جامعة سيدي محمد بن عبد الله بفاس
ⵜⴰⵙⴷⴰⵡⵉⵜ ⵙⵉⴷⵉ ⵎⵓⵃⵎⵎⴰⴷ ⴱⵏ ⵄⴱⴷⵍⵍⴰⵀ ⵏ ⴼⴰⵙ
UNIVERSITÉ SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH DE FES

كلية العلوم ظهر المهراز فاس
ⵜⴰⵖⵉⵡⴰⵏⵜ ⵏ ⵜⵎⵙⵙⵓⵏⵜ ⵉⵀⴰⵕ ⵍⵎⵀⵔⴰⵣ ⴼⴰⵙ
FACULTE DES SCIENCES DHAR EL MAHRAZ FES

N° d'ordre : 64/22

Centre des Etudes : ***Sciences et Techniques et Sciences Médicales***

Formation Doctorale : ***Ressources Naturelles, Environnement et Développement Durable (RNE2D)***

Discipline : ***Biologie***

Spécialité : ***Gestion et Valorisation des Bioressources (GVBR)***

Laboratoire : ***Biotechnologie, Conservation et Valorisation des Ressources Naturelles (LBCVRN)***

THÈSE DE DOCTORAT

Optimisation de la production d'enzymes chez les endophytes fongiques pour la dégradation de la biomasse végétale en vue de production du bioéthanol de seconde génération à haute température

Présentée par :

L o u b n a S E D D O U K

Soutenue le 29 / 11 / 2022 devant le jury :

Nom et Prénom	Grade	Etablissement	
Pr. BEKKARI Hicham	PES	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Fès	**Président**
Pr. BAHHOU Jamila	PES	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Fès	**Rapporteur**
Pr. BOUCHELTA Aziz	PES	Faculté des Sciences Meknès	**Rapporteur**
Pr. CHAHLAOUI Abdelkader	PES	Faculté des Sciences Meknès	**Rapporteur**
Pr. LOUASTE Bouchra	PES	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Fès	**Examinateur**
Pr. BOUIA Abdelhak	PES	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Fès	**Examinateur**
Pr. JANATI IDRISSI Abdellatif	PES	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Fès	**Directeur de thèse**
Pr. JAMAI Latifa	PH	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Fès	**Co-Directeur de thèse**

Année Universitaire : 2022-2023

A mes parents bien-aimés

Merci pour vos précieux sacrifices et votre compassion

Merci de m'avoir aidé à réussir

Vos encouragements et vos prières m'ont toujours soutenue et guidé

Acceptés l'expression de ma gratitude et mon profond amour

A ma très chère Sœur Nawal

Merci de ton assistance, soutien et encouragements

A toute ma famille et mes amis

A tous ceux qui me sont chers

Remerciements

Je tiens à remercier particulièrement mon directeur de thèse, le professeur JANATI IDRISSI Abdellatif. Sa haute compétence scientifique, ses qualités humaines et pédagogiques, son soutien, sa gentillesse et sa grande disponibilité qui ont été pour moi une source précieuse de réconfort et d'encouragement m'ont poussé pour mener à bien ce travail et atteindre mes objectifs.

Je remercie le professeur JAMAI Latifa pour la co-direction de la thèse. Je voudrais lui exprimer toute ma reconnaissance pour son encadrement scientifique, sa disponibilité, ses conseils très enrichissants et son aide tout au long de ce travail.

Je remercie très vivement le professeur ETTAYEBI Mohamed pour son aide, sa richesse scientifique et ses conseils précieux.

Mes vifs remerciements s'adressent également au professeur BAHHOU Jamila pour son support, son aide scientifique et ses critiques constructives dans la correction de la thèse.

Mes remerciements vont également au président BEKKARI Hicham d'avoir accepté la charge de présider le jury de cette thèse.

Je tiens également à exprimer mes vifs remerciements et ma gratitude aux membres de jury pour la confiance qu'ils m'ont témoigné et l'honneur qu'ils ont fait en acceptant de juger ce travail: professeur BAHHOU Jamila à FSDM, professeur BOUCHELTA Aziz à la Faculté des Sciences Meknès, professeur CHAHLAOUI Abdelkader à la Faculté des Sciences Meknès, professeur LOUASTE Bouchra à FSDM et professeur BOUIA Abdelhak à FSDM. Veuillez accepter l'expression de mon profond respect et ma vive reconnaissance

J'aimerais également remercier les membres du Laboratoire de « Biotechnologie, Conservation et Valorisation des Ressources Naturelles (LBCVRN) » de m'avoir accueilli chaleureusement au sein de leur laboratoire, pour leur bienveillance, l'aide considérable que vous m'avez apportée durant ce chemin de recherche et de m'avoir donné l'opportunité de partager l'ambiance du travail.

Je tiens à remercier aussi les professeurs et les personnels du Département de Biologie et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

J'exprime mes profonds remerciements aux autres chercheurs et tous mes amis pour l'aide et l'amitié qu'ils m'ont apportés.

Mes meilleures pensées et sentiments s'adressent à mes parents, ma sœur et à ma collège Karima, pour leurs sacrifices. Ils ont été un soutient incontestable pour poursuivre ces travaux de recherche jusqu'à la fin. Les mots ne suffisent plus à exprimer ma reconnaissance.

Résumé

Le bioéthanol lignocellulosique à base de matériels premiers non alimentaires est une solution bioénergétique durable qui réduit la dépendance aux combustibles fossiles. Cependant, la demande accrue d'enzymes hydrolytiques dans les industries du bioéthanol fait l'objet de plusieurs projets de recherche visant à explorer de nouveaux producteurs d'enzymes hydrolytiques. Dans ce contexte, la première partie de notre travail a ciblé l'isolement des endophytes fongiques à potentiel hydrolytique à partir de cinq espèces de plantes. 101 isolats d'endophytes fongiques sont obtenus et purifiés des tissus internes frais. Le criblage qualitatif montre que ces isolats représentent une source potentielle d'amylase, de cellulase et de laccase d'intérêts industriels. L'étude phylogénétique a identifié l'isolat JO-A en tant que *Preussia africana* avec une homologie de 97%. La présente étude est le premier rapport approfondi réalisé dans la région d'Ifrane sur l'isolement et l'identification des mésophiles *Preussia africana* JO-A et *Melanocarpus* sp. JO-V_2 en tant que producteurs d'enzymes cellulases et laccases. La deuxième partie de la recherche a porté sur divers paramètres physico-chimiques et conditions de croissance pour améliorer les niveaux de production d'enzymes chez *P. africana* JO-A et *Melanocarpus* sp. JO-V_2, avec un taux d'activité laccase supérieur à 100%. Une amélioration de dix fois de l'activité cellulase initiale est obtenue par rapport aux conditions non optimisées. Les facteurs sélectionnés ont été statistiquement optimisés pour la production de cellulase en utilisant la méthodologie de surface de réponse (RMS). Une amélioration de plus de 100% de la production de cellulase est obtenue avec RMS comparé aux conditions initiales non optimales. Des filtrats concentrés de cellulases et de laccases sont caractérisés. L'activité optimale de la cellulase a été atteinte à une température de 50 °C, à un pH de 5,0 et à une demi-vie de 24 heures. La laccase concentrée a révélé une activité maximale à un pH 5,0 et à une température de 40 °C. Dans la dernière partie de cette thèse, nous avons étudié la capacité du consortium d'endophytes fongiques à convertir directement la biomasse des figuier pour la rendre plus accessible aux enzymes et améliorer la quantité de sucres fermentescibles libérés lors la saccharification. Une valorisation énergétique de l'hydrolysat de figuier prétraité en bioéthanol est réalisée avec la souche thermotolérante *K. marxianus* sous le processus de fermentation SHF. Une quantité maximale d'éthanol de 23,70 $g.L^{-1}$ est obtenue par *K. marxianus* avec un rendement en éthanol de 0,43 $g.g^{-1}$ et une efficacité de fermentation de 80% comparé à *S. cerevisiae.* Ces processus optimisés de bioconversion de la lignocellulose pourraient être appliqués à grande échelle en tant qu'alternative énergétique respectueuse de l'environnement.

Mots clés : Ifrane, Endophytes fongiques, Cellulases, Laccases, Méthodologie de surface de réponse, Peau de figuier, Hydrolyse et fermentation séparée, Bioéthanol de deuxième génération

Abstract

Lignocellulosic bioethanol from non-food feedstocks is a sustainable bioenergy solution that reduces dependence on fossil fuels. However, the increased demand for hydrolytic enzymes in the bioethanol industries is the subject of several research projects aimed at exploring new hydrolytic enzyme producers. In this context, the first part of our work targeted the isolation of fungal endophytes with hydrolytic potential from five plant species. 101 fungal endophyte isolates are obtained and purified from fresh internal tissues. The qualitative screening shows that these isolates represent a potential source of amylase, cellulase and laccase of industrial interest. The phylogenetic study identified isolate JO-A as *Preussia africana* with a homology of 97%. The present study is the first extensive report carried out in the Ifrane region on the isolation and identification of the mesophilic *Preussia africana* JO-A and *Melanocarpus* sp. JO-V_2 as producers of cellulase and laccase enzymes. The second part of the research focused on various physicochemical parameters and growth conditions to improve the levels of enzyme production in *P. africana* JO-A and *Melanocarpus* sp. JO-V_2, with a rate of laccase activity that is above 100%. A ten-fold improvement in the initial cellulase activity is achieved in comparison with the non-optimized conditions. The selected factors were statistically optimized for cellulase production using response surface methodology (RMS). An improvement of more than 100% of the cellulase production is obtained with RMS compared to the initial non-optimal conditions. Concentrated cellulase and laccase filtrates are characterized. Optimal cellulase activity was achieved at a temperature of 50 °C, pH 5.0 and a half-life of 24 hours. Concentrated laccase showed maximum activity at pH 5.0 and a temperature of 40 °C. In the final part of this thesis, we investigated the ability of the fungal endophyte consortium to directly convert fig biomass to make it more accessible to enzymes and improve the amount of fermentable sugars released during saccharification. An energetic valorization of pretreated fig tree hydrolysate into bioethanol is realized with the thermotolerant strain *K. marxianus* under a SHF fermentation process. A maximum amount of ethanol of 23.70 $g.L^{-1}$ is obtained by *K. marxianus* with an ethanol yield of 0.43 $g.g^{-1}$ and a fermentation efficiency of 80% compared to *S. cerevisiae*. These optimized lignocellulose bioconversion processes could be applied on a large scale as an environmentally friendly energy alternative.

Keywords: Ifrane, Fungal endophytes, Cellulases, Laccases, Surface response methodology, Fig tree skin, Hydrolysis and separate fermentation, Second generation bioethanol

Table des matières

Résumé ..... **iii**
Abstract ..... **iv**
Liste des figures ..... **xii**
Liste des tableaux ..... **xvi**
Liste des abréviations ..... **xviii**
Introduction générale **1**
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE **4**
Chapitre I : Endophytes fongiques **5**
I. Généralités sur les endophytes 5
II. Définition des endophytes fongiques 5
III. Distribution des endophytes fongiques 6
III.1. Endophytes fongiques marins 6
III.2. Endophytes fongiques lignocellulosiques 7
IV. Classification et diversité des endophytes fongiques 9
IV.1. Mode de reproduction 10
IV.2. Mode de transmission 10
IV.3. Nutrition 10
IV.4. Colonisation 11
IV.5. Mode d'infection 12
V. Applications biotechnologiques des endophytes fongiques 12
Chapitre II : Dégradation de la biomasse lignocellulosique par les enzymes hydrolytiques **16**
I. Source de lignocellulose 16
I.1. Généralités sur la biomasse lignocellulosique 16
I.2. Résidus végétales 17
II. Structure et composants majeurs de la biomasse lignocellulosique 17
II.1. Cellulose 18
II.2. Hémicelluloses 19
II.3. Lignine 19
III. Prétraitement de la biomasse lignocellulosique 20
III.1. Généralités sur les procédés de prétraitement 20
III.2. Prétraitement biologique 21
IV. Enzymes hydrolytiques de lignocellulose 22
IV.1. Enzymes cellulolytiques 22
IV.1.1. Cellulases 22

IV.1.2. Endophytes fongiques cellulases 24
IV.2. Enzymes ligninolytiques 24
IV.2.1. Laccases 25
IV.2.2. Endophytes fongiques laccases 27
Chapitre III : Production de bioéthanol lignocellulosique 28
I. Généralités sur le bioéthanol de deuxième génération 28
II. Matières premières 29
III. Procédés de fermentation 29
IV. Levures thermotolérantes 31
Partie 1 : Isolement, purification et identification des endophytes sélectionnés 33
MATERIELS ET METHODES 34
I. Collection d'échantillon végétal 34
I.1. Site d'étude 34
I.2. Choix de matériel végétal 35
II. Isolement des endophytes fongiques 35
II.1. Traitement des échantillons 35
II.2. Mise en culture 35
III. Purification des endophytes fongiques isolées 36
IV. Conservation des endophytes fongiques isolées 37
V. Identification classique des endophytes fongiques 37
VI. Identification moléculaire de la souche d'intérêt JO-A 37
VI.1. Extraction de l'ADN fongique 37
VI.2. PCR, séquençage et analyse phylogénétique 38
RESULTATS ET DISCUSSION 38
I. Identification classique des souches sélectionnées 38
II. Identification moléculaire de la souche JO-A 44
CONCLUSION 45
Partie 2 : Criblage d'activités hydrolytiques de la biomasse lignocellulosique chez les endophytes fongiques 46
MATERIELS ET METHODES 47
I. Criblage des endophytes fongiques producteurs d'enzymes hydrolytiques 47
I.1. Test d'amylase 47
I.2. Test de cellulase 47
I.2.1. Essai qualitatif 47
I.2.2. Analyses quantitatives 48

I.2.2.1. Production des enzymes cellulolytiques par les endophytes sélectionnés 48
I.2.2.2. Détermination des activités cellulases 48
I.2.2.3. Cinétiques de la production d'activité cellulase par les endophytes sélectionnés 49
I.3. Test de laccase 49
I.3.1. Essai qualitatif 49
I.3.2. Production de laccases par les endophytes sélectionnés 49
I.3.2.1. Dosage de l'activité laccase 50
I.3.2.2. Mesure de la matière sèche fongique 50
II. Influence des différents facteurs sur la production de l'activité laccase par l'endophyte JO-V_2 51
II.1. Effet du diamètre du mycélium 51
II.2. Effet de la température 51
II.3. Effet des éléments nutritifs 51
II.4. Effet des inducteurs 51
II.5. Effet des concentrations de glucose, de nitrate de sodium et de sulfate de cuivre 51
III. Propriétés physico-chimique de l'extrait laccase de la souche JO-V_2 52
III.1. Purification de l'extrait d'enzyme 52
III.2. Température optimale 52
III.3. pH optimal 52
III.4. Stabilité de l'activité laccase 52
III.5. Activité laccase à différentes concentrations de substrat 53
IV. Analyse statistique 53
RESULTATS ET DISCUSSION 53
I. Endophytes fongiques amylolytiques 53
II. Détermination des souches cellulolytiques 56
II.1. Essai qualitatif 56
II.2. Analyses quantitatives 58
II.2.1. Production d'activités cellulolytiques en milieu liquide 58
II.2.2. Cinétique de la production des activités cellulases par les souches sélectionnées 60
III. Endophytes fongiques laccases positifs 61
III.1. Test qualitatif 61
III.2. Cinétique de la production de l'activité laccase par les endophytes sélectionnés 63
IV. Influence des facteurs sur la production de l'activité laccase par l'endophyte JO-V_2 66
IV.1. Effet du diamètre du mycélium et de la température d'incubation 66

IV.2. Effet des éléments nutritifs et des inducteurs 67
IV.3. Effet des concentrations de glucose, de nitrate de sodium et de sulfate de cuivre 70
V. Propriétés physico-chimique de l'extrait enzymatique laccase produit par la souche JO-V_2 72
V.1. Evaluation du pH et de la température optimale de l'activité laccase 73
V.2. Stabilité de l'activité laccase 74
V.3. Activité laccase à différents concentrations de substrat 76
CONCLUSION 78
Partie 3 : Optimisation de la production de cellulases par *P. africana* JO-A 79
MATERIELS ET METHODES 80
I. Matériel biologique 80
II. Choix du milieu optimum pour la production de l'activité cellulase par *P. africana* JO-A. 80
II.1. Milieux solides 80
II.2. Milieux liquides 80
III. Effets des différents facteurs sur la production de cellulase par *P. africana* JO-A 80
III.1. Concentration de CMC 81
III.2. Diamètre du mycélium fongique 81
III.3. Concentration de glucose 81
III.4. Température d'incubation 81
IV. Application de la méthode des surfaces de réponses pour l'optimisation de la production des cellulases par *P. africana* JO-A 81
IV.1. Conception du plan d'expérience pour la production maximale des cellulases 82
IV.2. Cinétique de la production de cellulases par *P. africana* JO-A selon les conditions optimisées de la RMS 83
IV.3. Comparaison de la production de cellulases par les différents endophytes fongiques sélectionnés 83
IV.4. Fermentation alcoolique du surnageant dans les conditions optimales 83
IV.4.1. Culture de levures 83
IV.4.2. Conditions de fermentation 84
V. Caractérisation de l'extrait cellulolytique de *P. africana* JO-A 84
V.1. Variation de l'activité cellulolytique en fonction de la température et du pH 84
V.2. Stabilité thermique de l'activité cellulolytique 84
V.3. Activités enzymatiques à différentes concentration de substrat 84
VI. Hydrolyse et fermentation alcoolique d'hydrolysat 85
VI.1. Hydrolyse enzymatique 85
VI.2. Fermentation alcoolique 85

VI.3. Méthodes analytiques....86
VI.3.1. Dosage d'éthanol....86
VI.3.2. Dosage des sucres réducteurs et totaux....86
VI.3.3. Détermination de la biomasse sèche des levures....86
VI.3.4. Détermination de la productivité volumétrique, du rendement et de l'efficacité de la fermentation....86
VII. Analyse statistique....87
RESULTATS ET DISCUSSION....87
I. Choix du milieu d'activité cellulase optimale produite par *P. africana* JO-A....87
II. Effets des différents facteurs sur la production des cellulases par *P.africana* JO-A....89
II.1. Concentration de CMC....89
II.2. Diamètre du mycélium fongique....89
II.3. Concentration de glucose....90
II.4. Température d'incubation....90
III. Optimisation de la production des cellulases par *P. africana* JO-A par la méthode des surfaces de réponses....93
III.1. Résultats de la régression des modèles adoptés....93
III.2. Validation statistique des modèles et l'étude des effets des facteurs....95
III.3. Représentation en surfaces de réponses....100
III.4. Cinétique de la production des enzymes cellulolytiques par *P. africana* JO-A....104
III.5. Comparaison de la production des cellulases par les différents endophytes sélectionnés 105
III.6. Evaluation de la production d'éthanol et de biomasse....106
IV. Caractérisation de l'extrait cellulolytique de *P. africana* JO-A....108
IV.1. Effet du pH sur l'activité cellulolytique....108
IV.2. Effet de la température sur l'activité cellulolytique....108
IV.3. Etude de la stabilité thermique de l'activité cellulolytique....109
IV.4. Effet de la concentration du substrat sur les activités cellulases....112
V. Saccharification et fermentation de l'hydrolysât....114
V.1. Hydrolyse enzymatique par le concentrât cellulolytique de JO-A....114
V.2. Fermentation alcoolique d'hydrolysât....114
CONCLUSION....118
Partie 4 : Production de bioéthanol à partir du figuier de barbarie sous SHF....120
MATERIELS ET METHODES....121
I. Substrat lignocellulosique....121
I.1. Préparation du substrat de fermentation....121

I.2. Caractérisation physico-chimiques de la poudre de peau de figuier.....121
I.2.1. Teneur en eau.....121
I.2.2. Teneur en cendre.....122
I.2.3. Teneur en hydrates de carbone.....122
I.2.4. Teneur en protéine totale.....122
I.2.5. Teneur en polyphénols totaux.....122
II. Production d'enzymes par les endophytes en utilisant la poudre de peau de figuier comme source de carbone.....123
II.1. Mise en culture des endophytes.....123
II.2. Détermination du poids sec de figuier traitée.....123
III. Fermentation en batch de la production d'éthanol à partir des suspensions de peau de figuier prétraitées.....124
IV. Production d'hydrolysat de la peau de figuier de barbarie.....124
IV.1. Prétraitement de la poudre de peau de figuier.....124
IV.1.1. Prétraitement acide.....124
IV.1.2. Prétraitement fongique.....125
IV.2. Production d'hydrolysat enzymatique du figuier prétraitée.....126
IV.3. Méthodes analytiques.....127
IV.3.1. Détermination du rendement en SRT et la récupération de solide.....127
IV.3.2. Calcule du pourcentage de conversion de substrat et d'efficacité d'hydrolyse 127
V. Etude de la fermentation alcoolique de l'hydrolysât du figuier prétraitée par trois souches de levure.....127
V.1. Production de bioéthanol en milieu chimiquement défini.....127
V.2. Production de bioéthanol à partir d'hydrolysat de figuier sous SHF.....128
V.2.1. Préparation du surnageant de l'hydrolysat.....128
V.2.2. Conditions de la fermentation.....128
V.2.3. Calcule du rendement de la conversion SRT.....128
RESULTATS ET DISCUSSION.....129
I. Caractérisation de la poudre de peau de figuier.....129
II. Effet de la supplémentation du substrat sur la production d'enzymes par les endophytes sélectionnés.....130
III. Production de bioéthanol et de biomasse à partir des suspensions prétraitées de figuier de barbarie.....135
IV. Prétraitement du substrat peau de figuier.....139
IV.1. Optimisation du prétraitement acide.....139
IV.2. Optimisation du prétraitement fongique.....144

V. Hydrolyse enzymatique du substrat traité et non traité 149
VI. Cinétiques de la production de bioéthanol dans un milieu chimiquement défini 154
VII. Cinétique de la production de bioéthanol à partir de l'hydrolysat de peau de figuier sous SHF 156
CONCLUSION 161
Conclusion générale 163
Références bibliographiques 168
Annexe 1 200
Annexe 2 205

Liste des figures

Figure 1: Exemple d'interaction entre l'endophyte fongique et sa plante hôte *Trichilia elegans*. (A) Aspect macroscopique d'endophyte fongique, (B) visualisation microscopique des spores et des hyphes d'endophyte fongique et (C) coupe histologique de la feuille de la feuille de *Trichilia elegans* avec les hyphes fongiques (Corrêa et al., 2014).....6
Figure 2: Symbiose bénéfique établie par l'endophyte fongique et sa plante hôte (in Jia et al., 2016).....9
Figure 3: Schéma d'association de l'endophyte fongique avec la plante hôte. (A) Modes de croissance de l'endophyte fongique dans les tissus de la plante hôte et (B) emplacement de diverses classes d'endophytes fongiques (Rodriguez et al., 2009) 11
Figure 4: Structure de la biomasse lignocellulosique avec un exemple de structure de (L-arabino)-4-O-methyl-D-glucurono-D-xylane (Alonso et al., 2012 ; Ebringerova, 2005 ; Calvo-Flores et Dobado, 2010) 20
Figure 5: Schéma de la dégradation enzymatique de la cellulose par l'action synergique de trois cellulases (Juturu et Wu, 2014) 23
Figure 6: Cycle catalytique des laccases (A) (Wesenberg et al., 2003) ; Schéma du site actif d'une laccase et la position des sites T1, T2 et T3 (B) (Pardo et Camarero, 2015) et la structure 3D de la laccase du fongique *Trametes trogii* (C) (Matera et al., 2008).....26
Figure 7: Différents modes de fermentation industrielle qui utilisent la biomasse lignocellulosique pour la production du bioéthanol ; SHF : Hydrolyse et fermentation séparée ; SSF : Saccharification et fermentation simultanée ; CBP : Bioprocédé consolidé (Chen et al., 2020).....30
Figure 8: Site d'échantillonnage de plantes dans la forêt en face de l'Oued Zerrouka 1 situé dans la région du Moyen Atlas, province d'Ifrane, Maroc (Décembre 2019).....34
Figure 9: Echantillons de plantes utilisées lors des isolements 1 et 2 (novembre 2017, décembre 2019).....35
Figure 10: Boites de PDA inoculées stérilement avec des fragments de tige et de feuille 36
Figure 11: Exemples d'endophytes fongiques purifiés sur le milieu PDA 39
Figure 12: Aspect de colonies fongiques sur le milieu solide PDA (A) et aspect microscopique (G×40) d'endophytes lignocellulosiques sélectionnés (B).....43
Figure 13: Profil de séparation électrophorèse des fragments amplifiés par PCR de l'isolat endophyte fongiques JO-A sur gel d'agarose à 2% 44
Figure 14: Arbre phylogénétique indique les faisceaux d'endophyte fongique *P. africana* JO-A 45
Figure 15: Zones de dégradations d'amidon des endophytes amylolytiques (JO-A_{15}), (JO-G_2), (JO-I), (JO-O_1), (JO-Q_5), (JO-V_3) et (JO-Y_1) avec le contrôle négative d'amylase (JO-A) sur le milieu amidon gélosé 54
Figure 16: Halos de dégradation de cellulose des endophytes cellulolytiques (JO-A), (JO-A_1), (JO-A_{13}), (JO-I), (JO-M), (JO-V_2) et (JO-Y_1) avec le contrôle négative de la cellulase (JO-A_0) sur le milieu CMC gélosé.....58
Figure 17: Production d'enzymes cellulases et de biomasse sèche par les endophytes sélectionnées à 28°C.....59
Figure 18: Aspect de cultures des endophytes fongiques développés séparément dans le milieu basique CMC pendant 7 jours à 28 °C 59
Figure 19: Sécrétion des activités CMCase et FPase dans le milieu de culture par JO-A (A), JO-I (B), JO-M (C) et JO-V_2 (D) développés séparément pendant 11 jours à 28 °C.....61

Figure 20: Zones d'oxydation du guaïacol obtenues avec les endophytes laccases positifs (JO-L_1), (JO-N_1), (JO-T), (JO-U_3), (JO-V_2), (JO-V_4) et (JO-X_3). JO-J_2 représente le contrôle négatif de la laccase sur le milieu PDA gélosé avec guaïacol.....62
Figure 21: Effet du temps de fermentation sur la synthèse de laccases par les souches endophytes sélectionnées dans le milieu MM à 28 °C.....64
Figure 22: Poids sec des cellules fongiques développés dans un milieu MM à 28 °C pendant 15 jours.....65
Figure 23: Aspect des cultures des endophytes fongiques développés sur le milieu MM pendant 15 jours à 28°C.....65
Figure 24: Effets de la taille d'inoculum en nombre de disques (A) et la température d'incubation (B) sur la sécrétion de laccase par l'endophyte JO-V_2.....66
Figure 25: Effets de différents sources de carbones (A), d'azotes (B) et d'inducteurs (C) sur la production de laccase par l'endophyte JO-V_2.....69
Figure 26: Effets de divers concentration de glucose (A), de nitrate de sodium (B) et de sulfate de cuivre sur la sécrétion de laccase par l'endophyte JO-V_2.....71
Figure 27: Effet de la température d'incubation (A) et du pH (B) sur l'activité laccase de l'endophyte JO-V_2.....73
Figure 28: Stabilité de l'extrait laccase de l'endophyte JO-V_2 dans une large gamme de pH (A) et de températures d'incubation (B) pendant 24 heures.....75
Figure 29: Effet de différentes concentrations de guaïacol sur l'activité laccase de l'endophyte JO-V_2.....77
Figure 30: Activités enzymatiques de l'endophyte JO-A sur les quatre milieux basiques.....88
Figure 31: Aspect de culture de *P. africana* JO-A sur les quatre milieux basiques.....88
Figure 32: Effet de la concentration de CMC en % p/v (A), diamètre de fragment du mycélium (B), concentration en glucose % p/v (C) et la température (D) sur les activités CMCase et FPase sécrétés par *P. africana* JO-A.....91
Figure 33: Graphiques des modèles de régression avec les valeurs observées et prévues pour la production des acticités CMCase (A), FPase (B) et la production de la biomasse sèche (C) par *P. africana* JO-A.....99
Figure 34: Classification des effets des coefficients des modèles statistiques et leurs interactions reliant la production de cellulases (A), (B) et la production de biomasse de *P. africana* JO-A (C) aux trois facteurs. X 1 : Température, X 2 : Quantité de glucose et X_3 : Temps d'incubation...100
Figure 35: Tracés tridimensionnelle de surface de réponse montrant l'effet de l'interaction de différents paramètres.....102
Figure 36: Profil multiple de désirabilité des conditions optimales de la production des cellulases et de biomasse fongique.....103
Figure 37: Cinétique des activités CMCase et FPase et la biomasse dans le milieu de culture de *P. africana* JO-A développé dans les conditions optimisées de la RMS.....104
Figure 38: Production d'activités cellulases par différents endophytes dans les conditions optimisées (RMS) de *P. africana* JO-A.....105
Figure 39: Profil de la production d'éthanol par les trois souches de levures : (A) *S. cerevisiae* ; (B) *K. marxianus* et (C) *C. tropicalis*, à partir du surnageant de la culture de *P. africana* JO-A dans les conditions de la RMS à 37 °C.....107
Figure 40: Effet du pH (A) et de la température (B) sur les deux activités cellulolytiques de *P. africana* JO-A.....109

Figure 41: Thermostabilité des deux activités cellulolytiques de *P. africana* JO-A à 50 °C, 60°C, 70 °C pour divers périodes d'incubation (A et B). (C) Thermostabilité de CMCase et FPase à la température et pH optimums (50 °C, pH 5.0) à différents temps d'incubation 110
Figure 42: Effet de la concentration des substrats sur les activités CMCase et FPase de l'extrait enzymatique produit par *P. africana* JO-A à pH 5.0 et à 50 °C.....113
Figure 43: Production d'éthanol par les trois souches de levure pendant 24 heures à 37 °C, à partir de deux hydrolysats du milieu synthétique et de peau de figuier, saccharifié par l'enzyme commercial et l'enzyme produit par JO-A. S.C : *S. cerevisiae* ; K.M : K. *marxianus* ; *C.T* : *C. tropicalis*.....116
Figure 44: Profil de fermentation de *K. marxianus* avec deux hydrolysats, hydrolysés par l'enzyme produit de la souche JO-A pendant 82 heures à 37 °C: (A) Milieu synthétique ; (B) Milieu avec la peau de figuier 118
Figure 45: Peau de figuier de Barbarie 'variété Moussa' 121
Figure 46: Aspect de la culture de JO-A, JO-V_2 et le consortium (JO-A + JO-V_2) dans le milieu avec la peau de figuier non supplémenté.....131
Figure 47: Production d'enzymes cellulases (A ; B), laccases (C) et de biomasses (D ; E) par les souches sélectionnées sous SmF à partir de poudre de peau de figuier en milieu supplémenté et non supplémenté.....133
Figure 48: Production d'éthanol par trois souches de levure à partir de différents cultures de peau de figuier non-supplémentée prétraitées avec les endophytes fongiques à 39 °C pendant 24 heures. S.A : Suspension prétraitée avec la souche JO-A ; S.V_2 : Suspension prétraitée avec JO-V_2 ; S.A+V_2 : Suspension prétraitée avec les souches JO-A et JO-V_2.....137
Figure 49: Aspect de cultures après fermentation par les trois souches de levure pendant 24 heures à 39 °C, à partir de suspensions prétraitées par le consortium de JO-A et JO-V_2.....137
Figure 50: Profil de fermentation de la souche *K. marxianus* à partir d'une culture prétraitée avec le consortium de souches JO-A et JO-V_2 à 39 °C pendant 96 heures.....139
Figure 51: Aspect des suspensions non traitées et traitées avec différents types d'acides à 1% pour 10% de charge solide à 121°C pendant 20 minutes.....140
Figure 52: Biomasses de résidus solides de figuier non traités et les sucres libérés au cours de l'hydrolyse acide des échantillons de peau de figuier avec différents : (A) types d'acides ; (B) concentration de substrat % (p/v) ; (C) concentration d'acide sulfurique % (v/v) et (D) temps d'hydrolyse.....142
Figure 53: Aspect des hydrolysats de figuier prétraités avec 3% d'acide sulfurique pour une charge en solide de 10% à 121°C pendant différentes périodes d'incubation 143
Figure 54: Effet de la variation du nombre d'inoculum au cours du prétraitement fongique de la peau de figuier non supplémentée avec des souches sélectionnées sur la libération de sucres (A), la biomasse solide de figuier non hydrolysée (B) et la biomasse fongique (C) à 28 °C pendant 10 jours.....146
Figure 55: Aspect de la culture en consortium (JO-A + JO-V_2) avec variation du nombre d'inoculum pendant le prétraitement fongique de la peau de figuier à 28 °C durant 10 jours ...147
Figure 56: Quantités de biomasses et de sucres libérés au cours du prétraitement fongique avec la combinaison des souches JO-A et JO-V_2 pendant 30 jours à 28 °C 148
Figure 57: Dégagement de sucres (A) et de biomasse de résidus non hydrolysés (B) après hydrolyse enzymatique de différentes biomasses avec 20 $IU.g^{-1}$ d'enzyme pendant 24 heures. T : biomasse non hydrolysée par les enzymes ; E.I : B. hydrolysé avec les enzymes industrielles $IU.g^{-1}$; E.P : B. hydrolysé avec des enzymes produites par les endophytes fongiques isolés $IU.g^{-1}$; M.E : B. hydrolysé avec mélange d'enzymes industrielles et produits $IU.g^{-1}$ 151

Figure 58: Effet de la concentration des enzymes et de la période d'hydrolyse sur le dégagement de sucres (A) et la biomasse des résidus non traités (B) 153
Figure 59: Profils de fermentation de trois souches de levure : (A) *S. cerevisiae* ; (B) *K. marxianus* et (C) *C. tropicalis,* dans un milieu synthétique contenant une concentration de glucose semblable à l'hydrolysat enzymatique de la peau de figuier 155
Figure 60: Profils de fermentation de trois souches de levure : (A) *S. cerevisiae* ; (B) *K. marxianus* et (C) *C. tropicalis*, dans l'hydrolysat de la peau de figuier.....160
Figure 61: Aspect de cultures avec les trois souches de levure après 96 heures de fermentation à 39 °C sur (A) Hydrolysat de la peau de figuier ; (B) milieu synthétique.....160

Liste des tableaux

Tableau 1: Caractérisation des quatre classes d'endophytes fongiques en fonction des critères symbiotiques (Rodriguez et al., 2009) 10
Tableau 2: Propriétés biologiques des métabolites secondaires sécrétés par une variété d'endophytes fongiques..... 13
Tableau 3: Endophytes fongiques produisant des enzymes hydrolytiques et leurs plantes hôtes 14
Tableau 4: Composition de quelques biomasses lignocellulosiques brutes (% du poids sec total) 18
Tableau 5: Listes d'endophytes fongiques isolés de différentes plantes 36
Tableau 6: Programme de la réaction de PCR 38
Tableau 7: Endophytes amylolytiques isolés des échantillonnages 1 et 2 avec les diamètres de croissances et les halos de dégradation 55
Tableau 8: Endophytes cellulolytiques des échantillonnages 1 et 2 avec la croissance mycélium et la production de cellulase (diamètre d'halo et la zone d'activité) sur un milieu CMC gélosé.. 57
Tableau 9: Endophytes laccases positives de l'échantillonnage 2 avec les diamètres de la croissance et les halos d'oxydation 62
Tableau 10: Correspondance entre les valeurs réelles et les valeurs codées 82
Tableau 11: Comparaison d'activité cellulase (diamètre d'halo, zone d'activité) de l'endophyte JO-A sur les trois milieux basiques..... 87
Tableau 12: Effet de la variation de la température sur la croissance fongique et la production de cellulases par *P. africana* JO-A dans un milieu CMC gélosé 92
Tableau 13: Matrice de la conception RMS - Box - Behnken avec les variables significatives affectant la production des activités et de la biomasse à partir de *P. africana* JO-A, avec des valeurs expérimentales et prévues des réponses..... 95
Tableau 14: Analyse de variance des expériences statistiques conçoit pour les modèles de régression pour la production de cellulases et de la biomasse pour le modèle Box – Behnken ... 97
Tableau 15: Effets des coefficients des modèles statistiques reliant la production de cellulases et de la biomasse aux trois facteurs..... 98
Tableau 16: Potentiel de production de bioéthanol des trois souches de levures avec le surnageant de production de *P. africana* JO-A dans les conditions optimisées à 37 °C 107
Tableau 17: Comparaison de l'optimum de pH et de la température de cellulases *P .africana* JO-A et d'autres cellulases fongiques..... 112
Tableau 18: Potentiel de production d'éthanol des trois souches de levure avec deux types d'hydrolysats du milieu synthétique pendant 24 heures à 37 °C 116
Tableau 19: Potentiel de production d'éthanol des trois souches de levure avec deux types d'hydrolysats de peau de figuier pendant 24 heures à 37 °C 117
Tableau 20: Caractérisation de la biomasse sèche de la peau de figuier de barbarie 130
Tableau 21: Potentiel de production d'éthanol des trois souches de levure avec différentes cultures de figuier prétraitées par des endophytes à 39 °C pendant 24 heures 138
Tableau 22: Paramètres de fermentation des trois souches de levure à 39 °C pendant 96 heures avec un milieu chimiquement défini 156

Tableau 23: Paramètres de fermentation obtenus à partir des cinétiques des trois levures dans l'hydrolysat de la peau de figuier à 39 °C.....161

Liste des abréviations

ABTS : 2,2’-azino-di-3-ethylbenzotiazol-6-sulfonate acid
ADN : Acide désoxyribo-nucléique
BLAST : Outil de recherche d’alignement local de base
BSA : Sérum albumine bovine
CAM : Fixateurs du métabolisme acide
Cm : Centimètre
CMC : Carboxy-méthyl cellulose
CPB : Bio-traitement consolidé
CTAB : Bromure de cétyltriméthylammonium
$CuSO_4$: Sulfate de cuivre
DNS : Réactif 3,5-dinitrosalicylique
EAG : Equivalent Acide Gallique
EDTA : Acide Ethylène-Diamine-Tétra-Acétique
H : Heure
IU : Unité enzymatique
kDa : Kilo dalton
KI : Iodure de potassium
KII_2 : Solution Iodo-iodurée
M : Molaire
MM : Milieu minimum
$NaNO_3$: Nitrate de sodium
NCBI: Centre national d’information biotechnologique
PCR : Réaction en chaine de la polymérase
PDA : Potato dextrose agar
p/v : Poids/volume
RMS : Méthodologie de surface de réponse
Rpm : Rotations par minute
SHF : Hydrolyse et fermentation séparées
SmF : Fermentation immergée
SRT : Sucres réducteurs totaux
SSF : Saccharification et fermentation simultanée
SSS : Tige de sorgho sucré
ZA : Zone d'activité
µM : Micromole

Introduction générale

L'épuisement continu des réserves de combustibles fossiles et l'augmentation de la demande d'énergie représentent un défi et une préoccupation à l'échelle mondiale. En effet, d'après certaines estimations la consommation mondiale d'énergie augmenterait de 35% au cours des 20 prochaines années pour répondre aux besoins croissants en énergie notamment dans les pays industrialisés (Fatehi, 2013 ; Udeh et Erkurt, 2017). La résolution de ces problèmes nécessite l'exploration de nouvelles sources d'énergie et des précurseurs alternatifs durables et non polluantes, surtout dans les secteurs des transports et des industries chimiques pétrolières (Chen et al., 2020).

Les biocarburants ont été considérés comme une solution alternative qui réduit la dépendance à l'égard des combustibles fossiles et résout les problèmes de pollution environnementale essentiellement lié aux émissions de gaz à effet de serre et aux changements climatiques (Gaurav et al., 2017 ; Rodionova et al., 2016 ; Wu et al., 2017). Dans ce contexte, la biomasse lignocellulosique est une source attrayante de carbone renouvelable, disponible, peu coûteuse et écologique pour une utilisation à grande échelle (Wu et al., 2017).

Le développement de la technologie de production de biocarburant est essentiellement basé sur la bioconversion de la biomasse lignocellulosique en différents combustibles liquides, principalement le biodiesel (Scott et al., 2010), l'iso-butanol (Lan et Liao, 2013 ; Wu et al., 2016) et le bioéthanol cellulosique (Schuster et Chinn, 2013 ; Wu, 2013 ; Wu et al., 2013) et d'autres bio-produits. La bioconversion lignocellulosique en bioéthanol exige plusieurs étapes, à commencer par la collecte de biomasses, le prétraitement (thermochimique, physique ou biologique), l'hydrolyse enzymatique, la fermentation et la récupération du produit (Haghighi Mood et al., 2013).

Le principal obstacle de la bioconversion de la biomasse en biocombustibles liquides est la récalcitrante structurale des matières premières lignocellulosiques lors de la dégradation enzymatique. Toutefois, les étapes du prétraitement et de la saccharification prédominent sur les coûts opérationnels et réduisent la faisabilité économique de la bioconversion (Wang et al., 2013). Surtout le coût des enzymes cellulase et laccase qui joue un rôle crucial dans l'économie du bioéthanol cellulosique, en raison de leurs charges élevées au cours de l'hydrolyse des substrats lignocellulosiques (Nagraj et al., 2014). Ce coût des enzymes peut être réduit en isolant des micro-organismes cellulosiques et lignolytiques et en optimisant les conditions de la production enzymatiques. Même si plusieurs enzymes hydrolytiques ont été identifiées, les enzymes appliquées dans les industries ne sont pas toujours efficaces en raison de leurs instabilités en particulier dans les conditions extrêmes, telles que : la température élevée, le pH et la salinité (Li et Yu, 2013).

Dans la nature, la lignocellulose est un solide complexe et récalcitrant, composé de cellulose combinée à l'hémicellulose et à la lignine. Les endophytes fongiques constituent les principaux décomposeurs de la biomasse lignocellulosique en de petites molécules qui pourraient être converties en bioéthanol cellulosique. Cette dégradation biologique des glucides en sucres monomères est effectuée à l'aide de plusieurs enzymes hydrolytiques (Dyk et Pletschke, 2012).

Récemment, plusieurs recherches ont mis l'accent sur la grande diversité des endophytes fongiques dans leurs habitats originaux. Ces espèces produisent un large spectre d'enzymes lignocellulosiques peu coûteuses et très actives, possédant des propriétés spécifiques, comme : la thermostabilité et la tolérance d'un large spectre de pH utilisés dans les procédés industriels.

Dernièrement, les plantes sont considérées comme des ressources naturelles de composés actifs et un réservoir d'un nombre infini d'endophytes fongiques (Uzma et al., 2018). Plusieurs plantes ligneuses et graminées ont été exploités afin de valoriser leur biodiversité fongique (Amirita et al., 2012 ; Huang et al., 2015). La flore marocaine regroupe près de 4200 espèces de plantes vasculaires. Pour le genre *Juniperus*, 70 espèces ont été réparties sur l'ensemble de l'hémisphère nord (Lesjak et al., 2011). L'espèce endémique *Juniperus oxycedrus* appartient aux principales plantes aromatiques en médecine traditionnelle marocaine. Les constituants chimiques de *Juniperus oxycedrus* et leur rôle dans la santé humaine font l'objet de plusieurs études. Pourtant, moins d'attention a été attribuée à *Juniperus oxycedrus* comme une niche variée d'endophytes fongiques.

Au Maroc, la diversité des endophytes fongiques associés à *Juniperus oxycedrus* et leurs activités enzymatiques ont été signalées dans cette thèse pour la première fois en tant que rapport détaillé, en développant et en explorant le potentiel hydrolytique d'endophytes fongiques isolés comme source d'outils biotechnologiques à l'échelle industrielle.

Cette thèse vise à optimiser la production d'enzymes cellulase et laccase par les endophytes fongiques et à caractériser les extraits enzymatiques, afin de les utiliser pour décomposer la lignocellulose et libérer les sucres fermentescibles. Dans le cadre de la recherche sur les biomasses à faible coût, notre étude a mis l'accent sur la valorisation de la peau de figuier de barbarie comme matériau lignocellulosique pour la production d'enzymes et de bioéthanol.

Ce manuscrit est divisé en parties :

- La partie bibliographique comprend trois chapitres :
  - ✓ Le premier chapitre est consacré à l'étude des endophytes fongiques, détaillant leur classement et leur diversité, leurs applications biotechnologiques et leur distribution.
  - ✓ Le deuxième chapitre présente la dégradation de la biomasse lignocellulosique, y compris les sources de matières premières, les principaux composants et les différentes enzymes hydrolytiques.
  - ✓ Le troisième chapitre porte sur la production de bioéthanol lignocellulosique et précise les procédés de fermentation et les levures thermotolérantes utilisées.

Les quatre sections suivantes résument tous les travaux de la thèse. Chaque partie contient les matériels et méthodes ainsi que les résultats obtenus :

- La première partie est consacrée à l'isolement des endophytes fongiques des tissus internes du bois frais, à la purification et à l'identification des endophytes fongiques sélectionnés.
- La deuxième partie a porté sur le criblage des endophytes fongiques produisant des activités d'amylase, de laccase et de cellulase en milieu solide et liquide, suivi d'une étude détaillée

sur les effets de différents facteurs qui influencent la production de laccase par *Melanocarpus* sp..

- Quant à la troisième partie, elle présente le développement d'un processus de culture de *Preussia africana* JO-A pour une production élevée de cellulase. Il explique en détail la méthode statistique adoptée (RMS) pour optimiser les facteurs influençant la production maximale de cellulase et présente aussi la caractérisation de l'extrait cellulolytique de JO-A.
- La dernière partie est consacrée à la production de bioéthanol à partir d'hydrolysat du figuier. Elle traite d'abord la production d'enzymes cellulases et laccases par les endophytes fongiques en utilisant la poudre de figuier. La partie aborde également la bioconversion et à la valorisation énergétique de la peau de figuier en bioéthanol de deuxième génération par le procédé d'hydrolyse et de fermentation séparée (SHF), en optimisant toutes les étapes du prétraitement à la fermentation.

Finalement, la conclusion expose les principaux objectifs et les résultats atteints.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Endophytes fongiques

I. Généralités sur les endophytes

Les micro-organismes qui vivent à l'intérieur des tissus végétaux de façon endo-symbiotique sans causer de symptômes apparents sont appelés endophytes (Nisa et al., 2015 ; Stone et al., 2000). Cette nomenclature a été introduite par Dé bary (1866) et appliquée à tout organisme présent à l'intérieur des hôtes sans infection asymptomatique dans les tissus hôtes (Wu et al., 2017). Ces endophytes regroupent un large groupe de symbiotes végétaux très divers avec un aspect bénéfique relativement peu étudié et inexploré (González-Teuber, 2016), en offrant ainsi, une protection indirecte aux plantes hôtes contre les herbivores (Hartley et Gange, 2009). Ces organismes endophytes peuvent exister sous la forme de racine mutualiste ou être associés aux plantes hôtes.

Les endophytes ont des implications intéressantes sur la biodiversité fongique et la santé des plantes à la fois sur les tissus foliaires et sur les surfaces. Certaines espèces sont plus fréquemment trouvées telles que : les genres Aspergillus et Trichoderma (Kharwar et al., 2010 ; Robl et al., 2013). Plusieurs espèces endophytes mutualistes sont reconnues pour leur efficacité à augmenter la résistance des plantes hôtes contre les pathogènes et les herbivores (Sadrati et al., 2013) et même, améliorer la croissance et conférer une tolérance au stress biotique et abiotique de leur plante hôte (Singh et al., 2011).

Les endophytes sont généralement utilisés pour la synthèse des enzymes hydrolytiques en raison de leur facilité de culture, de leur productivité élevée et de leur utilisation pour dégrader les parois cellulaires (Goldbeck et al., 2013). L'espèce *A. niger* a été identifiée comme un endophyte à l'intérieur de plusieurs plantes (Ilyas et al., 2009 ; Meijer et al., 2011 ; Zhao et al., 2009). Jusqu'à présent, toutes les espèces végétales étudiées vivent en symbioses avec les endophytes (Nithya et Muthumary, 2011 ; Sadrati et al., 2013). En suggérant que plus d'un million d'espèces endophytes existent dans la nature, principalement dans le règne végétale (Fouda et al., 2015 ; Torres et al., 2012 ; Zaferanloo et al., 2013). Ces diverses endophytes jouent un rôle primordial dans la survie et la colonisation de leurs plantes hôtes, en particulier dans les milieux difficiles tels que : les régions sèches et arides (Ben Chobba et al., 2013).

II. Définition des endophytes fongiques

Les endophytes fongiques ont été signalés étant naturellement présents dans divers hôtes (Suryanarayanan, 2013). Ces espèces vivent pendant la majeure partie de leur cycle de vie en association symbiotique à l'intérieur des tissus ou des organes des hôtes vivants sous la couche de cellules épidermiques, apparemment sains et asymptomatiques (Nisa et al., 2015 ; Rhoden et al., 2013), sans causer de dommages ou de maladies à leurs hôtes (Hardoim et al., 2015 ; Puri et al., 2016). Cette symbiose entre les endophytes fongiques et les organismes hôtes est réglée par les gènes des deux partenaires et contrôlée par les facteurs environnementaux (Uzma et al., 2018). En particulier, les hyphes endophytiques fongiques résident dans l'espace inter- et intracellulaire des parties aériennes, surtout dans les graines foliaires et même dans l'écorce et le système racinaire des plantes hôtes (Figure 1), sans provoquer de signes visibles d'infection (Ban et al., 2012 ; Baraban et al., 2013 ; Rajala et al., 2013 ; Rhoden et al., 2012).

Et outre, la même partie de la plante hôte peut contenir une variété d'endophytes fongiques (Fürnkranz et al., 2012). La biodiversité naturelle des endophytes fongiques est présente dans les régions tempérées et les forêts tropicales humides. Ces endophytes peuvent exprimer une gamme de modes de vie en réponse au génotype de l'hôte et aux facteurs environnementaux, y compris le commensalisme, le mutualisme et le parasitisme (Singh et al., 2011). Ces endophytes fongiques sont des microorganismes appartenant principalement aux groupes *Ascomycota* (mitosporiques et méiosporiques), *Basidiomycota* et *Zygomycota* (Silva-Hughes Alice et al., 2015).

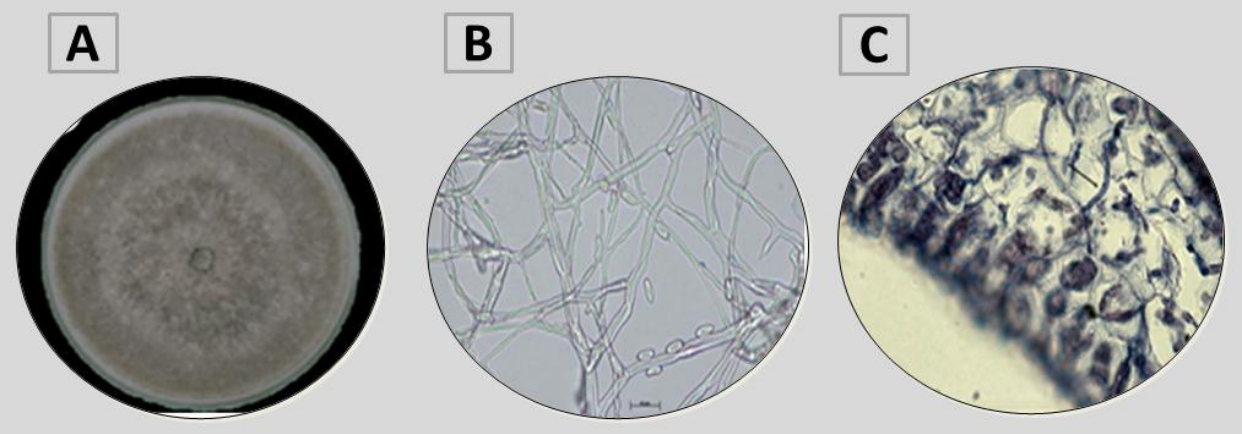


Figure 1: Exemple d'interaction entre l'endophyte fongique et sa plante hôte *Trichilia elegans*. (A) Aspect macroscopique d'endophyte fongique, (B) visualisation microscopique des spores et des hyphes d'endophyte fongique et (C) coupe histologique de la feuille de la feuille de *Trichilia elegans* avec les hyphes fongiques (Corrêa et al., 2014)

III. Distribution des endophytes fongiques

III.1. Endophytes fongiques marins

Les océans et les écosystèmes hydro-thermiques ont été signés comme source nouvelle et diversifiée d'endophytes fongiques riches en produits naturels utilisés comme des médicaments (Le Calvez et al., 2009) et même, des composés précliniques anti-cancéreux bioactifs isolés des endophytes comme le *Penicillium chrysogenum* QEN-24S (Gao et al., 2011). Ces endophytes fongiques peuvent vivre en association avec des palétuviers aquatiques de mangrove, qui sont identifiées comme une source de métabolites secondaires utilisés en tant qu'agents anticancéreux (Zhang et al., 2010).

L'exploitation des endophytes fongiques marins en tant que niche de nouvelles molécules bioactives naturelles alcaloïdes, flavonoïdes, iso-flavonoïdes et di-terpènes est une révolution scientifique (Debbab et al., 2012). Certains endophytes fongiques marins ont été identifiés comme des sources potentielles d'antibiotiques et d'enzymes hydrolytiques comme : les cellulases de *Cephalosporium* et la laccase de *Pestalotiopsis* sp. J63 isolé à partir d'échantillon de boue de mer (Chen et al., 2011 ; Smitha et al., 2014) aussi, les cellulases de *Trichoderma* sp. Merv6, *Penicillium* sp. Merv2 et *Aspergillus* sp. Merv70 isolés de l'éponge marine *Latrunculia corticata* (El-Bondkly Ahmed et El-Gendy Mervat, 2011).

III.2. Endophytes fongiques lignocellulosiques

Les endophytes fongiques lignocellulosiques sont des organismes isolés de nombreuses espèces de graminées, des herbes, de plantes ligneuses et herbacées qui habitent de manière symptomatiquement les tissus internes des végétaux (Hyde et Soytong, 2008). Ces plantes constituent un réservoir naturel d'un nombre infini d'endophytes fongiques (Uzma et al., 2018). Les endophytes fongiques sont un groupe polyphylétique de fongiques très diversifiés, appartenant principalement aux Clavicipitaceae (*Ascomycota*). Ces endophytes vivent dans les espaces intercellulaires des racines, des tiges, des pétioles et des feuilles des plantes sans causer d'effets négatifs par leur présence et même avec des herbes tempérées (Ban et al., 2012 ; Baraban et al., 2013 ; Corrêa et al., 2014). La symbiose entre la plante hôte et l'endophyte fongique était basée sur la protection des plantes en dégradant la paroi cellulaire des parasites et en sécrétant diverses enzymes hydrolytiques (Goldbeck et al., 2013). Et même, la production par divers voies de biosynthèse de substances bioactives qui régulent la croissance (figure 2).

Les insecticides, les antifongiques et antibactériens, améliorent la croissance et la survie de la plante contre les agents phyto-pathogènes (Aly et al., 2010 ; Kumar et Kaushik, 2012 ; Wang X.et al., 2013 ; Waqas et al., 2015). *Acremonium* sp. (ENF 31) et *Penicillium simplicissum* (ENF22) isolés à partir de maïs et de riz qui pourraient inhiber la croissance de tous les agents pathogènes testés avec une large gamme d'inhibition, comme des bio-ressources défensives (Potshangbam et al., 2017). Cette colonisation a permis aux plantes hôtes de s'adapter et de résister aux stress biotique et abiotique (Silva-Hughes Alice et al., 2015). Toutefois, ses caractéristiques sont très souhaitables pour une industrie agricole et pharmaceutique durable (Amin, 2016 ; Hartley et al., 2015). Certains groupes particuliers d'endophytes fongiques produisent des hormones végétales, afin d'améliorer et de stimuler la croissance de leurs plantes hôtes (Rai et al., 2014 ; Waqas et al., 2012).

Différentes espèces d'endophytes fongiques vivent en symbiose au sein de plantes médicinales et produisent des composés biologiques et des métabolites bioactifs semblables aux plantes hôtes (Jia et al., 2016 ; Pinheiro et al., 2013). En outre, les métabolites diffèrent nettement de ceux des plantes présentant des caractéristiques structurelles uniques (Kumar et Kaushik, 2012 ; Wang et al., 2013). Ces propriétés ont attiré plus d'attention vers les endophytes fongiques en tant que nouvelle source de composés plante-spécifiques et de médicaments que vers les plantes hôtes elles-mêmes (Ameen et al., 2021 ; Nisa et al., 2015). En suggérant que ses propriétés médicinales de ces plantes hôtes pourraient être dues à la présence d'endophytes symbiotiques (Uzma et al., 2018).

La germination des graines de nombreuses espèces de plantes hôtes a été facilitée par l'application d'endophytes fongiques cibles qui pourraient être utiles aux plantes médicinales rares et menacées. A titre d'exemple des espèces *Chaetomium, Fusarium, Acremonium, Myrothecium, Phomopsis, Pestalotiopsis* et *Colletotrichum* isolées des plantes médicinales des Ghâts occidentaux, Karnataka (Nalini et al., 2014). Une communauté riche et diverse d'endophytes fongiques associés en symbiose avec le cactus indigène *Opuntia humifusa* a été identifiée avec différents extraits bioactifs, en possédant un potentiel antifongique contre les phytopathogènes, appartenant à 17 taxons de genre différents *Phoma, Epicoccum, Diaporthe, Paraconiothyrium, Alternaria, Cryptococcus, Pestalotiopsis, Biscogniauxia, Cladosporium,*

Curvularia, Xylaria et Aureobasidium (Bezerra et al., 2013 ; Rosa et al., 2013 ; Silva-Hughes Alice et al., 2015).

Quelques espèces de *Preussia typharum, Preussia africana* et *Preussia* sp. isolés des arbres de *Ramalina calicaris, Aloe vera, Boswellia sacrum* et les plants de riz sont reconnus par la production de divers composés chimiques actifs d'intérêt médical. Tel que : l'activité antimicrobienne contre différentes bactéries pathogènes humaines (Du et al., 2014 ; Khan et al., 2016 ; Mapperson et al., 2014), la cytotoxicité contre les cellules A549 (Zhang et al., 2012), les applications thérapeutiques contre les états graves des maladies de cancer (Ameen et al., 2021) et la production de la phytohormone (l'auxine) de l'acide indole-3-acétique et ses analogues dans des conditions environnementales normales et stressantes. Afin de favoriser la croissance des plantes hôtes et la sécrétion des enzymes extracellulaires phosphatases et les glucosidases par les endophytes (Khan et al., 2015 ; Khan et al., 2016 ; Al-Hosni et al., 2018).

Les endophytes fongiques sont un élément important de la diversité fongique inexplorée. De nombreuses plantes médicinales et aromatiques ont démontré une biodiversité lignocellulosique endophytique très intéressante (Amirita et al., 2012 ; Huang et al., 2015 ; Uzma et al., 2016). Pourtant, la répartition de certaines populations endophytiques était limitée à des espèces de plantes hôtes particulières. La majorité des études ont été menées sur l'étude de la diversité des endophytes fongiques colonisés des plantes (Carvalho et al., 2012 ; Tao et al., 2013), et qui sont isolés ou associés à des espèces dans les environnements tropicaux, marins et désertiques (Aime et Brearley, 2012 ; Le Calvez et al., 2009).

En ce qui concerne leurs applications biotechnologiques, seuls quelques travaux ont été signalés, en recherchant de nouveaux producteurs d'enzymes dont les performances spécifiques sont exigées des habitats originaux (de Almeida et al., 2011 ; Pavithra et al., 2012 ; Peterson et al., 2011). Tels que : les endophytes amylases *Cylindrocephalum* sp., *Mycelia sterilia, Colletotrichum* sp., *Alternaria* sp. et *Cladosporium* sp. identifiés à partir de la plante médicinale *Alpinia calcarata* Roscoe (Sunitha et al., 2012), les endophytes cellulolytiques et pectinolytiques *Talaromyces emersonii, T.emersonii* et *Fusarium oxysporum* isolés de la plante *Calophyllum inophyllum* (Sunitha et al., 2013) et l'endophyte lipase *Fusarium oxysporum* PTM7 isolé à partir des feuilles de la plante médicinale *Croton oblongifolius* Roxb. (Panuthai et al., 2012). Et même, les endophytes fongiques qui produisent les hémicellulases, surtout *Trichoderma atroviride, Alternaria* sp., *Aspergillus niger, Annulohypoxylon stigyum* et *Talaromyces wortmannii*. Ces enzymes hydrolytiques ont contribué à la dégradation des constituants des matières lignocellulosiques.

Deux systèmes enzymatiques extracellulaires utilisés dans la détérioration des fibres lignocellulosiques dans les endophytes fongiques. Le premier système ligninolytique oxydatif unique composé d'enzymes ligninases, peroxydases et laccases responsables de la dégradation de la lignine et de l'ouverture de cycles phénoliques. Le second système hydrolytique se compose de cellulases et de xylanases qui dégradent principalement les molécules polysaccharidiques (Corrêa et al., 2014). Cette capacité à dégrader la lignocellulose rend les endophytes fongiques utiles pour explorer les matières lignocellulosiques dans le processus de production du bioéthanol et d'autres bioproduits.

Un dépistage préliminaire des micro-organismes endophytes était nécessaire pour sélectionner les activités enzymatiques souhaitées à l'aide de procédures de sélection appropriées. Les techniques de la culture à l'état solide et submergée sont largement utilisées pour produire de grandes quantités d'enzymes à l'échelle de laboratoire et industrielle (Li et al., 2012). Les enzymes produites ont été séparées et purifiées en utilisant des méthodes de bio-séparation qui représentent 60% des coûts de production totaux. Le système de fermentation immergé avec des endophytes fongiques est une culture de système complètement liquide avec les avantages de contrôler les conditions de culture de pH, d'aération et de température (Costa et al., 2012 ; Jegannathan et Nielsen, 2013). Cependant, dans le système de fermentation à l'état solide (SSF), les endophytes fongiques se développent sur des matériaux solides comme les résidus agro-industriels sans présence de liquides (Zilly et al., 2012). Tel que l'espèce laccase *Pestalotiopsis* sp. J63 utilise différents sous-produits lignocellulosiques comme substrat dans une culture à l'état solide principalement de la poudre de paille de riz (Chen et al., 2011).

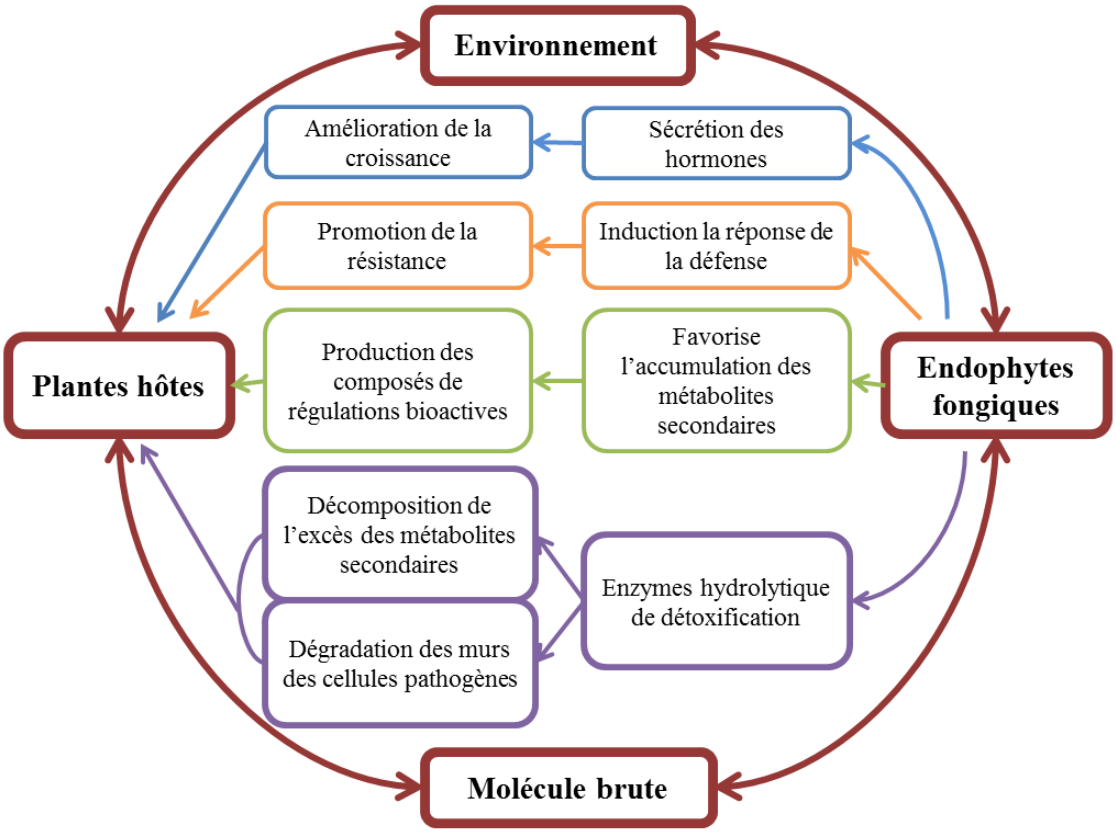


Figure 2: Symbiose bénéfique établie par l'endophyte fongique et sa plante hôte (in Jia et al., 2016)

IV. Classification et diversité des endophytes fongiques

Les endophytes fongiques sont classés en taxinomie, en catégories écologiques, en rôles fonctionnels et en termes de diversité. Deux grands groupes ont été divisés, les endophytes fongiques clavicipitacés et les endophytes non-clavicipitacés, différenciés selon la phylogénie (Bamisile et al., 2018). Le premier groupe de clavicipitacés était commun chez les espèces de graminées, tandis que le second groupe d'endophytes non-clavicipitacés était dominant chez les espèces végétales non vasculaires et vasculaires (Rodriguez et al., 2009).

Les endophytes non-clavicipitavés ont été divisés en trois catégories fonctionnelles basées sur la transmission et la colonisation de plantes hôtes (tableau 1). Des sous-classes ont été ajoutées pour classer davantage les endophytes fongiques en fonction de différents critères (Purahong et Hyde, 2011).

Tableau 1: Caractérisation des quatre classes d'endophytes fongiques en fonction des critères symbiotiques (Rodriguez et al., 2009)

	Critères	**Gamme d'hôte**	**Tissus colonisé**	**Colonisation de la plante**	**Biodiversité de la plante**	**Transmission**	**Avantages des formes physiques ***
Clavicipitaceous	**Classe 1**	Etroit	Tige/ rhizome	Extensive	Basse	Horizontal / Verticale	Habitat non adapté
Non-clavicipitaceous	**Classe 2**	Vaste	Tige / racine / rhizome	Extensive	Basse	Horizontal / Verticale	Habitat non adapté / Habitat adapté
	Classe 3	Vaste	Tige	Limitée	Haute	Horizontal	Habitat non adapté
	Classe 4	Vaste	Racine	Extensive	Inconnue	Horizontal	Habitat non adapté
*** Habitat non adapté : Tolérance à la sécheresse / Amélioration de la croissance**							
*** Habitat adapté : Pression sélective propre à l'habitat : Température, pH et salinité**							

IV.1. Mode de reproduction

Les endophytes fongiques sont classifiés comme sexués ou asexués. À titre d'exemple, l'espèce *Epichloë* a été divisée en deux genres, *Epichloë* et *Neotyphodium*, qui se reproduisent sexuellement et asexuellement, respectivement (Bamisile et al., 2018).

IV.2. Mode de transmission

Les endophytes fongiques ont été transmis verticalement et horizontalement dans l'hôte. Les endophytes du genre *Neotyphodium* et l'espèce *B. bassiana* sont transmis verticalement par les graines d'une plante hôte à l'autre (Hartley et Gange, 2009 ; Quesada-Moraga et al., 2014). Et les espèces d'*Epichloë* sont transmis verticalement par les semences (Schardl et al., 2013).

En ce qui concerne la transmission horizontale, les endophytes fongiques sont transférés entre différents individus d'une population à l'autre. Ce type de transmission est courant chez les endophytes qui affectent les plantes hôtes avec les spores dans l'air (Hartley et Gange, 2009).

IV.3. Nutrition

À partir des matières vivantes ou mortes décomposées, les endophytes fongiques ont été classés comme nécrotrophes et biotrophes.

Les espèces qui se développent et obtiennent leurs nutriments d'après les tissus de plante hôte vivante sont classé du type biotrophe. Pourtant, les endophytes fongiques nécrotrophes sont de type qui se développe sur les tissus morts des hôtes (Delaye et al., 2013 ; Kemen et Jones, 2012). Certains endophytes fongiques pourraient se basculer entre les deux modes de vie, en raison des changements écologiques périodiques et évolutifs (Purahong et Hyde, 2011).

IV.4. Colonisation

Les endophytes fongiques se répartissent en quatre classes d'espèces foliaires et racinaires (figure 3 B). Les espèces fongiques ont généralement signalé une colonisation sélective des tissus à l'intérieur de leurs plantes hôtes. Exemples des espèces *B. bassiana* et *Pochonia chlamydosporia* qui ont préférentiellement situé dans les tiges et les feuilles. Mais, l'endophyte *Metarhizium* spp. a été localisé dans les racines des plantes (Behie et al., 2015).

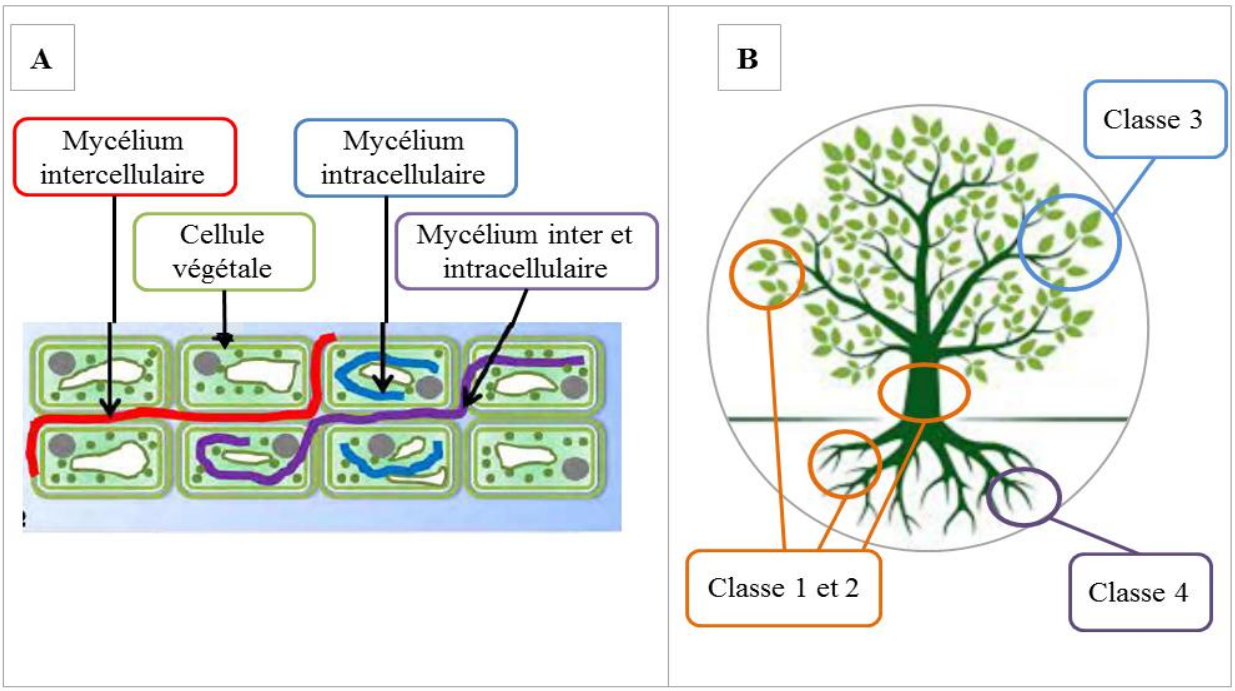


Figure 3: Schéma d'association de l'endophyte fongique avec la plante hôte. (A) Modes de croissance de l'endophyte fongique dans les tissus de la plante hôte et (B) emplacement de diverses classes d'endophytes fongiques (Rodriguez et al., 2009)

Le potentiel des endophytes fongiques a montré une colonisation localisée plus fréquente que la colonisation systématique chez les plantes hôtes (Impullitti et Malvick, 2013 ; Yan et al., 2015). Les endophytes racinaires qui affectent les racines des plantes hôtes font partie du groupe d'espèces qui colonisent les tissus végétaux rhizosphériques, tels que : les endophytes *Piriformospora indica*, *Glomus* spp., *Metarhizium* spp. et *Fusarium* spp. (Wyrebek et al., 2011). Toutefois, les endophytes foliaires sont surtout les espèces qui envahissent les feuilles et les tiges des plantes, particulièrement localisées dans la partie foliaire des hôtes (Meyling et al., 2011).

Deux groupes d'endophytes fongiques cultivables *Nectriacées* et les *Pleosporacées* ont été sélectionnés à partir d'échantillons de racines et de feuilles de palmiers dattiers *Phoenix dactylifera* avec des espèces majoritaires, tels que : *Davidiella* (*Cladosporium téléomorphe*),

Alternaria, *Cladosporium*, *Curvularia* et *Pythium* (Ben Chobba et al., 2013). La structure de la population des endophytes fongiques a été indirectement affectée en fonction des conditions environnementales ou écologiques, telles que : l'humidité du sol, la température et la nutrition du sol déterminent la quantité et le type de métabolites secondaires des plantes hôtes (Jiang et al., 2010 ; Wu L. et al., 2013). Les endophytes fongiques ont été divisés en trois groupes principaux : les endophytes de pâturage (balansicaeous), les endophytes non pâturages et les mycorrizes (Jia et al., 2016).

IV.5. Mode d'infection

Deux catégories d'endophytes ont été rapportées, les fongiques symptomatiques et asymptomatiques avec des mycéliums intercellulaires et intracellulaires (figure 3 A). La classe des endophytes asymptomatiques comprend un grand nombre d'espèces fongiques qui infectent les tissus intérieurs des plantes aériennes sans exprimer de symptômes. Ce groupe d'espèces attire davantage l'attention car elles sont omniprésentes avec une grande diversité et plusieurs rôles (Bamisile et al., 2018).

V. Applications biotechnologiques des endophytes fongiques

Les endophytes fongiques sont considérés comme une source abondante de métabolites secondaires biologiquement actifs (tableau 2), utilisés dans diverses applications pharmaceutiques (Jalgaonwala et al., 2017 ; Pant et al., 2014). Tels que : les traitements anti-inflammatoires (Guo et al., 2014), anticancéreux (Lakshmi et Selvi, 2013 ; Tanasova et Sturla, 2012) et antimicrobiens (Garcia et al., 2012 ; Kovac et al., 2015 ; Sunil et al., 2018). En effet, depuis plus de 20 ans, les endophytes fongiques constituent un réservoir d'agents biologiques et de composés bioactifs, comme : les anticancéreux et les antiparasites, les antibiotiques, les antioxydants et les immuno-modulateurs. Ces composés sont généralement employés dans les industries agrochimiques, pharmaceutiques et alimentaires (Baraban et al., 2013 ; Kusari et al., 2014 ; Murthy et al., 2011 ; Nithya et Muthumary, 2011 ; Rosa et al., 2011).

L'endophyte fongique *Aspergillus fumigatus* isolé de *Juniperus communis* a été rapporté comme une nouvelle source de composé anticancéreux (Kusari et al., 2009). On a accordé plus d'attention aux métabolites des endophytes fongiques terrestres, des mangroves et des sources marines, surtout les médicaments anticancéreux. Tels que : taxol (*Cladosporium* sp. de *Taxus baccata*), podophyllotoxin (*Chaetomium globosum* de *Sinopodophyllum hexandrum*) et alcaloïdes, en tant que composés bioactifs cytotoxiques contre les cellules cancéreuses (Kasaei et al., 2017 ; Uzma et al., 2018 ; Wang et al., 2017).

L'association des endophytes fongiques à des plantes hôtes favorise l'accumulation de métabolites secondaires qui réduisent les dommages des agents pathogènes (Cabezas et al., 2012), en inhibant directement ou indirectement l'infection et la prolifération des pathogènes dans les plantes hôtes, à travers des réponses intrinsèques (Eaton et al., 2011). Cette association symbiotique accroît la biomasse des plantes en développant les parties aériennes au fur et à mesure des efflorescences (Das et al., 2012).

Tableau 2: Propriétés biologiques des métabolites secondaires sécrétés par une variété d'endophytes fongiques

Plantes hôte	Endophytes fongiques	Métabolites secondaires	Activités biologiques	Références
Mentha longifolia	*Fusarium* sp.	Fusaripeptide A (149) / Amphotéricine-B	Activité antifongique	Ibrahim et al., (2018)
Murraya koenigii	*Curvularia* sp.	Murranolide A (158) / murranopyrone (159) / Curvularin (160)	Activité antifongique	Mondol et al., (2017)
Rubus idaeus	*Hypoxylon submonticulosum*	Trienylfuranol A (102)	Activité antifongique	Burgess et al., (2017)
Opuntia humifusa	*Alternaria* sp.	Protons oléfiniques d'acides gras insaturés / Protons d' acides gras méthylène et méthyles	Activité antifongique	Silva-Hughes Alice et al., (2015)
	Cladosporium funiculosum			
	Paraconiothyrium sp.			
	Biscogniauxia mediterranea	Composés aromatiques		
	B. mediterranea	5-méthylmelléine	Activité antifongique contre phytopathogène *Phom opsis obscurans*	
Thelypteris angustifolia	*Nodulisporium* sp.	Composés organiques volatils (COV)	Contrôle biologique	Riyaz-Ul-Hassan et al., (2013)
***Capsicum annuum* L.**	*Penicillium resedanum*	acide salicylique	Amélioration de la biomasse / stress osmotique	Khan et al., (2013)
Barringtonia acutangula	*Colletotrichum gloeosporioides*	-	Activité anticancéreuse	Lakshmi et Selvi, (2013)
Cucumis sativus	*Paecilomyces formosus*	Acide indole acétique / Gibberellines	Défense de la plante hôte / Améliore de la croissance	Khan et al., (2012)
Cucumis sativus	*Phoma glomerata*	Acide indole acétique / Gibberellines	Défense de la plante hôte / Améliore de la croissance	Waqas et al., (2012)
	Penicillium sp.			

Tableau 3:Endophytes fongiques produisant des enzymes hydrolytiques et leurs plantes hôtes

Plantes hôte	Endophytes fongiques	Enzymes	Références
***Tinospora cordifolia* (Willd.) Hook. f. & Thomson**	*Mycelia sterilia*	cellulase, pectinase	Uzma et al., (2016)
	Fusarium sp.	asparaginase	
***Piper nigrum* L.**	*Lasiodiplodia* sp.	amylase	
***Piper longum* L.**	*Aspergillus* sp.	amylase, cellulase	
	Penicillium sp.	cellulase	
***Zingiber officinale* Roscoe**	*Cladosporium* sp.	amylase, pectinase	
	Aspergillus sp.	asparaginase	
***Hedychium coronarium* J. Koenig**	*Mycelia sterilia*	cellulase	
Frutescence de poivron	*Aspergillus* sp.	asparaginase	Amrutha et al., (2014)
Calophyllum inophyllum	*T. emersonii*	pectinase	Sunitha et al., (2013)
	Fusarium oxysporum	pectinase	
Lawsonia inerims	*Cladosporium cladosporioides*	amylase, cellulase	Amirita et al., (2012)
	Nigrospora sphaerica	amylase	
	Colletotrichum gleosporioides	amylase, protéase	
Adathoda vasica	*Curvularia brachyspora*	amylase, laccase, lipase	
	Phyllosticta sp.	amylase, lipase	
Coleus aromaticus	*Curvularia vermiformis*	cellulase, lipase, protéase	
	Xylaria sp.	amylase, laccase, protéase	
***Opuntia ficus - indica* Mill. (Cactacées)**	*Aspergillus japonicus*	cellulase, pectinase, protéase, xylanase	Bezerra et al., (2012)
Centella asiatica	*Penicillium* sp.	cellulase	Devi et al., (2012)
***Alpina calcarata* (Haw) Roscoe**	*Cylindrocephalum* sp.	amylase	Sunitha et al., (2012)

Les métabolites secondaires produits pourraient devenir un obstacle à la colonisation de l'endophyte fongique eux-mêmes. Pour surmonter ce problème, les endophytes fongiques sécrètent des enzymes de détoxication telles que : laccases, protéases, cellulases et xylanases (tableau 3). Ces enzymes sont utilisées pour dégrader les métabolites et les empêcher de pénétrer dans les systèmes de défense de leurs plantes hôtes (Jia et al., 2016). Plusieurs endophytes fongiques comme : *Hypoxylon* sp. et *Daldinia eschscholzii* sont des symbiotes végétaux pour diverses plantes lignocellulosiques et résidus agricoles, et qui produisent les enzymes lignocellulosiques : endoglucanases, exoglucanases et *β*-glucosidases. Ces enzymes sont capables de déconstruire les polysaccharides, la lignine et les convertir en myco-diesel par la production de composés organiques volatils (COV) (Wu et al., 2017), surtout des monoterpènes et des sesquiterpènes (Strobel, 2014, 2015).

Toutefois, on a accordé moins d'attention au potentiel hydrolytique des endophytes fongiques en tant que producteurs efficaces d'enzymes cellulolytiques et oxydantes (tableau 3). Ils sont utilisés pour pénétrer et coloniser leurs plantes hôtes (Suryanarayanan et al., 2012) et obtenir les éléments nutritifs essentiels à leur croissance en hydrolysant les substances alimentaires (Desire et al., 2014) et en surmontant la défense de l'hôte contre l'invasion pathogène microbienne (Costa-Silva et al., 2011 ; Sunitha et al., 2012). Les endophytes fongiques sont peu exploitées comme sources d'enzymes d'intérêt industriel, telles que : cellulases, lipases, amylases, laccases et protéases (Corrêa et al., 2014). Des études supplémentaires sur la culture de l'endophyte fongique, l'optimisation de la production d'enzymes et la caractérisation des propriétés physico-chimiques sont nécessaires. Afin d'évaluer leur véritable potentiel en tant que sources industrielles de biocatalyseur.

Chapitre II : Dégradation de la biomasse lignocellulosique par les enzymes hydrolytiques

I. Source de lignocellulose

I.1. Généralités sur la biomasse lignocellulosique

La biomasse végétale, comme les plantes ligneuses et non ligneuses, se compose principalement de lignocellulose, qui contient de la matière organique renouvelable. A l'échelle mondiale, $2{,}3 \times 10^{11}$ tonnes de bois produites par les plantes terrestres par an correspondent à 7×10^{10} tonnes de charbon, soit environ les deux tiers des besoins énergétiques mondiaux par an (Sridevi et al., 2015).

La culture de la biomasse a été fortement affectée par la diminution des réserves d'eau due au changement climatique et au réchauffement planétaire (Gosling et Arnell, 2016). Une estimation de la réduction de l'approvisionnement mondial en eau de 40% en 2030 et 55% en 2050 selon les statistiques de UNESCO, 2017. Ceci augmente les zones des régions arides et les semi-arides mondiales au-delà du tiers de la surface terrestre. Cela affecte la disponibilité, la qualité et le type de la biomasse végétale (Silva et al., 2014). La biomasse végétale et la production énergétique futures ont été dirigées vers les cultures CAM de Crasulaceae, qui sont les groupes les plus résistants aux faibles disponibilités en eau, comme les Cactaceaes (Cushman et al., 2015 ; Davis et al., 2017).

Ce groupe de Cactaceae contient l'espèce poire de cactus ou figuier de Barbarie qui est très adaptée aux climats arides, semi-arides et secs avec une productivité élevée en biomasse (Silva et al., 2014). Sans irrigation, la production annuelle moyenne de biomasse de figues varie de 3 à 15 $mg.ha^{-1}.an^{-1}$, selon les endroits et les conditions environnementales (Consoli et al., 2013 ; Krumpel et al., 2020). Plus de 1500 espèces de cactus appartiennent au genre *Opuntia*, caractérisé par une teneur élevée en glucides et une source d'eau économique (Nebbache et al., 2009). En raison du changement climatique, plusieurs pays du Mexique, d'Afrique du Nord et du Brésil ont élargi la surface de production de cactus, comme le Brésil qui est passé de 697 000 à 1093 000 Km^2. Le cactus a été utilisé dans plusieurs applications en tant que source alimentaire, conservation des sols, aménagement paysager et production de produits cosmétiques, pharmaceutiques et colorants (Bensadon et al., 2010 ; Nebbache et al., 2009 ; Santos et al., 2016) et même, pour la production de biocarburants tel que : le biogaz (méthane) provenant de la digestion anaérobie de cladodes d'*O. ficus indica* d'une valeur comprise entre 233 à 325 $L.kg^{-1}$ (Calabro et al., 2018 ; Lueangwattanapong et al., 2020).

La plante de cactus est une culture énergétique alternative (Alencar et al., 2018). Au Maroc, diverses régions sont connues par la culture de plusieurs genres et espèces de cactus. La région d'Ait Baâmrane est reconnue par deux types de cultivars : Aïssa (précoce, récolte juin à août) et Moussa (tardive, récolte septembre à décembre, même janvier et février). Ils sont classés selon leur précocité, leur caractère épineux, la forme et la couleur du fruit. Cependant, les derniers efforts ont été concentrés sur le développement de variétés résistantes à la cochenille carminée, la principale maladie affectant la culture des cactus (FAO, 2017) et même améliorer différents procédés de prétraitement des fibres de cactus pour la production de bioéthanol.

Parmi la flore marocaine, l'espèce endémique *Juniperus oxycedrus*, un genévrier persistant, fait partie de la famille des Cupressaceae de conifères (gymnospermes). Il est indigène dans toute la région méditerranéenne du Maroc, avec une longue durée de vie (Semerdjieva et al., 2019). Ce genévrier est capable de se développer dans des conditions environnementales extrêmes. Sa croissance est adaptée à divers emplacements rocheux, du niveau de la mer à l'altitude de 1500 à 1800 m (Foudil-Cherif et Yassaa, 2012 ; Orhan et al., 2011) et de la côte jusqu'à les hautes altitudes du bassin méditerranéen (Hajdari et al., 2014 ; Roma-Marzio et al., 2017). Il s'agit de l'une des plantes aromatiques les plus utilisées en médecine traditionnelle marocaine.

Le goudron de genièvre (huile de cadre) est une huile essentielle extraite des branches de *Juniperus oxycedrus,* utilisée en dermatologie humaine et vétérinaire (Achour et al., 2011). L'extrait de *Juniperus oxycerus* a montré une forte activité antioxydant et un effet cytotoxique puissant (Ben Mrid et al., 2019 ; El Jemli et al., 2016). La diversité des endophytes fongiques associés à *Juniperus oxycedrus* a attiré moins d'attention que ces composants chimiques et leur rôle dans la santé humaine, ce qui est l'objet de plusieurs travaux récents.

I.2. Résidus végétales

A l'échelle mondiale, environ 180 millions de tonnes/an de matières premières cellulosiques proviennent uniquement de l'agriculture et d'autres sources de cellulose disponibles en tant que déchets municipaux et industriels. Ceci pose jusqu'à présent un problème majeur de pollution de l'environnement, leur conversion en produits utiles pourrait réduire ces problèmes. Ces dernières années, plusieurs résidus agro-industriels ont été utilisés dans les fermentations à l'état solides et submergées pour produire des enzymes hydrolytiques et du bioéthanol, en fonction de la disponibilité des substrats dans les régions.

Tels que : le son de blé, le son de riz, la bagasse de canne à sucre, la bagasse de manioc, la bagasse d'orange, la betterave à sucre cosse et pulpe, la paille de riz, la paille de blé, la paille de maïs, la paille de corncob, la balle de riz, la balle de soja, la pulpe de tremble, la pulpe de sorgho sucré, la vigne, le tourteau de colza, le tourteau de moutarde, le tourteau d'huile de noix de coco, la farine de manioc, la farine de maïs, la farine de manioc, la farine de blé, le marc de pomme, le jus et les pépins de raisin, déchets de la plante d'huile de palme, les déchets de banane, les déchets de thé, la cosse de café, noix de coco et la moelle de coco (Anwar et al., 2014 ; Bhargav et al., 2008 ; Latika et Sonia, 2015 ; Nagraj et al., 2014 ; Kumar et al., 2009 ; Zheng et Rehmann, 2014 ; Zheng et al., 2014).

II. Structure et composants majeurs de la biomasse lignocellulosique

La paroi lignocellulosique contient essentiellement de la lignocellulose, l'un des bio-polymères les plus abondants et les plus renouvelables, composé de la cellulose, d'hémicellulose et de lignine (figure 4). Lorsque les polymères de sucres occupent la majorité de la structure (Behera et Ray, 2016). Ces macromolécules lignocellulosiques peuvent être converties en sucres simples par intervention chimique et hydrolyse enzymatique. La lignocelluloses est une source inépuisable et renouvelable de carbone terrestre, avec un taux de production annuel de 200 milliards de tonnes de biomasse sèche (Anwar et al., 2014).

Les substrats lignocellulosiques contiennent généralement 40 à 50% de cellulose, 25 à 35% d'hémicellulose et 15 à 20% de lignine (tableau 4), en formant une structure de barrière récalcitrante autour de la cellulose qui protège la structure des cellules des plantes contre les attaques de ravageurs (Zhao et al., 2012). Cette structure complexe de substrats lignocellulosiques rend les processus industriels difficiles et exigeants (Serrano-Ruiz et al., 2010). Cependant, les proportions et la structure des composantes de la biomasse lignocellulosique peuvent variées selon le type et l'âge de la plante (Prévot et al., 2013).

