



Université Mohamed Khider de Biskra  
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie  
Département des sciences de la nature et de la vie  
Filière : Sciences biologiques

Référence ..... / 2021

# MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie Appliquée

---

Présenté et soutenu par :  
**LAOUNI Hanane**

Le: samedi 3 juillet 2021

## Optimisation de la production de cellulases par différentes souches bactériennes

---

Jury :

<b>Mme. MOHAMMEDI Kenza</b>	<b>MAB</b>	<b>Université de Biskra</b>	<b>Président</b>
<b>Dr. HEBAL Hakim</b>	<b>MAA</b>	<b>Université de Biskra</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Dr. BENBELAID Fathi</b>	<b>MCB</b>	<b>Université de Biskra</b>	<b>Examineur</b>

Année universitaire : 2020 - 2021

## ***Remerciement***

Je tiens à remercier en premier lieu Allah pour tout puissant de m'avoir donné le courage, la santé et la patience pour achever ce travail.

Je tiens à remercier ma famille mais surtout, de tout mon cœur, mes parents pour votre soutien et pour vos encouragements qui ont été indispensables pour mener à bien ce travail.

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et mon profond respect à mon encadreur **Dr. Hebal Hakim**, pour sa patience, sa rigueur et ses précieux conseils qui m'ont aidée dans la réalisation de ce travail.

Mes remerciements sont adressés aux membres de jury qui ont bien voulu accepter de juger ce modeste travail.

Enfin, ma reconnaissance et mes remerciements vont à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

*Merci*

## ***Dédicace***

*Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donnée la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère **Zohra***

*A L'homme de ma vie, mon père **Cedik**, école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.*

*Que dieu les garde et les protège.*

*Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour, mes très chers frères **Okba Oussama et Ayoub** et ma chères sœurs ; **Maruoi***

*Et à toute la famille **LAOUNI ET MOUKHTARI***

*LAOUNI Hanane*

# Sommaire

Remerciement	
Dédicace	
Liste des tableaux .....	I
Liste des figures .....	II
Liste des abréviations .....	III
Introduction.....	1

## Première partie : Partie bibliographique

### Chapitre 1. Matière lignocellulosique et enzymes cellulolytiques

1.1 Etude de la cellulose .....	3
1.1.1 Cellulose .....	3
1.1.2 Hémicelluloses .....	4
1.1.3 Lignine.....	4
1.1.4 Sensibilité de la cellulose aux différents traitements .....	5
1.2 Etude des cellulases.....	5
1.2.1 Définition des cellulases .....	5
1.2.2 Mode d'action .....	6
1.2.3 Nomenclature des cellulases .....	6
1.2.4 Classification des cellulases .....	7
1.2.5 Différentes origines de la cellulase .....	8
1.2.6 Etude des microorganismes cellulolytiques.....	8
1.2.7 Facteurs liés aux conditions opératoires de cellulase.....	10
1.2.8 Applications industrielles des cellulases .....	11
1.3 Optimisation de la production de la cellulase .....	11
1.3.1 Influence pH .....	11
1.3.2 Influence de la source de carbone .....	11
1.3.3 Influence de la salinité.....	12
1.3.4 Influence dutaux d'inoculation .....	12
1.3.5 Teneur en humidité.....	12

**Deuxième partie : Partie expérimentale****Chapitre 2. Matériel et méthodes**

2.1	Isolement et identification des souches cellulolytiques.....	13
2.1.1	Optimisation de la production de cellulase.....	14

**Chapitre 3. Résultats et discussion**

3.1	Isolement des bactéries productrices de cellulase .....	20
3.2	Optimisation des conditions de culture pour la production de cellulase .....	21
3.2.1	Effet de pH sur la production d'enzyme. ....	21
3.2.2	Effet de température sur la production d'enzymes. ....	24
3.2.3	Effets de sources de carbone sur la production d'enzymes.....	28
3.2.4	Effets de sources d'azote sur la production d'enzymes.....	30
3.2.5	Effet de la période d'incubation sur la production d'enzyme .....	32
3.2.6	Effets de résidus de déchets solides municipaux sur la production d'enzymes....	32
3.2.7	Effet des ions métalliques sur la production d'enzyme.....	33
3.2.8	Effet d'inhibiteurs et d'autres réactifs sur la production d'enzyme	
3.2.9	Effet de la spécificité du substrat sur la production d'enzyme .....	34
3.3	Discussion .....	35
	Conclusion.....	<b>39</b>
	Références bibliographiques .....	<b>40</b>
	Résumé	

