

UTILISATION DES DECHETS DE DATTES POUR LA PRODUCTION D'UNE CELLULASE INDUSTRIELLE

S. Bensmira, R. Merabti, Z. Meraihi.

Laboratoire de Biotechnologie et de Génie enzymatique, Université Mentouri-Constantine, Algerie

Résumé

L'industrie agroalimentaire génère d'importantes quantités de déchets le plus souvent non valorisées. Le patrimoine phoenicicol algérien, évalué en l'an 2002 est de plus de 13505880 palmiers dattiers (toutes variétés confondues) avec une production estimée à 4.2 millions de quintaux par an, et fournit à chaque compagne près de 60.000 tonnes de déchets de dattes qui proviennent soit directement des palmeraies soit des écarts des stations de conditionnement.

Les dattes de part leur grande richesse en hydrate de carbone se conserve relativement longtemps et offrent de nombreuses possibilités technologiques suivant les applications auxquelles elles sont soumises. En effet, elles peuvent servir en tant que matière première pour la production de plusieurs métabolites. L'objectif de notre travail est l'utilisation de jus de dattes comme substrat de fermentation pour la production de cellulase par *Trichoderma sp* isolée à partir de milieu extrême (sol de palmeraies de la région de Biskra). Des essais de fermentation ont été menés afin de maximiser la production de l'enzyme, et d'étudier sa capacité à résister à des températures élevées. La souche cultivée sur ce milieu à base de déchets de dattes s'est avérée hypercellulolytique avec une activité cellulasique de 775 U. L'enzyme quant à elle s'est révélée très thermostable avec des demis vie de 150, 140, 120 et 45 minutes à 60, 70, 80 et 90°C respectivement.

Mots clés : Déchets de dattes, valorisation, fermentation, production de cellulase, *Trichoderma sp*, industrie.

Abstract

Agroalimentary industry generates important quantities of date scrap generally not exploited. The Algerian inheritance phoenicicol, evaluated in 2002 is of more than 13505880 date palms (all confused varieties) with a production estimated at 4.2 million quintals per annum, and provides 60.000 tons date scrap which comes either directly from the palm plantations or of the stations of conditioning.

The dates with their great wealth of carbohydrate is preserved relatively a long time and offer many technological possibilities according to the applications to which they are subjected. Indeed, they can be useful as a raw material for the production of several metabolites. The objective of our work is the use of date juice like substrate of fermentation for the production of cellulase by *Trichoderma sp* isolated from extreme medium (soil of palm plantations of the area of Biskra). Tests of fermentation were carried out in order to maximize the production of the enzyme, and to study its capacity to resist high temperatures. The culture of the strain on this medium containing date scrap proved that it is an hypercellulolytic fungi with a cellulasic activity of 775 U. The enzyme was found very thermostable with a half-life of 170 , 140, 120 and 50 munites at 60, 70, 80 and 90°C respectively.

Key words: Date scrap, valorization, cellulase production, *Trichoderma sp*, industry.

1-Introduction

La nature insoluble de la cellulose représente un défi pour les systèmes cellulases qui sont

constitués de plusieurs enzymes dont seule l'action synergique peut aboutir à l'hydrolyse complète de la cellulose cristalline. L'industrie exige l'emploi d'enzymes thermostables

capables de supporter des températures élevées. Pour répondre à cette exigence, l'isolement des moisissures (agents bien connus pour la décomposition des substrats cellulotiques) de la région de Biskra, constitue une alternative intéressante permettant d'obtenir des souches productrices de ce type d'enzymes. Dans cette optique, nous avons réalisé, dans la première partie de notre travail, l'isolement des souches fongiques à partir du sol et de l'eau des Sebkhas de Biskra, afin de sélectionner les souches les plus performantes dans la production de cellulase thermostable.

En industrie, il ne s'agit pas seulement d'utiliser des souches productrices, mais il est également nécessaire de définir un milieu de production favorable et à faible coût. Dans notre étude le milieu utilisé pour la production de cellulase, est à base de déchets de l'industrie

2- matériels et méthodes

2-1- Echantillonnage :

Les échantillons sont prélevés, à partir des sols et eaux des sebkhas de la région de Biskra (LEMGHYAIR) considérés comme des écosystèmes extrêmes (végétation très réduite, salinité très élevée de plus de 25° Bowie, température élevée pouvant atteindre 49.5°C, pluviométrie : 120 à 150 mm/an correspondant à 15 jours de pluie par an) (Météo France. 2003).