Tableau 4: Composition de quelques biomasses lignocellulosiques brutes (% du poids sec total)

Biomasses	**Pourcentage du poids sec (%)**			**Références**
	Cellulose	**Hémicellulose**	**Lignine**	
Cladodes *Opuntia ficus-indica*	25,8 – 31,6	9,0 – 17,1	5,7 – 10,3	Alencar et al., (2018)
Tiges de *Phoenix canariensis*	45,6	27,0	19,6	Udeh et Erkurt, (2017)
Tiges d'*Opuntica ficus-indica*	48,5	33,4	16,7	
Cladodes *Nopalea cochenillifera*	28,5 – 34,9	10,5 – 20,0	6,4 – 15,7	de Souza Filho et al., (2016)
Pleures de *Ananas cosmosus*	25,0	28,0	8,0	Latika et Sonia, (2015)
Banane agro-gaspille	47,0	26,1	10,8	Shah et al., (2015)
Paille de blé	43,7	15,8	11,9	Sridevi et al., (2015)
Bagasse de la canne à sucre	43,9	15,0	12,1	
Sciure	47,7	16,9	12,4	
Son de riz	45,7	14,0	10,9	
Son de soja	34,0	18,1	9,7	Robl et al., (2013)
Bagasse de la canne à sucre	42,8	25,8	22,1	Gouveia et al., (2009)

II.1. Cellulose

La cellulose est un polymère d'une chaîne linéaire de glucose lié par des liaisons ß-1,4-glycosidiques catalysées par les cellulases (Cabrera et Blamey, 2018 ; Jeya et al., 2010).

Les cellulases sont la classe la plus diversifiée d'enzymes qui catalysent le substrat à travers quatre catégories : endoglucanase (EC 3.2.1.4), exoglucohydrolase (EC 3.2.1.74), β-glucosidase (EC 3.2.1.21 ; 1) et le cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91). La décomposition complète de la cellulose en glucose dépend de l'action combinée de ces quatre enzymes cellulases (Chen et al., 2020).

La cellulose est le composant principal de la paroi cellulaire des plantes et la plus abondante en nature, sa production annuelle estimée autour de 100 milliards de tonnes de matière sèche (Nazir et al., 2009 ; Sharma et al., 2014). La dépolymérisation de la cellulose forme d'importantes fractions de glucose et d'hydroxy-méthyl-furfural (HMF), que l'on peut convertir en acide formique (Gouveia et al., 2009).

II.2. Hémicelluloses

L'hémicellulose est un polymère d'une chaîne hétérogène d'hexose, de pentose et d'acide uronique. Le xylane est une partie majeure de la fraction hémicellulosique dans les biomasses. Son l'hydrolyse nécessite un cocktail d'enzymes β-xylosidase (EC 3.2.1.37), d'endo-β-1,4-xylanase (EC 3.2.1.8) et de plusieurs enzymes hydrolytiques accessoires. Tels que : α-glucuronidase (EC 3.2.1.139), α-galactosidase (EC 3.2.1.22), α-L-arabino-furanosidase (EC 3.2.1.55), estérase d'acide férulique (EC 3.1.1.73 ; 2-4) et estérase d'acétyl--xylane (3.1.1.72) (de Almeida et al., 2011).

La dépolymération de l'hémicellulose forme des sucres monomères qui peuvent être utilisés en fermentation, principalement le xylose, l'acide acétique et le furfural (Gouveia et al., 2009). La composition et la quantité de sucres libérés selon l'hydrolyse de l'hémicellulose dépendent du type d'enzymes, de la matière première et de la technique de saccharification employée (Sarkar et al., 2012).

II.3. Lignine

La lignine est de nature amorphe et forme l'un des bio-polymères poly-phénoliques qui constituent la paroi des cellules végétales. Elle contribue à l'intégrité structurelle, à la stabilité des parois cellulaires des plantes et à la résistance à l'hydrolyse enzymatique de l'hémicellulose. Ceci provoque surtout des biomasses lignocellulosiques récalcitrantes contre les attaques enzymatiques (Trajano et al., 2013 ; Zeng et al., 2014).

La lignine est un polymère tridimensionnel très complexe, ramifié et irrégulier, composé de divers groupes fonctionnels comme : le sinapyl, les phénylpropanoïdes de coniféryl et les *p*-alcools de poularyle (Zabin et al., 2017). Les groupes fonctionnels s'attachent au squelette de la lignine et de phénylpropanoïdes et rendent la structure plus complexe, tels que : les groupements hydroxyle phénolique, hydroxyle benzylique et carbonyle. La modification de la structure de la lignine ou la réduction de sa fraction massique sont les principaux objectifs pour surmonter la récalcitration de lignine et améliorer l'hydrolyse (Ragauskas et al., 2014). Cette structure de la lignine est considérée comme un obstacle à la transformation de la lignocellulose en biocarburants et aux industries de réduction de la pâte à papier (Kameshwar et Qin, 2016). La fraction massique de la lignine représente entre 9 et 30% de la matière première de la plupart des espèces ligneuses.

La lignine peut être dégradée par les micro-organismes lignine-dégradants, particulièrement les champignons blanc en sécrétant des enzymes ligninolytiques extracellulaires (ligninases) principalement laccase, peroxydase de lignine et peroxyde de manganèse, qui ont un potentiel industriel (Arora et Sharma, 2010 ; Liew et al., 2011). Cette délignification fongique de la biomasse est une alternative biologique au processus de détoxication et devient de plus en plus populaire en raison de sa nature écologique (Pandiyan et al., 2014).

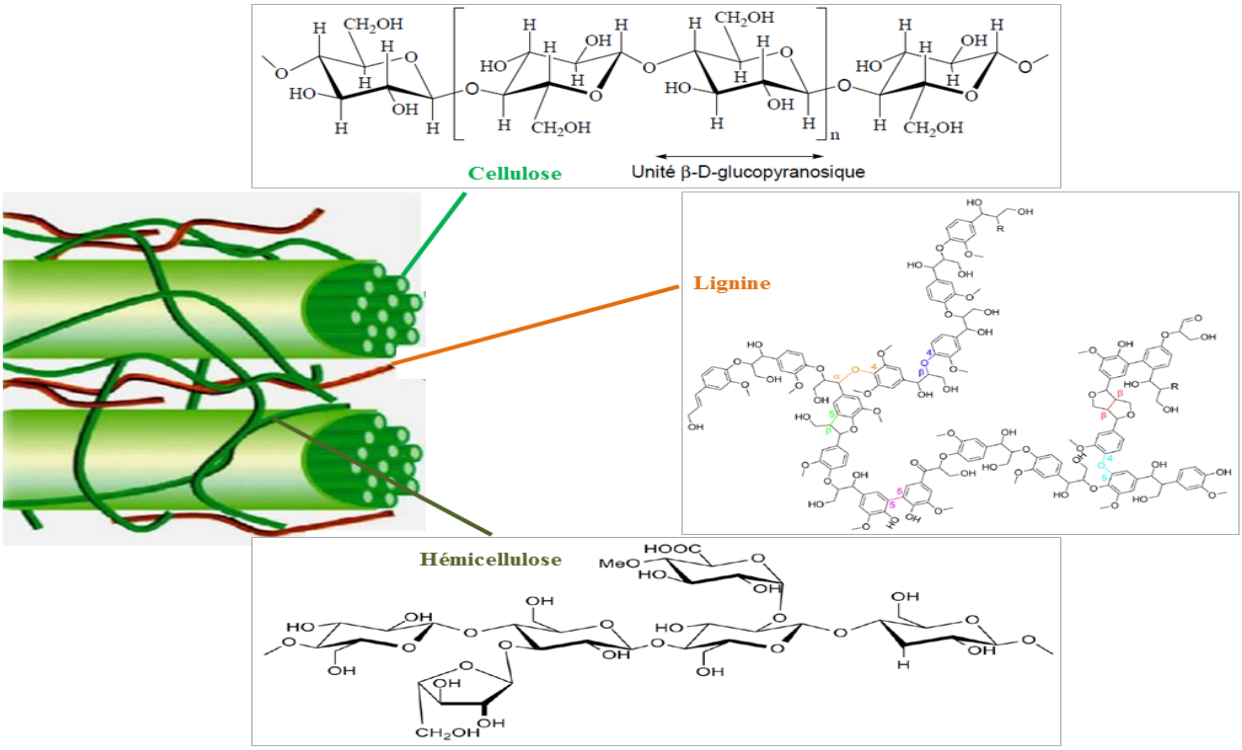


Figure 4: Structure de la biomasse lignocellulosique avec un exemple de structure de (L-arabino)-4-O-methyl-D-glucurono-D-xylane (Alonso et al., 2012 ; Ebringerova, 2005 ; Calvo-Flores et Dobado, 2010)

III. Prétraitement de la biomasse lignocellulosique

III.1. Généralités sur les procédés de prétraitement

La décomposition de la biomasse lignocellulosique a été entravée par la présence de la lignine et de sa structure récalcitrante associée à plusieurs liaisons carbone-carbone. Ceci bloque la dégradation enzymatique et chimique de divers substrats lignocellulose. Afin de faciliter l'accès des enzymes lignocellulosiques aux polysaccharides de substrats complexes, une phase de prétraitement est nécessaire pour éliminer ou modifier la lignine en une structure simple de fibres lignocellulosiques et rendre la cellulose plus accessible à la saccharification (Ma et al., 2014 ; Ping et al., 2016). Sans provoquer de rupture majeure dans la structure des glucides ou la dégradation des sucres et sans produire de produits susceptibles d'affecter l'étape de la saccharification et de la fermentation (Alvira et al., 2010). Plusieurs procédés de prétraitement chimiques, physiques, biologiques et physico-chimiques ont été utilisés individuellement ou en combinaison pour desserrer la structure lignocellulose et améliorer l'hydrolyse enzymatique de la biomasse (Lienqueo et al., 2016 ; Rabemanolontsoa et Saka, 2016).

Tel que : le broyage, le rayonnement à haute énergie, la pyrolyse, l'explosion de vapeur ou de fibres d'ammoniac, le traitement au gaz, l'oxydation humide, le traitement au solvant organique, le traitement au peroxyde d'hydrogène, le traitement biologique et le prétraitement alcalin ou acide (Badiei et al., 2014 ; Chaturvedi et Verma, 2013 ; Irfan et al., 2014 ; Langan et al., 2014 ; Kumar et al., 2009). Ces prétraitements sont classés en fonction du type d'énergie utilisée lors du prétraitement (Alvira et al., 2010). Les prétraitements acides et alcalins sont les méthodes les plus couramment employées (Chen et al., 2013a ; Iroba et al., 2013 ; Soares et al., 2016).

L'hydrolyse acide de différentes lignocellulose n'était efficace qu'aux températures élevées pour une récupération élevée des molécules cellulosiques et l'élimination de l'hémicellulose (Kapu et Trajano, 2014 ; Sun et al., 2014). Cependant, le processus de fermentation des sucres fermentescibles a été affecté par la formation d'inhibiteurs pendant le prétraitement acide, tels que : le furfural et l'hydroxylméthylfurfural. Ces processus actuels de prétraitement génèrent des sous-produits indésirables, une forte demande d'énergie et des coûts d'investissement élevés. Ceci est dû à l'utilisation de températures et de pressions élevées et à la dégradation partielle des substrats (Alvira et al., 2010).

III.2. Prétraitement biologique

Dans la recherche d'alternatives de prétraitement acide et alcalin, plusieurs traitements biologiques ont été développés en tant qu'outils écologiques pour perturber la structure lignocellulosique (Millati et al., 2011 ; Moreno et al., 2015). Ces méthodes biologiques exigent des conditions de réaction plus douces, une faible demande d'énergie, un faible inverstissement en capital et un temps de prétraitement prolongé. Pourtant, ces traitements ne libèrent pas les inhibiteurs et n'utlisent pas les catalyseurs chimiques.

Le prétraitement biologique est basé sur la dégradation de l'hémicellulose et de la lignine et de quelques molécules de cellulose par l'utilisation des champignons blanc et brun (Martin-Sampedro et al., 2015). Le prétraitement des résidus lignocellulosiques par des endophytes fongiques cellulolytiques et ligninolytiques, qui utilisent des matériaux végétaux comme source de carbone, constitue une alternative intéressante aux processus physico-chimiques. Les fongiques décomposeurs du bois sont généralement des saprothophes, tels que : les ascomycètes et les basidiomycètes de la pourriture blanche. Ces micro-organismes sont les plus efficaces pour dégrader les parois des cellules des plantes dans des conditions naturelles. Par l'utilisation d'enzymes ligninolytiques très spécifiques pour dégrader la lignine, modifier leur structure moléculaire et améliorer l'hydrolyse enzymatique ultérieure (Millati et al., 2011 ; Moreno et al., 2015). Ces traitements augmentent la surface disponible des substrats prétraités, le nombre de spores et améliorent l'accessibilité des enzymes aux polysaccharides (Fillat et al., 2017 ; Moreno et al., 2015).

Les endophytes fongiques ont une activité très spécifique en tant que principaux dégradeurs des biomasses lignocellulosiques, car ils sont adaptés aux processus évolutifs qui améliorent l'efficacité du prétraitement biologique (Martin-Sampedro et al., 2015). Les espèces basidiomycètes telles que : *Phanerochaete chrysosporium*, *Panus tigrinus*, *Trametes versicolor*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Ceriporiopsis subvermispora* et les genres *Bjerkandera*, *Trametes*, *Phanerochaete*, *Ganoderma* et *Pleurotus.*

Ils sont parmi les producteurs d'enzymes ligninolytiques les plus utilisés dans la décomposition biologique de différents résidus ligninolytiques et l'augmentation des rendements (Gupta et al., 2011 ; Kuhar et al., 2008 ; Maciel et al., 2012 ; Salvachua et al., 2011 ; Wan et Li, 2010). En plus des espèces basidiomycètes de la pourriture blanche, certains endophytes fongiques ligninolytiques du groupe ascomycète ont été utilisés comme étape de prétraitement, parce qu'ils sont impliqués dans les premiers stades de la dégradation de la matière.

Les endophytes fongiques *Hormonema* sp. et *Ulocladium* sp. ont été employés seuls ou en combinaison avec un traitement d'auto-hydrolyse pour améliorer les rendements d'hydrolyse enzymatique du bois d'*Eucalyptus globulus* (Fillat et al., 2016 ; Martin-Sampedro et al., 2015). De plus, les traitements biologiques pourraient être combinés avec d'autres prétraitements, tels que : l'extraction alcaline, l'explosion de vapeur et le prétraitement acide doux (Gui et al., 2013 ; Salvachua et al., 2011). Ces combinaisons augmentent le rendement en saccharification, réduisent la gravité du prétraitement chimique/physique, minimisent la formation d'inhibiteurs et réduisent la durée du traitement fongique (Martin-Sampedro et al., 2015).

IV. Enzymes hydrolytiques de lignocellulose

L'exploration chimique et énergétique des substrats lignocellulosiques est basée principalement sur la dépolymérisation de la matrice lignocellulose pour obtenir de petites molécules par l'intervention d'enzymes. La dégradation biologique des glucides est l'une des alternatives possibles obtenues avec plusieurs enzymes qui convertissent les hydrates de carbone en sucres monomères (Dyk et Pletschke, 2012). Endo et exo-glucanases, ß-xylosidases, endo et exo-xylanases et ß-glucosidases sont les principales enzymes hydrolytiques responsables de la dégradation de la lignocellulose. D'autres hémicellulases pourraient être impliquées dans le processus de dégradation comme : la β-glucuronidase, l'acétylestérase, la α-galactosidase et l'endo-1,4-β-mannase (Corrêa et al., 2014).

IV.1. Enzymes cellulolytiques

IV.1.1. Cellulases

Les cellulases sont des complexes protéiques multi-enzymatiques qui catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques et dépolymérisent la cellulose en sucre (figure 5). Ces enzymes font partie de la famille des glycosides hydrolases (Behera et Ray, 2016). Les cellulases impliquent une action hydrolytique synergique de l'endo-β-1,4 glucanase (3.2.1.4), de l'exo-β-1,4 glucanase (3.2.1.91) (3.2.1.74) et de la β-glucosidase (3.2.1.21) pour dépolymériser les celluloses (Sridevi et al., 2015). Ces cellulases sont importantes pour divers procédés industriels, fréquemment utilisés dans les secteurs pharmaceutiques, textile, alimentaire et du papier. Et même dans l'industrie alimentaire animale, ces enzymes hydrolytiques contribuent à améliorer la qualité nutritionnelle des aliments (Savitha et al., 2009). Les enzymes cellulolytiques sont répandues chez les plantes, les insectes et les micro-organismes. Les bactéries anaérobies et aérobies produisent des enzymes cellulolytiques sous forme de cellulosome ou simple (Bayer et al., 2009).

Cependant, les cellulases fongiques, notamment *Aspergillus* et *Trichoderma* sont les enzymes les plus courantes disponibles sur le marché sous la forme d'un mélange d'enzymes natives

simples (Behera et Ray, 2016). *Chrysosporium*, *Penicillium* et *Acremonium* sont les champignons alternatives prometteuses du *Trichoderma* (Liu et al., 2012). Dans les dernières décennies, l'attention a été dirigée vers l'utilisation des cellulases microbiennes dans la transformation des résidus lignocellulosiques pour la production de bioéthanol (Strakowska et al., 2014). Les endoglucanases sont les enzymes cellulases clés qui décomposent la cellulose en sucres fermentescibles simples, en hydrolysant aléatoirement les liaisons β-1,4-glycosidiques des chaînes de polymères cellulosiques dans la partie amorphe et en libérant les extrémités non réductrices et réductrices des oligosaccharides (Chen et al., 2020). Pourtant, les exoglucanases (EC 3.2.1.176) (EC 3.2.1.91) attaquent spécifiquement les extrémités cristallines non réductrices ou réductrices pour libérer les molécules de cellobiose et de glucose (figure 5) (Phitsuwan et al., 2013). De plus l'hydrolyse de la cellobiose au glucose était dirigée par les enzymes β-glucosidases (Eriksson et al., 2012 ; Gottschalk et al., 2010 ; Maeda et al., 2011).

Ces cellulases sont des enzymes hydrolytiques extrêmement importantes à l'échelle industrielle, en raison de leurs rôles dans le cycle du carbone en dégradant la cellulose insoluble en sucres solubles (Shah et al., 2015). Des cellulases pourraient être produites lors de la croissance d'endophytes sur des déchets lignocellulosiques dans des fermentations à l'état solide et submergée (de Almeida et al., 2011 ; Nagraj et al., 2014). L'utilisation de cellulases produites à partir de matières lignocellulosiques dans le processus de saccharification, fait partie de la plate-forme pour le développement de technologies de production de biocarburants et de produits chimiques (Sridevi et al., 2015).

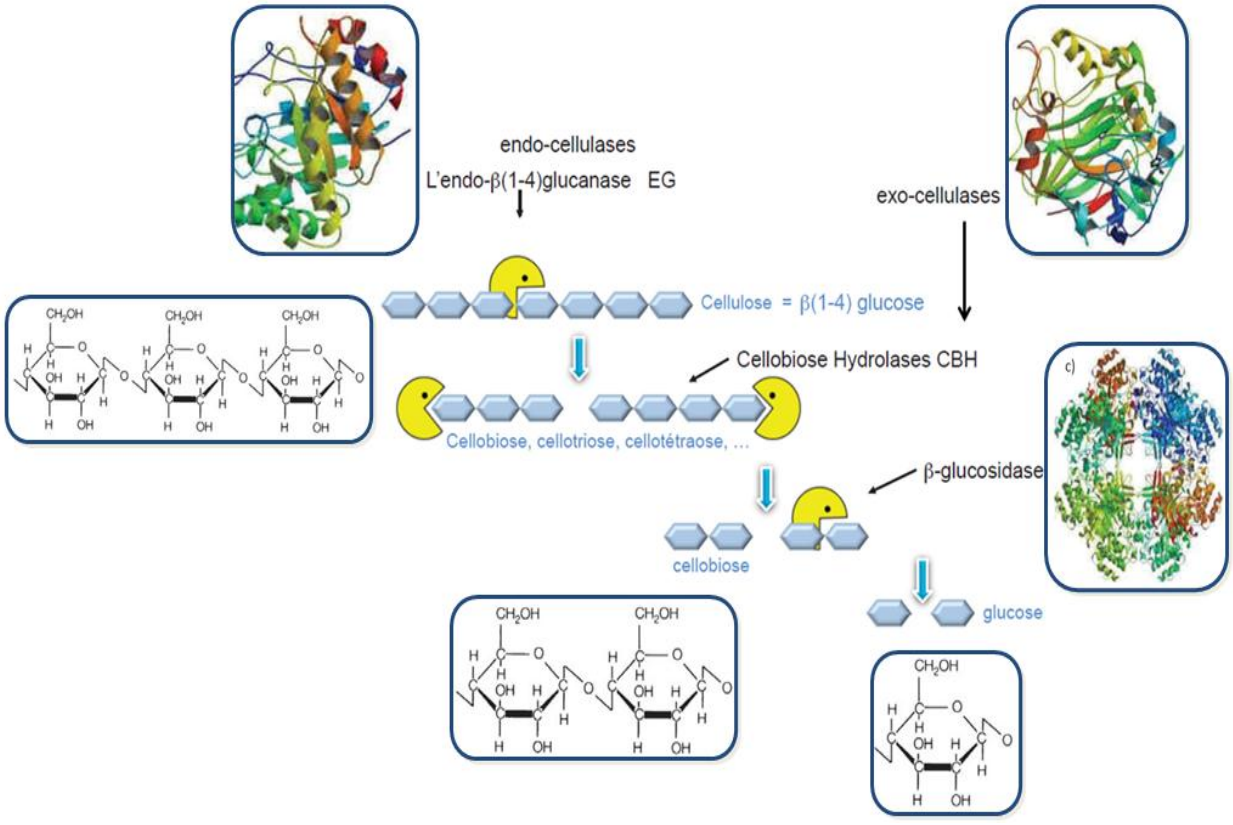


Figure 5: Schéma de la dégradation enzymatique de la cellulose par l'action synergique de trois cellulases (Juturu et Wu, 2014)

IV.1.2. Endophytes fongiques cellulases

L'opportunité de trouver de nouvelles enzymes cellulases est abondante avec la diversité fongique inexplorée qui colonise les plantes dans différentes niches et écosystèmes, surtout les cellulases fongiques pour des raisons industrielles (Fouda et al., 2015). La production industrielle d'enzymes cellulases était le troisième groupe d'enzymes le plus produit et utilisé au monde. Les endophytes fongiques *Trichoderma reesei, Neurospora crassa, Penicillium oxalicum, Aspergillus nidulans* et *Aspergillus niger* constituent les modèles de cellulase les plus étudiés à des fins biotechnologiques. Une valeur comprise entre de 1,0 et 59 $\mu mol.min.mg^{-1}$ d'endoglucanase brute produite par *Aspergillus niger* sur la cellulose commerciale et la lignocellulose naturelle (Gutiérrez-Rojas et al., 2013 ; Sridevi et al., 2009). Comme *Phanerochaete chrysosporium* qui a montré une très forte production d'enzymes cellulolytiques utilisant diverses pertes agricoles en tant que source de carbone (Saratale et al., 2014).

Les cellulases fongiques sont les enzymes les plus employées et les plus efficaces pour décomposer la cellulose. *Aspergillus glaucus* CCHA, *Penicillium* sp., *Phoma* sp., *Fusarium solani, Penicillium brasilianum, Humicola insolens, Phanerochaete chrysosporium, Trichoderma viride* et *Fusarium oxysporum* sont connus pour leurs capacités élevées de production de cellulases extracellulaires (Behera et Ray, 2016 ; Li et al., 2018 ; Pandey et al., 2016 ; Robl et al., 2013 ; Sideney Becker, 2013). *Colletrotrichum* sp., *Alternaria* sp., *Acremonium strictum, Cephalosporium, Talaromyces emersonii, A. fumigatus* et *Aspergillus* sp. isolés du biome et de plantes médicinales ont montré une très forte activité cellulolytique extracellulaire (Deswal et al., 2011 ; Devi et al., 2012 ; Dey et al., 2011 ; Goldbeck et al., 2013 ; Smitha et al., 2014 ; Sunitha et al., 2013 ; Uzma et al., 2016).

Bjerkandera adusta, Pycnoporus sanguineus et *Fomitopsis* sp. sont des basidiomycètes cellulylotiques qui produisent de grandes quantités de cellulases et sont développés sur des substrats lignocellulosiques à faible coût, comme : la paille de blé, la paille de riz, le chaume de maïs , la balle de riz et la sciure de bois (Deswal et al., 2011 ; Quiroz-Castaneda et al., 2011). Les fongiques de phylum d'ascomycète caractérisés par leur grand potentiel de production d'enzymes cellulolytiques, isolés principalement de niches écologiques contenaient des résidus agricoles (Hansen et al., 2015).

IV.2. Enzymes ligninolytiques

Une série d'enzymes oxydantes principalement le manganèse peroxydase, la laccase et la lignine peroxydase sont nécessaires pour la dégradation complète des matériaux lignocellulosiques (Maciel et al., 2012). Les oxydoréductases telles que : l'alcool arylique oxydase, glyoxal oxydase, pyranose-2-oxydase et glucose-1-oxydase peuvent être utilisés dans le processus d'hydrolyse enzymatique. Ces ligninases sont des enzymes prometteuses dans la dégradation des polluants environnementaux (Abrahao et al., 2008). Les fongiques sont différents des bactéries, ils produisent un ensemble d'exo-enzymes ligninolytiques capables de réduire divers colorants azoïques (Sen et al., 2016). Les enzymes oxydases sont généralement produites par différents fongiques blanc comme : *Trametes versicolor*, *Pycnoporus coccineus*, *Daedalea* sp. et les *Phellinus* sp. (Liew et al.,2011).

IV.2.1. Laccases

Les laccases sont des oxydoréductases ou benzène-diol (oxygène oxydoréductases : EC 1.10.3.2), appartiennent aux oxydases de cuivre appelés oxydases bleues, avec des poids moléculaires allant de 58 à 90 kDa (El Enshasy et al., 2017 ; Sheikhi et al., 2012). Les laccases contiennent quatre atomes de cuivre qui forment le noyau catalytique de l'enzyme divisé en trois sites redox (figure 6 B, C) (Sondhi et Saini, 2019). Ces laccases catalysent l'oxydation mono-électronique des molécules de substrat aux radiateurs réactifs, réduisent les molécules d'oxygène aux molécules d'eau et oxydent quatre molécules de substrat pour produire quatre radicaux (figure 6 A) (Arora et Sharma, 2010).

Certaines laccases ne contiennent pas d'atomes de type T1 et sont nommées par les laccases jaunes ou blanches comme la laccase de fongique *Pleurotus ostreatus*. Les laccases sont des oxydases exceptionnelles parce qu'elles utilisent l'oxygène moléculaire comme co-substrat à la place du peroxyde d'hydrogène employé par les enzymes peroxydases (figure 6 A). Ceci rend les laccases très intéressants pour différentes applications biotechnologiques (Sheikhi et al., 2012).

Ces laccases sont responsables de l'oxydation de divers groupes de composés phénoliques, polyphénols, diamines aromatiques et d'autres types de composés. En outre, en présence de médiateurs redox, les laccases peuvent même oxyder les structures non phénoliques (Desai et Nityanand, 2011). Car ces substrats non phénoliques ont des tailles et des potentiels redox élevés qui limitent leur pénétration dans l'emplacement actif de l'enzyme laccase. Les médiateurs redox sont des composés de faible poids moléculaire qui servent de vecteurs d'électrons synthétiques entre l'enzyme et le substrat, comme le 1-hydroxybenzotriazole (HBT). Cette utilisation des médiateurs redox permet d'explorer diverses applications biotechnologiques de laccase (Rico et al., 2014).

Les laccases extracellulaires ont été détectées chez diverses bactéries, plantes, insectes et champignons. Bien que les laccases intracellulaires n'étaient sécrétées que par certains insectes et champignons (Sen et al., 2016). Les laccases fongiques présentaient généralement des poids moléculaires inférieurs à ceux des laccases végétales. Ces laccases contribuent à la dégradation de la lignine, considérée parmi les technologies vertes. Les gènes de laccase fongique codent pour dix bases d'histidine et une de cystéine qui sont responsables de l'attachement des atomes de cuivre. Les propriétés spectroscopiques permettent de différencier et classer trois types d'atomes de cuivre. Le type 1 donne une coloration verdâtre de ces protéines, le type 2 intervient dans le transfert d'électrons et le type 3 est responsable de la fixation de l'oxygène (Arora et Sharma, 2010).

Les laccases fongiques jouent plusieurs rôles dans la morphogenèse, la pathogenèse et la dégradation de la lignine de lignocellulose (Kudanga et Le Roes-Hill, 2014) et même dans les applications agricoles, médicinales et industrielles (Arora et Sharma, 2010). Tels que : le blanchiment des teintures textiles, la délignication de la pulpe, la dégradation des colorants, la transformation des antibiotiques et des stéroïdes. Et même, en bio-remédiation de substances aromatiques, xénobiotiques, polluants industriels, sols contaminés et eaux usées (Desai et Nityanand, 2011 ; Mirzadeh et al., 2014 ; Yavuz et al., 2014).

Les laccases fongiques ont un potentiel de réduction du cuivre de type 1 plus élevé que les laccases bactériennes, ce qui les rend plus efficaces dans les applications commerciales (Augustine et al., 2008 ; El Enshasy et al., 2017) en dépit de la lente croissance des champignons et de la difficulté de contrôler leur taux de glycosylation (Rodgers et al., 2010).

La production de laccase est stimulée par des substrats inductifs, généralement des composés aromatiques et phénoliques liés à la lignine ou à ses dérivés, qui peuvent varier d'une laccase à l'autre. Comme : acide gallique, *p*- anisidine, acide férulique, alcool vératrylique, 1-hydroxybenzotriazol, 2,5-xylidine, guaïacol, acide-2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique) (ABTS), acide hydroxyanthranilique, syringaldazine et catéchol ou hydroquinone (Tisma et al., 2012). L'utilisation de l'enzyme laccase dépend de sa stabilité dans des conditions industrielles et de son coût de production (Sondhi et Saini, 2019). Certains laccases sont liées de façon covalente à un fragment de glucides (10 à 45%) qui contribue efficacement à leur stabilité (Tisma et al., 2012). Les déchets lignocellulosiques et les sous-produits industriels ont été utilisés dans la synthèse de laccases, afin de réduire les coûts de production des enzymes en tant qu'approche écologique et économiquement viable.

A l'échelle industrielle, la synthèse d'une grande quantité de laccase est réalisée par fermentation à l'état solide (SSF) à l'aide de résidus de déchets agricoles, tels que : la paille de blé, paille de riz, bagasse de canne à sucre, son de blé, son de riz, purée de pommes, peau de banane, etc… (Karp et al., 2015 ; Patel et Gupte, 2016).

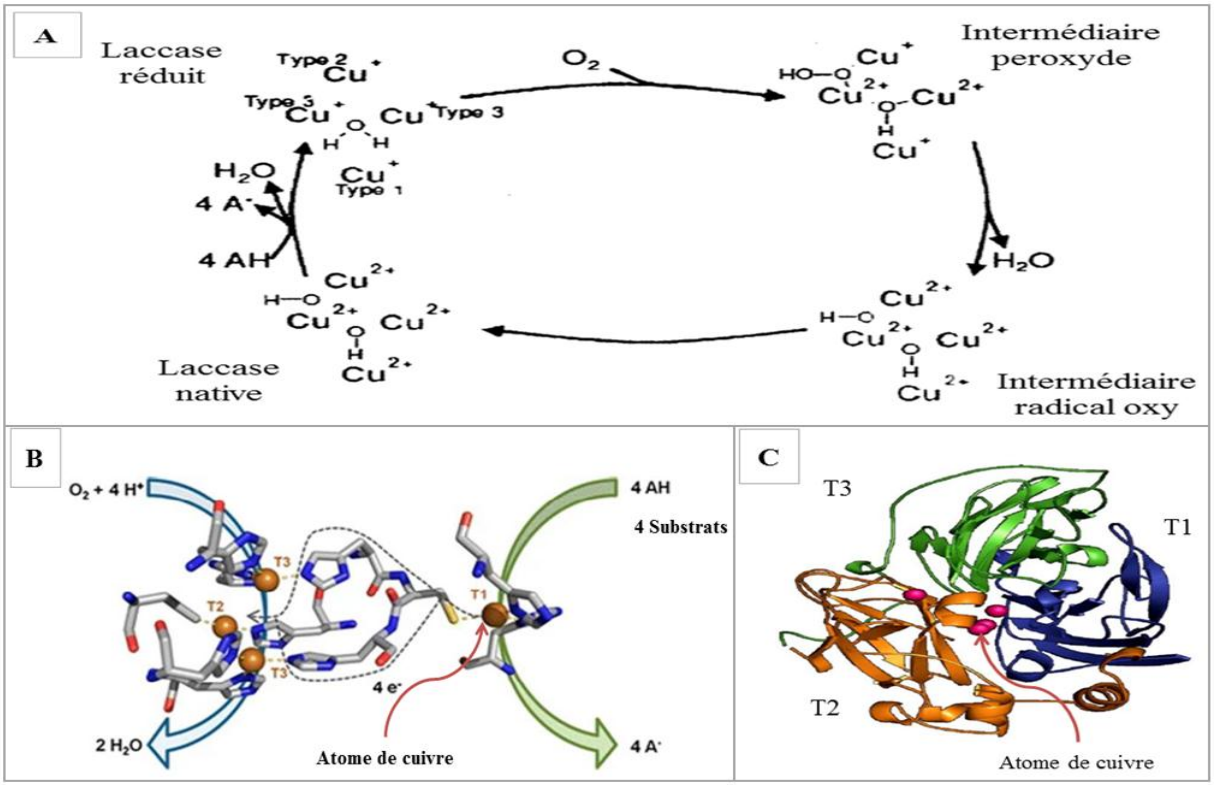


Figure 6: Cycle catalytique des laccases (A) (Wesenberg et al., 2003) ; Schéma du site actif d'une laccase et la position des sites T1, T2 et T3 (B) (Pardo et Camarero, 2015) et la structure 3D de la laccase du fongique *Trametes trogii* (C) (Matera et al., 2008)

IV.2.2. Endophytes fongiques laccases

Les endophytes fongiques lignocellulolytiques ont été considérés comme une nouvelle source alternative d'enzymes (Suryanarayanan et al., 2012). Parmi les champignons, les ascomycètes et les basidiomycètes se sont avérés être les producteurs les plus efficaces de laccase. Ces laccases sont généralement extracellulaires et plus stable dans leur rôle que les laccases intracellulaires. Les ascomycètes *Podospora anserina, Monocillium indicum* et le *Gaeumannomyces graminis* sécrètent des laccases oligomères avec des teneurs en glucides comprises entre 15% et 20% et des centres de glycoprotéine multi-cuivres de poids moléculaire entre 60 et 80 kDa (Arora et Sharma, 2010).

Divers systèmes fongiques ont été utilisés pour la délignification des différentes biomasses lignocellulosiques par la sécrétion de laccase et de peroxydases, tels que : *Peniophora* sp., *Marasmiellus palmivorus* et *Schizophyllum commune* (Pandiyan et al., 2014). L'association des endophytes fongiques laccases aux plantes hôtes favorise la formation d'organes fructifères, la défense contre le stress et la protection contre les agents pathogènes, en décomposant les parois cellulaires et les matériaux lignocellulosiques (Uzma et al., 2016).

A titre d'exemple, les espèces *Phomopsis longicolla* et *Pestalotiopsis* sp. J63 sont isolées à partir d'échantillons de boues marines qui peuvent utiliser divers sous-produits lignocellulosiques comme substrats (Chen et al., 2011). Un autre groupe d'endophytes fongiques ligninolytiques laccases considérés comme des espèces à fort potentiel de bio-remédiation et capables de dégrader l'indole. Tel que *Phomopsis liquidambari* produit l'enzyme laccase en employant l'acide phénolique 4-hydroxybenzoïque comme source de carbone et d'énergie (Chen-Y et al., 2013).

Les endophytes *Ganoderma lucidum* et *Trametes versicolor* sont reconnues par leur potentiel élevé de production de laccase et leur décoloration de vert de malachite (Kuhar et al., 2015). De façon similaire, les champignons basidiomycètes *Pleurotus ostreatus* et *T. versicolor* utilisent des tiges de sorgho pour soutenir la production de laccase et d'autres enzymes comme la xylanase et la protéase (Iandolo et al., 2011). Et même, les endophytes *Datronia caperata*, *Polyporus tenuiculus* et *Pycnoporus sanguineus* ont montré une grande capacité de production de laccase par fermentation à l'état solide avec du son de blé comme source de carbone (Abrahao et al., 2008).

Chapitre III : Production de bioéthanol lignocellulosique

I. Généralités sur le bioéthanol de deuxième génération

Les biocarburants sont un choix respectueux de l'environnement qui réduit la dépendance envers les combustibles fossiles en valorisant la biomasse inexploitée (Jin et al., 2011). Le Brésil et les Etats-Units sont les plus grands producteurs mondiaux de biocarburants avec 41,4% et 23,6% de la production totale en 2015, principalement des résidus de cultures de maïs et de canne à sucre (BP global, 2016). La demande mondiale de bioéthanol devrait augmenter de 3,4 fois en 2035 (Baeyens et al., 2015 ; Limayem et Ricke, 2012). Le département américain de l'Energie prédit que d'ici 2025, 30% des carburants de transport à base de biomasse remplaceront les carburants à base de pétrole (Department of Energy ; Transport Energy Future Series).

La production de bioéthanol à partir de fibres lignocellulosiques résiduelles était une alternative attrayante et peu coûteuse à l'essence et au diesel. Cela contribue au développement durable face aux enjeux des combustibles fossiles (Schuster et Chinn, 2013 ; Wu, 2013). Le haut indice d'octane et la chaleur de la vaporisation ont suscité un grand intérêt de la part des gouvernements du monde pour le développement et la valorisation de bioéthanol de deuxième génération (Chen et Qiu, 2010). La technologie de production d'éthanol lignocellulosique a été améliorée pour réduire les coûts de production et concurrencer les énergies fossiles, en utilisant des biomasses cultivées au niveau régional et leurs résidus afin de réduire les coûts de transport (Chen et Fu, 2016 ; Haque et al., 2014; Thangavelu et al., 2016).

Trois étapes sont nécessaires pour convertir les substrats lignocellulosiques en bioéthanol (Singh et Bishnoi, 2012). La première étape conduit principalement à la réduction de la cristallinité de la lignine et à l'exposition des celluloses à la digestion enzymatique avec diverses méthodes de prétraitement de la lignocellulose. Il a été suivi d'une saccharification des matériaux prétraités à l'aide d'un cocktail d'enzymes hydrolytiques pour obtenir des sucres fermentescibles (cellobiose, glucose…). Finalement, une étape de fermentation alcoolique des glucides fermentables est nécessaire pour produire du bioéthanol en utilisant des espèces telles que *Saccharomyces cerevisiae* (Paulova et al., 2015) (figure 7). La production d'éthanol à partir de résidus lignocellulosiques a été entravée par la présence de lignine et de sa structure récalcitrante, qui bloque la dégradation enzymatique et chimique de la lignocellulose.

L'efficacité du prétraitement des biomasses lignocellulosiques consiste à éliminer les barrières de l'hémicellulose et de la lignine autour des fibres cellulosiques, pour ouvrir leur structure cristalline et les rendre plus accessibles à l'attaque enzymatique (Bouza et al., 2016). Les nouvelles technologies de production de bioéthanol lignocellulosique visaient à réduire les coûts de prétraitement en recyclant les fractions liquides (Alencar et al., 2017 ; Li et al., 2015 ; Rocha et al., 2014). Et même, ils ciblaient à augmenter la quantité de monosaccharides durant l'hydrolyse enzymatique, en réduisant la charge enzymatique et en augmentant de la charge de biomasse lignocellulosique (Chiarello et al., 2016). La dégradation enzymatique des substrats lignocellulosiques, comme les déchets municipaux et industriels libère des sucres fermentescibles susceptibles de produire du bioéthanol (Saha et al., 2011).

II. Matières premières

Plusieurs types de substrats lignocellulosiques pourraient servir de matières premières pour produire de l'éthanol de deuxième génération, tels que : les déchets agricoles et industriels, les matières ligneuses et les résidus culturaux (Mussatto et al., 2010 ; Kwon et al., 2011 ; Singh et Bishnoi, 2013). Le substrat lignocellulosique est la biomasse non alimentaire la plus abondante, facile à collecter et à transporter et l'une des sources d'énergie durable. Environ 5,6 milliards de tonnes de résidus agricoles et forestiers secs sont produits annuellement, mais seulement 10 à 25% ont été utilisés comme matière première pour la production industrielle d'éthanol (Ho et al., 2014).

Les biomasses et les résidus de paille agricole sont une ressource mondiale durable, renouvelable, abondante et inépuisable. En Chine seulement, un rendement annuel d'environ 700 millions de tonnes de paille a été produit (Liu et al., 2013 ; Qin et al., 2012). La tige de sorgho sucré (SSS) a servi de matière première pour la production de bioéthanol parmi diverses pailles agricoles disponibles (Li et al., 2013), en raison de leur coût de production, de leur rendement élevé en biomasse (de 20 à 30 tonne par hectare de matière sèche) et de leur abondance de glucides solubles et insolubles (Petti et al., 2013 ; Wu et al., 2010).

La bagasse de canne à sucre était aussi l'un des substrats lignocellulosiques les plus utilisés pour la bioconversion de la biomasse en bioéthanol, en particulier pour les pays tropicaux, en raison de leur faible coût de récolte et de transport, de leur teneur élevée en glucides et de leur faible teneur en lignine (Gouveia et al., 2009). Plusieurs résidus agro-industriels ont été valorisés avec de nouvelles technologies pour la production de bioéthanol, en utilisant des procédés de fermentation à l'état solide et submergée, tels que : les tiges de *Phoenix canariensis*, les pleures d'*Ananas cosmosus*, l'agrogaspille de banane, le son de riz et le son de soja (Latika et Sonia, 2015 ; Robl et al., 2013 ; Shah et al., 2015 ; Sridevi et al., 2015).

Des données ont été rapportées sur le potentiel énergétique des cladodes de diverses variétés de cactus pour la production de bioéthanol, en combinant différents prétraitements (alcalin, acide…) avec l'hydrolyse enzymatique pour améliorer la production d'éthanol durant le processus de saccharification et de fermentation simultanée (de Souza Filho et al., 2016 ; Kuloyo et al., 2014).

Les cladodes et les fruits de plusieurs variétés de figuiers ont produit un rendement moyen en éthanol de 2,5 à 34,9 $g.L^{-1}$ (do Nascimento Santos et al., 2016). Ces espèces de cactus sont caractérisées par une teneur en lignine relativement faible comparé à d'autres matières premières herbacées. Ceci réduit leur nécessité pour le prétraitement dur et la saccharification, en réduisant ainsi le coût du traitement (Yang et al., 2015). Le figuier de cactus et d'autres espèces d'*Opuntia* spp. ont constitué récemment des matières premières bioénergétiques pour la production de bioéthanol pour les pays à climat semi-aride et aride (Cushman et al., 2015 ; Davis et al., 2019 ; Krumpel et al., 2020 ; Lueangwattanapong et al., 2020).

III. Procédés de fermentation

Parmi les procédés les plus utilisés pour produire du bioéthanol de deuxième génération figurent la fermentation SHF, SSF et la CPB (figure 7).

Pour la première, l'hydrolyse enzymatique et la fermentation des substrats lignocellulosiques prétraités sont effectuées en deux étapes séparées, suivant un procédé d'hydrolyse et de fermentation séparée (SHF). Ou en une seule étape, au cours d'un processus de saccharification et de fermentation simultanée (SSF) (Kuloyo et al., 2014 ; Lizardi-Jimenez et Hernandez-Martinez, 2017). La plus grande quantité de bioéthanol lignocellulosique a été produite par le procédé d'hydrolyse et de fermentation séparée (SHF), qui nécessite des récipients séparés et des conditions optimales pour la saccharification et la fermentation. Une fois la fermentation alcoolique terminée, la levure est facilement récupérée et recyclée. Néanmoins, des difficultés peuvent réduire l'efficacité de la saccharification en inhibant les enzymes par le produit final durant l'hydrolyse (Choudhary et al., 2017).

Pour la fermentation SSF, l'hydrolyse et la fermentation sont effectuées simultanément dans un seul bioréacteur, généralement à la température optimale des levures. Ceci permet de réduire les coûts de fonctionnement du procédé et de minimiser l'inhibition des enzymes hydrolytiques par le produit final (glucose et le cellobiose), en utilisant simultanément pour la fermentation les sucres et les cello-oligosaccharides produits par la saccharification (Fox et al., 2012 ; Garcia-Aparicio et al., 2011). Ce processus simultané réduit également le risque de contamination microbienne et facilite la récupération continue de l'éthanol (Abdel-Banat et al., 2010 ; Thomas et al., 2013).

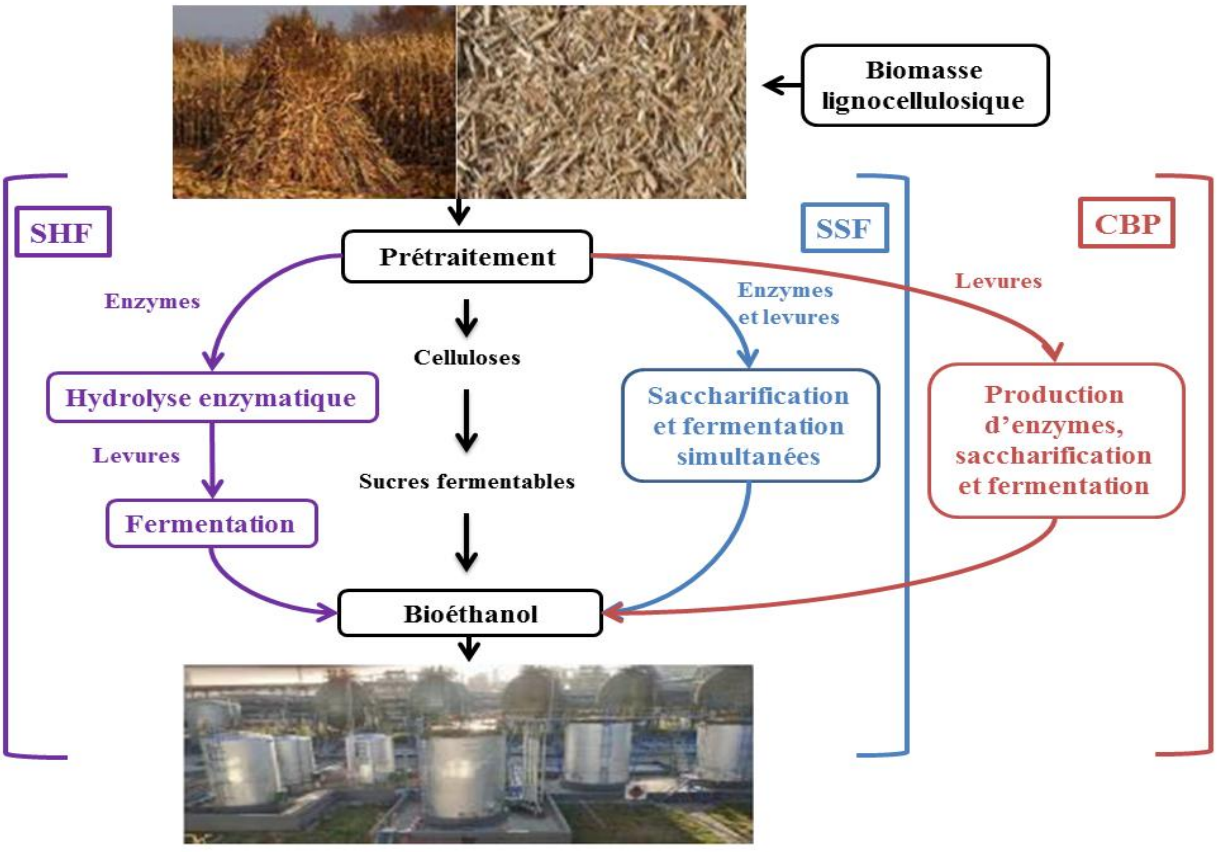


Figure 7: Différents modes de fermentation industrielle qui utilisent la biomasse lignocellulosique pour la production du bioéthanol ; SHF : Hydrolyse et fermentation séparée ; SSF : Saccharification et fermentation simultanée ; CBP : Bioprocédé consolidé (Chen et al., 2020)

La fermentation SSF est une culture microbienne qui se développe sur des substrats solides naturels comme les résidus agro-industriels ou sur des supports inertes destinés à la production de biocarburants (Chen et al., 2013). Cependant, la fermentation SSF a été influencée par plusieurs paramètres tels que : la température, les inhibiteurs, la concentration en solide, la charge des enzymes et la charge de levure.

Le bio-traitement consolidé (CBP) est une stratégie alternative prometteuse qui réduit de façon significative les coûts de la bio-raffinerie, en combinant en une seule étape la synthèse des enzymes lignocellulolytiques, la déconstruction de la biomasse et la fermentation du sucre à l'aide d'un seul micro-organisme (Olson et al., 2012 : Parisutham et al., 2014 ; Schuster et Chinn, 2013). Bien que, la plupart des travaux se soient concentrés sur le développement de micro-organismes et de consortiums capables de convertir la cellulose en éthanol à partir de la biomasse lignocellulosique (Akinosho et al., 2014 ; Anasontzis et Christakopoulos, 2014 ; Favaro et al., 2015 ; Wei et al., 2014 ; Wu et Davis, 2016). Pourtant, les différentes espèces ont généré une quantité significative de sous-bioproduits, ce qui indique un niveau immature pour une application commercialement rentable. Ceci nécessite davantage un développement et une exploration plus poussés pour identifier d'autres micro-organismes capables de réaliser les deux actions simultanément (Anasontzis et Christakopoulos, 2014).

IV. Levures thermotolérantes

Plusieurs facteurs affectent grandement la production d'éthanol et réduisent le taux de croissance des micro-organismes, particulièrement les levures. Ceux-ci, incluent le stress thermique, la concentration d'éthanol et la pression osmotique, qui sont générés pendant le processus de fermentation alcoolique (Atiya et al., 2017). La température utilisée pour la fermentation à grande échelle constitue un facteur déterminant du coût de production de l'éthanol (Abdel-Banat et al., 2010). Pourtant, la fermentation à haute température est un choix avantageux pour réduire le risque de contamination et augmenter l'efficacité de la récupération des produits finaux, tout en réduisant les coûts de refroidissement et les rapports énergétiques (Hasunuma et Kondo, 2012). Avant de procéder à une fermentation alcoolique à haute température, il faut tenir compte de la capacité des micro-organismes à croître et à produire de l'éthanol dans des conditions inhibitrices, en particulier les températures élevées.

La production d'éthanol s'est avérée plus efficace avec les levures que les bactéries, en raison de leur grande capacité à fermenter et à tolérer des concentrations élevées d'éthanol et de sous-produits formés pendant les étapes de prétraitement et de fermentation (Atiya et al., 2017). Les *Saccharomyces* ssp. restent les espèces les plus utilisées dans les industries productrices de bioéthanol. Ces espèces sont capables de fermenter différents types de sucres solubles (glucose, saccharose et fructose) en éthanol par glycolyse dans des conditions anaérobies (Lin et Tanaka, 2006). Les températures optimales pour la croissance et la fermentation de *Saccharomyces* ssp. varient entre 25 et 35 °C. Ceci limite leur utilisation spécifiquement dans le procédé de fermentation SSF. D'autres espèces thermotolérantes de *S. cerevisiae* ont montré des capacités de fermentation à haute température et atteint des concentrations d'éthanol de 28 $g.L^{-1}$ à 40 °C à partir de la canne à sucre et des biomasses lignocellulosiques (Edgardo et al., 2008). Des augmentations potentielles ont été montrées dans les rendements théoriques d'éthanol d'un pourcentage de 77,3% pendant le procédé de fermentation SSF (Wang et al., 2015).

Pour les industries du bioéthanol, les levures thermotolérantes sont souhaitables en raison de leur efficacité à produire de l'éthanol et de leur grande tolérance aux facteurs de stress, comme : les inhibiteurs, des concentrations élevées de sucres et de sels dans un milieu acide (Yuan et al., 2017). Certaines souches thermotolérantes de *Kluyveromyces marxianus* se développent à des températures variant entre 42 et 45 °C, puis produire des quantités d'éthanol comprises entre 28 et 67,8 $g.L^{-1}$ à des températures supérieures à 40 °C à partir des hydrolysats de biomasses lignocellulosiques (Edgardo et al., 2008). En utilisant simultanément, une large gamme de sucres lignocellulosiques tels que : le xylose, le cellobiose et l'arabinose, avec un taux de croissance élevé comparable à la souche standard *S. cerevisiae* (Kuloyo et al., 2014 ; Lane et Morrissey, 2010 ; Matsushika et al., 2009). La thermotolérance de *Kluyveromyces marxianus*, son système métabolique varié de sucres et leur rendement élevé en éthanol sont les avantages industriels recherchés pour les procédés SSF et SHF comparés à la levure de boulanger (Castro et Roberto, 2014).

La levure thermotolérante *Pichia kudriavzevii* se caractérise par sa grande productivité en éthanol en présence de fortes concentrations de sel dans le milieu acide et même sa tolérance aux inhibiteurs qui élimine le besoin de neutralisation et de perte de sucres (Isono et al., 2012). *Pichia kudriavzevii* a récemment été utilisé pour la production d'éthanol lignocellulosique à partir de paille de riz avec le procédé SSF à 42 °C pour une teneur élevée en éthanol de 33,4 $g.L^{-1}$, avec un taux d'augmentation de 39% par rapport à la *S. cerevisiae* classique de 24,1 $g.L^{-1}$ à 30 °C (Yuan et al., 2017). En présence de plusieurs hydrolysats de jus de canne à sucre, d'amidon de manioc, de paille de riz et de tiges de coton, *P. kudriavzevii* peut produire de l'éthanol avec des valeurs élevées par le processus SSF (Dhaliwal et al., 2011 ; Kaur et al., 2012 ; Oberoi et al., 2012 ; Yuangsaard et al., 2013).

Au cours des processus d'hydrolyse acide et enzymatique, la déshydratation et la dégradation des hexoses et des pentoses génèrent différents inhibiteurs dérivés de lignocellulose, comme : les composés phénoliques, les acides faibles et les dérivés du furanes qui jouent un rôle crucial dans l'inhibition de la croissance des levures et la réduction de la quantité d'éthanol produite (Yuan et al., 2017).

Certaines espèces de *Candida tropicalis* ont été caractérisées par leur capacité à utiliser des sucres fermentescibles provenant de l'hydrolysat lignocellulosique et même tolérer la présence de composées inhibiteurs comme : le 5-hydroxyméthylfurfural (HMF), le furfural et l'acide acétique qui sont générés au cours du prétraitement des substrats pour produire de l'éthanol (Choudhary et al., 2017 ; Mattam et al., 2016). La résistance aux inhibiteurs a été améliorée grâce à l'adaptation de la levure aux composés toxiques et au génie génétique (Jonsson et al., 2013). Les souches *K.marxianus, Candida tropicalis* et *Pichia kudriavzevii* constituent une alternative potentielle pour la fermentation éthanolique à haute température à partir d'hydrolysats de lignocellulose comparé à la souche de référence *S.cerevisiae* utilisée dans l'industrie de l'éthanol cellulosique.

Partie 1 : Isolement, purification et identification des endophytes sélectionnés

MATERIELS ET METHODES

I. Collection d'échantillon végétal

I.1. Site d'étude

Un échantillonnage aléatoire a été effectué dans une forêt en face d'Oued Zerrouka I (H16) principal affluent de l'oued Tizguite. Ce site est situé à l'entrée de la ville d'Ifrane, la région du Moyen Atlas, province d'Ifrane, Maroc. Les coordonnées géographiques ont été enregistrées par Latitude : 33,527605, Longitude : -5,107408 et Altitude : 1650 m (Figure 8).

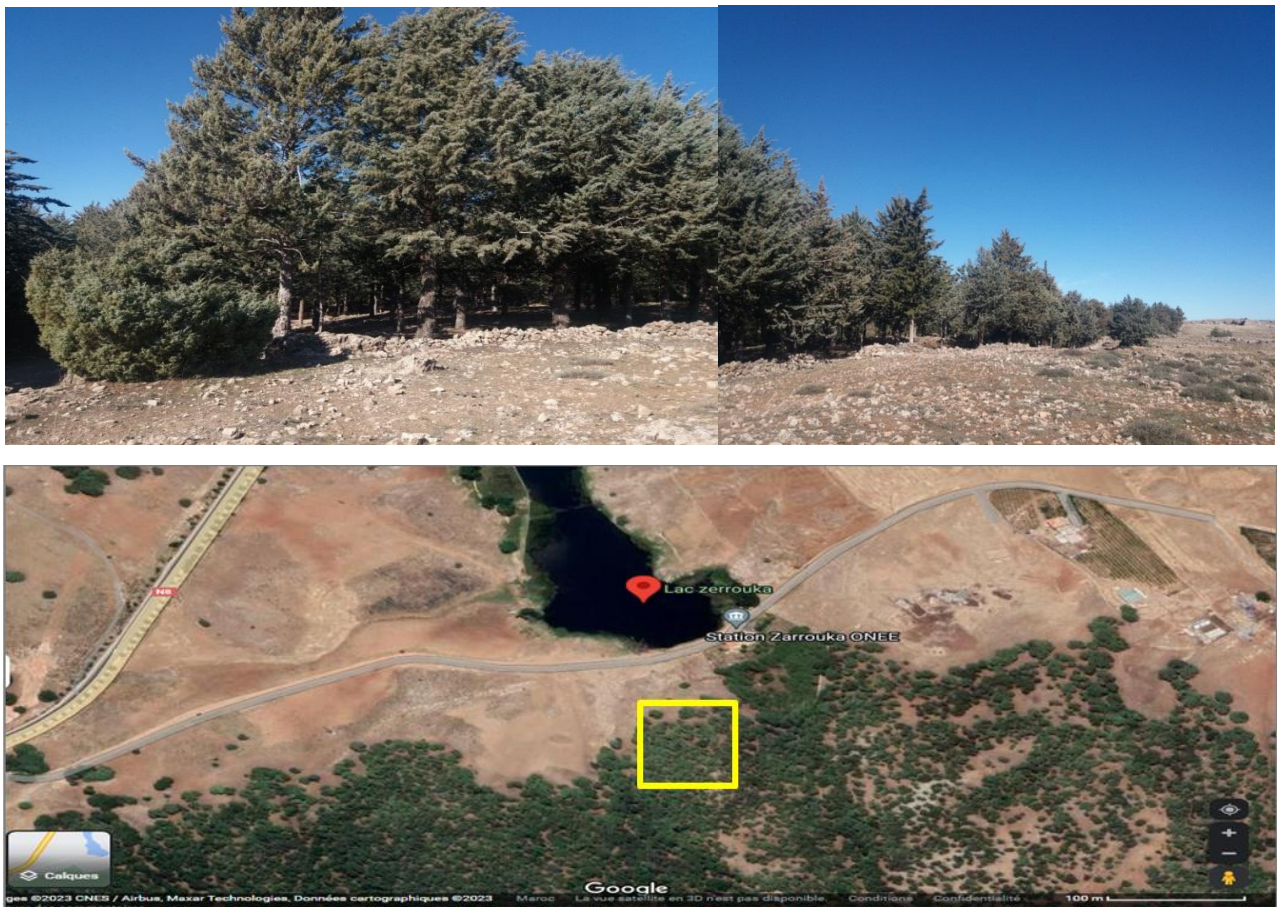


Figure 8: Site d'échantillonnage de plantes dans la forêt en face de l'Oued Zerrouka 1 situé dans la région du Moyen Atlas, province d'Ifrane, Maroc (Décembre 2019)

Ce site expérimental se trouve dans la région atlasique à 2 km au nord d'Ifrane, près du Jbel Zerrouka exposition Est. Cette région se caractérise par un bioclimat méditerranéen humide et froid en hiver, tempéré et sec en été. La température annuelle moyenne était de 0 - 37 °C et les précipitations annuelles étaient inférieures à 300 mm, car la région d'Ifrane a subi de graves sécheresses au cours des dernières années (Service d'information Ramsar).

La végétation dans cette forêt est variée avec des espèces ayant une vaste répartition géographique. *Juniperus thurifera* et *Juniperus oxycedrus* ont été repérés au milieu de la forêt. Quelques pieds de *Cedrus atlantica*, de *Chêne vert* et de *Pin maritime* ont été regroupés à l'extrémité de la forêt sous un sol pauvre en roches calcaires.

I.2. Choix de matériel végétal

La collecte des échantillons de bois a été réalisée à deux reprises : En novembre 2017, des tiges fraîches et saines ont été collectées de plantes des divers genres *Juniperus oxycedrus*, *Juniperus thurifera*, *Cedrus atlantica*, *Chêne vert* et *Pin maritime*. Et en décembre 2019, des tiges avec des feuilles aigues saines ont été récoltées des arbres de *Juniperus oxycedrus* (Figure 9).

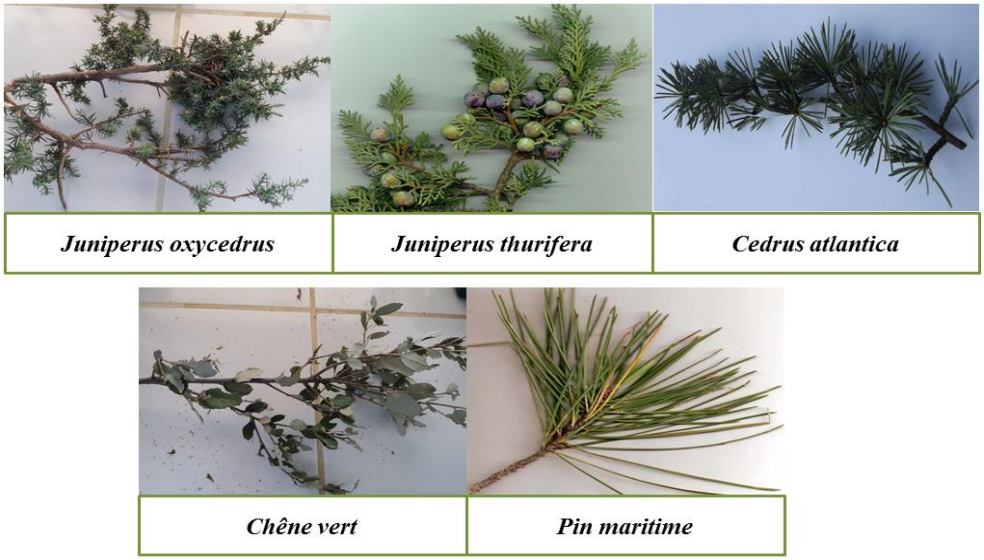


Figure 9: Echantillons de plantes utilisées lors des isolements 1 et 2 (novembre 2017, décembre 2019)

II. Isolement des endophytes fongiques

II.1. Traitement des échantillons

Des échantillons de bois frais ont été collectés de manière aléatoire à différents points dans la forêt sans laisser de traces d'échantillonnage. Plusieurs tiges de 10 cm avec des feuilles ont été coupées à l'aide d'un couteau désinfecté à 70% d'éthanol et mis dans des sacs en plastique stériles. Au laboratoire les échantillons sont traités en un maximum de 24 heures.

Les échantillons de tiges et de feuilles ont été rincés deux fois avec de l'eau distillée stérile. Les tiges des plantes ont été découpées en petits morceaux de 1cm avec un scalpel stérile, puis stérilisées à la surface par immersion des échantillons dans les solutions suivantes : 75% d'éthanol pendant 20 s, hypochlorite de sodium 4% 90 s, éthanol 75% 10 s une deuxième fois et rincé trois fois dans de l'eau distillée stérilisée pour éliminer les micro-organismes épiphytes (Bezerra et al., 2012 ; Fisher et al., 1993).

II.2. Mise en culture

Après la désinfection superficielle de l'échantillon de bois, les couches externes de la tige ont été retirées stérilement sous une hotte à flux laminaire (Captair chem by erlabo, France) et les parties internes de chaque échantillon ont été placées stérilement au centre du milieu PDA additionnée avec 250 $\mu g.mL^{-1}$ de chloramphénicol, pour prévenir la prolifération bactérienne. Les feuilles désinfectées ont été coupées en deux fragments avant d'être déposées sur la gélose.

Chaque boîte de gélose a été scellée avec du para-film et incubée à 28 °C ± 2 °C pendant 5 à 10 jours (ou plus selon le cas). La croissance est surveillée quotidiennement (Figure 10).

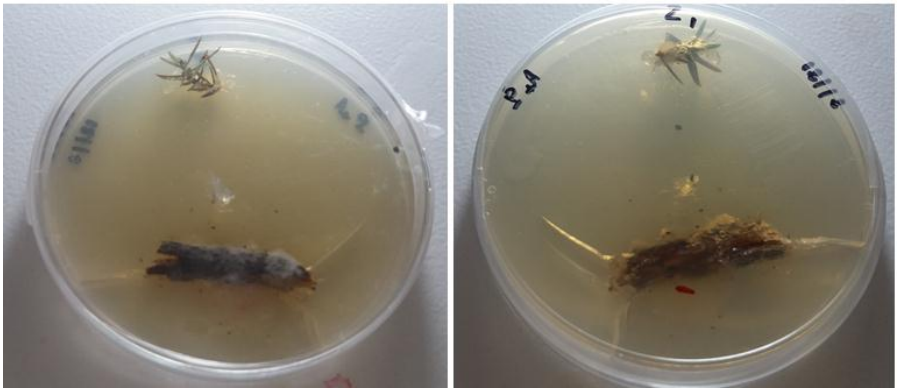


Figure 10: Boites de PDA inoculées stérilement avec des fragments de tige et de feuille

III. Purification des endophytes fongiques isolées

Durant la croissance des endophytes, les premiers tissus internes des endophytes fongiques détectés ont été marqués et isolés. Chaque structure fongique évidente a été soigneusement enlevée à l'aide d'une aiguille stérilisée. La partie inférieure du tapis mycélien est ensuite transférée sur des plaques PDA fraîches. Des isolats fongiques purs ont été obtenus par un repiquage répété de deux à trois fois dans des milieux gélosés, jusqu'à la purification des souches. 101 isolats endophytes fongiques ont été purifiés d'après les tissus internes frais de cinq plantes (Tableau 5).

Tableau 5: Listes d'endophytes fongiques isolés de différentes plantes

	Niches végétales	**Nombre d'isolats**	**Noms des endophytes fongiques isolés**
Echantillonnage 1 : novembre 2017	Tiges de *Juniperus oxycedrus*	11	JO-A – JO-A_0 – JO-A_1 –JO-A_3 – JO-A_4 – JO-A_5 – JO-A_6 – JO-A_7 – JO-A_{13} – JO-A_{14} – JO-A_{15}
	Tiges de *Juniperus thurifera*	10	JT-B – JT-B_0 – JT-B_1 – JT-B_2 – JT-B_3 – JT-B_4 – JT-B_5 – JT-C – JT-C_1 – JT-C_2
	Tiges de *Cedrus atlantica*	8	CA-D_1 – CA-D_2 – CA-D_3 – CA-D_4 – CA-D_5 – CA-D_6 – CA-D_7 – CA-D_8
	Tiges de *Chêne Vert* :	7	CV-E_1 – CV-E_2 – CV-E_3 – CV-E_4 – CV-E_5 – CV-E_6 – CV-E_7
	Tiges de *Pin maritime*	6	PM-F_1 – PM-F_2 – PM-F_3 – PM-F_4 – PM-F_5 – PM-F_6

Echantillonnage 2 : décembre 2019	Feuilles de *Juniperus oxycedrus*	30	JO-G_1 – JO-G_2 – JO-G_3 – JO-H_1 – JO-H_2 – JO-J_1 – JO-J_2 – JO-K_1 – JO-K_2 – JO-L_1 – JO-L_2 – JO-M – JO-O_1 – JO-O_2 – JO-P_1 – JO-P_2 – JO-P_3 – JO-Q_4 –JO-Q_5 – JO-Q_6 – JO-S_1 – JO-T – JO-U_1 – JO-U_2 – JO-V_2 – JO-V_3 – JO-X_6 – JO-X_7 – JO-Y_1 – JO-Z_1
	Tiges de *Juniperus oxycedrus*	29	JO-I – JO-N_1 – JO-N_2 – JO-O_3 – JO-O_4 – JO-P_4 – JO-P_5 – JO-Q_1 – JO-Q_2 – JO-Q_3 – JO-R_1 – JO-R_2 – JO-S_2 – JO-S_3 – JO-U_3 – JO-U_4 – JO-V_1 – JO-V_4 – JO-V_5 – JO-W_1 – JO-W_2 – JO-X_1 – JO-X_2 – JO-X_3 – JO-X_4 – JO-X_5 – JO-Y_2 – JO-Z_2 – JO-Z_3

IV. Conservation des endophytes fongiques isolées

Deux méthodes ont permis de préserver des isolats fongiques. Selon la méthode décrite par Fouda et al., (2015), chaque extrémité hyphal était conservée dans un tube contenant la gélose PDA inclinée à 4 °C. La cryoconservation est la deuxième méthode de conservation des endophytes fongiques purifiés. Les fragments de mycélium de chaque souche ont été enlevés stérilement et placés dans des cryotubes stériles, puis ajoutés de l'eau distillée stérile et stockés à 4 °C, selon la méthode de Castellani (1967).

V. Identification classique des endophytes fongiques

L'identification des endophytes sélectionnés est basée sur des caractères macroscopiques, microscopiques et culturels sur le milieu PDA pendant quatre semaines.

Les clés taxonomiques décrites par Arnold et al., (2007) ; Barnett et Hunter, (1999) ; Barnett et Hunter, (1972) ; Barnett et Hunter, (1998) ; Barnett, (1960) ; Domsch, (1980) ; Hanlin, (1998) ; Pitt et Hocking, (2009) ont été utilisées pour identifier les isolats fongiques.

VI. Identification moléculaire de la souche d'intérêt JO-A

VI.1. Extraction de l'ADN fongique

Avant l'extraction d'ADN génomique, le mycélium fongique a été cultivé dans le milieu PDA liquide pendant 7 jours à 28 °C sans agitation, pour avoir la pré-culture de l'endophyte JO-A. L'extraction de l'ADN a été effectuée selon le protocole décrit par Robl et al., (2013).

Une partie du mycélium a été transférée dans un tube stérile contenant 300 µL de tampon CTAB et 80 mg d'un mélange 2 : 1 (w/w) de gel de silice H (Merck) et de Celite™ 545. Après avoir ajouté 200 µL de tampon CTAB, le mycélium fongique a été broyé manuellement pendant 5 min à l'aide d'un broyeur stérile, puis vortéxé pendant quelques minutes et incubé à 65 °C pendant 10 min. Par la suite, 500 µL de chloroforme ont été ajoutés, suivis d'un mélange de 5 min par vortex et d'une centrifugation à 12000 rpm pendant 15 min. Le surnageant a été

transféré dans un nouveau tube et ajouté un double volume d'éthanol absolu froid. Après avoir incubé à -20 °C pendant 30 min pour précipiter d'ADN, le culot d'ADN a été récupéré par centrifugation à 12000 rpm pendant 15 min et lavé avec l'éthanol froid 70% (v/v). Le culot est finalement séché à température ambiante, suspendu dans le tampon TE et stocké à -20 °C.

VI.2. PCR, séquençage et analyse phylogénétique

L'amplification de l'ADNr 5.8S-ITS à partir de l'ADN génomique extrait a été faite à l'aide des amorces ITS1 et ITS4, selon la méthode de White et al., (1990). Le mélange de la réaction de PCR est celui établi par Cabezas et al., (2012) selon le programme d'amplification mentionné dans le tableau 6.

Les amplicons d'ADN ribosomal 5.8S-ITS ont été séquencés sur un analyseur génétique ABI PRISM® 310 (Applied Biosystems), avec BigDye™ Terminator v1.1. Le séquençage a été réalisé avec les mêmes amorces que pour la PCR, selon le protocole standard de l'analyseur 310 qui nécessite l'utilisation d'un réactif de suppression du Formamide Hi-Di™ (P/N4311320) ou du TSR (P/N 402844). La création de la matrice avec POP-4™ sur l'analyseur 310 exige l'utilisation les normes matricielles BigDye® Terminator v1.1 (P/N 4336805).

Tableau 6: Programme de la réaction de PCR

Cycle	**Temps**	**Température °C**	
Dénaturation initiale	5 minutes	94°C	
Dénaturation	1 minute	94°C	**x 35 cycles**
Hybridation	1 minute	50°C	
Elongation	1 minute	72°C	
Prolongation finale	5 minutes	72°C	

L'affiliation phylogénétique des souches a été déterminée en comparant chaque séquence nucléotidique d'ITS à celles disponibles dans les bases de données en utilisant le programme d'alignement de séquence BLAST (logiciel Blastn) du Centre national d'information biotechnologique (NCBI). Les séquences ont été alignées et l'arbre phylogénétique a été généré à l'aide du programme Phylogeney.fr (Dereeper et al., 2008).

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Identification classique des souches sélectionnées

Ces 101 endophytes fongiques purs présentant des caractéristiques morphologiques différentes ont été répartis comme suit : quarante-deux isolats provenant des tiges de *Juniperus oxycedrus* (11 isolats), *Juniperus thurifera* (10 isolats), *Cedrus atlantica* (8 isolats), *Chêne Vert* (7 isolats), *Pin maritime* (6 isolats) lors de l'échantillonnage 1 (en novembre 2017) et cinquante-neuf isolats fongiques provenant des feuilles et des tiges de *Juniperus oxycedrus* durant l'échantillonnage 2 en décembre 2019 (Figure 11).

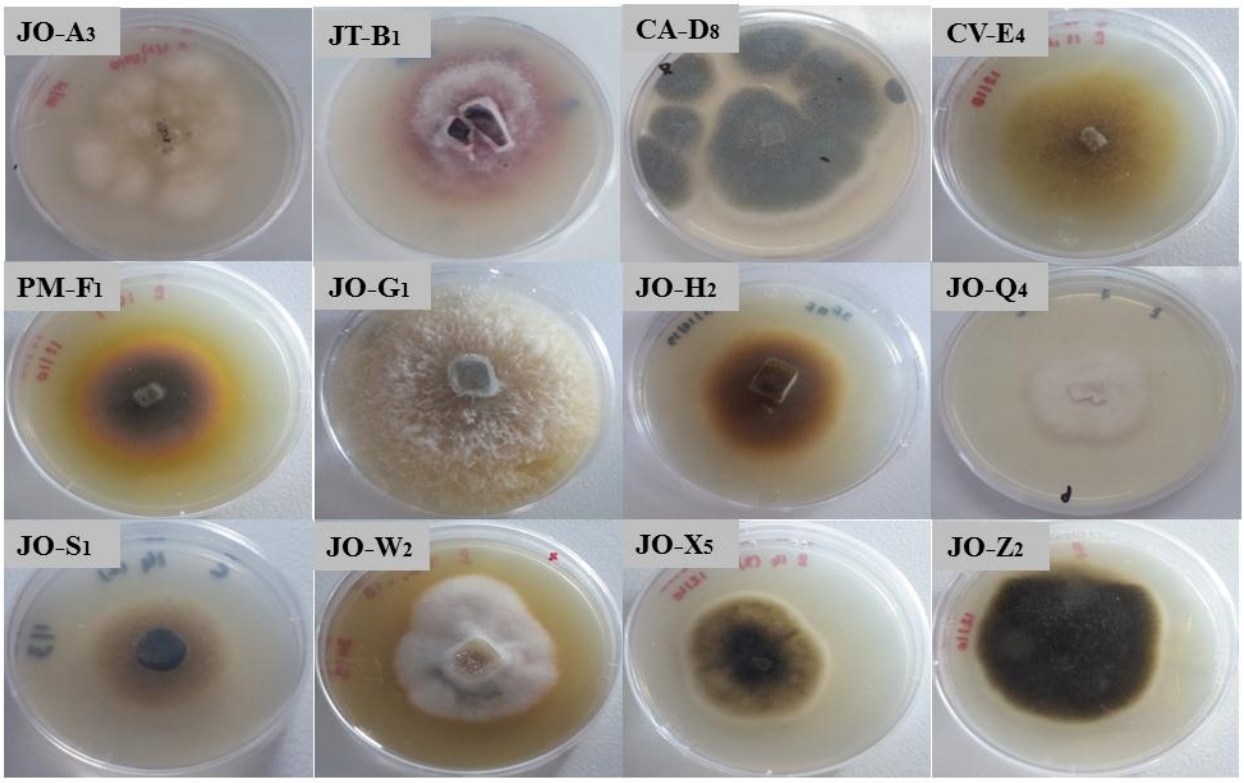


Figure 11: Exemples d'endophytes fongiques purifiés sur le milieu PDA

L'identification concerne uniquement quinze endophytes fongiques sélectionnés sur la base de leurs pouvoirs hydrolytiques élevés.

Les caractéristiques morphologiques telles que : sporulation, aspect et coloration mycélienne, pigmentation du milieu de culture, diamètre et taux de croissance des colonies et leur morphologie et leur texture de surface, couleur du verso des colonies et l'observation microscopique de la forme des hyphes, des conidies, des conidiophores et des corps fruitiers ont montré que ces isolats ont des caractéristiques différentes selon l'origine et l'espèce.

La clé d'identification a permis de classer les isolats en douze genres principaux (Figure 12).

La classification des isolats identifiés est la suivante :

1) Les isolats JO-A et JO-M :

Embranchement : Ascomycota
Classe : Dothideomycetes
Ordre : Pléosporales
Famille : Sporormiaceae
Genre : *Preussia*

2) L'isolat JO-I :

Embranchement : Ascomycota
Classe : Euascomycetes
Ordre : Hypocréales
Famille : Hypocreaceae
Genre : *Acremonium*

3) L'isolat JT-B :

Embranchement : Ascomycota
Classe : Euascomycètes
Ordre : Hypocréales
Famille : Hypocreaceae
Genre : *Fusarium*

4) Les isolats JT-C et JO-X_3 :

Embranchement : Ascomycota
Classe : Sordariomycetes
Ordre : Hypocreales
Famille : Hypocreaceae
Genre : *Trichoderma*

5) L'isolat JO-O_1 :

Embranchement : Ascomycota
Classe : Xenospadicoidales
Ordre : Xylariales
Famille : Xylariaceae
Genre : *Xylaria*

6) Les isolats JO-R_1, JO-V_4 :

Embranchement : Ascomycota
Classe : Euascomycetes
Ordre : Eurotiales
Famille : Trichomaceae
Genre : *Penicillium*

7) L'isolat JO-Y_1 :

Embranchement : Ascomycota
Classe : Dothideomycetes
Ordre : Pleosporales
Famille : Pleosporaceae
Genre : *Curvularia*

8) L'isolat JO-L_1 :

Embranchement : Ascomycota
Classe : Euascomycetes (ou Dothideomycetes)
Ordre : Pleosporales
Famille : Pleosporaceae
Genre : *Alternaria*

9) L'isolat JO-N_1 :

Embranchement : Zygomycota (Mucoromycota)
Classe : Mucoromycetes (ou Zygomycètes)
Ordre : Mucorales
Famille : Mucoraceae (ou Rhizopodaceae)
Genre : *Rhizopus*

10) L'isolat JO-U_3 :

Embranchement : Ascomycota
Classe : Sordariomycetes
Ordre : Sordariales
Famille : Podosporaceae
Genre : *Podospora*

11) L'isolat JO-G_2 :

Embranchement : Basidiomycota
Classe : Agaricomycetes
Ordre : Agaricales
Famille : Marasmiaceae
Genre : *Marasmiaceae*

12) L'isolat JO-V_2 :

Embranchement : Ascomycota
Classe : Sordariomycetes
Ordre : Sordariales
Famille : Lasiosphaeriaceae
Genre : *Melanocarpus*

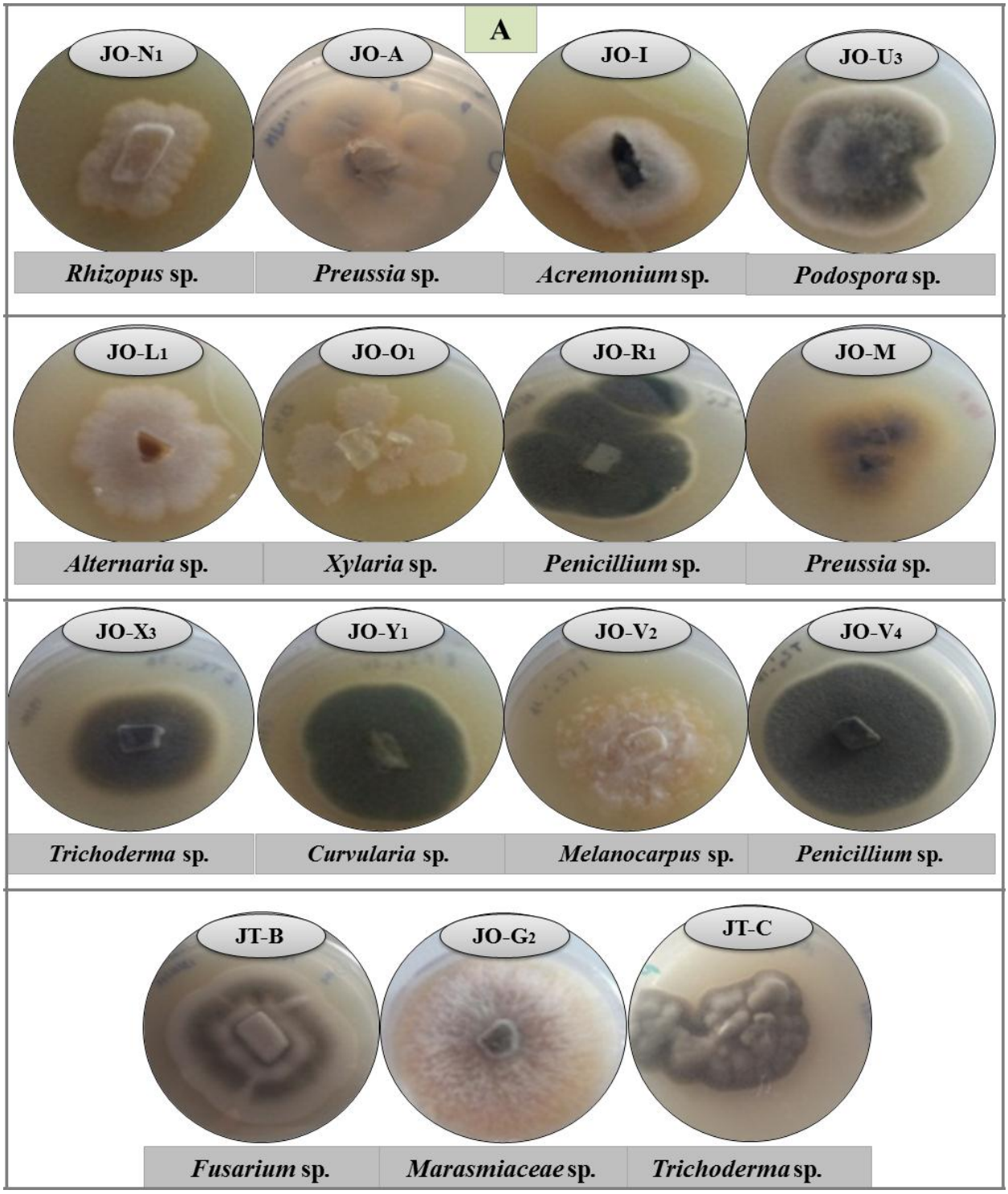
Au niveau des échantillons analysés, cette étude a révélé une diversité d'endophytes fongiques isolés ayant un taux de colonisation différent sur les plantes examinées. Nos résultats concordent avec ceux de M'barek et al., (2019) qui ont montré une très grande diversité d'endophytes fongiques lignocellulosiques (isolés à partir de bois frais) dans la région de Meknès.

Cependant, aucune spécificité n'a été observée en ce qui concerne la fréquence des endophytes dans les tissus des tiges et des feuilles testées (30 isolats dans les feuilles et 29 isolats dans les tiges). Pourtant, des études menées par Uzma et al., (2016) ont révélé des différences dans la fréquence des endophytes fongiques entre les tissus des tiges et des feuilles. Par ailleurs, Siqueira et al., (2011) ont trouvé que la colonisation des feuilles (50,41%) est supérieure à celle des tiges (35,40%) de *Lippia sidoides*. En revanche, Bezerra et al., (2012) qui ont constaté que pour *Bauhinia forficata,* la fréquence la plus élevée de colonisation se trouve dans les tiges.

Cependant, très peu d'études ont été réalisées sur l'isolement des microorganismes des plantes appartenant à *Juniperus thurifera, Cedrus atlantica, Chêne Vert et Pin maritime.* En outre, aucun rapport n'a été établi sur l'isolement des endophytes fongiques ayant des activités enzymatiques à partir de la plante endémique *Juniperus oxycedrus*.

Des études précédentes ont signalé une grande variété d'endophytes tels que : des bactéries et des moisissures, associés aux plantes ligneuses (Ameen et al., 2021 ; Jia et al., 2016). Cela concorde avec les études de Pandey et al., (2016) et Sideney Becker, (2013) qui ont signalé que les endophytes fongiques constituent une ressource potentielle d'enzymes hydrolytiques. Les endophytes fongiques *Penicillium, Rhizopus, Curvularia, Xylaria, Fusarium, Preussia, Alternaria* ont été isolés à partir de diverses plantes ligneuses et herbacées (*Piper longum* L.,

Zingiber officinale, Opuntia ficus – indica…) et dotés d'un potentiel hydrolytique d'activités diversifiés cellulases, lipases, xylanases, protéases, amylases et laccases (Amirita et al., 2012 ; Bezerra et al., 2012 ; Bhagobaty et Joshi, 2012 ; Devi et al., 2012 ; Uzma et al., 2016 ; Zhang et al., 2010). De même, les plantes médicinales ont également été étudiées en raison de la diversité des champignons qu'elles contiennent (comme : *Alternaria* sp., *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp…) et dont l'activité hydrolytique extracellulaire est très élevée (Deswal et al., 2011 ; Devi et al., 2012 ; Dey et al., 2011 ; Goldbeck et al., 2013 ; Smitha et al., 2014).



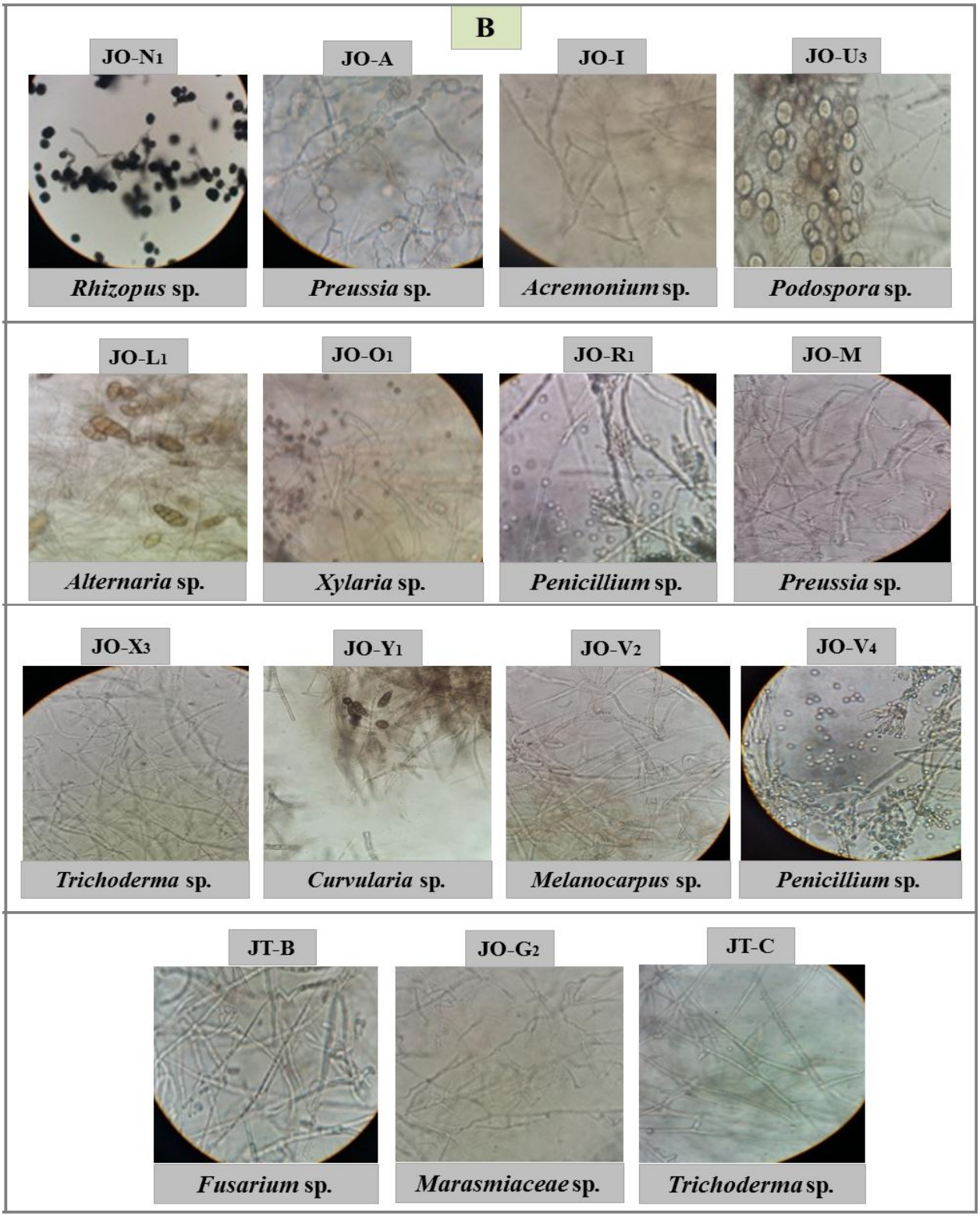


Figure 12: Aspect de colonies fongiques sur le milieu solide PDA (A) et aspect microscopique (G×40) d'endophytes lignocellulosiques sélectionnés (B)

II. Identification moléculaire de la souche JO-A

Seul l'endophyte fongique JO-A a fait l'objet d'une identification moléculaire.

Les amorces ITS1 et ITS4 sont utilisées pour l'amplification par PCR des régions transcrites internes (ITS1 et ITS2).

L'amplification de l'ADNr 5,8S-ITS à partir de l'ADN génomique de trois exemplaires de l'endophyte fongique JO-A a générée trois bandes d'empreintes génomiques qui sont similaires avec les mêmes intensités. Une bande située à un poids moléculaire de 8000 pb qui correspond à la souche JO-A (Figure 13).

La combinaison de l'analyse numérique du poids moléculaire des séquences des trois échantillons testés avec une comparaison visuelle des différentes bandes a permis de dégager un seul groupe. Ce groupe est formé d'un seul isolat J-OA provenant de la région d'Ifrane isolé à partir de la plante *Juniperus oxycedrus*.

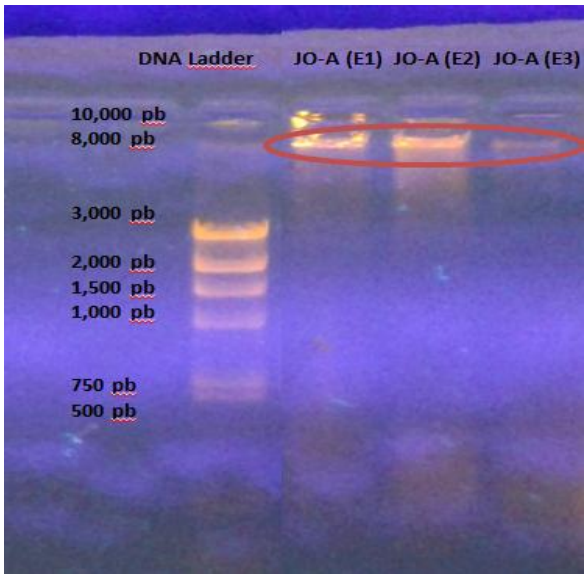


Figure 13: Profil de séparation électrophorèse des fragments amplifiés par PCR de l'isolat endophyte fongiques JO-A sur gel d'agarose à 2%

- **Séquence ITS de *Preussia africana* JO-A**

GGTTTCCGTAGNGANCCTGCGGNNGNNNTNATCGTAGGGCTTCGGCCCTGTCGAGANAGAACCCTTGCCTT
TTTGANTACCTTTCGTTTCCTCGGCAGGCTCGCCTGCCAATGGGGACCCCAAAAAACACTTTGCAGTACCTGTA
ATAGTCTGAACAAACAAACAAAAATTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC
AGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTT
TGGTATTCCTTAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTAAACCTTCAAGCTCAGCTTGGTGTTGGGTGACTGTCC
GCTTCACCGCGGACTCGCCTCAAAATTATTGGCGGCCGGTACATTGGCTTCGAGCGCAGCAGAAACGCGAACTC
GGGCCCGTCGTATTGGCTCCCAGAAGCTATCTTCACAATTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAAC
TTAAGCATATCAATANNGNNNANGGAA

En se basant sur l'analyse moléculaire, l'endophyte fongique JO-A a été identifié comme étant *Preussia africana* avec 97% d'homologie avec des endophytes fongiques apparentés (séquence ITS de *P. africana* JO-A). L'arbre phylogénétique indique que la souche *Preussia africana* JO-A présente la plus grande similarité avec la souche *Preussia africana* AS03 (MG583753.1), l'isolat

Preussia africana AS03 (MH250006.1) et l'isolat *Preussia africana* A54 (KX611037.1), respectivement. Le pourcentage d'identité varie entre 92 et 97% (Figure 14).

Selon les résultats de l'analyse phylogénétique, l'endophyte fongique *Preussia africana* JO-A représente la première étude détaillée en tant qu'endophyte fongique cellulase positif associé à la plante *Juniperus oxycedrus*.

Le genre *Preussia* comprenait plusieurs espèces (*Preussia sp.* et *Preussia mediterranea*), appartenant à la famille des Sporormiaceae, généralement isolées des débris de bois, du sol et des plantes lignocellulosiques à divers endroits géographiques (Al-Hosni et al., 2018 ; Andreea Cosoveanu et al., 2018 ; Mapperson et al., 2014). *Preussia africana* a été décrit précédemment comme un endophyte fongique isolé de morceaux de bois de plante tropicale *Aquilaria malaccensis* et les feuilles de vigne *Vitis labrusca* (Brum et al., 2012 ; Premalatha et Kalra, 2013).

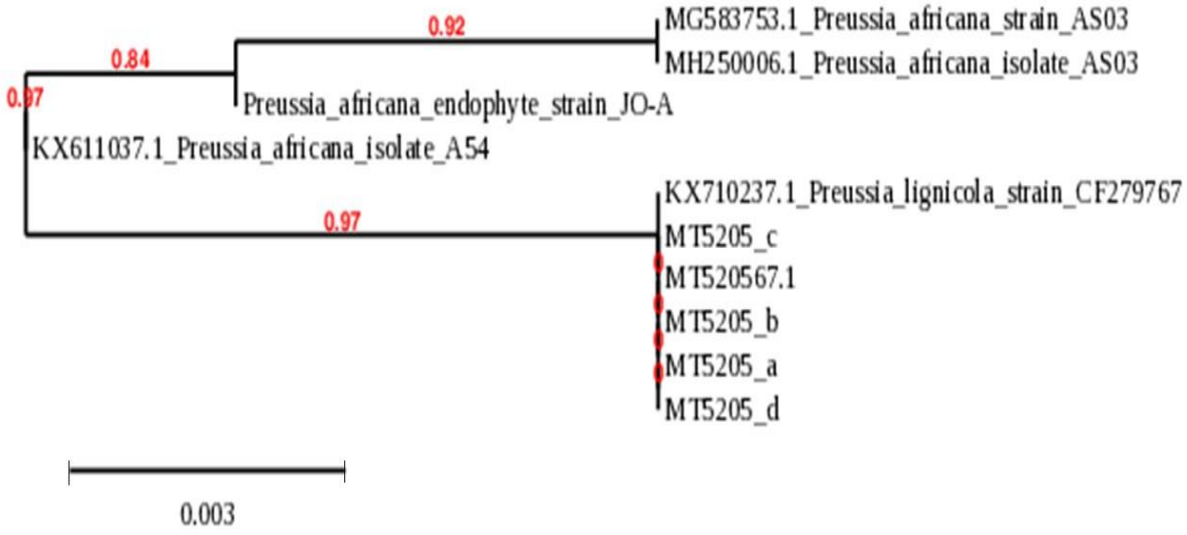


Figure 14: Arbre phylogénétique indique les faisceaux d'endophyte fongique *P. africana* JO-A

CONCLUSION

L'exploitation de la diversité fongique inexplorée qui colonise les plantes dans divers niches et écosystèmes est une étape clé des recherches récentes. Cent-un endophytes fongiques purs sont obtenus à partir d'échantillons frais de plantes avec des caractères morphologiques différents. Quinze endophytes fongiques sélectionnés produisent des enzymes extracellulaires d'intérêt industriel et ils sont répartis dans douze principaux genres.

Ces échantillons de bois frais ont fait apparaitre une grande diversité d'endophytes fongiques lignocellulosiques dans la région d'Ifrane, surtout des endophyte *P. africana* JO-A et *Melanocarpus* sp. JO-V_2 isolés de *Juniperus oxycedrus*.

Partie 2 : Criblage d'activités hydrolytiques de la biomasse lignocellulosique chez les endophytes fongiques

MATERIELS ET METHODES

I. Criblage des endophytes fongiques producteurs d'enzymes hydrolytiques

I.1. Test d'amylase

Les souches fongiques testées ont été repiquées sur des milieux PDA. L'action d'amylase a été évaluée en cultivant des fragments d'endophytes fongiques sur le milieu gélosé à 0,2% d'amidon soluble (Annexe 1, M1). Pour chaque endophyte fongique testé, un fragment de mycélium de 1 cm de diamètre a été coupé à l'aide de porte de pièces d'après la boite de PDA. Le fragment est ensuite placé au centre de la boite contenant le milieu M1 et incubé à 28 °C ± 2 °C pendant 7 jours.

Après incubation, les boites de la gélose ont été immergées avec la solution d'iode (KII_2) pendant 20 min. Le milieu prend alors une couleur bleu et les boites sont ensuite rincées avec de l'eau distillée. Les endophytes fongiques qui ont une activité amylase positive sont caractérisés par la présence d'un halo jaune, ce qui indique une dégradation de l'amidon (Maria et al., 2005). Cette zone de dégradation autour de la colonie a été mesurée et les résultats sont exprimés par la formule suivante :

$$\text{Halo de dégradation amylase (cm)} = \text{Surface d'hydrolyse} - \text{Diamètre de croisance fongique}$$

Pour chaque souche ce test a été réalisé en triple.

I.2. Test de cellulase

I.2.1. Essai qualitatif

Le titrage des enzymes cellulolytiques a été évalué à l'aide d'un test qualitatif. Les fragments de mycélium testés (de 1cm de diamètre chacun) ont été inoculés dans le milieu basique gélosé (Annexe 1, M2) contenant 0,5% de Carboxy-méthyl cellulose 'CMC' (Zeng et al., 2018).

Après incubation dans l'obscurité pendant 7 jours à 28 °C, les boites ont été inondées avec du rouge du Congo aqueux (1% p/v) pendant 15 min. Ensuite, les mêmes boites ont été lavées et immergées avec du NaCl (1M) pendant 10 min.

La production de cellulase se traduit par la formation d'halos de dégradation jaune opaque autour des colonies. Cette surface d'hydrolyse a été mesurée et calculée selon la formule suivante (Robl et al., 2013) :

$$\text{Halo de dégradation cellulase (cm)} = \frac{\text{Diamètre d'halos d'hydrolyse}}{\text{Diamètre croissance fongique}}$$

L'activité cellulase (ZA) est exprimée par la relation entre le diamètre de la colonie et le diamètre des halos d'hydrolyse et calculée selon la formule suivante :

$$\text{Activité cellulase (ZA)} = \frac{\text{Diamètre de colonie}}{\text{Diamètre de colonie} + \text{Halo de dégradation}}$$

Les résultats de la production de la cellulase sont interprétés selon les critères établis par Bezerra et al., (2012) : ZA entre 0,9 et 1 : très faible ; ZA entre 0,89 et 0,80 : faible ; ZA entre 0,79 et 0,70 : fort et ZA plus petit que 0,69 : très fort (Bezerra et al., 2012).

Des souches ayant une activité cellulase élevée ont été sélectionnées pour une deuxième analyse quantitative.

I.2.2. Analyses quantitatives

I.2.2.1. Production des enzymes cellulolytiques par les endophytes sélectionnés

La culture des endophytes sélectionnés a été effectuée dans le milieu de production de cellulase (Annexe 1, M3), inoculant 100 mL du milieu avec deux fragments de mycélium actif de 1cm de diamètre préalablement développé sur PDA. Le milieu a été incubé dans l'obscurité sans agitation à 28 ± 2 °C pendant 7 jours. Des témoins non inoculé ont été incubés parallèlement. Les expériences ont été réalisées en trois exemplaires.

Après l'incubation, des échantillons ont été prélevés pour chaque endophyte étudié et centrifugés à 12000 rpm à 4 °C pendant 15 min.

Les surnageant ont été récupérés et utilisés comme enzyme brute pour l'analyse enzymatique.

I.2.2.2. Détermination des activités cellulases

L'activité endoglucanase (CMCase) a été mesurée selon la méthode de Ghose, (1987), en utilisant le CMC comme substrat. En revanche, l'activité cellulolytique totale (FPase) a été analysée comme l'ont décrit Mandels et Weber, (1969), selon la méthode de dosage du papier filtre Whatman (FPA). Les deux activités ont été déterminées dans la solution tampon d'acétate de sodium 20 mM, pH 5,0. Les réactions comprenaient 1 mL de CMC à 1% ou 50 mg de bandes de papier Whatman N°1 (1,0×6,0 cm) préparé dans le tampon et 0,5 mL de surnageant d'enzyme brut. Les mélanges réactionnels sont incubés pendant 30 et 60 min pour les activités CMCase et FPase, respectivement, à 50 °C.

Après l'incubation 2,25 mL du réactif DNS ont été ajoutés au mélange réactionnel et les échantillons ont été chauffés à 100 °C pendant 10 min. Un control a été exécuté sans enzyme, remplaçant l'extrait enzymatique par de l'eau distillée. Les tests ont été effectués en trois exemplaires.

La méthode de DNS (Miller, 1959) a été utilisée pour estimer la quantité de sucres réducteurs libérés et calculée à partir de la courbe de 0 à 1 µmole de glucose. La densité optique a été mesurée à une absorbance de 540 nm.

La quantité d'enzyme nécessaire pour libérer une µmol de sucre réducteur par minute par mL a été définie comme une unité internationale d'activité cellulase (IU). L'activité cellulase a été calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Activité cellulase (IU/mL)} = \frac{\text{[Glucose libéré] µmole}}{\left(\text{0,5 mL d'échantillon} \times \text{Temps d'incubation (min)}\right)}$$

I.2.2.3. Cinétiques de la production d'activité cellulase par les endophytes sélectionnés

Les endophytes fongiques sélectionnés ont été cultivés pour exprimer la présence de cellulases extracellulaires au cours du temps.

Le processus de production de cellulase a été réalisé avec 300 mL du milieu basique contenant 0,5% de CMC et 0,1% de glucose comme source de carbone. Chaque milieu a été inoculé avec six fragments de mycélium de 1 cm et incubé sans agitation à 28 °C pendant 12 jours.

Après l'incubation, des échantillons de culture ont été prélevés à des périodes déterminées. Le surnageant a été séparé du mycélium par une centrifugation à 12000 rpm à 4 °C pendant 15 min et utilisé en tant qu'enzyme extracellulaire.

Les deux activités enzymatiques CMCase et FPase ont été déterminées selon les conditions standards décrites dans le paragraphe Détermination des activités cellulases. Chaque expérience a été réalisée en triple.

I.3. Test de laccase

L'activité laccase a été réalisée selon deux méthodes : Test qualitatif préliminaire et test quantitatif de confirmation.

I.3.1. Essai qualitatif

L'activité laccase a été examinée pour 70 isolats d'endophytes fongiques utilisés. Pour chaque souche testée, un fragment du mycélium actif de 1cm de diamètre a été placé au centre du milieu PDA avec du guaïacol 0,01% w/v (comme substrat de laccase). Les boites ont été scellées avec du para-film et incubées à 28 °C ± 2 °C pendant 7 jours (ou plus selon le cas).

Après incubation, la production de laccase a été observée par la formation d'halos brun-rougeâtre dans le milieu de culture, qui se forment lorsque l'enzyme laccase a été produite. Un témoin non inoculé a été réalisé et incubé aux mêmes conditions. La zone d'oxydation brune entourant la colonie fongique a été mesurée. Trois boites pour chaque isolat ont été faites.

Les endophytes fongiques présentant les plus grands halos brun-rougeâtre ont été sélectionnés pour une étude plus approfondie.

I.3.2. Production de laccases par les endophytes sélectionnés

Les meilleures souches laccases positives (JO-L_1, JO-N_1, JO-T, JO-U_3, JO-V_2, JO-V_4 et JO-X_3) basées sur le test qualitatif ont été sélectionnées pour un second essai de confirmation. Afin d'enregistrer le temps de production maximum des enzymes laccase pour chaque souche.

Six fragments du mycélium actif (diamètre de 1 cm) de chaque endophyte fongique testé pris de la périphérie précédemment développé sur des boites PDA ont été inoculés sur 300 mL du

milieu minimal MM (Annexe 1). Les flacons ont été incubés à l'obscurité sans agitation à 28 ± 2 °C et suivis pendant 15 jours.

Un milieu basique non inoculé a été utilisé comme témoin. Toutes les 24 heures, 10 mL de chaque culture ont été prélevés afin d'évaluer l'activité laccase et la biomasse fongique. Ces échantillons ont été centrifugés à 5000 rpm pendant 20 minutes à 4°C et le surnageant a été utilisé comme enzyme extracellulaire. Toutes les expériences ont été déterminées en triples exemplaires.

L'endophyte fongique montrant une activité laccase extracellulaire maximale a été choisie.

I.3.2.1. Dosage de l'activité laccase

L'activité de laccase a été déterminée par spectrophotométrie, en employant le guaïacol (2 mM) comme substrat (Sheikhi et al., 2012).

L'oxydation du guaïacol par la laccase a été rapportée par le développement de la couleur brune rougeâtre. Le mélange réactionnel a été effectué, selon Arora et Sandhu, (1985) avec 1 mL de guaïacol (2 mM), 3,8 mL de la solution tampon d'acétate de sodium (20 mM, pH 5,0) et 0,2 mL d'échantillon d'enzyme dilué. La réaction a été incubée à 30 °C pendant 2 heures et le titrage du produit formé a été mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre (UV-2005, JP Selecta, Barcelona, Spain) à 450 nm. Le blanc a été préparé avec l'eau distillée au lieu de l'enzyme diluée.

Les activités enzymatiques ont été exprimées en tant qu'unités internationales ($IU.mL^{-1}$). L'IU est la quantité d'enzyme capable d'oxydé 1µmol de guaïacol par minute dans les conditions standard du protocole. Tous les échantillons ont été analysés en triple contre du blanc. Les données sont présentées en tant qu'écart type de la moyenne. L'activité laccase a été calculée selon la formule suivante (Abd El Monssef et al., 2016) :

$$E.A = \frac{A \times V}{t \times e \times v}$$

Où : E.A : activité enzymatique ; A : Absorbance ; V : volume total de mélange (mL) ; v : volume d'enzymes (mL) ; t : temps d'incubation et e : coefficient d'extinction pour le guaïacol (0.6740 µM/cm).

I.3.2.2. Mesure de la matière sèche fongique

La biomasse restante après la centrifugation (5000 rpm/20 min, 4 °C) dans des flacons pré-pesés contenant le tapis mycélien a été lavée deux fois avec de l'eau distillée. Le tapis mycélien a été séché à 80 °C dans un four jusqu'à ce qu'il atteigne un poids constant, puis le poids a été enregistré. La perte de poids a été déterminée comme une différence entre le poids initial et final des flacons et exprimée en poids sec ($g.L^{-1}$), selon l'équation suivante :

$$Bs = \frac{P2 - P1}{T2 - T1}$$

Où B_S est la biomasse sèche, P_1 et P_2 sont le poids sec par $g.L^{-1}$ au temps T_1 et T_2, respectivement.

II. Influence des différents facteurs sur la production de l'activité laccase par l'endophyte JO-V_2

II.1. Effet du diamètre du mycélium

Les fragments de mycélium de différentes tailles ont été inoculés sur 50 mL de milieu minimal MM et incubés sans agitation dans l'obscurité à 28 °C pendant 13 jours. Les diamètres choisis du mycélium actif sont 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 10 cm.

II.2. Effet de la température

Huit températures (25, 28, 32, 35, 37, 41, 45 et 50 °C) ont été testées pour étudier l'influence de la variation de la température d'incubation sur la production d'enzyme. Les milieux MM (50 mL chacun) inoculés avec des fragments ayant un diamètre de 2 cm sont incubés séparément sans agitation pendant 13 jours. La concentration d'inoculum et la température optimale trouvées ont été fixées pour les tests suivants.

II.3. Effet des éléments nutritifs

Ces essais ont été réalisés sur des échantillons qui ont présenté un optimum pour les facteurs : le diamètre du mycélium et la température d'incubation. Différentes sources de carbone (glucose, lactose, saccharose, fructose, maltose, galactose et l'amidon) et d'azote (l'extrait de levure, peptone, tryptone, sulfate d'ammonium, nitrate de sodium, nitrate de potassium et nitrate d'ammonium) ont été utilisées pour ce test. Ces éléments nutritifs ont été employés à des concentrations respectives de 1% (p/v) et de 0,3% (p/v).

II.4. Effet des inducteurs

Le milieu MM a été enrichi séparément avec divers inducteurs, comme : le sulfate de cuivre, l'éthanol, catéchol, pyrogallol, l'acide vanillique, l'acide gallique, l'acide férulique et la 2,5-xylidine à 0,02% (p/v), avec 1% de glucose et 0,3% de nitrate de sodium. Chaque milieu MM (50 mL chacun) a été inoculé avec des fragments de mycélium de 2 cm de diamètre et incubé à 37 °C sans agitation pendant 13 jours.

Les concentrations optimales des sources de carbone, d'azote et d'inducteurs obtenues par ces étapes ont été fixées pour les expériences suivantes.

II.5. Effet des concentrations de glucose, de nitrate de sodium et de sulfate de cuivre

En outre, d'autres tests ont été réalisés avec les paramètres qui ont donné la meilleure production de laccase, à savoir le glucose, le nitrate de sodium et le sulfate de cuivre.

A cet effet, des milieux MM (50 mL chacun) contenant différentes concentrations de glucose (0,1, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3 et 4% (p/v)), de nitrate de sodium (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,7 et 1% (p/v)) et de sulfate de cuivre (0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06 et 0,1% (p/v)) ont été inoculés séparément avec des fragments de mycélium de 2 cm de diamètre. Les autres composants ont été employés à des concentrations fixes de 0,3% de $NaNO_3$ + 0,02% de $CuSO_4$, 1,5% de glucose + 0,02% de $CuSO_4$ et 1,5% de glucose et 0,5% de $NaNO_3$, respectivement. Les milieux MM

ensemencés ont été incubés à 37 °C sans agitation pendant 13 jours. Les milieux témoins ont été réalisés en parallèles.

A noter que les aliquotes des cultures testées ont été centrifugées à 13 000 rpm pendant 10 minutes à 4 °C.

Le surnageant a été utilisé comme enzyme brut. Toutes les expériences précédentes ont été effectuées en triple exemplaire pour présenter les valeurs moyennes avec l'écart-type.

III. Propriétés physico-chimique de l'extrait laccase de la souche JO-V_2

III.1. Purification de l'extrait d'enzyme

Basé sur les résultats de l'essai quantitatif (cinétique des endophytes), la souche JO-V_2 a été sélectionnée pour la sécrétion d'un niveau significatif de laccase.

Après 13 jours d'incubation, le milieu MM ensemencé par la souche JO-V_2 a été centrifugé à 5000 rpm pendant 20 min à 4 °C. Le surnageant est ensuite congelé à -20 °C. Après la congélation, le surnageant est décongelé et filtré afin d'éliminer les mycéliums et les polysaccharides précipités. Cette étape constitue une pré-purification. La purification est obtenue par une deuxième filtration (concentration du filtrat) à l'aide d'un tube flacon à membrane (flacon Macrosep ® Advance avec une membrane Omega à polyéthersulfone) de 10 KDa MWCO (bleu 100/pqt), pour éliminer les sels et les sucres résiduels de faible poids moléculaire. Le filtrat a été centrifugé 10 fois à 5000 rpm pendant 30 min. Cette méthode a été confirmée par Sharma et al., (2014).

Le filtrat concentré a été employé en tant qu'enzyme brute pour évaluer la caractérisation enzymatique.

III.2. Température optimale

L'effet de la température sur l'activité laccase a été évalué en incubant le mélange réactionnel contenant l'enzyme, le tampon acétate de sodium (20 mM, pH 5,0) et le guaïacol (2 mM) à différentes températures allant de 20 à 80 °C.

III.3. pH optimal

L'effet du pH a été analysé durant l'oxydation du guaïacol dans le mélange réactionnel. Le pH optimal a été déterminé en incubant l'enzyme laccase à un pH variant de 2,0 à 8,0, en utilisant la solution guaïacol (2mM) comme substrat. Les solutions tampons employées (20mM) sont l'acétate de sodium à pH 2,0 à 6,0, le phosphate de sodium à pH 6,0 à 7,0 et le Tris-HCl à pH 8,0.

III.4. Stabilité de l'activité laccase

La stabilité de laccase a été déterminée par la pré-incubation de l'enzyme pendant 24 heures dans différents pH allant de pH 3,0 à 7,0. Les systèmes tampons utilisés sont décrits dans le paragraphe du pH optimal. Le mélange réactionnel a été incubé à 30°C. Les résultats ont été lus à différents temps 15, 30, 60, 90, 120, 240, 360, 480 et 1440 min.

De même la thermo-stabilité de l'enzyme a été étudiée pendant 24 heures, en incubant l'extrait de laccase à différentes températures de 30 à 70 °C en utilisant l'acétate de sodium (pH 5,0). Noter que ce test a été réalisé en absence du substrat guaïacol.

Afin d'arrêter l'activité de l'enzyme, les aliquotes ont été refroidies en les plaçant dans la glace. Les activités enzymatiques laccase ont été déterminées selon les conditions standards décrites le paragraphe Dosage de l'activité laccase.

III.5. Activité laccase à différentes concentrations de substrat

L'activité laccase a été également étudiée à différentes concentrations de guaïacol allant de 2 à 100 mM. L'enzyme concentrée a été incubée dans la solution contenant le tampon acétate de sodium (20 mM, pH 5,0) et le substrat à 30 °C pendant 2 heures. L'activité résiduelle de l'enzyme laccase a été mesurée et les essais ont été effectués en triples.

Les valeurs des constantes de Michaelis-Menten K_m et V_{max} ont été calculées à partir du graphique de Lineweaver et Burk (1934).

IV. Analyse statistique

Les expériences ont été réalisées en trois exemplaires. Le programme MS-Excel a été utilisé pour calculer les moyennes, les écarts-types et tracer les courbes d'étalonnages.

Le logiciel GraphPad Prism version 5.01 a été employé pour tracé, présenté les données sous forme de figures et les constantes de Michaelis-Menten (K_m et V_{max}).

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Endophytes fongiques amylolytiques

Les endophytes fongiques amylolytiques positifs sont sélectionnés après la formation de zones de dégradation de l'amidon jaune autour des colonies fongiques avec la sécrétion d'enzymes amylases extracellulaires. Les résultats sont représentés dans le tableau 7.

Quarante-deux isolats d'endophytes fongiques isolées pendant l'échantillonnage 1 (novembre 2017) sont testés sur le milieu d'amidon gélosé. Huit isolats ont présenté une activité amylase extracellulaire après la révélation par KII_2, par la formation de plaques bleu foncé avec des zones non colorées indiquant que l'amidon est dégradé. Quatre endophytes isolés de *Juniperus oxycedrus* JO-A_3, JO-A_{13}, JO-A_{14} et JO-A_{15} ont donné une hydrolyse maximale avec des emplacements jaunes de 3,20 ± 0,01, 4,55 ± 0,02, 2,45 ± 0,04 et 2,85 ± 0,15 cm de diamètre, respectivement. Dans le cas des endophytes isolés de *Juniperus thurifera,* seuls deux isolats ont montré une activité amylase positive JT-B_0 et JT-C avec des zones de dégradation de 1,8 ± 0,03 et 2,5 ± 0,13 cm, respectivement (Tableau 7, Figure 15).

Après le second échantillonnage en décembre 2019, cinquante-neuf endophytes sont isolés de *Juniperus oxycedrus* et testés sur un milieu amidon gélosé.

Parmi les vingt-cinq endophytes qui ont une activité amylase positive, douze isolats sont sélectionnés pour leurs emplacements jaune clair et bien visible, JO-G_1, JO-G_2, JO-G_3, JO-J_1,

JO-P_4, JO-P_5, JO-Q_5, JO-R_1, JO-X_1, JO-X_4, JO-X_6 et JO-X_7 avec des zones de dégradation de diamètre de 3,40 ± 0,11, 4,83 ± 0,20, 3,83 ± 0,16, 4,30 ± 0,15, 3,1 ± 0,2, 3,65 ± 0,15, 2,6 ± 0,1, 2,00 ± 0,06, 2,50 ± 0,17, 2,8 ± 0,1, 3,40 ± 0,11 et 2,65 ± 0,13 cm, respectivement (Tableau 7, Figure 15). En outre, quatre endophytes fongiques JO-I (3,8 ± 0,1 cm), JO-O_1 (2,35 ± 0,13 cm), JO-V_3 (3,1 ± 0,07 cm) et JO-Y_1 (2,8 ± 0,3 cm) ont présenté des auréoles jaunes très claires.

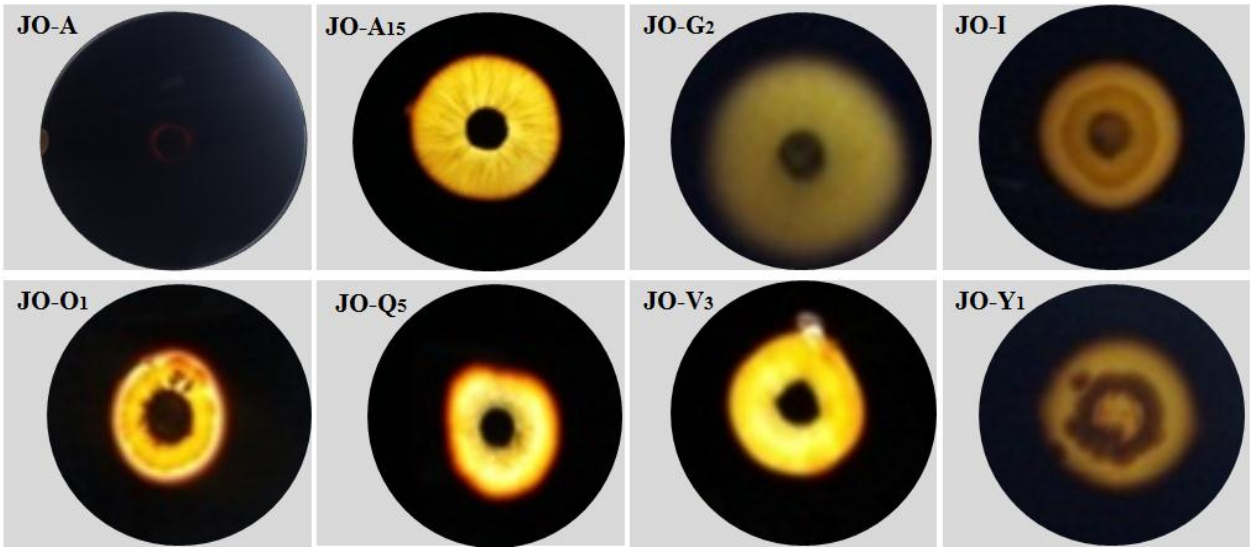


Figure 15: Zones de dégradations d'amidon des endophytes amylolytiques (JO-A_{15}), (JO-G_2), (JO-I), (JO-O_1), (JO-Q_5), (JO-V_3) et (JO-Y_1) avec le contrôle négative d'amylase (JO-A) sur le milieu amidon gélosé

Les enzymes amylolytiques sont les enzymes industrielles les plus utilisées en biotechnologie moderne, en particulier, dans le processus d'hydrolyse de l'amidon, oligo- et polysaccharides apparentés (Wang et al., 2019). Et même dans différentes applications industrielles, y compris les produits pharmaceutiques, l'alimentaires et la fermentation. Ces enzymes amylolytiques sont classifiées comme étant des endoamylase (α-amylase, isoamylase) et des exoamylase (α-glucosidase, glucoamylase et ß-amylase) (Zhang et al., 2017). De nombreux microorganismes produisent des enzymes amylolytiques, telles que : les moisissures et les bactéries. Ces sources microbiennes d'amylases sont très demandées à cause de leur plasticité et de leur grande disponibilité industrielle (Rana et al., 2013).

Cependant, l'amylase fongique a attiré plus d'attention au cours des dernières années, principalement les amylases qui sont capables de tolérer des conditions industrielles difficiles. Sunitha et al., (2012) ont signalé une activité amylolytique élevée avec *Cylindrocephalum* sp. (Ac-7) isolé d'*Alpinia-calcarata*, présentant une zone de dégradation claire maximale de 13,33 mm sur YPG à 0,2% d'amidon. Hegde et al., (2011) ont rapporté que les amylases de *Penicillium* sp. et de *Discosia* sp. isolées de *Calophyllum inophyllum* ont une forte activité amylolytique de 8 et 28 mm de diamètre, respectivement. Cela concorde avec les résultats obtenus avec les isolats amylolytiques, tels que : JO-I, JO-O_1, JO-V_3 et JO-Y_1, qui ont montré des activités enzymatiques entre 2,35 et 3,8 cm de diamètre. Et même, Liang et al., (2015) ont signalé que *Alternaria sp.* et *Preussia sp*. ont montré une activité amylase élevée avec des zones de dégradation maximales. Zaferanloo et al., (2014) et Zhang et al., (2010) ont présenté que *Preussia minima* isolée d'*Eremophilia longifolia* produit une amylase extracellulaire.

Tableau 7: Endophytes amylolytiques isolés des échantillonnages 1 et 2 avec les diamètres de croissances et les halos de dégradation

	Niches végétales	Endophytes fongiques	Croissance (cm)	Halo de dégradation (cm)
Echantillonnage 1 : Novembre 2017	***Juniperus oxycedrus***	**JO-A_3**	4,30 ± 0,10	3,20 ± 0,01
		JO-A_{13}	5,95 ± 0,20	4,55 ± 0,02
		JO-A_{14}	3,60 ± 0,10	2,45 ± 0,04
		JO-A_{15}	3,55 ± 0,25	2,85 ± 0,15
	Juniperus thurifera	**JT-B_0**	2,40 ± 0,20	1,80 ± 0,03
		JT-C	2,10 ± 0,10	2,50 ± 0,13
Echantillonnage 2 : Décembre 2019	***Juniperus oxycedrus***	**JOG_1**	4,83 ± 0,10	3,40 ± 0,11
		JO-G_2	5,80 ± 0,05	4,83 ± 0,20
		JO-G_3	4,83 ± 0,11	3,83 ± 0,16
		JO-I	2,75 ± 0,09	3,80 ± 0,12
		JO-J_1	5,06 ± 0,05	4,30 ± 0,15
		JO-O_1	2,20 ± 0,10	2,35 ± 0,13
		JO-P_4	4,43 ± 0,25	3,10 ± 0,20
		JO-P_5	5,05 ± 0,13	3,65 ± 0,15
		JO-Q_5	2,95 ± 0,19	2,60 ± 0,10
		JO-R_1	2,60 ± 0,05	2,00 ± 0,06
		JO-V_3	2,85 ± 0,11	3,10 ± 0,07
		JO-X_1	3,15 ± 0,01	2,50 ± 0,17
		JO-X_4	2,95 ± 0,14	2,80 ± 0,10
		JO-X_6	5,75 ± 0,02	3,40 ± 0,11
		JO-X_7	2,80 ± 0,01	2,65 ± 0,13
		JO-Y_1	2,45 ± 0,10	2,80 ± 0,30

II. Détermination des souches cellulolytiques

II.1. Essai qualitatif

Les endophytes fongiques cellulolytiques positifs sont sélectionnés par la formation de zones jaunes et claires de dégradation de la cellulose autour des colonies fongiques après la révélation avec le rouge de Congo, qui indique la sécrétion de cellulases extracellulaires.

Parmi les endophytes fongiques isolés à partir d'échantillons de plantes durant l'échantillonnage 1 (novembre 2017), quarante-deux isolats sont testés sur le milieu CMC gélosé. Dix-huit isolats fongiques ont présenté une activité cellulase positive (Tableau 8). Les endophytes isolés de *Juniperus oxycedrus* et *Juniperus thurifera* JO-A, JT-B et JT-C sont détectés pour la production de cellulase, avec des halos d'hydrolyse maximaux de 1,2 ± 0,05, 0,8 ± 0,01 et 0,7 ± 0,01 cm, respectivement.

En revanche, les restes des endophytes cellulases positives ont présenté des halos d'hydrolyse faibles entre 0,2 et 0,5 cm. Par exemple, JO-A_1 et JO-A_{13} isolés de *Juniperus oxycedrus* ont produit un minimum d'halos de 0,5 ± 0,01 et 0,4 ± 0,1 cm de diamètre (Figure 16). Les endophytes JO-A, JT-B et JT-C ont présenté une capacité de dégradation maximale avec des zones d'activité (ZA) très fortes (ZA plus petit que 0,69) de 0,59, 0,69 et 0,65, respectivement. Pourtant, les souches JO-A_1, JO-A_{13}, JT-B_4, JT-B_5, JT-B_0, CA-D_2, CA-D_3, CA-D_6, CA-D_7, CA-D_8, CV-E_5, PM-F_2 et PM-F_6 ont montré une activité cellulase positive, mais avec des zones d'activité (ZA) très faibles entre 0,9 et 1.

Pour le deuxième échantillonnage (décembre 2019), cinquante-neuf souches sont isolées de *Juniperus oxycedrus* et sélectionnées sur le milieu CMC gélosé. Après 7 jours d'incubation, vingt et un sont présentés des activités cellulases positives avec des zones d'hydrolyse jaune (Tableau 8). Les endophytes fongiques avec un emplacement clairement visible et mesurable JO-I, JO-K_2, JO-M, JO-O_1, JO-R_1, JO-V_2, JO-X_4, JO-X_7 et JO-Y_1, sont retenus avec des zones de dégradations de 1,2 ± 0,1, 1,26 ± 0,22, 1,73 ± 0,24, 0,73 ± 0,11, 1,2 ± 0,1, 1,83 ± 0,05, 0,33 ± 0,05, 0,33 ± 0,11 et 1,4 ± 0,7 cm, respectivement (Tableau 8, Figure 16). Cependant, les endophytes cellulolytiques JO-I, JO-K_2, JO-M, JO-R_1, JO-V_2 et JO-Y_1 ont montré un pouvoir maximal de dégradation avec des zones d'activité (ZA) très forte de 0,48, 0,51, 0,34, 0,65, 0,12 et 0,44, respectivement. Pourtant, les zones d'activité faibles (ZA entre 0,89 et 0,8) sont présentées par les endophytes JO-O_1, JO-V_5, JO-X_4 et JO-X_7 avec une capacité de dégradation minimale de 0,81, 0,84, 0,86 et 0,89, respectivement. Et même des endophytes dont les zones d'activité sont très faibles (ZA entre 0,9 et 1) pour le JO-Q_1 (0,93) et le JO-Q_2 (0,92).

Gupta et al., (2016) et Zeng et al., (2018) ont mentionnés que les endophytes fongiques produisent un système varié et complémentaire de cellulases généralement sécrétées dans le milieu extérieur, contrairement à d'autres microorganismes. da Silva Ribeiro et al., (2018) ont été signalé un diamètre d'hydrolyse de 12,89 mm pour *Diaporthe* sp. PL67, similaire aux zones de dégradation des endophytes JO-A, JO-I, JO-K_2 et JO-R_1. Bezerra et al., (2012) ont présenté que *Acremonium terricola*, *Penicillium aurantiogriseum* et *Pestalotiopsis guepinii* montrant de très fortes zones d'activité (ZA) et *Fusarium lateritium* avec une zone d'activité faible. Ces résultats concordent avec ceux obtenus pour les endophytes JO-A, JT-B, JT-C, JO-I, JO-K_2, JO-M, JO-R_1, JO-V_2 et JO-Y_1.

Les souches endophytiques ayant les zones d'activité cellulase les plus élevées sont sélectionnées et vérifiés dans le milieu de production liquide.

Tableau 8: Endophytes cellulolytiques des échantillonnages 1 et 2 avec la croissance mycélium et la production de cellulase (diamètre d'halo et la zone d'activité) sur un milieu CMC gélosé

	Niches végétales	Endophytes fongiques	Croissance (cm)	Halo d'hydrolyse (cm)	Zone d'activité (ZA)
Echantillonnage 1 : Novembre 2017	***Juniperus oxycedrus***	**JO-A**	2,96 ± 0,04	1,2 ± 0,05	0,59
		JO-A_1	5,7 ± 0,1	0,5 ± 0,01	0,91
		JO-A_{13}	7,7 ± 0,01	0,4 ± 0,1	0,95
	Juniperus thurifera	**JT-B_4**	7,5 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,94
		JT-B_5	7,7 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,93
		JT-B	2,6 ± 0,001	0,8 ± 0,01	0,69
		JT-B_0	7,5 ± 0,02	0,5 ± 0,02	0,93
		JT-C	2 ± 0,01	0,7 ± 0,01	0,65
	Cedrus atlantica	**CA-D_2**	6,7 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,94
		CA-D_3	6,5 ± 0,0	0,3 ± 0,2	0,95
		CA-D_6	5,1 ± 0,05	0,3 ± 0,1	0,94
		CA-D_7	7,5 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,97
		CA-D_8	5,5 ± 0,02	0,5 ± 0,01	0,9
	Chêne vert	**CV-E_3**	3 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,8
		CV-E_5	7,2 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,93
	Pin maritime	**PM-F_2**	6 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,91
		PM-F_5	4,5 ± 0,3	0,5 ± 0,1	0,88
		PM-F_6	6 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,93
Echantillonnage 2 : Décembre 2019	***Juniperus oxycedrus***	**JO-I**	2,35 ± 0,15	1,2 ± 0,1	0,48
		JO-K_2	2,6 ± 0,25	1,26 ± 0,22	0,51
		JO-M	2,66 ± 0,11	1,73 ± 0,24	0,34
		JO-O_1	3,85 ± 0,15	0,73 ± 0,11	0,81
		JO-Q_1	3,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,93
		JO-Q_2	3,26 ± 0,08	0,23 ± 0,04	0,92

		JO-R_1	3,45 ± 0,45	1,2 ± 0,1	0,65
		JO-V_2	2,1 ± 0,1	1,83 ± 0,05	0,12
		JO-V_5	2,5 ± 0,3	0,4 ± 0,00	0,84
		JO-X_4	2,53 ± 0,22	0,33 ± 0,05	0,86
		JO-X_7	3,23 ± 0,1	0,33 ± 0,11	0,89
		JO-Y_1	2,5 ± 0,5	1,4 ± 0,7	0,44

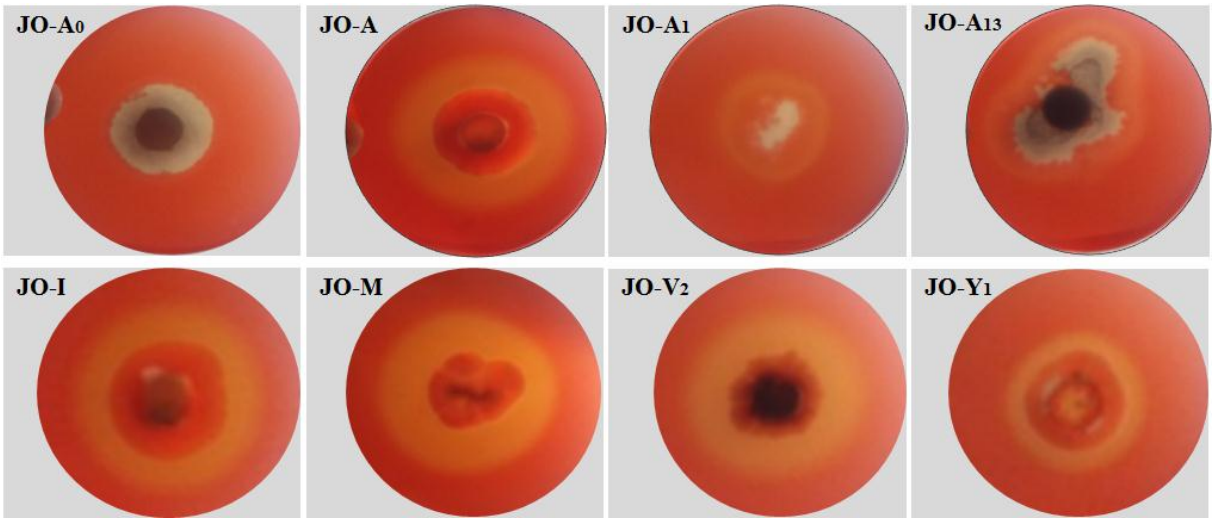


Figure 16: Halos de dégradation de cellulose des endophytes cellulolytiques (JO-A), (JO-A_1), (JO-A_{13}), (JO-I), (JO-M), (JO-V_2) et (JO-Y_1) avec le contrôle négative de la cellulase (JO-A_0) sur le milieu CMC gélosé

II.2. Analyses quantitatives

II.2.1. Production d'activités cellulolytiques en milieu liquide

Un criblage qualitatif sur milieu CMC solide a sélectionné neuf endophytes fongiques pour un second test de vérification en milieu liquide afin de produire des cellulases extracellulaires. Ce test a présenté divers valeurs d'activité CMCase et FPase avec des endophytes sélectionnés.

La valeur maximale de la production d'enzymes cellulases est enregistrée avec l'endophyte JO-A avec une CMCase élevée de 0,206 ± 0,011 IU.mL^{-1} et FPase de 0,117 ± 0,015 IU.mL^{-1} au 7ème jour (Figure 17 et 18). Même les activités CMCase des endophytes JO-I, JO-M et JO-V_2 ont montré des valeurs élevées de 0,156 ± 0,018, 0,170 ± 0,011 et 0,177 ± 0,017 IU.mL^{-1}, respectivement. L'endophyte JO-A produit l'activité CMCase à un niveau supérieur à celui de l'activité FPase.

Les endophytes fongiques JO-A, JO-I, JO-M, JO-V_2 et JO-Y_1 ont rapporté des valeurs élevées d'activité FPase de 0,117 ± 0,015, 0,11 ± 0,01, 0,108 ± 0,016, 0,107 ± 0,012 et 0,104 ± 0,017 IU.mL^{-1}, respectivement, par rapport aux restes des souches testées (Figure 17).

La forte activité de FPase indique une capacité élevée de dégradation des parois cellulaires et une caractérisation significative de la survie des champignons dans son environnement. Cela concorde avec de Almeida et al., (2011), qui ont travaillé sur *Acremonium* sp. EA0810 et présenté les activités maximales de FPase 0,12 UI.mL^{-1} et d'endoglucanase 0,18 UI.mL^{-1} sur une période de 8 à 14 jours. Les valeurs des enzymes cellulases sécrétées par les endophytes fongiques testés variaient d'un isolat à l'autre et cette production dépend généralement du type d'hôte et de son habitat. Tel qu'il a été mentionné par Uzma et al., (2016).

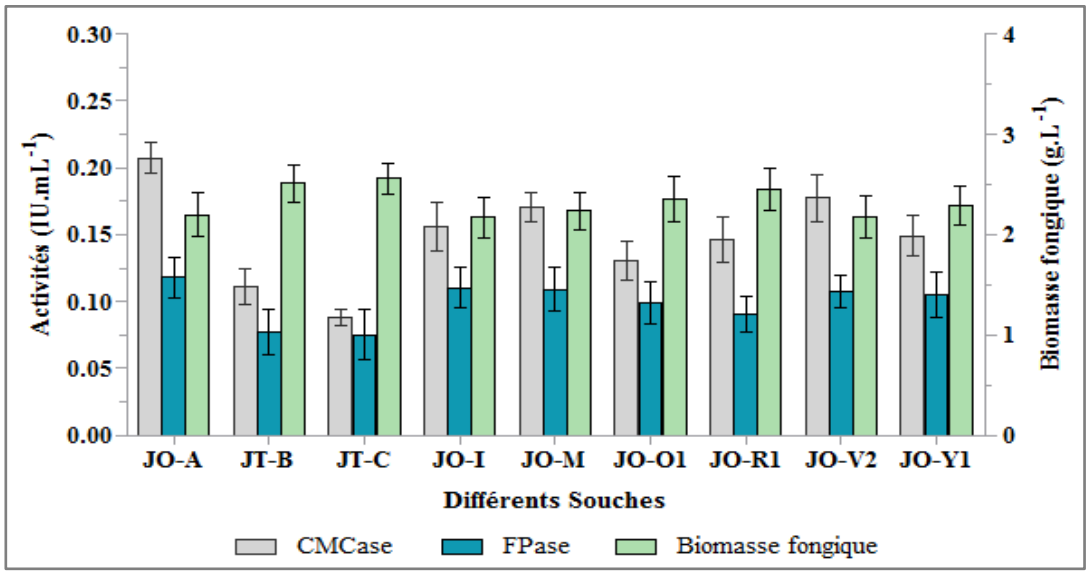


Figure 17: Production d'enzymes cellulases et de biomasse sèche par les endophytes sélectionnées à 28°C

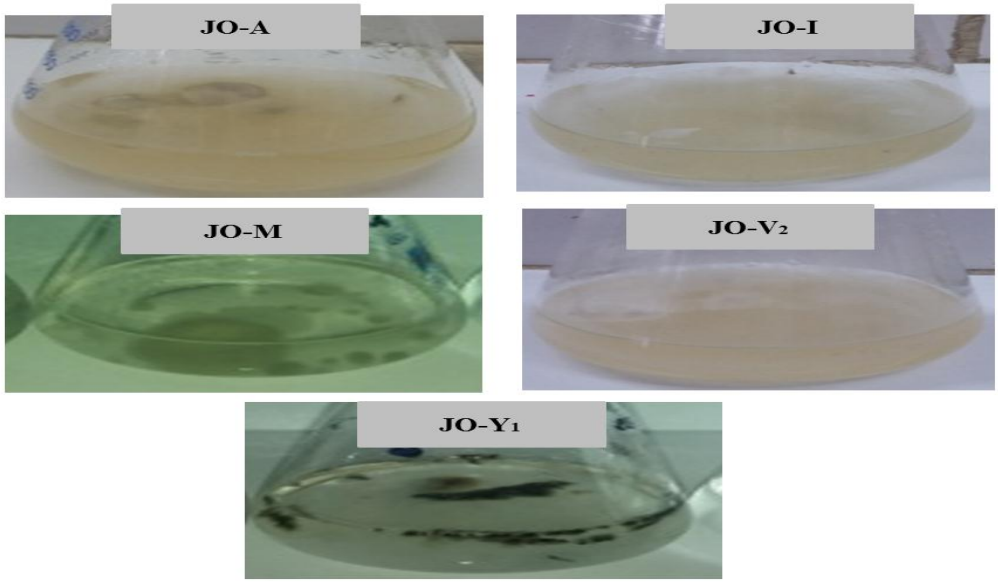


Figure 18: Aspect de cultures des endophytes fongiques développés séparément dans le milieu basique CMC pendant 7 jours à 28 °C

Parallèlement, la biomasse fongique a montré des différences de poids sec pour les endophytes testés. Des valeurs élevées de la biomasse sèche sont signalées avec les endophytes JT-B, JT-C et JT-R_1 de 2,51 ± 0,19, 2,56 ± 0,15 et 2,45 ± 0,21 g.L^{-1}, respectivement (Figure 17).

Les activités cellulases des endophytes sélectionnés sont qualitativement affirmées par la décoloration du rouge du Congo (Figure 16) et confirmées quantitativement par la détermination des activités CMCase et FPase dans un milieu liquide par la méthode du réactif de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) (Figure 17).

Cependant, l'isolat JO-A associé à *Juniperus oxycedrus* a donné des résultats favorables à la production d'enzymes cellulases à des niveaux raisonnables, ce qui suggère son utilisation dans des applications industrielles.

II.2.2. Cinétique de la production des activités cellulases par les souches sélectionnées

Les activités cellulases des endophytes sélectionnés sont testées de nouveau dans un milieu liquide CMC. La cinétique de la synthèse de la cellulase par les différents endophytes JO-A, JO-I, JO-M et JO-V_2 est évaluée pour déterminer le moment optimal de la production enzymatique (Figure 19).

Les cinétiques de production des enzymes cellulolytiques ont montré une augmentation exponentielle des activités CMCase et FPase jusqu'au 8ème jour d'incubation (Figure 19). La production la plus élevée des activités CMCase et FPase ne fut enregistrée qu'après le 7ème jour pour les endophytes JO-M (0,170 ± 0,006, 0,108 ± 0,007 IU.mL^{-1}) et JO-V_2 (0,177 ± 0,008, 0,107 ± 0,006 IU.mL^{-1}), respectivement (Figure 19 C, D) et après le 8ème jour pour les endophytes JO-A (0,209 ± 0,004, 0,118 ± 0,009 IU.mL^{-1}) et JO-I (0,160 ± 0,008, 0,113 ± 0,006 IU.mL^{-1}), respectivement (Figure 19 A, B).

Ensuite, les activités enzymatiques ont diminué avec le prolongement du temps d'incubation de plus de 9 jours pour les quatre endophytes testés. Cela pourrait probablement s'expliquer par l'autolyse des mycéliums, où bien l'hydrolyse des cellulases extracellulaires par les protéases sécrétées et la production de métabolites toxiques.

Selon de Castro et al., (2010), la plupart des champignons commencent à produire une activité enzymatique détectable seulement après 72 heures de croissance. Ceci concorde avec nos résultats obtenus par les endophytes testés avec des valeurs d'activité CMCase de 0,071 à 0,150 IU.mL^{-1} et de 0,047 à 0,086 IU.mL^{-1} pour l'activité FPase seulement après 3 jours d'incubation (Figure 19). Pourtant, de Almeida et al., (2011) ont rapporté que l'activité FPase maximale avait été obtenue le 8ème jour de l'incubation dans la culture d'*A.fumigatus* et d'*Acremonium*.

Ces résultats montrent pour la première fois que les endophytes fongiques isolés de *Juniperus oxycedrus* ont la capacité de produire des cellulases extracellulaires. Cela contribue à la richesse fongique du genévrier à sécréter des enzymes hydrolytiques, en donnant des informations sur le potentiel biotechnologique des endophytes dans cette région méditerranéenne (Moyen Atlas, Province d'Ifrane).

La souche JO-A est confirmée au cours de la cinétique de production des cellulases parmi les meilleurs isolats fongiques présélectionnés et retenus comme une espèce cellulosique pour les expériences suivantes.

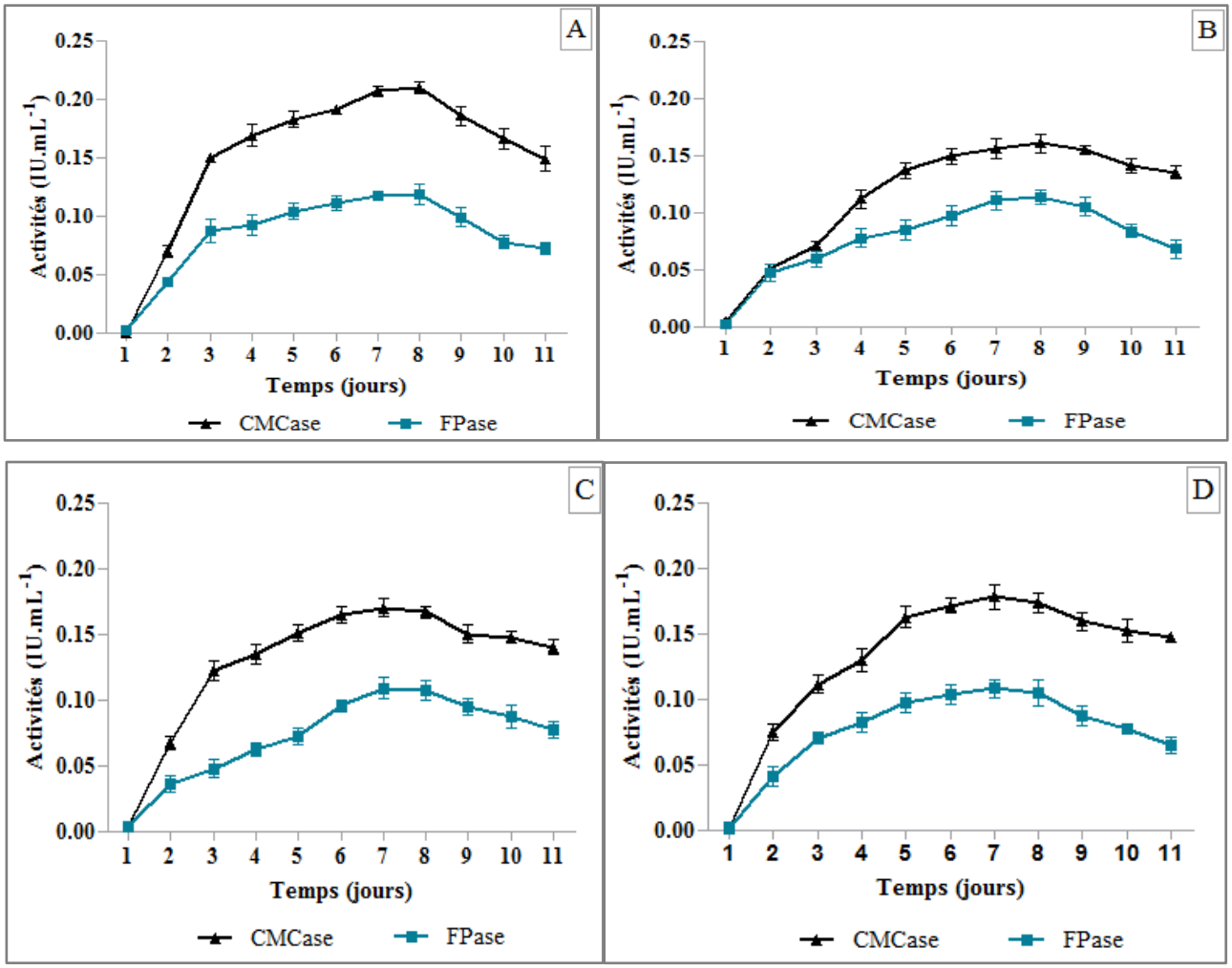


Figure 19: Sécrétion des activités CMCase et FPase dans le milieu de culture par JO-A (A), JO-I (B), JO-M (C) et JO-V_2 (D) développés séparément pendant 11 jours à 28 °C

III. Endophytes fongiques laccases positifs

III.1. Test qualitatif

Les endophytes fongiques laccase positifs sont choisis sur la base de la polymérisation oxydative du guaïacol avec la formation de zones brune-rougeâtres autour des colonies de croissance fongique. A ce jour, aucune production d'enzyme laccase d'endophytes fongiques isolés de *Juniperus oxycedrus* n'est signalée dans la région d'Ifrane.

Les endophytes fongiques isolés lors du premier échantillonnage (novembre 2017) sont testés sur le milieu PDA complété avec du guaïacol comme indicateurs. Aucune activité laccase n'est détectée avec quarante-deux endophytes fongiques testés.

Pour le deuxième échantillonnage (Décembre 2019), cinquante-neuf isolats de *Juniperus oxycedrus* sont testés dans le même milieu. Dix endophytes fongiques ont présenté des zones de couleur brun rougeâtre de diamètres différents autour des colonies fongiques (Tableau 9, Figure 20). Les isolats JO-L_1, JO-N_1, JO-T, JO-U_3, JO-V_2, JO-V_4 et JO-X_3 ont montré des zones de couleur plus foncée de 1,80 ± 0,15, 2,02 ± 0,27, 4,20 ± 0,55, 3,60 ± 0,52, 3,10 ± 0,50, 3,20 ± 0,37 et 3,50 ± 0,37 cm, respectivement. Cependant, pour les autres endophytes fongiques testés,

la polymérisation oxydante du guaïacol est signalée par une coloration brun verdâtre du mycélium fongique pour JO-P_3, JO-Q_3, JO-Q_6, JO-R_2, JO-S_1, JO-S_2, JO-S_3, JO-V_1, JO-W_1, JO-W_2, JO-Z_2 et JO-Z_3.

Les endophytes fongiques qui dégradent la lignine avec les plus grands halos d'oxydation brun rougeâtre sont sélectionnés pour le criblage quantitatif.

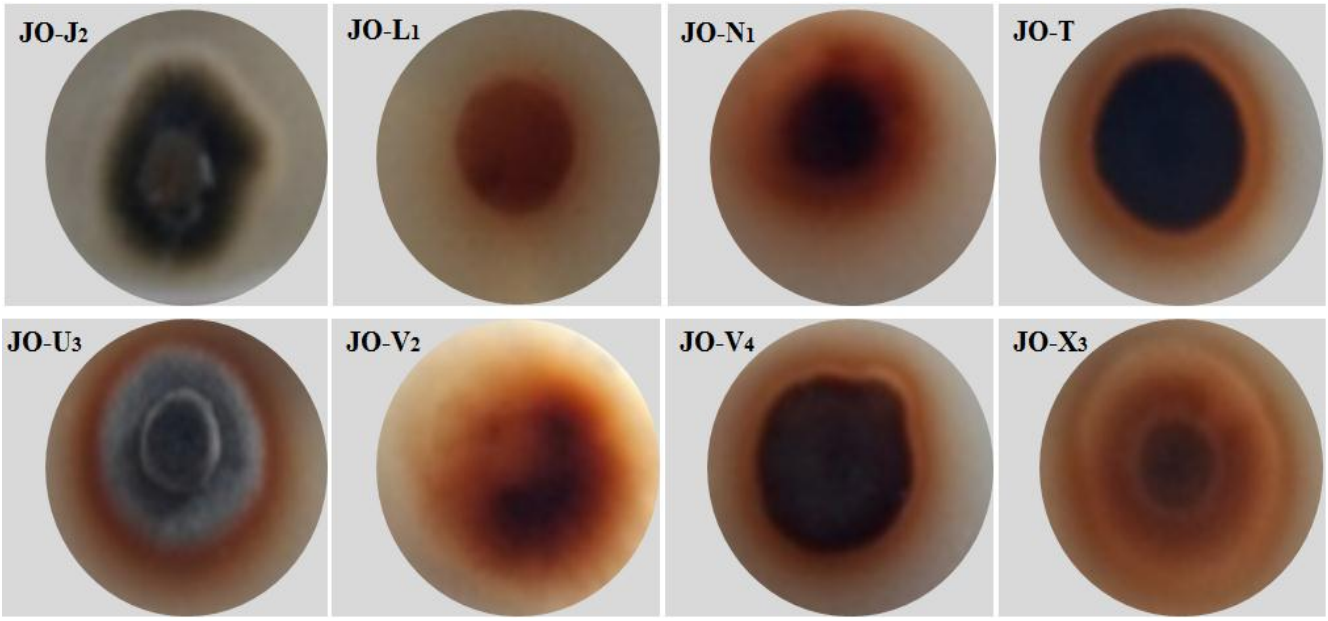


Figure 20: Zones d'oxydation du guaïacol obtenues avec les endophytes laccases positifs (JO-L_1), (JO-N_1), (JO-T), (JO-U_3), (JO-V_2), (JO-V_4) et (JO-X_3). JO-J_2 représente le contrôle négatif de la laccase sur le milieu PDA gélosé avec guaïacol

Tableau 9: Endophytes laccases positives de l'échantillonnage 2 avec les diamètres de la croissance et les halos d'oxydation

Niche végétale	Endophytes fongiques	Croissance (cm)	Zone d'oxydation (cm)
Echantillonnage 2 : Décembre 2019 *Juniperus oxycedrus*	**JO-K_1**	1,46 ± 0,17	1,80 ± 0,11
	JO-L_1	1,30 ± 0,15	1,80 ± 0,15
	JO-M	1,80 ± 0,17	2,00 ± 0,30
	JO-N_1	1,50 ± 0,25	2,02 ± 0,27
	JO-O_1	1,60 ± 0,12	1,80 ± 0,10
	JO-T	3,60 ± 0,47	4,20 ± 0,55
	JO-U_3	3,10 ± 0,45	3,60 ± 0,52
	JO-V_2	2,40 ± 0,55	3,10 ± 0,50
	JO-V_4	2,60 ± 0,32	3,20 ± 0,37
	JO-X_3	3,00 ± 0,42	3,50 ± 0,37

Les laccases sont des enzymes multicopper-oxydase (appartenant au groupe oxydase) qui catalysent l'oxydation d'une large gamme des substrats phénoliques et non phénoliques, utilisés dans une variété d'applications biotechnologiques principalement les laccases fongiques (Mina et al., 2019). Les échantillons de bois de forêt présentent un habitat intéressant et une source d'endophytes fongiques ligninolytiques efficaces qui produisent des cocktails enzymatiques de grande valeur biotechnologique.

Zhao et al., (2013) ont rapporté la production de diverses ligninases et d'enzymes actifs de glucides extracellulaires par des endophytes fongiques qui colonisent les bois forestières. Cependant, Abd El Monssef et al., (2016) ont signalé la production d'enzyme laccase par *Trichoderma harzianum* avec la méthode de vérification du guaïacol (milieu de PDA complété par 0.04%).

L'activité est détectée par la formation d'une zone brun rougeâtre autour du mycélium fongique en raison de la réaction d'oxydation-réduction. Cela est confirmé par Gochev et Krastanov, (2007) et Chenthamarakshan et al., (2017) qui ont indiqué que *Trichoderma* sp. et *Marasmiellus palmivorus* LA1 sont reconnus comme sources d'enzymes laccase.

III.2. Cinétique de la production de l'activité laccase par les endophytes sélectionnés

L'évolution temporelle de la synthèse des laccases par les endophytes sélectionnés est étudiée afin de déterminer le temps optimal de la production des enzymes dans le milieu extérieur. Pourtant, le temps de fermentation joue un rôle primordial dans la croissance fongique et la sécrétion des enzymes hydrolytiques. La production de laccase est enregistrée par la formation d'une couleur brun rougeâtre dans le mélange réactionnel due à l'oxydation du guaïacol en présence des enzymes laccase.

La production de laccase par les souches sélectionnées est confirmée sur le milieu liquide MM. Les figures 21, 22 et 23 illustrent l'activité laccase et le poids sec des espèces fongiques testées. La figure 21 a montré une augmentation de l'activité laccase avec une augmentation du temps d'incubation pour tous les endophytes testés. L'endophyte fongique JO-V_2 a produit l'enzyme laccase avec la concentration la plus élevée, suivie de l'endophyte JO-U_3 et de JO-V_4. L'endophyte JO-V_2 a produit approximativement plus de 65% de l'enzyme que JO-V_4 et d'un taux d'augmentation dépasse 100% par rapport à l'enzyme sécrétée par l'endophyte JO-X_3.

La production de l'enzyme laccase a augmenté rapidement après la fermentation durant la phase de croissance de 2 à 5 jours et a atteint son maximum après 10 jours de culture pour les endophytes JO-N_1 (1,204 ± 0,078 IU.mL^{-1}), JO-V_4 (1,380 ± 0,070 IU.mL^{-1}), JO-T (1,111 ± 0,094 IU.mL^{-1}) et JO-X_3 (1,036 ± 0,070 IU.mL^{-1}) et 13 jours pour JO-L_1 (1,370 ± 0,049 IU.mL^{-1}), JO-U_3 (1,691 ± 0,066 IU.mL^{-1}) et JO-V_2 (2,294 ± 0,089 IU.mL^{-1}). Ensuite, l'activité est devenue stationnaire pour les deux endophytes JO-T et JO-X_3. L'activité tend à diminuer avec une période d'incubation plus longue au-delà de 13 jours, pour la plupart des isolats testés (Figure 21). Cette diminution de la production pourrait être due à l'épuisement des macro- et microéléments présents dans le milieu de culture.

Le rendement en laccase est inférieur pour la plupart des endophytes fongiques testés tels que : JO-X_3, JO-T et JO-N_1, en comparant avec l'activité laccase sécrétée par l'endophyte JO-V_2.

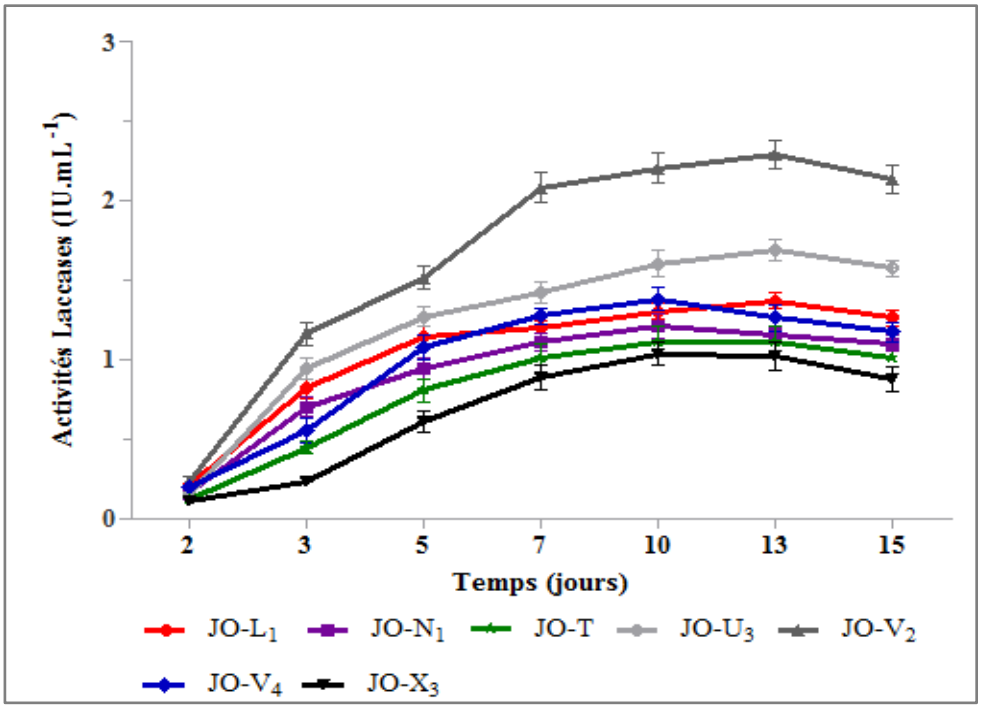


Figure 21: Effet du temps de fermentation sur la synthèse de laccases par les souches endophytes sélectionnées dans le milieu MM à 28 °C

Le poids sec des endophytes fongiques après 15 jours d'incubation a montré des différences dans les biomasses sèches pour les endophytes testés JO-L_1, JO-N_1, JO-T, JO-U_3, JO-V_2, JO-V_4 et JO-X_3 avec des valeurs de 2,18 ± 0,17, 2,06 ± 0,22, 1,99 ± 0,23, 2,66 ± 0,20, 3,23 ± 0,18, 2,44 ± 0,20 et 1,82 ± 0,25 $g.L^{-1}$, respectivement (Figure 22).

Les résultats obtenus concordent avec l'étude de Vaithanomsat et al., (2012) qui ont rapporté une activité laccase maximale de 669,81 $IU.L^{-1}$ et une valeur de poids sec de 2,25 $g.L^{-1}$ après 6 jours de culture du champignon *Lentinus strigosus* en milieu MM. *Trichoderma harzianum* a également produit une activité laccase maximale au 6ème jour de 1,286 $IU.mL^{-1}$ et une biomasse sèche maximale au 8ème jour d'une valeur de 2,70 g/100 mL, pourtant, aucune production de laccase n'est observée après le 9ème jour (Abd El Monssef et al., 2016). Toutefois, Yin et al., (2017) ont signalé une production maximale de laccase de 37 $IU.mL^{-1}$ avec *Abortiporus biennis* J2 pour le 6ème jour. Ceci est similaire aux travaux de Kalra et al., (2013) et Desai est Nityanand, (2011) qui ont présenté un maximum d'activité laccase produite par *Trichoderma* spp. le 6ème jour d'incubation.

Cependant, *Trichoderma harzianum* WL1 a produit une activité laccase maximale pendant seulement 4 jours d'incubation pour une valeur de 4,36 $IU.mL^{-1}$ (Sadhasivam et al., 2008). Pourtant, *Phlebia brevispora* et *Phlebia floridensis* ont produit des activités laccases maximales le 8ème jour de l'incubation avec des titres de 0,24 $IU.mL^{-1}$ et 0,098 $IU.mL^{-1}$, respectivement (Chander et Kaur, 2015). Toutefois, Forootanfar et al., (2011) ont signalé une production maximale de laccase de 65 $IU.L^{-1}$ en culture submergée par *Paraconiothyrium variabile* pendant 9 jours d'incubation. Même Hamza et al., (2012) ont indiqué qu'après 10 jours de culture de *T. trogii* CTM 10156 sécrété 2246 $IU.L^{-1}$ dans le bouillon de culture. L'activité laccase sécrétée par l'endophyte JO-V_2 est supérieure à celle rapportée par ce dernier.

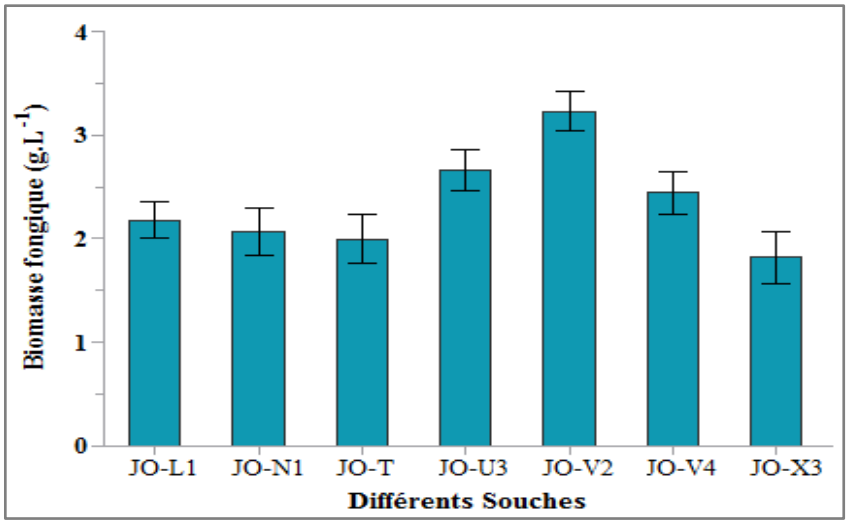


Figure 22: Poids sec des cellules fongiques développés dans un milieu MM à 28 °C pendant 15 jours

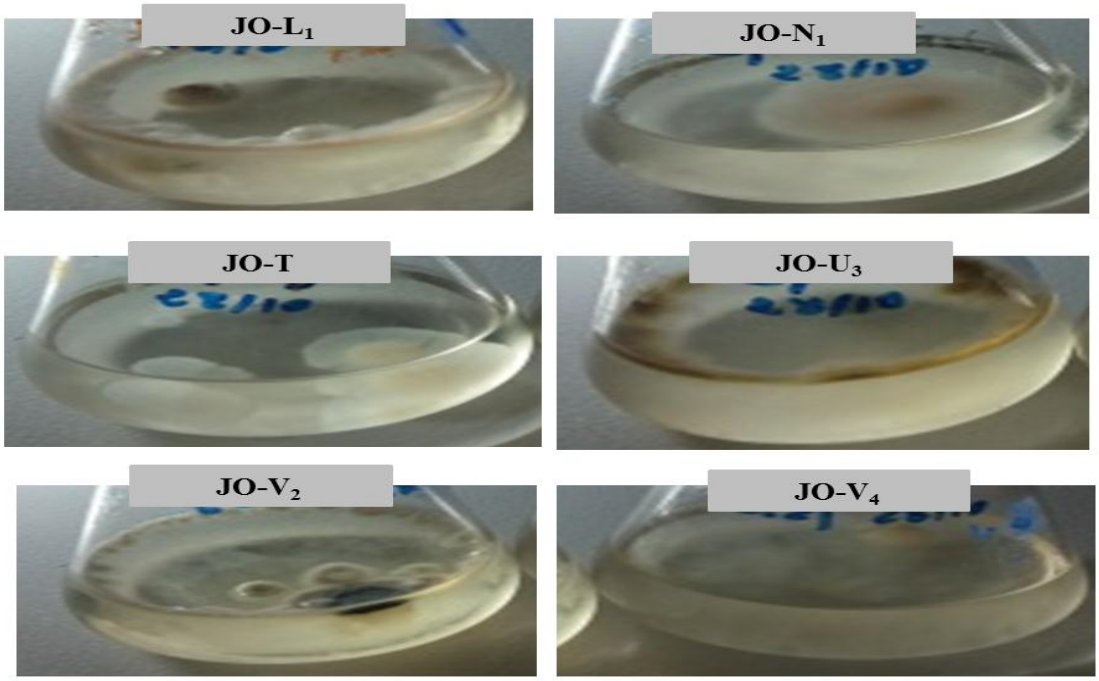


Figure 23: Aspect des cultures des endophytes fongiques développés sur le milieu MM pendant 15 jours à 28°C

Nos résultats indiquent que *J. oxycedrus* présente une diversité fongique intéressante. L'endophyte ligninolytique JO-V_2 est un promoteur industriel doté d'un potentiel biotechnologique considérable, notamment dans le cadre de programmes de bio-remédiation.

La production de laccase dépend non seulement du type d'espèces fongiques utilisées, mais également des conditions de culture utilisées. Ces facteurs jouent un rôle crucial dans la production des enzymes laccase. Par exemple : présence ou absence d'inducteurs, temps d'induction, température et sources de carbone et d'azote, etc...

L'endophyte JO-V_2 est choisi en tant que meilleur producteur de laccase isolé et sélectionné pour l'optimisation de divers paramètres qui influencent la production de laccase extracellulaire. Le temps de fermentation est fixé à 13 jours lors des expériences suivantes.

IV. Influence des facteurs sur la production de l'activité laccase par l'endophyte JO-V_2

L'optimisation de la composition du milieu et des conditions d'incubation est nécessaire pour cribler les facteurs ayant des effets significatifs sur la production maximale de l'enzyme laccase.

IV.1. Effet du diamètre du mycélium et de la température d'incubation

La production de laccase par JO-V_2 est augmentée avec un taux d'ensemencement de deux fragments de 1 cm chacun avec un titre significativement élevé de 3,03 ± 0,15 IU.mL^{-1}, comparé à d'autres quantités d'inoculum testées (Figure 24 A). L'augmentation de l'inoculum a montré un effet négatif sur la production de laccase par JO-V_2, avec un taux de diminution de 51% de l'activité laccase avec dix fragments (2,00 ± 0,18 IU.mL^{-1}) par rapport à l'activité avec deux fragments. Une prolifération rapide du mycélium de l'endophyte JO-V_2 est obtenue en augmentant le nombre d'inoculum de 3 à 10 fragments.

Un certain nombre de cellules fongiques sont accumulées, ce qui a provoqué l'épuisement des éléments nutritifs, suivie par une réduction de l'activité métabolique et puis une diminution de la production d'enzyme laccase. Sun et al., (2010) ont indiqué que l'équilibre entre la biomasse de prolifération et les nutriments disponibles est très important pour rapporter une synthèse optimale d'enzymes hydrolytiques dans un milieu de production.

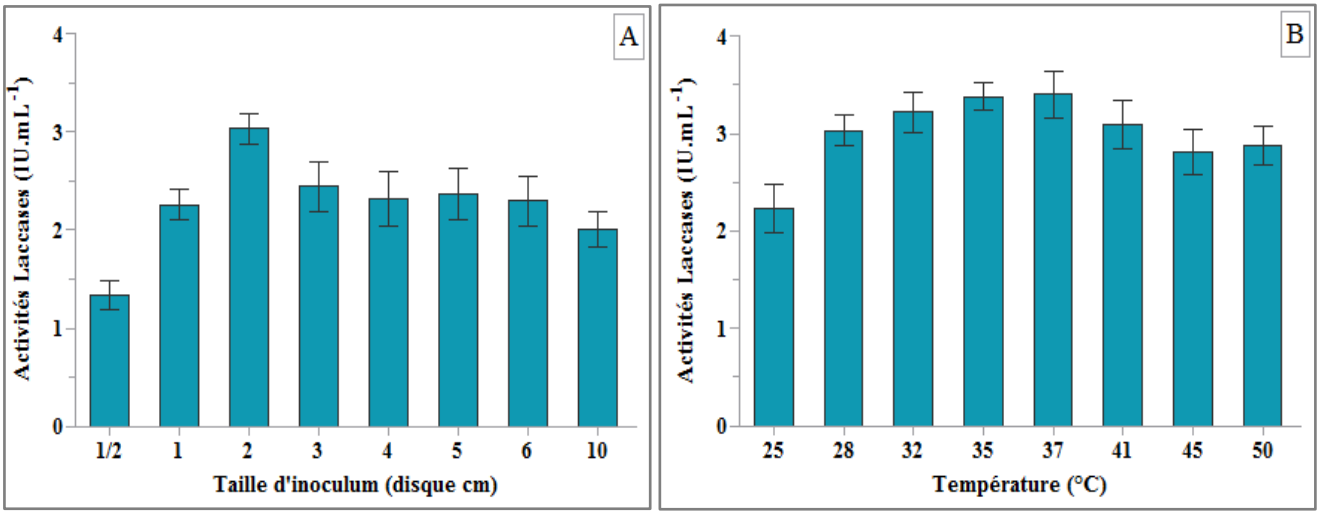


Figure 24:Effets de la taille d'inoculum en nombre de disques (A) et la température d'incubation (B) sur la sécrétion de laccase par l'endophyte JO-V_2

La figure 24 (B) montre que 37 °C est la température d'incubation optimale pour la production d'une quantité élevée de laccase et une bonne croissance de 3,40 ± 0,24 IU.mL^{-1} et 3,88 ± 0,18 g.L^{-1}, respectivement. Une diminution de l'activité est observée avec l'augmentation de la température avec un taux de diminution de 18% à 50 °C.

En parallèle, la biomasse fongique a montré des différences dans le poids sec pour les diverses températures testées. Les quantités de biomasse sèche sont obtenues à des températures de 25, 28, 32, 35, 37, 41, 45 et 50 °C de 3,33 ± 0,20, 4,04 ± 0,21, 4,23 ± 0,16, 4,21 ± 0,19, 3,88 ± 0,18, 2,40 ± 0,23, 2,05 ± 0,19 et 1,80 ± 0,20 $g.L^{-1}$, respectivement.

La température d'incubation optimale pour la production de laccase diffère selon les endophytes fongiques. Selon Abd El Monssef et al., (2016), la température optimale pour la production de laccase et la croissance de *T.harzianum* est de 35 °C, avec des valeurs maximales de 1,479 $IU.mL^{-1}$ et 2,923 $g.100\ mL^{-1}$, respectivement.

Cependant, Shraddha et al., (2011) ont signalé que lorsque les sources microbiennes produisent des laccases, l'effet de la température d'incubation est limité. En outre, selon Kumar et al., (2016), l'espèce *Aspergille flavus* a produit l'activité laccase la plus élevée de 18,6 $IU.mL^{-1}$ à 25 °C.

IV.2. Effet des éléments nutritifs et des inducteurs

La figure 25 (A), illustre l'effet de la source de carbone sur la production de laccase par JO-V_2. Parmi les diverses sources de carbone testées, la culture d'endophyte dans le milieu MM contenant du glucose a eu l'effet le plus important avec une production maximale d'activité laccase de 3,40 ± 0,21 $IU.mL^{-1}$, suivie du milieu contenant du saccharose (2,78 ± 0,20 $IU.mL^{-1}$) et du milieu contenant du fructose (2,41 ± 0,23 $IU.mL^{-1}$).

Toutefois, la cellobiose est signalée comme une meilleure source de carbone pour une production optimale de l'activité laccase à partir de *Lentinus strigosus* avec une valeur de 6374 $IU.L^{-1}$ (Vaithanomsat et al., 2012). Dans certains cas, l'ajout régulier de différentes sources de carbone comme : l'amidon soluble, le glucose et le glycérol a conduit à une augmentation de la production d'enzyme laccase par *Ganoderma* sp.WR-1 (Revankar et Lele, 2006). En outre, Quaratino et al., (2008) ont constaté que la production d'enzyme laccase par *T. pubescens* est retardée dans un milieu contenant du glucose, parce que l'activité est déclenchée par l'épuisement presque complet des sources de carbone. D'autre part, selon la même étude, un début précoce de l'activité laccase produit par *T. pubescens* est atteint lorsque le glucose est remplacé par du fructose.

Cependant, Bakkiyaraj et al., (2013) ont signalé qu'il existe une variation considérable dans le type de source de carbone utilisée pour la croissance et la production de laccase pour différentes espèces fongiques ou même pour des espèces du même genre. Dans certains cas, le rendement en laccase est multiplié par 17 fois chez l'espèce *Hypsizygus ulmarius* en présence de xylose (Ravikumar et al., 2012). Ces résultats montrent que l'activité laccase sécrétée par les champignons peut être augmentée par le choix de la source de carbone utilisée dans le milieu de production. Ces sources semblent réguler l'expression des gènes Laccase.

Les sources d'azote utilisées ont présenté un effet marqué sur la production de laccase par l'endophyte JO-V_2 (Figure 25 B). La supplémentation avec des sources d'azote organique comme : l'extrait de levure, la peptone et la tryptone a clairement présenté une production élevée d'activité laccase par JO-V_2 avec des valeurs respectives de 3,89 ± 0,17, 3,55 ± 0,24 et 3,50 ± 0,13 $IU.mL^{-1}$, comparativement au témoin sans aucune source d'azote de 2,02 ± 0,14 $IU.mL^{-1}$.

Le remplacement des sources d'azote organique par des sources inorganiques a amélioré la production d'activité laccase avec une activité maximale obtenue par $NaNO_3$ d'une valeur de 4,30 ± 0,18 $IU.mL^{-1}$ par rapport aux autres sources d'azote KNO_3 (3,70 ± 0,18 $IU.mL^{-1}$), NH_4NO_3 (3,33 ± 0,13 $IU.mL^{-1}$) et $(NH_4)_2SO_4$ (3,41 ± 0,11 $IU.mL^{-1}$).

Bien que la plupart des études ont rapporté que peptone, extrait de levure, tryptone et L-asparagine sont souvent des sources d'azote organique qui montre une plus grande production de laccase que des sources inorganiques telles que : NH_4NO_3 et $(NH4)_2SO_4$ par *L. strigosus* (Vaithanomsat et al., 2012). Cependant, Teerapatsakul et al., (2007) ont montré l'avantage d'utiliser l'extrait de levure pour une production maximale de laccase par *Ganoderma* sp. KU-Alk4. Ceci concorde avec l'étude de Zhu et al., (2016) qui ont rapporté qu'une concentration d'extrait de levure de 0,5 à 1,0% a entraîné une double augmentation du rendement en laccase par *Pleurotus ostreatus* (ACCC 52857).

De plus, Patel et Gupte, (2016) ont également signalé que l'ajout de l'extrait de levure et de la tryptone dans le milieu de production de *Tricholoma giganteum* AGHP améliore l'activité laccase. En outre, l'utilisation de peptone comme source d'azote organique a présenté des activités laccases plus élevées avec *T. persicolor* (Elisashvili et Kachlishvili, 2008). Par ailleurs, une activité de laccase produite par *Trametes versicolor* a atteint une concentration de 633,3 $mU.mL^{-1}$ à 20 $g.L^{-1}$ CSL (liqueur de maïs), en présence d'une source d'azote et les inducteurs de laccase (Wang et al., 2014).

Et même, une augmentation de la production de laccase par *Trametes versicolor* MTCC138 de 35423 $IU.L^{-1}$ est obtenue avec la supplémentation des pelures de citron par le peptone et l'extrait de malt (Bakkiyaraj et al., 2013). Dans certains cas, un effet positif maximal des sources d'azote sur l'activité laccase est obtenu à partir de la culture de *B. subtilis* DS en présence d'extrait de levure suivi de $MgSO_4.7H_2O$ et de tryptone (Kumar et al., 2018). Alors que, l'extrait de levure est signalé comme une bonne source d'azote et même un inducteur des activités laccases chez divers champignons. En outre, les valeurs de la production de laccase varient d'un microorganisme à l'autre.

Les inducteurs ont un effet remarquable sur la production de laccase par JO-V_2. Bien que, l'endophyte ait pu se développer grâce aux différents inducteurs examinés, il existe des différences significatives dans la synthèse de laccase. Un rendement d'activité relativement élevé est obtenu avec $CuSO_4$, suivi de 2,5-xylidine, catéchol et pyrogallol avec des teneurs respectives de 5,10 ± 0,20, 4,90 ± 0,08, 4,60 ± 0,21 et 4,42 ± 0,10 $IU.mL^{-1}$. L'action la plus élevé de la laccase est trouvée avec l'inducteur $CuSO_4$, indiquant que le $CuSO_4$ est le meilleur inducteur parmi les substrats examinés (Figure 25 C). Les inducteurs qui simulent la synthèse des laccases varient en fonction des substrats utilisés dans la culture fongique et de la variabilité entre les différentes souches fongiques.

Toutefois, la production d'activité laccase par *Ganoderma* sp. rckk-02 est également soutenue par une supplémentation en Cu^{2+} (Sharma et al., 2015). Pourtant, l'espèce *Abortiporus biennis* J2 a sécrété une forte activité laccase en présence d'éthanol, Cu^{2+} et l'acide tannique, avec une augmentation de l'activité enzymatique de 2,5 fois avec l'ajout d'éthanol 0,5 M (Yin et al., 2017). Dans certains cas, le rendement d'activité laccase augmente plusieurs fois lorsque les ions

Cu^{2+} sont utilisés comme inducteur dans le milieu de production (Sondhi et al., 2015). Et même, les ions Cu^{2+} sont reconnus comme un régulateur de l'expression génique de l'activité laccase du fongique au niveau de la transcription (Gonzalez et al., 2013). Par contre, Valle et al., (2014) ont rapporté que $MgSO_4.7H_2O$ a induit la production d'activité laccase par *Agaricus blazei.* En revanche, Wang et al., (2016) ont présenté que l'augmentation d'environ deux fois du rendement d'activité laccase produite par *T. versicolor,* lorsque l'acide vanillique est ajouté dans le milieu de production comme inducteur. Ceci génère un stress oxydatif qui améliore l'expression du gène de la laccase (Piscitelli et al., 2011).