2-2- Sélection des souches cellulolytiques :

Là mise en évidence de l'activité cellulolytique des moisissures isolées est réalisée sur 02 types de milieux :

2-2-1-En milieu solide :

La technique la plus évidente serait de faire apparaître la capacité des moisissures à assimiler la cellulose sur un milieu gélosé à base de cellulose (en poudre à 0.5%) comme seule source carbonée.

2-2-2-En milieu liquide :

Les échantillons sont incubés à 28°C en

2-4- Milieu synthétique

Le milieu synthétique permet de déterminer la souche la plus cellulolytique parmi celles isolées

pheonicicole (les déchets de dattes) car le patrimoine pheonicicol algérien, évalué en l'an 2002, est de plus de 13,505,880 palmiers dattiers (Anonyme, 2003).. Ce déchet est choisi comme substrat de fermentation pour sa richesse en sucres facilement fermentescibles. Ce déchet est employé comme milieu de production dans plusieurs travaux pour la production d'autres métabolites : production de catalase extracellulaire par un mutant d'*Aspergillus pheonicis* (Kacem Chaouche. 2005), production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* (Boudjlal et Nancib .2001), fabrication de la levure boulangère (Acourée et Tama .2001) etc. Par ailleurs, le faible prix de revient des déchets agroalimentaires industriels, fait d'eux une source d'énergie et de substrat bien adaptés aux fermentations.

présence des bandelettes de papier filtre Whatman n°1 (0.5 mm de largeur et 12 cm de longueur) plongées dans 10 ml du milieu minéral : (NH₄)₂ SO₄ 1g, CaCl₂ 0.1g, FeCl₃ 0.02g, MgSO₄.7H₂O 0.2g, K₂HPO₄.7H₂O 0.3g préalablement stérilisées.

L'ensemencement se fait par une suspension de spores de chaque souche à une concentration de 10⁵ spores / ml de milieu. Un blanc (sans inoculum) est soumis aux mêmes conditions.

La dégradation du papier est observée visuellement et quotidiennement (Gunnar *et al.*,1999).

2-3- Identification des genres des souches fongiques :

L'identification d'une souche représentative est effectuée par deux techniques classiques : une observation macroscopique et une étude microscopique des souches, largement suffisantes pour déterminer le genre des moisissures isolées et cela en réalisant des ensemencements par touches sur des milieux d'études solides favorisant la croissance et la sporulation des moisissures. Les milieux les plus souvent utilisés à ces fins sont l'Agar blanc, utile pour éviter certains phénomènes de pléomorphisme (Giraud.1998), le Czapeck Dox Agar et le milieu MEA, utilisés simultanément (Botton *et al.*,1990).

par une culture en Batch (Température 25°C, pH=5 et agitation à 130 rpm).

2-5- Milieu de base (Déchets de Dattes)

Les dattes déclassées sont soigneusement lavées et dénoyautées, séchées à température ambiante, l'eau est additionnée à raison de deux litres par kilogramme de pulpes. Le mélange est chauffé à 80°C pendant 2 heures. L'extrait obtenu est centrifugé à 5000 rpm pendant 30 mn (Acourée et Tama .2001). Le surnageant est recueilli puis dilué aux proportions testées et utilisé comme substrat de fermentation (source d'énergie).

2-6- Milieu de production de l'enzyme :

Différentes concentrations de déchets de dattes (0.5 à 5%) sont testées. Le milieu de production de l'enzyme est alors constitué de : substrat de fermentation (jus de dattes à la concentration optimale en farine de dattes), 0.1% de sulfate d'ammonium

(Meilleure source azotée utilisée par les moisissures pour la production de cellulase (Gokhale *et al.*,1991) et 0.5% d'extrait de levure (source de plusieurs facteurs de croissance) ainsi que 0.5% de cellulose (type Sigma Cell) comme substrat inducteur.

3-1- Les souches fongiques isolées :

Sur les cinq échantillons prélevés, nous avons isolé 57 souches de moisissures réparties en fonction des sites d'échantillonnage. Nous observons une forte densité de souches fongiques dans le sol des palmeraies aux concentrations en sel 5 et 10%. Ce résultat s'explique probablement par la richesse du sol de palmeraies en matière organique, apportée par les fruits et les feuilles, forme végétative du palmier dattier et d'autres plantes, ainsi que par le caractère halophile des souches isolées. A l'inverse, les autres échantillons renferment beaucoup moins de souches fongiques.

3-2- Sélection de souches cellulolytiques :

La quantification et l'obtention des cellulases fongiques sont des objectifs difficiles à atteindre (Stephen *et al.*,2003). De ce fait, deux milieux différents ont été mis au point pour permettre une sélection primaire des souches cellulolytiques (parmi les 57 isolées).