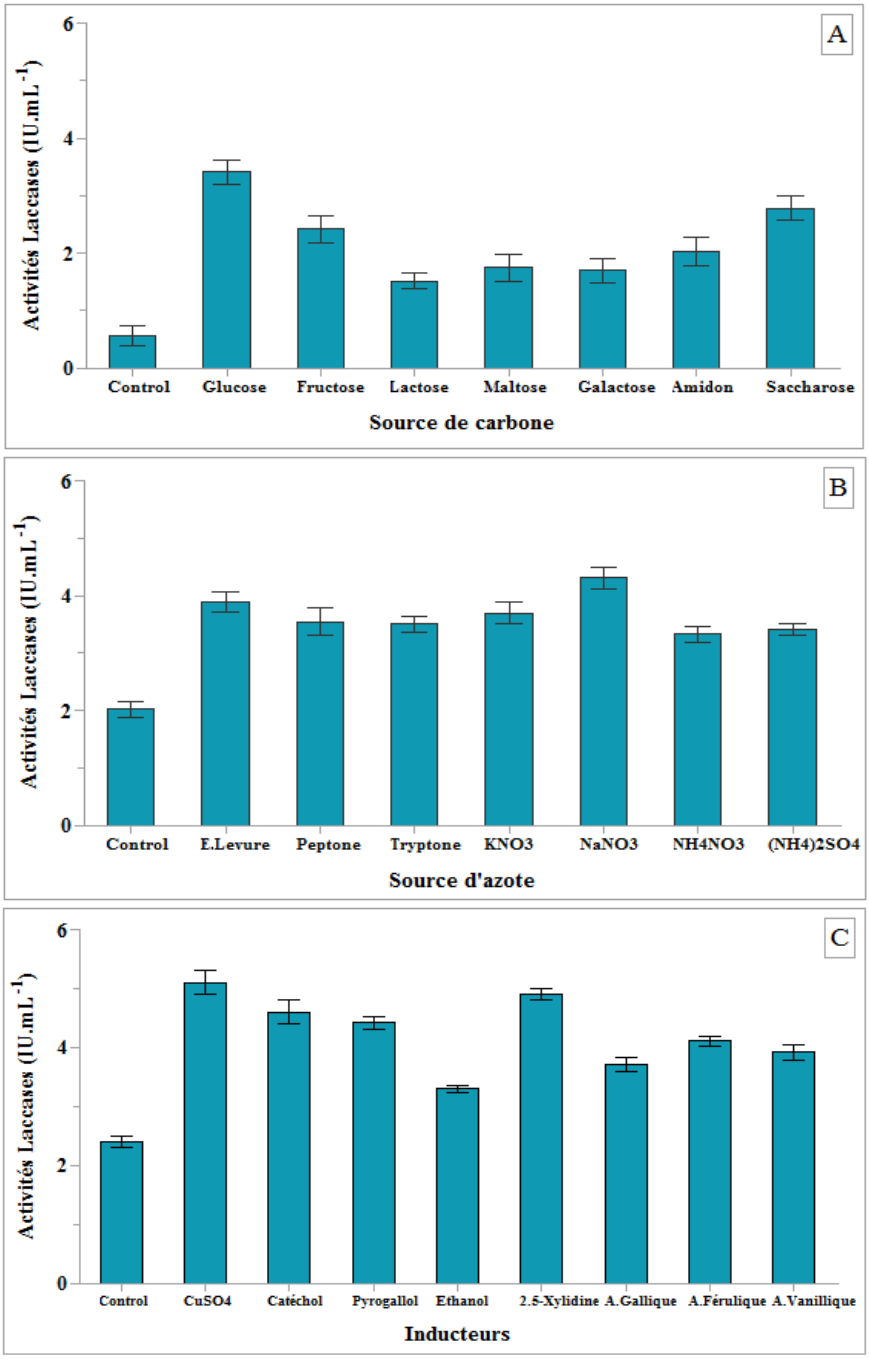


Figure 25: Effets de différents sources de carbones (A), d'azotes (B) et d'inducteurs (C) sur la production de laccase par l'endophyte JO-V_2

En outre, la production de laccase par *Panus tigrinus* est stimulée par l'ajout de 2,5-xylidine à une concentration de 0,25 mM avec une activité maximale de 2 $IU.mL^{-1}$ dans un milieu contenant du glucose et d'azote (Quaratino et al., 2008). Et même, *Trametes versicolor* MTCC 138 a montré une augmentation significative de la production de laccase de 70125 $IU.L^{-1}$ avec l'addition de 2,5-xylidine dans le milieu de production (Bakkiyaraj et al., 2013).

En revanche Yin et al., (2017) ont signalé que l'induction de la sécrétion de laccase par *Marasmius quercophilus* se fait par l'acide férulique, l'acide gallique, catéchol et l'acide veratrique pour les espèces *Trametes pubescens* et *Phlebia radiate*. Ceci est en accord avec Kumar et al., (2018) ont montré que l'alcool veratrylique et l'acide férulique n'ont aucun effet significatif sur la production de laccase par *B. subtilis* DS.

D'autre part, les travaux de Revankar-S et Lele, (2006) ont montré que la production d'enzymes ligninolytiques spécifiquement les laccases pourrait être stimulée par une variété de substrats inducteurs, comme : la 2,5-xylidine, l'acide gallique et férulique. Cependant, la supplémentation avec une faible concentration d'éthanol n'a pas amélioré la production de laccase dans une culture submergée de *T. versicolor* pendant 17 jours dans un milieu synthétique comparativement au témoin (Tisma et al., 2012).

IV.3. Effet des concentrations de glucose, de nitrate de sodium et de sulfate de cuivre

Selon les résultats de la figure 25, le glucose, le nitrate de sodium et le sulfate de cuivre représentent les meilleures sources de carbone, d'azote et d'inducteurs, respectivement, pour une production élevée d'activité laccase par JO-V_2. Ils sont ensuite testés pour déterminer la concentration optimale de chaque facteur indépendamment afin d'établir la composition optimale du milieu de production de laccase par JO-V_2.

La figure 26 montre l'influence de chacun des facteurs sur la production de laccase. Une augmentation des concentrations de glucose, de nitrate de sodium et de sulfate de cuivre a entrainé des différences significatives dans le rendement d'enzymes sécrétées. L'augmentation de la concentration de glucose a conduit à des valeurs plus élevées de production de laccase jusqu'à 5,55 ± 0,21 $IU.mL^{-1}$ avec une concentration de 1,5% de glucose. Mais des augmentations ultérieures de la quantité de glucose ≥ à 3% ont entrainé une diminution de l'activité enzymatique de 4,82 ± 0,16 $IU.mL^{-1}$ à 4% de glucose (Figure 26 A).

Cependant, Aung et al., (2019) ont signalé une production plus élevée de laccase par *Aureobasidium melanogenum* 11-1 d'une valeur de 3120 ± 170 $mU.mL^{-1}$ avec 20 $g.L^{-1}$ de glucose. En outre, Quaratino et al., (2008) ont présenté que l'expression du gène du laccase *lap2* de *T. pubescens* est supprimée dans un milieu contenant plus de 1 $g.L^{-1}$ de glucose.

L'effet de la variation de la concentration de $NaNO_3$ sur la production de la laccase est étudié en détail et illustré dans la figure 26 (B). L'augmentation de la concentration de nitrate de sodium de 1 à 5 $g.L^{-1}$ a entrainé un taux d'augmentation de 51,7% avec une valeur d'activité de 3,92 ± 0,14 à 5,95 ± 0,13 $IU.mL^{-1}$. En plus d'un taux d'augmentation dépasse 100% en comparant l'activité maximale avec 0,5% $NaNO_3$ par rapport au témoin sans aucune source

d'azote. Une augmentation de la concentration de nitrate de sodium à une valeur ≥ 7 $g.L^{-1}$ n'a pas amélioré l'activité laccase, mais a eu un effet négatif sur la sécrétion de laccase.

Pourtant, Kumar et al., (2018) ont signalé que la concentration élevée d'azote dans le milieu de culture des champignons favorise la production d'enzymes ligninolytiques, comme les laccases. Cela concorde avec Elisashvili et Kachlishvili, (2008) qui ont rapporté l'effet positif d'une forte supplémentation en azote sur la production de laccases par *T. versicolor*.

L'ajout de différentes concentrations de $CuSO_4$ dans le milieu de production a augmenté la production de laccase extracellulaire. La valeur d'activité laccase la plus élevée de 6,66 ± 0,11 $IU.mL^{-1}$ est enregistrée lorsque le milieu est complété avec 0,03% (p/v) de $CuSO_4$ (Figure 26 C). Le rendement le plus faible de laccase est marqué avec une concentration de 0,1% d'une valeur de 2,88 ± 0,16 $IU.mL^{-1}$ et avec un taux de diminution de 22% par rapport au témoin sans inducteur. Ceci indique que la nature et la quantité de l'inducteur dans le milieu de production est très importante pour la croissance et la synthèse de laccase extracellulaire.

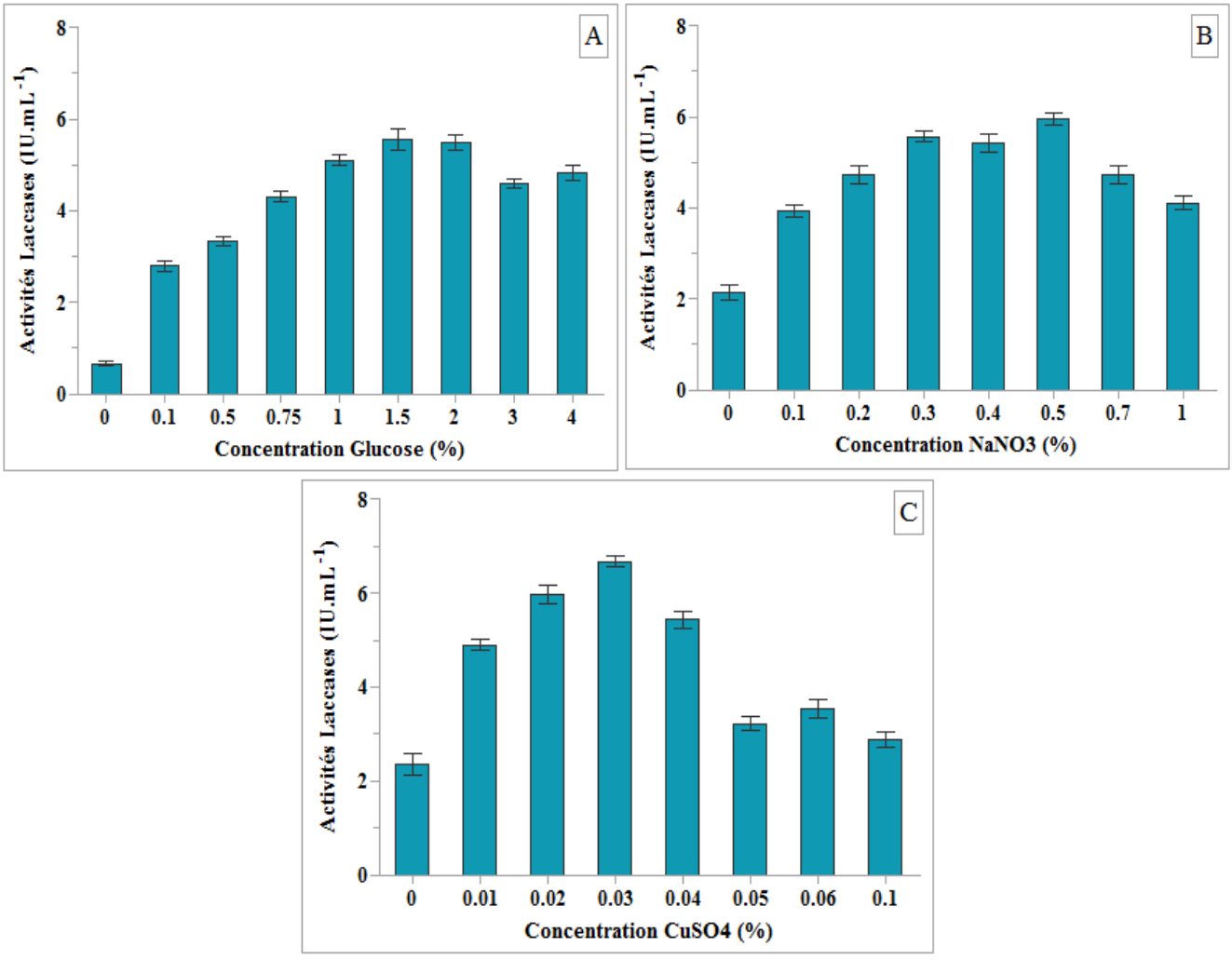


Figure 26: Effets de divers concentration de glucose (A), de nitrate de sodium (B) et de sulfate de cuivre sur la sécrétion de laccase par l'endophyte JO-V_2

Selon Adamafio et al., (2012) les ions de cuivres ont provoqué l'effet d'activation pour l'activité laccase. Cependant Zabin et al., (2017) ont présenté que la concentration de 0,045%

des ions Cu^{2+} est la quantité idéale pour induire la synthèse de laccase par *Trichoderma harzianum* HZN10 et l'augmentation de la concentration de cuivre affecte négativement la croissance et la production de laccase.

Pourtant, la production de laccase par *Panus tigrinus* est inhibée par la supplémentation avec des ions Cu^{2+} dans une gamme de concentration testées de 0 à 0,25 mM, en raison d'un effet toxique de l'inducteur sur la croissance mycélienne (Quaratino et al., 2008). Cela concorde avec Abdelmageed et al., (2014) qui ont indiqué que l'ajout de $CuSO_4.5H_2O$ à une concentration de 5×10^{-2} M a causé une inhibition complète de l'activité laccase de *P.ostreatus* ARC280. Et même, Vaithanomsat et al., (2012) ont rapporté que l'augmentation de la concentration de $CuSO_4 \geq$ à 0,002 $g.L^{-1}$ entraine une diminution de l'activité laccase par *L. strigosus*.

Cependant, cette diminution de la production d'enzymes ligninolytiques peut être influencée par les métaux lourds présents dans les cultures fongiques, qui influencent les niveaux de transcription et de traduction. Cela concorde avec Majeau et al., (2010) qui ont signalé que l'excès de Cu^{2+} dans la culture fongique avait un effet toxique sur la croissance et la production de laccase. Selon la même étude, une concentration minimale de Cu^{2+} est nécessaire pour une production active de laccase, parce que l'ion Cu^{2+} constitue un cofacteur du noyau catalytique de la molécule de Lac.

Nos résultats ont confirmé le rôle du glucose, de $NaNO_3$ et de $CuSO_4$, ainsi que leurs concentrations dans l'amélioration de manière significative la production de laccases par JO-V_2. Ces conditions optimales ont permis au JO-V_2 de produire une activité laccase de 6,66 ± 0,11 $IU.mL^{-1}$ pendant 13 jours. Un taux d'augmentation dépasse 100% du rendement en laccase obtenu après optimisation d'un facteur à la fois par rapport à la quantité de laccase produite dans les conditions non optimisées 2,29 ± 0,08 $IU.mL^{-1}$.

L'optimisation du milieu et des conditions de culture pour une activité maximale de laccase a rendu 15 $g.L^{-1}$ glucose, 5 $g.L^{-1}$ $NaNO_3$, 0,3 $g.L^{-1}$ $CuSO_4$ et deux fragments de mycélium frais (1cm chacun) à 37 °C pendant 13 jours, peut-être la meilleure condition pour la production de laccase par JO-V_2.

Dans ces derniers décimés, les enzymes ligninolytiques des endophytes fongiques ont attiré plus d'attention pour leur application industrielle dans diverses approches biotechnologiques, grâces aux réactions synergiques dans les processus de biorestauration et de biotransformation. L'endophyte ligninolytique JO-V_2 peut constituer une source attrayante d'enzymes à usage industriel. Ainsi que la délignification biologique de la biomasse lignocellulosique par la laccase fongique sécrétée dans un contexte écologique.

V. Propriétés physico-chimique de l'extrait enzymatique laccase produit par la souche JO-V_2

D'après les résultats du criblage quantitatif et qualitatif, l'endophyte fongique JO-V_2 est sélectionné pour le test de la caractérisation de l'extrait enzymatique produit dans des conditions optimales. A grande échelle, les variations de température et de pH facilitent la production d'enzymes laccase à des fins industrielles (Thiribhuvanamala et al., 2013).

V.1. Evaluation du pH et de la température optimale de l'activité laccase

L'effet de la température et du pH sur l'activité laccase de l'extrait enzymatique de JO-V_2 est déterminé à différentes températures (20 à 80 °C) et au pH (2,0 à 8,0) (Figure 27).

L'extrait enzymatique de JO-V_2 a montré des valeurs élevées à un pH compris entre 3,0 et 7,0, avec une activité maximale de 13,07 ± 0,39 IU.mL^{-1} à un pH de 5,0 (Figure 27 A). En outre, l'extrait est relativement stable à partir d'une gamme de pH de 4,0 à 6,0 et conserve plus de 73 et 69% de leur activité initiale à pH 3,0 et 7,0, respectivement, avec une valeur de 12,79 ± 0,26 IU.mL^{-1} à pH 4,0, indiquant une nature acide de l'extrait enzymatique.

A pH alcalin, l'extrait laccase a conservée en moyenne 49% de son activité enzymatique à pH 8,0. Au-dessus de pH 6,0 l'activité enzymatique laccase a graduellement diminué et presque complètement perdu à pH supérieur à 8,0, suggérant la nature acide de l'extrait laccase testé. Le niveau d'activité laccase varie selon l'alcalinité moyenne du milieu réactionnel.

L'extrait enzymatique de JO-V_2 a montré une activité élevée sur une large gamme de températures entre 20 et 60 °C, avec une température optimale à 40 °C pour une valeur d'activité maximale de 13,05 ± 0,40 IU.mL^{-1}. Pourtant, l'activité est stable et reste élevée jusqu'à 50 °C, en maintenant une valeur d'activité de 12,79 ± 0,38 IU.mL^{-1} (Figure 27 B). Cependant, à une température supérieure à 60 °C, l'extrait enzymatique a indiqué une baisse significative de leur activité. De même, il a conservé jusqu'à 80, 46 et 31% d'activité initiale à 60, 70 et 80 °C, respectivement, ce qui indique un faible niveau de dénaturation ou d'inactivation de l'enzyme laccase aux hantes températures d'incubations.

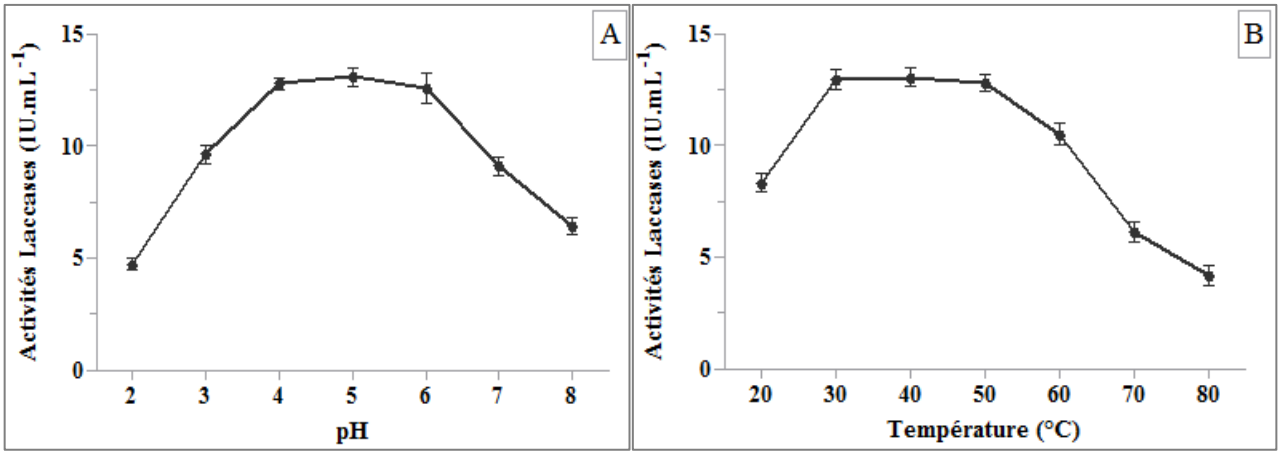


Figure 27: Effet de la température d'incubation (A) et du pH (B) sur l'activité laccase de l'endophyte JO-V_2

Kalra et al., (2013) ont obtenu des résultats semblables, parce qu'ils ont constaté que l'activité laccase maximale est enregistrée à une température optimale de 45 à 50 °C. Et même, avec Yin et al., (2017) ont montré que la température optimale pour une activité maximale de laccase est de 40 °C avec un pH optimal de 5,0, suivie d'une diminution de l'activité enzymatique de 75% et 41% à 60 et 70 °C, respectivement.

De plus, la majorité des laccases fongiques sont des enzymes inactivés à des températures supérieures à 60 °C après 6 heures d'incubation. Ceci est cohérent avec avec d'autres laccases fongiques extracellulaires de *Leptosphaerulina chartarum* et *Panus tigrinus* (Quaratino et al.,

2007 ; Sajben-Nagy et al., 2014). Pourtant, Ademakinwa et Agboola, (2016) ont signalé que la laccase *d'A. pullulans* NAC8 présentait une activité maximale à 45 °C et un pH optimal de 4,5. Wang et al., (2017) ont rapporté que le pH et la température optimaux de laccase fongique *Cerrena unicolor* sont de 2,6 et 45 °C, respectivement.

Habituellement, la majorité des laccases fongiques sont stables à pH acide et cette stabilité varie selon l'origine de l'enzyme étudiée. En fonction du type de substrat de laccase examiné dans la réaction, les optimums de pH des laccases pourraient changer d'un pH optimal de 4,0 à 7,0 pour les substrats DMP, guaïacol et la syringaldazine (Abdelmageed et al., 2014). Ceci est en accord avec Patel et al., (2013) et Schückel et al., (2011) qui ont rapporté une activité maximale de laccase à pH 4,5 et 5,5 par oxydation d'ABTS et de guaïacol, respectivement. Cependant, Abd El Monssef et al., (2016) ont présenté une température optimale à 35 °C et un pH à 5,0 pour une activité maximale de laccase de *T. harzianum* de 3,81 $IU.mL^{-1}$ et 4,21 $IU.mL^{-1}$, respectivement, quand le guaïacol est employé comme substrat.

En général, les laccase fongiques sont stables à des températures comprises entre 30 et 50 °C et perdent rapidement la plus grande partie de leur activité initiale à des températures au-dessus de 60 °C. De plus, Stoilova et al., (2010) ont signalé que la laccase brute de *T. versicolor* a une activité maximale à 45 °C et l'enzyme a maintenu plus de 90% de son activité originale à un pH de 4,5 et une température allant de 40 à 47 °C. Même, les laccases fongiques de *P. ostreatus* ARC280, *P. ostreatus* EM-1, *Paraconiothyrium variabile* et *P. ostreatus* HP-1 ont enregistré des optimums d'activité à 50 °C (Abdelmageed et al., 2014 ; Adamafio et al., 2012 ; Forootanfar et al., 2011 ; Patel et al., 2013).

D'autre part, *T. versicolor* IBL-04 et *H. coralloides* ont présenté des optimums d'activités laccases à 40 °C (Asgher et al., 2012 ; Zou et al., 2012). Alors que pour l'espèce *T. hirsuta* BM-2 a un optimum d'activité laccase étendues à des températures de 40 à 60 °C (Zapata-Castillo et al., 2012). Cependant, à une température de 60 °C et de 80 °C, l'activité laccase a donné lieu à un maximum pour *Trametes sp*. HS-03 (LacIII isozyme) et *Lentinus tigrinus* (Guo et al., 2012 ; Xu et al., 2012), respectivement.

Les résultats obtenus ont indiqué que la laccase de l'endophyte JO-V_2 est une enzyme thermostable avec un pH acide optimal (40 °C et 5,0).

V.2. Stabilité de l'activité laccase

A partir des données sur l'effet du pH et de la température sur l'activité laccase de l'endophyte JO-V_2, l'évaluation de la stabilité de l'enzyme est testée à un pH de 3,0 à 7,0 et à une température de 30 à 70 °C avec un intervalle de 10 °C pendant 24 heures (Figure 28).

L'extrait laccase de JO-V_2 est stable à un pH acide dans une gamme de pH de 4,0, 5,0 et 6,0, conservant respectivement 96, 97 et 88% de l'activité originale après 24 heures d'incubation en gardant l'enzyme stable pendant 240 minutes, sans aucune perte d'activité laccase à son pH optimal de 5,0. L'activité laccase a brusquement diminué à des niveaux de pH de 3,0 et 7,0 avec un taux de diminution de 42 et 72%, respectivement, après 24 heures d'incubation (Figure 28 A). La demi-vie de l'extrait de laccase de JO-V_2 est de 24 heures au pH optimal de 5,0 et de 6 heures à un pH de 6,0.

La stabilité thermique de laccase de JO-V_2 est déterminée par la pré-incubation de l'extrait enzymatique pendant 15 à 1440 min, à une température comprise entre 30 et 70 °C (Figure 28 B). La laccase de JO-V_2 est stable et presque complètement actif à des températures allant de 30 à 50 °C pendant une longue période. Cependant, la laccase a conservé 96% et 72% de son activité initiale après 24 heures d'incubation à 40 °C et 50 °C, respectivement et sans aucune perte d'activité pendant 360 minutes à leur température optimale (40 °C). Pourtant, à 60 °C et 70 °C, l'activité laccase a diminué de 58% et 46% de l'activité originale respectivement, après 24 heures d'incubation. Cependant, à une température supérieure à 70 °C, la laccase de JO-V_2 est entièrement inactivée après moins de 24 heures et cette diminution d'activité pourrait être due à une perte de la stabilité enzymatique. La demi-vie de l'enzyme laccase de JO-V_2 est de 6 heures à 60 °C et de 24 heures à leur température optimale de 40 °C.

Ces résultats sont conformes à ceux de Yin et al., (2017) qui ont constaté que la laccase d'*Abortiporus biennis* J2 est entièrement actif entre 20 et 40 °C, en maintenant 85% de son activité initiale à 50 °C après 6 heures d'incubation. Ainsi, une stabilité de pH alcalin d'une gamme de 6,0 à 10,0 jusqu'à 80% d'activité originale après 24 heures. La stabilité thermique peut changer à différentes températures, en fonction de l'origine et de la source de l'enzyme hydrolytique. Cela est confirmé par Richa et al., (2013) qui ont rapporté que la laccase d'*A. pullulans* montre une température optimale de 50 °C et 60 °C et une stabilité d'une heure à 50 °C.

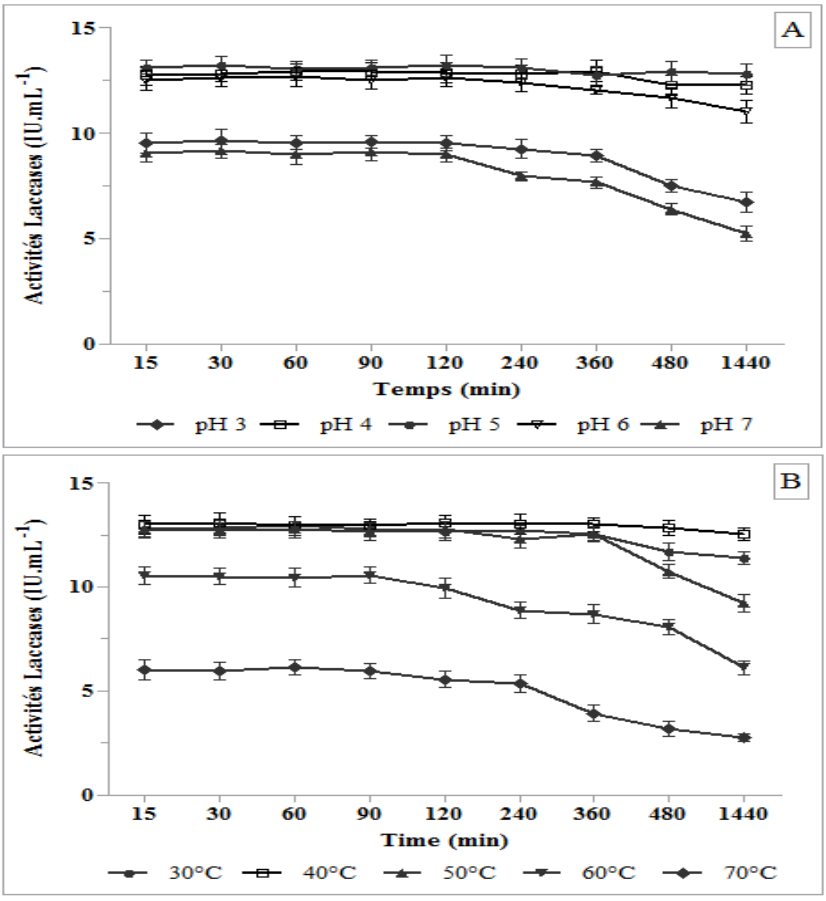


Figure 28: Stabilité de l'extrait laccase de l'endophyte JO-V_2 dans une large gamme de pH (A) et de températures d'incubation (B) pendant 24 heures

Cependant, Ademakinwa et Agboola, (2016) ont signalé une stabilité de l'enzyme laccase d'*A. pullulans* NAC8 à une température de 45 à 55 °C après 2 heures d'incubation. En revanche, l'isoenzyme laccase du *Trametes trogii* a prouvé sa thermostabilité à une température de 50 °C et une demi vie de 45 minutes à 70 °C, avec une plus grande stabilité de 3 heures à 60 °C (Campos et al., 2016). Pourtant, la température optimale de la laccase d'*A. flavus* est de 25 °C et sa stabilité se situe entre 25 et 50 °C.

D'autre part, Kumar et al., (2016) ont montré que la laccase d'*Aspergillus flavus* a un pH optimal de 5,0 avec un pH stable entre 4,0 et 6,0. La laccase alcaline extracellulaire de *B. subtilis* (Lac DS) a un pH optimal de 8,5 avec une stabilité de 4 heures, en maintenant 70% de son activité initiale et avec une température optimale de 55 °C (Kumar et al., 2018). Selon les mêmes auteurs, l'enzyme laccase a conservé 90% de son activité pendant 24 heures d'incubation.

Cependant, la laccase de *P. ostreatus* ARC280 est stable à 30 °C sans perte d'activité originale pendant 120 minutes, suivie d'une diminution de l'activité résiduelle en fonction du temps d'exposition et de la température (Abdelmageed et al., 2014). D'autre part, les laccases de *P. ostreatus* EM-1 et *P. variabile* ont gardé respectivement 22,6 et 50% de leur activité initiale, après 60 minutes d'incubation à 50 °C (Adamafio et al., 2012 ; Forootanfar et al., 2011). Chez la même espèce, *P. ostreatus*, Luna et al., (2013) ont signalé que la laccase est thermostable à 39 °C avec 27,5% de son activité initiale et qu'une stabilité élevée à pH 7,0 est obtenue avec une valeur d'activité résiduelle de 42,1% maintenue pendant 15 heures d'incubation. Et pour, Patel et al., (2013) ont constaté avec l'espèce *P. ostreatus* HP-1 une stabilité d'activité laccase pendant 10 minutes à 50 °C, suivie d'une inactivation rapide de l'enzyme à 70 °C.

Guo et al., (2012) ont trouvés que les divers isozymes (LacI, LacII et LacIII) de laccase de *Trametes* sp. HS-03 ont un pH stable variant entre 2,0 et 5,5 après 4 heures d'incubation. Selon les mêmes auteurs, pour des valeurs de pH supérieures à 7,0, tous les isozymes de laccase ont rapidement perdu leur activité originale. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Fouda et al., (2015) qui ont montré que les enzymes les plus stables proviennent de champignons et de bactéries et sont souvent impliqués dans différentes industries de bio-traitement de matières premières à haute température.

Les résultats obtenus indiquent que la laccase de JO-V_2 est stable avec une plage de température de 30 à 50 °C et un pH de 4,0 à 6,0. Ceci peut être une propriété intéressante pour diverses applications biotechnologiques industrielles.

V.3. Activité laccase à différents concentrations de substrat

L'efficacité de l'activité laccase est examinée sur une large gamme de guaïacol allant de 2 à 100 mM.

L'activation de l'extrait laccase a augmenté avec la quantité de guaïacol testée jusqu'à une concentration de substrat de 100 mM et atteint un taux d'oxydation élevé de 16,76 ± 0,36 $IU.mL^{-1}$ avec une augmentation de 78% par rapport à la concentration de 2 mM (Figure 29).

Les paramètres de cinétiques de l'extrait enzymatique de JO-V_2 sont analysés en utilisant diverses concentrations de guaïacol en tant que substrat. Les paramètres K_m et V_{max} sont estimés d'après l'équation de Michaelis-Menten du graphique de Lineweaver-Burk.

L'extrait laccase oxyde le guaïacol avec une valeur d'affinité enzymatique (K_m) de 0,4727 mM et une valeur de vitesse maximale (V_{max}) de 15,40 $IU.mL^{-1}$. Ces résultats impliquent que l'extrait laccase de JO-V_2 a une affinité plus élevée pour le substrat guaïacol. D'autre part, la faible valeur de K_m obtenue implique qu'il s'agit d'une enzyme laccase très particulière avec une forte affinité pour son substrat guaïacol. Pourtant, en obtenant une réaction enzymatique à une vitesse maximale, de faibles quantités de substrat seront suffisamment employées.

Cependant, l'affinité du substrat et le taux de réaction de l'enzyme pourraient varier selon le type de substrat oxydé. En accord avec les résultats obtenus, l'enzyme laccase de *A. pullulans* NAC8 a montré des valeurs plus élevées de K_m (1,1 ± 0,12 mM) et de V_{max} (12,7 ± 0,55 $\mu moL.mL.min^{-1}$) avec le guaïacol comme substrat (Ademakinwa et Agboola, 2016).

Pourtant, les paramètres de cinétiques K_m et V_{max} de *C. unicolor* (CUL) sont estimés par des valeurs plus faibles de 302,7 µM et 13,6 $\mu M.min^{-1}$, respectivement, avec ABTS (Wang et al., 2017). Même, la laccase de *P. ostreatus* ARC280 a enregistré des valeurs de 0,074 µM et 1,563 $\mu moL.min^{-1}$ pour K_m et V_{max}, respectivement avec la syringaldazine (SGZ) comme substrat. Et pour le guaïacol, la constante d'affinité (K_m) a montré des valeurs entre 0,46 et 6,61 $mmol.L^{-1}$ pour les laccases de différentes espèces de *P. ostreatus* (Abdelmageed et al., 2014). A cet égard, Patel et al., (2013) ont signalé que la laccase de *P. ostreatus* HP-1 a enregistré des valeurs de K_m de 46,51 et 400 mM avec ABTS et DMP, respectivement.

Et même, Zapata-Castillo et al., (2012) ont présenté des valeurs appropriées de K_m (68 et 164 µM) et V_{max} (14 et 4,65 $Units.mL^{-1}$) de laccase de *Trametes hirsuta* Bm-2 pour les deux substrats ABTS et DMP. Selon Asgher et al., (2012), l'enzyme laccase montre des valeurs similaires de V_{max} (780 $Units.mL^{-1}$) et de K_m (73 µM) lorsque le substrat ABTS est utilisé.

Les résultats obtenus indiquent que la laccase de JO-V_2 a montré une activité maximale à 40 °C et un pH de 5,0, ainsi qu'une spécificité de l'activité laccase avec une haute thermo-stabilité d'une demi-vie de 24 heures à 40 °C et une plage de pH stable de 24 heures à un pH de 5,0.

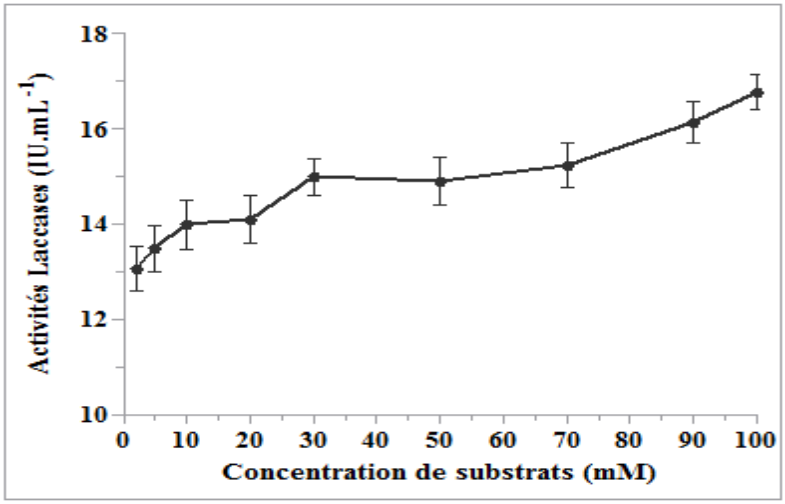


Figure 29: Effet de différentes concentrations de guaïacol sur l'activité laccase de l'endophyte JO-V_2

CONCLUSION

Les enzymes fongiques ont attiré plus d'attention au cours des dernières années et sont utilisés en biotechnologie moderne, principalement les amylases, les cellulases et les laccases qui tolèrent des conditions industrielles difficiles.

Parmi les meilleurs isolats cellulolytiques, *P. africana* JO-A isolé de *Juniperus oxycedrus* présente la grande capacité de produire des cellulases extracellulaires et par hydrolyse élevée de CMCase ($0,206 \pm 0,011$ IU.mL^{-1}) et de FPase ($0,117 \pm 0,015$ IU.mL^{-1}).

L'endophyte ligninolytique JO-V_2 est un meilleur isolat produisant de laccase avec une activité maximale de $2,294 \pm 0,089$ IU.mL^{-1}. L'optimisation des milieux et des conditions de culture pour une activité laccase maximale de $6,66 \pm 0,11$ IU.mL^{-1} a permis d'obtenir 15 g.L^{-1} de glucose, 5 g.L^{-1} de $NaNO_3$, 0,3 g.L^{-1} de $CuSO_4$, peut-être la meilleure condition pour améliorer la production de laccase par JO-V_2, avec un taux d'augmentation supérieur à 100% du rendement de laccase obtenue après optimisation par rapport à la quantité de laccase produite dans des conditions non optimisées.

La caractérisation de l'extrait enzymatique produit par JO-V_2 indique que la laccase est une enzyme thermostable au pH acide (40 °C et 5,0), avec une forte affinité pour le guaiacol.

L'endophyte ligninolytique JO-V_2 est un promoteur industriel à fort potentiel biotechnologique considérable, notamment dans le cadre de programmes de bio-remédiation et de dégradation de la lignocellulose.

Partie 3 : Optimisation de la production de cellulases par *P. africana* JO-A

MATERIELS ET METHODES

I. Matériel biologique

Trois souches de levure ont été utilisées parmi la collection de levures génétiquement identifiées du Laboratoire de Biotechnologie Conservation et Valorisation des Ressources Naturelles (LBCVRN). Les trois souches sont déjà identifiées comme étant *Saccharomyces cerevisiae* YMES2, *Kluyveromyces marxianus* YMEK23 et *Candida tropicalis* YME C24. Ces levures ont été isolées à partir de plusieurs niches : fruits secs (différentes variétés de dattes, raisins secs), fromages et beurre fermenté.

II. Choix du milieu optimum pour la production de l'activité cellulase par *P. africana* JO-A

II.1. Milieux solides

Pour le choix du milieu qui a donné l'activité cellulase maximale de l'endophyte JO-A, trois milieux de culture solides ont été choisis, M. Czapek-Dox (Sri Lakshmi et Narasimha, 2012) et M. Mandels et Weber, (1969) (Annexe 1).

Ces trois milieux ont été inoculés chacun par des fragments (1 cm de diamètre) de mycélium testé. L'incubation a été effectuée à 28 °C ± 2 °C pendant 7 jours.

Après incubation, la production de cellulase a été observée par la présence d'un halo de dégradation jaune qui a été visualisé avec la solution rouge du Congo (1% p/v).

II.2. Milieux liquides

Quatre milieux de culture liquides ont été utilisés pour choisir le milieu optimal pour la production d'activité cellulase par l'endophyte JO-A :

- Les milieux Czapek-Dox, CMC basique et Mandels M. & Weber J. contiennent 0,5% de carboxy-méthylcellulose (CMC)
- Le milieu basique M2 avec 0,5% de papier filtre Whatman N°1 (source de carbone).

Ces différents milieux (100 mL chacun) ont été inoculés chacun avec deux fragments (1 cm de diamètre) de mycélium testé et incubés à 28 °C dans l'obscurité pendant 7 jours.

A partir de chaque milieu, des échantillons ont été prélevés et centrifugés à 12000 rpm à 4 °C pendant 15 min et le surnageant obtenu est utilisé comme enzyme brute pour déterminer les activités enzymatiques cellulases.

III. Effets des différents facteurs sur la production de cellulase par *P. africana* JO-A

La souche *P. africana* JO-A a été sélectionnée pour déterminer l'efficacité de la production de cellulase dans les milieux liquides. L'endophyte JO-A a été cultivé dans 50 mL du milieu de production de cellulase (Annexe 1, M3) et incubé dans l'obscurité sans agitation pendant 7 jours, en présence d'un témoin non inoculé.

La procédure adoptée pour déterminer les conditions de production maximale de cellulases consistait à évaluer l'effet de divers paramètres indépendants en modifiant un facteur à la fois et en gardant les autres constants.

III.1. Concentration de CMC

La tolérance de *P. africana* JO-A à une concentration élevée de substrat a été étudiée en la cultivant à différentes concentrations de CMC allant de 0, 0,5, 1, 2 à 3% (p/v). Après l'inoculation de chaque milieu avec un fragment de mycélium frais (1 cm de diamètre), les cultures ont été incubées à 28 °C pendant 7 jours.

La concentration optimale de CMC trouvée a été adoptée pour l'expérience suivante.

III.2. Diamètre du mycélium fongique

L'influence de la taille du disque de mycélium frais sur la production de l'enzyme cellulase a été évaluée en modifiant le diamètre des fragments de mycélium ajoutés (allant de 0,5 à 10 cm) au milieu M3 (50 mL). Après une culture fraîche de *P. africana* JO-A sur PDA, chaque disque a été coupé avec des tubes de verre stériles de 1 cm de diamètre. Les cultures ont été incubées sans agitation dans l'obscurité à 28 °C pendant 7 jours.

III.3. Concentration de glucose

Par ailleurs, d'autres tests ont été effectués avec les paramètres qui ont donné la meilleure production de cellulase, à savoir le CMC et le diamètre du mycélium. Afin de déterminer l'effet de la concentration initiale de glucose sur la production d'enzymes cellulases par *P. africana.*

A cet effet, des milieux M3 (50 mL chacun) contenant différentes concentrations de glucose (0, 0,1, 1, 2, 3, 4 et 5% (p/v)) et de 0.5 de CMC ont été inoculés séparément avec un disque de mycélium de 1 cm de diamètre. Les milieux M3 ensemencés ont été incubés à 28 °C pendant 7 jours.

III.4. Température d'incubation

Sept températures 28, 30, 35, 37, 40, 45, 50 °C ont été évaluées pour étudier l'influence de la variation de la température d'incubation sur la production de cellulases par l'endophyte *P. africana*, dans des milieux liquides et solides. Les milieux M3 (50 mL chacun) inoculés avec un disque de mycélium de 1 cm de diamètre sont incubés séparément sans agitation pendant 7 jours.

A noter que les aliquotes des cultures testées ont été centrifugées à 12 000 rpm à 4 °C pendant 10 minutes.

Le surnageant a été utilisé pour le dosage des activités CMCase et FPase. Toutes les expériences ont été réalisées en triples et les valeurs moyennes sont présentées avec l'écart-type.

IV. Application de la méthode des surfaces de réponses pour l'optimisation de la production des cellulases par *P. africana* JO-A

La méthodologie de surface de réponse (RMS) est une technique qui combine des méthodes statistiques et mathématiques afin d'optimiser l'effet des variables et leurs interactions. En outre,

elle permet d'évaluer le rapport entre les facteurs expérimentaux prévues et ceux observés, influençant la production d'enzymes (Nagraj et al., 2014 ; Texco-López et al., 2018).

La version du logiciel JMP 7.0.1 a servi à construire les modèles expérimentaux et à effectuer une analyse de la régression. Les paramètres statistiquement significatifs sont déterminés à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA). Les différences ont été considérées comme significatives à p <0,05.

Cette méthode a été utilisée dans notre étude afin d'optimiser l'effet de trois paramètres indépendants et donner leurs interactions qui influencent la production de cellulases par *P. africana*. Ces facteurs ayant un effet positif sur la production maximale de cellulases ont été déterminés par les essais préliminaires mentionnés ci-dessus.

A cet effet, les expériences ont été réalisées en inoculant 50 mL du milieu basique M3 contenant 0,5% de CMC avec un disque de mycélium de 1cm de la souche *P. africana*. L'incubation a été faite dans l'obscurité sans agitation.

Au cours de la fermentation de production de cellulase, des aliquotes ont été prélevées pour déterminer les activités CMCase et FPase.

IV.1. Conception du plan d'expérience pour la production maximale des cellulases

Un plan d'expériences Box-Behnken a été conçu pour étudier l'influence de trois facteurs quantitatifs indépendants, à savoir la température (X_1 : 28, 37 et 46 °C), la concentration en glucose (X_2 : 0,1, 1 et 1,9%) et le temps d'incubation (X_3 : 5, 7 et 9 J).

Ces facteurs ont été étudiés en utilisant une conception factorielle complète de trois niveaux (bas, moyen et haut) de chaque variable expérimentale (Tableau 10), ce qui inclut un total de 15 essais avec 3 répétitions au centre.

Tableau 10: Correspondance entre les valeurs réelles et les valeurs codées

Facteurs	**Valeurs codées**		
	-1	0	1
	Valeurs réelles		
X_1 Température (°C)	28	37	46
X_2 Concentration en glucose (%)	0,1	1	1,9
X_3 Temps d'incubation (J)	5	7	9

La production des activités enzymatiques CMCase (Y_1), FPase (Y_2) et la biomasse (Y_3) sont les variables de réponse. L'équation du modèle mathématique a servi à rapprocher les trois variables significatives :

- Y est la réponse prévue
- X_0 est une constante
- X_1, X_2 et X_3 sont les coefficients linéaires

- X_1^2, X_2^2 et X_3^2 sont les coefficients quadratiques
- X_{12}, X_{13} et X_{23} sont les interactions

Cette équation quadratique a été exprimée en tant que coefficient de détermination (R^2).

IV.2. Cinétique de la production de cellulases par *P. africana* JO-A selon les conditions optimisées de la RMS

Après optimisation des conditions de production maximum de cellulase par *P. africana* JO-A, des cinétiques de la production des enzymes CMCase et FPase et de la biomasse ont été réalisées dans un flacon contenant 300 mL de milieu M3 avec 0,5% de CMC et 1,9% de glucose. Chaque culture a été inoculée avec 6 disques de 1cm de diamètre issus de culture fraiche et incubée sans agitation à 37 °C.

Des aliquotes de 5 mL ont été collectées toutes les 24 heures sans interruption pendant 13 jours.

IV.3. Comparaison de la production de cellulases par les différents endophytes fongiques sélectionnés

Parmi les isolats fongiques qui ont montré une activité cellulase élevée sur le milieu gélosé CMC, cinq souches fongiques ont été sélectionnées et conservées sur un milieu PDA solide à 4°C.

La production des activités enzymatiques CMCase et FPase de ces endophytes fongiques a été comparée avec celle de la souche *P. africana* JO-A.

Le processus de production d'enzymes a été effectué en cultivant chaque endophyte dans 100mL de milieu basique M3 contenant 0,5% de CMC et 1,9% de glucose. Chaque milieu a été inoculé avec des fragments de mycélium de 2 cm de diamètre de l'endophyte testé et incubé sans agitation à 37 °C pendant 9 jours.

Des aliquotes ont été prélevées et centrifugées à 12000 rpm à 4 °C pendant 10 min et le surnageant a été utilisé en tant qu'extrait d'enzyme brute.

IV.4. Fermentation alcoolique du surnageant dans les conditions optimales

Pour ce test, nous avons utilisé le surnageant obtenu dans les conditions optimales données par RMS auquel nous ajouterons des souches afin d'étudier la fermentation alcoolique.

IV.4.1. Culture de levures

Pour effectuer une fermentation alcoolique on a utilisé trois souches de levure *S. cerevisiae*, *K. marxianus* et *C. tropicalis.*

Ces levures ont été pré-cultivées séparément dans 50 mL de milieu YPDA avec 2% de glucose auquel on a ajouté de l'ampicilline à 75 $\mu g.mL^{-1}$. L'incubation a été effectuée à 37 °C dans un incubateur à agitation (UNITRONIC OR, J.P.SELECTA). L'agitation a été faite pendant 18-20 heures à 80 rpm, jusqu'à ce que les cellules de levure aient atteint la phase de croissance exponentielle.

Le même milieu dans une autre série de flacons est ensuite ensemencé de 1 mL de chaque pré-culture déjà préparée. Jusqu'à la phase exponentielle, ces cultures ont été incubées et puis utilisées pour ensemencer les milieux de fermentation.

Des cellules de levure ont été recueillies par une centrifugation à 5000 rpm pendant 10 min, lavées deux fois avec de l'eau distillée stérile et remises en suspension dans une solution de NaCl (0,08%), puis maintenues à 4 °C.

IV.4.2. Conditions de fermentation

300 mL du surnageant de la culture de *P. africana* JO-A obtenu dans des conditions optimisées de la RMS ont été supplémentés par des nutriments (Annexe 1 ; M6) dans des conditions stériles. Auquel on a ajouté séparément des cellules de levure à 10^8 cellules/mL. La concentration d'inoculum a été déterminée par la méthode de comptage direct en utilisant la cellule de Malassez avec une profondeur de 0,2 nm.

Les fermentations ont été réalisées, en conditions anaérobies dans un bain marie agité avec une vitesse de 80 rpm. L'incubation a été faite à 37 °C pendant 82 heures.

Des échantillons ont été prélevés à des intervalles de temps appropriés de 10 heures. Pour déterminer l'utilisation du sucre et la formation du produit, les échantillons prélevés ont été centrifugés à 5000 rpm pendant 5 min à 4 °C.

Toutes les fermentations ont été effectuées en triples et les valeurs moyennes sont indiquées.

V. Caractérisation de l'extrait cellulolytique de *P. africana* JO-A

Le filtrat de l'extrait concentré par la membrane d'ultrafiltration de 30 KDa a été employé en tant qu'enzyme brute pour les études de caractérisation.

V.1. Variation de l'activité cellulolytique en fonction de la température et du pH

La détermination de la température optimale des activités CMCase et FPase dans l'extrait enzymatique a été réalisée entre 20 et 90 °C avec un intervalle de 10 °C en utilisant le tampon acétate de sodium (20 mM, pH 5,0) (Annexe 2).

Bien que l'effet du pH, il a été évalué en incubant l'extrait enzymatique à un pH variant de 2,0 à 9,0, en employant l'acétate de sodium (pH 2,0-6,0), le phosphate de sodium (pH 6,0-7,0) et le Tris-HCl (pH 8,0-9,0) à 50 °C.

V.2. Stabilité thermique de l'activité cellulolytique

La stabilité thermique a été déterminée en mesurant les activités enzymatiques lorsque l'extrait enzymatique a été incubé dans de l'acétate de sodium (20 mM, pH 5,0) à différentes températures (50 °C, 60 °C et 70 °C) et à différents de temps d'incubation.

Chaque échantillon a été effectué en triple et présenté sous forme d'écart-type.

V.3. Activités enzymatiques à différentes concentration de substrat

La variation des activités CMCase et FPase de l'extrait enzymatique en fonction de la concentration du substrat a été évaluée à différentes concentrations de CMC et de morceaux de

papier Whatman utilisés comme substrat cellulolytique. La concentration des substrats utilisés varie entre 5 et 100 $mg.mL^{-1}$.

Ces activités ont été déterminées dans le tampon d'acétate de sodium (20 mM, pH 5,0) à 50°C pendant 30 min. Chaque échantillon a été effectué en trois exemplaires.

Les valeurs des constantes de Michaelis-Menten K_m et V_{max} pour les deux activités cellulases ont été déterminées à des concentrations variables des substrats et calculées à partir du graphique de Lineweaver et Burk (1934).

VI. Hydrolyse et fermentation alcoolique d'hydrolysat

Deux substrats ont été utilisés pour l'hydrolyse enzymatique à une concentration de 1% :

- Substrat cellulosique synthétique
- Et la poudre de peau de figuier non supplémentée (organique)

Deux enzymes sont employées :

- Concentrât cellulolytique de la souche JO-A
- L'enzyme cellulase commerciale (Annexe 2)

Afin de déterminer la digestibilité des enzymes et d'évaluer la production des sucres fermentables.

Deux étapes ont été utilisées : l'hydrolyse enzymatique et la fermentation alcoolique.

VI.1. Hydrolyse enzymatique

Pour produire un hydrolysat enzymatique avec l'enzyme cellulase concentrée de la souche JO-A, une hydrolyse a été réalisée en ajoutant 20 $IU.g^{-1}$ de substrat aux erlenmeyers séparées contenant 300 mL de milieux : M. synthétique (Annexe 1, M4) et M. contenant de la poudre de figuier avec de l'eau distillée. Les deux types de milieux contiennent 1% de substrat.

Le témoin a été effectué en parallèle avec l'enzyme cellulase commerciale (Celluclast 1,5 L). L'enzyme commerciale a été utilisée comme contrôle positif.

Les expériences ont été menées dans les conditions optimales de l'enzyme produite par JO-A et l'enzyme Celluclast (pH 5,0, 50 °C, 80 rpm pendant 24 heures).

Après l'incubation, des échantillons ont été prélevés des deux milieux pour les dosages des sucres réducteurs totaux. Toutes les expériences ont été exécutées en triple.

VI.2. Fermentation alcoolique

Pour l'inoculation des fermentations, des souches de levures ont été cultivées dans le milieu YPD avec 2% de glucose.

La culture de levure a été centrifugée à 5000 rpm pendant 10 min, lavée à l'eau distillée et mise en suspension dans une solution isotonique.

Les essais de fermentation ont été effectués dans des flacons contenant 300 mL de la suspension complète d'hydrolysat de la peau de figuier. Les fermentations ont été démarrées avec une concentration initiale de cellules de levure d'environ 1×10^8 cellules/mL. Les flacons ont été incubés à 37 °C dans un agitateur à 80 rpm, pendant 24 heures pour les trois souches de levure. Seule *K. marxianus* a été testé pour une étude de cinétique en prélevant des échantillons toutes les 8 heures pendant 82 heures.

Pour les trois souches de levure, les analyses des sucres réducteurs, de l'éthanol et de la biomasse ont été effectuées à différents intervalles de temps, après la centrifugation à 5000 rpm pendant 5 min à 4 °C.

VI.3. Méthodes analytiques

VI.3.1. Dosage d'éthanol

L'éthanol est récupéré par un système de distillation (FIBROMAN HT-W, J.P.SELECTA). La concentration d'éthanol est déterminée à l'aide d'un réfractomètre (REFRACTOMETRO DE ABBE) maintenu à 22 °C, en lisant les graduations et en notant l'indice de réfraction (IR).

La teneur en éthanol est estimée à l'aide d'une courbe d'étalonnage de l'éthanol de 0 à 12%.

VI.3.2. Dosage des sucres réducteurs et totaux

La teneur en sucre résiduel total du surnageant de fermentation est mesurée selon la méthode du phénol sulfurique (Dubois et al., 1956).

La méthode du DNS (Miller, 1959) est utilisée pour déterminer la concentration des sucres réducteurs libérés et calculée selon la courbe standard de 0 à 1 µmole de glucose. L'absorbance du mélange est mesurée à 640 nm.

VI.3.3. Détermination de la biomasse sèche des levures

La masse sèche des cellules de levure est quantifiée à l'aide de la méthode gravimétrie. Chaque échantillon de 10 mL est centrifugé à 5000 rpm pendant 10 min à 4 °C et la biomasse de culot cellulaire est lavée deux fois avec de l'eau distillée et séchée à 80 °C jusqu'à ce que le poids se stabilise.

VI.3.4. Détermination de la productivité volumétrique, du rendement et de l'efficacité de la fermentation

Le rendement en éthanol ($Y_{P/S}$) est exprimé en g d'éthanol par g de sucres utilisés (g/g). L'efficacité de fermentation (Ef) et le rendement en éthanol sont calculés sur la base de la concentration d'éthanol produite et de la consommation de sucre.

La productivité volumétrique de l'éthanol (Q_P, $g.L.h^{-1}$) est calculée à partir de la concentration finale de l'éthanol par le temps de fermentation à la concentration d'éthanol la plus élevée, et qui sont calculés selon les formules suivantes (Alencar et al., 2018) :

(1)

$$Y = \frac{E\ tOH\ (g/L)}{S\ (g/L)}$$

(2)

$$Qp = \frac{E\ tOH\ (g/L)}{t\ (h)}$$

(3)

$$Ef = \frac{Y}{0{,}511} \times 100$$

Où E_{tOH} correspond à la concentration en éthanol obtenue, S à la quantité de sucres utilisés, t au temps de fermentation et 0,511 au rendement en éthanol théorique maximale par un gramme de sucres (glucose) consommé.

VII. Analyse statistique

L'étude statistique des données de la RMS a été évaluée à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) et les différences ont été considérées comme significatives à p <0,05 et ont été validé avec le logiciel de JMP 7.0.1.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Choix du milieu d'activité cellulase optimale produite par *P. africana* JO-A

Une comparaison de la production d'activité cellulase par l'endophyte *P. africana* JO-A a été effectuée sur trois milieux solides (Tableau 11). Après la révélation avec la solution rouge de Congo, la production maximale de cellulase a été observée sur le milieu CMC gélosé avec un halo de dégradation jaune de 1,2 ± 0,05 cm et une zone d'activité (ZA) très forte (0,59).

Tableau 11: Comparaison d'activité cellulase (diamètre d'halo, zone d'activité) de l'endophyte JO-A sur les trois milieux basiques

	Croissance fongique (cm)	**Halo d'hydrolyse (cm)**	**Zone d'activité (ZA)**
Milieu CMC	2,96 ± 0,04	1,2 ± 0,05	0,59
M. Czapek-Dox	3,17 ± 0,16	0,9 ± 0,1	0,71
M. Mandels et Weber	3,75 ± 0,05	0,8 ± 0,04	0,78

En comparant avec les deux autres milieux standards M. Czapek-Dox et M. Mandels et Weber, la souche JO-A a présenté des halos d'hydrolyse plus faibles de 0,9 ± 0,1 et 0,8 ± 0,04 cm, respectivement, avec des zones d'activité (ZA) forte (entre 0,71 et 0,78). Ces résultats sont en désaccord avec ceux obtenus par M'barek et al., (2019) qui ont trouvé une activité cellulase plus élevée des endophytes fongiques sur le milieu Czapek-Dox avec de la cellulose microcristalline. Selon les mêmes auteurs, les espèces *Penicillium, Fusarium, Aspergillus,*

Curvularia, *Humicola* et *Trichoderma* ont présenté des niveaux d'activité cellulase intéressants avec des halos d'hydrolyse importants.

Par contre, Sri Lakshmi et Narasimha, (2012) ont signalé des zones maximales d'hydrolyse entre 2,7 et 4,2 cm par l'endophyte cellulolytique *Aspergillus* sp. dans le milieu de Mandels & Weber avec de la carboxyméthylcellulose.

La figure 31 présente l'aspect de culture d'endophyte JO-A sur trois milieux de base liquides durant 7 jours à 28 °C. La sélection du meilleur milieu de production d'activité cellulase parmi les quatre milieux de base liquides testés a monté un maximum d'activités CMCase et FPase dans le milieu CMC basique avec des valeurs respectivement de 0,206 ± 0,011 et 0,117 ± 0,015 $IU.mL^{-1}$.

Cependant, en note que les milieux basiques Czapek-Dox, Mandels et Weber et M. basique P. Whatman présentent, par rapport au milieu CMC basique, un taux de diminution d'activité CMCase dépasse 100%. Tant que la FPase, le taux de diminution est variable (de 18% à 100%) (Figure 30).

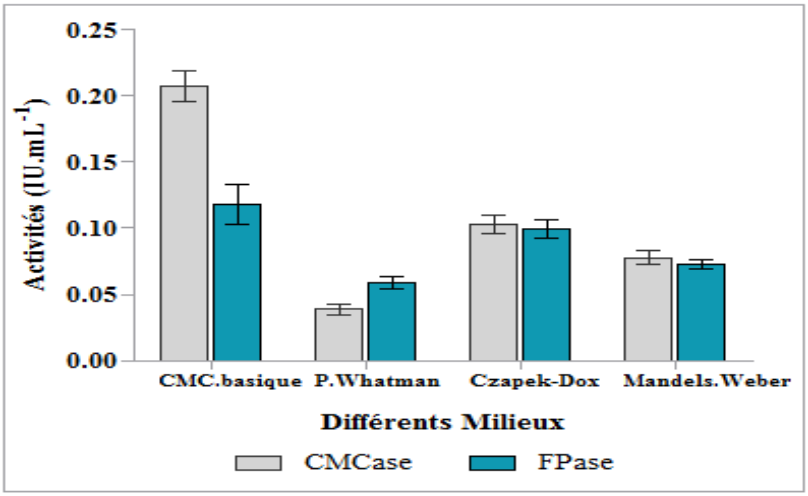


Figure 30: Activités enzymatiques de l'endophyte JO-A sur les quatre milieux basiques

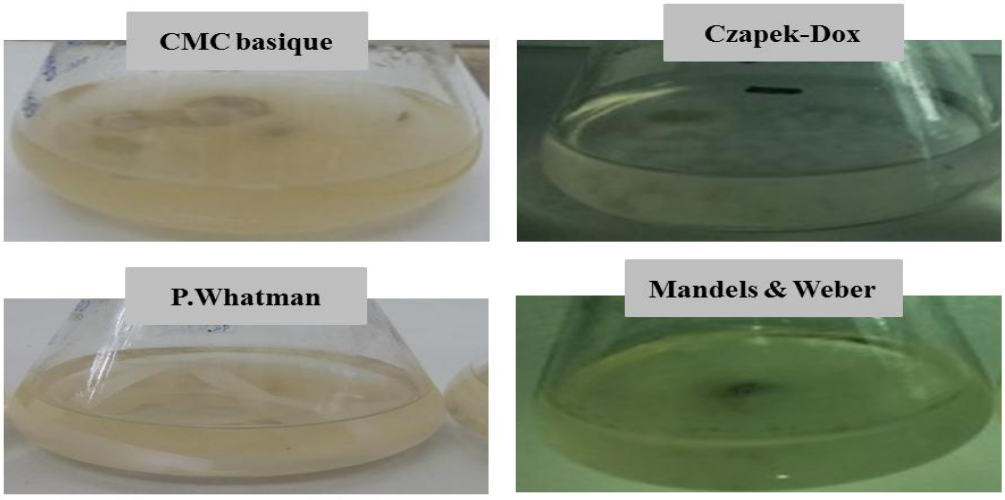


Figure 31: Aspect de culture de *P. africana* JO-A sur les quatre milieux basiques

Ces résultats sont en désaccord avec ceux de Sri Lakshmi et Narasimha, (2012) qui ont rapporté des valeurs d'activité CMCase élevées de 64 $IU.mL^{-1}$ et d'activité FPase de 14,16 $IU.mL^{-1}$ par *Aspergillus* sp. dans le milieu Mandels et Weber avec la carboxyméthylcellulose. Pourtant, l'activité cellulase de *Penicillium oxalicum* a présenté des valeurs élevées d'activités d'endoglucanase (0,496 $IU.mL^{-1}$) et de FPase (0,103 $IU.mL^{-1}$) dans le milieu de fermentation de Mandels et Weber (Shah et al., 2015).

En général, les résultats obtenus dans notre cas ont montré que le milieu CMC basique est considéré comme un milieu avec une production maximale de cellulase par l'endophyte JO-A sur le plan qualitativement et quantitativement (Tableau 11 et Figure 30) et conservé pour des expériences suivantes.

II. Effets des différents facteurs sur la production des cellulases par *P.africana* JO-A

II.1. Concentration de CMC

La production des activités enzymatiques par *P. africana* JO-A diminue lorsque la concentration du substrat dans le milieu augmente. De même, la diminution de la production s'accompagne d'une diminution de la croissance fongique. D'après la figure 32 (A), les concentrations de 0,5 et de 1% de CMC présentent les conditions les plus appropriées pour induire l'optimum d'activité CMCase (0,206 ± 0,004 $IU.mL^{-1}$ et 0,162 ± 0,007 $IU.mL^{-1}$) et FPase (0,117 ± 0,003 $IU.mL^{-1}$ et 0,098 ± 0,004 $IU.mL^{-1}$).

Par ailleurs, l'absence de CMC (0%) a montré une réduction de la production d'enzymes avec un taux de diminution qui dépasse 100% par rapport à la concentration de 0,5 % CMC. De fortes concentrations de CMC peuvent constituer un effet inhibiteur de l'activité et de la croissance fongique.

D'après ces résultats, *P. africana* JO-A utilise la CMC comme substrat pour la croissance et la production de cellulase. Cela concorde avec Shah et al., (2015) qui ont démontré que la production d'enzymes cellulolytiques dépend du substrat présent dans le milieu.

II.2. Diamètre du mycélium fongique

D'après les résultats obtenus, l'activité maximale est obtenue avec un disque de 1 cm de diamètre suivi de 2 cm à des niveaux significativement élevés de CMCase (0,206 ± 0,004 $IU.mL^{-1}$ et 0,169 ± 0,000 $IU.mL^{-1}$) et de FPase (0,117 ± 0,003 $IU.mL^{-1}$ et 0,099 ± 0,006 $IU.mL^{-1}$) par rapport à d'autres concentrations d'inoculum examinées (Figure 32 B). Par contre, les tailles varient de 3 à 10 cm, mais l'activité enzymatique ne varie pas beaucoup et l'activité est comprise entre (0,123 ± 0,001 $IU.mL^{-1}$ et 0,090 ± 0,005 $IU.mL^{-1}$) pour CMCase et (0,088 ± 0,001 $IU.mL^{-1}$ et 0,076 ± 0,005 $IU.mL^{-1}$) pour FPase.

La taille d'inoculum est donc un facteur important qui influe sur la production d'enzyme cellulase et son augmentation agit négativement sur la production de cellulase et se traduit par une augmentation de la biomasse de *P. africana* JO-A. Ces résultats concordent avec ceux de Shah et al., (2015) qui ont montré également que l'augmentation de la quantité d'inoculum s'accompagne d'une augmentation de la biomasse fongique qui s'effectue par le regroupement des cellules, la réduction de l'activité métabolique et la diminution de la production d'enzymes.

Cependant, d'autres travaux montrent que la forte concentration d'inoculum n'affecte pas la production d'enzymes, mais seulement la croissance fongique. Selon Kumar et Kanwar, (2012), une biomasse fongique élevée est responsable, dans des conditions de nutriments limitées, de la réduction de la biosynthèse d'enzymes.

II.3. Concentration de glucose

Selon les résultats obtenus, l'addition de glucose à différentes concentrations dans le milieu de culture augmente la production d'enzymes. Les valeurs les plus élevées de CMCase (1,913 ± 0,045 UI.mL^{-1}) et de FPase (0,885 ± 0,024 UI.mL^{-1}) ont été enregistrées lorsque le milieu a été supplémenté avec 2% (p/v) de glucose (Figure 32 C). Cependant, les résultats montrent une diminution graduelle de la production de cellulase, lorsque la concentration de glucose augmente.

De faibles valeurs d'activités ont été enregistrées aux concentrations de glucose de 0% et de 0,1% (Figure 32 C). Cela indique que la présence de glucose dans le milieu de fermentation a induit la croissance de *P. africana* JO-A et augmenté la production d'enzymes cellulolytiques, dépassant les valeurs d'activité sans optimisation préliminaire.

Nos résultats concordent avec ceux de Cabezas et al., (2012) qui ont également montré une activité CMCase plus élevée de 1,87 UI.mL^{-1} avec l'endophyte *Penicillium glabrum*-2399. D'autres études ont montré, par contre, que c'est le lactose qui permet l'induction de la production de cellulase par les champignons, tels que : *Trichoderma reesei*-RutC-30 et *Aspergillus nidulans* (Tai et al., 2019a).

Dans le cas du glucose ou du lactose, l'augmentation de l'activité cellulase peut s'expliquer, par le fait que les champignons commencent à consommer les sucres simples disponibles au cours des premiers stades de croissance, puis produisent des enzymes hydrolytiques au cours de la deuxième étape pour utiliser des sources de carbone complexes.

Les endophytes tels que *P. africana* JO-A peuvent concurrencer et survivre dans leur environnement en sécrétant des cellulases qui sont capables de décomposer des tissus lignocellulosiques morts permettant à des endophytes de pénétrer dans des cellules végétales vivantes (M'barek et al., 2019).

II.4. Température d'incubation

Selon les résultats obtenus, la production de cellulases augmente légèrement avec l'augmentation de la température de 28 à 37 °C. Les valeurs maximales obtenues à 37 °C pour les activités endoglucanase et la FPase sont de 0,236 ± 0,005 UI.mL^{-1} et 0,129 ± 0,009 UI.mL^{-1}, respectivement (Figure 32 D). En note que, le taux d'augmentation par rapport à des valeurs sans optimisation dépasse 31% et 7,5%, respectivement, pour la CMCase et la FPase. Cependant, peu d'effets sont enregistrés sur les activités enzymatiques lorsque la température atteint 50 °C, où l'on observe que l'activité cellulase est toujours stable.

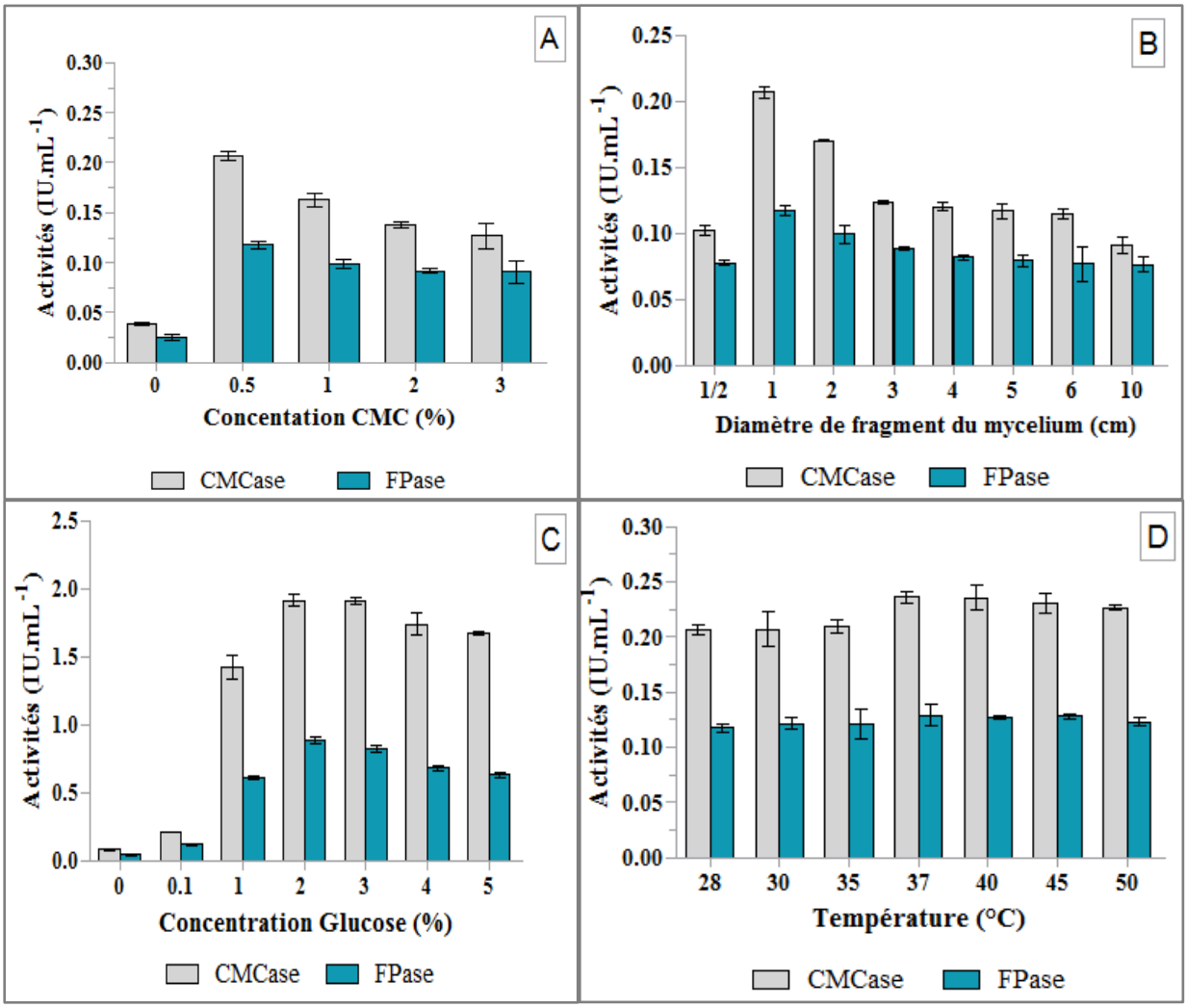


Figure 32: Effet de la concentration de CMC en % p/v (A), diamètre de fragment du mycélium (B), concentration en glucose % p/v (C) et la température (D) sur les activités CMCase et FPase sécrétés par *P. africana* JO-A

Un essai qualitatif a été effectué parallèlement à différentes températures. Les résultats montrent que la croissance maximale de *P. africana* JO-A a été obtenue à 28 °C avec un diamètre de croissance de 2,79 ± 0,04 cm (Tableau 12). A mesure que la température d'incubation augmente, il y a une diminution de la croissance fongique voir même nulle à partir de 40 °C.

L'activité cellulase de *P. africana* JO-A est confirmée par les résultats du test en milieu solide (Tableau 12). Pour le diamètre des zones d'hydrolyse, il est observé une augmentation de l'activité à la température de 28 à 40 °C. L'activité cellulolytique maximale de 2,26 ± 0,15 cm est obtenue pour une température de 37 °C et elle est restée relativement élevée à 40 °C avec un halo de 2,1 ± 0,1 cm de diamètre. Au-delà de 40 °C, on a observé une chute de l'activité cellulase, bien qu'il n'y ait pas eu de croissance fongique.

A partir de ces résultats, on peut conclure que l'intervalle de température idéal pour la croissance de *P. africana* JO-A se situe entre 28 et 37 °C (Tableau 12). En ce qui concerne la production de cellulase, elle persiste bien qu'à des valeurs inférieures à des valeurs élevées de la température (même si aucune croissance n'a été observée). Cette production de cellulase à ces

températures élevées peut s'expliquer par le fait que les cellules fongiques continuent leurs sécrétions et/ ou leur libération passive des cellulases.

La CMCase et la FPase produites par *P. africana* JO-A, pourraient être appliquées dans le processus de saccharification et de fermentation simultanée (SSF) grâce à leurs activités hydrolytiques élevées, entre 28 et 37 °C de température favorable à la plupart des espèces de levures produisant de l'éthanol utilisées dans l'industrie. Ceci rejoint l'idée de Martín-Sampedro et al., (2017a).

En outre, la production de composés chimiques d'intérêt médical par *P. africana* JO-A pourrait être réalisée à l'aide de la biomasse fongique cultivée sur des substrats cellulosiques abordables, ceci réduira considérablement le coût des bioprocédés à l'échelle industrielle. Tel qu'il a été mentionné par Chen et al., (2020).

Au Maroc, très peu d'études sont réalisées sur l'identification des endophytes dégradant la lignocellulose. Seuls M'barek et al., (2019) ont rapporté des résultats similaires en isolant des souches cellulolytiques (*Penicillium* et *Fusarium*) à partir d'échantillons de bois dans la région de Meknès.

A l'échelle internationale, très peu d'espèces du genre *Preussia* ont été exploitées jusqu'à présent. Cependant, Khan-A et al., (2016) ont mentionné l'isolement des endophytes cellulases du genre *Preussia* sp. à partir des tiges et des feuilles de *Boswellia sacra* dans les forêts désertiques d'Oman.

Tableau 12: Effet de la variation de la température sur la croissance fongique et la production de cellulases par *P. africana* JO-A dans un milieu CMC gélosé

Température (°C)	Croissance (cm)	Halo d'hydrolyse (cm)
28	2,79 ± 0,04	1,2 ± 0,05
30	2,75 ± 0,08	1,2 ± 0,1
35	2,71 ± 0,15	1,26 ± 0,05
37	2,13 ± 0,08	2,26 ± 0,15
40	0 ± 0,00	2,1 ± 0,1
45	0 ± 0,00	0,8 ± 0,05
50	0 ± 0,00	0,3 ± 0,02

Notre étude est la première à signaler l'isolement et l'identification d'un endophyte de valeur industrielle provenant des tiges fraiches de la plante endémique *Juniperus oxycedrus*.

L'isolement de l'endophyte *P. africana* JO-A et l'étude de sa production de cellulase feront l'objet de recherches plus approfondies (L'optimisation statistique de la production de cellulase par *P. africana* JO-A, voir le paragraphe suivant). Les propriétés des enzymes CMCase et FPase dans cette étude sont très remarquables et permettent leur application dans différentes approches

biotechnologiques, en particulier, pour la bioconversion de la biomasse lignocellulosique en sucres fermentables pour la production de bioéthanol et d'autres produits chimiques à forte valeur ajoutée. Cette bioconversion utilisant les enzymes de *P. africana* JO-A fait l'objet de la partie 4 : Production de bioéthanol à partir du figuier de barbarie sous SHF.

III. Optimisation de la production des cellulases par *P. africana* JO-A par la méthode des surfaces de réponses

La RMS est une technique expérimentale utilisée pour optimiser divers processus d'hydrolyse enzymatique et pour améliorer la production et les rendements des produits hydrolytiques (Chen-L et al., 2019 ; Jeya et al., 2010 ; Zhang et Jia, 2018).

III.1. Résultats de la régression des modèles adoptés

Selon les résultats de l'optimisation préliminaire de la caractérisation de cellulases, la température (X_1), la quantité de glucose (X_2) et le temps d'incubation (X_3) ont été choisis en tant que facteurs indépendants avec trois niveaux significatifs. Cela permettra de concevoir des expériences de conception RMS établies par Box – Behnken et d'optimiser les conditions de production maximale d'enzymes cellulolytiques et de la biomasse par *P. africana* JO-A.

Jusqu'à présent, aucune étude n'a pas été réalisée sur l'optimisation statistique par la RMS de la production de cellulase par l'espèce *P. africana* JO-A. Peu de rapports sont disponibles sur l'optimisation de la production d'enzymes hydrolytiques par les endophytes fongiques avec la RMS. L'optimisation statistique de la production des cellulases et des enzymes ligninolytiques par d'autres espèces telles que *Trichoderma* sp. a été réalisée uniquement par Gao et al., (2013) et Zabin et al., (2017).

Au total, 15 combinaisons différentes ont été obtenues avec les valeurs de réponse (Tableau 13). Ce tableau montre qu'à une température de 37 °C, à une concentration de glucose de 1,9% et à 9 jours d'incubation, il y a un maximum de 2,042 $IU.mL^{-1}$ de l'activité endoglucanase (essai numéro 8).

La production maximale de FPase a été obtenue dans les mêmes conditions que l'activité CMCase, cependant, avec une différence dans le temps d'incubation, qu'il est le 5ème jour avec une valeur maximale de 0,809 $IU.mL^{-1}$.

En ce qui concerne la biomasse fongique, la valeur maximale enregistrée est de 3,182 $g.L^{-1}$ avec l'essai numéro 2.

Les résultats obtenus peuvent conclure que, la plupart des champignons dans les premiers stades de croissance consomment des sucres simples et produisent des enzymes hydrolytiques en dégradant des sources complexes de carbone lors de la deuxième étape.

La production maximale des activités cellulases a été obtenue avec une quantité élevée de glucose dans le milieu (Tableau 13). Ceci peut être dû à l'induction de la production d'enzymes quand l'endophyte *P. africana* JO-A a cultivé avec une source simple et complexe de carbone dans le milieu de culture.

De même, de Almeida et al., (2011) ont rapporté des résultats similaires avec le monosaccharide D-xylose comme inducteur de l'activité FPase dans la culture d'*A. fumigatus* et d'*Acremonium* sp. avec une valeur de 0,55 $U.mL^{-1}$ pour 8 jours. Cependant, d'autres études ont montré que la synthèse des cellulases par les espèces *Trichoderma rees*ei-RutC-30 et *Aspergillus nidulans* est induit par le lactose présent dans le milieu de culture (Tai et al., 2019).

La marge de température idéale pour la croissance et la production d'enzymes par *P. africana* JO-A s'étend de 28 °C à 37 °C et il garde une activité cellulolytique plus élevée même à 45 °C (tableau 13). A 46 °C, la production des deux enzymes de *P. africana* JO-A montre un léger déclin par rapport au niveau de production maximal à 37 °C. Tel que signalé par Sandhu et al., (2012) et Oberoi et al., (2014), cela pourrait être dû à la dénaturation thermique des cellulases ou à la production de métabolites toxiques dans le milieu et même, à une limitation des nutriments.

Nos résultats concordent avec ceux de Tai et al., (2019) qui ont montré que les souches fongiques (telles qu'*Aspergille wentii, Aspergillus niger*, *Penicellium rubrum*) gardent les activités cellulases entre 50 et 65 °C, avec une croissance optimale entre 25 et 30 °C. D'autre part, selon Shah et al., (2015), une température supérieure à 28 °C inhibe l'activité de la cellulase chez les espèces fongiques, ce qui est contradictoire avec les résultats de cette optimisation.

En revanche, Gautam et al., (2011) ont rapporté que les souches fongiques *Aspergille* et *Trichoderma* utilisent diverses températures pour la production de cellulases extracellulaires et suggèrent que la température optimale pour la production d'enzymes cellulolytiques dépend de la souche elle-même. Les conditions du biotope initial de *P. africana* JO-A (région d'Ifrane) constituent les conditions environnementales favorisant le développement des espèces cellulolytiques.

Toutefois, la production d'endoglucanase par JO-A est supérieure à celle indiquée par da Silva Ribeiro et al., (2018), qui ont montré une valeur maximale de 1,6 $IU.mL^{-1}$ d'endoglucanase produite par l'endophyte *Diaporthe anacardii* isolée des feuilles de *Pachystachys lutea.* Cependant, les études Khan-A et al., (2016), ont signalé que des espèces *Preussia* sp. isolées de *Boswellia sacra,* sécrétaient des concentrations de cellulase allant de 0,66 à 2,21 $IU.mL^{-1}$. Cela concorde avec Liang et al., (2015) qui ont rapporté que l'endophyte *Preussia* sp. a sécrétait des valeurs maximales d'enzymes cellulases et d'amylases dans le milieu extracellulaire. Cabezas et al., (2012) ont rapporté que la recherche de nouveaux enzymes hydrolytiques provenant d'endophytes fongiques pour améliorer la production de bioéthanol à l'échelle industrielle à attirer un grand intérêt ces dernières décennies.

L'optimisation statistique par la RMS des conditions de production de la cellulase indique que *P. africana* JO-A semble être un endophyte mésophile cellulolytique industriellement promoteur, puisqu'il se développe et produit des cellulases à 37 °C.

Tableau 13: Matrice de la conception RMS - Box - Behnken avec les variables significatives affectant la production des activités et de la biomasse à partir de *P. africana* JO-A, avec des valeurs expérimentales et prévues des réponses

N° Expérience	Facteur X1 : Température (°C)	Facteur X2 : Quantité de Glucose (%)	Facteur X3 : Temps d'incubation (J)	Réponse Y1 : Activité CMCase ($IU.mL^{-1}$)		Réponse Y2 : Activité FPase ($IU.mL^{-1}$)		Réponse Y3 : Biomasse ($g.L^{-1}$)	
				Observé	Prévu	Observé	Prévu	Observé	Prévu
1	28	0,1	7	0,207	0,134	0,105	0,102	2,200	2,172
2	28	1,9	7	1,586	1,636	0,796	0,797	3,182	3,175
3	46	0,1	7	0,232	0,181	0,110	0,108	1,793	1,800
4	46	1,9	7	1,772	1,844	0,768	0,770	2,263	2,291
5	37	0,1	5	0,224	0,306	0,112	0,111	2,136	2,118
6	37	0,1	9	0,231	0,271	0,101	0,105	2,290	2,328
7	37	1,9	5	1,823	1,782	0,809	0,804	2,916	2,877
8	37	1,9	9	2,042	1,959	0,768	0,768	3,046	3,063
9	28	1	5	1,255	1,245	0,655	0,657	2,422	2,467
10	46	1	5	1,424	1,392	0,636	0,637	1,902	1,912
11	28	1	9	1,304	1,335	0,629	0,627	2,748	2,737
12	46	1	9	1,434	1,443	0,628	0,625	2,082	2,036
13	37	1	7	1,451	1,419	0,670	0,664	2,474	2,482
14	37	1	7	1,424	1,419	0,670	0,664	2,404	2,482
15	37	1	7	1,383	1,419	0,654	0,664	2,569	2,482

III.2. Validation statistique des modèles et l'étude des effets des facteurs

Les résultats de cette analyse statistique assemblés en équations polynomiales quadratiques de réponses. Les équations de prédiction sont les suivantes:

$$\mathbf{Y_1 = 1{,}41 + 0{,}791\ X_2 - 0{,}372\ X_2^2 + \mathcal{E}}$$

$$\mathbf{Y_2 = 0{,}664 + 0{,}339\ X_2 - 0{,}010\ X_3 - 0{,}015\ X_1^2 - 0{,}204\ X_2^2 - 0{,}012\ X_3^2 + \mathcal{E}}$$

$$\mathbf{Y_3 = 2{,}482 - 0{,}314\ X_1 + 0{,}373\ X_2 + 0{,}098\ X_3 - 0{,}128\ X_1 X_2 - 0{,}215\ X_1^2 + 0{,}092\ X_2^2 + \mathcal{E}}$$

Où :

- Y_1 : Réponses de la production d'enzymes CMCase
- Y_2 : Réponses de la production d'enzymes FPase
- Y_3 : Réponses de la production de biomasse de *P. africana* JO-A
- X_1, X_2 et X_3 : Valeurs codées de variables indépendantes

Les analyses de régression des trois modèles ont montré que des effets significatifs sont obtenus pour les termes de coefficients linéaires (X_1, X_2 et X_3), coefficients quadratiques (X_1^2, X_2^2 et X_3^2) et les termes d'interaction (X_1 et X_2) sur la production d'activités et de biomasse ($P < 0{,}05$) (Tableau 15). Chacun de ces modèles statistiques permet d'examiner et de classer les résultats, s'ils sont différents d'une manière significative ou non.

Le rapport *F* présente une valeur de 84,435 (à $P < 0,0001$), de 2492,02 (à $P < 0,0001$) et de 54,419 (à $P = 0,0002$), respectivement, pour la CMCase, la FPase et de la biomasse fongique (Tableau 14). Les trois modèles sont statistiquement hautement significatifs ($P < 0,01$) avec un intervalle de confiance maximal de 99,99%. Cela confirme la quasi-totalité de la variabilité des données qui peuvent être décrites en termes d'effets significatifs.

Les valeurs de *P* pour le manque d'ajustement des trois modèles CMCase, FPase et de biomasse fongique présentent des valeurs de 0,0937, 0,8437, 0,7384, respectivement (Tableau 14). Ceci indique que ces modèles quadratiques sont incorporés adéquatement dans les données. Les valeurs de *F* des trois modèles validés montrent que la probabilité de manque d'ajustement n'est pas statistiquement significative.

Après la concordance et la signification maximale des trois modèles, ceux-ci ont traité en utilisant le coefficient de détermination (R^2). Pour les trois réponses, les valeurs de R^2 ont montré que les modèles empiriques concordaient mieux avec les valeurs réelles. Les R^2 des modèles CMCase, FPase et de la biomasse fongique calculés pour être, respectivement, de 0,9934, 0,999 et 0,9898. Ceci montre que 99% et 98% de la variabilité des réponses pourrait être expliquée par les modèles.

Tel que mentionné par Texco-López et al., (2018), ces coefficients de corrélation (R^2) supérieurs à 0,8 permettent aux modèles d'expliquer les variabilités observées. En revanche, selon Moon et al., (2011), les valeurs de R^2 des trois modèles varient de 0,75 à 1, avec des niveaux de précision élevés pour prévoir les variables les plus adaptées au processus de production. Avec ces trois modèles fiables et validés, les variables significatives et leurs interactions ont été déterminé afin de maximiser le taux de production de cellulase et de biomasse (Tableau 13 et Figure 35).

Les valeurs de R^2_{aju} des trois modèles sont pour l'activité CMCase de 0,9816, pour l'activité FPase de 0,999 et pour la biomasse fongique de 0,9717. Ceci suggère que la variation des réponses attribuées aux variables indépendantes et seulement 0,01 à 0,03 de la variation totale n'a pas pu être expliquée par les modèles avec une corrélation maximale entre les valeurs quasi observées et les valeurs prédites (Figure 33).

L'importance relative de l'impact des paramètres et leur signification sur la production des activités enzymatiques et de la biomasse fongique est dans l'ordre suivant (Tableau 15 et Figure 34) :

- Pour CMCase : Seulement la quantité de glucose
- Pour FPase : La quantité de glucose et le temps d'incubation
- Pour la biomasse fongique : La température, la quantité de glucose et le temps d'incubation

Les valeurs $P < 0,05$ indiquent que les termes de ces trois modèles sont significatifs. Les valeurs négatives des coefficients X_1, X_3, X_1^2, X_2^2, X_3^2, X_{12} signalent que la production d'activités et de biomasse ont étudié en des points autres que le point optimal.

A l'issue de nos résultats statistiques, ces modèles pourraient être utilisés pour prédire la production d'activités et de biomasse à partir de *P. africana* JO-A.

La modélisation et l'optimisation des facteurs qui affectent la production de CMCase, de FPase et de la biomasse fongique déterminés à l'aide du RMS - Box - Behnken. La quantité de glucose, la température et le temps d'incubation sont les principaux paramètres influençant la production enzymatique et la biomasse par *P. africana* JO-A (tableaux 13, 14, 15).

Tableau 14: Analyse de variance des expériences statistiques conçoit pour les modèles de régression pour la production de cellulases et de la biomasse pour le modèle Box – Behnken

Réponse/ Y	Source de variance	Somme des carrées	Degré de liberté	Carré moyen	Rapport F	*p-value*	
Activité CMCase							
	Modèle	5,6135	9	0,6237	84,435	<0,0001	** significatif
	Résidus	0,0369	5	0,0073			
	Manque d'ajustement	0,0345	3	0,0115	9,8378	0,0937	non significatif
	Erreur pure	0,0023	2	0,0011			
	R^2	0,9934					
	R^2_{aju}	0,9816					
Activité FPase							
	Modèle	1,0765	9	0,1196	2492,02	<0,0001	** significatif
	Résidus	0,0002	5	0,00004			
	Manque d'ajustement	0,00006	3	0,00002	0,2705	0,8437	non significatif
	Erreur pure	0,00017	2	0,00008			
	R^2	0,999					
	R^2_{aju}	0,999					
Biomasse							
	Modèle	2,2735	9	0,2526	54,419	0,0002	** significatif
	Résidus	0,0232	5	0,0046			
	Manque d'ajustement	0,0094	3	0,0031	0,4607	0,7384	non significatif
	Erreur pure	0,0137	2	0,0068			
	R^2	0,9898					
	R^2_{aju}	0,9717					

Note : ** (fortement significatif), $p < 0.01$

Tableau 15: Effets des coefficients des modèles statistiques reliant la production de cellulases et de la biomasse aux trois facteurs

Réponse/Y	Terme	Coefficient	Ecart-type	Rapport t	Prob.	
Activité CMCase						
	Constante	1,4193	0,0496	28,60	<0,0001	** significatif
	X_1	0,0637	0,0303	2,10	0,0900	
	X_2	0,7911	0,0303	26,04	<0,0001	** significatif
	X_3	0,0356	0,0303	1,17	0,2939	
	X_{12}	0,0402	0,0429	0,94	0,3919	
	X_{13}	-0,0097	0,0429	-0,23	0,8295	
	X_{23}	0,053	0,0429	1,23	0,2723	
	X_1^2	-0,0979	0,0447	-2,19	0,0802	
	X_2^2	-0,3721	0,0447	-8,32	0,0004	** significatif
	X_3^2	0,0328	0,0447	0,73	0,4959	
Activité FPase						
	Constante	0,6646	0,0040	166,02	<0,0001	** significatif
	X_1	-0,0053	0,0024	-2,19	0,0799	
	X_2	0,3391	0,0024	138,33	<0,0001	**significatif
	X_3	-0,0107	0,0024	-4,38	0,0071	**significatif
	X_{12}	-0,0082	0,0034	-2,38	0,0632	
	X_{13}	0,0045	0,0034	1,30	0,2510	
	X_{23}	-0,0075	0,0034	-2,16	0,0829	
	X_1^2	-0,0152	0,0036	-4,21	0,0084	**significatif
	X_2^2	-0,2047	0,0036	-56,73	<0,0001	**significatif
	X_3^2	-0,0124	0,0036	-3,45	0,0182	*significatif
Biomasse						
	Constante	2,4823	0,0393	63,11	<0,0001	**significatif
	X_1	-0,314	0,0240	-13,04	<0,0001	**significatif
	X_2	0,3735	0,0240	15,51	<0,0001	**significatif
	X_3	0,0987	0,0240	4,10	0,0094	**significatif

X_{12}	-0,128	0,0340	-3,76	0,0132	*significatif
X_{13}	-0,0365	0,0340	-1,07	0,3329	
X_{23}	-0,006	0,0340	-0,18	0,8671	
X_1^2	-0,2156	0,0354	-6,08	0,0017	**significatif
X_2^2	0,0928	0,0354	2,62	0,0472	*significatif
X_3^2	0,0218	0,0354	0,62	0,5650	

Note : ** (fortement significatif), P < 0,01 ; * (significatif), 0,01 < P < 0,05.

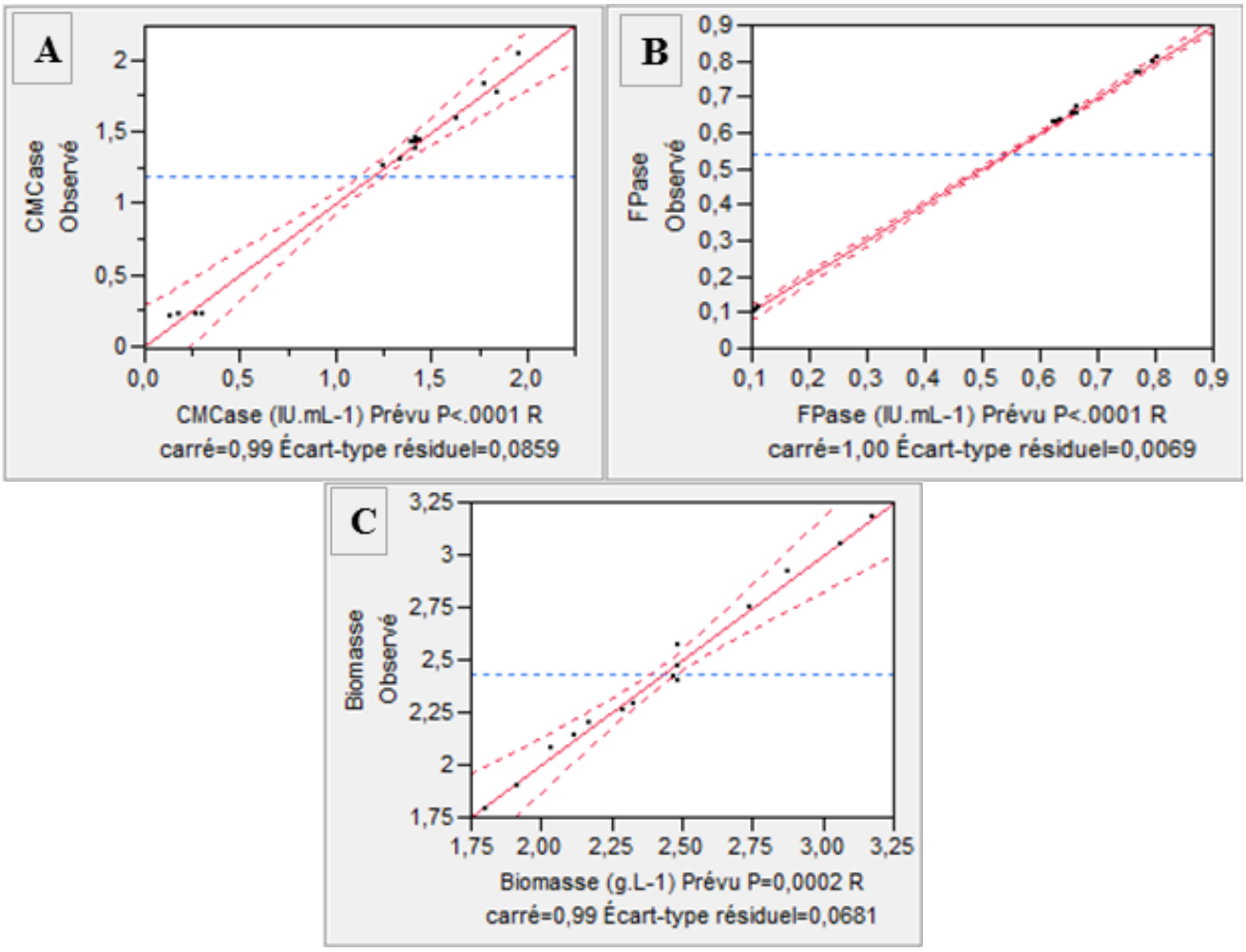


Figure 33: Graphiques des modèles de régression avec les valeurs observées et prévues pour la production des acticités CMCase (A), FPase (B) et la production de la biomasse sèche (C) par *P. africana* JO-A

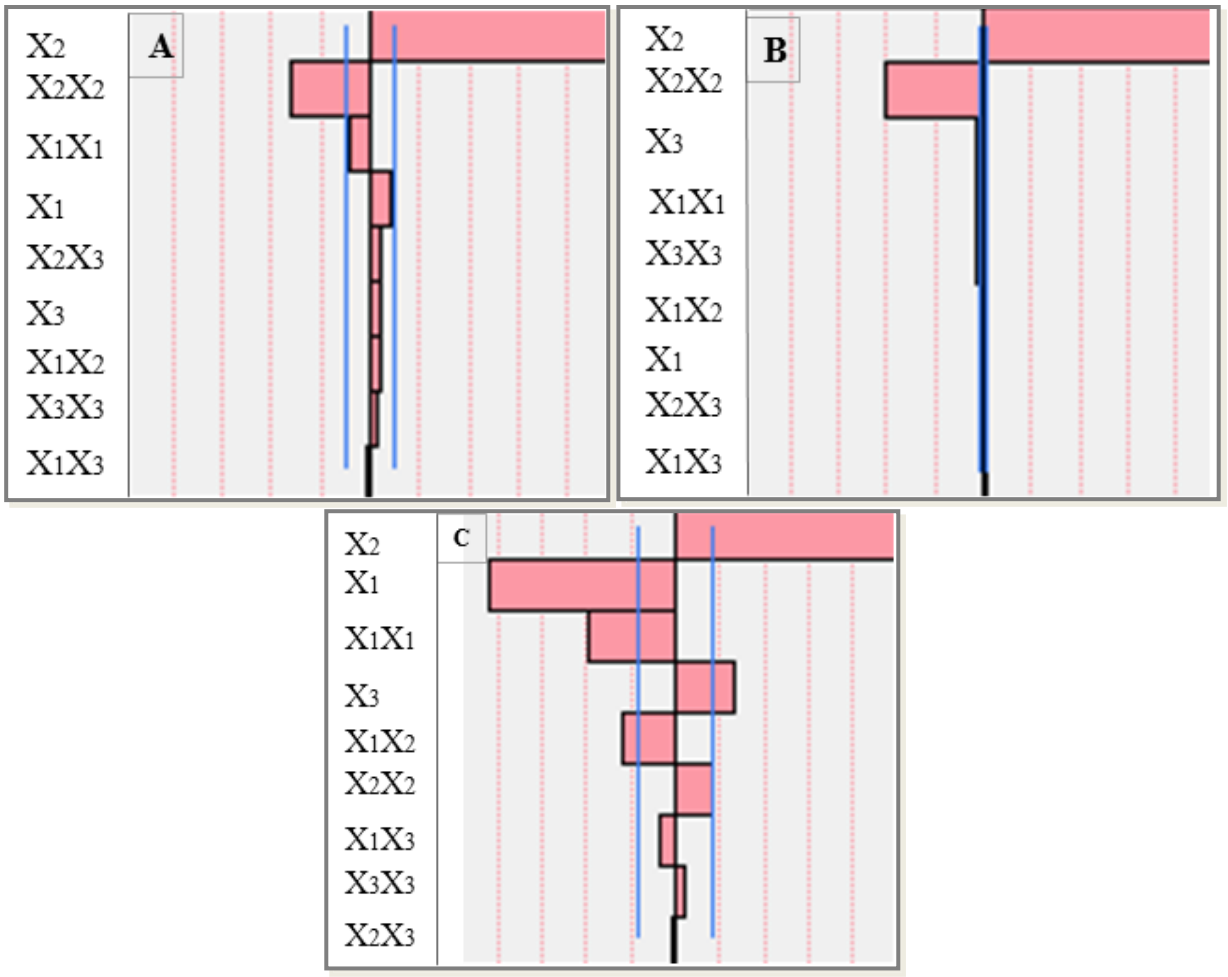


Figure 34: Classification des effets des coefficients des modèles statistiques et leurs interactions reliant la production de cellulases (A), (B) et la production de biomasse de *P. africana* JO-A (C) aux trois facteurs. X 1 : Température, X 2 : Quantité de glucose et X_3 : Temps d'incubation

III.3. Représentation en surfaces de réponses

Les trois équations ont donné des modèles appropriés pour les surfaces de réponses (Figure 35). Un diagramme de surface de réponse est établi par rapport à l'interaction entre deux variables en gardant l'autre variable à un niveau modéré (0).

La production d'activités enzymatiques et de biomasse augmente avec l'addition de glucose dans le milieu de culture. Une augmentation de la quantité de glucose en maintenant tous les autres facteurs constants entraine une augmentation de la production des activités et de biomasse. Mais, avec une quantité de glucose plus élevée, l'interaction entre le temps d'incubation et la quantité de glucose réduit l'effet de la production de l'activité FPase, mais ne peut pas la diminuer complètement (Figure 35 B). Au contraire, pour l'activité CMCase, cette interaction a entrainé une production maximale de 2,042 $IU.mL^{-1}$ (Figure 35 A). La température d'incubation n'a aucun effet négatif (non significatif) sur la production d'enzymes.

Pourtant, la production d'activité FPase diminue lorsque le temps d'incubation augmente à une température intermédiaire de 37 °C. La production maximale est de 0,768 $IU.mL^{-1}$ pour une température de 37 °C à 9 jours tout en maintenant la quantité de glucose à 1,9% (Figure 35 E).

En outre, une augmentation du temps d'incubation en maintenant tous les autres facteurs constants provoque une diminution de la production d'activité FPase.

En revanche, l'activité CMCase augmente en prolongeant le temps d'incubation (Figure 35 D). Lorsque la température augmente de 37 °C, la production des activités enzymatiques CMCase et FPase atteint également des valeurs maximales. Une augmentation supplémentaire de la température à 46 °C conduit à garder les valeurs des activités CMCase et FPase plus ou moins stables avec des valeurs de CMCase et FPase de 1,772 $IU.mL^{-1}$ et 0,768 $IU.mL^{-1}$, respectivement, à 7 jours d'incubation. Ceci suggère que l'activité des enzymes reste stable à des températures élevées avec l'interaction d'une quantité élevée de glucose présent dans le milieu de culture.

A une température de 28 °C et 1,9% de glucose, la production maximale de biomasse est de 3,182 $g.L^{-1}$ (Figure 35 F). Cette interaction est significative pour la biomasse. Lorsque la concentration de glucose dans le milieu augmente, la quantité de biomasse augmente également avec des températures intermédiaires de 28 à 37 °C. Cependant, l'augmentation de la quantité de glucose à haute température (46 °C) a conduit à une faible production de biomasse. L'augmentation de la quantité de glucose et du temps d'incubation avec une température allant de 28 à 37 °C a mené à une plus grande quantité de biomasse. En revanche, à des températures supérieures à 37 °C, la production de biomasse a diminué (Figure 35 C, F).

L'augmentation de la quantité de glucose, avec le maintien de tous les autres facteurs constants, a amélioré la production de biomasse. Pour une concentration de glucose de 1,9 % et 9 jours d'incubation, la biomasse produite présente une valeur de 3,046 $g.L^{-1}$, lorsque la température est fixée à 37 °C. La production de la biomasse fongique surveillée sur une période de 5 à 9 jours a montré que la quantité de biomasse augmente avec le temps d'incubation. Une augmentation de 0,1 à 1,9% du glucose à toute période d'incubation a augmenté la production de biomasse fongique (Figure 35 C).

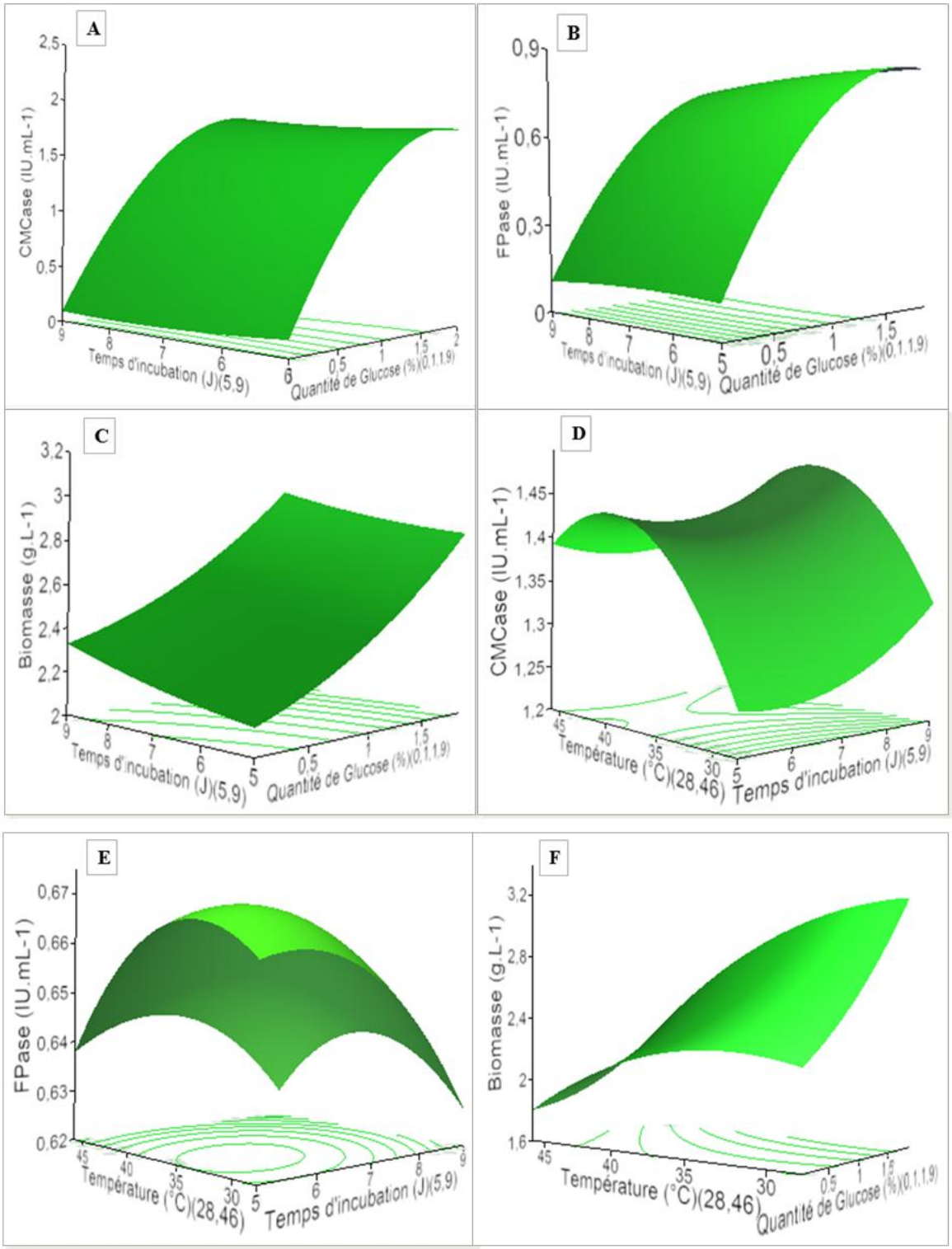


Figure 35: Tracés tridimensionnelle de surface de réponse montrant l'effet de l'interaction de différents paramètres.

- **Interaction de la quantité de glucose et du temps d'incubation sur la production de l'activité CMCase (A), l'activité FPase (B) et la biomasse fongique (C)**
- **Interaction de la température et du temps d'incubation sur la production de la CMCase (D), la FPase (E)**
- **Interaction de la température et de la quantité de glucose sur la production de la biomasse de *P. africana* JO-A (F)**

Le taux de production maximal des activités CMCase, FPase et de biomasse a prévu à 1,925 ± 0,163 IU.mL^{-1}, 0,778 ± 0,013 IU.mL^{-1}, 3,048 ± 0,129 g.L^{-1}, respectivement, en utilisant la quantité de glucose 1,9%, la température de 37 °C et le temps d'incubation de 9 jours, avec la même désirabilité de 87% (Figure 36). La validation du modèle expérimental est effectuée avec un essai de confirmation en trois exemplaires, réalisé par la culture de *P. africana* JO-A, en utilisant les paramètres optimaux identifiés ci-dessus. La confirmation a montré des valeurs similaires à celles des expériences.

Cependant, les données traitées statistiquement par le plan Box-Behnken (RMS) confirment les résultats précédents obtenus par l'optimisation préliminaire de différents paramètres. Les valeurs de productions moyennes obtenues dans les conditions optimisées par RMS sont augmentées avec un taux dépasse 100% pour les deux activités CMCase et FPase et d'un taux d'augmentation de 48% pour la biomasse, par rapport à ceux obtenus dans les conditions initiales non optimisées. Tous ces facteurs optimisés ont augmenté la synthèse des enzymes cellulolytiques pendant la croissance de *P. africana* JO-A sur un substrat cellulosique. Ceci pourrait constituer un moyen efficace de réduire les coûts des processus de prétraitement des biomasses lignocellulosiques à l'échelle industrielle. Tel qu'il est mentionné par Chen et al., (2020).

La présence étude de l'optimisation par la RMS a suggéré que la production d'une quantité optimale d'enzymes cellulolytiques peut être atteinte à une température intermédiaire et à une quantité élevée de glucose ajouté une durée d'incubation appropriée. Cela a permet d'augmenter l'efficacité de la production d'enzymes cellulosiques chez *P. africana* JO-A.

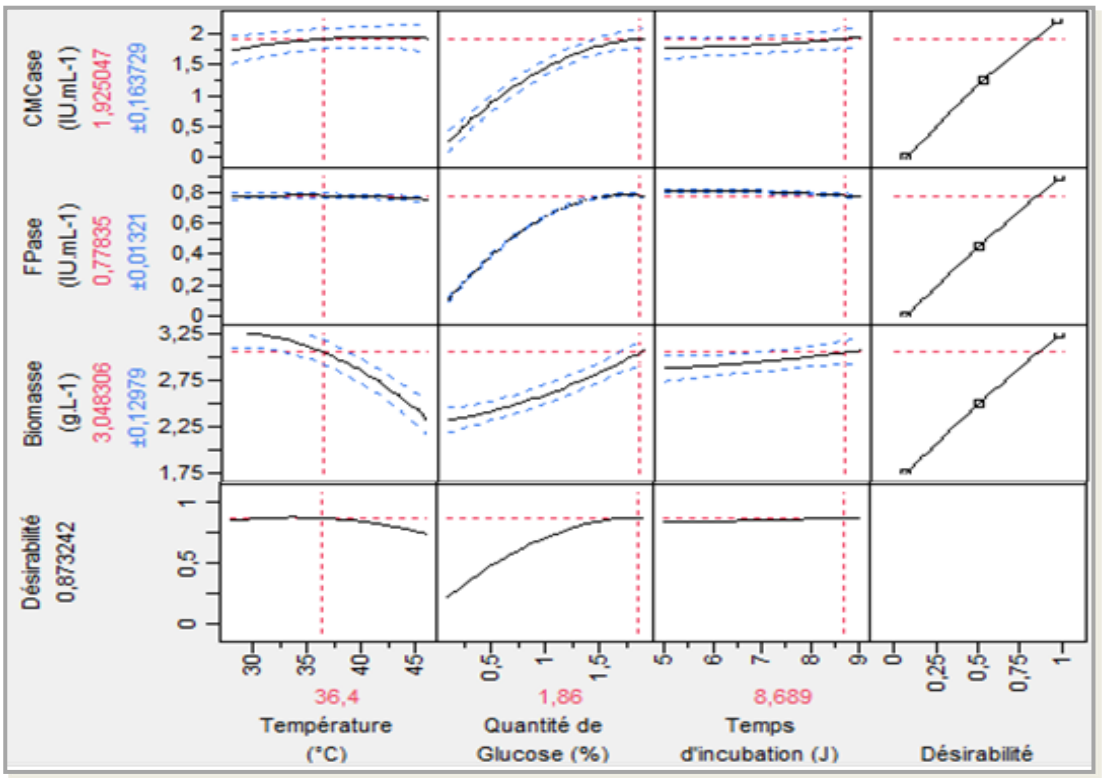


Figure 36: Profil multiple de désirabilité des conditions optimales de la production des cellulases et de biomasse fongique

III.4. Cinétique de la production des enzymes cellulolytiques par *P. africana* JO-A

L'étude de la cinétique de la production d'enzymes cellulolytiques par *P. africana* JO-A a été réalisée selon les conditions optimales de la RMS.

Les activités enzymatiques et la biomasse augmentent exponentiellement du 1ère jour au 4ème jour pour atteindre une phase stationnaire du 5ème au 10ème jour. Un léger déclin est noté les 12 et 13ème jours (Figure 37). Les plus grandes quantités d'activités CMCase (2,013 ± 0,002 IU.mL^{-1}) et FPase (0,811 ± 0,016 IU.mL^{-1}) sont produites pendant 9 et 5ème jours, respectivement. Tandis que, la production maximale de la biomasse est signalée le 7ème jour de la culture avec une valeur maximale de 3,002 ± 0,002 g.L^{-1}. L'activité spécifique est enregistrée avec des valeurs de 12,25 IU.mg^{-1} et 4,94 IU.mg^{-1}, respectivement, pour l'endoglucanase le 9ème jour de l'incubation et pour l'activité FPase le 5ème jour dans les conditions optimales de *P. africana* JO-A.

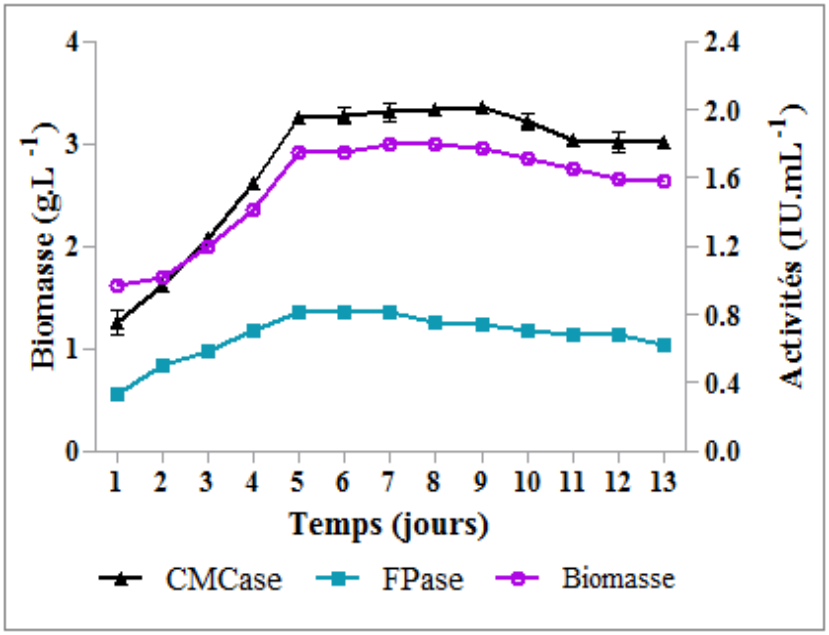


Figure 37: Cinétique des activités CMCase et FPase et la biomasse dans le milieu de culture de *P. africana* JO-A développé dans les conditions optimisées de la RMS

Le maximum des activités enzymatiques et de biomasse fongique sont produites pendant 5 à 9 jours, lorsque la souche *P. africana* JO-A est en phase stationnaire. Tel qu'il y a été signalé par Lee et al., (2018). Cependant, de Castro et al., (2010) ont rapporté que la quantité détectable d'enzymes produites par les moisissures seulement après 72 heures de croissance. Après 11 jours d'incubation, on note que les activités enzymatiques de *P. africana* JO-A ont diminué. Ceci pourrait être dû à la production de métabolites toxiques au cours de la culture, ou bien à l'hydrolyse des cellulases par les protéases sécrétées.

En outre, selon Cabezas et al., (2012) la caractérisation de la cinétique donne une idée de l'interaction de l'enzyme avec leur substrat. Pourtant, le temps d'incubation adapté est un facteur important pour la souche fongique et son attachement au substrat, cela peut affecter la production d'enzymes hydrolytiques et la libération de sucres fermentescibles. Comme indiqué par Tai et al., (2019b).

III.5. Comparaison de la production des cellulases par les différents endophytes sélectionnés

En utilisant les conditions optimisées prédéterminées par la RMS, la production des enzymes cellulases par la souche JO-A a été améliorée à des valeurs élevées de la CMCase (2,013 ± 0,002 IU.mL^{-1}) et de la FPase (0,745 ± 0,009 IU.mL^{-1}). Cependant, pour les cinq endophytes, les activités enzymatiques (CMCase et FPase) sont significativement plus élevées que la production d'enzymes dans des conditions normales avec un taux d'augmentation dépassant 100%. Bien qu'une augmentation légèrement significative ait été détectée des activités CMCase et FPase des endophytes testés, par rapport à la quantité d'enzymes endo et exoglucanase produite par la souche JO-A dans les mêmes conditions.

Les endophytes JO-M et JO-I sont les souches les plus adaptées pour produire des activités enzymatiques dans les mêmes conditions optimisées de la souche JO-A avec des valeurs de la CMCase (0,791 ± 0,126 et 0,684 ± 0,098 IU.mL^{-1}) et la FPase (0,616 ± 0,104 et 0,568 ± 0,045 IU.mL^{-1}) enregistrées pour les endophytes JO-M et JO-I, respectivement (Figure 38). Ces résultats confirment que l'optimisation des paramètres de la production d'enzymes est spécifique à chaque espèce étudiée séparément.

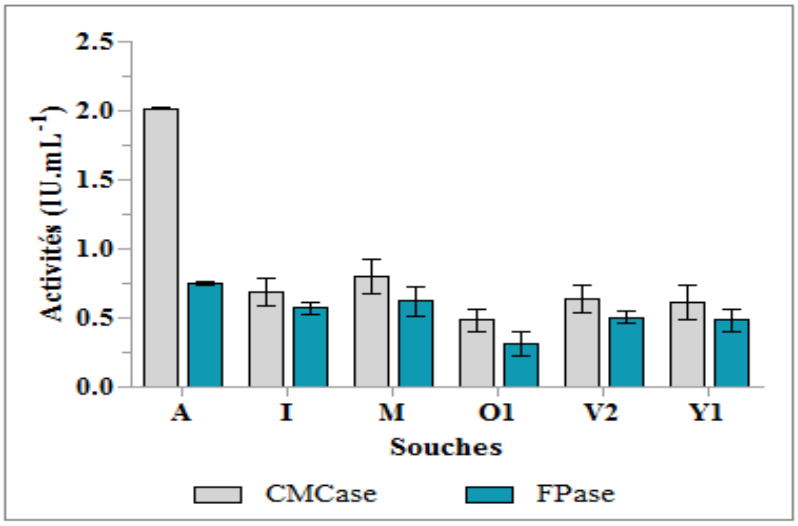


Figure 38: Production d'activités cellulases par différents endophytes dans les conditions optimisées (RMS) de *P. africana* JO-A

La production élevée de FPase de 0,745 ± 0,009 IU.mL^{-1} par *P. africana* JO-A pourrait être un indicateur d'une haute capacité de la dégradation des composés cellulosiques spécifiquement les composants de la paroi cellulaire, comme un critère de survie dans son environnement. Cela concorde avec l'étude de M'barek et al., (2019) qui ont rapporté que les souches *Penicillium* et *Fusarium*, isolées des échantillons de bois dans la région de Meknès, ont de meilleurs potentiels cellulolytiques qui leur permet de pénétrer les cellules vivantes et de dégrader les tissus lignocellulosiques morts.

Ces résultats indiquent que *P. africana* JO-A est un endophyte cellulolytique promoteur dans le domaine industriel qui offre un potentiel biotechnologique à mesure qu'il croit et produit des cellulases à 37 °C. Cela permet de concevoir un nouveau procédé de dégradation de la biomasse

lignocellulosique lors de la production de biocarburant de deuxième génération à haute température.

III.6. Evaluation de la production d'éthanol et de biomasse

La dynamique de la production d'éthanol à partir du surnageant de *P. africana* JO-A dans des conditions de la RMS contenant 23 $g.L^{-1}$ de sucres réducteurs totaux est illustrée dans la figure 39. Cette fermentation concerne les souches de levure suivantes : *S. cerevisiae*, *K. marxianus* et *C. tropicalis*. Elle a été effectuée à différentes périodes d'incubation de 0 à 80 heures, afin d'évaluer l'effet du temps d'incubation sur la production d'éthanol à 37 °C.

Les résultats indiquent que la teneur en éthanol dépend de la concentration des sucres présents initialement dans le surnageant de la fermentation et du temps de la fermentation.

On constate que la teneur en sucre diminue rapidement avec le temps de fermentation de 0 à 24 heures pour les trois souches après l'inoculation. En revanche, la teneur en éthanol augmente graduellement avec le temps de fermentation avec un maximum de production à 14 heures de fermentation pour *S. cerevisiae* et *C. tropicalis* et à 24 heures pour la souche *K. marxianus*, en maintenant un niveau élevé d'éthanol jusqu'au dernier stade de la fermentation.

Après la fermentation, la teneur en éthanol la plus élevée est de 7,4 ± 0,740, 8,88 ± 0,00 et 5,92 ± 0,740 $g.L^{-1}$, respectivement par *S. cerevisiae, K. marxianus* et *C. tropicalis* (Figure 39 et Tableau 16). Ces maximums peuvent être dus à la disponibilité de nutriments, spécifiquement les sucres et la facilité de leur utilisation par les souches de levure dès le début de la fermentation, tel qu'il a été signalé par Chen et al., (2014). Pour *S. cerevisiae* et *C. tropicalis*, la forte teneur en éthanol est obtenue avec un temps de fermentation inférieur à celui utilisé par la souche *K. marxianus.*

En comparant les souches entre elles, on constate que, *K. marxianus* montre la production la plus élevée d'éthanol avec une concentration de 8,88 ± 0,00 $g.L^{-1}$ pendant 24 heures de fermentation. Par contre, le taux de production d'éthanol par la souche *C. tropicalis* (5,92 ± 0,740 $g.L^{-1}$) est inférieur à celui de *S. cerevisiae* et de *K. marxianus* pendant 82 heures de fermentation.

Pourtant, Mattam et al., (2016) ont rapporté que la souche *Candida tropicalis* MTCC 25057 était capable de convertir une quantité de sucres fermentescibles présents dans l'hydrolysat en éthanol d'une valeur de 4,5 $g.L^{-1}$ au cours des 24 premières heures à 32 °C. Une augmentation du temps d'incubation a entrainé une diminution de la production d'éthanol. Ceci pourrait être dû à l'épuisement des aliments et à la production d'autres sous-produits dans le milieu de fermentation (Haq et al., 2006 ; El-Bondkly Ahmed et El-Gendy Mervat, 2011).

La valeur maximale de la biomasse sèche a été obtenue avec *C. tropicalis* avec une concentration de 3,01 ± 0,740 $g.L^{-1}$ pendant 38 heures. La souche *K. marxianus* a montré la meilleure performance pour la production d'éthanol avec une productivité de 0,37 $g.L.h^{-1}$ et un rendement en éthanol de 0,39 $g.g^{-1}$ et une efficacité de fermentation supérieure à 77% à 37 °C. Une légère diminution de l'efficacité est observée avec la souche *S. cerevisiae* avec une valeur de 64% (Tableau 16).

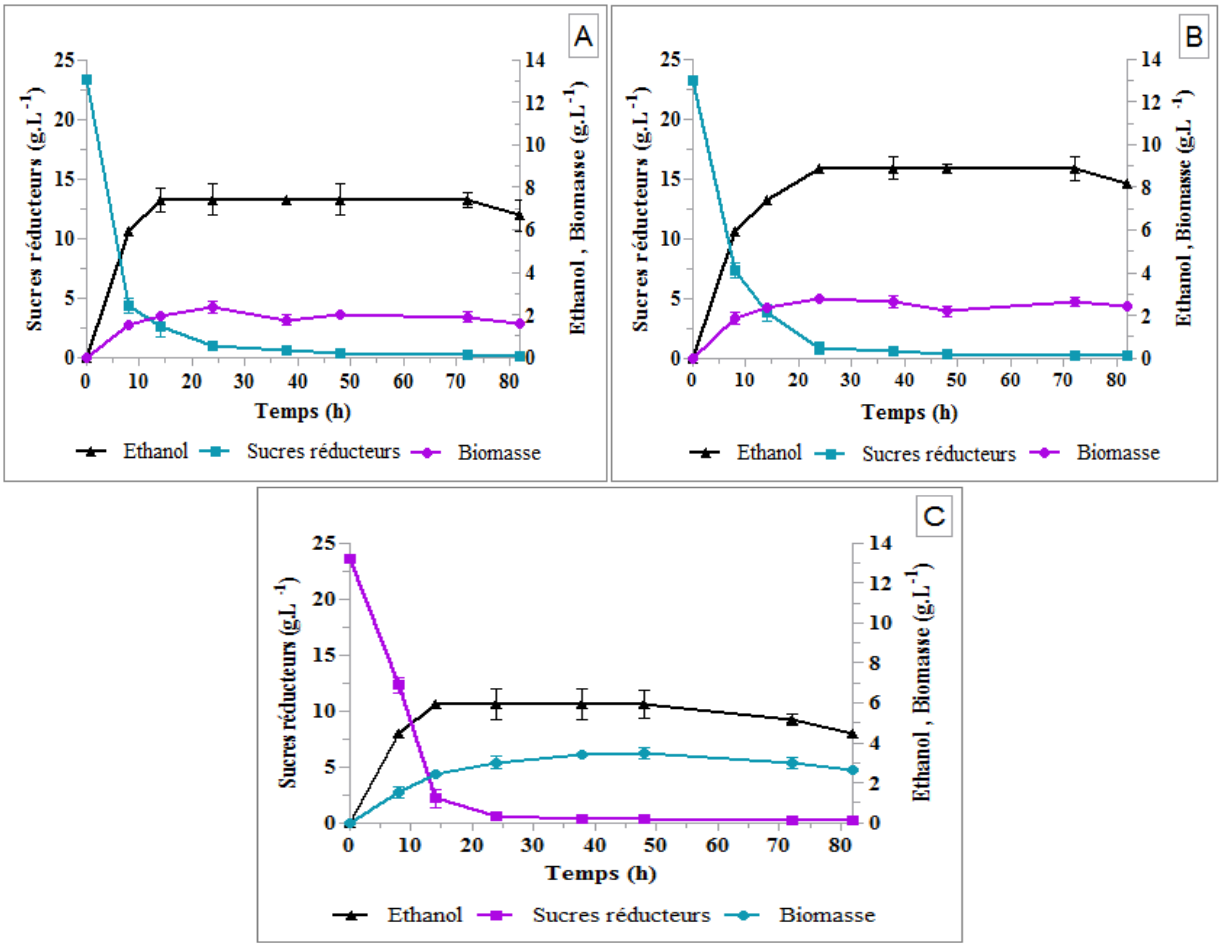


Figure 39: Profil de la production d'éthanol par les trois souches de levures : (A) *S. cerevisiae* ; (B) *K. marxianus* et (C) *C. tropicalis*, à partir du surnageant de la culture de *P. africana* JO-A dans les conditions de la RMS à 37 °C

Tableau 16: Potentiel de production de bioéthanol des trois souches de levures avec le surnageant de production de *P. africana* JO-A dans les conditions optimisées à 37 °C

Paramètres	***S. cerevisiae***	***K. marxianus***	***C. tropicalis***
Sucres résiduels g.L^{-1}	0,977 ± 0,077	0,873 ± 0,485	0,644 ± 0,098
Ethanol g.L^{-1}	7,406 ± 0,740	8,888 ± 0,000	5,925 ± 0,740
Biomasse sèche g.L^{-1}	2,348 ± 0,288	2,809 ± 0,008	3,019 ± 0,285
Q_p d'éthanol g.L.h^{-1}	0,308	0,370	0,246
Qp biomasse g.L.h^{-1}	0,097	0,117	0,125
Rendement en éthanol sur les sucres utilisés g.g^{-1}	0,330	0,398	0,258
Rendement en biomasse sur les sucres utilisés g.g^{-1}	0,104	0,126	0,131
Efficacité de fermentation %	64,57	77,88	50,48

IV. Caractérisation de l'extrait cellulolytique de *P. africana* JO-A

IV.1. Effet du pH sur l'activité cellulolytique

Les deux activités enzymatiques produites par l'endophyte *P. africana* JO-A ont présenté des valeurs élevées dans une marge de pH allant de 4,0 à 7,0. A pH 4,0, les enzymes ont maintenue 76 et 66% de leurs activités originales, respectivement, pour la CMCase et la FPase, en indiquant ainsi, une nature plus au moins acidophile des enzymes. Ainsi, la production maximale des deux enzymes est détectée à un pH de 5,0 avec CMC comme substrat (Figure 40 A). L'activité CMCase a conservé une valeur relativement moyenne à un pH alcalin en maintenant 37% de son activité à un pH de 8,0. Pour la FPase, on observe une baisse significative de l'activité à pH ≥ 8,0 avec seulement 21% d'activité d'une valeur de 0,42 ± 0,00 $IU.mL^{-1}$ à pH 9,0, le niveau d'activité diminue en fonction de l'alcalinité du milieu réactionnel.

Le surnageant récupéré contenant l'extrait hydrolytique produit par *P. africana* JO-A a été concentré dans une membrane ultrafiltration. La concentration en membrane est l'une des méthodes de bio-séparation qui diffère de la technique de purification, elle facilite l'élimination des composés et des sels de faible poids moléculaire et libère des sites actifs pour une catalyse efficace, généralement utilisée en bio-traitement (Sharma et al., 2014). Les méthodes de bio-séparation demandent jusqu'à 60% des coûts totaux de la production industrielle (Corrêa et al., 2014). La concentration en membrane est moins coûteuse et permet l'acquisition d'enzymes qui ne nécessitent pas de purification supplémentaire pour dégrader le substrat, constituant ainsi une propriété rentable à l'échelle industrielle (Chen et al., 2020). Dans cette étude, les valeurs de la CMCase (4,00 ± 0,03 $IU.mL^{-1}$) et la FPase (1,92 ± 0,015 $IU.mL^{-1}$) de *P. africana* JO-A ont été doublées dans des conditions optimales (50 °C, pH 5,0).

Les enzymes de *P. africana* JO-A ont montré une activité optimale au pH similaire à celui obtenu par Ang et al., (2013) et Li et al., (2018), dont la FPase d'*Aspergillus fumigates* et l'AgCMCase GH5 d*'Aspergillus glaucus* CCHA ont une activité élevée à pH 5,0. De même, les cellulases de *Melanocarpus* sp. sont acidophiles et actives entre un pH de 4,0 à 6,0 avec une activité optimale à pH 5,0 (Sharma et al., 2014). Alors que la cellulase d'*Aspergillus niger* présente une activité optimale à pH 4,0 (Sulyman et al., 2020). De même, l'enzyme PdCel5C sécrétée par *Penicillium decumbens* possède une activité maximale à pH 4,8 (Liu et al., 2013).

Sur la bases des résultats obtenus, les enzymes cellulolytiques de *P. africana* JO-A ont démontré leur capacité à maintenir jusqu'à 66 - 76% de leurs activités enzymatiques initiales à pH 4,0, ceci permet leur utilisation dans le processus de bioconversion de la biomasse lignocellulosique nécessitant l'utilisation de cellulases acides notamment lorsque la biomasse a subi un traitement acide.

IV.2. Effet de la température sur l'activité cellulolytique

Selon les résultats obtenus, les enzymes sont actives à des températures variant de 30 à 70 °C (Figure 40 B). Environ 72% d'activité CMCase et 66% d'activité FPase ont été détectés à la température de 30 °C. La température optimale pour les enzymes CMCase et FPase est de 50 °C avec des valeurs d'activité maximales de 4,00 ± 0,03 $IU.mL^{-1}$ et 1,92 ± 0,015 $IU.mL^{-1}$,

respectivement. Pour les enzymes CMCase et FPase sont restés plus élevés à des températures supérieures à 50 °C, en maintenant les activités élevés à 70 °C avec des valeurs moyennes de 2,91 ± 0,11 IU.mL^{-1} pour la CMCase et de 1,14 ± 0,00 IU.mL^{-1} pour la FPase. Cependant, à des températures supérieures à 70 °C, l'activité des deux enzymes a diminué de façon importante. De même, ils ont gardé environ 25 et 20% d'activité CMCase et de 26 et 19% d'activité FPase, respectivement, à 80 °C et à 90 °C. Ceci indique une forte dénaturation ou inactivation des enzymes à hautes températures.

En plus du pH, les enzymes de *P. africana* JO-A ont montré une activité importante à une température ambiante de 30 à 37 °C, cette forte activité hydrolytique à basse température pourrait être appliquée de façon rentable au processus de saccharification et de fermentation simultanée. Cela concorde avec l'étude de Almeida et al., (2011) qui a révélé que la FPase d'*Acremonium* sp. EA0810 a plus de 70% de son activité maximale entre 30 et 40 °C, même si la température optimale est de 55 °C, avec une activité endoglucanase élevée et un profil de pH semblable à celui de *P. africana* JO-A. Aussi, l'étude récente de Batista et al., (2022) a montré des résultats similaires pour l'endophyte fongique *Colletotrichum* sp. S1 isolé de tiges de palmiers açai, elle a une forte activité cellulase à 35 °C au pH 5,0. Pourtant, Delabona et al., (2012) et Ang et al., (2013) ont mentionné que la plupart des endoglucanases sécrétées par les champignons ont des optimums d'activités généralement entre 50 et 60 °C.

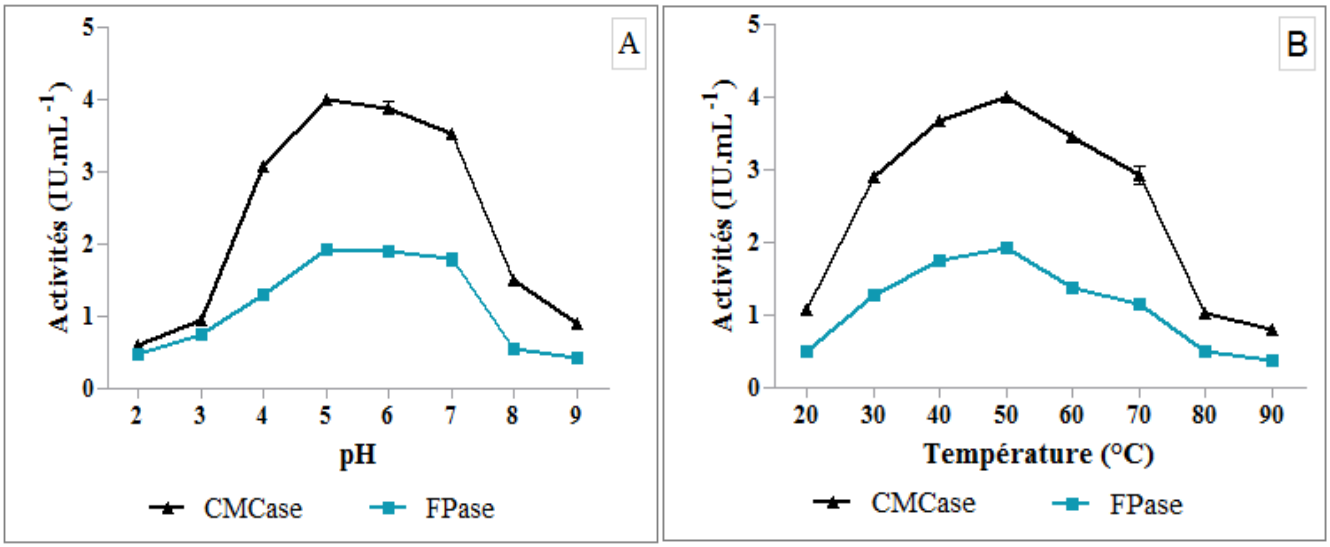


Figure 40: Effet du pH (A) et de la température (B) sur les deux activités cellulolytiques de *P. africana* JO-A

IV.3. Etude de la stabilité thermique de l'activité cellulolytique

Sur la base des résultats obtenus, l'étude de thermostabilité de la CMCase et la FPase a démontré que les enzymes sont stables pendant 240 minutes à 50 °C sans aucune perte d'activité (Figure 41 A, B). Bien que, les CMCase et FPase ont gardé respectivement plus de 66 et 63% de leur activité cellulolytique initiales à 60 °C pendant 240 minutes. Cependant, à 70 °C il y a une perte moyenne d'activité des deux enzymes après 240 minutes d'incubation, ce qui peut être dû à une exposition prolongée à des températures élevées. La demi-vie pour CMCase et FPase est respectivement de 4 et 3 heures à 70 °C (Figure 41 A, B).

Le test de stabilité thermique à 50 °C a montré que les enzymes cellulolytiques de *P. africana* JO-A sont thermostables et ont des activités même lorsqu'elles sont exposées à leur température optimale pendant une longue période (Figure 41 C). Aucun changement dans l'activité CMCase n'a été détecté après 360 minutes d'exposition à 50 °C. Ainsi, pour l'activité FPase, un léger changement est observé après 360 minutes d'incubation avec une valeur de 1,53 ± 0,04 $IU.mL^{-1}$. De plus, les CMCase et FPase ont maintenu respectivement 51 et 43% de leurs activités initiales, même après 24 heures d'incubation à 50 °C et cette diminution des activités sont due à la perte de la stabilité enzymatique. La demi-vie des deux enzymes est de 24 heures à leur température optimale de 50 °C.

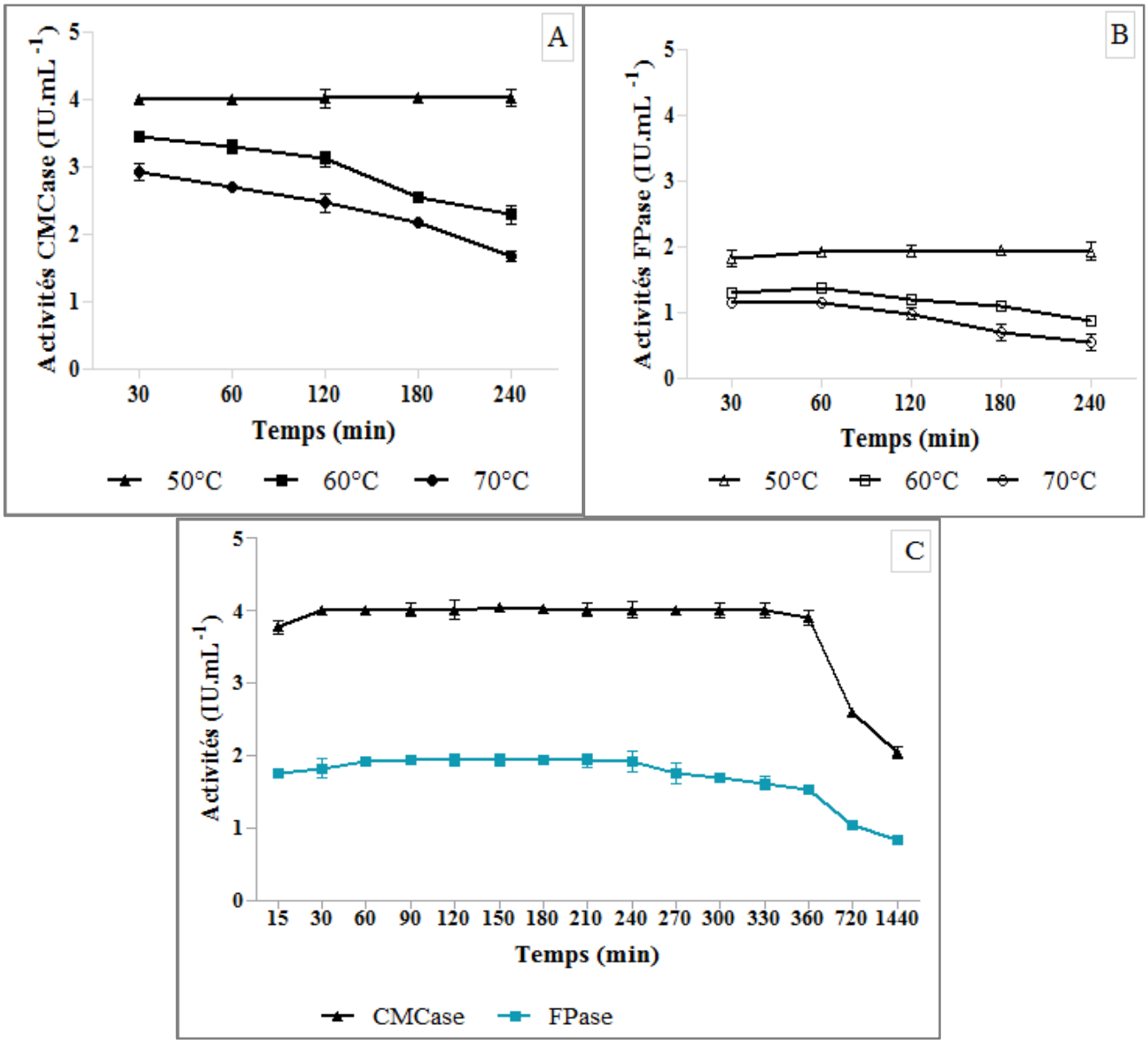


Figure 41: Thermostabilité des deux activités cellulolytiques de *P. africana* JO-A à 50 °C, 60°C, 70 °C pour divers périodes d'incubation (A et B). (C) Thermostabilité de CMCase et FPase à la température et pH optimums (50 °C, pH 5.0) à différents temps d'incubation

Selon les études de Sharma et al., (2014), la température optimale pour l'activité endoglucanase d'*Aspergillus terreus* RWY et la thermostabilité de l'activité FPase se sont

révélées être de 50 °C. Pourtant, selon les mêmes auteurs, les enzymes thermostables fongiques de *Thermoascus aurantiacus, Sporotrichum thermophile, Corynascus thermophilus* sont stables et actives à des températures supérieures à 60 °C, au-dessus de leur température optimale de croissance de 30 à 55 °C. Ceci est similaire à nos résultats, dont *P. africana* JO-A a montré une production optimale à 50 °C, maintenant les activités CMCase et FPase stables et actives à 70 °C (2,91 ± 0,11 $IU.mL^{-1}$, 1,14 ± 0,00 $IU.mL^{-1}$).

Le tableau 17 compare les diverses études sur le pH et la température optimaux des cellulases de *P. africana* JO-A et d'autres cellulases fongiques. Saroj et al., (2018) ont isolé un champignon thermophile *Aspergillus fumigatus* JCM10253 qui a montré une thermostabilité de la cellulase avec une activité optimale à 60 °C et 50 °C pour l'activité FPase (Tableau 17). En revanche, d'autres travaux sur la cellulase d'*A. fumigatus* ont indiqué une perte d'activité de 10 à 40% durant 1 heure d'incubation à 60 °C (Delabona et al., 2012 ; Ang et al., 2013). Pourtant, faible stabilité à des températures élevées pour l'AgCMCase *d'Aspergillus glaucus*, conservant 60% de son activité initiale à 70 °C pendant 4 heures d'incubation (Li et al., 2018).

La stabilité des enzymes de *P. africana* JO-A à des températures variant de 50 à 70 °C pendant une demi-vie de 24 heures à 50 °C est essentielle pour accroître la productivité pendant l'hydrolyse enzymatique. En effet, ces enzymes peuvent être recommandées dans le processus d'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique afin d'augmenter l'efficacité de la saccharification de la cellulose qui nécessite une température élevée (Nigam, 2013). En améliorant ainsi, la solubilité du substrat, la libération de sucres réducteurs et l'augmentation du taux de la réaction enzymatique, avec une relation significative entre le coût et le rendement (Li et al., 2018). Par conséquent, l'utilisation de cellulases robustes sécrétées par des endophytes fongiques est une alternative intéressante dans les domaines des conversions biocatalytiques industrielles (Zarafeta et al., 2016).

L'activité spécifique de l'endoglucanase de *P. africana* JO-A a enregistré une valeur de 16,94 $IU.mg^{-1}$ similaire à celle de Cellulase Cel28a (20,56 $IU.mg^{-1}$), mentionnée par Cheng et al., (2016) dans les mêmes conditions optimales (50 °C, pH 5,0) avec 1% de CMC.

Dans cette étude, le mésophile *P. africana* JO-A a produit des cellulases thermostables acidophiles à forte activité dans une plage de pH et de température extrêmes. Ces conditions sont très recommandées dans les procédés industriels à haute température, notamment dans l'industrie des biocarburants pour une fermentation simple et peu coûteuse (Chen et al., 2019), en sélectionnant un producteur extrêmement efficace d'enzymes hydrolytiques dirigé vers la production commerciale. Ces endophytes fongiques isolés de substrats lignocellulosiques frais sont des sources prometteuses d'enzymes utilisées dans les transformations biotechnologiques et les prétraitements biologiques des résidus lignocellulosiques (Batista et al., 2022).

Tableau 17: Comparaison de l'optimum de pH et de la température de cellulases *P. africana* JO-A et d'autres cellulases fongiques

	pH optimal	Température optimale (°C)	Références
Cellulase *Preussia africana* JO-A	5.0	50	Cette étude
Endoglucanase EG1 *Actinomyces* sp.	6.0	55	Kim et al. (2015)
Cellulase *Aspergillus niger*	4.0	40	Sulyman et al. (2020)
Cellulase *Cel28a*-Grm	5.0	50	Cheng et al. (2016)
Endoglucanase EG5C *Paenibacillus* sp.	5.0	40	Dhar et al. (2015)
Endoglucanase AcCel12B-*Acidothermus cellulolyticus*	4.5	70	Wang et al. (2015)
Endoglucanase *Aspergillus niger* VTCC-F021	5.0	55	Pham et al. (2012)
Cellulase CrCel *Crassostrea rivularis*	5.5	40	An et al. (2015)
Cellulase CelDZ1 *Thermoanaerobacterium* sp.	5.0	70	Zarafeta et al. (2016)
CMCase *Aspergillus fumigatus* JCM 10253	-	60	Saroj et al. (2018)
FPase *Aspergillus fumigatus* JCM 10253	-	50	

IV.4. Effet de la concentration du substrat sur les activités cellulases

Deux composées, papier filtre et CMC, sont utilisés comme substrats à des concentrations de 100 mg.mL^{-1} pour étudier l'effet de la concentration de substrat sur l'activité de l'extrait enzymatique cellulase.

Selon les résultats obtenus, les activités enzymatiques augmentent avec l'augmentation du substrat et atteignent un taux élevé de dégradation de 5,14 ± 0,15 IU.mL^{-1} et 2,68 ± 0,17 IU.mL^{-1}, respectivement pour la CMCase et la FPase (Figure 42).

Les paramètres des cinétiques enzymatiques (K_m et V_{max}) ont été mesurés dans la solution tampon d'acétate de sodium de 20 mM à pH 5,0 et à 50 °C pendant 30 min. A partir des graphiques linéaires de l'équation de Michaelis-Menten, les K_m et V_{max} des cellulases de *P. africana* JO-A ont été calculés. Les valeurs de K_m et V_{max} sont de 2,7 mg.CMC.mL^{-1} et 4,88 IU.mL^{-1} pour la CMCase et 31,9 mg.papier.mL^{-1} et 3,332 IU.mL^{-1} pour la FPase, respectivement

et qui sont estimés à partir du graphique Lineweaver-Burk (R^2 était de 0,9781 – 0,9570). Ces résultats suggèrent que l'extrait enzymatique de *P. africana* JO-A a la plus grande affinité pour CMC (Figure 42). La faible valeur de K_m, obtenue pour l'activité CMCase implique que c'est une enzyme très spéciale avec une forte affinité pour son substrat (CMC). Afin d'obtenir un taux de réaction maximal, de faible quantités de substrat seront utilisées.

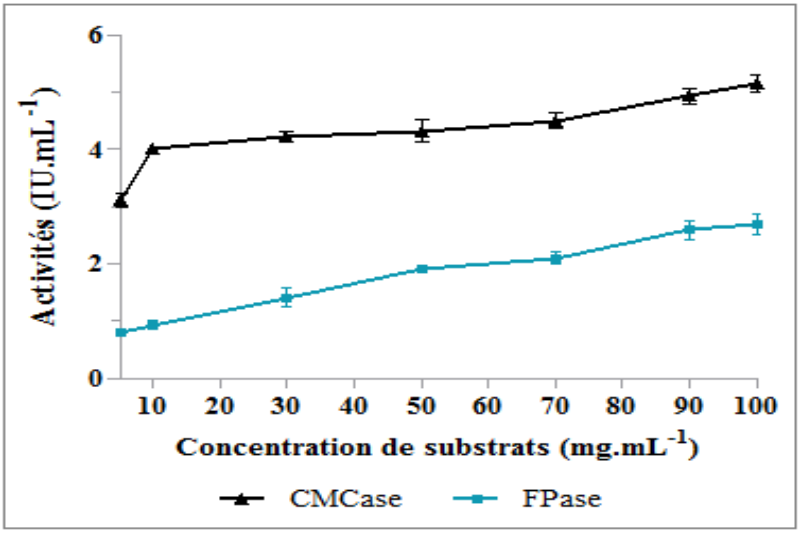


Figure 42: Effet de la concentration des substrats sur les activités CMCase et FPase de l'extrait enzymatique produit par *P. africana* JO-A à pH 5.0 et à 50 °C

La CMCase et la FPase de *P. africana* JO-A ont présenté un taux élevé de dégradation pour les deux substrats commerciaux (CMC et papier filtre) avec une concentration de 100 $mg.mL^{-1}$. Cela concorde avec l'étude de Saliu et Sani, (2012) qui ont rapporté que l'activité endoglucanase des deux espèces *Aspergillus niger* et *Penicillium decumbens* est la plus élevée à une concentration de CMC de 100 $mg.mL^{-1}$. Cela pourrait être dû à la différence de réactivité de l'enzyme cellulase brute à divers composés dégradés. An et al., (2015) ont signalé que l'enzyme CrCel présente des valeurs de K_m et V_{max}, avec CMC comme substrat, respectivement de 2,1 ± 0,4% et 73,5 ± 3,3. Kim et al., (2015) ont rapporté des résultats similaires avec l'endoglucanase EG1 recombinant d'*Actinomyces* sp., les valeurs de K_m et de V_{max} sont respectivement de 0,4% de CMC et de 144,9 $IU.mg^{-1}$. Cependant, elle était supérieure à la valeur obtenue avec l'enzyme cellulase *cel28a* de 0,144 $mg.mL^{-1}$ pour le substrat carboxyméthyle cellulose (Cheng et al., 2016).

Selon la cinétique de Michaelis-Menten, l'enzyme de *P. africana* JO-A a une grande affinité pour le substrat carboxyméthyle cellulose (CMC). La valeur de K_m de 2,7 $mg.CMC.mL^{-1}$ est plus haute que la valeur obtenue avec l'enzyme CrCel, l'endoglucanase EG1 recombinante d'*Actinomyces* sp. et de la cellulase d'*A.niger* (An et al., 2015 ; Kim et al., 2015 ; Sulyman et al., 2020). Ainsi que l'enzyme cellulase *cel28a* dont la valeur est de 0,144 $mg.CMC.mL^{-1}$ (Cheng et al., 2016). Même si V_{max} (4,88 $IU.mL^{-1}$) est supérieure à la valeur de CMCase de *Penicillium simplicissimum* H-11 à 0,364 $mg.mL.min^{-1}$ et l'endoglucanase EG5C de *Paenibacillus* sp. IHB B 3084 à 0,692 $IU.mL^{-1}$ (Bai et al., 2013 ; Dhar et al., 2015). De même, la valeur du K_m (2,7 $mg.CMC.mL^{-1}$) est inférieure à celle obtenue pour EG d'*A. niger VTCC*-F021 avec 8,5815 $mg.CMC.mL^{-1}$ et pour EG *d'Aspergillus terreus RWY* avec 16,09 $mg.mL^{-1}$ (Pham et al., 2012 ; Sharma et al., 2014).

Les résultats montrent que l'endophyte mésophile *P. africana* JO-A produit des enzymes cellulases thermostables acidophiles présentant une forte affinité pour le substrat cellulosique. Ces enzymes extracellulaires jouent un rôle important et sont potentiellement recommandées dans les industries du biocarburant pour la bioconversion de la biomasse lignocellulosique et la production commerciale.

V. Saccharification et fermentation de l'hydrolysât

V.1. Hydrolyse enzymatique par le concentrât cellulolytique de JO-A

L'étape de l'hydrolyse enzymatique a été étudiée pour évaluer l'action des enzymes sur la dégradation du substrat et la libération des sucres fermentables à partir d'un milieu synthétique et d'un substrat lignocellulosique. La quantité de sucres libérés après l'hydrolyse du substrat cellulosique dans le milieu synthétique, avec l'extrait enzymatique cellulase produit par *P. africana* JO-A est d'une valeur de 30,49 ± 0,28 $g.L^{-1}$. Cette valeur est plus proche de celle obtenue avec l'enzyme cellulase commercial (34,81 ± 0,14 $g.L^{-1}$).

L'hydrolyse de la peau de figuier avec des enzymes commerciales et produite par *P. africana* JO-A a permis de libérer des sucres avec des quantités de 15,52 ± 0,17 $g.L^{-1}$ et 11,57 ± 0,07 $g.L^{-1}$, respectivement. L'enzyme cellulase produite par JO-A s'est révélé une hydrolyse significative et efficace des matières cellulosiques industrielles et lignocellulosiques, avec un niveau moyen de sucres fermentables libérés comparable à la saccharification par la cellulase commerciale. Les polysaccharides produits sont utilisés dans une fermentation éthanolique à 37°C.

V.2. Fermentation alcoolique d'hydrolysât

Lors de l'évaluation de la capacité des trois souches de levure à produire de l'éthanol à partir d'hydrolysats produits pendant 24 heures d'incubation, la souche *K. marxianus* a présenté le pouvoir de fermentation le plus élevée avec le milieu synthétique et le milieu avec la peau de figuier saccharifiée par l'enzyme produite par JO-A. Ces valeurs sont respectivement de 11,85 ± 0,74 et 5,43 ± 1,64 $g.L^{-1}$. De même pour les milieux saccharifiés par l'enzyme commerciale, les valeurs obtenues avec *K. marxianus* sont de 13,33 ± 1,48 $g.L^{-1}$ pour le milieu synthétique et 7,9 ± 1,64 $g.L^{-1}$ pour le milieu avec la peau de figuier saccharifié par l'enzyme produite par JO-A (Tableau 18, 19 et Figure 43).

Durant l'évaluation de la production d'éthanol dans le milieu synthétique, la souche *S. cerevisiae* présente la biomasse la plus élevée avec 2,96 ± 0,05 $g.L^{-1}$ dans le milieu saccharifié avec l'enzyme produite par JO-A et avec une valeur de 3,71 ± 0,16 $g.L^{-1}$ dans le milieu saccharifié avec l'enzyme commerciale, comparativement aux autres souches étudiées. D'autre part, pour le milieu de peau de figuier saccharifié avec l'enzyme produit et commercial, la souche *K. marxianus* a montré une croissance significative par rapport aux souches *S. cerevisiae* et *C. tropicalis* avec des valeurs respectivement de 1,895 ± 0,20 et 1,365 ± 0,272 $g.L^{-1}$ de poids sec (Tableau 18 et 19). Ceci suggère que les souches *K. marxianus* et *S. cerevisiae* ont la capacité de métaboliser diverses sources de carbone pour la production d'éthanol et de biomasse. Cela concorde avec Lane et Morrissey, (2010) qui ont montré que *Kluyveromyces marxianus*

peut utiliser une large gamme de sucres lignocellulosiques, tels que : la cellobiose, la xylose et l'arabinose avec un taux de croissance élevé comparable à la souche standard *S. cerevisiae*.

Lors de la quantification de la consommation de substrat pendant la fermentation pour obtenir des sucres réducteurs, la souche *K. marxianus* présente un rendement en éthanol de 0,421 $g.g^{-1}$ supérieur à celui obtenu par la souche *S. cerevisiae* avec un rendement de 0,376 $g.g^{-1}$ dans le milieu synthétique saccharifié par l'enzyme commerciale. D'autre part, les rendements en éthanol sont respectivement de 0,405 et 0,386 $g.g^{-1}$ pour la souche *K. marxianus* et *S. cerevisiae* dans le milieu synthétique saccharifié par l'enzyme produit par JO-A (Tableau 18).

Pour le milieu avec la peau de figuier saccharifiée par l'enzyme commerciale et l'enzyme produite, les rendements en éthanol se situent entre 0,443 et 0,510 $g.g^{-1}$ pour les trois souches de levure (Tableau 19). La souche *K. marxianus* a présenté les meilleures performances pour la production d'éthanol avec le milieu synthétique saccharifié par l'enzyme commerciale et l'enzyme produite par JO-A avec la plus grande productivité volumétrique de 0,555 et 0,493 $g.L.h^{-1}$ respectivement et une efficacité de fermentation améliorée de 82% et 79%. Ils se sont montrés similaires (Tableau 18). De même, pour le milieu dont la peau de figuier saccharifiée par l'enzyme commerciale et l'enzyme produite, une productivité volumétrique est de valeur de 0,329 et 0,226 $g.L.h^{-1}$, respectivement, avec une efficacité de fermentation très élevée de 99% (Tableau 19).

Les résultats obtenus ont montré que la souche *K. marxianus* pourrait être la plus efficace en ce qui concerne la conversion des sucres produits par l'hydrolyse des matières cellulosiques et lignocellulosiques (peau de figuier) en éthanol, par rapport à la souche standard *S. cerevisia* qui a présenté les valeurs d'éthanol les plus faibles de 4,444 à 5,92 $g.L^{-1}$, surtout après la fermentation des hydrolysats de figuier. En revanche, Choudhary et al., (2017) ont mentionné que la souche *Saccharomyces cerevisiae* JRC6 produit la plus grande quantité d'éthanol (3,8 $g.L^{-1}$) à partir de la paille de paddy prétraitée et l'efficacité de fermentation est de 87,9%.

La culture de *C. tropicalis* dans le milieu peau de figuier précédemment saccharifié par l'enzyme commerciale a produit une forte teneur en éthanol de 7,4 ± 0,987 $g.L^{-1}$ avec un rendement de 0,493 $g.g^{-1}$ sur les sucres utilisés. Dans une étude similaire, la fermentation avec la souche *Candida tropicalis* MTCC 25057 d'un hydrolysat de sucre complété par une source d'azote a produit une concentration de 7,3 ± 1,1 $g.L^{-1}$ d'éthanol avec un rendement net de 0,28 $g.g^{-1}$ (Mattam et al., 2016).

D'autre part, Pérez-Cadena et al., (2018) ont rapporté que l'espèce *Candida* a fermenté l'hydrolysat d'*opuntia ficus indica* enrichi en KH_2PO_2 et a une quantité maximale d'éthanol de 4 $g.L^{-1}$. Cette valeur est inférieure à celle obtenue par la fermentation avec *C. tropicalis* de l'hydrolysat de figuier non supplémenté et saccharifié par l'enzyme produite par JO-A. La teneur en éthanol est de 5,43 ± 1,64 $g.L^{-1}$ pour un rendement de 0,5 $g.g^{-1}$.

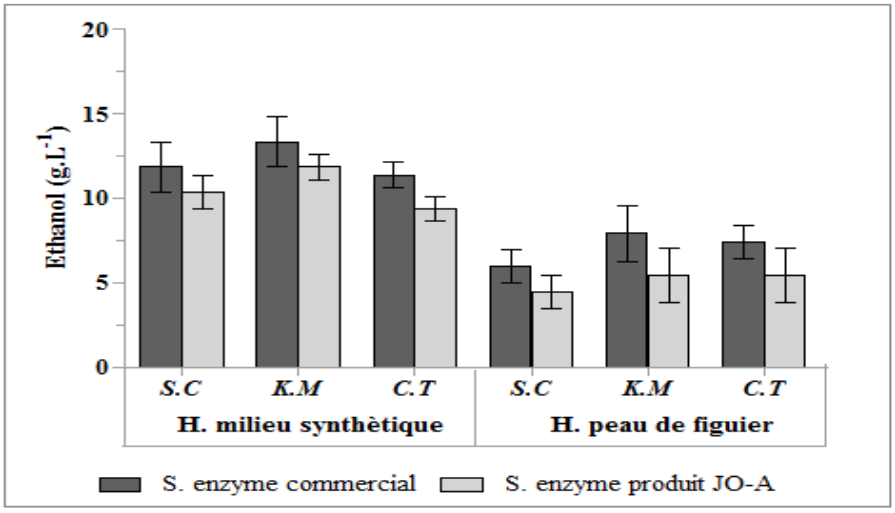


Figure 43: Production d'éthanol par les trois souches de levure pendant 24 heures à 37 °C, à partir de deux hydrolysats du milieu synthétique et de peau de figuier, saccharifié par l'enzyme commercial et l'enzyme produit par JO-A. S.C : *S. cerevisiae* ; K.M : K. *marxianus* ; *C.T* : *C. tropicalis*

Tableau 18: Potentiel de production d'éthanol des trois souches de levure avec deux types d'hydrolysats du milieu synthétique pendant 24 heures à 37 °C

Paramètres	Saccharification avec l'enzyme cellulase commercial			Saccharifiction avec l'enzyme cellulase produit par la souche JO-A		
	K. marxianus	*C. tropicalis*	*S. cerevisiae*	*K. marxianus*	*C. tropicalis*	*S. cerevisiae*
Sucres résiduels g.L^{-1}	3,186 ±0,44	3,42±0,41	3,336±0,24	1,298±1,06	3,88±0,164	3,66±0,249
Ethanol g.L^{-1}	13,33±1,48	11,35±0,74	11,85±1,48	11,851±0,740	9,38±0,740	10,36±0,98
Biomasse sèche g.L^{-1}	3,225±0,71	3,62±0,08	3,715±0,16	2,135±0,012	2,735±0,09	2,965±0,05
Q_p d'éthanol g.L.h^{-1}	0,555	0,473	0,493	0,493	0,390	0,432
Q_p biomasse g.L.h^{-1}	0,134	0,151	0,154	0,088	0,113	0,123
Rendement en éthanol sur les sucres utilisés g.g^{-1}	0,421	0,361	0,376	0,405	0,352	0,386
Rendement en éthanol sur les sucres totaux g.g^{-1}	0,382	0,326	0,340	0,388	0,307	0,339
Rendement en biomasse sur les sucres utilisés g.g^{-1}	0,101	0,115	0,118	0,073	0,102	0,110
Rendement en biomasse sur les sucres totaux g.g^{-1}	0,092	0,104	0,106	0,070	0,089	0,097

Efficacité de fermentation %	82,38	70,64	73,58	79,25	68,88	75,53

Tableau 19: Potentiel de production d'éthanol des trois souches de levure avec deux types d'hydrolysats de peau de figuier pendant 24 heures à 37 °C

Paramètres	**Saccharification avec l'enzyme cellulase commercial**			**Saccharifiction avec l'enzyme cellulase produit par la souche JO-A**		
	K.marxianus	***C. tropicalis***	***S. cerevisiae***	***K. marxianus***	***C. tropicalis***	***S. cerevisiae***
Sucres résiduels g.L^{-1}	0,05 ±0,01	0,511±0,067	2,220±0,151	0,90 ±0,049	0,808±0,183	1,550±0,302
Ethanol g.L^{-1}	7,90 ±1,64	7,406±0,987	5,925±0,987	5,431±1,645	5,431±1,645	4,444±0,987
Biomasse sèche g.L^{-1}	1,895±0,20	1,635±0,11	1,475±0,148	1,365±0,272	1,255±0,15	1,005±0,33
Q_p d'éthanol g.L.h^{-1}	0,329	0,308	0,246	0,226	0,226	0,181
Q_p Biomasse g.L.h^{-1}	0,078	0,068	0,061	0,056	0,052	0,041
Rendement en éthanol sur les sucres utilisés g.g^{-1}	0,510	0,493	0,445	0,508	0,504	0,443
Rendement en éthanol sur les sucres totaux g.g^{-1}	0,508	0,476	0,381	0,469	0,469	0,384
Rendement en biomasse sur les sucres utilisés g.g^{-1}	0,122	0,108	0,110	0,127	0,116	0,100
Rendement en biomasse sur les sucres totaux g.g^{-1}	0,122	0,105	0,094	0,117	0,108	0,086
Efficacité de fermentation %	99,80	96,47	87,08	99,41	98,63	86,69

La souche *K.marxianus* a été évaluée pour sa capacité à fermenter et à assimiler les sucres fermentables issus de l'hydrolyse des substrats cellulosique et lignocelulosiques saccharifiés par l'enzyme de JO-A. Selon le profil de fermentation d'hydrolysat du milieu synthétique, la souche *K. marxianus* consomme les sucres fermentables disponibles au cours des 14 premières heures de croissance et produit parallèlement une quantité progressive d'éthanol. La production d'éthanol et de biomasse atteint son maximum après 24 heures d'incubation. Ces valeurs sont de 11,85 ± 0,74 g.L^{-1} d'éthanol et de 2,135 ± 0,012 g.L^{-1} de masse sèche (Figure 44 A).

Pour l'hydrolysat de la peau de figuier, le profil de fermentation de la souche *K. marxianus* a montré une consommation de sucres fermentescibles durant les 20 premiers heures, avec une

production maximale d'éthanol (5,92 ± 0,74 $g.L^{-1}$) et de biomasse après 38 heures d'incubation (1,51 ± 0,40 $g.L^{-1}$). Une consommation de sucres est complète après 50 heures de fermentation et une faible baisse de la concentration d'éthanol a été observée (Figure 44 B). Cela suggère que la souche *K. marxianus* a changé son métabolisme à la consommation d'éthanol pour le maintien des cellules vivantes.

Ces résultats ont montré que le substrat de peau de figuier constitue l'un des biomasses lignocellulosiques résistant à la saccharification enzymatique en raison de la barrière structurelle de la lignine. D'autre part, une étape de prétraitement de la biomasse est nécessaire pour diminuer la cristallisation de la cellulose et de l'hémicellulose et pour améliorer l'étape d'hydrolyse enzymatique afin d'augmenter la conversion des polysaccharides en sucres fermentescibles (Belay et al., 2021 ; Idrees et al., 2014).

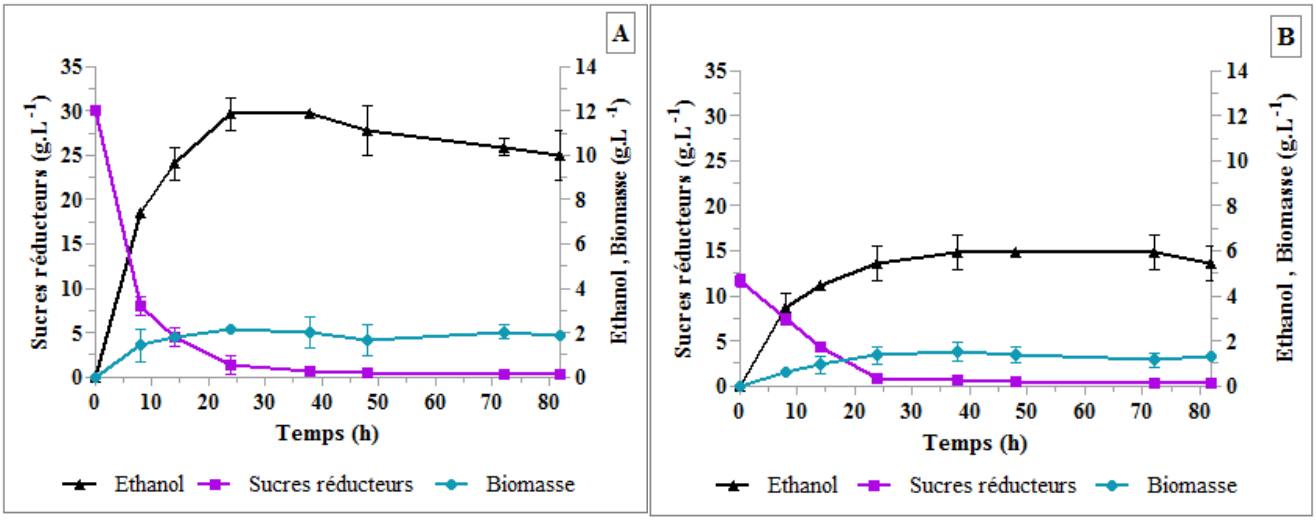


Figure 44: Profil de fermentation de *K. marxianus* avec deux hydrolysats, hydrolysés par l'enzyme produit de la souche JO-A pendant 82 heures à 37 °C: (A) Milieu synthétique ; (B) Milieu avec la peau de figuier

CONCLUSION

P. africana JO-A est l'un des meilleurs endophytes cellulolytiques, sélectionnés pour optimiser la production de cellulase en étudiant les effets de divers facteurs. La production des cellulases par *P. africana* JO-A a été multipliée par dix.

L'optimisation statistique avec RMS confirme les résultats obtenus en évaluant l'effet de différents facteurs pour déterminer les conditions de production maximale de cellulase par JO-A, dont les valeurs élevées d'activité CMCase et FPase sont de 2,042 $IU.mL^{-1}$, 0,809 $IU.mL^{-1}$ respectivement, à 1,9% de glucose, à une température de 37 °C et 9 jours d'incubation pour l'endoglucanase et 5 jours pour FPase. Une amélioration de plus de 100% de la production des cellulases est atteinte avec RMS par rapport aux conditions initiales non optimisées.

Les cellulases de JO-A peuvent être appliquées dans le processus de fermentation SSF, grâce à sa forte activité hydrolytique à basse température entre 28 et 37 °C.

L'optimisation de la production de cellulase montre que *P. africana* JO-A semble être un endophyte cellulolytique mésophile promoteur dans la dégradation de la cellulose et réduit

efficacement les coûts des processus de prétraitement des biomasses lignocellulosiques à l'échelle industrielle.

Après le test de caractérisation, les enzymes cellulases de *P. africana* JO-A sont des acidophiles thermostables avec une activité enzymatique plus élevée dans une plage de pH et de température extrêmes (pH 5,0 et 50 °C) pour une demi-vie de 24 heures en conditions optimales. Cette thermostabilité des cellulases à des températures supérieures à 50 °C en fait un bon agent pour les applications industrielles en augmentant l'efficacité de la saccharification de la cellulose à haute température.

Ces propriétés spécifiques des cellulases de *P. africana* JO-A sont fortement recommandées dans l'industrie des biocarburants pour convertir la lignocellulose en sucres fermentescibles pour une fermentation facile et peu coûteuse.

Partie 4 : Production de bioéthanol à partir du figuier de barbarie sous SHF

MATERIELS ET METHODES

I. Substrat lignocellulosique

La peau de figue de Barbarie a été utilisée comme substrat lignocellulosique dans cette étude. Ces échantillons proviennent des cultivars marocains Ait Baâmrane de fruits vert jaunâtre, variété Moussa (Figure 45). Les fruits mûrs sont achetés du marché local et se caractérisent par un aspect non dégradant.



Figure 45: Peau de figuier de Barbarie 'variété Moussa'

I.1. Préparation du substrat de fermentation

Pour l'analyse de la composition, les matières premières sont lavées avec de l'eau distillée pour éliminer la saleté et les impuretés. La peau des figues de Barbarie fraiches mûres est soigneusement enlevée du fruit manuellement par épluchage et la peau d'une épaisseur d'environ 3 à 4 mm est coupée en bandes avec un déchiqueteur et séchée au soleil jusqu'à ce que la matière soit suffisamment sèche puis transférée dans une étuve à 60 °C pendant 48 heures. Ensuite la matière séchée de figuier est broyée avec un broyeur (un moulin à café domestique) pour obtenir une farine. Avant de les stocker dans des sacs en plastique scellés à 4 °C, la matière broyée de figuier est tamisée à une taille de 1 mm et soigneusement mélangée pour assurer des échantillons représentatifs avec une poudre homogène (Figure 45).

I.2. Caractérisation physico-chimiques de la poudre de peau de figuier

Les analyses de la composition de la poudre de peau, y compris la matière sèche solide, les sucres et les protéines qui sont déterminés par des procédures d'analyse standard de la biomasse.

I.2.1. Teneur en eau

La teneur en eau de la peau du figuier est déterminée après évaporation de l'eau contenue dans 10 g de la poudre placée dans un plat sec (propre) et séchée dans un four à 105 °C jusqu'à obtenir un poids constant (différence de poids), selon la méthode de Brandi et Wilson-Wilde, (2013).

La teneur en eau est exprimée en pourcentage et calculée par la formule suivante :

$$\text{Teneur en eau (\%)} = \frac{\text{masse de la poudre} - \text{masse de la matière sèche}}{\text{masse de la poudre}} \times 100$$

I.2.2. Teneur en cendre

La cendre totale a été déterminée en calcinant 2g de la farine de la peau de figuier séchée à 300°C pendant huit heures. Les échantillons sont pesés dans un creuset de porcelaine taré. Par la différence de masse, la teneur en cendre est déterminée et exprimée en pourcentage selon la procédure décrite par Gouveia et al., (2009) :

$$\text{Teneur en cendre (\%)} = \frac{\text{masse de cendre}}{\text{masse de la matière sèche}} \times 100$$

I.2.3. Teneur en hydrates de carbone

La poudre de peau de figuier est utilisée avec une concentration de 10 g par 100 mL d'eau distillée.

Les sucres totaux de la poudre de figuier sont déterminés par la méthode de Dubois et al., (1956), à l'aide de phénol et d'acide sulfurique concentré. Ainsi, que les glucides présents dans la peau de figuier hydrolysée sont déterminés par la méthode de DNS (Miller, 1959).

Un échantillon de 500 µL de la peau hydrolysée est ajouté à 500 µL d'eau distillé et à 1,5 mL du réactif 3,5 dinitrosalycilique (DNS). Le mélange réactionnel est mis à ébullition à 100 °C pendant 10 min.

La densité optique de la solution est mesurée à 640 nm. La concentration des sucres réducteurs libérés est calculée selon la courbe standard de 0 à 1 µmole de glucose par rapport à un témoin contenant de l'eau et du DNS. Les échantillons sont exprimés en mg EG (Glucose équivalent)/mL.

I.2.4. Teneur en protéine totale

La teneur totale en protéines des échantillons de la poudre de peau de figuier (10%) est mesurée selon la méthode de Bradford, (1976), en employant le bleu brillant de Coomassie.

La couleur développée est lue à 595 nm. Le sérum d'albumine bovine (BSA) est utilisé en tant que courbe étalon standard de protéine.

I.2.5. Teneur en polyphénols totaux

La composition phénolique totale est déterminé selon la méthode de Folin-Ciocalteau décrite par De Ascensao et Dubery, (2003). Cette méthode repose sur la capacité des composés phénoliques à réduire le réactif phosphomolybdicphosphotungstique avec la formation d'un complexe bleu, en oxydant les phénols en un mélange de tungstène et de molybdène.

Un échantillon de 50 µL de la solution de peau de figuier (10%) est ajouté à 50 µL d'eau distillée et à 500 µL du réactif de Folin-Ciocalteu (10%). Le mélange est ensuite agité et incubé dans l'obscurité pendant 5 min. On ajoute au mélange 400 µL d'une solution aqueuse de Na_2CO_3 (7.5%) et on l'incubés dans l'obscurité pendant 1 heure.

Une gamme étalon est préparée avec de l'acide gallique et l'absorbance de la solution est mesurée à une longueur d'onde de 760 nm. Les résultats sont exprimés en mg EAG (équivalent en acide gallique) par g de poudre de peau. Les expériences sont réalisées en triples.

II. Production d'enzymes par les endophytes en utilisant la poudre de peau de figuier comme source de carbone

II.1. Mise en culture des endophytes

L'utilisation de matériel lignocellulosique dans la fermentation immergée pour la production d'enzymes est un facteur clé pour l'efficacité et la rentabilité des enzymes extracellulaires. La fermentation immergée (SmF) est définie comme la fermentation en présence d'un excès d'eau, d'éléments nutritifs et de micro-organismes submergée (Behera et Ray, 2016). L'influence de la supplémentation sur la production d'enzymes est étudiée avec les souches sélectionnées qui sont *P. africana* JO-A, *Acremonium* sp. JO-I, *Alternaria* sp. JO-L_1, *Preussia* sp. JO-M, *Rhizopus* sp. JO-N_1, *Podospora* sp. JO-U_3, *Melanocarpus* sp. JO-V_2, *Penicillium* sp. JO-V_4 et le consortium JO-V_2 + JO-V_4, et la poudre de peau de figuier comme matériel lignocellulosique.

Les souches fongiques sélectionnées sont cultivées et stockées sur le milieu PDA à 28 °C pendant 7 jours. Pour le milieu supplémenté, le processus de production d'enzymes sous SmF avec les souches sélectionnées est effectué dans des flacons de 250 mL constitués de 10% de peau de figuier humidifiée à 70% chacun avec un milieu liquide M5 (Annexe 1). D'autre part, le milieu non supplémenté de peau de figuier est humidifié seulement avec de l'eau distillée. Le pH du milieu est ajusté à pH 5,0 en ajoutant la solution HCl (2M).

Après stérilisation (à 121 °C pendant 30 min), la série de flacons contenant 100 mL du substrat humidifié de peau de figuier est inoculée chacun avec six fragments de mycélium de 1cm de diamètre de chaque endophyte approprié dans des flacons distincts. Les cultures sont incubées sans agitation dans l'obscurité à 28 °C pendant 10 jours.

Toutes les expériences ont été réalisées en triples. Deux témoins de poudre avec de l'eau distillée et de la poudre avec des éléments nutritifs incubés dans les mêmes conditions.

Les bouillons fongiques sont collectés de chaque fermentation en utilisant un tampon d'acétate de sodium (20 mM, pH 5,0), afin d'éliminer le mycélium superficiel. Les filtrats enzymatiques sont obtenus après centrifugation à 5000 rpm pendant 20 min à 4 °C (répéter deux fois) pour enlever les particules fines. Le surnageant obtenu est utilisé en tant qu'enzyme brute pour l'analyse des activités enzymatiques cellulases et laccases.

Des isolats endophytiques à forte activité enzymatique sont sélectionnés pour les tests de fermentation alcoolique et de prétraitement biologique de la peau de figuier.

II.2. Détermination du poids sec de figuier traitée

La partie solide de la peau de figuier qui reste après centrifugation est séchée à 80 °C jusqu'à ce qu'il atteigne un poids constant. Le poids sec total de la partie insoluble de la culture est désigné par le mycélium fongique et le substrat de peau de figuier.

Les valeurs de perte de poids de la poudre de peau sont mesurées à partir du poids sec de la biomasse avant et après le prétraitement. Une soustraction du poids sec des échantillons pour les témoins d'endophytes dans un milieu nutritif standard est réalisée en parallèle.

III. Fermentation en batch de la production d'éthanol à partir des suspensions de peau de figuier prétraitées

La fermentation est réalisée avec les suspensions obtenues directement à partir des cultures de figuier non supplémentées prétraitées avec les endophytes (*P. africana* JO-A et *Melanocarpus* sp. JO-V_2), en séparant les culots du surnageant par une centrifugation (5000 rpm pendant 20 min à 4 °C). Les hydrolysats utilisés comme une source de carbone sont d'un volume de 100 mL (en flacons de 250 mL).

Pour la cinétique de la souche *K. marxianus,* le volume de la suspension est de 300 mL et préparé en erlenmeyers de 1 L. Les trois souches de levure sont pré-cultivées séparément deux fois dans un milieu YPD à 2% de glucose additionné de 75 $\mu g.mL^{-1}$ d'ampicilline.

Les cellules de levure sont recueillies par centrifugation à 5000 rpm pendant 10 min, lavées et mises en suspension dans une solution de NaCl (0,08%). Pour inoculer les cultures prétraitées, la concentration initiale des cellules de levure est fixée à 1×10^8 cellules/mL et la capacité de produire de l'éthanol pour les levures est testée séparément. Les flacons sont incubés à 39 °C dans un agitateur à 80 rpm, pendant 24 heures pour les trois souches de levure. Seul *K. marxianus* est testé pour une étude de cinétique de 96 heures.

Toutes les fermentations sont effectuées en triples et les valeurs moyennes sont indiquées. Les échantillons collectés sont centrifugés à 5000 rpm pendant 20 min à 4 °C pour déterminer la quantité d'éthanol produite, les sucres résiduels et la biomasse.

IV. Production d'hydrolysat de la peau de figuier de barbarie

IV.1. Prétraitement de la poudre de peau de figuier

Les deux méthodes de prétraitement sont optimisées afin de déterminer les paramètres optimaux de libération maximale de sucre fermentescible avec chaque méthode individuellement.

IV.1.1. Prétraitement acide

L'augmentation de l'efficacité de la conversion de la cellulose en glucose lors de l'hydrolyse enzymatique est évaluée après le prétraitement acide de la poudre de peau de figuier.

Le premier test de prétraitement chimique est effectué avec quatre acides différents : H_2SO_4, HCl, HNO_3 et H_3PO_4, avec une concentration fixe de 1% (v/v) et une charge solide de 10% (p/v). Les hydrolysats sont stérilisés à une température de 121 °C pendant 20 min.