Seules les souches ayant répondu positivement aux deux tests ont été prises en considération. En effet, 10 souches fongiques parmi les 57 isolées, ont été sélectionnées pour la suite de notre étude.

2 souches (Q1 et R3), parmi les 10 sélectionnées, ont révélé un potentiel

2-7-Dosage de l'activité cellulolytique :

L'activité cellulasique est mesurée selon la méthode de Somogyi et Nelson, (1952). Le principe est basé sur la mesure du pouvoir réducteur des sucres libérés lors de l'hydrolyse de la cellulose. L'activité cellulasique est exprimée par l'unité internationale, correspondant à une micromole de cellobiose libéré par minute et par ml d'extrait enzymatique à 40°C et à pH 5.

2-8-Etude de la stabilité thermique :

L'enzyme subit un traitement thermique à différentes températures (60°, 70° 80° et 90°C) (prélèvements toutes les 5 min). L'activité cellulasique résiduelle est mesurée selon la méthode de Somogyi et Nelson, (1952).

3-Résultats et discussion

cellulolytique important vis à vis du milieu solide par un envahissement complet de la boîte au bout du 4^{ème} jour d'incubation. Les 8 autres (C1, F1, I1, K1, E1, L1, S2 et R4) ont montré une croissance faible (diamètre entre 2.5 à 4 cm) avec un mycélium aérien peu développé. L'autre test (sur papier filtre) a permis d'observer différents aspects :

- Dégagement des fibres cellulosiques et digestion partielle du papier lui conférant un aspect cotonneux entraînant sa rupture et sa dissolution. Cette observation s'explique probablement par la sécrétion des enzymes cellulolytiques dans le milieu extracellulaire caractérisant la production de cellulases fongiques extracellulaires (Nam Sun Wang. 2003).

- Croissance mycélienne des souches fongiques sur la partie immergée du papier, probablement due à l'absorption des spores par le papier filtre. Leur condensation vers son extrémité terminale entraîne une croissance par fixation au support cellullosique. Ce phénomène d'adhésion se traduit par :

- La présence d'enzymes cellulases à la surface des cellules fongiques (Stephen *et al.*,2003). Par cet effet de proximité, l'enzyme devient plus active lorsqu'elle est immobilisée à

molécule enzymatique une grande intégrité structurale (Vieille et Gregory. 2001 ; Xu *et al.*, 2000).

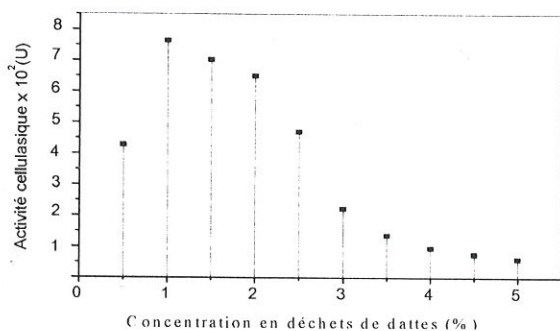


Figure 1 : Détermination de la concentration optimale en farine de dattes

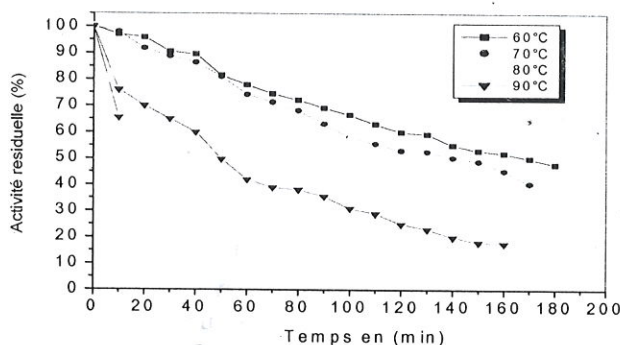


Figure 2 : Etude de la thermostabilité de la cellulase de *Trichoderma sp* isolée

4- Conclusion

L'objectif de notre travail consiste en l'isolement de souches fongiques à partir d'une région climatiquement aride (Sebkha et sol de palmeraies de la région de Biskra) et à la sélection d'une souche performante dans la production d'une cellulase thermostable sur un milieu à base de déchets de dattes.

Pour l'isolement, les examens macroscopiques et microscopiques approfondis des moisissures sélectionnées ont mis en évidence 10 souches réparties sur 7 genres différents: *Aspergillus*,

Penicillium, *Geotrichum*, *Altarnaria*, *Cladosporium*, *Emericella* et *Trichoderma*.

Les 10 souches ont été cultivées sur un milieu à base de déchets de dattes dans le but d'un renouvellement énergétique qui permet, d'une part, de recycler les déchets de dattes et d'autre part, de produire une enzyme (cellulase) à forte valeur ajoutée à usage industriel varié.