Pour le second test de prétraitement, l'hydrolyse acide est réalisée avec différentes concentrations de 5, 7, 10 et 15% (p/v) de poudre de peau de figuier, en ajoutant 1% (v/v) d'acide sulfurique. Chaque hydrolysat est stérilisé à 121 °C pendant 20 min.

Troisième essai d'hydrolyse acide est réalisé avec diverses concentrations d'acide sulfurique H_2SO_4 de 0, 1, 2, 3, 4, 5 et 6% (v/v), en fixant la teneur en solides à 10% (p/v). La stérilisation des flacons est effectuée à 121 °C pendant 20 min.

Les concentrations optimales d'acide sulfurique (3%) et une charge de solide (10%) sont fixées pour le dernier essai d'hydrolyse, qui est effectué à 121 °C à différents temps 10, 20, 30, 40 et 60 min.

Avant la stérilisation, tous les flacons (250 mL) contenant 100 mL d'hydrolysats prétraités sont agités à l'aide d'une barre magnétique (70 rpm) à température ambiante pendant 1 heure. Après stérilisation, les flacons sont retirés et les suspensions hydrolysées obtenues sont neutralisées avec du NaOH en ajustant le pH à 5,0 et laissé refroidir à température ambiante. Les fractions liquide et solide des échantillons traités ne sont pas séparées et l'hydrolysat obtenu après le prétraitement acide (HA) est stocké stérile à 4 °C.

Les échantillons prélevés sont centrifugés à 5000 rpm pendant 20 min à 4 °C (répéter la centrifugation deux fois). Le surnageant obtenu est employé pour les analyses de sucres SRT et de polyphénols totaux.

La fraction solide restante est séchée à 80 °C jusqu'à la stabilisation du poids puis mesurée afin de quantifier la matière hydrolysée.

IV.1.2. Prétraitement fongique

La poudre de peau de figuier est utilisée sans supplémentation comme seule source de carbone à une concentration de 10% (p/v) et autoclavée à 121 °C pendant 30 min. Le prétraitement fongique est réalisé avec *P. africana* JO-A, *Melanocarpus* sp. JO-V_2 et le consortium de JO-A+JO-V_2, chacun inoculé dans des flacons séparés (250 mL) contenant 100 mL.

Dans le premier test de prétraitement fongique, le nombre d'inoculum varie de 1, 2, 4, 6, 8 et 10 fragments de mycélium approprié de 1 cm de diamètre. Les cultures sont incubées sans agitation, dans l'obscurité à 28 °C pendant 10 jours.

Le deuxième essai de prétraitement fongique est effectué avec le consortium JO-A+JO-V_2, dans un flacon (1L) contenant 300 mL du mélange de poudre à 10% avec de l'eau distillée.

Les cultures sont inoculées avec dix-huit fragments de mycélium frais approprié (1 cm de diamètre) et incubées sans agitation à 28 °C pendant 30 jours. Les échantillons sont prélevés par intervalle de 5 jours.

Pour chaque expérience, trois exemplaires sont établis. Les milieux témoins (poudre de figuier sans champignon) sont réalisés en parallèle.

Après l'incubation, les fractions liquides sont prélevées des échantillons de peau traités et non traités et centrifugées deux fois (5000 rpm pendant 20 min à 4 °C) pour éliminer le mycélium. Le surnageant obtenu est utilisé pour les analyses de sucres réducteurs et totaux et de composés phénoliques. La fraction solide restante est séchée à 80 °C et mesurée.

Les réactions sont réalisées en triple et les données sont présentées en tant que moyenne.

IV.2. Production d'hydrolysat enzymatique du figuier prétraitée

L'hydrolyse enzymatique des échantillons de peau de figuier prétraités (acide et biologique) et non traités est étudiée en utilisant un cocktail d'enzymes produites par les endophytes JO-A et JO-V_2 et les enzymes commerciaux. Afin d'évaluer la digestibilité enzymatique des matériaux prétraités et obtenir des glucides fermentescibles.

Les enzymes hydrolytiques produites par JO-A et JO-V_2 en utilisant la peau de figuier (non supplémenté comme source de carbone) sont concentrées par la membrane d'ultrafiltration. Le concentrât produit est utilisé comme enzyme brut dans l'étape d'hydrolyse enzymatique.

Dans les mêmes flacons, les suspensions prétraitées complètes (sans séparation de la fraction liquide des insolubles) sont utilisées pour la saccharification. La solution d'acétate de sodium (2 mM, pH 5.0) est additionnée aux suspensions prétraitées avec une concentration de 10% en tenant compte de l'humidité du substrat. On ajout ensuite la solution d'enzyme aux suspensions prétraitées.

Pour une étude comparative, toutes les hydrolyses enzymatiques sont réalisées avec la même concentration d'enzyme de 20 IU par gramme de peau sèche par rapport à la suspension prétraitée. Les types d'enzymes sont utilisés pour l'hydrolyse :

- Complexe enzymatique commercial Celluclast 1.5 L et Viscozyme L (Annexe 2)
- Concentrât d'enzymes cellulase et laccase des souches JO-A et JO-V_2

La réaction enzymatique est effectuée à 50 °C pendant 24 heures secouée dans un agitateur à 70 rpm pour une libération maximale des sucres monomères.

Le second test de saccharification est effectué avec la combinaison qui a donné la plus grande quantité de sucre : traitement fongique suivi par une hydrolyse enzymatique réalisée avec un cocktail d'enzymes (industriels et produits).

Le test d'hydrolyse est évalué avec différentes concentrations d'enzymes de 10, 15, 20 et 25 IU par gramme de biomasse sèche pendant diverses périodes d'incubation de 14, 24, 38, 48 et 72 heures.

Tous les tests sont réalisés à trois exemplaires. Une fois l'hydrolyse terminée, les suspensions d'hydrolysat résultantes sont enlevées et chauffées dans de l'eau bouillante à 100 °C pendant 10 min. Afin d'arrêter la réaction enzymatique et inactiver les enzymes utilisées.

Pour chaque expérience, des échantillons sont prélevés de chaque flacon à différents intervalles de temps et centrifugés à 5000 rpm pendant 20 min à 4 °C. Le surnageant est utilisé pour évaluer les concentrations de sucres réducteurs totaux libérés (SRT).

Le culot solide restant est séché à 80 °C jusqu'à ce que son poids soit constant et mesuré.

Les teneurs finales en sucres fermentescibles après l'hydrolyse enzymatique sont utilisées pour calculer les rendements en éthanol.

IV.3. Méthodes analytiques

IV.3.1. Détermination du rendement en SRT et la récupération de solide

La récupération de solide et le rendement en SRT sont calculés selon les équations suivantes (Wang et al., 2016) :

(1)

$$\text{Récupération solide (\%)} = \frac{Sp}{Sup} \times 100$$

(2)

$$\text{Rendement SRT (\%)} = \frac{\text{poids de SRT}}{\text{poids du substrat sec total} \times \text{récupération solide\%}}$$

Où S_p est le poids sec de peau de figuier prétraitée, S_{up} est le poids sec de peau de figuier non traitée.

IV.3.2. Calcule du pourcentage de conversion de substrat et d'efficacité d'hydrolyse

La conversion de substrat peau de figuier et l'efficacité d'hydrolyse (ou % saccharification) sont calculées selon les équations suivantes (de Almeida et al., 2011 ; Latika et Sonia, 2015) :

$$\text{Conversion de substrat (\%)} = \frac{\text{sucres réducteurs (g/L)} \times 0{,}9 \times 100}{\text{substrat initial (g/L)}}$$

$$\text{Saccharification (\%)} = \frac{\text{Concentration en sucres réducteurs obtenu (g/L)} \times 0{,}98 \times 100}{\text{Concentration potentiel en sucres dans le substrat traité (g/L)}}$$

V. Etude de la fermentation alcoolique de l'hydrolysât du figuier prétraitée par trois souches de levure

Les cellules de levure *S. cerevisiae*, *K. marxianus* et *C. tropicalis* utilisées sont maintenues en suspension de NaCl (0.08%) pendant 24 heures à 4 °C. Ces souches sont à nouveau centrifugées et utilisées pour ensemencer l'hydrolysat enzymatique pour les expériences SHF et le milieu de fermentation chimiquement défini.

V.1. Production de bioéthanol en milieu chimiquement défini

Avant de procéder à la fermentation de l'hydrolysat de la peau de figuier, les souches *S. cerevisiae*, *K. marxianus* et *C. tropicalis* sont évaluées en tant que référence, dans un milieu chimiquement défini limité en glucose en tant que seule source de carbone à une concentration semblable à la quantité de sucres simples présentée dans l'hydrolysat enzymatique de la peau de figuier elle-même.

Les fermentations de chaque levure sont faites en trois exemplaires dans 300 mL (flacons de 1L) du milieu synthétique M4 (Annexe 1). La solution de glucose est stérilisée séparément par filtration à l'aide d'un filtre à membrane de 0.2 µm et ajoutée aseptiquement au milieu stérilisé.

Pour chaque levure, les flacons sont ensemencés avec une concentration cellulaire initiale d'environ 1×10^8 cellules /mL pour commencer les fermentations. Les flacons sont incubés à 39 °C dans un agitateur d'une vitesse constante de 80 rpm pendant 96 heures.

Les échantillons sont prélevés et centrifugés à 5000 rpm pendant 5 min à 4 °C. Le surnageant est utilisé pour doser l'éthanol et les sucres résiduels. Le culot est séché pour déterminer la biomasse microbienne.

V.2. Production de bioéthanol à partir d'hydrolysat de figuier sous SHF

V.2.1. Préparation du surnageant de l'hydrolysat

Les essais de la fermentation SHF sont effectués avec la suspension d'hydrolysats cellulosiques obtenues directement après un traitement fongique avec *P. africana* JO-A et *Melanocarpus* sp. JO-V_2, suivi d'une hydrolyse enzymatique.

La suspension d'hydrolysat est centrifugée en conditions stériles à 5000 rpm pendant 20 min à 4 °C. Le surnageant obtenu est utilisé comme une source de carbone de 300 mL (erlenmeyers de 1L) pour les essais de production d'éthanol SHF.

La supplémentation en éléments nutritifs des hydrolysats de SHF est semblable à celle utilisée dans le milieu chimiquement défini. L'hydrolysat est complété par un concentré d'une solution de sel minéral, avec l'ajout d'extrait de levure, $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4, K_2HPO_4 et $MgSO_4.7H_2O$ (M6, Annexe 1) dans des conditions stériles. Afin d'obtenir des concentrations similaires à celles du milieu synthétique avec une suspension plus miscible.

V.2.2. Conditions de la fermentation

La capacité des trois souches de levure à produire de l'éthanol à partir de peau saccharifiée est testée séparément.

Pour démarrer les fermentations, l'inoculum est ajouté aux hydrolysats avec une concentration cellulaire initiale d'environ 1×10^8 cellules /mL. Les flacons sont incubés à 39 °C en conditions anaérobies dans un agitateur à 80 rpm pendant 96 heures.

Des échantillons sont prélevés périodiquement de chaque flacon et centrifugés à 5000 rpm pendant 20 min à 4 °C. Le surnageant est collecté pour analyser les sucres résiduels ainsi que la concentration d'éthanol. Le résidu est utilisé pour déterminer la biomasse sèche. L'efficacité de fermentation et le rendement en éthanol sont déterminés à partir de la consommation de sucre et de la concentration en éthanol.

V.2.3. Calcule du rendement de la conversion SRT

Le rendement de la conversion SRT en éthanol et calculé selon l'équation suivante (Travaini et al., 2016) :

$$\text{Rendement de conversion SRT en éthanol (\%)} = \frac{\text{Ethanol obtenu g/L}}{\text{SRT initial g/L} \times 0{,}511} \times 100$$

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Caractérisation de la poudre de peau de figuier

Les résultats obtenus par la caractérisation physicochimique de la poudre de peau de figuier ont révélé une teneur élevée en eau de 91,5% et une quantité de composés phénoliques d'une concentration de 0,0595 $g.g^{-1}$. L'étude de Guevara-Figueroa et al., (2010) a identifié des composés phénoliques tels que : l'acide gallique, l'acide caféique, l'acide salicylique, l'acide férulique, l'acide p-coumarique et l'acide 4-hydroxybenzoique aussi les flavonoïdes dans les échantillons de figuier de Barbarie (Stintzing et Carle, 2005). En revanche, Santos-zea et al., (2011) ont mentionné des concentrations de phénols de 0,3 à 0,9 $g.g^{-1}$ dans la farine de cladode de différentes variétés d'*Opuntia* spp.. Pour Khatabi et al., (2011), la teneur en polyphénols était de 7,76 ± 0,72 $mg.kg^{-1}$ pour le jus et de 15,03 ± 1,36 $mg.kg^{-1}$ pour le figuier entiers (figue de Barbarie jaune, variété Moussa).

L'analyse de la composition de la poudre de figuier a indiqué que la teneur en eau, en cendre, en protéines, en sucres totaux et en sucres réducteurs ont des valeurs respectives de 91,5 ± 0,11, 11,1 ± 0,02, 7,6 ± 0,33, 44,27 ± 0,06 et 11,44 ± 0,04% (Tableau 20). La forte teneur en eau de la poudre de figuier est résolue par un séchage dans le four, puis par broyage pour concentrer et réduire la teneur en humidité afin de faciliter la manipulation. Cette valeur est proche des valeurs obtenues avec les cladodes d'*O. ficus-indica* (88 – 95%). La teneur totale en sucre est proche de celle de la poudre de cladode de *O. ficus-indica* (42%), mais plus faible que celle de certains autres substrats lignocelluloses (Kuloyo et al., 2014).

Toutefois, la teneur en sucre représente 11,44% de la biomasse sèche de la peau de figuier qui est inférieure à la teneur en sucre fermentable des autres biomasses utilisées telles que : la paille d'orge (38,3%), la bagasse de canne à sucre (42,1%), les cladodes de *O. ficus-indica* (34,3%) et la canne de maïs (39%) (Garcia-Aparicio et al., 2011).

Pour d'autres compositions telles que : les protéines totales et les cendres, elles représentent des valeurs similaires aux données précédentes de Ginestra et al., (2009) et Stintzing et Carle, (2005) sur la cladode d'*O. ficus-indica*, avec une teneur en cendres de 11,1% obtenue qui est supérieure à 5,4 et 6,0% que déclaré par de Souza Filho et al., (2016). Ces différences dans les valeurs de la caractérisation physicochimique de la poudre de peau de figuier provenant de ce travail avec celles rapportées par d'autres auteurs peuvent être liés aux conditions climatiques, aux variétés végétales, aux pratiques agronomiques et aux méthodes de culture adoptées, tel que mentionné par Texco-López et al., (2018).

Les biomasses d'espèces de cactus déjà publiées ont montré des concentrations d'hémicellulose (9 – 33,4%), de cellulose (25,8 – 48,5%) et de lignine (5,7 – 16,7%) similaires entre le cladode et la tige de diverses variétés (Alencar et al., 2018 ; de Souza Filho et al., 2016 ; Udeh et Erkurt, 2017). Pourtant, ces biomasses de figuier sont riches en minéraux, en fibres alimentaires, en polyphénols et en flavonoïdes (Hahm et al., 2011), avec des pourcentages moyens de sucres tels que : le saccharose (2,25%), le glucose (14%), le fructose (2,29%) et les minéraux comme : le Ca (15,7%), le K (98%), le Na (1,1%) et le Mg (15,2%) (Nebbache et al., 2009). De même les pectines montrent des valeurs de 6 à 14% de la masse sèche de cactus qui se

composent aussi de glucose, de galactose , de rhamnose, de xylose et d'arabinose (Ginestra et al., 2009 ; Pena-Valdivia et al., 2012).

L'espèce *O. ficus-indica* est l'un des matériaux herbacés caractérisés par une teneur en lignine relativement faible comparée aux autres matières premières. Ceci réduit sa nécessité de prétraitement dur et coûteux (Yang et al., 2015).

Tableau 20: Caractérisation de la biomasse sèche de la peau de figuier de barbarie

Constituant	Cendre	Protéine	Teneur en eau	Phénol total	Sucres totaux	Sucres réducteur
Pourcentage en matière sèche (%)	11,1 ± 0,02	7,6 ± 0,33	91,5 ± 0,11	5,95 ± 0,01	44,27 ± 0,06	11,44 ± 0,04

II. Effet de la supplémentation du substrat sur la production d'enzymes par les endophytes sélectionnés

Les résidus de peau de figuier supplémentée et non supplémentée ont été vérifiés pour la croissance fongique et la synthèse d'enzymes sous la fermentation immergée (SmF). La peau de figuier est recommandée comme un substrat équilibré pour la croissance fongique, car elle contient une forte teneur en cellulose, en hémicellulose, en lignine et en protéine (de Souza Filho et al., 2016). La peau de figuier est aussi riche en sucres, en éléments minéraux et en amidon (Hahm et al., 2011).

Selon les résultats obtenus, la poudre de peau de figuier supplémentée et non supplémentée a montré une croissance fongique et une colonisation complète du substrat jusqu'au 10ème jour, dernier jour d'incubation (Figure 46) et une production significative d'enzymes extracellulaires cellulases et laccases. Ceci concorde avec l'étude de Latika et Sonia, (2015) qui ont présenté le 10ème jour une production d'enzymes cellulases à partir du surnageant de culture de *Trichoderma reesei* NCIM1052 avec du son de blé en tant que source de carbone à 28 °C. En revanche, Patel et Gupte, (2016) ont signalé que *T. giganteum* AGHP avait complètement colonisé le substrat de paille de blé le 16ème jour de l'incubation. De même, Cunha et al., (2014) ont rapporté une liquéfaction de la canne à sucre catalysée par la cellulase produite par d'*A. niger* pendant la SmF et la synthèse d'endoglucanase est 12 fois supérieure à celle produite par la fermentation SSF. Différentes cultures fongiques submergées par *Trichoderma* sp. Merv6, *Penicillium* sp. Merv2, *Aspergillus* sp. Merv70 et leur recombinaison Tahrir-25 ont montré une production durable de CMCase, de FPase et de ß-glucosidase avec des rendements acceptables à ceux obtenus par la production de SSF (El-Bondkly Ahmed et El-Gendy Mervat, 2011).

L'effet de l'ajout de nutriments au milieu avec la peau de figuier a été examiné sur la production d'enzymes hydrolytiques cellulases et laccases. Les résultats indiquent que la poudre de peau de figuier est un substrat potentiel avec/ou sans nutriment pour la production d'enzymes cellulases par les souches JO-A, JO-I, JO-M, JO-V_2 et JO-V_4 et les enzymes laccases par les

endophytes JO-L_1, JO-N_1, JO-U_3, JO-V_2 et JO-V_4 (Figure 47 A, B, C), si on les compare aux autres substrats commercialisés.

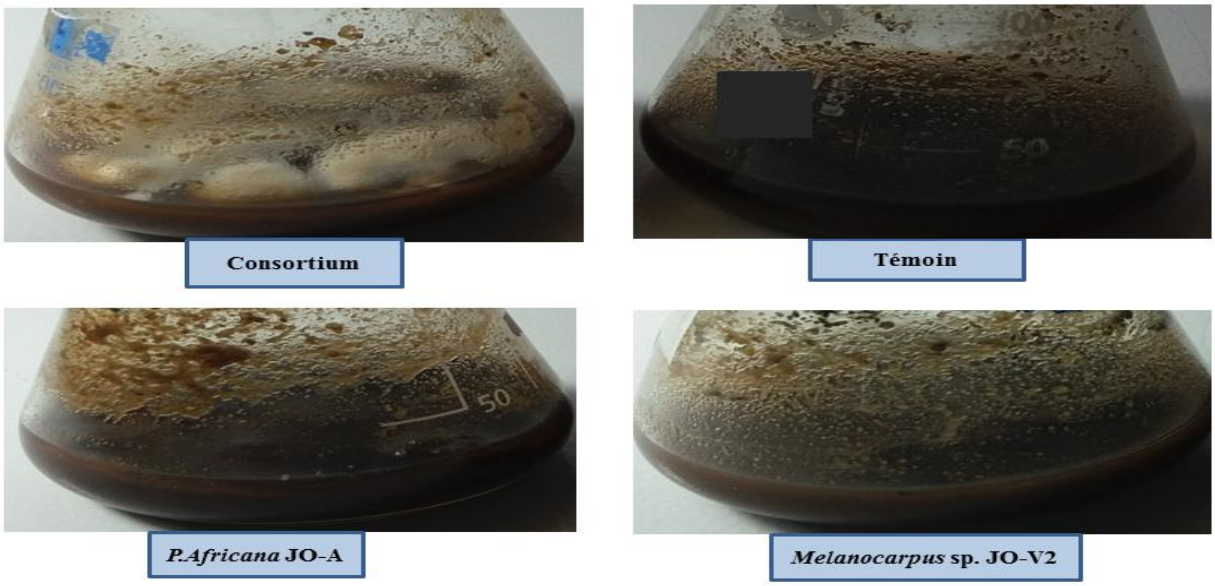


Figure 46: Aspect de la culture de JO-A, JO-V_2 et le consortium (JO-A + JO-V_2) dans le milieu avec la peau de figuier non supplémenté

D'après les résultats obtenus, les endophytes fongiques dans un milieu contenant de la poudre de peau non supplémentée JO-A (2,06 ± 0,08 IU.mL^{-1}), JO-I (1,56 ± 0,07 IU.mL^{-1}), JO-M (1,45 ± 0,1 IU.mL^{-1}) et JO-V_2 (1,77 ± 0,01 IU.mL^{-1}) ont également montré des activités CMCase raisonnables comparable au milieu avec la poudre de peau supplémenté par des valeurs de 2,135 ± 0,076, 1,679 ± 0,073, 1,52 ± 0,05 et 1,823 ± 0,071 IU.mL^{-1}, respectivement. Cependant, la plus faible activité a été enregistrée avec la souche JO-V_4 dans le milieu non supplémenté et supplémenté avec la valeur de 1,15 ± 0,00 et 1,199 ± 0,072 IU.mL^{-1}, respectivement (Figure 47 A). Cependant, les endophytes testés ont produit des activités CMCase comparables en présence ou en absence de supplémentation dans un milieu contenant de la peau de figuier. Cela pourrait être dû à l'existence de composés azotés et de sources de carbone dans la suspension de peau de figuier stérilisée qui déclenche la croissance et la production d'enzymes.

D'après les résultats obtenus, la plus grande production d'activité FPase au milieu avec la poudre non supplémentée est enregistrée avec les deux endophytes JO-A (1,25 ± 0,1 IU.mL^{-1}) et JO-V_2 (1,05 ± 0,08 IU.mL^{-1}) et comparable de valeur significative au milieu complété avec la peau de figuier avec 1,354 ± 0,029 et 1,168 ± 0,026 IU.mL^{-1}, respectivement (Figure 47 B).

Cependant, *P. africna* JO-A et *Melanocarpus* sp. JO-V_2 peuvent se développer et hydrolyser la peau du figuier supplémentée et non supplémentée lors de la digestion anaérobie après 10 jours d'incubation. Pourtant, Martin-Sampedro et al., (2015) ont signalé que le bio-prétraitement de la biomasse de *E. Globulus* avec des endophytes fongiques a montré une quantité significative d'activité ligninolytique (activité laccase) seulement après 28 jours d'incubation. Une autre étude de Shah et al., (2015) a montré que *Penicillium oxalicum* a produit des quantités considérables d'enzyme cellulolytique en utilisant le substrat de banane agro-gaspillent supplémenté. Aussi, pour l'endophyte *Phanerochaete chrysosporium* qui a montré une production très élevée

d'enzymes cellulolytiques avec diverses pertes agricoles tels que : la paille de maïs, la cosse de riz et la bagasse de canne à sucre comme source de carbone lors de la fermentation de production de l'enzyme SSF (Saratale et al., 2014).

D'après les résultats obtenus, la production de CMCase et de FPase a démontré que la supplémentation de la peau de figuier avait un effet négligeable comparativement au milieu non supplémenté. Ceci est également confirmé avec les valeurs d'activité laccase. La production la plus élevée est observée avec les deux fongiques *Podospora* sp. JO-U_3 et *Melanocarpus* sp. JO-V_2 dans le milieu non supplémenté 4,90 ± 0,20 IU.mL^{-1}, 6,34 ± 0,23 IU.mL^{-1} et le milieu supplémenté 5,00 ± 0,01 IU.mL^{-1} et 7,10 ± 0,10 IU.mL^{-1}, respectivement (Figure 47 C). Cela concorde avec les travaux de Martín-Sampedro et al., (2017), qui ont été montré une activité laccase maximale de 16,6 UI.g^{-1} de poids sec dans l'échantillon OTP non supplémenté prétraité biologiquement avec *Trametes* sp. I-62.

Divers substrats et déchets lignocellulosiques tels que : le son de blé, la paille de blé et les déchets de papier, sont utilisés en tant qu'inducteurs de l'activité laccase produite par les endophytes *Pleurotus ostreatus*, *Cotylidia pannosa*, *Trichoderma harzianum* et *T. versicolor* dans une culture submergée, en raison de leur coût réduit à l'échelle industrielle (El-Batal et al., 2015 ; Gao et al., 2013 ; Sharma et al., 2014 et Tisma et al., 2012). Cependant, la supplémentation en nutriments n'a pas augmenté significativement l'activité enzymatique des différents endophytes testés. Pour les cultures avec la peau de figuier non supplémentée, la disponibilité en éléments nutritifs provient entièrement de la dégradation des composés organiques disponibles dans le substrat complet. Ceci est confirmé par Tai et al., (2019) qui ont montré qu'avec des structures complexes, la nature récalcitrante et les pertes lignocellulosiques fournissent une alimentation limitée pour l'induction de la croissance fongique initiale avant la synthèse d'enzymes hydrolytiques.

De petites modifications du rapport C/N sont observées en complétant des substrats complexes avec des sources d'azote et de carbone (Kumar et Kanwar, 2012). Les inducteurs et les composés qui simulent la synthèse de la laccase varient selon les substrats utilisés. La poudre de peau de figuier est reconnue par sa teneur en cuivre non négligeable et qui rentre dans les principaux inducteurs de l'activité laccase. Dans cette étude, l'ajout de suppléments au substrat n'a aucun effet significatif sur la production des différentes activités enzymatiques produites par les endophytes sélectionnés. Ceci s'explique probablement par le fait que la fermentation a été effectuée à l'échelle pilote. Les effets des additifs peuvent être mieux confirmés en cas de fermentation industrielle à grande échelle, tel que mentionné par Tai et al., (2019).

On a constaté que les endophytes *P. africana* JO-A et *Melanocarpus* sp. JO-V_2 peuvent se développer et produire des niveaux significatifs de divers enzymes hydrolytiques avec des résidus de la peau de figuier riches en composés lignocellulosiques sous la fermentation SmF. Cela concorde avec Cunha et al., (2014) qui ont rapporté la liquéfaction de la canne à sucre catalysée par la cellulase produite par d'*A. niger* au cours de la SmF, Cependant, la synthèse d'endoglucanase par d'*A. niger* sous SmF était 12 fois supérieure à celle produite par la fermentation SSF. Différentes cultures fongiques submergées par *Trichoderma* sp. Merv6, *Penicillium* sp. Merv2, *Aspergillus* sp. Merv70 et leur recombinaison Tahrir-25 ont montré une

production durable de CMCase, de FPase et de ß-glucosidase avec des rendements acceptables à ceux obtenus par la production de SSF (El-Bondkly Ahmed et El-Gendy Mervat, 2011).

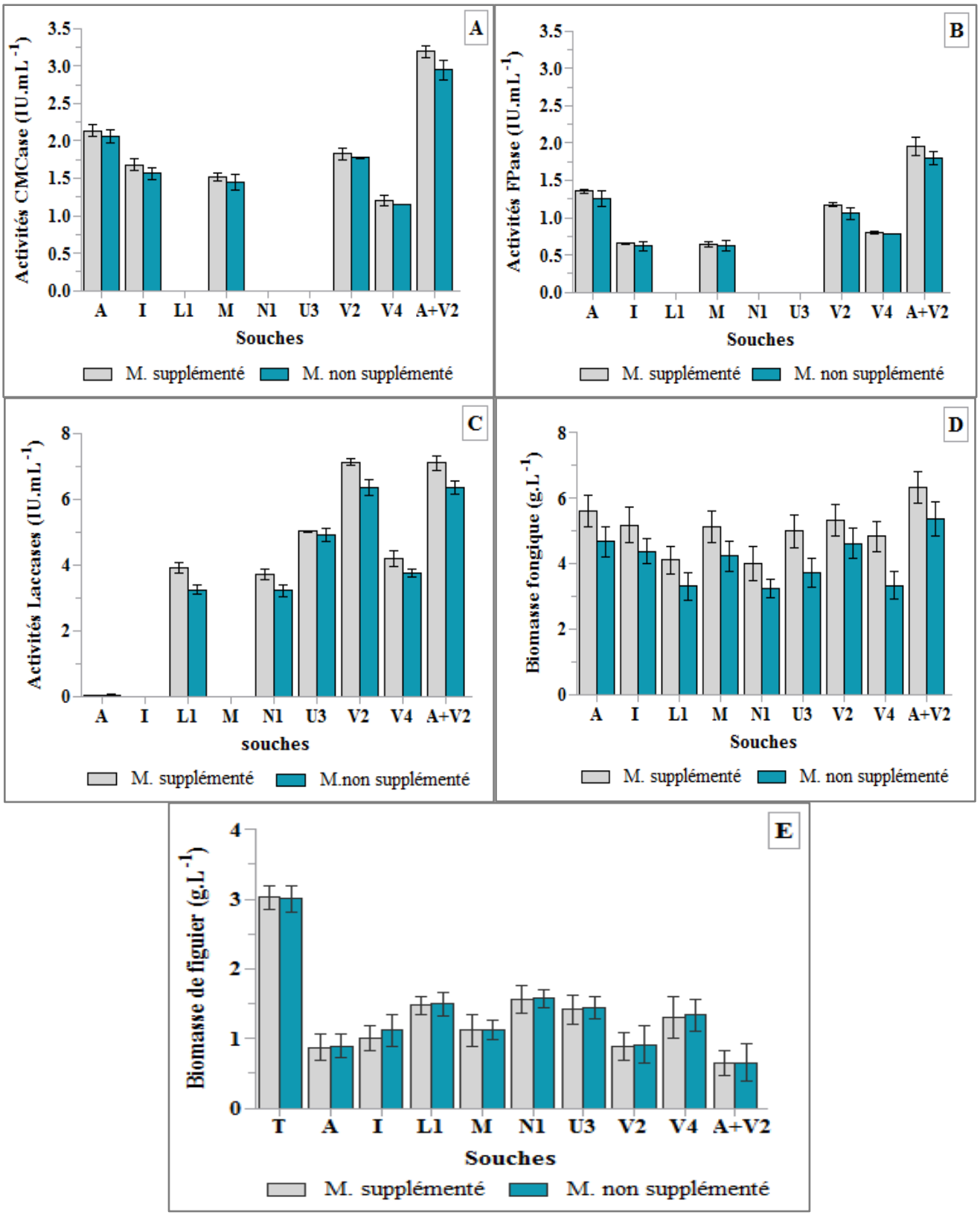


Figure 47: Production d'enzymes cellulases (A ; B), laccases (C) et de biomasses (D ; E) par les souches sélectionnées sous SmF à partir de poudre de peau de figuier en milieu supplémenté et non supplémenté

Sur la base des résultats obtenus, les rendements les plus élevés de la production d'enzymes sont attribués au consortium de JO-A et JO-V_2, cultivés sous SmF dans un milieu supplémenté et non supplémenté, avec une activité CMCase (3,19 ± 0,07 et 2,94 ± 0,12 IU.mL^{-1}), FPase (1,95 ± 0,12 et 1,80 ± 0,08 IU.mL^{-1}) et laccase (7,10 ± 0,22 et 6,34 ± 0,19 IU.mL^{-1}), respectivement (Figure 47 A, B, C). Néanmoins, au sein du consortium, même si la croissance est légèrement limitée, on a observé une production maximale d'enzymes hydrolytiques. Ces résultats ont montré que la culture de deux endophytes en consortium a révélé une meilleure efficacité de digestion du substrat lignocellulosique et d'un taux de production d'enzymes hydrolytiques CMCase / FPase de 42,71 à 75,27% sur 10 jours.

En parallèle, les résultats sur la biomasse fongique sèche ont montré des différences de masse sèche avec différents fongiques utilisés, ainsi que le consortium entre le milieu supplémenté et non supplémenté. Des valeurs élevées de poids sec sont observées avec le milieu supplémenté. La souche JO-A, JO-V_2 et le consortium ont rapporté des valeurs supérieures de 5,59 ± 0,47, 5,33 ± 0,47 et 6,23 ± 0,48 g.L^{-1}, respectivement, pour le milieu de peau supplémenté (Figure 47 D). Les résultats sur la biomasse sèche des résidus solides de figuier non dégradées n'ont pas montré aucune différence de poids entre les deux milieux supplémenté et non-supplémenté pour les différents endophytes utilisés (Figure 47 E). Les valeurs les plus faibles de poids sec ont été enregistrées avec les endophytes JO-A, JO-V_2 et le consortium pour le milieu supplémenté de 0,87 ± 0,19, 0,88 ± 0,19 et 0,64 ± 0,17 g.L^{-1}, respectivement, avec un taux de diminution de 70 à 78% par rapport à la biomasse non traitée.

D'autre part, la supplémentation en extrait de levure et peptone comme source d'azote améliore la croissance fongique au cours des premières phases de la colonisation. Cependant, avec la présence de cuivre dans le milieu de production sous SmF, qui constitue l'un des inducteurs puissants de laccase, favorisant la sécrétion et la production de laccase tel que mentionné par Zabin et al., (2017).

Les résultats montrent que la peau du figuier est une source de carbone et d'azote qui favorise la croissance des endophytes fongiques. Cela suggère qu'elle est très nutritive et soutient la croissance et même satisfait les besoins alimentaires des endophytes fongiques sélectionnés pour une production améliorée d'enzymes lignocellulosiques en fournissant une matière première végétale peu coûteuse pour la production de bioéthanol de seconde génération. Les déchets lignocellulosiques comme les pertes agricoles ont formé un bon équilibre alimentaire pour supporter la croissance de plusieurs micro-organismes (*Aspergillus glaucus* XC9) et la production d'enzymes, comme indiqué par Xu et al., (2006).

El-Bondkly Ahmed et El-Gendy Mervat, (2011) ont rapporté que le substrat de bagasse de canne à sucre complété par des grains de maïs solides est le meilleur inducteur pour les activités cellulases avec le recombinant Tahrir-25. Cela contribue à une diminution des coûts de production des complexes enzymatiques et une production économique de bioéthanol. L'addition exogène de divers aliments et de sources d'azote est nécessaire pour les résidus agricoles, en raison de l'insuffisance des sources d'azote afin d'améliorer la croissance des endophytes et la production d'enzymes, comme l'ont mentionné El-Bondkly et El-Gendy, (2010) et El-Gendy, (2010).

Cependant, l'utilisation de la cellulose pure comme le substrat de peau de figuier non supplémenté constitue l'un des moyens économiques de production d'enzymes cellulase et laccase à grande échelle. Car, la peau de figuier est l'un des substrats lignocellulosiques facilement disponibles et pourrait induire et soutenir la production de la cellulases (CMCase et FPase) et laccases par les endophytes industriels promoteur *P. africana*-JO-A et *Melanocarpus* sp. JO-V_2. Pendant le prétraitement de la biomasse, les composés phénoliques ont dérivé et libéré de la lignine et ont agi comme inhibiteurs d'enzymes extracellulaires principalement les cellulases fongiques impliquées dans l'hydrolyse, comme indiqué par Parawira et Tekere, (2011).

En même temps, les résultats pour le traitement par la laccase fongique du *Melanocarpus* sp. JO-V_2 et du consortium JO-A + JO-V_2, les produits phénoliques sont réduits d'une concentration de 0,19 ± 0,02 et 0,18 ± 0,01 $g.g^{-1}$, respectivement et la digestibilité de la biomasse est améliorée. Cette détoxification de la biomasse de figuier est due à l'élimination des inhibiteurs toxiques avec un prétraitement à la laccase par la souche *Melanocarpus* sp. JO-V_2, en constituant l'une des méthodes de délignification de nature écologique. Tel que mentionné par Pandiyan et al., (2014). Cela concorde avec l'étude de Zabin et al., (2017), qui ont présenté une réduction de l'échantillon de sciure traitée à la laccase de *Trichoderma harzianum* HZN10 et l'élimination des inhibiteurs toxiques. Pendant le prétraitement biologique, la nature des composés toxiques et le type d'inhibiteur dépendent spécifiquement de la composition des biomasses lignocellulosiques, du procédé et des conditions du prétraitement utilisé (Kalyani et al., 2012 ; Ximenes et al., 2010).

Cependant, la peau de figuier s'est avérée être un substrat potentiellement peu coûteux parmi divers résidus agricoles, pour la biosynthèse des enzymes cellulase et laccase par la culture du consortium *P. africana* JO-A et *Melanocarpus* sp. JO-V_2 sous la fermentation SmF. Ces enzymes hydrolytiques produites pourraient dégrader divers déchets lignocellulosiques, équivalent à l'endophyte *Aspergillus niger* qui produit un cocktail d'enzymes hydrolytiques (Bansal et al., 2011). Cela indique l'importance du consortium d'endophytes fongiques dans les industries des biocarburants avec des procédés de prétraitement biologique, pour abaisser le prix de l'éthanol produit à partir de la biomasse lignocellulosique (El-Bondkly Ahmed et El-Gendy Mervat, 2011). Dans le cas des consortiums fongiques ou de leurs préparations enzymatiques, peu d'études ont indiqué leur utilisation dans la saccharification des biomasses lignocellulosiques et la production de bioéthanol. Par exemple, les différentes combinaisons d'*Aspergille noir, Trichoderma ressei* et *Phanerochaete chrysosporium* qui sont utilisés pour la dégradation de la lignocellulose et la libération des sucres employés pour la production de bioéthanol (Patel et al., 2007 ; El-Bondkly Ahmed et El-Gendy Mervat, 2011).

III. Production de bioéthanol et de biomasse à partir des suspensions prétraitées de figuier de barbarie

L'étape de prétraitement et de production d'enzymes est également étudiée pour évaluer la libération de sucres fermentables utilisés pour la production de bioéthanol à partir des différentes cultures de la peau de figuier non supplémentées prétraitées avec les souches fongiques sélectionnées.

Selon les résultats obtenus, la quantité de sucres libérés après le prétraitement avec la souche JO-A, JO-V_2 et le consortium de JO-A + JO-V_2 est de 14,720 ± 0,72, 11,549 ± 0,75 et 24,81 ±

1,07 $g.L^{-1}$, respectivement. Ces résultats de prétraitement ont montré que le consortium des deux endophytes a montré une digestion efficacité du substrat lignocellulosique avec le taux de libération de sucre fermentable le plus élevé et la plus faible concentration de composés phénoliques avec une valeur de 0,18 ± 0,01 $g.g^{-1}$ par rapport aux cultures prétraitées séparément avec JO-A et JO-V_2 de valeur de 0,2 ± 0,01 et 0,19 ± 0,02 $g.g^{-1}$, respectivement. Cependant, les polysaccharides libérés sont évalués par une fermentation alcoolique à 39 °C avec les trois souches de levure pendant 24 heures d'incubation.

Au cours de l'évaluation de la capacité de production d'éthanol par les souches de levure, la souche *K. marxianus* a montré le pouvoir de fermentation le plus élevé avec la culture prétraitée par le consortium de souches fongiques d'une valeur de 10,369 ± 1,97 $g.L^{-1}$. Et même les souches *S. cerevisiae* et *C. tropicalis* ont présenté des quantités d'éthanol plus ou moins élevées de 8,88 ± 0,98 et 9,87 ± 2,3 $g.L^{-1}$, respectivement (Tableau 21 et Figure 48 et 49). Ces résultats sont conformes à l'étude réalisée par El-Bondkly Ahmed et El-Gendy Mervat, (2011), qui ont montré que la fermentation avec *saccharomyce cereviciae* NRC2 d'une suspension de bagasse de canne à sucre saccharifiée par l'endophyte P3 a donné une teneur en éthanol de 11 $g.L^{-1}$.

En revanche, la fermentation de cultures prétraitées séparées avec les souches JO-A et JO-V_2 a donné une production maximale d'éthanol avec les souches *K. marxianus* et *C. tropicalis* et qui ont montré les mêmes valeurs d'éthanol de 6,419 $g.L^{-1}$ pour la culture prétraitée avec JO-A et 5,431 $g.L^{-1}$ pour la culture prétraitée avec JO-V_2 seulement (Tableau 21 et Figure 48).

Pourtant, lors de la quantification de la consommation de substrats lignocellulosiques (peau de figuier) au cours de la fermentation sous forme de sucres fermentescibles, les souches *K. marxianus* et *C. tropicalis* présentent des rendements en éthanol plus élevés que ceux obtenus par la souche *S. cerevisiae* pour les différentes suspensions de figuier prétraitées et fermentées, avec un taux d'augmentation de 7% à 13%. Les valeurs de rendement les plus élevées sont obtenues avec la souche *K. marxianus* d'une valeur de 0,504 $g.g^{-1}$ avec la suspension de figuier prétraitée par JO-A et de 0,495 $g.g^{-1}$ lorsque la suspension de figuier est prétraitée par JO-V_2. En outre, pour la suspension prétraitée par le consortium des souches, le rendement en éthanol donné par la souche *K. marxianus* est de 0,486 $g.g^{-1}$ sur les sucres utilisés (Tableau 21). Les souches *K. marxianus* et *C. tropicalis* ont présenté les meilleures performances pour la production d'éthanol avec des suspensions de figuier prétraitées séparément par les souches JO-A et JO-V_2, avec une productivité volumétrique élevée de 0,267 à 0,226 $g.L.h^{-1}$ et une efficacité de fermentation améliorée de 98 à 96%, respectivement (Tableau 21). Par contre, pour la suspension prétraitée par le consortium JO-A + JO-V_2, la souche *K. marxianus* a montré la meilleure productivité volumétrique de 0,432 $g.L.h^{-1}$ et une efficacité de fermentation de 95% supérieure à celles des souches de *C. tropicalis* et de *S. cerevisiae.* Ceci indique que la souche de levure *K. marxianus* est la plus efficace comparativement aux autres souches testées en termes de conversion des sucres fermentescibles des différents prétraitements du substrat de figuier en éthanol par des souches fongiques.

Pour l'évaluation de la production d'éthanol provenant des suspensions fermentées, les souches *K. marxianus* et *C. tropicalis* ont montré les plus fortes coissances de biomasses comparées à la souche *S. cerevisiae* pour toutes les suspensions de figuier prétraitées (Tableau

21). *K. marxianus* a enregistré des valeurs de 1,55 ± 0,07, 1,25 ± 0,12 et 2,43 ± 0,05 $g.L^{-1}$ de pois sec, respectivement, pour les suspensions prétraitées avec JO-A, JO-V_2 et consortium.

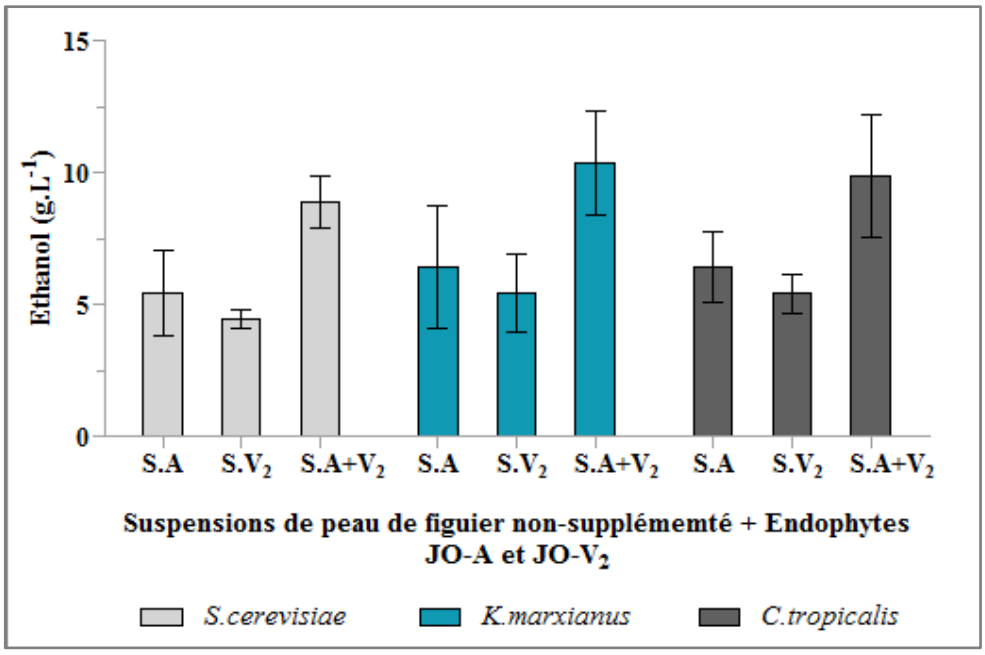


Figure 48: Production d'éthanol par trois souches de levure à partir de différents cultures de peau de figuier non-supplémentée prétraitées avec les endophytes fongiques à 39 °C pendant 24 heures. S.A : Suspension prétraitée avec la souche JO-A ; S.V_2 : Suspension prétraitée avec JO-V_2 ; S.A+V_2 : Suspension prétraitée avec les souches JO-A et JO-V_2

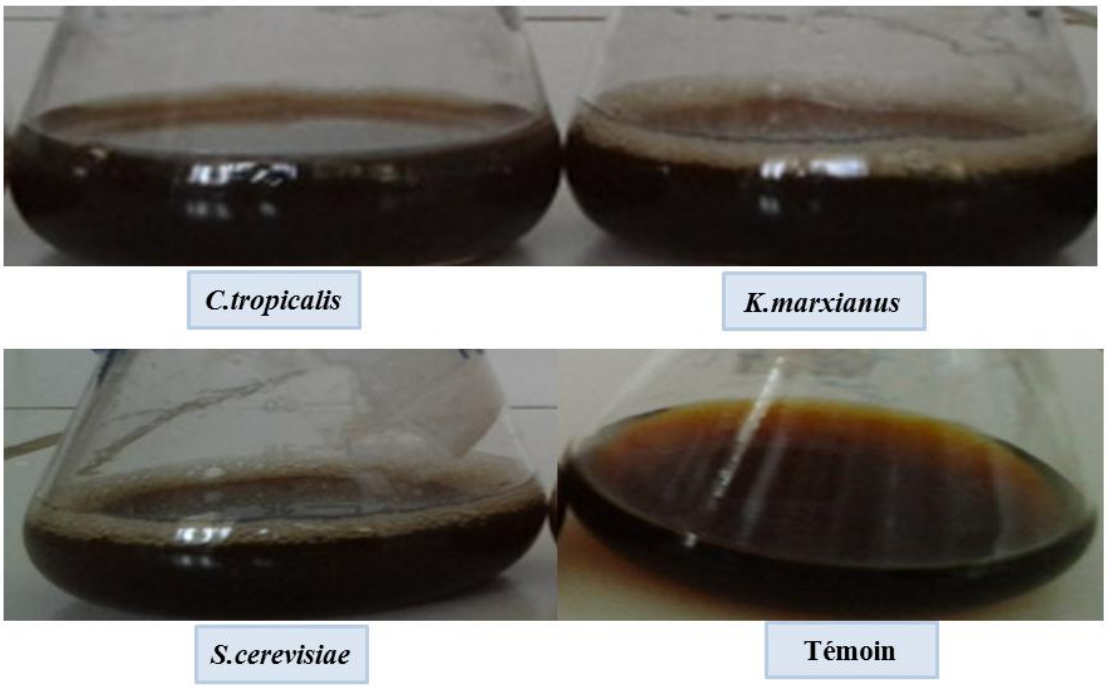


Figure 49: Aspect de cultures après fermentation par les trois souches de levure pendant 24 heures à 39 °C, à partir de suspensions prétraitées par le consortium de JO-A et JO-V_2

Tableau 21: Potentiel de production d'éthanol des trois souches de levure avec différentes cultures de figuier prétraitées par des endophytes à 39 °C pendant 24 heures

Paramètres	Suspension de figuier non supplémentée prétraitées								
	Souche JO-A			Souche JO-V_2			Souches JO-A et JO-V_2		
	S. C	***K. M***	***C. T***	***S. C***	***K. M***	***C. T***	***S. C***	***K. M***	***C. T***
Sucres résiduels g.L^{-1}	2,65±0,2	2 ± 0,09	1,92±0,1	1,91±0,4	0,59±0,0	0,53±0,0	4,04±0,0	3,50±0,0	4,12±0,0
Ethanol g.L^{-1}	5,43±1,6	6,41±2,3	6,41±1,3	4,44±0,3	5,43±1,4	5,43±0,7	8,88±0,9	10,36±1,97	9,87±2,3
Biomasse sèche g.L^{-1}	1,34±0,1	1,55±0,0	1,7±0,01	1,06±0,0	1,25±0,1	1,41±0,0	2,04±0,0	2,43±0,05	2,64±0,0
Q_p d'éthanol g.L.h^{-1}	0,226	0,267	0,267	0,185	0,226	0,226	0,370	0,432	0,411
Q_p Biomasse g.L.h^{-1}	0,056	0,064	0,071	0,044	0,052	0,058	0,085	0,101	0,110
Rendement en éthanol sur les sucres utilisés g.g^{-1}	0,449	0,504	0,501	0,461	0,495	0,492	0,427	0,486	0,477
Rendement en éthanol sur les sucres totaux g.g^{-1}	0,368	0,436	0,436	0,384	0,470	0,470	0,358	0,417	0,398
Rendement en biomasse sur les sucres utilisés g.g^{-1}	0,111	0,122	0,133	0,110	0,114	0,128	0,098	0,114	0,127
Rendement en biomasse sur les sucres totaux g.g^{-1}	0,091	0,105	0,115	0,092	0,108	0,122	0,082	0,098	0,106
Efficacité de fermentation%	87,86	98,63	98,15	90,21	96,86	96,28	83,56	95,10	93,34

Sur la base des résultats obtenus, la dynamique de fermentation de la souche *K. marxianus* est évaluée pour la production d'éthanol pendant 96 heures, à partir d'une culture prétraitée avec le consorsium JO-A et JO-V_2 contenant 24,25 ± 0,66 g.L^{-1} de sucres réducteurs totaux.

La figure 50 montre que la teneur en éthanol dépend de la quantité de sucres fermentables dans la suspension prétraitée et du temps de fermentation. Une diminution rapide de la quantité de sucres avec le temps de fermentation de 0 à 48 heures, en même temps une augmentation progressive de la teneur en éthanol. On enregistre un maximum d'éthanol et de biomasse à 48 heures de fermentation avec des valeurs respectives de 11,11 ± 0,74 g.L^{-1} et 2,52 ± 0,35 g.L^{-1}, puis maintenu un niveau élevé jusqu'à la fin de la fermentation (Figure 50). Une prolongation supplémentaire de la période d'incubation a entraîné une production stable d'éthanol. Cela peut

être dû à la capacité de la souche *K. marxianus* à utiliser une large gamme de sucres lignocellulosiques (cellobiose, xylose et l'arabinose) comme la souche *S. cerevisiae* (Lane et Morrissey, 2010). Ceci fait de la souche *K. marxianus* une alternative potentielle à la souche de référence *S. cerevisiae* pour la fermentation éthanolique à partir d'hydrolysats lignocellulosiques.

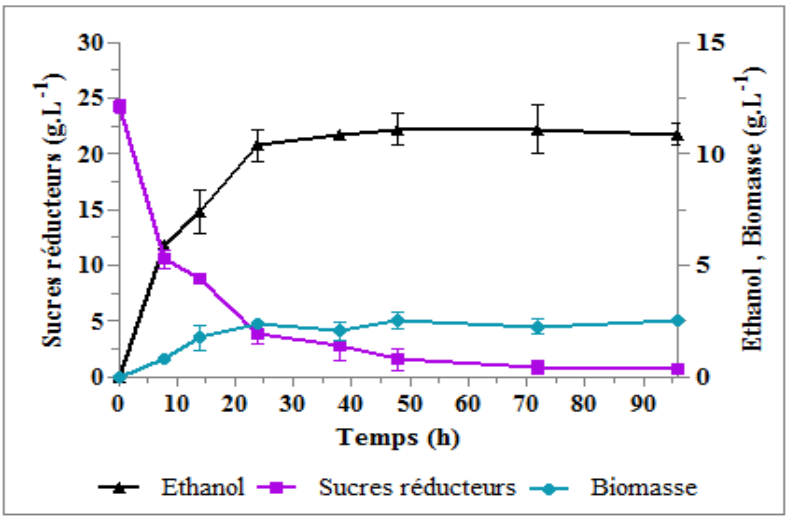


Figure 50: Profil de fermentation de la souche *K. marxianus* à partir d'une culture prétraitée avec le consortium de souches JO-A et JO-V_2 à 39 °C pendant 96 heures

IV. Prétraitement du substrat peau de figuier

La peau de figuier est l'une des biomasses lignocellulosiques résistantes à l'hydrolyse enzymatique en raison de sa barrière structurelle de lignine. Cependant, l'étape de prétraitement est nécessaire pour améliorer l'étape d'hydrolyse (Belay et al., 2021). Cette partie vise à optimiser la récupération des sucres fermentescibles après l'hydrolyse enzymatique.

IV.1. Optimisation du prétraitement acide

Pour obtenir une hydrolyse enzymatique maximale avec une forte teneur en sucres libérés, une étape de prétraitement est nécessaire pour réduire la cristallinité de la cellulose et de l'hémicellulose et éliminer la lignine, afin d'économiser le processus de saccharification. Le prétraitement permet d'éviter la production d'inhibiteurs, ce qui diminue l'efficacité de la fermentation, comme mentionné par Idrees et al., (2014).

L'effet de plusieurs acides est testé à une concentration fixe de 1%. D'après les résultats obtenus, l'acide H_2SO_4 a dégradé la biomasse avec la plus forte concentration de sucre libérée de 11,21 ± 0,7 $g.L^{-1}$ et le résidu solide restant le plus faible de 1,86 ± 0,16 $g.L^{-1}$ par rapport aux autres acides utilisés. Bien que l'on observe une concentration minimale de sucres libérés et une plus grande quantité de résidus qui restent sans hydrolyse lors du prétraitement avec H_3PO_4 de valeur 3,45 ± 0,68 $g.L^{-1}$ et 2,655 ± 0,19 $g.L^{-1}$, respectivement et un taux de diminution dépasse 100% en comparant avec l'hydrolyse par l'acide H_2SO_4 (Figure 51 et Figure 52 A).

Pourtant, l'utilisation d'H_2SO_4 pour l'hydrolyse acide est un meilleur choix afin d'obtenir une meilleure hydrolyse de peau de figuier et un maximum de sucres libérés pour les tests de prétraitement restants. Cependant, le choix du type d'acide utilisé dans l'hydrolyse varie selon le substrat lignocellulosique utilisé. Ces résultats sont confirmés par l'étude de Martinez-Patino et

al., (2015), qui ont montré une augmentation de la digestibilité du substrat d'olive après un prétraitement acide, quand l'acide phosphorique remplace l'acide sulfurique. Toutefois, le prétraitement à l'aide d'acides minéraux tels que : HCl, HNO_3, H_3PO_4 et H_2SO_4 n'entraîne pas l'élimination totale de la lignine tel qu'indiqué par Sun et al., (2016).

L'utilisation d'acides tels que : l'acide sulfurique, l'acide chlorhydrique et des bases comme le HNO_3 peut s'avérer efficace pour le traitement chimique de la biomasse à différentes températures et obtenir une hydrolyse enzymatique maximale au cours de la deuxième étape, tel que cité par Zhao et al., (2007). Cependant, une perte de poids de biomasse lignocellulosique peut survenir lors d'un prétraitement acide ou basique, suite à l'hydrolyse complète de l'hémicellulose et à l'élimination de la lignine, comme l'indiquent Lin et al., (2010) et Wang et al., (2010).

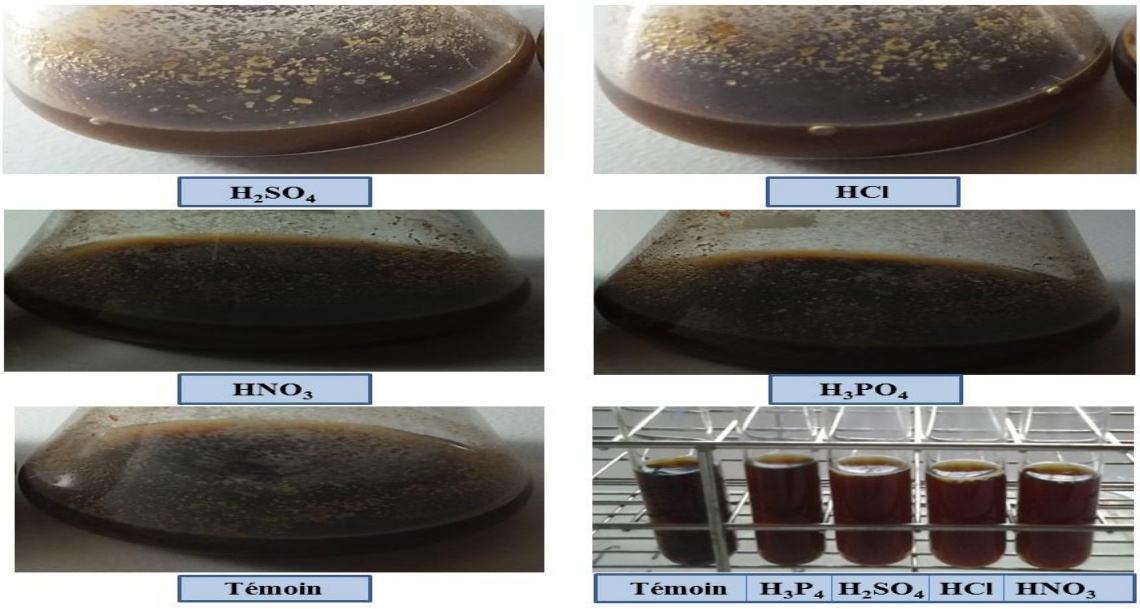


Figure 51: Aspect des suspensions non traitées et traitées avec différents types d'acides à 1% pour 10% de charge solide à 121°C pendant 20 minutes

Pour le second test de prétraitement, l'effet de la concentration du substrat sur la quantité de sucres libérés est étudié à l'aide de différentes quantités de substrat avec une concentration fixe de H_2SO_4.

Selon les résultats, avec l'augmentation de la concentration de biomasse, la quantité de sucres libérés augmente parallèlement. A 10% du substrat, la concentration de sucre est maximale de 11,21 ± 0,7 $g.L^{-1}$ et maintenu le même niveau élevé de 11,43 ± 0,68 $g.L^{-1}$ quand la quantité du substrat augmente à 15% (Figure 52 B). Une augmentation ultérieure de la concentration de la peau de figuier n'a pas augmenté le rendement des sucres libérés. Et même, pour la plus faible quantité de résidu non hydrolysés, on obtient des concentrations de 10 et 15% avec une valeur de 1,86 ± 0,17 et 1,85 ± 0,18 $g.L^{-1}$, respectivement. Par conséquent, la concentration de 10% du substrat est efficace pour l'hydrolyse acide (Figure 52 B) et cette concentration optimale du substrat est fixée pour des essais ultérieurs de prétraitement acide.

Cependant, Binod et al., (2011) ont confirmé que l'augmentation de la charge en solide produit à la fois une concentration de sucre maximale et aussi une grande quantité de composés

toxiques comme le furfural qui inhibent pendant le processus de fermentation. Au cours de l'hydrolyse acide, les conditions de prétraitement ont eu une influence importante sur la quantité de sucres réducteurs libérés pendant l'hydrolyse de la cellulose et la perte d'hémicellulose. Cela est confirmé par Sun-Q et al., (2014) et Ibarra et al., (2017) qui ont montré que l'hydrolyse acide élimine les extraits et la perte d'hémicellulose, augmentant la surface accessible de la cellulose aux enzymes cellulases et donc la libération maximale des sucres fermentables.

Le troisième essai de prétraitement à l'acide sulfurique à différentes concentrations sert à améliorer le rendement en hydrolyse.

Sur la base des résultats obtenus, la quantité de sucres libérés augmente graduellement jusqu'à une concentration maximale de sucres libérés avec 3,0% d'H_2SO_4, puis, la libération de sucres se stabilise sur un plateau avec l'augmentation de la concentration d'acide ajouté (Figure 52 C). Parallèlement, la quantité de résidus solides non hydrolysés diminue progressivement en augmentant la quantité d'acide utilisée d'une valeur de 0,815 ± 0,16 et 0,775 ± 0,18 $g.L^{-1}$ à 3% et 6 % H_2SO_4, respectivement. Cela concorde avec Idrees et al., (2014), qui ont montré que l'augmentation de la concentration d'acide dans l'hydrolysat prétraité augmente l'hydrolyse de l'hémicellulose et l'élimination de la lignine et des oxydes métalliques, ce qui entraîne une diminution du poids de la biomasse prétraitée.

A partir des résultats, les quantités de sucres obtenues avec les concentrations d'acide sulfurique 0,0, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 et 6,0% sont de 8,88 ± 0,66, 12,12 ± 0,78, 17,93 ± 0,66, 21,63 ± 0,91, 20,95 ± 0,65, 21,66 ± 0,53 et 21,99 ± 0,70 $g.L^{-1}$, respectivement (Figure 52 C). Ces valeurs élevées de sucres libérés avec l'augmentation de la concentration d'acide peuvent être dues à l'hydrolyse complète de l'hémicellulose accompagnée de carbonisation de la cellulose restante au cours de la phase d'hydrolyse acide. En revanche, un traitement acide postérieur affecte la dégradation de la cellulose qui produit des inhibiteurs affectant négativement la libération des sucres.

Un autre essai d'hydrolyse acide de peau de figuier est effectué avec une charge en solide et une concentration d'acide sulfurique fixe pour différentes durées. Après seulement 30 minutes de prétraitement, l'hydrolyse est optimale avec les sucres réducteurs totaux (SRT) et les composés phénoliques libérés à des concentrations de 22,14 ± 0,59 $g.L^{-1}$ et 1,17 ± 0,1 $g.L^{-1}$, respectivement et une réduction de la quantité de résidu solide non hydrolysé de 0,76 ± 0,16 $g.L^{-1}$. Toutefois, à 60 minutes la valeur des sucres mesurée dans l'hydrolysat est abaissée de 21,99 ± 0,75 $g.L^{-1}$ **(**Figure 52 D et Figure 53). Cette diminution de la teneur en sucre avec l'augmentation du temps d'hydrolyse, peut être due à la dégradation des oligosaccharides en composés de bas poids moléculaire, ainsi que des dérivés du furfural tel qu'indiqué par Behera et al., (2014) et Pérez-Cadena-R et al., (2018). Ces composés phénoliques de faible poids moléculaire sont les plus toxiques et peuvent causer une perte d'intégrité de la membrane et affecter le processus de fermentation des hydrolysats lignocellulosiques, en réduisant le rendement de fermentation de 30%. Par rapport à ce qui précède, Pérez-Cadena et al., (2018) ont présenté des quantités proches des résultats obtenus avec des concentrations de sucres et de composés phénoliques de 22,96 $g.L^{-1}$ et 1,63 $g.L^{-1}$, respectivement, en hydrolysant la farine de cladode d'*Opuntia* sp. Var Atlixco avec une charge en solide de 10% avec 3% d'acide sulfurique à 121 °C pendant 40 min.

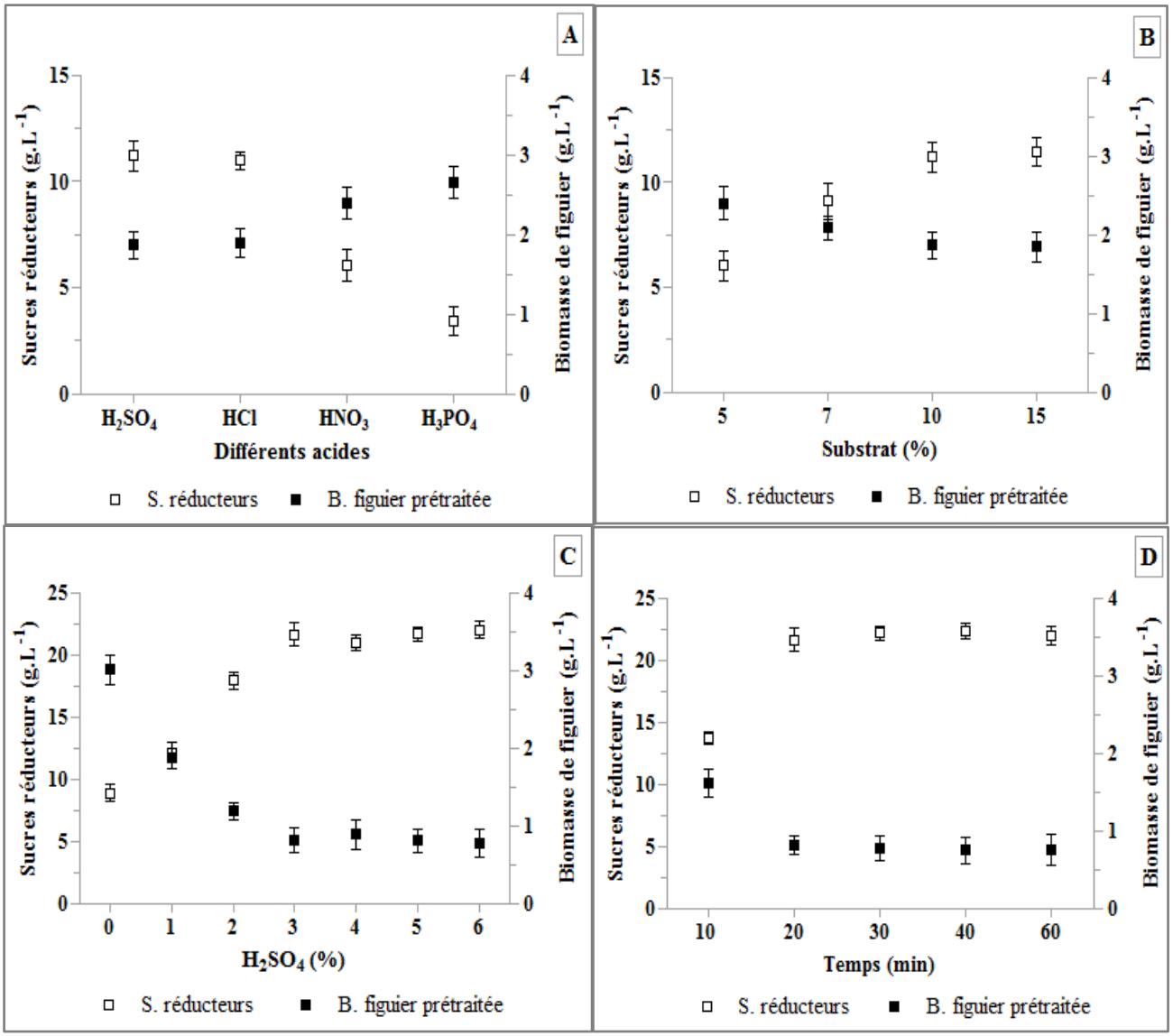


Figure 52: Biomasses de résidus solides de figuier non traités et les sucres libérés au cours de l'hydrolyse acide des échantillons de peau de figuier avec différents : (A) types d'acides ; (B) concentration de substrat % (p/v) ; (C) concentration d'acide sulfurique % (v/v) et (D) temps d'hydrolyse

Cependant, Guevara-Figueroa et al., (2010) ont déterminé une teneur en composés phénoliques de 2 à 20 $mg.g^{-1}$ de dix variétés de cactus (figuier de Barbarie sauvage ; *Opuntia* spp). Pourtant, Kuloyo et al., (2014) ont également rapporté une valeur proche du SRT de 22,6 $mg.mL^{-1}$, après un prétraitement acide des cladodes OFI avec un rapport S/L de 3,36, 1,5% H_2SO_4, à 121 °C pendant 50 min. Une autre étude de Santos et al., (2016) a signalé des valeurs de SRT allant de 19,18 à 26,36 $mg.mL^{-1}$ pour trois variétés de cactus dans les mêmes conditions d'hydrolyse acide (rapport 13,33, 1% H_2SO_4, 121 °C pour 60 min). Cela suggère que les sucres obtenus après le prétraitement peuvent varier selon le ratio de substrat S : L initial, le type de prétraitement et les traitements subséquents selon Adeboye et al., (2014), Qin et al., (2016) et Texco-López et al., (2018). Et même, les types de variété d'espèce végétale, l'âge et le temps de récolte peuvent affecter la quantité de sucres produits, comme indiqué par Stintzing et Carle, (2005).

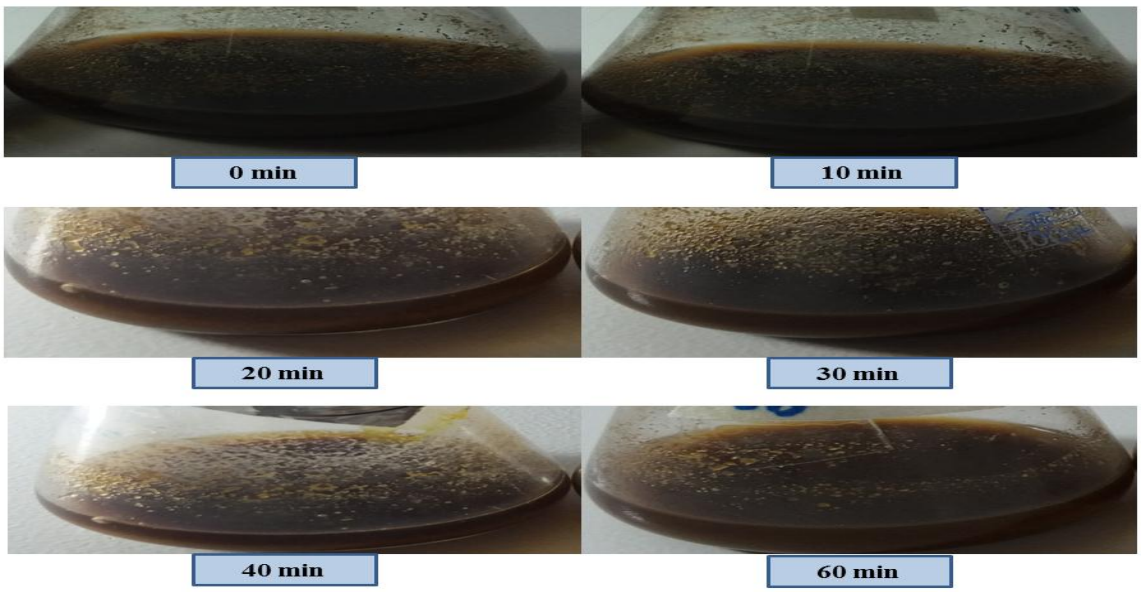


Figure 53: Aspect des hydrolysats de figuier prétraités avec 3% d'acide sulfurique pour une charge en solide de 10% à 121°C pendant différentes périodes d'incubation

Sur la base des résultats de l'optimisation du prétraitement acide, on a obtenu une amélioration considérable des rendements en sucres libérés, avec un pourcentage d'hydrolyse de 74,54% de la peau de figuier. Sur cette fraction hydrolysée nous avons pu observer un mélange de sucres et d'autres composants comme : des composés phénoliques, des protéines, des lipides et des pigments etc…Tel que mentionné par Agbor et al., (2011). Cela est conforme aux résultats de Texco-López et al., (2018) qui a rapporté un pourcentage d'hydrolyse de 74,65% de la farine de cladodes OFI avec des conditions optimales pour la libération de 20,825 ± 0,128 $mg.mL^{-1}$ de SRT pour un rapport de 1:15 de biomasse et de 3,47% d'H_2SO_4 pendant 27,25 min à 121 °C. Dans d'autres études d'Alencar et al., (2018) et de Souza Filho et al., (2016) ont indiqué 60% d'hydrolyse de *Nopalea cochenillifera* avec une charge de 30% de biomasse solide et un rendement de libération de sucre total de 57% avec *Opuntia* sp. et 61% avec *Nopalea* sp. après une hydrolyse acide alcalin. Toutefois, seuls 19,1% des sucres sont libérés par hydrolyse acide des cladodes OFI (Astello-García et al., 2015).

Selon Shen et Wyman, (2011), pendant l'hydrolyse avec le H_2SO_4 la plupart des hémicellulose peuvent être solubilisées, de même qu'une légère quantité de cellulose et de lignine. A partir des résultats, la valeur de récupération du solide est de 25,45% avec un rendement en SRT de 2,92% pour 10% de la peau de figuier hydrolysée avec 3% H_2SO_4. Cette valeur de récupération de solide est inférieure à celle de 49,8% obtenue après une hydrolyse acide des tiges d'*Opuntia ficus-indica* par 5% de H_2SO_4 avec un rendement du SRT de 2,4%, comme noté par Udeh et Erkurt, (2017). Cependant, cette diminution de la valeur de récupération solide montre que le prétraitement acide pourrait dégrader et solubiliser les composés lignocellulosiques tels que l'hémicellulose, ceci augmente l'accessibilité de la cellulose par les cellulases. Le prétraitement à l'acide sulfurique dilué à moins de 4% est considéré comme un procédé économique, cet acide offre le rendement d'hydrolyse le plus élevé parmi les divers prétraitements physico-chimiques selon Idrees et al., (2014).

En revanche, Saliu et Sani, (2012) ont signalé qu'au cours de l'hydrolyse acide, la production de produits de dégradation toxiques tels que : le furfural et l'hydroxyle méthyl furfural qui interagissent avec la saccharification enzymatique avant l'étape de la fermentation alcoolique. Après un prétraitement acide de la peau de figuier, l'hydrolysat produit peut contenir un mélange de monosaccharides (glucose, galactose, arabinose, xylose) et d'oligosaccharides, comme mentionné par Pérez-Cadena et al., (2018).

Une analyse chromatographique d'hydrolysat d'*Opuntia ficus indica* a montré la présence d'oligosaccharides tels que : la xylotriose, la xylotétrose, la xylopentose, la xylobiose, le maltose et les monosaccharides avec des valeurs variables en fonction des conditions de prétraitement employées. Qing et al., (2013) ont constaté qu'après le prétraitement acide de la biomasse lignocellulosique, les oligosaccharides sont obtenus en éliminant la perte insoluble d'hémicellulose à la surface des micro-fibrilles des molécules de cellulose en produisant des oligosaccharides solubles.

Selon l'étude de Pérez-Cadena-R et al., (2018) ont mentionné que la concentration maximale de glucose (4,5 $g.L^{-1}$) est obtenue avec la charge solide de 10% de la farine de figuier traitée avec une concentration d'acide de 5%. D'autre part, Kuloyo et al., (2014) ont rapporté une concentration en sucre de 7,4 $g.L^{-1}$ avec 30% de la farine d'*O.ficus-indica* traitée avec 1,5% de H_2SO_4. Ceci démontre que la quantité de sucres (monosaccharides et oligosaccharides) est proportionnelle à la quantité de solides et d'acides utilisés dans le prétraitement. Toutefois, Akanni et al., (2014) ont montré que les états de traitement peuvent modifier la concentration des composés libérés durant l'étape d'hydrolyse. En général, la quantité de SRT est augmentée avec le temps et la concentration d'acide utilisé dans le prétraitement acide tel que cité par Akpinar et al., (2009). Pourtant, Dagnino et al., (2013) et Sun et al., (2016) ont signalé que la concentration de monosaccharides augmente si l'hydrolyse acide est combinée à des traitements enzymatiques.

IV.2. Optimisation du prétraitement fongique

La figure 54 illustre l'interaction entre le nombre d'inoculum, la quantité de sucres libérés, la biomasse de fongique produite et la biomasse de figuier non-hydrolysée. Par ailleurs, l'objectif principal de cette section consiste à d'évaluer l'effet des endophytes fongiques comme prétraitement biologique pour sa combinaison dans la partie suivante avec une hydrolyse enzymatique sans masquer l'influence de chaque endophyte sur la peau de figuier.

La variation du nombre d'inoculum et des espèces fongiques utilisées a également été étudiée comme des facteurs importants qui peuvent être optimisés pour une meilleure libération des sucres fermentescibles. La concentration optimale pour une libération de sucre maximale est déterminée.

Selon les résultats, la figure 54 (A) montre une différence significative dans la libération de sucres tout en faisant varier le nombre d'inoculum des endophytes sélectionnés de 1 à 10 disques. La quantité de sucres libérés par le consortium JO-A et JO-V_2 est de plus de 97% à 100% supérieure à celle obtenue avec le prétraitement par chaque endophyte seulement (Figure 54 A). Cependant, avec six disques comme inoculum, la quantité de sucres libérés par le consortium est significativement la plus élevée des différentes suspensions prétraitées avec une valeur de 24,81 ± 1,07 $g.L^{-1}$ de sucres réducteurs pour 100 g de peau de figuier (Figure 54 A et

Figure 55). En parallèle, la biomasse fongique avec le consortium a montré des valeurs supérieures en augmentant le nombre d'inoculum, par une quantité en poids sec de 5,4 ± 0,16 $g.L^{-1}$ avec six fragments de mycélium (Figure 54 C). En revanche, la biomasse de figuier non hydrolysée diminue avec une augmentation de la quantité d'inoculum utilisée de 0,6 ± 15 $g.L^{-1}$ pour les six fragments d'endophytes (Figure 54 B). Ces quantités de résidus cellulosique non hydrolysés diffèrent selon les conditions de prétraitement, comme mentionné par Idrees et al., (2014).

D'après les résultats, le prétraitement fongique a également amélioré la libération des sucres avec un taux élevé d'augmentation de 12% par rapport à la biomasse traitée avec 3% d'acide sulfurique dilué d'une valeur de 22,14 ± 0,5 $g.L^{-1}$.

Pourtant, le prétraitement avec chaque endohyte séparé est significativement élevé avec un nombre d'inoculum de seulement 4 fragments de mycélium, pour une suspension prétraitée avec l'endophyte JO-A d'une valeur de 14,72 ± 0,72 $g.L^{-1}$ de sucres réducteurs par 100 g de biomasse. Par contre, pour les suspensions prétraitées avec l'endophyte JO-V_2 seul ou bien prétraitée avec le consortium, 6 fragments de mycélium sont optimisés pour une libération maximale de sucres de 11,54 ± 0,75 $g.L^{-1}$, 24,81 ± 1,07 $g.L^{-1}$, respectivement, pour 100 g de peau de figuier autoclavée (Figure 54 A). Cependant, à une forte concentration d'inoculum ≥ à 8 fragments (1cm), la quantité de sucres mesurée dans le milieu diminue avec l'augmentation du nombre d'inoculum utilisé pour les suspensions testées. Parallèlement, la biomasse des résidus solides non hydrolysés diminue alors que la quantité d'inoculum pour les suspensions augmente, avec la valeur la plus faible de 0,49 ± 0,18 $g.L^{-1}$ obtenue pour la suspension prétraitée avec le consortium par 10 fragments de mycélium (Figure 54 B).

Cependant, la biomasse fongique dans toutes les suspensions prétraitées est plus ou moins stable avec le nombre d'inoculum ≥ à 6 fragments de mycélium (Figure 54 C). Ceci, peut être expliqué qu'avec l'augmentation du nombre d'inoculum ≥ à 8 fragments de mycélium, toute la quantité de sucres libérés après la dégradation du figuier est dirigée vers la croissance des endophytes. Selon l'étude de Kumar et Kanwar (2012), la grande taille de l'inoculum affecte la croissance fongique et réduit la biosynthèse des enzymes hydrolytiques dans des conditions alimentaires limitées, diminuant ainsi la quantité de sucres libérés. Cela concorde avec l'étude de Tai et al., (2019) qui a confirmé que la grande taille de l'inoculum peut nuire à la prolifération fongique accompagnée d'une faible production d'enzymes hydrolytiques et d'une faible libération de sucres fermentescibles.

Pourtant, ce processus biologique améliore l'étape de la saccharification enzymatique en modifiant et en éliminant la lignine, afin d'augmenter le niveau d'hydrolyse enzymatique de la cellulose ou de l'hémicellulose pour obtenir des sucres fermentescibles. Comme indiqué par Zabin et al., (2017). Ainsi, la réduction de la cristallinité de la cellulose par les endophytes fongiques augmente la porosité de la matière végétale. Tel qu'il est mentionné par Saliu et Sani, (2012). Cependant, ce prétraitement fongique facilite l'accès à la biomasse lignocellulosique en permettant d'extraire et d'utiliser plus facilement les sucres. Comme mentionné par Martín-Sampedro et al., (2017).

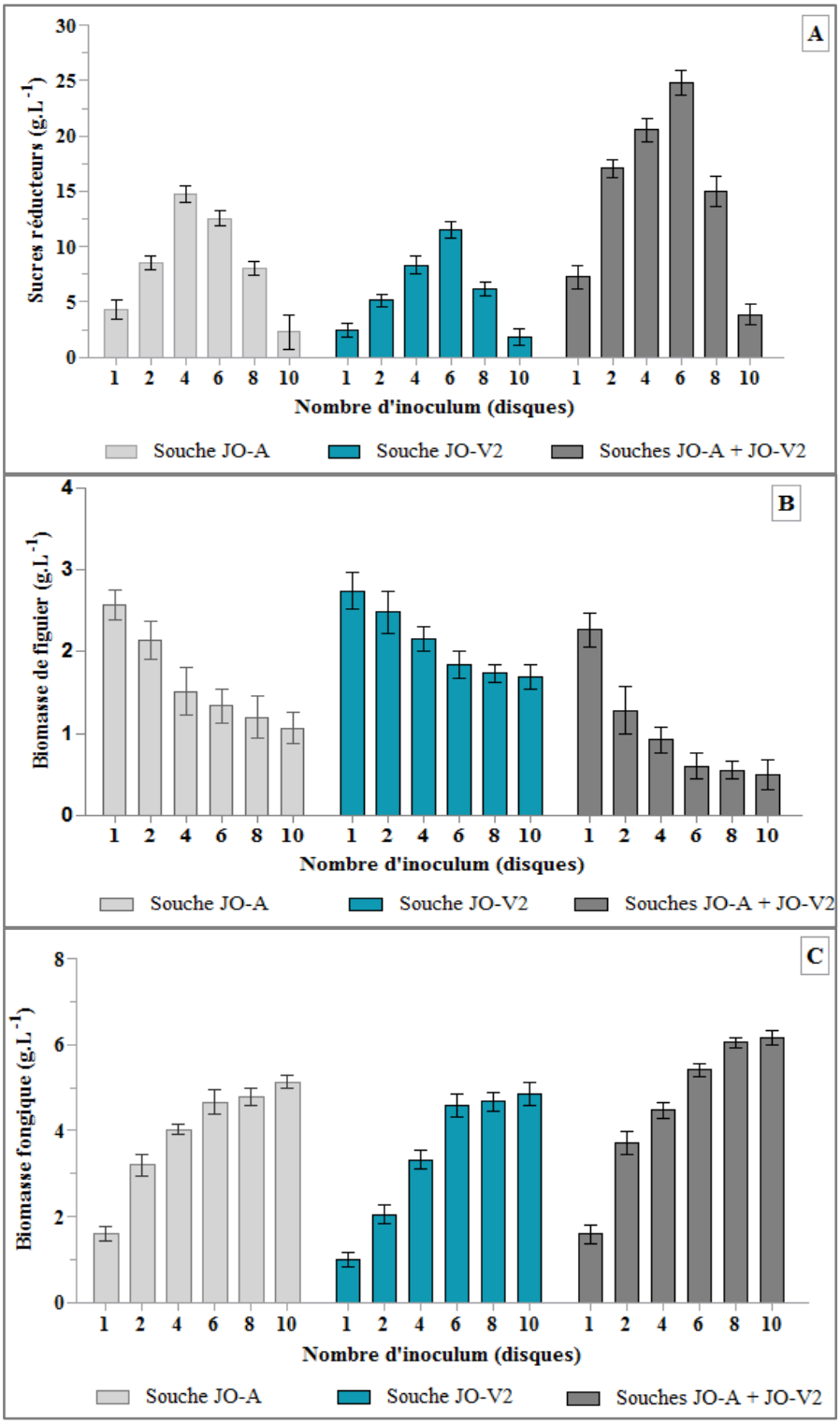


Figure 54: Effet de la variation du nombre d'inoculum au cours du prétraitement fongique de la peau de figuier non supplémentée avec des souches sélectionnées sur la libération de sucres (A), la biomasse solide de figuier non hydrolysée (B) et la biomasse fongique (C) à 28 °C pendant 10 jours

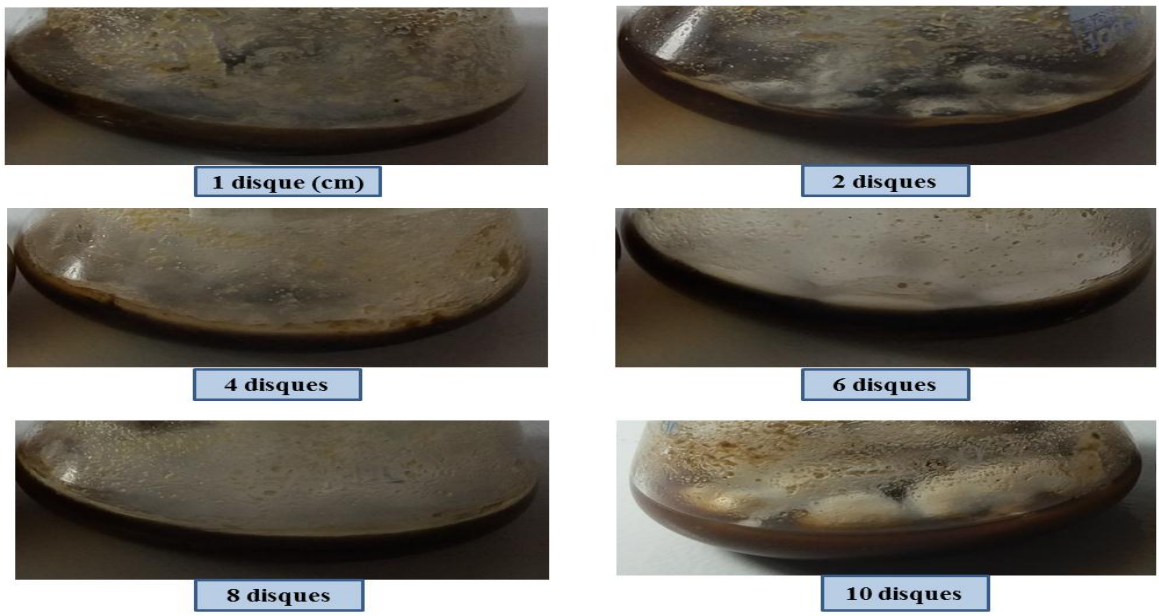


Figure 55: Aspect de la culture en consortium (JO-A + JO-V_2) avec variation du nombre d'inoculum pendant le prétraitement fongique de la peau de figuier à 28 °C durant 10 jours

Les résultats du prétraitement fongique indiquent que non seulement une différence dans le nombre d'inoculum a produit différentes quantités de sucres fermentables, mais le prétraitement avec différentes souches fongiques a provoqué des changements dans la concentration des sucres libérés. Pourtant, la taille inférieure de l'inoculum a exigé une période d'incubation plus longue pour que les endophytes fongiques se multiplient en nombre suffisant, afin de sécréter des enzymes hydrolytiques qui dégradent la peau de figuier. Mais l'augmentation du nombre d'inoculum permet une synthèse et une prolifération rapides de la biomasse fongique. Cependant, un équilibre approprié entre la biomasse de prolifération et les aliments disponibles est très important et a donné un optimum de synthèse des enzymes, ceci aboutit à un maximum de sucres libérés (Sun et al., 2010).

Selon les résultats, la quantité de sucre mesurée dans la suspension prétraitée avec le consortium de JO-A et JO-V_2 pendant 5, 10, 15, 20, 25 et 30 jours est de 14,52 ± 1,04, 24,81 ± 1,07, 19,26 ± 1,95, 13,07 ± 1,41, 5,38 ± 1,00 et 0,95 ± 0,56 $g.L^{-1}$, respectivement, par 100 g de la peau de figuier. La plus grande quantité de sucres est optimisée à une durée d'incubation maximale de 10 jours (24,81 ± 1,07 $g.L^{-1}$), suivi d'une période de prétraitement de 15 jours et du moins long de 30 jours (Figure 56). Au fur et à mesure que le temps de prétraitement passe de 1 à 10 jours, la libération de sucres augmente d'un taux supérieur à 100% par rapport aux premiers jours d'incubation. Parallèlement, la biomasse fongique augmente avec l'allongement du temps d'incubation d'une valeur de 7,33 ± 0,38 $g.L^{-1}$ au 30ème jour. En revanche, la biomasse solide des résidus non hydrolysés diminue graduellement de 5 à 30 jours et sa valeur est de 0,22 ± 0,12 $g.L^{-1}$ à 30 jours (Figure 56). Cela indique que le prétraitement fongique a effectivement réduit la teneur en lignine du substrat, avec un pourcentage plus ou moins élevé de délignification à l'aide des enzymes sécrétées par l'endophyte ligninolytique JO-V_2. Ceci rend la structure plus lâche pour faciliter l'accessibilité et améliorer la digestibilité des composés cellulosiques avec l'endophyte cellulolytique *P. africana* JO-A.

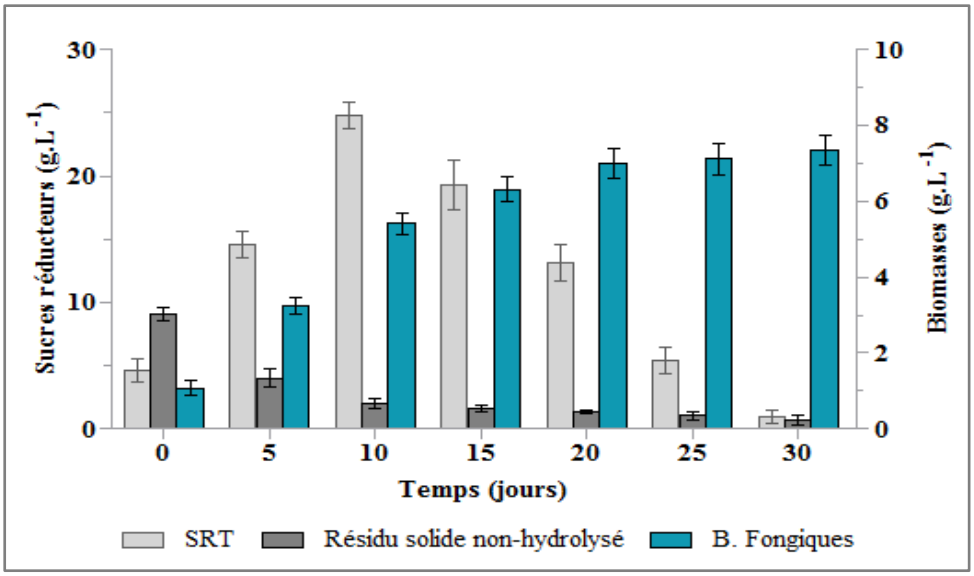


Figure 56: Quantités de biomasses et de sucres libérés au cours du prétraitement fongique avec la combinaison des souches JO-A et JO-V_2 pendant 30 jours à 28 °C

Cependant, d'après les résultats, la concentration de composés phénoliques au 10ème jour est de 0,184 ± 0,05 g.g^{-1} par 10% de peau prétraitée, avec un taux de diminution de 53% par rapport à la concentration de polyphénols obtenue après le prétraitement acide de la peau de figuier.

Par contre, Pérez-Cadena-R et al., (2018) ont signalé une concentration de 0,0178 g.g^{-1} de composés phénoliques pour le traitement des cladodes de figuier avec 10% de la charge en solide. Au temps de prétraitement de 15 à 30 jours, la quantité de sucres diminue de 19,26 ± 1,95 à 0,95 ± 0,56 g.L^{-1}. Il s'agit d'une consommation progressive de sucres facilement accessibles (glucides) libérés pour la croissance des endophytes fongiques utilisés dans ce prétraitement en tant que source de carbone. C'est la raison pour laquelle ils ne sont pas détectés à la fin du traitement, comme mentionné par Martín-Sampedro et al., (2017).

Toutefois, sur la base des résultats, cette réduction significative de la teneur en sucre est observée lorsqu'on compare la quantité de sucre le 10ème jour avec celle obtenue après le dernier jour de prétraitement fongique. Ainsi, qu'une accumulation de substances toxiques est possible en raison de l'augmentation du nombre des endophytes fongiques dans le milieu, qui peut inhiber l'action fongique et la libération d'enzymes hydrolytiques. Cependant, une consommation complète de substances organiques biodégradables solubles peut être observée au cours de la période d'incubation anaérobie. Tel qu'indiqué par Gerardi, (2003) et Belay et al., (2021).

Dans cette étude, 10 jours est le meilleur moment pour le prétraitement fongique pour la dégradation de la peau de figuier et la libération d'une quantité maximale de sucres fermentescibles. Cependant, une incubation supplémentaire avec des endophytes fongiques ne présente aucun avantage supplémentaire par rapport à la libération de sucres fermentables.

A partir des résultats de l'optimisation du prétraitement fongique avec le consortium, une hydrolyse de 78,03% de la poudre de peau de figuier est obtenue, avec un taux d'augmentation de 4% par rapport au résultat de l'hydrolyse donnée par prétraitement acide. Ce pourcentage de dégradation de la peau de figuier obtenu avec les endophytes JO-A et JO-V_2 peut être acceptable

pour le prétraitement de ce type de biomasse lignocellulosique. Tel que noté par Texco-López et al., (2018).

Selon les résultats, la quantité de 10% de peau de figuier prétraitée avec des endophytes JO-A et JO-V_2 a donné une valeur de récupération solide de 21,96%, d'un taux diminution de 13%, par rapport à la valeur de récupération solide obtenue après prétraitement acide de la même quantité de figuier. Puis, un rendement en SRT calculé sur la base du poids des sucres libérés au cours du prétraitement fongique est d'une valeur de 3,55%, avec un taux d'augmentation de 21% par rapport au rendement en SRT déduit après l'hydrolyse acide. Cette faible valeur de récupération de solide peut être liée à la dégradation de l'hémicellulose en monosaccharides et à la dissolution partielle de la lignine et des composants solubles. Tel que rapporté par Udeh et Erkurt, (2017). Et même, à la dégradation des pectines dans la paroi cellulaire de la peau de figuier qui produit en parallèlement des sucres, telles que : le glucose, l'arabinose, la xylose, le galactose ou la rhamnose. Comme indiqué par Ginestra et al., (2009) et Pena-Valdivia et al., (2012).

D'autre part, il y avait peu de recherche sur l'utilisation de la peau de figuier comme biomasse lignocellulosique, ainsi que leur prétraitement fongique et acide. Cette perte agricole (peau de figuier) hydrolysée avec les endophytes sélectionnés en consortium a produit une variété de sucres fermentables, ainsi que leurs produits de dégradation, par la modification de la structure de la lignine et l'amélioration de la biodégradabilité des composés cellulosiques.

Selon, de Souza Filho et al., (2016) la réduction de la teneur en lignine dans la biomasse lignocellulosique augmente la convergence des polysaccharides en sucres fermentables pendant le processus de digestion anaérobie. Cela concorde avec d'autres travaux sur diverses espèces végétales, y compris les cactus, qui sont dégradés par des espèces nectrotrophiques. Par exemple, *Pectobacterium* et *Dickeya* qui provoquent la pourriture molle, en sécrétant par la voie de type II une gamme d'enzymes hydrolytiques dégradant les parois cellulaires. Tel qu'il a été signalé par Hugouvieux-Cotte-Pattat, (2016) , Motyka et al., (2017) et Valenzuela-Soto et al., (2015).

Cependant, le prétraitement de la peau de figuier avec des endophytes fongiques cellulolytiques et ligninolytiques semble être un processus moins coûteux, écologique et plus efficace pour améliorer et valoriser à la fois la libération de sucres fermentescibles et la biodégradation de la matière lignocellulosique.

V. Hydrolyse enzymatique du substrat traité et non traité

Pour produire un hydrolysat enzymatique de la peau de figuier et évaluer l'effet du traitement enzymatique sur les rendements de saccharifications, une hydrolyse enzymatique est appliquée aux échantillons résultant des différents prétraitements acides, fongiques et non traités, sans séparer la fraction liquide des insolubles.

Sur la base des résultats, avant l'hydrolyse enzymatique, il existe deux types de suspensions prétraitées. Le prétraitement fongique de la peau de figuier avec l'endophyte cellulolytique JO-A et ligninolytique JO-V_2 a montré une augmentation de la concentration en sucres libérés de 24,82 ± 1,6 $g.L^{-1}$ équivalant à la biomasse traitée à l'acide qui est de 22,14 ± 0,5 $g.L^{-1}$, avec un taux d'augmentation de 12% (Figure 57 A). En revanche, la biomasse de figuier non prétraitée

(fongique ou acide) et non hydrolysée avec l'enzyme a montré de très faibles quantités de sucres fermentescibles d'une valeur de 8,88 ± 0,66 $g.L^{-1}$.

Les biomasses de figuier prétraitées et non traitées sont soumises à une saccharification enzymatique avec une quantité fixe d'un mélange d'enzymes hydrolytiques industrielles et produites pendant 24 heures d'hydrolyse enzymatique. Neuf types d'hydrolysat enzymatique sont obtenus. Le dosage des sucres réducteurs totaux dans les hydrolysats a révélé que le bio-prétraitement fongique avec JO-A et JO-V_2 effectué avant l'hydrolyse enzymatique de la peau de figuier a montré une augmentation de la concentration en sucre libérés de 57,67 ± 2,5 $g.L^{-1}$ par rapport à la biomasse traitée avec l'acide de 53,42 ± 3,9 $g.L^{-1}$, d'une augmentation de 8% des sucres libérés après le traitement enzymatique. En outre, la peau de figuier non traitée a montré de faibles concentrations de sucres après la réaction d'hydrolyse enzymatique pour différentes combinaisons d'enzymes hydrolytiques.

Cependant, une valeur de 35,24 ± 4,6 $g.L^{-1}$ est donnée avec un mélange d'enzymes industrielles et produits, avec une réduction de 51% de la concentration des sucres libérés par rapport à la biomasse traitée à l'acide et 63% par rapport à la peau de figuier prétraitée avec des endophytes fongiques. En revanche, la biomasse solide non hydrolysée après la saccharification par différentes combinaisons d'enzymes a présenté de faibles valeurs pour les biomasses préalablement traitées par rapport à la biomasse non traitée. Une saccharification avec un mélange d'enzymes a montré de petites quantités de résidus avec une valeur de 0,350 ± 0,08 $g.L^{-1}$ pour la biomasse traitée avec endophytes fongiques et avec une valeur de 0,385 ± 0,084 $g.L^{-1}$ pour la biomasse traitée à l'acide, d'un taux de diminution dépasse 100% par rapport la biomasse non traitée (1,43 ± 0,12 $g.L^{-1}$) (Figure 57 B).

Promputtha et al., (2010) et Rahikainen et al., (2013) ont signalé que la teneur en lignine et sa répartition sur la biomasse lignocellulosique inhibent l'hydrolyse enzymatique, en limitant physiquement l'accès à la cellulose et l'absorption réversible/irréversible des enzymes hydrolytiques sur la lignine. En outre, l'attaque de la lignine est essentielle pour une efficacité de l'hydrolyse enzymatique des polysaccharides des parois végétales, mais la dégradation complète de la lignine n'est pas toujours corrélée aux niveaux plus élevés de digestibilité de la cellulose et de l'hémicellulose. Tel que rapporté par Salvachua et al., (2011) , Martin-Sampedro et al., (2015) et Cianchetta et al., 2014.

Selon les résultats, lorsque l'hydrolyse enzymatique est effectuée, tous les endophytes fongiques utilisés pour le prétraitement biologique augmentaient la saccharification par rapport aux échantillons hydrolysés par l'acide, dont la digestibilité des sucres fermentescibles est la plus élevée. Cependant, le prétraitement fongique de la peau de figuier avec le consortium d'endophytes s'est avéré être la condition la plus optimale, car la saccharification ultérieure a démontré une efficacité maximale dans la libération de sucres et la dégradation de la biomasse. Cela prouve que les deux endophytes en consortium peuvent stimuler le processus de la saccharification. Ces résultats sont confirmés par Dias et al., (2010), qui ont rapporté que l'hydrolyse enzymatique est améliorée grâce au prétraitement fongique avant la saccharification, en décomposant le complexe lignine-glucides et en améliorant la porosité de la biomasse lignocellulosique. Cela entraîne une meilleure absorption des enzymes hydrolytiques cellulases sur la cellulose. Comme l'on signalé Deswal et al., (2014).

D’autres travaux de Fillat et al., (2017) ont également montré que le prétraitement fongique améliore et stimule le processus de saccharification en produisant des modifications de la lignine par hydroxylation, dé-méthoxylation et raccourcissement des chaines latérales sans réduire la teneur en lignine. Cela réduit la liaison non productive des enzymes hydrolytiques.

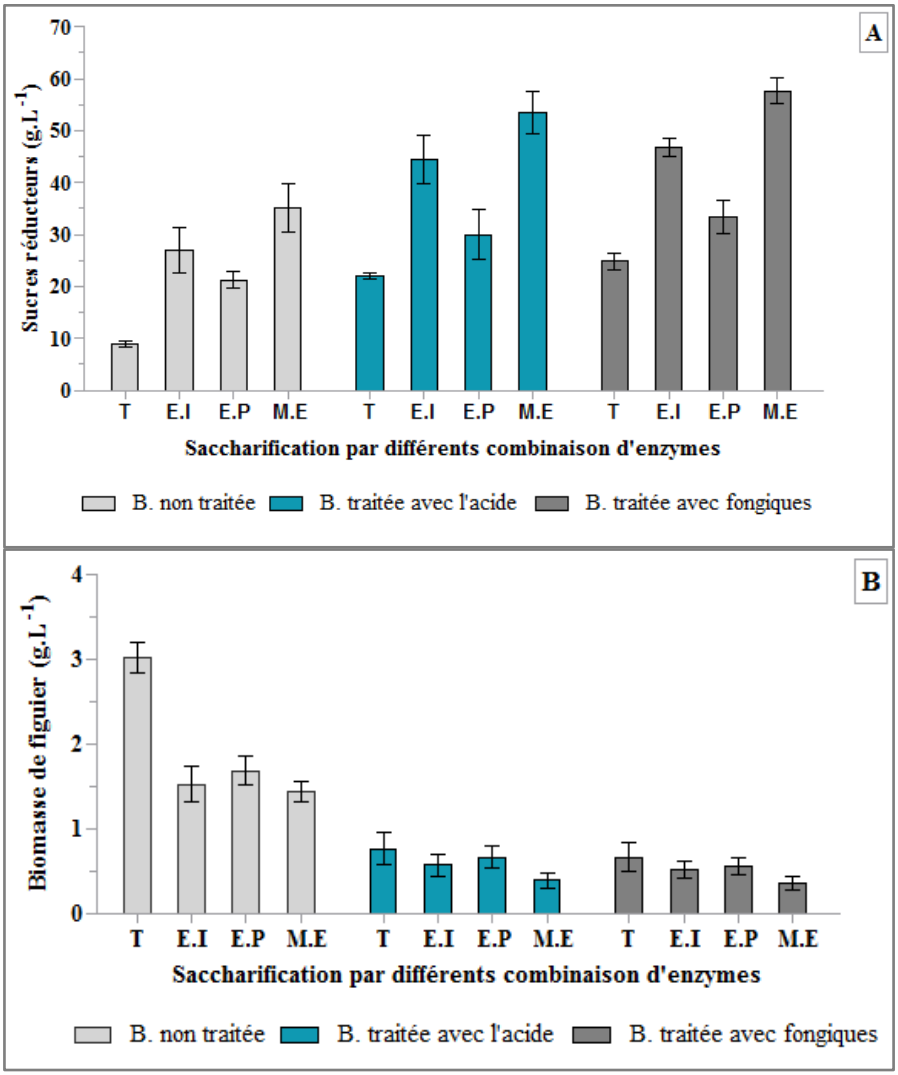


Figure 57: Dégagement de sucres (A) et de biomasse de résidus non hydrolysés (B) après hydrolyse enzymatique de différentes biomasses avec 20 IU.g^{-1} d’enzyme pendant 24 heures. T : biomasse non hydrolysée par les enzymes ; E.I : B. hydrolysé avec les enzymes industrielles IU.g^{-1} ; E.P : B. hydrolysé avec des enzymes produites par les endophytes fongiques isolés IU.g^{-1} ; M.E : B. hydrolysé avec mélange d’enzymes industrielles et produits IU.g^{-1}

Une fois que la combinaison la plus appropriée est sélectionnée, une optimisation d’hydrolyse enzymatique est réalisée afin de maximiser la récupération des sucres.

La réaction enzymatique est effectuée à intervalles réguliers à l’aide d’un mélange d’enzymes hydrolytiques, afin de déterminer la concentration optimale de l’enzyme et le temps optimal pour la digestion maximale de la peau de figuier par les cellulases.

D’après les résultats, la figure 58 (A) montre que la quantité de sucres augmente avec l’augmentation de la concentration des enzymes ajoutées et avec le temps d’incubation. Pour les concentrations 10 et 15 IU.g-^{1}, la quantité de sucres augmente graduellement avec le temps

d'incubation et atteint un maximum de 42,72 ± 1,12 et 52,97 ± 1,74 $g.L^{-1}$, respectivement, après 72 heures d'hydrolyse. En revanche, avec la concentration de 20 $IU.g^{-1}$, une quantité élevée de sucres réducteurs sont obtenus au cours des 24 heures, puis lentement augmenté et atteint un maximum à 48 heures pour 64,15 ± 1,98 $g.L^{-1}$ de sucres et 0,25 ± 0,08 $g.g^{-1}$ de composés phénoliques, puis la teneur en sucre reste stable jusqu'à 72 heures.

Cependant, pour la concentration de 25 $IU.g^{-1}$, la figure 58 (A) a montré qu'avec le temps d'incubation, la quantité de sucres libérés augmente d'une valeur maximale de 64,32 ± 2,20 $g.L^{-1}$ pendant 38 heures et qu'après 48 heures, il n'y a aucune différence significative dans la quantité de sucres observée dans l'hydrolysat. Cela, peut être expliqué par la présence d'une large gamme de substrats qui ont empêché les activités des enzymes hydrolytiques, comme : les sucres fermentescibles (glucose), les dérivés de furfural et les composés phénoliques. Tel que déclaré par Sun et al., (2016). En entraînant ainsi, une faible concentration de SRT avec la prolongation de la durée de l'hydrolyse, comme indiqué par Gonzalez-Bautista et al., (2017). Cela réduit l'efficacité de la saccharification et inhibe les enzymes saccharifiantes par les produits finals, comme indiqué par Choudhary et al., (2017).

La quantité maximale de sucres obtenue dans cette étude (64 $g.L^{-1}$) est supérieure à celle donnée par Udeh et Erkurt, (2017) de 32,47 $g.L^{-1}$ de sucres réducteurs totaux après la saccharification des cladodes d'*Opuntia ficus-indica* prétraités dans les conditions maximales de 25 FPU g^{-1}, charge des solides de 10% et pH de 4,8 pendant 72 heures à 50 °C. Et même, pour le substrat de noix de coco mésocarpe traité et sacharifié avec un rendement en sucre de 516 $mg.g^{-1}$ tel qu'indiqué par Soares et al., (2016). Pourtant, les valeurs obtenues sont conformes aux valeurs des hydrolysats enzymatiques des deux variétés de cactus qui ont formé plus de 60 $g.L^{-1}$ de sucres durant 24 heures d'hydrolyse avec une charge de cellulase de 10 $FPU.g^{-1}$, selon Alencar et al., (2018).

Selon les résultats, la figure 58 (B) montre une diminution graduelle de la quantité de résidus solides non hydrolysés avec une augmentation de la concentration d'enzymes et la prolongation de la durée d'incubation. Les quantités de résidus solides diminuent de 0,5 ± 0,1 et 0,41 ± 0,12 $g.L^{-1}$, respectivement, pour des concentrations de 10 et 15 $IU.g^{-1}$ après 72 heures de saccharification. Bien que fortes concentrations des enzymes 20 et 25 $IU.g^{-1}$ présentent une diminution de la biomasse de résidus après seulement 24 heures d'hydrolyse, avec des valeurs très faibles de 0,09 ± 0,02 et 0,075 ± 0,033 $g.L^{-1}$ de peau non hydrolysée, respectivement, après 72 heures d'hydrolyse avec un taux de diminution supérieur à 100%. Pourtant, la valeur de récupération du solide après la saccharification de figuier avec 20$IU.g^{-1}$ d'enzymes est de 15,15%, comparé au poids sec de la peau de figuier prétraitée avec des endophytes fongiques. Avec un taux d'augmentation de 58% par rapport à la valeur de récupération de solide obtenue après le prétraitement fongique seulement et 92% par rapport au taux de récupération de solide calculé à partir du poids sec de figuier traitée à l'acide seulement, et un rendement en SRT de 5,6% calculé à partir du poids du sucre après l'hydrolyse enzymatique. Les résultats de la saccharification avec le mélange d'enzymes ont montré une conversion de figuier de 87,47% après 48 heures d'hydrolyse, avec une efficacité hydrolytique de 83,65%.

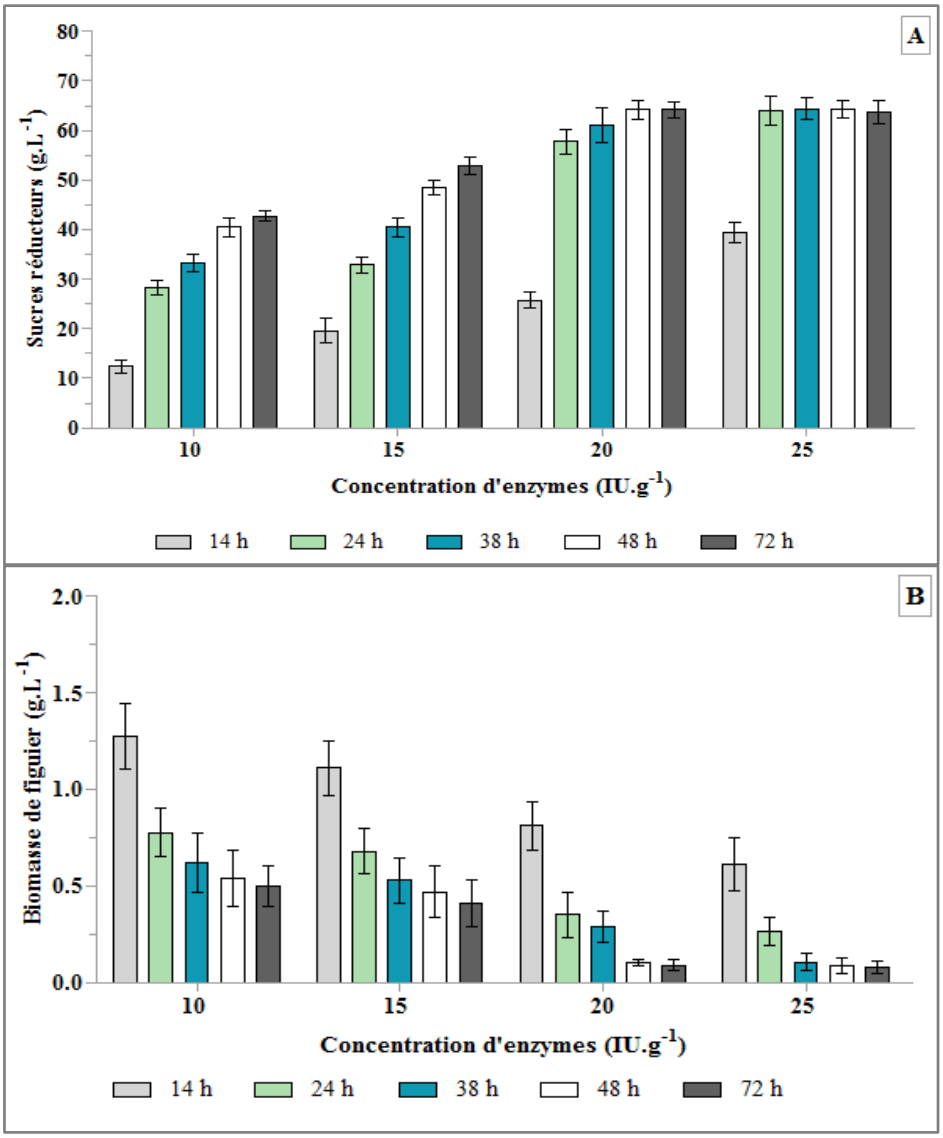


Figure 58: Effet de la concentration des enzymes et de la période d'hydrolyse sur le dégagement de sucres (A) et la biomasse des résidus non traités (B)

En revanche, la valeur de conversion du substrat obtenue après l'hydrolyse de figuier est plus élevée que celle donnée par de Almeida et al., (2011), qui ont montré une conversion de 63% de bagasse de canne à sucre après 110 heures d'hydrolyse enzymatique. Le mélange des sucres et des oligosaccharides présents dans les hydrolysats saccharifiés, comme : le glucose, le fructose, l'arabinose et le xylose, nécessite des levures qui possèdent la capacité métabolique de convertir les sucres fermentescibles en éthanol, comme l'ont mentionné Pérez-Cadena-R et al., (2018). Cependant, la libération de sucres réducteurs à chaîne courte après la dégradation des matières lignocellulosiques est fortement recommandé pour les applications industrielles et plus rentable avec l'utilisation d'enzymes non purifiés, moins coûteux à l'échelle industrielle. Tels que cités par Chen et al., (2020) et Li et al., (2018).

Par ailleurs, l'étude de Lee et al., (2012), a montré que la laccase d'*Yarrowia lipolytica* est utilisé dans l'hydrolyse enzymatique de la paille de riz pour décomposer les produits phénoliques et augmenter le rendement en saccharification en réduisant de 30 à 52% les composés phénoliques. Cela concorde avec les travaux de Kalyani et al., (2012), qui ont rapporté qu'une

élimination de 76% des composés phénoliques par la laccase produite à partir de *C. perennis* au cours du prétraitement de la paille de riz avec un rendement en saccharification de 48% pour l'hydrolyse enzymatique de la paille de riz traitée à la laccase. Pourtant, Martin-Sampedro et al., (2015) ont signalé que le prétraitement biologique avec les endophytes fongiques *Hormonema* sp. et *Ulocladium* sp. a amélioré les rendements d'hydrolyse enzymatique du bois d'*Eucalyptus globulus*.

L'optimisation de l'étape d'hydrolyse enzymatique à une charge moyenne en enzymes hydrolytiques, avec la combinaison de traitement biologique et de saccharification a également exploré une amélioration des taux de digestibilité du glucose et d'autres sucres fermentescibles. Dans ce contexte, l'objectif principal de cette partie est la réduction des coûts de transformation de la biomasse (peau de figuier) pendant la fermentation SHF avec un procédé écologique.

VI. Cinétiques de la production de bioéthanol dans un milieu chimiquement défini

La fermentation dans un milieu chimiquement défini à une concentration de 64 $g.L^{-1}$ de sucres (glucose) a servi de référence pour évaluer la capacité des trois levures à fermenter et à assimiler des sources de carbone similaires présentées dans l'hydrolysat de peau de figuier pendant 96 heures à 39 °C.

Sur la base des cinétiques réalisées, on observe que les souches *S. cerevisiae, K. marxianus* et *C. tropicalis,* consomment la majorité du glucose présent dans le milieu au des 24 premières heures d'incubation pour la croissance, tandis que les quantités d'éthanol sont libérées progressivement et détectées après 12 heures pour les trois souches. La production maximale d'éthanol est observée à 38 heures d'incubation pour les souches *S. cerevisiae* et *K. marxianus* et à 24 heures pour *C. tropicalis,* après que la production a atteint un plateau, puis a commencé à diminuer légèrement jusqu'à la fin de la fermentation pour la souche *S. cerevisiae* (Figure 59). En revanche, lors de l'évaluation de la capacité des trois souches a fermentée, la consomation de glucose en tant que seule source de carbone est complète après 72 heures d'incubation, tandis que la quantité d'éthanol détectée dans le milieu est graduellement diminuée aux temps d'incubation plus longs.

Ces résultats suggèrent que les souches ont très probablement changé leur métabolisme en consommant de l'éthanol pour l'entretion des souches de levure vivants. La levure qui a montré un meilleur comportement est *K. marxianus* avec la plus grande quantité d'éthanol produite et une efficacité de conversion très élevée.

Lors de l'évaluation de l'effet de substrat pour la synthèse de l'éthanol, la souche *C. tropicalis* a montré la plus forte production de biomasse avec un taux de croissance de 6,095 ± 0,06 $g.L^{-1}$ comparé aux autres souches étudiées et possède jusqu'à 4,44 ± 0,47 et 5,32 ± 0,06 $g.L^{-1}$ de biomasse sèche pendant 38 heures (Figure 59 et Tableau 22). Ceci suggère que la souche *C. tropicalis* est capable de métaboliser les sucres fermentescibles pour la formation de biomasse. Néonmoins; avec les souches *S. cerevisiae, K. marxianus,* bien que la croissance soit légèrement limitée, une meilleure quantité d'éthanol a été produite. Les trois souches de levure peuvent fermenter le glucose à une température élevée de 39 °C. L'efficacité de la production d'éthanol des souches est examinée pendant 96 heures.

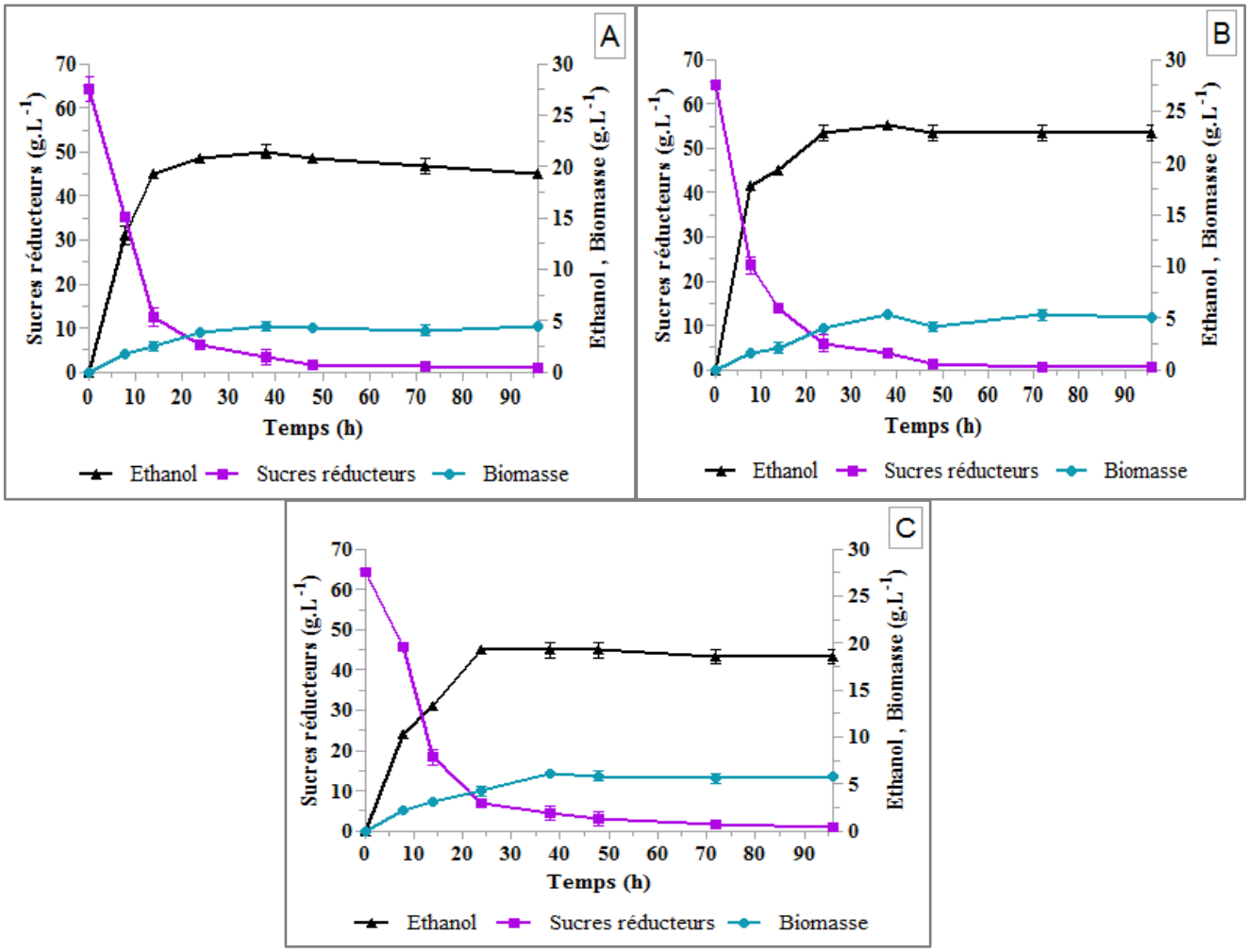


Figure 59: Profils de fermentation de trois souches de levure : (A) *S. cerevisiae* ; (B) *K. marxianus* et (C) *C. tropicalis*, dans un milieu synthétique contenant une concentration de glucose semblable à l'hydrolysat enzymatique de la peau de figuier

Les trois souches montrant une production d'éthanol différentielle avec des concentrations d'éthanol allant de 19,25 à 23,7 $g.L^{-1}$, des productivités de 0,5 à 0,62 $g.L.h^{-1}$, des rendements en éthanol de 0,32 à 0,39 $g.g^{-1}$ et une efficacité de fermentation de 63 à 76%. Il y a seulement de légères différences dans la production d'éthanol à 39 °C pour les trois souches de levure. Cependant, la souche *K. marxianus* est une levure avec une production maximale d'éthanol avec une concentration de 23,7 ± 0,37 $g.L^{-1}$, une efficacité de fermentation de 76%, une productivité de 0,62 $g.L.h^{-1}$ et un rendement supérieur de l'éthanol à 0,39 $g.g^{-1}$. Une légère diminution de l'efficacité de la fermentation est observée chez *S. cerevisiae* contre *K. marxianus.* Selon les études de Sree et al., (2000) et Atiya et al., (2017), des souches de levure capables de produire des rendements supérieurs à 0,33 $g.g^{-1}$, peuvent être sélectionnées pour d'autres expériences.

Cette fermentation dans un milieu chimiquement défini a servi de référence pour montrer la performance des trois souches de levure dans l'hydrolysat de figuier prétraitée. *S. cerevisiae* et *K. marxianus* ont produit une quantité d'éthanol comprise entre 21 et 23 $g.L^{-1}$ similaire à celle de *S. cerevisiae* Y-0528 et *K. marxianus* Y-2791 avec 25 $g.L^{-1}$ dans des conditions non-aérés. Comme l'ont mentionné Kuloyo et al., (2014).

Tableau 22: Paramètres de fermentation des trois souches de levure à 39 °C pendant 96 heures avec un milieu chimiquement défini

Paramètres	*S. cerevisiae*	*K. marxianus*	*C. tropicalis*
Sucres résiduels $g.L^{-1}$	3,47 ± 1,75	3,66 ± 0,06	4,45 ± 1,72
Ethanol $g.L^{-1}$	21,47 ± 0,73	23,70 ± 0,37	19,25 ± 0,84
Biomasse sèche $g.L^{-1}$	4,44 ± 0,47	5,32 ± 0,06	6,09 ± 0,06
Q_p d'éthanol $g.L.h^{-1}$	0,565	0,623	0,506
Qp biomasse $g.L.h^{-1}$	0,116	0,140	0,160
Rendement en éthanol sur les sucres utilisés $g.g^{-1}$	0,354	0,392	0,323
Rendement en éthanol sur les sucres totaux $g.g^{-1}$	0,335	0,370	0,300
Rendement en biomasse sur les sucres utilisés $g.g^{-1}$	0,073	0,088	0,102
Rendement en biomasse sur les sucres totaux $g.g^{-1}$	0,069	0,083	0,095
Efficacité de fermentation %	69,27	76,71	63,20

VII. Cinétique de la production de bioéthanol à partir de l'hydrolysat de peau de figuier sous SHF

Selon les résultats précédents, les trois souches sélectionnées *S. cerevisiae*, *K. marxianus* et *C. tropicalis* sont des thermotolérants éthanologènes dont la tolérance à l'éthanol exogène est ≥ à 8% et une osmotolérance élevées jusqu'à 32% de saccharose. Plus important encore, *K. marxianus* et *C. tropicalis* qui ont une tolérance à des composés phénoliques tels que : le catéchol et le pyrogallol, ainsi que la capacité d'utiliser différents acides comme : l'acide ascorbique, l'acide gallique et l'acide quercétine. *K. marxianus* et *C. tropicalis* peuvent assimiler différents sucres tels que : le lactose, le saccharose, le xylose, le galactose et le glucose (données non indiquées). Ces caractéristiques sont très importantes dans le processus de fermentation des biomasses lignocellulosiques prétraitées.

L'utilisation efficace de tous les sucres fermentescibles présents dans l'hydrolysat des matériaux lignocellulosiques est essentielle pour augmenter la rentabilité du bioéthanol. Par la suite, l'hydrolysat enzymatique de la peau de figuier supplémentée par une solution de sels minéraux est utilisée comme base du milieu de production d'éthanol pendant 96 heures. Selon les conditions environnementales utilisées, les souches de levure ont montrés des comportements intéressants avec des quantités d'éthanol et des rendements de conversion très élevés à partir d'un hydrolysat qui contient 64,52 ± 0,14 $g.L^{-1}$ de sucres fermentescibles.

Selon les résultats, la production d'éthanol est détectée durant les 12 premières heures de fermentation pour les trois souches de levure après que la production est progressivement augmentée à un maximum de 38 heures, puis la quantité d'éthanol produite a atteint un plateau jusqu'à la fin de la fermentation pour la souche *K. marxianus*. En revanche, les souches *S. cerevisiae* et *C. tropicalis* ont enregistré une diminution graduelle après une augmentation ultérieure de la période d'incubation (Figure 60). Les levures qui ont montré un meilleur comportement sont *K. marxianus* et *C. tropicalis* avec des quantités d'éthanol à un niveau maximal de 23,702 ± 1,97 et 23,2 ± 1,32 $g.L^{-1}$, respectivement pendant 38 heures à 39 °C (Figure 60, 61 et Tableau 23). Bien que, la consommation de sucres fermentescibles est graduelle avec une affinité élevée sur le substrat (Figure 60 B, C).

Les valeurs d'éthanol obtenues à partir de la peau de figuier prétraitée sont supérieures aux valeurs produites par les espèces *S. cerevisiae* et *K. marxianus* cultuvées sur les cladodes d'*O. ficus-indica* prétraitées dans les conditions de fermentation SHF non-aérées et aérées à 35 °C d'une valeur comprise entre 14,7 et 19,6 $g.L^{-1}$. Tel qu'il y a été signalé par Kuloyo et al., (2014). Cependant, la fermentation avec la souche *S. cerevisiae* des tiges de *Phoenix canariensis* et d'*Opuntica ficus-indica* prétraitées a donné des valeurs faibles de 15,75 et 14,71 $g.L^{-1}$, respectivement. Tel que rapporté par Udeh et Erkurt, (2017). Et même, pour la fermentation de résidus prétraités de *Phoenix dactylifera* ayant un rendement en éthanol de 10,9 $g.g^{-1}$, selon Cybulska et al., (2016).

Les résultats indiquent que la concentration de composés phénoliques après 38 heures de fermentation pour les trois souches *K. marxianus, C. tropicalis* et *S. cerevisiae* est de 0,13 ± 0,05, 0,11 ± 0,04 et 0,22 ± 0,18 $g.g^{-1}$ de biomasse prétraitée, respectivement. Les quantités d'éthanol produites peuvent s'expliquer par le processus d'adaptation des cellules de levure à l'hydrolysat de figiuer utilisé et par la présence de différents composés.

Les valeurs d'éthanol obtenues sont comparées à celles obtenues antérieurement avec le milieu chimiquement défini. Les levures *S. cerevisiae* et *K. marxianus* n'ont montré aucune différence significative dans la capacité de produire de l'éthanol dans les deux milieux. Par contre, la souche *C. tropicalis* a produit un maximum d'éthanol avec de l'hydrolysat de figuier.

Ces résultats indiquent que les deux souches *K. marxianus* et *C. tropicalis* sont les principales levures qui métabolisent les sucres fermentables pour produire de l'éthanol, avec une grande tolérance aux composés inhibiteurs présents dans les hydrolysats de figuier, comme les composés phénoliques et les convertir en composés moins nocifs dans des conditions aérobies et anaérobies. Tel qu'il y a été signalé par Parawira et Tekere, (2011). Cela concorde avec l'étude de Choudhary et al., (2017) qui a montré que la souche *Candida tropicalis* Y6 est capable de métaboliser une large gamme de sucres et a une meilleure tolérance aux inhibiteurs et aucune réduction de la croissance pour le furfural et le 5-hydroxyméthylfurfural comparativement aux souches *Saccharomyces* et *Pishia*.

Ainsi, selon ces résultats, la souche *S. cerevisiae* a peu d'assimilation des sucres fermentescibles présents dans l'hydrolysat. Cela indique que *Saccharomyces* ne peut pas métaboliser tous les sucres présents en éthanol, ou exige des conditions particulières qui permettent l'activation des enzymes respensables à l'assimilation des sucres et l'obtention des

métabolites. Cependant, la quantité de sucres disponibles dans la suspension fermentée peut être l'un des proncipaux facteurs qui affectent le processus de fermentation. Tel que rapporté par Kurian et al., (2010).

Selon Adeboye et al., (2014), les divers composés phénoliques présents dans la suspension fermentée de *S. cerevisiae*, pourraient réduire le rendement en éthanol et modifier le rendements des autres métabolites. Ces différents produits de dégradation toxiques de la lignine et des sucres présents dans l'hydrolsat sont formés pendant les prétraitements afin de décomposer la biomasse lignocellulosique, principalement le furfural, le 5-hydroxyméthylfurfural, l'acide acétique, les composés phénoliques, les aromatiques et les acides faibles. Comme mentionné par Alvira et al., (2010), Choudhary et al., (2017) et Franden et al., (2009). Toutefois, Albers et Larsson, (2009) ont montré que le processus de la fermentation est affecté par ces composés toxiques en augmentant la durée de la phase de latence et en réduisant la densité des cellules de levure, leur taux de croissance et la productivité finale en éthanol.

Selon les résultats des profils de fermentation des trois souches de levure, la consommation de sucres réducteurs de 74 à 83% est observée durant les premiers 24 heures et la consommation complète de sucres facilement accessibles nécessite une incubation prolongée jusqu'à 82-96 heures. Ces résultats sont conformes à ceux de Yang et al., (2015) qui ont confirmé que la biomasse *d'Opuntia ficus-indica* peut être une matière première appropriée pour la production de biocarburants.

Outre l'évaluation de la production d'éthanol, les souches *K. marxianus* et *C. tropicalis* ont présenté la plus grande production de biomasse avec une quantité de 6,135 ± 0,332 et 6,905 ± 0,112 $g.L^{-1}$, respectivement, comparé à la souche *S. cerevisiae* dont la valeur est de 4,735 ± 0,222 $g.L^{-1}$ de poids sec pendant 38 heures (Tableau 23). Les rendements de conversion SRT en éthanol des trois souches varient entre 66,64, 71,89 et 70,36%, respectivement, pour *S. cerevisiae*, *K. marxianus* et *C. tropicalis* pendant 38 heures de fermentation. Ces résultats concordent avec l'étude de Pérez-Cadena et al., (2018) qui a démontré un rendement de conversion de 63,029% avec l'hydrolysat d'*Opuntia* fermenté par *Candida intermedia*.

Au cours de la cinétique des trois levures, des concentrations d'éthanol comprises entre 21,97 et 23,70 $g.L^{-1}$, des efficacités de fermentation de 72 à 84%, des productivités de 0,57 à 0,62 $g.L.h^{-1}$ et des rendements en éthanol de 0,37 à 0,43 $g.g^{-1}$ (Tableau 23). En revanche, *K. marxianus* et *C. tropicalis* sont plus performants que *S. cerevisiae*. Ces résultats indiquent que *K. marxianus* et *C. tropicalis* sont plus efficaces pour convertir et transformer les sucres et le substrat en éthanol, en maintenant un degré semblable de conversion du substrat en éthanol pour les deux souches avec une efficacité allant jusqu'à 84%. Ceci peut être expliqué par la forte capacité de *K. marxianus* à assimiler et à fermenter un large spectre de sucres tels que: le glucose, le lactose, le galactose et le xylose comparativement à *S. cerevisiae* (données non montrées) qui sont produites par la dégradation des pectines de la paroi cellulaire. Comme indiqué par Ginestra et al., (2009) et Pena-Valdivia et al., (2012). Cela concorde avec Matsushika et al., (2009) qui ont signalé que *Kluyveromyces marxianus* utilise l'arabinose et le xylose pour produire d'éthanol.

En revanche, Alencar et al., (2018) ont montré une efficacité de fermentation de 82,8% avec une production d'éthanol de 26,4 $g.L^{-1}$ par *Saccharomyces cerevisiae* JP1 à 33 °C à partir d'hydrolysats de cladodes d'*Opuntia ficus-indica* prétraitées. Et même, la biomasse de *Nopalea cochenillifera* traitée et fermentée présente une efficacité de 95,6% après 48 heures. Comme l'ont rapporté de Souza Filho et al., (2016). Pourtant, ces rendements en éthanol de la peau de figuier donnés par *K. marxianus* et *C. tropicalis* peuvent être commercialisés en raison de la libération moyenne de glucides fermentescibles. Comme indiqué par Blair et al., (2021). Cependant, selon les travaux de Mussatto et al., (2012) l'efficacité de la conversion du substrat peut changer selon le type de source de carbone, la souche et les conditions de cultures utilisées.

En ce sens, la supplémentation dans le milieu de culture avec une source d'azote facilement assimiler comme l'extrait de levure est l'un des facteurs importants de la fermentation alcoolique dont les rendements sont supérieurs à 10 $g.L^{-1}$. Tel qu'il y a été signalé par Pérez-Cadena et al., (2018). Selon les traveaux de Lopez-Abelairas et al., (2013), le rendement en sucre et la production d'éthanol sont élevés et il n'existe aucun inhibiteur après un traitement biologique précoce de la biomasse de la paille de blé utilisant les champignons ligninolytiques *Pleurotus eryngii* et *Irpex lacteus.* Ceci est cohérent avec Martín-Sampedro et al., (2017) ont montré la capacité du traitement fongique à améliorer la digestibilité du xylose de 10 à 30% et il est l'un des sucres les plus abondants dans la biomasse lignocellulosique et sa transformation en bioéthanol ou en produits chimiques par des processus de fermentation est essentielle. De même, Myovela et al., (2019) et Pérez-Cadena et al., (2018) ont signalé que la digestion microbienne améliore la production de bioéthanol à partir de cladodes de cactus (*Opuntia* spp.) en hydrolysant biologiquement la pectine et les autres polysaccharides difficiles à dégrader par des prétraitements acides.

Selon les résultats, la similitude du rendement en éthanol et la production précoce d'éthanol avec l'hydrolysat de figuier est identique à celle obtenue avec le milieu synthétique, ceci suggère que *K. marxianus* s'est bien adapté à l'hydrolysat de figuier prétraitée. En confirmant ainsi, l'efficacité de la production d'éthanol de deuxième génération à partir de l'hydrolysat de figuier par *K. marxianus* sous SHF par rapport à la souche de référence *S. cerevisia*. Notant que la production d'éthanol à partir de peau de figuier est le premier rapport signalé à ce jour comparé aux autres travaux sur la production d'éthanol à partir de cladodes et de fruits sans peau d'O. ficus-indica allant de 2,5 à 34,9 $g.L^{-1}$, selon do Nascimento Santos et al., (2016) et de Souza Filho et al., (2016).

Le consortium d'endophytes *P. africana* JO-A et *Melanocarpus* sp. JO-V_2 a le potentiel d'améliorer et d'augmenter la libération de sucres fermentescibles à partir de la peau de figuier, en améliorant ainsi, les rendements totaux d'éthanol après la fermentation alcoolique avec *K. marxianus* et *C. tropicalis* sous le processus SHF. Sur la base de ces résultats, la peau de figuier prétraitée avec des endophytes *P. africana* JO-A et *Melanocarpus* sp. JO-V_2 est une matière première potentielle pour la production d'enzymes et la fermentation à grande échelle sous le processus SHF.

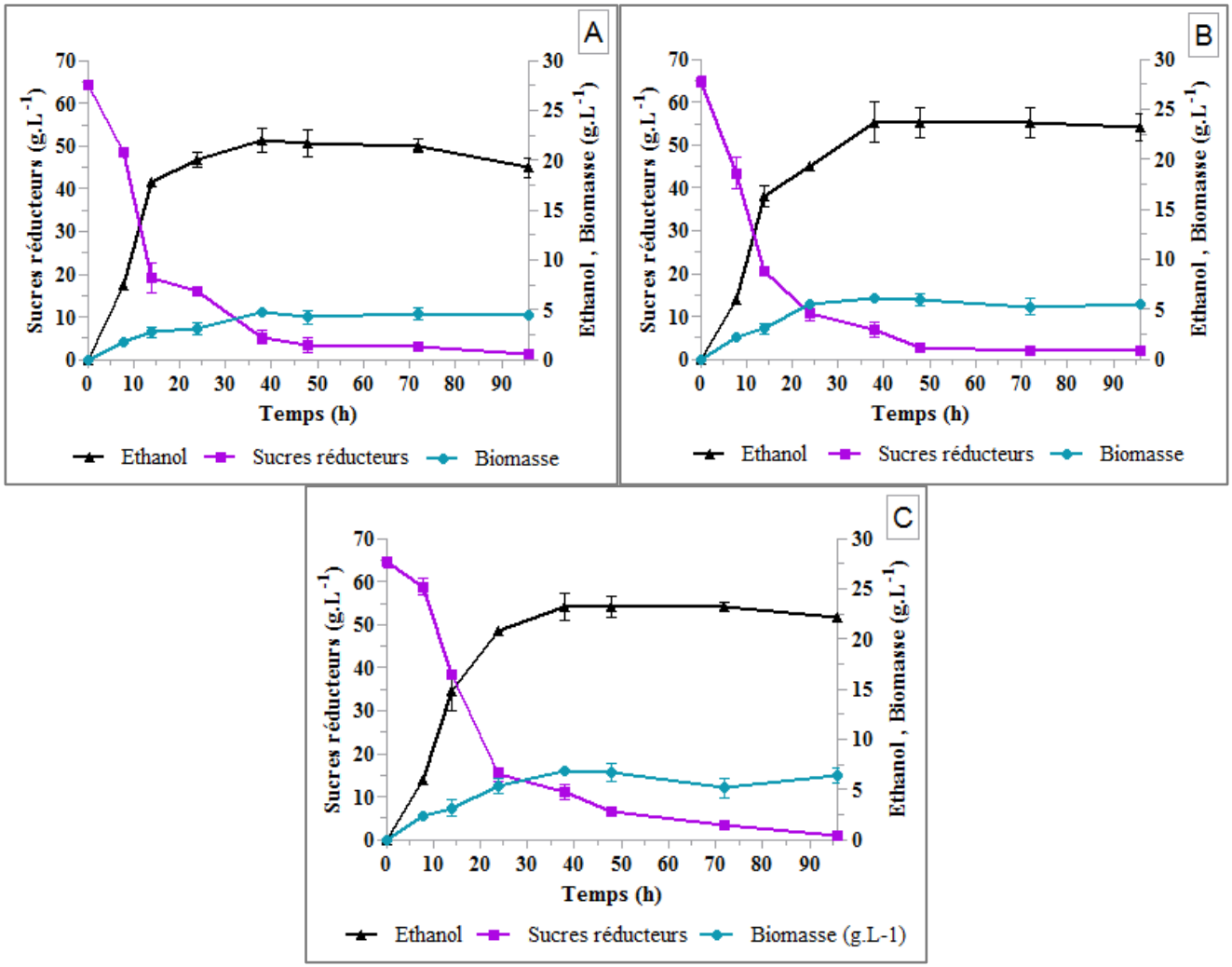


Figure 60: Profils de fermentation de trois souches de levure : (A) *S. cerevisiae* ; (B) *K. marxianus* et (C) *C. tropicalis*, dans l'hydrolysat de la peau de figuier

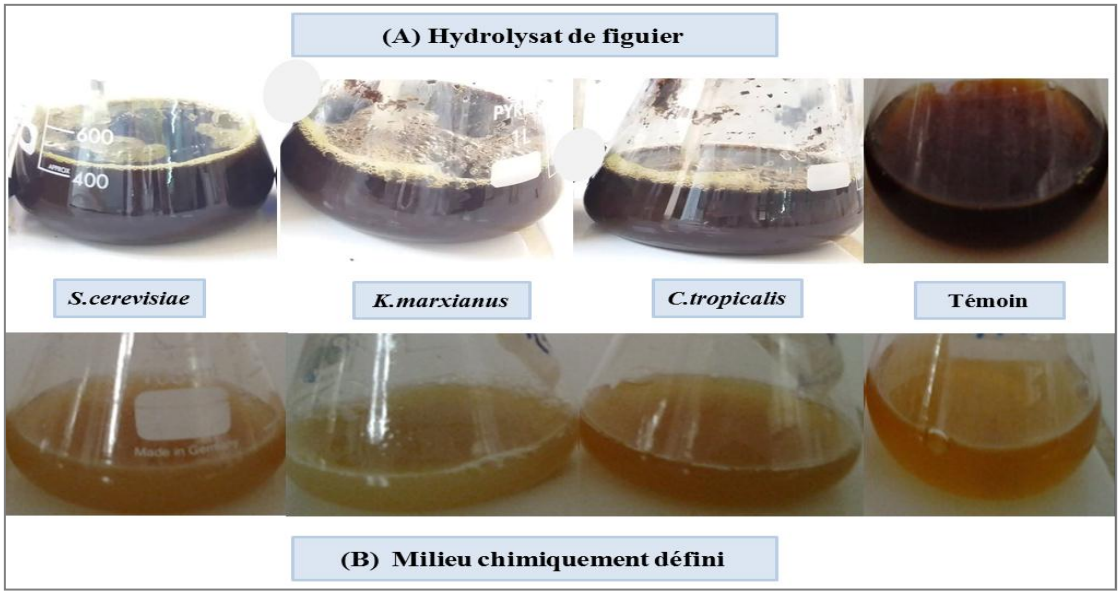


Figure 61: Aspect de cultures avec les trois souches de levure après 96 heures de fermentation à 39 °C sur (A) Hydrolysat de la peau de figuier ; (B) milieu synthétique

Tableau 23: Paramètres de fermentation obtenus à partir des cinétiques des trois levures dans l'hydrolysat de la peau de figuier à 39 °C

Paramètres	***S. cerevisiae***	***K. marxianus***	***C. tropicalis***
Sucres résiduels $g.L^{-1}$	5,14 ± 1,57	6,99 ± 1,76	11,111 ± 1,72
Ethanol $g.L^{-1}$	21,97 ± 1,15	23,70 ± 1,97	23,20 ± 1,32
Biomasse sèche $g.L^{-1}$	4,735 ± 0,222	6,135 ± 0,332	6,905 ± 0,112
Q_pd'éthanol $g.L.h^{-1}$	0,578	0,623	0,610
Q_p Biomasse $g.L.h^{-1}$	0,124	0,161	0,181
Rendement en éthanol sur les sucres utilisés $g.g^{-1}$	0,371	0,410	0,434
Rendement en éthanol sur les sucres totaux $g.g^{-1}$	0,341	0,366	0,359
Rendement en biomasse sur les sucres utilisés $g.g^{-1}$	0,079	0,106	0,129
Rendement en biomasse sur les sucres totaux $g.g^{-1}$	0,073	0,094	0,107
Efficacité de fermentation %	72,60	80,23	84,93
Rendement de conversion SRT en éthanol	66,64	71,89	70,36

CONCLUSION

La peau de figuier est un substrat potentiel avec ou sans nutriments pour la production d'enzymes cellulases et laccases. Cette peau est caractérisée par une teneur moyenne en sucre, une faible concentration en composés phénoliques et en lignine ainsi qu'une teneur élevée en azote.

Lors de la digestion anaérobie de la peau de figuier avec le consortium a montré une production enzymatique importante, une efficacité améliorée de la digestion du substrat, une réduction de la concentration de toxines et une libération maximale de sucres. Ce taitement de la peau de figuier avec le consortium d'endophytes est une méthode rentable et économique pour la production d'enzymes avec l'utilisation de lignocellulose à grande échelle.

La capacité du consortium à dégrader la peau de figuier démontre que *P. africana* JO-A et *Melanocarpus* sp. JO-V_2 sont de nouveaux endophytes fongiques à explorer pour le bio-traitement de la lignocellulose, afin de réduire les coûts de transformation de la biomasse et d'amélioraer la libération de sucres pendant la fermentation SHF.

La valorisation énergétique de la peau prétraitée sous fermentation SHF a montré que le métabolisme fermentaire de *K. marxianus* est très actif sur l'hydrolysat de figuier avec une quantité maximale d'éthanol de 23,702 ± 1,97 $g.L^{-1}$ comparativement au *S. cerevisiae*.

La peau prétraitée avec le consortium est un matériau énergétique potentiel pour la production de bioéthanol lignocellulosique sous SHF à l'échelle industrielle, grâce à la richesse du figuier prétraitée en sucres simples facilement fermentescibles.

K. marxianus est une alternative potentielle à la souche de référence *S. cerevisiae* durant la fermentation SHF à partir de l'hydrolysat lignocellulosique, grâce à la capacité élevée de *K. marxianus* à assimiler et à fermenter un large spectre de sucres et à tolérer les composés inhibiteurs.

L'amélioration de la production de bioéthanol sous SHF par la digestibilité précoce de la peau de figuier avec le traitement biologique et enzymatique et l'utilisation de la plupart des sucres présents dans l'hydrolysat de figuier par *K. marxianus* constituent une méthode cruciale pour augmenter la rentabilité du bioéthanol de deuxième génération.

Conclusion générale

La demande accrue d'enzymes hydrolytiques à l'échelle industrielle a nécessité l'exploration de nouvelles enzymes stables, en particulier dans des conditions extrêmes, telles que : les hautes températures, le pH et la salinité. Les endophytes fongiques, principalement le groupe Ascomycota, sont reconnus comme une riche source d'enzymes hydrolytiques comme : les laccases, les amylases, les protéases, les xylanases et les cellulases.

Pour cette raison, les objectifs déterminants de notre étude sont :

D'une part, d'isoler les endophytes fongiques produisant des cellulases et laccases à partir de tissus végétaux frais. En ce sens, nous avons exploré une source d'endophytes fongiques pour la première fois dans la région d'Ifrane, qui s'est avéré être une niche inépuisable d'enzymes hydrolytiques.

Et d'autre part, étudier leur potentiel hydrolytique pour la conversion directe de la lignocellulose en sucres fermentescibles.

Dans la première partie de la thèse, nous nous sommes concentrés sur l'isolement de nouveaux endophytes fongiques à partir d'échantillons de bois frais provenant de plantes de la région d'Ifrane. Premièrement, un total de 42 isolats sont purifiés des tiges de cinq plantes lors du premier échantillonnage et 59 isolats des tiges et des feuilles de *Juniperus oxycedrus* seulement pour le second échantillonnage. Deuxièmement, les endophytes fongiques sélectionnés sont identifiés à l'aide de clés taxonomiques et d'observations macro et microscopiques. L'identification morphologique montre que les isolats sélectionnés sont divisés en 12 genres : *Preussia*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Xylaria*, *Penicillium*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Podospora*, *Marasmiaceae* et *Melanocarpus*. L'identification moléculaire et l'étude phylogénétique ont identifié l'isolat JO-A comme étant *Preussia africana* avec une homologie supérieure à 97%.

La diversité de la flore fongique associée aux *Juniperus oxycedrus* et leurs activités hydrolytiques extracellulaires est signalée pour la première fois dans la région d'Ifrane. Ces endophytes fongiques sont étudiés comme une source potentielle d'enzymes d'intérêt industriel.

Dans la deuxième partie, nous nous sommes intéressés d'une part au criblage des endophytes fongiques produisant des enzymes hydrolytiques dans les milieux solides et liquides. Et d'autre part, l'étude des facteurs qui influencent la production de l'activité laccase par l'endophyte JO-V_2.

Un total de 39 isolats cellulolytiques sont choisis d'après le test solide. Puis une cinétique de la synthèse des cellulases par divers endophytes fongiques a sélectionné l'isolat JO-A comme le producteur le plus efficace de cellulases avec des titres raisonnables.

Dix endophytes fongiques produisant l'activité laccase sont sélectionnés pour la production de laccases en milieu liquide. L'endophytes JO-V_2 est choisi pour son activité laccasique élevée et sélectionné pour le test d'optimisation qui traite les facteurs influençant la production de laccase extracellulaire.

L'optimisation des conditions du milieu et de culture pour une activité maximale de la laccase du JO-V_2 a séléctionné que 15 g.L^{-1} glucoses, 5 g.L^{-1} $NaNO_3$ et 0.3 g.L^{-1} $CuSO_4$, pour être la plus appropriée à la production de laccase à 37 °C pendant 13 jours. L'extrait enzymatique laccase de JO-V_2 est concentré et caractérisé. L'enzyme s'avère thermotolérante à 40 °C et tolérante à une large gamme de pH pendant une demi-vie de 24 heures dans ces conditions optimales.

L'étude des diverses activités hydrolytiques (cellulase et laccase) montre que les endophytes fongiques sélectionnées présentent une biodiversité enzymatique. Cette collection fongique est un candidat potentiel pour la biotechnologie et l'intérêt industriel. Spécifiquement l'endophyte JO-V_2 pourrait être efficace dans les processus de biorestauration et de biotransformation dans un contexte respectueux de l'environnement.

La troisième partie de la thèse met l'accent sur l'optimisation du milieu de production de cellulases par *P. africana* JO-A avec la méthode statistique RMS, afin d'améliorer la production de cellulases.

L'étude des effets des différents facteurs a permis de multiplier par dix la production de cellulases par *P. africana* JO-A.

L'optimisation statistique avec RMS est réalisée pour étudier les effets interactifs de facteurs sélectionnés sur la production de cellulase par *P. africana* JO-A. On a observé des valeurs d'activité CMCase et FPase plus élevées de 2,042 IU.mL^{-1}, 0,809 IU.mL^{-1} respectivement, à 1,9 % de glucose, à une température de 37 °C et à 9 jours d'incubation pour l'endoglucanase et à 5 jours pour FPase. Une amélioration de plus de 100% de la production de cellulases est obtenue avec RMS comparé aux conditions initiales non optimisées.

Après le test de caractérisation, les enzymes cellulases de *P. africana* JO-A sont acidophiles thermostables avec une activité enzymatique plus élevée à pH 5,0 et une température comprise entre 40 et 50 °C pour une demi-vie de 24 heures dans les conditions optimales. Cette thermostabilité des cellulases à des températures supérieures à 50 °C en fait un bon agent dans les applications industrielles.

Les enzymes cellulolytiques produites par *P. africana* JO-A sont utilisées pour hydrolyser les substrats cellulosiques et lignocellulosiques sans traitement (peau de figuier) comparé aux enzymes commerciaux. Les sucres libérés par l'hydrolyse sont convertis en éthanol par les souches thérmotolérantes. De faibles concentrations d'éthanols sont obtenues avec *K. marxianus* avec une valeur de 11,85 g.L^{-1} d'après l'hydrolysat cellulosique et de 5,43 g.L^{-1} d'après l'hydrolysat lignocellulosique. Ces quantités inférieures d'éthanol obtenues après la fermentation d'hydrolysat, nécessitent un traitement préliminaire avant que la biomasse soit saccharifiée.

Les nouvelles technologies de production de bioéthanol s'appuient essentiellement sur la bioconversion de la lignocellulose. La récalcitrante structurelle des matières premières et la production de composés phénoliques au cours du prétraitement constituent les principaux obstacles à de cette transformation. Un coût opérationnel élevé au cours des processus de prétraitement et de saccharification actuels diminue la faisabilité économique à l'échelle industrielle. Dans ce contexte, la dernière partie de la thèse porte sur l'étude de la capacité

hydrolytique du consortium fongique (*P. africana* JO-A et *Melanocarpus* sp. JO-V_2) à traiter biologiquement et à convertir directement la peau de figuier en sucres solubles, pour la rendre plus accessible aux enzymes hydrolytiques, améliorant ainsi la quantité de sucres fermentescibles libérés pendant la saccharification. Une valorisation énergétique de l'hydrolysat en bioéthanol est effectuée avec des souches thermotolérantes sous un processus de fermentation SHF.

Dans la première partie, l'étude est consacrée à la caractérisation physico-chimique de la poudre de peau de figuier. La quantité de sucres totaux libérés correspond à 44% du poids sec du figuier, avec une faible concentration de composés phénoliques 0,0595 $g.g^{-1}$ et une teneur moyenne en protéine (7,6%) et en lignine (5,7 – 16,7%). La structure de la biomasse de la peau de figuier, en particulier la lignine, nécessite un prétraitement préliminaire pour éliminer un maximum de lignine et récupérer la cellulose. Afin d'augmenter le nombre de sites de cellulose accessibles aux enzymes hydrolytiques pendant la saccharification.

La fraction lignocellulosique de la peau de figuier supplémentée et non supplémentée est utilisée comme source de carbone pour vérifier la croissance fongique et la synthèse des enzymes avec les endophytes fongiques sélectionnés sous la fermentation SmF. Une colonisation complète du substrat est présentée avec les différents échantillons, associée à une production importante des enzymes cellulases et laccases dans les deux milieux. L'effet non significatif de l'addition des nutriments aux milieux indique que la peau de figuier est un substrat potentiel riche en carbone et en azote pour la croissance et la production des enzymes. Une valorisation énergétique des sucres fermentescibles libérés dans les hydrolysats de figuier est réalisée par trois souches de levures thermotolérantes. La plus grande quantité d'éthanol est produite par la souche *K. marxianus* avec une valeur de 10,36 $g.L^{-1}$ d'éthanol provenant de la culture du consortium de JO-A et JO-V_2. La faible teneur en éthanol de la culture prétraitée exige une optimisation supplémentaire du traitement fongique.

L'optimisation de deux types de prétraitement acide et biologique est effectuée, en utilisant la poudre de figuier non supplémenté. Les résultats de l'optimisation du prétraitement acide ont montré une amélioration considérable des rendements en sucre libérés, avec un pourcentage d'hydrolyse de 74,54% de figuier. L'hydrolyse acide maximale de figuier a donné une quantité de 22,14 ± 0,59 $g.L^{-1}$ de sucres réducteurs totaux avec une charge en solide de 10% et une concentration d'acide sulfurique de 3% à 120 °C pendant 30 min d'incubation. La valeur élevée des composés phénoliques libérés pendant le prétraitement acide pourrait réduire l'efficacité des prochaines étapes de la saccharification et de la fermentation d'hydrolysat. Dans ce contexte, l'optimisation du traitement biologique est réalisée avec les endophytes sélectionnés.

Le consortium de *P. africana* JO-A et *Melanocarpus* sp. JO-V_2 a prouvé une haute capacité de digestibilité de la biomasse de figuier, avec un taux d'hydrolyse de 78% et une quantité de SRT de 24,81 $g.L^{-1}$, pendant seulement 10 jours d'incubation. La concentration de composés phénoliques est de 0,184 ± 0,05 $g.g^{-1}$ pour 10% de peau de figuier, avec une réduction de 53% par rapport à la concentration des polyphénols obtenue après le prétraitement acide.

La capacité de déconstruire les parois de cellulaires, de produire des enzymes et de diminuer la quantité des composés phénoliques dans l'hydrolysat montre que *P. africana* JO-A et

Melanocarpus sp. JO-V_2 sont de nouveaux endophytes fongiques prometteurs à explorer pour le bio-traitement au cours des processus de fermentation, en vue de réduire les coûts de traitement de la biomasse pendant la fermentation SHF.

Suite à ces résultats, nous avons abordé l'hydrolyse enzymatique de la biomasse de figuier prétraitées avec le consortium d'endophytes afin d'améliorer et de maximiser la récupération des sucres. Les résultats de la saccharification avec un mélange d'enzymes ont montré une augmentation de la quantité de sucres libérés de 64,15 ± 1,98 $g.L^{-1}$ avec une concentration d'enzymes de 20 $IU.g^{-1}$ pendant 48 heures. Cela a produit une faible quantité de composés phénoliques avec une valeur de 0,25 ± 0,08 $g.g^{-1}$. Une conversion de figuier de 87,47% et une efficacité hydrolytique de 83,65 sont enregistrées après seulement 48 heures d'hydrolyse.

Enfin, la valorisation énergétique de la bioconversion de peau de figuier en sucres fermentescibles est réalisée avec trois souches de levure *S. cerevisiae, K. marxianus* et *C. tropicalis* sous le processus de fermentation SHF à 39 °C.

Avant la fermentation de l'hydrolysat de figuier, les trois souches de levure sont évaluées leur performance en tant que référence, dans un milieu synthétique limité en glucose à une concentration similaire à la quantité de sucres simples présentée dans l'hydrolysat de figuier. Les trois souches de levures sont capables de fermenter le glucose dans le milieu synthétique à 39 °C. La quantité maximale d'éthanol est obtenue avec la souche *K. marxianus* avec une valeur de 23,7 ± 0,37 $g.L^{-1}$, une efficacité de fermentation de 76% et un rendement en éthanol le plus élevé de 0,39 $g.g^{-1}$.

Pour l'hydrolysat de figuier, les souches *K. marxianus* et *C. tropicalis* ont montré un meilleur comportement de fermentation, avec des quantités maximales d'éthanol de 23,702 ± 1,97 et 23,2 ± 1,32 $g.L^{-1}$, respectivement, par rapport à *S. cerevisiae* pendant 38 heures. Les rendements de conversion de SRT en éthanol sont de 71,89% et 70,36% pour *K. marxianus* et *C. tropicalis*, respectivement, avec un rendement en éthanol compris entre 0,41 et 0,43 $g.g^{-1}$. La similitude du rendement en éthanol avec l'hydrolysat de figuier est identique à celle obtenue avec le milieu synthétique. Ceci suggère que *K. marxianus* s'est bien adapté à l'hydrolysat de figuier prétraitée. Ce qui confirme l'efficacité de la production d'éthanol de deuxième génération à partir de l'hydrolysat de figuier par *K. marxianus* sous SHF comparé à la souche de référence *S. cerevisia*.

A la lumière de ces résultats expérimentaux, nous avons constaté que la peau de figuier prétraitée avec le consortium JO-A et JO-V_2 est une matière énergétique potentielle pour la production de bioéthanol lignocellulosique sous SHF à l'échelle industrielle.

Sur la base des résultats obtenus, on suggère que :

- Elargir la collection fongique développée par l'exploitation d'autres niches naturelles dans des conditions extrêmes, afin d'isoler des endophytes fongiques plus puissants pour des applications biotechnologiques et industrielles.

- Des recherches supplémentaires sur le métabolisme des endophytes fongiques isolés seraient nécessaires pour déterminer des stratégies plus efficaces de digestibilité des polysaccharides.

- Amplifier les gènes codant les cellulases et la laccase de *P.africana* JO-A et *Melanocarpus* sp. JO-V_2, afin de découvrir les propriétés moléculaires et biochimiques des enzymes amplifiées, après avoir étudié la séquence de l'extrémité N terminale de ses gènes. Et même, leur classement par familles selon les structures de leurs protéines.

- Utiliser des enzymes cellulases et laccases pour décomposer les autres matières premières lignocellulosiques.

- Effectuer la fermentation SHF avec la peau de figuier prétraitée dans un bioréacteur controler.

- Utiliser la laccase sérétée par *Melanocarpus* sp. JO-V_2 pour dégrader et la détoxiquer les effluents industriels à forte concentrations de composées phénoliques.

- Mélange de deux biomasses lignocellulosique ou plus, afin que les endophytes fongiques sélectionnés puissent montrer l'effet sélectif de la dégradation des celluloses et des lignines sur certaines matrices, dans le but d'améliorer le processus de dégradation.

Références bibliographiques

Abd El Monssef, R.A., Enas, A.H., Ramadan, E.M., 2016. Production of laccase enzyme for their potential application to decolorize fungal pigments on aging paper and parchment. Annals of Agricultural Science 61(1), 145–154.

Abdel-Banat, B.M., Hoshida, H., Ano, A., 2010. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? Appl Environ Microbiol 85: 861–867.

Abdelmageed, M.O., Elshafei, A.M., Hassan, M.M., 2014. Purification, Biochemical Characterization and Applications of Pleurotus ostreatus ARC280 Laccase. British Microbiology Research Journal 4(12): 1418–1439.

Abrahao, M.C., Gugliotta, A.D.-M., da silva, R., 2008. Ligninolytic activity from newly isolated basidiomycete strains and effect of these enzymes on the azo dye orange II decolourisation. Annals of Microbiology, 58 (3) 427–432.

Achour, S., Abourazzak, S., Mokhtari, A., Soulaymani, A., Soulaymani, R., Hida, M., 2011. Juniper tar (cade oil) poisoning in new born after a cutaneous application. Case Reports 2011, bcr0720114427–bcr0720114427. https://doi.org/10.1136/bcr.07.2011.4427

Adamafio, N.A., Sarpong, N.S., Mensah, C.A., 2012. Extracellular laccase from Pleurotus ostreatus strain EM-1: Thermal stability and response to metal ions. Asian J Biochem. 7(3): 143–50.

Adeboye, P.T., Bettiga, M., Olsson, L., 2014. The chemical nature of phenolic compounds determines their toxicity and induces distinct physiological responses in Saccharomyces cerevisiae in lignocellulose hydrolysates. AMB Express, 4, 46.

Ademakinwa, A.N., Agboola, F.K., 2016. Biochemical characterization and kinetic studies on a purified yellow laccase from newly isolated Aureobasidium pullulans NAC8 obtained from soil containing decayed plant matter. J Genet Eng Biotechnol 14: 143–151.

Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., 2011. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. Biotechnology Advances 29, 675-685. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.05.005.

Aime, M.C., Brearley, F.Q., 2012. Tropical fungal diversity: closing the gap between species estimates and species discovery. Biodivers Conserv 21, 2177–2180. https://doi.org/10.1007/s10531-012-0338-7

Akanni, G.B., du Preez, J.C., Steyn, L., 2014. Protein enrichment of an Opuntia ficus-indica cladode hydrolysate by cultivation of Candida utilis and Kluyveromyces marxianus. Journal of Science Food Agriculture 95, 1094- 1102. doi 10.1002/jsfa.6985.

Akinosho, H., Yee, K., Close, D., 2014. The emergence of Clostridium thermocellum as a high utility candidate for consolidated bioprocessing applications. Front Chem 2: 66.

Akpinar, O., Erdogan, K., Bostanci, S., 2009. Production of xylooligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials. Carbohydrate Research 344, 660-666.

Albers, E., Larsson, C., 2009. A comparison of stress tolerance in YPD and industrial lignocellulose-based medium among industrial and laboratory yeast strains. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 36, 1085-1091.

Alencar, B.R.A., Dutra, E.D., Sampaio, E.V.D.S.B., 2018. Enzymatic hydrolysis of cactus pear varieties with high solids loading for bioethanol production. Bioresource Technology 250, 273–280.

Alencar, B.R.A., Dutra, E.D., Sampaio, E.V.D.S.B., 2018. Enzymatic hydrolysis of cactus pear varieties with high solids loading for bioethanol production. Bioresource Technology 250, 273–280.

Alencar, B.R.A., Reis, A.L.S., de Souza, R.D.F.R., 2017. Recycling the liquid fraction of alkaline hydrogen peroxide in the pretreatment of corn stover. Bioresour. Technol. 241, 928–935.

Al-Hosni, K., Shahzad, R., Latif Khan, A., Muhammad Imran, Q., Al Harrasi, A., Al Rawahi, A., Asaf, S., Kang, S.-M., Yun, B.-W., Lee, I.-J., 2018. *Preussia* sp. BSL-10 producing nitric oxide, gibberellins, and indole acetic acid and improving rice plant growth. Journal of Plant Interactions 13, 112–118. https://doi.org/10.1080/17429145.2018.1432773

Alonso, D., Wettstein, S., Dumesic, J., 2012. Bimetallic catalysts for upgrading of biomass to fuels and chemicals. 8075–8098.

Alvira, P., Tomas-Pejo, E., Ballesteros, M., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. Bioresour. Technol. 101, 4851–4861.

Aly, A.H., Debbab, D., Kjer, J., 2010. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products, Fungal Divers. 41. 16.

Ameen, F., Stephenson, S.L., AlNadhari, S., Yassin, M.A., 2021. Isolation, identification and bioactivity analysis of an endophytic fungus isolated from Aloe vera collected from Asir desert, Saudi Arabia. Bioprocess Biosyst Eng 44, 1063–1070. https://doi.org/10.1007/s00449-020-02507-1

Amin, N., 2016. Endophytic fungi to control of Cocoa Pod Borer (Conopomorpha cramerella) on Cocoa plantation. Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci. 6: 1496.

Amirita, A., Sindhu, P., Swetha, J., Vasanthi, N.S., Kannan, K.P., 2012. Enumeration of endophytic fungi from medicinal plants and screeening of extracellular enzymes 8.

Amrutha, V., Audipudi, G., Supriya, N.G., 2014. Characterization of L-asparaginase producing endophytic fungi isolated from ripened fruit of capsicum frutescence. Int J Pharm Dev Tech ;4: 52–7.

An, T., Dong, Z., Lv, J., Liu, Y., Wang, M., Wei, S., Song, Y., Zhang, Y., Deng, S., 2015. Purification and characterization of a salt-tolerant cellulase from the mangrove oyster, Crassostrea rivularis. Acta Biochimica et Biophysica Sinica 47, 299–305. https://doi.org/10.1093/abbs/gmv015

Anasontzis, G.E., Christakopoulos, P., 2014. Challenges in ethanol production with Fusarium oxysporum through consolidated bioprocessing. Bioengineered 5(6): 393–395.

Andreea Cosoveanu, Samuel Rodriguez Sabina, Raimundo Cabrera, 2018. Fungi as Endophytes in Artemisia thuscula: Juxtaposed Elements of Diversity and Phylogeny. Journal of Fungi 4, 17. https://doi.org/10.3390/jof4010017

Ang, S.K., E.M., S., Y., A., A.A, S., M.S, M., 2013. Production of cellulases and xylanase by Aspergillus fumigatus SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. Process Biochemistry 48, 1293–1302. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.019

Anwar, Z., Gulfraz, M., Irshad, M., 2014. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review. J Radiat Res Appl Sci 7(2), 163–173.

Arnold, A.E., Henk, D.A., Eells, R.L., 2007. Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. Mycologia. 99(2): 185–206.

Arora, D.S., Sandhu, D.K., 1985. Laccase production and wood degradation by white rot fungus Daedalea flavida.Enzyme Microbial Technol., 7: 405–408.

Arora, D.S., Sharma, R.K., 2010. Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. Appl Biochem Biotechnol. 160: 1760–1788.

Asgher, M., Iqbal, H.M.N., Asad, M.J., 2012. Kinetic characterization of purified laccase produced from Trametes versicolor IBL-04 in solid state bio-processing of corncobs. Bio Resources. 7(1): 1171–88.

Astello-García, M.G., Cervantes, I., Nair, V., 2015. Chemical composition and phenolic compounds profile of cladodes from Opuntia spp. Cultivars with di_erent domestication gradient. Journal of Food Composition and Analysis 43, 119-113. doi: 10.1016/j.jfca.2015.04.016.

Atiya, T., Thanonkeo, P., Klanritb, P., 2017. High-temperature ethanol production using thermotolerant yeast newly isolated from Greater Mekong Subregion. Brazilian journal of microbiology 4 8: 461–475.

Augustine, A.J., Kragh, M.E., Sarangi, R., 2008. Spectroscopic studies of perturbed T1 Cu sites in the multicopper oxidases Saccharmycescerevisiae Fet3p and Rhusvernicifera laccase: allosteric coupling between the T1 and trinuclear Cu sites. Biochemistry 47: 2036–2045.

Aung, T., Jiang, H., Chen, C.-C., 2019. Production, Gene Cloning, and Overexpression of a Laccase in the Marine-Derived Yeast Aureobasidium melanogenum Strain 11-1 and Characterization of the Recombinant Laccase. Marine Biotechnology 21: 76–87.

Badiei, M., Asim, N., Jahim, J.M., 2014. Comparison of chemical pretreatment methods for cellulosic biomass. APCBEE Proced 9: 170–174.

Baeyens, J., Kang, Q., Appels, L., 2015. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol, Prog. Energy Combust. Sci. 47 60–88.

Bai, H., Wang, H., Sun, J., Irfan, M., Han, M., Huang, Y., Han, X., Yang, Q., 2013. Purification and Characterization of beta 1,4-Glucanases from Penicillium simplicissimum H-11. BioResources 8, 3657–3671. https://doi.org/10.15376/biores.8.3.3657-3671

Bakkiyaraj, S., Aravindan, R., Arrivukkarasan, S., 2013. lemon peelings: a potential substrate for laccase production by Trametes versicolor mtcc 138 in submerged fermentation International Journal of Current Chemical Sciences - Vol.2, Issue, 12, pp. 17–24.

Bamisile, B.S., Chandra, K.D., Komivi, S.A., 2018. Fungal Endophytes: Beyond Herbivore Management. Frontiers in Microbiology. 9 : 544.

Ban, Y., Tang, M., Chen, H., 2012. The response of dark septate endophytes (DSE) to heavy metals in pure culture. PLoS One 7:e 47968.

Bansal, N., Tewari, R., Gupta, J.K., 2011. A novel strain of Aspergillus niger producing a cocktail of hydrolytic depolymerising enzymes for the production of second generation ethanol. Bioresources 6(1):552–569.

Baraban, E.G., Morin, J.B., Phillips, A.J., 2013. Xyolide, a bioactive nonenolide from an Amazonian endophytic fungus, Xylaria feejeensis. Tetrahidron Lett 54: 4058–4069.

Barnett, H.C., Hunter, B.B., 1999. Illustrated genera of imperfect fungi. New York: Macmillan Publishing Company

Barnett, H.L., 1960. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Pub. Co, Minneapolis, USA.

Barnett, H.L., Hunter, B.B., 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. St. Paul, Minnesota, USA: APS Press;

Barnett, H.L., Hunter, B.B., 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi.3. Edition. Burgess publishing company U.S.A.

Batista, B.N., Matias, R.R., Oliveira, R.L. e, Albuquerque, P.M., 2022. Hydrolytic enzyme production from açai palm (Euterpe precatoria) endophytic fungi and characterization of the amylolytic and cellulolytic extracts. World J Microbiol Biotechnol 38, 30. https://doi.org/10.1007/s11274-021-03217-w

Bayer, E.A., Henrissat, B., Lamed, R., 2009. The cellulosome: a natural bacterial strategy to combat biomass recalcitrance, biomass recalcitrance, in: M.E. Himmel (Ed.), Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy, Blackwell Publishing Ltd., England 407–435.

Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., 2014. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 36, 91-106.

Behera, S.S., Ray, R.C., 2016. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies. International Journal of Biological Macromolecules 86: 656–669.

Behie, S.W., Jones, S.J., Bidochka, M.J., 2015. Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi Metarhizium and Beauveria. Fungal Ecol. 13, 112–119.

Belay, J.B., Habtu, N.G., Ancha, V.R., 2021. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cladodes of cactus (opuntia ficus-indica) for biogas production. Heliyon 7, e08002. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08002.

Ben Chobba, I., Elleuch, A., Ayadi, I., 2013. Fungal diversity in adult date palm (Phoenix dactylifera L.) revealed by culture-dependent and culture-independent approaches. J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol) 14(12): 1084–1099.

Ben Mrid, R., Bouchmaa, N., Bouargalne, Y., Ramdan, B., Karrouchi, K., Kabach, I., El Karbane, M., Idir, A., Zyad, A., Nhiri, M., 2019. Phytochemical Characterization, Antioxidant and In Vitro Cytotoxic Activity Evaluation of Juniperus oxycedrus Subsp. oxycedrus Needles and Berries. Molecules 24, 502. https://doi.org/10.3390/molecules24030502

Bensadon, S., Hervert-Hernández, D., Sáyago-Ayerdi, S.G., 2010. By-products of Opuntia ficus-indica as a source of antioxidant dietary fiber. Plant Foods Hum. Nutr. 65, 210–216.

Bezerra, J.D.P., Santos, M.G.S., Barbosa, R.N., 2013. Fungal endophytes from cactus Cereus jamacaru in Brazilian tropical dry forest:a first study. Symbiosis ;60 53–63.

Bezerra, J.D.P., Santos, M.G.S., Svedese, V.M., Lima, D.M.M., Fernandes, M.J.S., Paiva, L.M., Souza-Motta, C.M., 2012. Richness of endophytic fungi isolated from Opuntia ficus-indica Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. World J Microbiol Biotechnol 28, 1989–1995. https://doi.org/10.1007/s11274-011-1001-2

Bhagobaty, R.K., Joshi, S.R., 2012. Enzymatic activity of fungi endophytic on five medicinal plant species of the pristine sacred forests of Meghalaya, India. Biotechnol Bioprocess Eng 17: 33–40.

Bhargav, S., Panda, B.P., Ali., M., 2008. Solid-state fermentation: an overview. Chem Biochem Eng Q 22: 49–70.

Binod, P., Janu, K.U., Sindhu, R., 2011. Hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. Biofuels (1st ed.) Elsevier Inc USA.

Blair, B.B., Yim, W.C., John, C., 2021. Characterization of a microbial consortium with potential for biological degradation of cactus pear biomass for biofuel production. Heliyon 7 : e07854.

Bouza, R.J., Gu, Z., Evans, J.H., 2016. Screening conditions for acid pretreatment andenzymatic hydrolysis of empty fruit bunches. Ind. Crop. Prod. 84,.

BP global, 2016. Statistical review of world energy. BP Global. Available in:<https://www.bp. com/content/dam/bp/pdf/energy-economics/statistical-review-2016/bp-statisticalreview- of-world-energy-2016-full-report.pdf>, 2016 (accessed May 9, 2017).

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem., 72, 248–254.

Brandi, J., Wilson-Wilde, L., 2013. Standard Methods, Encycl. Foren. Sci. second ed.

Brum, M.C.P., Araújo, W.L., Maki, C.S., Azevedo, J.L., 2012. Endophytic fungi from Vitis labrusca L. 'Niagara Rosada') and its potential for the biological control of Fusarium oxysporum. Genetics and Molecular Research 11, 4187–4197. https://doi.org/10.4238/2012.December.6.2

Burgess, K.M.N., Ibrahim, A., Soerensen, D., 2017. Trienylfuranol A and trienylfuranone A.B: Metabolites isolated from an endophytic fungus, Hypoxylon submonticulosum, in the raspberry Rubus idaeus. J. Antibiot. 70: 721–725.

Cabezas, L., Calderon, C., Medina, L.M., Bahamon, I., Cardenas, M., Bernal, A.J., Gonzalez, A., Restrepo, S., 2012. Characterization of cellulases of fungal endophytes isolated from Espeletia spp. Journal of Microbiology 50, 1009–1013. https://doi.org/10.1007/s12275-012-2130-5

Cabrera, M., Blamey, J.M., 2018. Biotechnological applications of archaeal enzymes from extreme environments. Biol Res 51: 37.

Calabro, P.S., Catalan, E., Folino, A., 2018. Effect of three pretreatment techniques on the chemical composition and on the methane yields of Opuntia ficus-indica (prickly pear) biomass. Waste Manag. Res. 36, 17–29.

Calvo-Flores, F.G., Dobado, J.A., 2010. Lignin as Renewable Raw Material. ChemSusChem 3, 1227–1235.

Campos, P.A., Levin, L.N., Wirth, S.A., 2016. Heterologous production, characterization and dye decolorizationability of a novel thermostable laccase isoenzyme from Trametes trogii BAFC 463. Process Biochem 51: 895–903.

Carvalho, C.R., Gonc¸ alves, V.N., Pereira, C.B., 2012. The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville (Fabaceae) from the Brazilian savannah. Symbiosis ;57 95–107.

Castellani, A., 1967. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. J Trop Med Hyg 42: 181–184.

Castro, R., Roberto, I., 2014. Selection of a thermotolerant Kluyveromyces marxianus strain with potential application for cellulosic ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. Appl Biochem Biotechnol 172: 1553–156.

Chander, M., Kaur, I., 2015. An Industrial Dye Decolourisation by Phlebia sp. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci 4(5): 217–226.

Chaturvedi, V., Verma, P., 2013. An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products. Biotech 3(5), 415–431.

Chen et al., 2014. A novel solid state fermentation coupled with gas stripping enhancing the sweet sorghum stalk conversion performance for bioethanol. Biotechnology for Biofuels 7: 35

Chen, H., Fu, X., 2016. Industrial technologies for bioethanol production fromlignocellulosic biomass. Renew. Sustain. Energy Rev. 57,.

Chen, H.-Y., Xue, D.-S., Feng, X.-Y., 2011. Screening and production of ligninolytic enzyme by a marine-derived fungal Pestalotiopsis sp. J63. Appl Biochem Biotechnol 165: 1754–1769.

Chen, H.Z., Li, Y.J., Xu, F.J., 2013. Impact of operating conditions on performance of a novel gas double-dynamic solid-state fermentation bioreactor (GDSFB). Bioprocess Biosyst Eng, 36: 1753–1758.

Chen, H.Z., Qiu, W.H., 2010. technologies for bioethanol production from lignocelluloses. Biotechnol Adv, 28: 556–562.

Chen, L., Wei, Y., Shi, M., Li, Z., Zhang, S.-H., 2020. Statistical optimization of a cellulase from Aspergillus glaucus CCHA for hydrolyzing corn and rice straw by RSM to enhance yield of reducing sugar. Biotechnol Lett 42, 583–595. https://doi.org/10.1007/s10529-020-02804-5

Cheng, J., Huang, S., Jiang, H., Zhang, Y., Li, L., Wang, J., Fan, C., 2016. Isolation and characterization of a non-specific endoglucanase from a metagenomic library of goat rumen. World J Microbiol Biotechnol 32, 12. https://doi.org/10.1007/s11274-015-1957-4

Chen-L, Wei, Y., Shi, M., 2019. An archaeal chitinase with a secondary capacity for catalyzing cellulose and its biotechnological applications in shell and straw degradation. Front Microbiol. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01253.

Chen, Y., Stevens, M.A., Zhu, Y., 2013. Understanding of alkaline pretreatment parameters for corn stover enzymatic Saccharification. Biotechnol Biofuels 6(8): 1–10.

Chen-Y, Xie, X.-G., Ren, C.-G., 2013. Degradation of N-heterocyclic indole by a novel endophytic fungus Phomopsis liquidambari. Bioresour Technol 129: 568–574.

Chenthamarakshan, A., Parambayil, N., Miziriya, N., 2017. Optimization of laccase production from Marasmiellus palmivorus LA1 by Taguchi method of design of experiments. BMC Biotechnol 17: 12.

Chiarello, L.M., Ramos, C.E.A., Neves, P.V., 2016. Production of cellulosic ethanol from steam-exploded Eucalyptus urograndis and sugarcane bagasse at high total solids and low enzyme loadings. Sustainable Chem. Processes. 4, 15.

Choudhary, J., Singh, S., Nain, L., 2017. Bioprospecting thermotolerant ethanologenic yeasts for simultaneous saccharification and fermentation from diverse environments. J. Bioscience and Bioengineering, Vol. 123 No. 3, 342–346.

Cianchetta, S., Di Maggio, B., Burzi, P.L., 2014. "Evaluation of selected white-rot fungal isolates for improving the sugar yield from wheat straw," Applied Biochemistry and Biotechnology, vol. 173, no. 2, pp. 609–623.

Consoli, S., Inglese, G., Inglese, P., 2013. Determination of evapotranspiration and annual biomass productivity of a cactus pear [Opuntia ficus-indica L.(Mill.)] orchard in a semiarid environment. J. Irrigat. Drain. Eng. 139, 680–690.