La production de la cellulase sur un milieu à base de déchets de dattes nécessite, dans un premier temps, une analyse chimique de ces déchets (substrat de fermentation). La composition chimique révèle un milieu riche en sucres (70%) mais déficient en azote (0.56% seulement). Cette déficience peut être palliée par l'addition de sulfate d'ammonium et d'extrait de levure permettant de rétablir le rapport C/N à 20 suffisant pour une croissance adéquate des souches fongiques.

La souche (R3) isolée du Sol des palmeraies appartenant au genre *Trichoderma*, est la plus performante dont l'activité cellulolytique est évaluée à 775U. Cette souche est sélectionnée pour la production de l'extrait enzymatique.

L'étude de la thermostabilité de l'enzyme révèle une forte résistance aux hautes températures au cours du temps. La demi-vie à 60, 70, 80 et 90°C est de 170, 140, 120 et 50 minutes respectivement. Ces records de thermostabilité permettent l'utilisation industrielle de l'enzyme.

molécule enzymatique une grande intégrité structurale (Vieille et Gregory. 2001 ; Xu *et al.*, 2000).

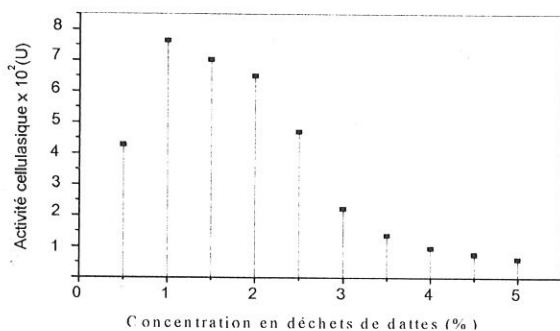


Figure 1 : Détermination de la concentration optimale en farine de dattes

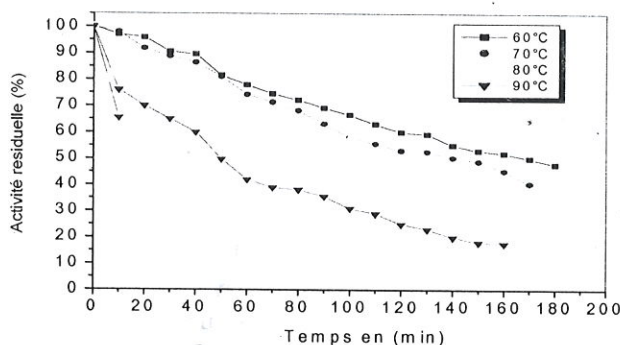


Figure 2 : Etude de la thermostabilité de la cellulase de *Trichoderma sp* isolée

4- Conclusion

L'objectif de notre travail consiste en l'isolement de souches fongiques à partir d'une région climatiquement aride (Sebkha et sol de palmeraies de la région de Biskra) et à la sélection d'une souche performante dans la production d'une cellulase thermostable sur un milieu à base de déchets de dattes.

Pour l'isolement, les examens macroscopiques et microscopiques approfondis des moisissures sélectionnées ont mis en évidence 10 souches réparties sur 7 genres différents: *Aspergillus*,

Penicillium, *Geotrichum*, *Altarnaria*, *Cladosporium*, *Emericella* et *Trichoderma*.

Les 10 souches ont été cultivées sur un milieu à base de déchets de dattes dans le but d'un renouvellement énergétique qui permet, d'une part, de recycler les déchets de dattes et d'autre part, de produire une enzyme (cellulase) à forte valeur ajoutée à usage industriel varié.

La production de la cellulase sur un milieu à base de déchets de dattes nécessite, dans un premier temps, une analyse chimique de ces déchets (substrat de fermentation). La composition chimique révèle un milieu riche en sucres (70%) mais déficient en azote (0.56% seulement). Cette déficience peut être palliée par l'addition de sulfate d'ammonium et d'extrait de levure permettant de rétablir le rapport C/N à 20 suffisant pour une croissance adéquate des souches fongiques.

La souche (R3) isolée du Sol des palmeraies appartenant au genre *Trichoderma*, est la plus performante dont l'activité cellulolytique est évaluée à 775U. Cette souche est sélectionnée pour la production de l'extrait enzymatique.

L'étude de la thermostabilité de l'enzyme révèle une forte résistance aux hautes températures au cours du temps. La demi-vie à 60, 70, 80 et 90°C est de 170, 140, 120 et 50 minutes respectivement. Ces records de thermostabilité permettent l'utilisation industrielle de l'enzyme.