Corrêa, R.C.G., Rhoden, S.A., Mota, T.R., Azevedo, J.L., Pamphile, J.A., de Souza, C.G.M., Polizeli, M. de L.T. de M., Bracht, A., Peralta, R.M., 2014. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 41, 1467–1478. https://doi.org/10.1007/s10295-014-1496-2

Costa, A.M., Kadowaki, K.M., Minozzo, M.K., 2012. Production, purification and characterization of tannase from Aspergillus tamarii. Afr J Biotechnol 11: 391–398.

Costa-Silva, T.A., Nogueira, M.A., Souza, C.R.F., 2011. Lipase production by endophytic fungus Cercospora kikuchii: stability of enzymatic activity after spray drying in the presence of carbohydrates. Dry Technol 29(9): 1112–1119.

Choudhary, J., Singh, S., Nain, L., 2017. Bioprospecting thermotolerant ethanologenic yeasts for simultaneous saccharification and fermentation from diverse environments. J. Bioscience and Bioengineering, Vol. 123 No. 3, 342–346.

Cunha, M., Kreke, T., Badino, A.C., 2014. Liquefaction of sugarcane bagasse for enzyme production, Bioresour.Technol. 172 . 249–252.

Cushman, J.C., Davis, S.C., Yang, X., 2015. Development and use of bioenergy feedstocks for semi-arid and arid lands. J. Exp. Bot. 66, 4177–4193.

Cybulska, I., Brudecki, G.P., Zembrzuska, J., 2016. Organosolv delignification of agricultural residues (date palm fronds, Phoenix dactylifera L.) of the United Arab Emirates. Appl. Energy. http://dx.doi. org/10.1016/j.apenergy.2016.01.094.

da Silva Ribeiro, A., Polonio, J.C., Costa, A.T., dos Santos, C.M., Rhoden, S.A., Azevedo, J.L., Pamphile, J.A., 2018. Bioprospection of Culturable Endophytic Fungi Associated with the Ornamental Plant Pachystachys lutea. Current Microbiology 75, 588–596. https://doi.org/10.1007/s00284-017-1421-9

Dagnino, E.P., Chamorro, E.R., Romano, S.D., 2013. Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production. Industrial Crops and Products 42, 363-368.

Das, A., Kamal, S., Shakil, N.A., 2012. The root endophyte fungus Piriformospora indica leads to early flowering, higher biomass and altered secondary metabolites of the medicinal plant, Coleus forskohlii. Plant Signal Behav 7: 1–10.

Davis, S.C., Kuzmick, E.R., Niechayev, N., 2017. Productivity and water use efficiency of Agave americana in the first field trial as bioenergy feedstock on arid lands. Gcb Bioenergy 9, 314–325.

Davis, S.C., Simpson, J., Vega, G., 2019. Undervalued potential of crassulacean acid metabolism for current and future agricultural production. J. Exp. Bot. 70, 6521–6537.

de Almeida, M.N., Guimarães, V.M., Bischoff, K.M., Falkoski, D.L., Pereira, O.L., Gonçalves, D.S.P.O., de Rezende, S.T., 2011. Cellulases and Hemicellulases from Endophytic Acremonium Species and Its Application on Sugarcane Bagasse Hydrolysis. Applied Biochemistry and Biotechnology 165, 594–610. https://doi.org/10.1007/s12010-011-9278-z

De Ascensao, A.R.F.D.C., Dubery, I.A., 2003. Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in Musa acuminata roots exposed to elicitors from Fusarium oxysporum f. sp. cubense. Phytochemistry 63, 679–686.

De Bary, A., 1866. Morphologie und Physiologie Pilze, Flechten, und myxomyceten. Hofmeister's Handbook of Physiological Botany 2.

de Castro, A.M., Ferreira, M.C., da Cruz, J.C., Pedro, K.C.N.R., Carvalho, D.F., Leite, S.G.F., Pereira, N., 2010. High-Yield Endoglucanase Production by *Trichoderma harzianum* IOC-3844 Cultivated in Pretreated Sugarcane Mill Byproduct. Enzyme Research 2010, 1–8. https://doi.org/10.4061/2010/854526

de Pandey, S.S., Singh, S., Babu, C.V., 2016. Endophytes of opium poppy differentially modulate host plant productivity and genes for the biosynthetic pathway of benzylisoquinoline alkaloids. Planta. 1–8.

de Souza Filho, P.F., Ribeiro, V.T., dos Santos, E.S., 2016. Simultaneous saccharification and fermentation of cactus pear biomass-evaluation of using different pretreatments. Industrial Crops and Products 89, 425–433.

Debbab, A., Aly, A.H., Proksch, P., 2012. Endophytes and associated marine derived fungi—ecological and chemical perspectives. Fungal Divers 57: 45–83.

Delabona, P. da S., Pirota, R.D.P.B., Codima, C.A., Tremacoldi, C.R., Rodrigues, A., Farinas, C.S., 2012. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. Biomass and Bioenergy 37, 243–250. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.12.006

Delaye, L., García-Guzmán, G., Heil, M., 2013. Endophytes versus biotrophic and necrotrophic pathogens—are fungal lifestyles evolutionarily stable traits? Fungal Divers. 60, 125–135.

Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.-M., Gascuel, O., 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic Acids Research 36, W465–W469. https://doi.org/10.1093/nar/gkn180

Desai, S.S., Nityanand, C., 2011. Microbial laccase and their applications: a review. Asian J. Biotechnol. 3 (2), 98–124.

Desire, M.H., Bernard, F., Forsah, M.R., 2014. Enzymes and qualitative phytochemical screening of endophytic fungi isolated from Lantana camara Linn. Leaves. J Appl Biol Biotech 2014;2: 1–6.

Deswal, D., Gupta, R., Nandal, P., 2014. “Fungal pretreatment improves amenability of lignocellulosic material for its saccharification to sugars,” Carbohydrate Polymers, vol. 99, pp. 264–269.

Deswal, D., Khasa, Y.P., Kuhad, R.C., 2011. Optimization of cellulase production by abrown rot fungus Fomitopsis sp RCK2010 under solid state fermentation,Bioresour. Technol. 102 6065–6072.

Devi, N.N., Prabakaran, J.J., Wahab, F., 2012. Phytochemical analysis and enzyme analysis of endophytic fungi from Centella asiatica. Asian Pac J Trop Biomed 2: S1280–S1284.

Dey, P., Banerjee, J., Marti, M., 2011. Comparative lipid profiling of two endophytic fungal isolates Colletrotrichum sp. and Alternaria sp. having potential utilities as biodiesel feedstock. Bioresour Technol 102: 5815–5823.

Dhaliwal, S.S., Oberoi, H.S., Sandhu, S.K., 2011. Enhanced ethanol production from sugarcane juice by galactose adaptation of a newly isolated thermotolerant strain of Pichia kudriavzevii. Bioresour Technol 102(10): 5968–5975.

Dhar, H., Kasana, R.C., Dutt, S., Gulati, A., 2015. Cloning and expression of low temperature active endoglucanase EG5C from Paenibacillus sp. IHB B 3084. International Journal of Biological Macromolecules 81, 259–266. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.060

Dias, A.A., Freitas, G.S., Marques, G.S.M., 2010. “Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi,” Bioresource Technology, vol. 101, no. 15, pp. 6045–6050,.

do Nascimento Santos, T., Dutra, E.D., do Prado, A.G., 2016. Potential for biofuels from the biomass of prickly pear cladodes: challenges for bioethanol and biogas production in dry areas. Biomass Bioenergy 85, 215–222.

Domsch, K.H., 1980. Compendium of soil fungi 1. Academic Press, London, UK.

Du, L., Robles, A.J., King, J.B., Mooberry, S.L., Cichewicz, R.H., 2014. Cytotoxic Dimeric Epipolythiodiketopiperazines from the Ascomycetous Fungus *Preussia typharum*. Journal of Natural Products 77, 1459–1466. https://doi.org/10.1021/np5002253

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and relatedsubstances. Anal Chem. 1956;28(3):

Dyk, J.S., Pletschke, B.I., 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes: factors affecting enzymes, conversion and synergy. Biotechnol Adv 30.

Eaton, C.J., Cox, M.P., Scott, B., 2011. What triggers grass endophytes to switch from mutualism to pathogenism? Plant Sci 180: 190–195.

Ebringerova, A., 2005. Structural Diversity and Application Potential of Hemicelluloses. Macromol. Symp. 232, 1–12.

Edgardo, A., Carolina, P., Manuel, R., 2008. Selectionof thermotolerant yeast strains Saccharomyces cerevisiae for bioethanol production. Enzyme MicrobTech. 2008 ;43(2): 120–123.

El Enshasy, H.A., Hanapi, S.Z., Abdelgalil, S.A., 2017. Mycoremediation: Decolourization Potential of Fungal Ligninolytic Enzymes. Mycoremediation and Environmental Sustainability, Fungal Biology,.

El Jemli, M., Kamal, R., Marmouzi, I., 2016. Radical-Scavenging Activity and Ferric Reducing Ability of Juniperus thurifera (L.), J. oxycedrus (L.), J. phoenicea (L.) and Tetraclinis articulata (L.), Hindawi Publishing Corporation Advances in Pharmacological Sciences.

El-Batal, A.I., El-Kenawy, N.M., Yassin, A.S., 2015. Laccase production by Pleurotus ostreatus and its application in synthesis of gold nanoparticles. Biotechnol Rep 5:31–39. https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.11.001.

El-Bondkly Ahmed, M.A., El-Gendy Mervat, M.A., 2011. Cellulase production from agricultural residues by recombinant fusant strain of a fungal endophyte of the marine sponge Latrunculia corticata for production of ethanol. Antonie van Leeuwenhoek 101: 331–346.

El-Bondkly, A.M., El-Gendy, M.M.A., 2010. Keratinolytic activity from new recombinant fusant AYA2000, an endophytic Micromonospora spp. Can J Microbiol 56:748–760.

El-Gendy, M.M.A., 2010. Optimization of process parameters for keratinase produced by endophytic Penicillium spp. Morsy1 under solid state fermentation. Appl Biochem Biotechnol 162:780–794.

Elisashvili, V., Kachlishvili, E., 2008. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 35, 1531–1538.

Eriksson, K.-E., Blanchette, R., Ander, P., 2012. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer, Berlin. https://doi.org/10.1007/978-3-642-46687-8.

Fatehi, P., 2013. Production of Biofuels from Cellulose of Woody Biomass, in: Kadla, J. (Ed.), Cellulose - Biomass Conversion. InTech. https://doi.org/10.5772/50740

Favaro, L., Viktor, M.J., Rose, S.H., 2015. Consolidated bioprocessing of starchy substrates into ethanol by industrial Saccharomyces cerevisiae strains secreting fungal amylases. Biotechnol Bioeng 112(9): 1751–1760.

Fisher, P.J., Pertini, L.E., Sutton, B.C., 1993. A comparative study of fungal endophytes in xylem and bark of Eucalptypus niteus in Australia and England. Sydowia 45.

Fillat, U., Ibarra, D., Eugenio, M., 2017. Laccases as a Potential Tool for the Efficient Conversion of Lignocellulosic Biomass: A Review. Fermentation 3(2), 17.

Fillat, U., Martin-Sampedro, R., Macaya-Sanz, D., 2016. Screening of eucalyptus wood endophytes for laccase activity," Process Biochemistry, vol. 51, pp. 589–598.

Forootanfar, H., Faramarzi, M.A., Shahverdi, A.R., 2011. Purification and biochemical characterization of extracellular laccase from the ascomycete Paraconiothyrium variabile. Bioresour Technol. 102: 18008–1814.

Fouda, A.H., Hassan, S.E.-D., Eid, A.M., Ewais, E.E.-D., 2015. Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant Asclepias sinaica (Bioss.). Annals of Agricultural Sciences 60, 95–104. https://doi.org/10.1016/j.aoas.2015.04.001

Foudil-Cherif, Y., Yassaa, N., 2012. Enantiomeric and non-enantiomeric monoterpenes of Juniperus communis L. and Juniperus oxycedrus needles and berries determined by HS-SPME and enantioselective GC/MS. Food Chemistry 135, 1796–1800. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.073

Fox, J.M., Levine, S.E., Blanch, H.W., 2012. An evaluation of cellulosesaccharification and fermentation with an engineered Saccharomyces cerevisiaecapable of cellobiose and xylose utilization. Biotech. J. 7, 361–373.

Franden, M.A., Pienkos, P.T., Zhang, M., 2009. Development of a high-through put method to evaluate the impact of inhibitory compounds from lignocellulosic hydrolysates on the growth of Zymomonas mobilis. J. Biotechnol., 144, 259-267.

Fürnkranz, M., Lukesch, B., Müller, H., 2012. Microbial diversity inside pumpkins: microhabitat-specific communities display a high antagonistic potential against phytopathogens. Microb. Ecol. 63: 418–428.

Gao, H., Chu, X., Wang, Y., 2013. Media optimization for laccase production by Trichoderma harzianum ZF-2 using response surface methodology. J Microbiol Biotechnol 23: 1757–1764.

Gao, Y., Zhao, J.T., Zu, Y.G., 2011. Characterization of five fungal endophytes producing cajaninstilbene acid isolated from pigeon pea [Cajanus cajan (L.) Mill sp]. PLoS One 6:e 27589.

Garcia, A., Rhoden, S.A., Bernardi-Wenzel, J., 2012. Antimicrobial activity of crude extracts of endophytic fungi isolated from medicinal plant Sapindus saponaria L. J Appl Pharm Sci 2: 035–040.

Garcia-Aparicio, M.P., Oliva, J.M., Manzanares, P., 2011. Second-generation ethanol production from steam exploded barley straw by Kluyveromyces marxianus CECT 10875. Fuel 90: 1624–1630.

Gaurav, N., Sivasankar, S., Kiran, G., 2017. Utilization of bioresources for sustainable biofuels: a review. Renewable Sustainable Energy Rev 73, 205–214.

Gautam, S.P., Bundela, P.S., Pandey, A.K., Khan, J., Awasthi, M.K., Sarsaiya, S., 2011. Optimization for the Production of Cellulase Enzyme from Municipal Solid Waste Residue by Two Novel Cellulolytic Fungi. Biotechnology Research International 2011, 1–8. https://doi.org/10.4061/2011/810425

Gerardi, M.H., 2003. The Microbiology of Anaerobic Digesters, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, pp. 99–103.

Ghose, T.K., 1987. MEASUREMENT OF CELLULASE ACTIVITIES. Pure and Appl Chem. 59(2): 257–268.

Ginestra, G., Parker, M.L., Bennett, R.N., 2009. Anatomical, chemical, and biochemical characterization of cladodes from prickly pear [Opuntia ficus-indica (L.) Mill.]. J Agric Food Chem 57:10323–10330.

Gochev, V.K., Krastanov, A.I., 2007. Isolation of laccase producing Trichoderma sp. Bulg. J. Agric. Sci. 13, 171–176.

Goldbeck, R., Ramos, M.M., Pereira, G.A.G., Maugeri-Filho, F., 2013. 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

Gonzalez, J.C., Medinal, S.C., Rodriguez, A., 2013. Production of Trametes pubescens laccase under submerged and semi-solid culture conditions on agroindustrial wastes. PLoS One 8(9):e 73721.

Gonzalez-Bautista, E., Santana-Morales, J.C., Ríos-Fr´anquez, J.C., 2017. Phenolic compounds inhibit cellulase and xylanase activities of Cellulomonas flavigena PR-22 during saccharification of sugarcane bagasse. Fuel 196, 32–35. https://doi.org/ 10.1016/j.fuel.2017.01.080.

González-Teuber, M., 2016. The defensive role of foliar endophytic fungi for a South American tree 050.

Gosling, S.N., Arnell, N.W., 2016. A global assessment of the impact of climate change on water scarcity. Clim. Change 134, 371–385.

Gottschalk, L.M.F., Oliveira, R.A., da Silva Bon, E.P., 2010. Cellulases, xylanases, b-glucosidase and ferulic acid esterase produced by Trichoderma and Aspergillus act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. Biochem Eng J 51: 72–78.

Gouveia, E.R., Nascimento, R.D., Souto-Maior, A.M., 2009. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. Quim. Nova,Vol. 32, No. 6, 1500–1503.

Guevara-Figueroa, T., Jimenez-Islas, H., Reyes-Escogido, M.L., 2010. Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (Opuntia spp). Journal of Food Composition and Analysis, 23(6), 525-532.

Gui, X., Wang, G., Hu, M., 2013. Combined fungal and mild acid pretreatment of Glycyrrhiza uralensis residue for enhancing enzymatic hydrolysis and oil production," Bioresources, vol. 8, no. 4, pp. 5485–5499.

Guo, K., Mou, X., Huang, J., 2014. Trans-caryophyllene suppresses hypoxia-induced neuroinflammatory responses by inhibiting NF-κB activation in microglia. J Mol Neurosci 54(1): 41–48.

Guo, W., Yao, Z., Zhou, C., 2012. Purification and characterization of three laccase isozymes from the white rot fungus Trametes sp. HS-03. Afr J Biotechnol. 11(31): 7916–22.

Gupta, R., Mehta, G., Khasa, Y.P., 2011. Fungal delignification of lignocellulosic biomass improves the saccharification of cellulosics vol. 22, no. 4, pp. 797–804.

Gupta, V.K., Kubicek, C.P., Berrin, J.-G., Wilson, D.W., Couturier, M., Berlin, A., Filho, E.X.F., Ezeji, T., 2016. Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass. Trends in Biochemical Sciences 41, 633–645. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.04.006

Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmientoa, N., Montoya, D., 2013. Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos.Rev Iberoam Micol 32: 1–12.

Haghighi Mood, S., Hossein Golfeshan, A., Tabatabaei, M., Salehi Jouzani, G., Najafi, G.H., Gholami, M., Ardjmand, M., 2013. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. Renewable and Sustainable Energy Reviews 27, 77–93. https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.033

Hahm, S.W., Park, J., Son, Y.S., 2011. Opuntia humifusa stems lower blood glucose and cholesterol levels in streptozotocin-induced diabetic rats. Nutr Res. 31:479–87.

Hajdari, A., Mustafa, B., Gashi, V., Nebija, D., Ibraliu, A., Novak, J., 2014. Chemical composition of the essential oils of ripe berries of Juniperus oxycedrus L., growing wild in Kosovo. Biochemical Systematics and Ecology 57, 90–94. https://doi.org/10.1016/j.bse.2014.07.022

Hamza, M., Khoufi, S., Sayadi, S., 2012. Fungal enzymes as a powerful tool to release antioxidants from olive mill wastewater. Food Chemistry 131: 1430–1436.

Hanlin, R.T., 1998. Combined keys to Illustrated genera of ascomycetes, volume I APS Press, St. Paul, MN.

Hansen, G.H., Lübeck, M., Frisvad, J.C., 2015. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: comparison of solid state andsubmerged fermentation, Process Biochem. 50 1327–1341.

Haq, I., Shahzadi, K., Hameed, U., 2006. Solid state fermentation of cellulases by locally isolated Trichoderma harzianum for the exploitation of agriculture byproducts. Pakistan J Biol Sci 9(9): 1779–1782.

Haque, M., Epplin, F.M., Biermacher, J.T., 2014. Marginal cost of delivering switch grass feedstock and producing cellulosic ethanol at multiple biorefineries. Biomass Bioenergy 66, 308–309.

Hardoim, P.R., Van Overbeek, L.S., Berg, G., 2015. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 79: 293–320.

Hartley, S.E., Eschen, R., Horwood, J.M., 2015. Infection by a foliar endophyte elicits novel arabidopside-based reactions in its host, Cirsium arvense. New Phytol. 205, 816–827.

Hartley, S.E., Gange, A.C., 2009. Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context 323–342.

Hasunuma, T., Kondo, A., 2012. Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains. Process Biochem 47: 1287–1294.

Hegde, S.V., Ramesha, A., Srinvas, C., 2011. Optimization of amylase production from an endophytic fungi Discosia sp. isolated from Calophyllum inophyllum. Journal of Agricultural Technology Vol. 7(3): 805–813.

Ho, D.P., Ngo, H.H., Guo, W., 2014. A mini review on renewable sources for biofuel. Bioresour Technol 169: 742–749.

Huang, Q., An, H., Song, H., Mao, H., Shen, W., Dong, J., 2015. Diversity and biotransformative potential of endophytic fungi associated with the medicinal plant Kadsura angustifolia. Research in Microbiology 166, 45–55. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.12.004

Hugouvieux-Cotte-Pattat, H., 2016. Metabolism and virulence strategies in Dickeya–host interactions. In: San Francisco, M., B (Eds.), Progress in Molecular Biology and Translational Science, 142. Academic Press, San Francisco, pp. 93–129.

Hyde, K.D., Soytong, K., 2008. The fungal endophyte dilemma, Fungal Divers. 33: 163–173.

Iandolo, D., Piscitelli, A., Sannia G., 2011. Enzyme production by solidsubstrate fermentation of Pleurotus ostreatus and Trametes versicolor ontomato pomace, Appl. Biochem. Biotechnol. 163 40–51.

Ibarra, D., Eugenio, M.E., Ca˜nellas, I., 2017. Potential of different poplar clones for sugar production," Wood and Science Technology, vol. 51, no. 3, pp. 669– 684,.

Ibrahim, S.R.M., Abdallah, H.M., Elkhayat, E.S., 2018. Fusaripeptide A: New antifungal and anti-malarial cyclodepsipeptide from the endophytic fungus Fusarium sp. J. Asian Nat. Prod. Res.20, 75–85.

Idrees, M., Adnan, A., Bokhari, S.A., 2014. Production of Fermentable Sugars by Combined Chemo-Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Material for Bioethanol Production. Brazilian Journal of Chemical Engineering, Vol. 31, No. 02, pp. 355 - 363, dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20140312s00002415.

Ilyas, M., Kanti, A., Jamal, Y., 2009. Biodiversity of endophytic fungi associated with Gambieruncaria roxb. (Rubiaceae) from west Sumatra. Biodiversitas 10:23–28 23–28.

Impullitti, A., Malvick, D., 2013. Fungal endophyte diversity in soybean. J. Appl. Microbiol. 114, 1500–1506.

Irfan, M., Nadeem, M., Syed, Q., 2014. Ethanol production from agricultural wastes using Sacchromyces cervisae Braz. J Microbiol 45(2): 457–465.

Iroba, K.L., Tabil, L.G., Dumonceaux, T., 2013. Effect of alkaline pretreatment on chemical composition of lignocellulosic biomass using radio frequency heating. Biosyst Eng 116(4): 385–398.

Isono, N., Hayakawa, H., Usami, A., 2012. A comparative study of ethanol production by Issatchenkia orientalis strains under stress conditions. J Biosci Bioeng 113: 76–78.

Jalgaonwala, R.E., Mohite, B.V., Mahajan, R.T., 2017. A review: natural products from plant associated endophytic fungi. J. Microbiol. Biotechnol. Res. 1, 21–32.

Jegannathan, K.R., Nielsen, P.H., 2013. Environmental assessment of enzyme use in industrial production—a literature review. J Clean Prod 42, 228–240.

Jeya, M., Moon, H.-J., Kim, S.-H., 2010. Conversion of woody biomass into fermentable sugars by cellulase from Agaricus arvensis. Bioresour Technol 101: 8742–8749.

Jia, M., Chen, L., Xin, H.-L., 2016. A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review 7, 906. https://doi.org/doi: 10.3389/fmicb.2016.00906

Jiang, S., Duan, J.A., Tao, J.H., 2010. Ecological distribution and elicitor activities of endophytic fungi in Changium smyrnioides. Chin.Tradit.Herb.Drugs 1, 121–125.

Jin, C., Yao, M., Liu, H., 2011. Progress in the production and application of n-butanol as a biofuel. Renew Sustain Energ Rev 15: 4080–4106.

Jonsson, L.J., Alriksson., B., Nilvebrant, N.-O., 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. Biotechnol Biofuels 6: 1–10.

Juturu, V., Wu, J.C., 2014. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. Renewable and Sustainable Energy Reviews 33, 188–203.

Kalra, K., Chauhan, R., Shavez, M., 2013. Isolation of laccase producing Trichoderma spp. and effect of pH and temperature on its activity. Int. J. Chem. Environ. Technol. 5 (5) 2229–2235.

Kalyani, D., Dhiman, S.S., Kim, H., 2012. Characterization of a novel laccase from the isolated Coltricia perennis and its application to detoxification of biomass. Process Biochem 47:671–678. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.013.

Kameshwar, A.K.S., Qin, W., 2016. Qualitative and Quantitative Methods for Isolation and Characterization of Lignin-Modifying Enzymes Secreted by Microorganisms. Bioenerg. Res.

Kapu, N.S., Trajano, H.L., 2014. Review of hemicellulose hydrolysis in softwoods and bamboo. Biofpr 8(6), 857–870.

Karp, S.G., Faraco, V., Amore, A., 2015. Statistical optimization of laccase production and delignification of sugarcane bagasse by Pleurotus ostreatus in solidstate fermentation. Biomed Res Int 8.

Kasaei, A., Mobini-Dehkordi, M., Mahjoubi, F., 2017. Isolation of taxol-producing endophytic fungi from Iranian yew through novel molecular approach and their effects on human breast cancer cell line. Curr.Microbiol. 74, 702–709.

Kaur, U., Oberoi, H.S., Bhargav, V.K., 2012. Ethanol production from alkali- and ozone-treated cotton stalks using thermotolerant Pichia kudriavzevii HOP-1. Ind Crops Prod 37: 219–226.

Kemen, E., Jones, J.D., 2012. Obligate biotroph parasitism: can we link genomes to lifestyles? Trends Plant Sci. 17, 448–457.

Khan-A, L., Al-Harrasi, A., Al-Rawahi, A., Al-Farsi, Z., Al-Mamari, A., Waqas, M., Asaf, S., Elyassi, A., Mabood, F., Shin, J.-H., Lee, I.-J., 2016. Endophytic Fungi from Frankincense Tree Improves Host Growth and Produces Extracellular Enzymes and Indole Acetic Acid. PLOS ONE 11, e0158207. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158207

Khan, A.L., Asaf, S., Khan, A.R., Al-Harrasi, A., Al-Rawahi, A., Lee, I.-J., 2016. First draft genome sequencing of indole acetic acid producing and plant growth promoting fungus Preussia sp. BSL10. Journal of Biotechnology 225, 44–45. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.03.025

Khan, A.L., Hamayun, M., Kang, S.-M., 2012. Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of Paecilomyces formosus LHL10. BMC Microbiol 12: 3.

Khan, A.L., Waqas, M., Hamayun, M., 2013. Co-synergism of endophyte Penicillium resedanum LK6 with salicylic acid helped Capsicum annuum.

Khan, A.L., Waqas, M., Hussain, J., Al-Harrasi, A., Hamayun, M., Lee, I.-J., 2015. Phytohormones enabled endophytic fungal symbiosis improve aluminum phytoextraction in tolerant Solanum lycopersicum: An examples of Penicillium janthinellum LK5 and comparison with exogenous GA3. Journal of Hazardous Materials 295, 70–78. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.04.008

Kharwar, R., Gond, S.K., Kumar, A., 2010. A comparative study of endophytic and epiphytic fungal association with leaf of Eucaliptus citriodora Hook., and their antimicrobial activity 1941–1948.

Khatabi, O., Hanine, H., Elothmani, D., 2011. Extraction and determination of polyphenols and betalain pigments in the Moroccan Prickly pear fruits (Opuntia ficus indica) . Arabian Journal of Chemistry 9, S278-S281 .

Kim, S.C., Kang, S.H., Choi, E.Y., Hong, Y.H., Bok, J.D., Kim, J.Y., Lee, S.S., Choi, Y.J., Choi, I.S., Cho, K.K., 2015. Cloning and Characterization of an Endoglucanase Gene from *Actinomyces* sp. Korean Native Goat 40. Asian Australas. J. Anim. Sci 29, 126–133. https://doi.org/10.5713/ajas.15.0616

Kovac, J., Simunovic, K., Wu, Z., 2015. Antibiotic resistance modulation and modes of action of (−)-α-pinene in campylobacter jejuni. PLoS One 10(4):e 0122871.

Krumpel, J., George, T., Gasston, B., 2020. Suitability of Opuntia ficus-indica (L) Mill. and Euphorbia tirucalli L. as energy crops for anaerobic digestion. J. Arid Environ. 174, 104047.

Kudanga, T., Le Roes-Hill, M., 2014. Laccase applications in biofuels production: current status and future prospects, Appl. Microbiol. Biotechnol. 98 6525–6542.

Kuhar, F., Castiglia, V., Levin, L., 2015. Enhancement of laccase production and malachite green decolorization by co-culturing Ganoderma lucidum and Trametes versicolor in solid-state fermentation. Int Biodeterior Biodegrad 104: 238–243.

Kuhar, S., Nair, L.M., Kuhad, R.C., 2008. Pretreatment of lignocellulosic material with fungi capable of higher lignin degradation and lower carbohydrate degradation improves substrate acid hydrolysis and the eventual conversion to ethanol," Canadian Journal of Microbiology, vol. 54, no. 4, pp. 305–313.

Kuloyo, O.O., du Preez, J.C., García, A.M. del P., 2014. Opuntia ficus-indica cladodes as feedstock for ethanol production by Kluyveromyces marxianus and Saccharomyces cerevisiae. World Journal Microbiology and Biotechnology 30, 3173–3183.

Kumar, A., Kanwar, S.S., 2012. Lipase production in SSF: recent development and biotechnological applications. Dyn Biochem Process Biotechnol Mol Biol. 6(I): 13–27.

Kumar, D., Kumar, A., Sondhi, S., 2018. An alkaline bacterial laccase for polymerization of natural precursors for hair dye synthesis. 3 Biotech. 8: 182.

Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., 2009. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. Ind Chem. Res, Eng.

Kumar, R., Kaur, J., Jain, S., 2016. Optimization of laccase production from Aspergillus flavus by design of experiment technique: partial purification and characterization. J Genet Eng Biotechnol 14:

Kumar, S., Kaushik, N., 2012. Metabolites of endophytic fungi as novel source of biofungicide: a review. Phytochem Rev 11, 507–22.

Kurian, J.K., Minu, A.K., Banerji, A., 2010. Bioconversion of hemicellulose hydrolysate of sweet sorghum bagasse to ethanol by using Pichia stipitis ncim 3497 and Debaryomyces hansenii sp. BioResources, 5(4), 2404–2416.

Kusari, S., Lamshöft, M., Spiteller, M., 2009. Aspergillus fumigatus Fresenius, an endophytic fungus from Juniperus communis L. Horstmann as a novel source of the anticancer pro-drug deoxypodophyllotoxin. J. Appl. Microbiol., 107: 1019–1030.

Kusari, S., Singh, S., Jayabaskaran, C., 2014. Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype. Trends Biotechnol 32: 297–303.

Kwon, Y.J., Ma, A.-Z., Li, Q., 2011. Effect of lignocellulosic inhibitory compounds on growth and ethanol fermentation of newly-isolated thermotolerant Issatchenkia orientalis. Bioresour Technol. 2011 ;102(17): 8099–8104.

Lakshmi, P.J., Selvi, K.V., 2013. Anticancer potentials of secondary metabolites from endophytes of Barringtonia acutangula and its molecular characterization. Int J Curr Microbiol App Sci 2: 44–45.

Lan, E.I., Liao, J.C., 2013. Microbial synthesis of n-butanol, isobutanol, and other higher alcohols from diverse resources. Bioresource Technology 135, 339–349. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.104

Lane, M.M., Morrissey, J.P., 2010. Kluyveromyces marxianus: a yeast emerging from its sister's shadow. Fungal Biol Rev 24: 17–26.

Langan, P., Petridis, L., O'Neill, H.M., 2014. Common processes drive the thermochemical pretreatment of lignocellulosic biomass. Green Chem 16: 63–68.

Latika, B., Sonia, J., 2015. Biovalorization potential of peels of Ananas cosmosus (L.) Merr. for ethanol production by Pichia stipites NCIM 3498 & Pachysolen tannophilus MTCC1077. Indian Journal of Experimental Biology 53, pp. 819–827.

Le Calvez, T., Burgaud, G., Mahé, S., Barbier, G., Vandenkoornhuyse, P., 2009. Fungal Diversity in Deep-Sea Hydrothermal Ecosystems. Applied and Environmental Microbiology 75, 6415–6421. https://doi.org/10.1128/AEM.00653-09

Lee, K.M., Kalyani, D., Tiwari, M.K., 2012. Enhanced enzymatic hydrolysis of rice straw by removal of phenolic compounds using a novel laccase from yeast Yarrowia lipolytica. Bioresour Technol 123:636–645. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.066.

Lee, S.H., Lim, V., Lee, C.K., 2018. Newly isolate highly potential xylanase producer strain from various environmental sources. BiocatalAgricBiotechnol. 16:

Lesjak, M.M., Beara, I.N., Orčić, D.Z., Anačkov, G.T., Balog, K.J., Francišković, M.M., Mimica-Dukić, N.M., 2011. Juniperus sibirica Burgsdorf. as a novel source of antioxidant and anti-inflammatory agents. Food Chemistry 124, 850–856. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.006

Li, S., Yang, X., Yang, S., 2012. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. Comput Struct Biotechnol J 2: 1–11.

Li, S.H., Li, G.M., Zhang, L., 2013. A demonstration study of ethanol production from sweet sorghum stems with advanced solid state fermentation technology. Appl Energ, 102: 260–265.

Li, X., Yu, H.Y., 2013. Characterization of a halostable endoglucanase with organic solvent-tolerant property from Haloarcula sp. G10 101–106.

Li, Y., Qi, B., Luo, J., 2015. Alkali recycling from rice straw hydrolyzate by ultrafiltration: fouling mechanism and pretreatment efficiency. Ind. Eng. Chem. Res. 54, 7925–7832.

Li, Z., Pei, X., Zhang, Z., Wei, Y., Song, Y., Chen, L., Liu, S., Zhang, S.-H., 2018. The unique GH5 cellulase member in the extreme halotolerant fungus Aspergillus glaucus CCHA is an endoglucanase with multiple tolerance to salt, alkali and heat: prospects for straw degradation applications. Extremophiles 22, 675–685. https://doi.org/10.1007/s00792-018-1028-5

Liang, X., Fu, Y., Liu, H., 2015. Isolation and characterization of enzyme-producing bacteria of the silkworm larval gut in bioregenerative life support system. Acta Astronautica 116, 247–253. https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2015.07.010

Lienqueo, M.E., Ravanal, M.C., Pezoa-Conte, R., 2016. Second generation bioethanol from Eucalyptus globulus Labill and Nothofagus pumilio: ionic liquid pretreatment boosts the yields. Ind. Crop Prod. 80, 148–155.

Liew, C.Y., Husaini, A., Hussain, H., 2011. Lignin biodegradation and ligninolytic enzyme studies during biopulping of Acacia mangium wood chips by tropical white rot fungi. World J Microbiol Biotechnol 27: 1457–1468.

Limayem, A., Ricke, S.C., 2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects, Prog. Energy Combust. Sci. 38 449–467.

Lin, L., Yan, R., Liu, Y., 2010. In-depth investigation of enzymatic hydrolysis of biomass wastes based on three major components: Cellulose, hemicellulose and lignin. Bioresource Technology, 101, 8217-8223.

Lin, Y., Tanaka, S., 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. Appl Microbiol Biot. 2006;69(6): 627–642.

Lineweaver, H., Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. Am Chem Soc 658–666.

Liu, G., Qin, Y., Hu, Y., 2013. An endo-1,4-bglucanase PdCel5C from cellulolytic fungus Penicillium decumbens with distinctive domain composition and hydrolysis product profile. Enzyme Microb Technol 52:

Liu, H.Q., Feng, Y., Zhao, D.Q., 2012. Evaluation of cellulases produced fromfour fungi cultured on furfural residues and microcrystalline cellulose,Biodegradation 23 465–472.

Liu, Z.H., Qin, L., Jin, M.J., 2013. Evaluation of storage methods for the conversion of corn stover biomass to sugars based on steam explosion pretreatment. Bioresour Technol, 132: 5–15.

Lizardi-Jimenez, M.A., Hernandez-Martinez, R., 2017. Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass. 3 Biotech 7: 44.

Lopez-Abelairas, M., Alvarez Pallin, M., Salvachua, D., 2013. Optimisation of the biological pretreatment of wheat straw with white-rot fungi for ethanol production. Bioprocess Biosyst Eng 36(9):1251–1260. https://doi.org/10.1007/s00449-012-0869-z.

Lueangwattanapong, K., Ammam, F., Mason, P.M., 2020. Anaerobic digestion of Crassulacean Acid Metabolism plants: exploring alternative feedstocks for semi-arid lands. Bioresour. Technol. 297, 122262.

Luna, L., Meneses, M., Mendoza, G., 2013. Effect and enzyme activity of Pleurotus ostreatus on cell wall of barley straw. Livestock Research for Rural Development. 2013; 25, Article 223. Retrieved June 8, 25.

Ma, J., Zhang, X., Zhou, X., 2014. Revealing the changes in topochemical characteristics of poplar cell wall during hydrothermal pretreatment," Bioenergy Research, vol. 7, no. 4, pp. 1358–1368.

Maciel, G.M., Bracht, A., Souza, C.G.M., 2012. Fundamentals, diversity and application of white-rot fungi. In: Silva AP, Sol M (eds) Fungi: types, environmental impact and role in disease. Nova Science Publishers Inc., United States, pp 409–458.

Maeda, R.N., al., 2011. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using Penicillium funiculosum and Trichoderma harzianum. Process Biochem 46: 1196–1201.

Majeau, J.A., Brar, S.K., Tyagi, R.D., 2010. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. Bioresour. Technol., 101: 2331–2350.

Mandels, M., Weber, J., 1969. The Production of Cellulases. Advances in Chemistry 95, 391–413. https://doi.org/10.1021/ba-1969-0095.ch023

Mapperson, R.R., Kotiw, M., Davis, R.A., Dearnaley, J.D.W., 2014. The Diversity and Antimicrobial Activity of Preussia sp. Endophytes Isolated from Australian Dry Rainforests. Curr Microbiol 68, 30–37. https://doi.org/10.1007/s00284-013-0415-5

Maria, G.L., Sridhar, K.R., Raviraja, N.S., 2005. Antimicrobial and enzyme activity ofmangrove endophytic fungi of southwest coast of India. Journal of Agricultural technology1: 67–80.

Martinez-Patino, J.C., Romero-Garcıa, J.M., Ruiz, E., 2015. "High solids loading pretreatment of olive tree pruning with dilute phosphoric acid for bioethanol production by Escherichia coli," Energy and Fuels, vol. 29, pp. 1735–1742.

Martin-Sampedro, R., Fillat, U., Ibarra, D., 2015. Use of new endophytic fungi as pretreatment to enhance enzymatic saccharification of Eucalyptus globulus," Bioresource Technology, vol. 196, pp. 383–390.

Martín-Sampedro, R., López-Linares, J.C., Fillat, Ú., Gea-Izquierdo, G., Ibarra, D., Castro, E., Eugenio, M.E., 2017. Endophytic Fungi as Pretreatment to Enhance Enzymatic Hydrolysis of Olive Tree Pruning. BioMed Research International 2017, 1–10. https://doi.org/10.1155/2017/9727581

Matera, I., Gullotto, A., Tilli, S., 2008. Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus Trametes trogii complexed with p-toluate. Inorg Chim Acta 361, 4129–4137.

Matsushika, A., Inoue, H., Kodaki, T., 2009. Ethanol production from xylose in engineered Saccharomyces cerevisiae strains: current state and perspectives. Appl. Microbiol. Biotechnol. 84, 37–53.

Mattam, A.J., Kuila, A., Suralikerimath, N., 2016. Cellulolytic enzyme expression and simultaneous conversion of lignocellulosic sugars into ethanol and xylitol by a new Candida tropicalis strain Biotechnol Biofuels 9: 157.

M'barek, H.N., Taidi, B., Smaoui, T., Aziz, M.B., Mansouri, A., Hajjaj, H., 2019. Isolation, screening and identification of ligno-cellulolytic fungi from northern central Morocco. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. https://doi.org/10.25518/1780-4507.18182

Meijer, M., Houbraken, J.A.M.P., Dalhuijsen, S., 2011. Growth and hydrolase profiles can be used as characteristics to distinguish Aspergillus niger and other black aspergilla. Stud Mycol 69:19–30 19–30.

Meyling, N.V., Thorup-Kristensen, K., Eilenberg, J., 2011. Below-and aboveground abundance and distribution of fungal entomopathogens in experimental conventional and organic cropping systems. Biol. Control 59, 180–186.

Millati, I.R., Syamsiah, S., Niklasson, C., 2011. Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: A review,. Bioresources 6(4), 5225–5259.

Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anal. Chem. 31, 426–428. https://doi.org/10.1021/ac60147a030

Mina, M., Djokic, L., Nikolaivits, E., 2019. Identification and Characterization of New Laccase Biocatalysts from Pseudomonas Species Suitable for Degradation of Synthetic Textile Dyes. Catalysts, 9, 629.

Mirzadeh, S.S., Khezri, S.M., Rezaei, S., 2014. Decolorization of two synthetic dyes using the purified laccase of Paraconiothyrium variabile immobilized on porous silica beads. J Environ Health Sci Eng 12: 6–14.

Mondol, M.A.M., Farthouse, J., Islam, M.T., 2017. Metabolites from the endophytic fungus Curvularia sp. M12 act as motility inhibitors against Phytophthora capsici Zoospores. J. Nat. Prod. 70: 347–355.

Moon, C., Lee, C.H., Sang, B.I., 2011. Optimization of medium compositions favoring butanol and 1,3-propanediol production from glycerol by Clostridium pasteurianum. Bioresour Technol 102:

Moreno, A.D., Ibarra, D., Alvira, P., 2015. A review of biological delignification and detoxification methods for lignocellulosic bioethanol production. Critical Reviews in Biotechnology 35(3), 342–354.

Motyka, A., Zoledowska, S., Sledz, W., 2017. Molecular methods as tools to control plant diseases caused by Dickeya and Pectobacterium spp: a minireview. N. Biotech. 39, 181–189.

Murthy, N.K., Pushpalatha, K.C., Joshi, C.G., 2011. Antioxidant activity and phytochemical analysis of endophytic fungi isolated from Lobelia nicotianifolia. J Chem Pharm Res 3(5): 218–225.

Mussatto, S.I., Dragone, G., Guimarães, P.M.R., 2010. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. Biotechnol Adv. 2010 ;28(6): 817–830.

Mussatto, S.I., Machado, E.M.S., Carneiro, L.M., 2012. Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates. Applied Energy, 92, 763–768.

Myovela, H., Mshandete, A.M., Imathiu, S., 2019. Enhancement of anaerobic batch digestion of spineless cacti (Opuntia ficus indica) feedstock by aerobic pre-treatment. Afr. J. Biotechnol. 18, 12–22.

Nagraj, A.K., Singhvi, M., Kumar, V.R., Gokhale, D., 2014. Optimization Studies for Enhancing Cellulase Production by Penicillium janthinellum Mutant EU2D-21 Using Response Surface Methodology. BioResources 9, 1914–1923. https://doi.org/10.15376/biores.9.2.1914-1923

Nalini, M.S., Sunayana, N., Prakash, N.S., 2014. Endophytic fungal diversity in medicinal plants of Western Ghats, India. Int J Biodivers.

Nazir, A., Soni, R., Saini, H.S., 2009. Purification and characterization of an endoglucanase from Aspergillus terreus highly active against barley b-glucan and xyloglucan. World J. Microbiol. Biotechnol., 25, 1189–1197.

Nebbache, S., Abdelwaheb, C., Rabah, C., 2009. Chemical composition of Opuntia ficus-indica (L.) fruit. African Journal of Biotechnology Vol. 8 (8), pp. 1623–1624.

Nigam, P., 2013. Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications. Biomolecules 3, 597–611. https://doi.org/10.3390/biom3030597

Nisa, H., Kamili, A.N., Nawchoo, I.A., Shafi, S., Shameem, N., Bandh, S.A., 2015. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. Microbial Pathogenesis 82, 50–59. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.04.001

Nithya, K., Muthumary, J., 2011. Bioactive metabolite produced by Phomopsis sp, an endophytic fungus in Allamanda cathartica linn. Recent Res Sci Technol 3: 44–48.

Oberoi, H., Babbar, N., Sandhu, S., 2012. Ethanol production from alkali-treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation using newly isolated thermotolerant Pichia kudriavzevii HOP-1. J Ind Microbiol Biotechnol 39: 557–566.

Oberoi, H.S., Rawat, R., Chadha, B.S., 2014. Response surface optimization for enhanced production of cellulases with improved functional characteristics by newly isolated Aspergillus niger HN-2. Antonie van Leeuwenhoek 105, 119–134. https://doi.org/10.1007/s10482-013-0060-9

Olson, D.G., McBride, J.E., Shaw, A.J., 2012. Recent progress in consolidated bioprocessing. Curr Opin Biotechnol 23(3): 396–405.

Orhan, N., Berkkan, A., Deliorman Orhan, D., Aslan, M., Ergun, F., 2011. Effects of Juniperus oxycedrus ssp. oxycedrus on tissue lipid peroxidation, trace elements (Cu, Zn, Fe) and blood glucose levels in experimental diabetes. Journal of Ethnopharmacology 133, 759–764. https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.002

Pandey, S.S., Singh, S., Babu, C.S.V., Shanker, K., Srivastava, N.K., Kalra, A., 2016. Endophytes of opium poppy differentially modulate host plant productivity and genes for the biosynthetic pathway of benzylisoquinoline alkaloids. Planta 243, 1097–1114. https://doi.org/10.1007/s00425-016-2467-9

Pandiyan, K., Tiwari, R., Rana, S., 2014. Comparative efficiency of different pretreatment methods on enzymatic digestibility of Parthenium sp. World J Microbiol Biotechnol 30(1): 55–64.

Pant, A., Saikia, S.K., Shukla, V., 2014. β-Caryophyllene modulates expression of stress response genes and mediates longevity in Caenorhabditis elegans. Exp Gerontol 57: 81–95.

Panuthai, T., Sihanonth, P., Peapukiew, J., 2012. An extracellular lipase from the endophytic fungi Fusarium oxysporum isolated from the Thai medicinal plant, Croton oblongifolius Roxb. Afr J Microbiol Res 6: 2622–2638.

Parawira, W., Tekere, M., 2011. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. Critical Reviews in Biotechnology, 31(1), 20–31. https://doi.org/10.3109/07388551003757816.

Pardo, I., Camarero, S., 2015. Laccase engineering by rational and evolutionary design. Cell Mol Life Sci 72, 897–910.

Parisutham, V., Kim, T.H., Lee, S.K., 2014. Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: from pretreatment to biofuel production. Bioresour Technol 161: 431–440.

Patel, H., Gupte, A., 2016. Optimization of different culture conditions for enhanced laccase production and its purification from Tricholoma giganteum AGHP. Bioresour Bioprocess 3: 11.

Patel, H., Gupte, S., Gahlout, M., 2013. Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of Pleurotus ostreatus HP-1. 3 Biotech. 4: 77–84.4

Patel, S.J., Onkarappa, D.R., Shobha, K.S., 2007. Fungal pretreatment studies on rice husk and bagasse for ethanol production. EJEAFChe 6(4):1921–1926.

Paulova, L., Patakova, P., Branska, B., 2015. Lignocellulosic ethanol: technology design and its impact on processefficiency. Biotech. Adv. 33, 1091–1107.

Pavithra, N.L., Sathish, K., Ananda, K., 2012. Antimicrobial and enzyme activity of endophytic fungi isolated from Tulsi. J Pharm Biomed Sci ; 16 12.

Pena-Valdivia, C.B., Trejo, C., Arroyo-Pena, V.B., 2012. Diversity of unavailable polysaccharides and dietary fiber in domesticated nopalito and cactus pear fruit (Opuntia spp.). Chem. Biodivers. 9, 1599–1610.

Pérez-Cadena, R., Solares, T.E., Medina-Moreno, S.A., 2018. Production of Ethanol by Three Yeasts in Defined Media and Hydrolyzed Cladodes of Opuntia ficus-indica var. Atlixco. International Journal of Agriculture and Forestry, 8(1): 26-34 DOI: 10.5923/j.ijaf.20180801.05.

Pérez-Cadena-R, Medina-Moreno, S.A., Martinez, A., 2018. Effect of concentration of salts in ethanol production from acid hydrolysis of cladodes of Opuntia ficus indica Var. Atlixco. Revista Mexicana de Ingenieria Quimica, Vol.17, No.1, 349-364.

Peterson, R., Grinyer, J., Nevalainen, H., 2011. Extracellular hydrolase profiles of fungi isolated from koala faeces invite biotechnological interest. Mycol Prog 10: 207–218.

Petti, C., Harman-Ware, A.E., Tateno, M., 2013. Sorghum mutant RG displays antithetic leaf shoot lignin accumulation resulting in improved stem saccharification properties. Biotechnol Biofuels, 6: 146.

Pham, T.H., Quyen, D.T., Nghiem, N.M., 2012. Purification and properties of an endoglucanase from Aspergillus niger VTCC-F02 9.

Phitsuwan, P., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O., 2013. Present and potential applications of cellulases in agriculture, biotechnology, and bioenergy, Folia Microbiol. 58 163–176.

Ping, L., Cai, D., Luo, Z., 2016. Effect of acid pretreatment on different parts of corn stalk for second generation ethanol production. Bioresour. Technol. 206, 86–91.

Pinheiro, E.A., Carvalho, J.M., dos Santos, D.C., 2013. Antibacterial activity of alkaloids produced by endophytic fungus Aspergillus sp. EJC08 isolated from medical plant Bauhinia guianensis. Nat Prod Res ;27 1633–8.

Piscitelli, A., Giardina, P., Lettera, V., 2011. Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. Curr Genomics 12: 104.

Pitt, J.L., Hocking, A.D., 2009. Fungi and food spoilage. Springer Science+Business Media, LLC.

Potshangbam, M.S., Indira, D., Dinabandhu, S., 2017. Functional Characterization of Endophytic Fungal Community Associated with Oryza sativa L. and Zea mays L. Frontiers in Microbiology. 8: 325.

Premalatha, K., Kalra, A., 2013. Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from resinous and healthy wood of Aquilaria malaccensis, a red listed and highly exploited medicinal tree. Fungal Ecology 6, 205–211. https://doi.org/10.1016/j.funeco.2013.01.005

Prévot, V., Michel, L., Estelle, C., 2013. Comparative performance of commercial and laboratory enzymatic complexes from submerged or solid-state fermentation in lignocellulosic biomass hydrolysis. Bioresource Technology 129: 690+693.

Promputtha, I., Hyde, K.D., McKenzie, E.H.C., 2010. "Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes?" Fungal Diversity, vol. 41, pp. 89–99,.

Purahong, W., Hyde, K.D., 2011. Effects of fungal endophytes on grass and non-grass litter decomposition rates. Fungal Divers. 47, 1–7.

Puri, A., Padda, K.P., Chanway, C.P., 2016. Evidence of nitrogen fixation and growth promotion in canola (Brassica napus L.) by an endophytic diazotroph Paenibacillus polymyxa P2b-2R. Biol. Fertil. Soils 52: 119–125.

Qin, L., Li, W.-C., Liu, L., 2016. Inhibition of lignin-derived phenolic compounds to cellulose. Biotechnology for Biofuels, 9(1), 70.

Qin, L., Liu, Z.H., Li, B.Z., 2012. Mass balance and transformation of corn stover by pretreatment with different dilute organic acids. BioresourTechnol, 112: 319–326.

Qing, Q., Li, H., Kumar, R., 2013. Xylooligosaccharides production, quantification, and characterization in context of lignocellulosic biomass pretreatment. In Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals (pp. 391-415).

Quaratino, D., Ciaffi, M., Federici, E., 2008. Response surface methodology study of laccase production in Panus tigrinus liquid cultures. Biochemical Engineering Journal 39 : 236–245.

Quaratino, D., Federici, F., Petruccioli, M., 2007. Production, purification and partial characterisation of a novel laccase from the white-rot fungus Panus tigrinus CBS 577.79. Antonie van Leeuwenhoek. 91: 54–69.

Quesada-Moraga, E., López-Díaz, C., Landa, B.B., 2014. The hidden habit of the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana: first demonstration of vertical plant transmission. PLoS One 9:e 89278.

Quiroz-Castaneda, R.E., Perez-Mejia, N., Martínez-Anaya, C., 2011. Evaluation of different lignocellulosic substrates for the production of cellulases and xylanases by the basidiomycete fungi Bjerkandera adusta and Pycnoporus sanguineus, Biodegradation 22 565–572.

Rabemanolontsoa, H., Saka, S., 2016. Various pretreatments of lignocellulosics. Bioresour. Technol. 199, 83–91.

Ragauskas, A.J., Beckham, G.T., Biddy, M.J., 2014. Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery. Science 344 (6185), 1246843.

Rahikainen, J.L., Martin-Sampedro, R., Heikkinen, H., 2013. "Inhibitory effect of lignin during cellulose bioconversion: the effect of lignin chemistry on non-productive enzyme adsorption," Bioresource Technology, vol. 133, pp. 270–278,.

Rai, M., Rathod, D., Agarkar, G., 2014. Fungal growth promotor endophytes: a pragmatic approach towards sustainable food and agriculture. Symbiosis 62, 63–79.

Rajala, T., Velmala, S.M., Tuomivirta, T., 2013. Endophyte communities vary in the needles of Norway spruce clones. Fungal Biol 117: 182–190.

Rana, N., Walia, A., Gaur, A., 2013. α-Amylases from microbial sources and its potential applications in various industries, Natl. Acad. Sci. Lett. 36 9–17.

Ravikumar, G., Gomathi, D., Kalaiselvi, M., 2012. Production, purification and partial characterization of laccase from the mushroom Hypsizygus ulmarius. Int J Pharm Bio Sciences 3(3):

Revankar, M.S., Lele, S.S., 2006. Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus WR-1. Proc. Biochem., 41: 581–588.

Revankar-S, M., Lele, S.S., 2006. Increased production of extracellular laccase by the white rot fungus Coriolus versicolor. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 22, 921–926.

Rhoden, S.A., Garcia, A., Azevedo, J.L., 2013. In silico analysis of diverse endophytic fungi by using ITS1-5, 8S-ITS2 sequences with isolates from various plant families in Brazil. Gen Mol Res 12: 935–950.

Rhoden, S.A., Garcia, A., Rubin-Filho, C.J., 2012. Phylogenetic diversity of endophytic leaf fungus isolates from the medicinal tree Trichilia elegans (Meliaceae). Genet Mol Res 11: 2513–2522.

Richa, J.O., Leathersa, T.D., Andersona, A.M., 2013. Laccases from Aureobasidium pullulans. Enzym Microb Technol 53: 33–37.

Rico, A., Rencoret, J., Del Rio, J.C., 2014. Pretreatment with laccase and a phenolic mediator degrades lignin and enhances saccharification of Eucalyptus feedstock. Biotechnol Biofuels 7(1): 6.

Riyaz-Ul-Hassan, S., Strobel, G., Geary, B., 2013. An endophytic Nodulisporium sp. from Central America producing volatile organic compounds with both biological and fuel potential. J Microbiol Biotechnol 23: 29–35.

Robl, D., Delabona, P. da S., Mergel, C.M., Rojas, J.D., Costa, P. dos S., Pimentel, I.C., Vicente, V.A., da Cruz Pradella, J.G., Padilla, G., 2013. The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. BMC Biotechnol 13, 94. https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-94

Rocha, G.J.M., Nascimento, V.M., da Silva, V.E.N., 2014. Contributing to the environmental sustainability of the second generation ethanol production: delignification of sugarcane bagasse with sodium hydroxide recycling. Ind. Crops Prod. 59, 63–68.

Rodgers, C.J., Blanford, C.F., Giddens, S.R., 2010. Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes? Trends Biotechnol 28: 63–72.

Rodionova, M.V., Poudyal, R.S., Tiwari, I., Voloshin, R.A., Zharmukhamedov, S.K., Nam, H.G., Zayadan, B.K., Bruce, B.D., Hou, H.J.M., Allakhverdiev, S.I., 2017. Biofuel production: Challenges and opportunities. International Journal of Hydrogen Energy 42, 8450–8461. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.11.125

Rodriguez, R.J., White, J.F.Jr., Arnold, A.E., 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. New Phytol. 182, 314–330.

Roma-Marzio, F., Najar, B., Alessandri, J., Pistelli, L., Peruzzi, L., 2017. Taxonomy of prickly juniper (Juniperus oxycedrus group): A phytochemical–morphometric combined approach at the contact zone of two cryptospecies. Phytochemistry 141, 48–60. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.05.008

Rosa, L.H., Queiroz, S.C.N., Moraes, R.R., 2013. Coniochaetaligniaria: antifungal activity of the cryptic endophytic fungus associated withautotrophic tissue cultures of the medicinal plant Smallanthus sonchifolius(Asteraceae). Symbiosis ;60 133–42.

Rosa, L.H., Vieira, M.L.A., Cota, B.B., 2011. Endophytic fungi of tropical forests: a promising source of bioactive prototype molecules for the treatment of neglected diseases. In: Rundfeldt C (ed) Drug development—a case study based insight into modern strategies. Intech, Rijeka, pp 469–486.

Sadhasivam, S., Savitha, S., Swaminathan, K., 2008. Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated Trichoderma harzianum WL1. Process Biochem. 43: 736–742.

Sadrati, N., Daoud, H., Zerrog, A., 2013. Screening of antimicrobial and antioxidant secondary metabolites from endophytic fungi isolated from wheat (Triticum durum). J Plant Prot Res 53: 128–136.

Saha, B.C., Nichols, N.N., Cotta, M.A., 2011. Ethanol production from wheat straw by recombinant Escherichia coli strain FBR5 at high solid loading. Bioresour Technol 102: 10892–10897.

Sajben-Nagy, E., Manczinger, L., Škrbić, B., 2014. Characterization of an extracellular laccase of Leptosphaerulina chartarum. World J Microbiol Biotechnol. 30: 2449–2458.

Saliu, B.K., Sani, A., 2012. BIOETHANOL POTENTIALS OF CORN COB HYDROLYSED USING CELLULASES OF ASPERGILLUS NIGER AND PENICILLIUM DECUMBENS. EXCLI Journal 12.

Salvachua, D., Prieto, A., L´opez-Abelairas, M., 2011. Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw," Bioresource Technology vol. 102, no. 16, pp 7500–7506.

Sandhu, S.K., Oberoi, H.S., Dhaliwal, S.S., 2012. Ethanol production from Kinnow mandarin (Citrus reticulata) peels via simultaneous saccharification and fermentation using crude enzyme produced by Aspergillus oryzae and the thermotolerant Pichia kudriavzevii strain. Ann. Microbiol., 62, 655–666.

Santos, T.N., Dutra, E.M., do Prado, A.G., 2016. Potential for biofuels from the biomass of prickly pear cladodes: Challenges for bioethanol and biogas production in dry areas. Biomass and Bioenergy 85, 215–222.

Santos-zea, L., Guti, J.A., Serna-saldivar, S.O., 2011. Comparative Analyses of Total Phenols, Antioxidant Activity, and Flavonol Glycoside Profile of Cladode Flours from Different Varieties of Opuntia spp. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 7054-7061.

Saratale, G.D., Kshirsagar, S.D., Sampange, V.T., 2014. Cellulolytic enzymes production by utilizing agricultural wastes under solid state fermentation and its application for biohydrogen production. Appl Biochem Biotechnol 174(8): 2801–2817.

Sarkar, N., Ghosh, S.K., Bannerjee, S., 2012. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview.Renewable Energy 37: 19–27.

Saroj, P., P, M., Narasimhulu, K., 2018. Characterization of thermophilic fungi producing extracellular lignocellulolytic enzymes for lignocellulosic hydrolysis under solid-state fermentation. Bioresour. Bioprocess. 5, 31. https://doi.org/10.1186/s40643-018-0216-6

Savitha, S., Sadhasivam, S., Swaminathan, K., 2009. Modification of paper properties by the pretreatment of wastepaper pulp with Graphium putredinis, Trichoderma harzianum and fusant xylanases Bioresource Technology, 100, 883–889.

Schardl, C.L., Young, C.A., Pan, J., 2013. Currencies of mutualisms: sources of alkaloid genes in vertically transmitted epichloae. Toxins 5, 1064–1088.

Schückel, J., Matura, A., Van Pée, K.H., 2011. One-copper laccase-related enzyme from Marasmius sp.: Purification, characterization and bleaching of textile dyes. Enzym Microb Tech. 48(3): 278–84.

Schuster, B.G., Chinn, M.S., 2013. Consolidated Bioprocessing of Lignocellulosic Feedstocks for Ethanol Fuel Production. Bioenerg. Res. 6, 416–435. https://doi.org/10.1007/s12155-012-9278-z

Scott, S.A., Davey, M.P., Dennis, J.S., Horst, I., Howe, C.J., Lea-Smith, D.J., Smith, A.G., 2010. Biodiesel from algae: challenges and prospects. Current Opinion in Biotechnology 21, 277–286. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.005

Semerdjieva, I., Zheljazkov, V.D., Radoukova, T., Radanović, D., Marković, T., Dincheva, I., Stoyanova, A., Astatkie, T., Kačániová, M., 2019. Essential oil yield, composition, bioactivity and leaf morphology of Juniperus oxycedrus L. from Bulgaria and Serbia. Biochemical Systematics and Ecology 84, 55–63. https://doi.org/10.1016/j.bse.2019.04.001

Sen, S.K., Raut, S., Bandyopadhyay, P., 2016. Fungal decolouration and degradation of azo dyes: a review. Fungal Biol Rev 30: 112–133.

Serrano-Ruiz, J.C., West, R.M., Dumesic, J.A., 2010. Catalytic conversion of renewable biomass resources to fuel and chemicals. Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng. 1, 79–100.

Shah, S.P., Kalia, K.S., Patel, J.S., 2015. Optimization of cellulase production by *Penicillium oxalicum* using banana agrowaste as a substrate. J. Gen. Appl. Microbiol. 61, 35–43. https://doi.org/10.2323/jgam.61.35

Sharma, D., Goel, G., Sud, A., 2015. A novel laccase from newly isolated Cotylidia pannosa and its application in decolorization of synthetic dyes. Biocatal Agric Biotechnol 4: 661–666.

Sharma, R., Kocher, G.S., Bhogal, R.S., Oberoi, H.S., 2014. Cellulolytic and xylanolytic enzymes from thermophilic *Aspergillus terreus* RWY: Cellulolytic enzyme production by thermophilic *A. terreus*. J. Basic Microbiol. 54, 1367–1377. https://doi.org/10.1002/jobm.201400187

Sheikhi, F., Ardakani, M.R., Enayatizamir, N., 2012. The determination of assay for laccase of Bacillus subtilis WPI with two classes of chemical compounds as substrates, Indian J. Microbiol. 52 (4) 701–707.

Shen, J.H., Wyman, C.E., 2011. A novel mechanism and kinetic model to explain enhanced xylose yields from dilute sulfuric acid compared to hydrothermal pretreatment of corn stover. Bioresour. Technol. 102, 9111–9120.

Shraddha, R.S., Sehgal, S., Kamthania, M., 2011. Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. Enzyme Res.

Sideney Becker, O., 2013. Production of Cellulases by the Endophytic Fungus Fusarium oxysporum. microbiology 3, 131–134. https://doi.org/10.5923/j.microbiology.20130304.01

Silva, L.M., Lara Fagundes, J., Almeida Viegas, P.A., 2014. Produtividade da palma forrageira cultivada em diferentes densidades de plantio. Ciência Rural 44.

Silva-Hughes Alice, F., David, E.W., Charles, L.C., 2015. Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associatedwith the native medicinal cactus Opuntia humifusa (Cactaceae) from the United States. Microbiological Research.

Singh, A., Bishnoi, N.R., 2013. Ethanol production from pretreated wheat straw hydrolyzate by Saccharomyces cerevisiae via sequential statistical optimization. Ind Crop Prod. ;41 221–226.

Singh, A., Bishnoi, N.R., 2012. Optimization of enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw and ethanol production. Appl Microbiol Biotechnol 93: 1785–1793.

Singh, L.P., Gill, S.S., Tuteja, N., 2011. Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. Plant Signaling & Behavior, 6 (2): 175-191. DOI: 104161/psb.6.2.14146 175–191.

Siqueira, V.M., Conti, R., Araujo, J.M., 2011. Endophytic fungi from the medicinal plant Lippia sidoides Cham. and their antimicrobial activity. Symbiosis 53: 89–95.

Smitha, S.L., Correya, N.S., Philip, R., 2014. Marine fungi as a potential source of enzymes and antibiotics. Int J Res Mar Sci ;3 5–10.

Soares, J., Demeke, M.M., Foulquie-Moreno, M.R., 2016. Green coconut mesocarp pretreated by an alkaline process as raw material for bioethanol production. Bioresour. Technol. 216, 744–753.

Sondhi, S., Saini, K., 2019. Response surface based optimization of laccase production from Bacillus sp. MSK-01 using fruit juice waste as an effective substrate. Heliyon 5: e 01718.

Sondhi, S., Sharma, P., George, N., 2015. An extracellular thermo-alkali-stable laccase from Bacillus tequilensis SN4, with a potential to biobleach softwood pulp. 3 Biotech 5: 175–185.

Sri Lakshmi, A., Narasimha, G., 2012. Production of cellulases by fungal cultures isolated from forest litter soil. Ann. For. Res. 55(1): 85–92.

Sridevi, A., Narasimha, G., Rajasekhar Reddy, B., 2009. Production of Cellulase by Aspergillus niger on natural and pretreated lignocellulosic wastes. Internet J Microbiol 7: 580–592.

Sridevi, A., Narasimha, G., Ramanjaneyulu, G., 2015. Saccharification of pretreated sawdust by Aspergillus niger cellulose. 3 Biotech. 5: 883–892.

Stintzing, F.C., Carle, R., 2005. Cactus stems (Opuntia spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. Molecular Nutrition and Food Research 49, 175-194. doi: 10.1002/mnfr.200400071.

Stoilova, I., Krastanov, A., Stanchev, V., 2010. Properties of crude laccase from Trametes versicolor produced by solid-substrate fermentation. Advances in Bioscience and Biotechnology 1 : 208–215.

Stone, J.K., C.W. Bacon, White, J.F., 2000. An overview of endophytic microbes: endophytism defined, in: C.W. Bacon, J.F. White (Eds.), Microbial Endophytes, Marcel Dekker Inc. New York 3, 29.

Strakowska, J., Blaszczyk, L., Chelkowski, J., 2014. The significance of cellulolytic enzymes produced by Trichoderma in opportunistic lifestyle of this fungus. J. Basic Microbiol., 54(S1), S2–S13.

Strobel, G., 2014. The story of mycodiesel. Curr Opin Microbiol 19: 52–58.

Strobel, G.A., 2015. Bioprospecting-fuels from fungi. Biotechnol Lett 37(5): 973–982.

Sun, H., Cao, C., Sun, R., 2016. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. Bioresour. Technol. 199, 49–58. https://doi. org/10.1016/j.biortech.2015.08.061.

Sun, H., Ge, X., Hao, Z., 2010. Cellulase production by Trichoderma sp. on apple pomace under solid state fermentation. African J Biotechnol 9(2): 163–166.

Sun, Q., Foston, M., Meng, X., 2014. Effect of lignin content on changes occurring in poplar cellulose ultrastructure during dilute acid pretreatment. Biotech Biofuels 7: 150.

Sun-Q, Foston, M., Sawada, D., 2014. Comparison of changes in cellulose ultrastructure during different pretreatments of poplar," Cellulose, vol. 21, no. 4, pp. 2419–2431.

Sunil, K.D., Manish, K.G., Ved, P., 2018. Endophytic Fungi: A Source of Potential Antifungal Compounds J. Fungi, 4, 77.

Sunitha, V., Ramesha, A., Savitha, J., 2012. Amylase production by endophytic fungi cylindrocephalum sp. isolated from medicinal plant alpinia calcarata (haw.) Roscoe. Brazilian Journal of Microbiology 43: 1213–1221.

Sunitha, V.H., Devi, N., Srinivas, C., 2013. Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants.World J Agric Sci; 9: 1–9.

Suryanarayanan, T.S., 2013. Endophyte research: going beyond isolation and metabolite documentation. Fungal Ecol. 6: 561–568.

Suryanarayanan, T.S., Thirunavukkarasu, N., Govindarajulu, M.B., 2012. Fungal endophytes: an untapped source of biocatalysts. Fungal Divers 54: 19–30.

Tanasova, M., Sturla, S.J., 2012. Chemistry and biology of acylfulvenes: sesquiterpene-derived antitumor agents. Chem Rev 112(6): 3578–6010.

Tai, W.Y., Tan, J.S., Lim, V., Lee, C.K., 2019. Comprehensive studies on optimization of cellulase and xylanase production by a local indigenous fungus strain via solid state fermentation using oil palm frond as substrate. Biotechnol Progress 35, e2781. https://doi.org/10.1002/btpr.2781

Tao, G., Liu, Z.Y., Liu, F., 2013. Endophytic Colletotrichum species from Bletillaochracea (Orchidaceae), with descriptions of seven new species. Fungal Divers;61: 139–64.

Teerapatsakul, C., Parra, R., Bucke, C., 2007. Improvement of laccase production from Ganoderma sp. KU-Alk4 by medium engineering. J. Microb. Biotechnol., 23: 1519–1527.

Texco-López et al., 2018. Optimization Of The Acid Hydrolysis Of Cladodes Of Opuntia Ficus-Indica By Response Surface Methodology. Revista Mexicana de Ingeniería Química Vol. 17, No. 3 1095–1104.

Thangavelu, S.K., Ahmed, A.S., Ani, F.N., 2016. Review on bioethanol as alternative fuel for spark ignition engines. Renew. Sustain. Energy Rev. 56, 820–835.

Thiribhuvanamala, G., Prakasam, V., Kalaiselvi, G., 2013. Lignolytic enzyme by Pleurotus pulmonarius in differentagrowastes under solid state fermentation. Mushroom Res., 2: 89–96.

Thomas, L., Larroche, C., Pandey, A., 2013. Current developments in solid-state fermentation. Biochem Eng J 81: 146–161.

Tisma, M., znidarsic-Plazl, P., Vasic-Racki, D., 2012. Optimization of Laccase Production by Trametes versicolor Cultivated on Industrial Waste. Appl Biochem Biotechnol 166: 36–46.

Torres, M.S., White, J.F., Zhang, X., 2012. Endophyte-mediated adjustments in host morphology and physiology and effects on host fitness traits in grasses. Fungal Ecol 5: 322–330.

Trajano, H.L., Engle, N.L., Foston, M., 2013. The fate of lignin during hydrothermal pretreatment. Biotechnol. Biofuel. 6 (1), 110–125.

Travaini, R., Barrado, E., Bolado-Rodríguez, S., 2016. Effect of ozonolysis pretreatment parameters on the sugar release, ozone consumption and ethanol production from sugarcane bagasse. Bioresour. Technol. 214, 150–158.

Udeh, B., Erkurt, E., 2017. Compositional and structural changes in Phoenix canariensis and Opuntia ficus-indica with pretreatment: Effects on enzymatic hydrolysis and second generation ethanol production 702–707.

UNESCO, 2017. Urgent need to manage water more sustainably, says UN report. Unesco office in Brasilia. Available in:<http://www.unesco.org/new/en/brasilia/about-thisoffice/ single-view/news/urgent_need_to_manage_water_more_sustainably_says_un_ report/>, Mar 14.

Uzma, F., Chakrabhavi, D., Abeer, H., 2018. Endophytic Fungi—Alternative Sources of Cytotoxic Compounds: A Review 9. https://doi.org/doi: 10.3389/ fphar.2018.00309

Uzma, F., Konappa, N.M., Chowdappa, S., 2016. Diversity and extracellular enzyme activities of fungal endophytes isolated from medicinal plants of Western Ghats, Karnataka. Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences 3, 335–342. https://doi.org/10.1016/j.ejbas.2016.08.007

Vaithanomsat, P., Chedchant, J., Kreetachat, T., 2012. Improvement of lignin-degrading enzymes production from the white-rot fungus (Lentinus strigosus) and its application in synthetic dye removal. African Journal of Microbiology Research Vol. 6(2), pp. 267–278.

Valenzuela-Soto, J.H., Maldonado-Bonilla, L.D., Hern_andez-Guzm_an, G., 2015. Infection by a coronatine-producing strain of Pectobacterium cacticidum isolated from sunflower plants in Mexico is characterized by soft rot and chlorosis. J. Gen. Plant Pathol. 81, 368–381.

Valle, J.S., Vandenberghe, L.P.D., Santana, T.T., 2014. Optimization of Agaricus blazei laccase production by submerged cultivation with sugarcane molasses. Afr J Microbiol Res 8(9): 939–946.

Wan, C., Li, Y., 2010. Microbial delignification of corn stover by Ceriporiopsis subvermispora for improving cellulose digestibility," Enzyme and Microbial Technology, vol. 47, no. 1-2, pp. 31–36.

Wang, F., Hu, J.H., Guo, C., 2014. Enhanced laccase production by Trametes versicolor using corn steep liquor as both nitrogen source and inducer. Bioresour Technol 166: 602–605.

Wang, G., Tan, L., Sun, Z.-Y., 2015. Production of bioethanol from rice straw by simultaneous saccharification and fermentation of whole pretreated slurry using Saccharomyces cerevisiae KF-7. Environ Prog Sustain Energy 34: 582–588.

Wang, K.F., Hu, J.H., Guo, C., 2016. Scale-up laccase production from Trametes versicolor stimulated by vanillic acid. Bioprocess Biosyst Eng 39: 1041–1049.

Wang, L., Sharifzadeh, M., Templer, R., Murphy, R.J., 2013. Bioethanol production from various waste papers: Economic feasibility and sensitivity analysis. Applied Energy 111, 1172–1182. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.08.048

Wang, Q., Hu, J., Shen, F., 2016. Pretreating wheat straw by the concentrated phosphoric acid plus hydrogen peroxide (PHP): investigations on pretreatment conditions and structure changes. Bioresour. Technol. 199, 245–257.

Wang, S.S., Ning, Y.J., Wang, S.N., 2017. Purification, characterization, and cloning of an extracellular laccase with potent dye decolorizing ability from white rot fungus Cerrena unicolor GSM-01. Int J Biol Macromol 95: 920–927.

Wang, T., Ma, Y.-X., Ye, Y.-H., 2017. Screening and identification of endophytic fungi producing podophyllotoxin compounds in Sinopodophyllum hexandrum stems. Chinese J. Exp.Trad. Med. Formul. 2: 006.

Wang, X., Kan, G., Shi, C., 2019. Purification and characterization of a novel wild-type α-amylase from Antarctic sea ice bacterium Pseudoalteromonas sp. M175. Protein Expression and Purification 164 : 105444.

Wang, X., Radwan, M.M., Tarawneh, A.M., 2013. Antifun-gal activity against plant pathogens of metabolites from the endophytic fungusCladosporium cladosporioides. J Agric Food Chem ; 61: 4551–5.

Wang, Z., Keshwani, D.R., Redding, A.P., 2010. Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass. Bioresource Technology, 101(10), 3583-3585.

Waqas, M., Kahan, A.L., Kamran, M., 2012. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. Molecules 17: 10754–10773.

Waqas, M., Khan, A.L., Hamayun, M., 2015. Endophytic fungi promote plant growth and mitigate the adverse effects of stem rot: an example of Penicillium citrinum and Aspergillus terreus. J. Plant Interact. 10, 280–287.

Wei, H., Wang, W., Alahuhta, M., 2014. Engineering towards a complete heterologous cellulase secretome in Yarrowia lipolytica reveals its potential for consolidated bioprocessing. Biotechnol Biofuels 7(1): 148.

Wesenberg, D., Kyriakides, I., Agathos, S.N., 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents, Elsevier Inc. 161–187.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS, in: PCR Protocols. Elsevier, pp. 315–322. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1

Wu, L., Han, T., Li, W., 2013. Geographic and tissue influences on endophytic fungal communities of Taxus chinensis var. maireiin China. Curr.Microbiol. 66, 40–48.

Wu, W., 2013. Fuel ethanol production using novel carbon sources and fermentation medium optimization with response surface methodology 42–53.

Wu, W., Davis, R.W., 2016. One-pot bioconversion of algae biomass into terpenes for advanced biofuels and bioproducts. Algal Res 17: 316–320.

Wu, W., Davis, R.W., Tran-Gyamfi, M.B., Kuo, A., LaButti, K., Mihaltcheva, S., Hundley, H., Chovatia, M., Lindquist, E., Barry, K., Grigoriev, I.V., Henrissat, B., Gladden, J.M., 2017. Characterization of four endophytic fungi as potential consolidated bioprocessing hosts for conversion of lignocellulose into advanced biofuels. Appl Microbiol Biotechnol 101, 2603–2618. https://doi.org/10.1007/s00253-017-8091-1

Wu, W., Hildebrand, a., Kasuga, t., 2013. Direct cellobiose production from cellulose using sextuple β-glucosidase gene deletion Neurospora crassa mutants 184–189.

Wu, W., Tran-Gyamfi, M.B., Jaryenneh, J.D., Davis, R.W., 2016. Cofactor engineering of ketol-acid reductoisomerase (IlvC) and alcohol dehydrogenase (YqhD) improves the fusel alcohol yield in algal protein anaerobic fermentation. Algal Research 19, 162–167. https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.08.013

Wu, X.R., Staggenborg, S., Propheterb, J.L., 2010. Features of sweet sorghum juice and their performance in ethanol fermentation. Ind Crop Prod, 31(1): 164–170.

Wyrebek, M., Huber, C., Sasan, R.K., 2011. Three sympatrically occurring species of Metarhizium show plant rhizosphere specificity. Microbiology 157, 2904–2911.

Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., 2010. Inhibition of cellulases by phenols. Enzyme Microb Technol 46:170–176. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.11.001.

Xu, C., Long, M., Wu, X., 2006. Screening and characterization of the high-cellulase producing strain Aspergillus glaucus XC9. Front Biol China. 1:35-40.

Xu, L.J., Wang, H.K., Ng, T.B., 2012. A laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the broth of mycelial culture of the mushroom Lentinus tigrinus. J Biomed Biotechnol.

Yan, J., Broughton, S., Yang, S., 2015. Do endophytic fungi grow through their hosts systemically? Fungal Ecol. 13, 53–59.

Yang, L., Lu, M., Carl, S., 2015. Biomass characterization of Agave and Opuntia as potential biofuel feedstocks 43–53.

Yavuz, M., Kaya, G., Aytekin, C., 2014. Using Ceriporiopsis subvermispora CZ-3 laccase for indigo carmine decolourization and denim bleaching. Int Biodeter Biodegr 88: 199–205.

Yin, L., Ye, J., Kuang, S., 2017. Induction, purification, and characterization of a thermo and pH stable laccase from Abortiporus biennis J2 and its application on the clarification of litchi juice. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, Vol. 81, No. 5, 1033–1040.

Yuan, S.-F., Guo, G.-L., Guo, W.-S., 2017. Ethanol production from dilute-acid steam exploded lignocellulosic feedstocks using an isolated multistress-tolerant Pichia kudriavzevii strain. Microbial Biotechnology 10(6), 1581–1590.

Yuangsaard, N., Yongmanitchai, W., Yamada, M., 2013. Selection and characterization of a newly isolated thermotolerant Pichia kudriavzevii strain for ethanol production at high temperature from cassava starch hydrolysate. Anton Leeuw 103: 577–588.

Zabin, K.B., Mulla, S.I., Ninnekar, H.Z., 2017. Optimization of laccase production and its application in delignification of biomass. Int J Recycl Org Waste Agricult 6: 351–365.

Zaferanloo, B., Bhattacharjee, S., Ghorbani, M.M., 2014. Amylase production by Preussia minima, a fungus of endophytic origin: optimization of fermentation conditions and analysis of fungal secretome by LC-MS. BMC Microbiology 14: 55.

Zaferanloo, B., Virkar, A., Mahon, P., 2013. Endophytes from an Australian native plant are a promising source of industrially useful enzymes. World J Microbiol Biotechnol 29: 335–345.

Zapata-Castillo, P., Villalonga-Santana, M.L., J. Tamayo-Cortés, 2012. Purification and characterization of laccase from Trametes hirsuta BM-2 and its contribution to dye and effluent decolorization. Afr J Biotechnol. 11(15): 3603–11.

Zeng, S., Ling, J., Ahmad, M., Lin, L., Zhang, Y., Wang, C., Dong, J., 2018. Culturable fungal diversity and cellulase production by mixed culture *Aspergillus* fungi from Sanya mangrove. The Journal of General and Applied Microbiology 64, 293–298. https://doi.org/10.2323/jgam.2018.02.004

Zeng, Y., Zhao, S., Yang, S., 2014. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. Curr. Opin. Biotechnol. 27, 38–48.

Zhang, F., Li, L., Niu, S., Si, Y., Guo, L., Jiang, X., Che, Y., 2012. A Thiopyranchromenone and Other Chromone Derivatives from an Endolichenic Fungus, *Preussia africana*. Journal of Natural Products 75, 230–237. https://doi.org/10.1021/np2009362

Zhang, J., Jia, B., 2018. Enhanced butanol production using Clostridium beijerinckii SE-2 from the waste of corn processing. Biomass Bioenergy 115: 260–266.

Zhang, J., Tao, L., Liang, Y., Chen, L., Mi, Y., Zheng, L., Wang, F., She, Z., Lin, Y., To, K.K.W., Fu, L., 2010. Anthracenedione Derivatives as Anticancer Agents Isolated from Secondary Metabolites of the Mangrove Endophytic Fungi. Marine Drugs 8, 1469–1481. https://doi.org/10.3390/md8041469

Zhang, Q., Han, Y., Xiao, H., 2017. Microbial-amylase: a biomolecular overview, Process Biochem. 53 88–101.

Zhao, K., Ping, W., Li, Q., 2009. Aspergillus Niger var. taxi, a new species variant of taxol-producing fungus isolated from Taxus cuspidate in China. J Appl Microbiol 107:1202–1207.

Zhao, X., Zhang, L., Liu, D., 2012. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. Biofuels, Bioprod Biorefin 6: 465–482.

Zhao, X., Zhang, L., Liu, D., 2007. Comparative study on chemical pretreatment methods for improving enzymatic digestibility of crofton weed stem. Bioresource Technology, 99, 3729-3736.

Zhao, Z., Liu, H., Wang, C., Xu, J.-R., 2013. Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. BMC Genomics 14, 274. https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-274

Zheng, J., Rehmann, L., 2014. Extrusion pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. Int J Mol Sci 15, 18967–18984.

Zheng, Y., Zhao, J., Fuqing, X., 2014. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. Prog Energy Combust Sci 42: 35–53.

Zhu, C., Bao, G., Huang, S., 2016. Optimization of laccase production in the white-rot fungus Pleurotus ostreatus (ACCC 52857) induced through yeast extract and copper. Biotechnol Biotechnol Equip 30(2): 270–276.

Zilly, A., Bazanella, G.C.S., Helm, C.V., 2012. Solid-state bioconversion of passion fruit waste by white-rot fungi for production of oxidative and hydrolytic enzymes. Food Bioprocess Technol 5: 1573–1580.

Zou, Y.J., Wang, H.X., Ng, T.B., 2012. Purification and characterization of a novel laccase from the edible mushroom Hericium coralloides. J Microbiol. 50(1): 72–8.

Annexe 1

Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

Extrait de pomme de terre	1L
Glucose	20 g
Agar-agar	20 g

Milieu gélosé d'activité amylase : M1

Extrait de levure	0,1 g
Peptone	0,5 g
Glucose	1 g
Amidon soluble	2 g
Agar-agar	16 g
Eau distillée	1 L

Ajuster à pH 6,0

Autoclaver 15 min à 121 °C

Milieu basique CMC : M2

KNO_3	1 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,5 g
NaCl	1,5 g
Glucose	1 g
CMC	5 g
Agar-agar	15 g
Eau distillée	1 L

Ajuster à pH 7,0

Autoclaver 15 min à 110 °C

Milieu Czapek-Dox

Glucose	1 g
$NaNO_3$	2 g
K_2HPO_4	1 g

$MgSO_4$	0,05 g
KCl	0,5 g
$FeSO_4$	0,01 g
CMC	5 g
Agar-agar	20 g
Eau distillée	1 L
Ajuster à pH 5,0	
Autoclaver 15 min à 121 °C	

Milieu Mandels et Weber

$(NH4)_2SO_4$	1,4 mg
KH_2PO_4	2 mg
$CaCl_2$	0,3 mg
$MgSO_4.7H_2O$	0,3 mg
$FeSO_4.7H_2O$	5 mg
$MnSO_4.7H_2O$	1,6 mg
$ZnSO_4.7H_2O$	1,4 mg
$CoCl_2$	2 mg
Peptone	1 mg
Tween 80	1 mg
CMC	5 mg
Solution d'oligoélément	1 mL
Agar-agar	20
Eau distillée	1 L
Ajuster à pH 5,0	

Solution d'oligoélément :

$FeSO_4.7H_2O$	0,035 mg
$MnSO_4.7H_2O$	0,007 mg
$ZnSO_4.7H_2O$	0,011 mg
$CuSO_4.5H_2O$	0,001 mg

$CoSO_4.6H_2O$	0,002 mg
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,013 mg
H_3BO_3	0,002 mg
KI	0,0004 mg
$Al_2 (SO_4)_3.18H_2O$	0,0016 mg
Eau distillée	1 L

Ajuster à pH 5,0

Autoclaver 20 min à 121 °C

Milieu minimal (MM) d'activité laccase

Glucose	10 g
K_2HPO_4	1 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,5 g
NaNO3	0,3 g
KCl	0,5 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,1 g
$MnSO_4.4H_2O$	0,008 g
$Zn (CH_3COO)_2$	0,003 g
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	0,006 g
$CuSO_4.5H_2O$	0,003 g
Eau distillée	1 L

Ajuster à pH 5,0

Autoclaver 20 min à 121 °C

Milieu basique de production de cellulase : M3

CMC	5 g
Extrait de levure	0,5 g
Glucose	1 g
KNO_3	1 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,5 g

NaCl	1,5 g
Eau distillée	1 L
Ajuster à pH 7,0	
Autoclaver 15 min à 110 °C	

Milieu YPDA

Extrait de levure	10 g
Peptone	20 g
Glucose	20 g
Agar-agar	20 g
Eau distillée	1 L
Autoclaver 15 min à 120 °C	

Milieu synthétique : M4

Cellulose	10 g
Acide citrique	0,25 g
Extrait de levure	3 g
$(NH_4)_2SO_4$	5 g
KH_2PO_4	9,6 g
K_2HPO_4	0,76 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,75 g
$CaCl_2.2H_2O$	0,05 g
NaCl	0,1 g
Solution d'oligoélément	1 mL
Eau distillée	1 L
Ajuster à pH 5,0	
Autoclaver 20 min à 121 °C	

Milieu de fermentation SmF : M5

KH_2PO_4	1 g
K_2HPO_4	2,5 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,3 g

$CaCl_2$	0,3 g
Urée	3,75 g
Peptone	3,75 g
Extrait de levure	1 g
Tween 80	1 mL
Solution d'oligoélément	1 mL
Eau distillée	1 L
Ajuster à pH 5,0	
Autoclaver 30 min à 121 °C	

Milieu de supplémentation : M6

Extrait de levure	10 g
Peptone	20 g
KH_2PO_4	0,75 g
K_2HPO_4	0,5 g
Eau distillée	1 L
Ajuster à pH 5,0	
Autoclaver 20 min à 121 °C	

Annexe 2

Tampons

- Le tampon acétate de sodium (20mM) composé de deux solutions A et B. A est la solution d'acide acétique (0,2 M), mélange de 11,55 mL et 1 L d'eau distillée. B est la solution d'acétate de sodium (0,2 M), mélange de 16,4 g de $C_2H_3O_2Na$ et 1 L d'eau distillée.
- Le tampon phosphate de sodium (20mM) composé de la solution A phosphate de sodium monobasique 27,8 g dissous dans 1 L d'eau distillée et la solution B phosphate de sodium dibasique 53,65 g $Na_2HPO_4.7H_2O$ dissous dans 1 L d'eau distillée.
  - Le tampon Tris-HCl (20mM) composé de la solution A de Tris 24,2 g dissous dans 1 L d'eau distillée et la solution B de 0,2 M HCl.
  - Le tampon CTAB (bromure de cétyltriméthylammonium) est composé de 2% (w/v) CTAB, 1,4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM EDTA et 0,2% (v/v) β-mercaptoéthanol.

Solutions

La solution isotonique est préparée par la dissolution de 0,08 g de NaCl dans 100 mL d'eau distillée.

Colorants

- La solution aqueuse iodo-iodurée (KII2) est préparée par le mélange de 10 $g.L^{-1}$ d'iode métalloïde (I2) avec 20 $g.L^{-1}$ iodure de potassium (KI) dans 1 L de l'eau distillée.
- Le colorant acide rouge de Congo est formé par la dissolution de 1 g de rouge Congo dans 100 mL de l'eau distillée.

Substrats

La solution du guaïacol est préparée par la dissolution du substrat en éthanol 50%, puis stérilisé par filtration en utilisant le filtre à seringue de diamètre 0,22 μm. Le substrat est obtenu de Sigma-Aldrich (USA).

Réactifs

Le réactif DNS a été préparé en ajoutant 2% de NaOH à l'eau distillé jusqu'à dissolution sous agitation. Suivi de 2 g de DNS et 0,1 g de sulfite de sodium ont été ajoutés et porté le volume à 100 mL avec de l'eau distillé sous une agitation continue pour la solution 1. Enfin, pour la solution 2, 0,4 g de phénol a été ajouté à 40 g de tartrate double Na.K et complété à 200 mL avec de l'eau distillé. Le réactif composé de mélange de deux solutions 1 et 2 a été conservé à l'abri de lumière environ trois mois.

Enzymes

- Celluclast 1,5 L est une solution aqueuse d'enzyme Cellulase de *Trichoderma reesi*, d'une activité enzymatique ≥ 700 $IU.g^{-1}$ et une densité de 1,10 à 1,30 g/mL, obtenu après Sigma-Aldrich® (USA).

- Viscozyme L est un mélange d'enzymes cellulolytiques, d'une activité enzymatique ≥ 100 IU.g^{-1}, obtenu après Sigma-Aldrich® (USA).

Amorces

Des oligo-nucléotides pour l'amplification et le séquençage de la région fongique 5,8S-ITS (Internal Transcribed Spacer).

- Amorce ITS1 Fw (5′–TCCGTAGGTGAACCTGCGG–3′)
- Amorce ITS4 Rv (5′-TCCTCCG CTTATTGATATGC–3′)