## Liste des tableaux

**Tableau 1.** Classification des enzymes cellulolytiques et leur système (Sadhu et Maiti, 2013).  
.....7

**Tableau 2 .** principaux microorganismes cellylolytiques etv pseudocellulolytiques (Bayer *et al.*, 1983) .....9

**Tableau 3.**Composition chimique des déchets solides minicipaux (Abdullah *et al.*, 2016)...21

**Liste des figures**

<b>Figure 1.</b> Structure moléculaire de la cellulose (Mirande, 2009).....	3
<b>Figure 2.</b> Structure moléculaire d'hémicellulose (Scriban <i>et al.</i> , 1993).....	4
<b>Figure 3.</b> Structure de la lignine(Paillet, 2013). ....	5
<b>Figure 4.</b> Projection des bactéries cellulolytiques sur la plaque d'agar CMC (Yassien <i>et al.</i> , 2014).....	20
<b>Figure 5.</b> Effet du pH sur l'activité des cellulases d' <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Bacillus subtilis</i> et <i>Serratia marcescens</i> (Sethi <i>et al.</i> , 2013). ....	22
<b>Figure 6.</b> Effet du pH sur la production de cellulase (U/mL) par <i>A. niger</i> (Gautam <i>et al.</i> , 2011) .....	23
<b>Figure 7 .</b> Effet du pH sur la cellulase purifiée de <i>Bacillus subtilis</i> YJ1 (Yin <i>et al.</i> , 2010). ...	23
<b>Figure 8.</b> Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la cellulase de <i>Streptomyces</i> C188 (Yassien <i>et al.</i> , 2014).....	24
<b>Figure 9.</b> Effet de la concentration du carboxyméthyle cellulose sur la production de cellulase par la souche <i>Bacillus</i> sp. CDB27 et CDB30 (Shaikh <i>et al.</i> , 2013). ....	25
<b>Figure 10.</b> Effet de la température sur l'activité de la cellulase d' <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Bacillus subtilis</i> et <i>Serratia marcescens</i> (Sethi <i>et al.</i> , 2013). ....	26
<b>Figure 11.</b> Effet de la température sur la production de cellulase (U/mL) par <i>A. niger</i> (Gautam <i>et al.</i> , 2011). ....	27
<b>Figure 12.</b> Effet de la température sur la cellulase purifiée de <i>Bacillus subtilis</i> YJ1(Yin <i>et al.</i> , 2010).....	27
<b>Figure 13.</b> Effet de la température sur l'activité et la stabilité de la cellulase de <i>Streptomyces</i> C188 (Yassien <i>et al.</i> , 2014).....	28
<b>Figure 14.</b> Production de cellulase de <i>B. altitudinis</i> et <i>B. licheniformis</i> dans les médias complétés par différents Sources de carbone entiers (Sreeja <i>et al.</i> , 2013). ....	30
<b>Figure 15.</b> Effet de source d'azote sur l'enzyme cellulase produite par les <i>pleuréatus trains</i> (Elsebaay <i>et al.</i> , 2018) .....	31
<b>Figure 16.</b> Cinétique de la production d'enzyme en (U/ml) par <i>Aspergillus niger</i> (Gautam <i>et al.</i> , 2011).....	32
<b>Figure 17.</b> Effet des sources de déchets agroalimentaires (Sethi <i>et al.</i> , 2013).....	33
<b>Figure 18.</b> Effet des sels métalliques des surfactants sur la production de cellulase par <i>B. altitudinis</i> et <i>B. licheniformis</i> (Sreeja <i>et al.</i> , 2013). ....	34

**Liste des abréviations**

**CMC:** Carboxyméthylcellulose

**DNS:** 3,5- acide dinitro salicylique.

**EC :** Enzyme commission.

**MSW :** Déchets solides municipaux.

**NAST :** Académie des sciences et technologies du Népal.

**NR :** Réactif nitrate.

**p/v :** masse par volume.

**rpm :** Rotation par minute.



# **Introduction**

## **Introduction**

Les biocarburants occupent actuellement de plus en plus de place dans nos journaux, sites Internet ou même les débats politiques, l'idée n'est pas nouvelle. C'est en 1900 que Mr Diesel (inventeur du moteur portant le même nom) présenta lors de l'exposition universelle de Paris le premier moteur fonctionnant à l'huile végétale (Tchunden, 1990).

L'idée avait alors été abandonnée par manque de compétitivité avec les hydrocarbures traditionnels. En outre, avec l'augmentation du prix de pétrole et l'aggravation des émissions de gaz à effet de serre (équivalents de CO<sub>2</sub>) justifient la recherche de matières premières et de technologies alternatives capables de réduire la dépendance en ces combustibles fossiles et de protéger l'environnement (Eloutassi *et al.*, 2014).

Pour y parvenir, les émissions mondiales de gaz à effet de serre doivent culminer vers 2015 et diminuer ensuite, pour atteindre une réduction de 50 % vers 2050, selon l'ONU Les gouvernements peuvent encourager une série d'options comme le gaz naturel et les énergies renouvelables et sensibiliser le public au rendement énergétique. Pour pallier à ces deux problèmes, les énergies renouvelables sont la meilleure alternative durable. Parmi ces énergies, la bioénergie est produite à partir de la biomasse et de certains déchets tels que Les déchets agricoles, Les déchets de l'industrie agroalimentaire. Les rejets de l'industrie du papier, Les cultures énergétiques non destinées à l'alimentation dont l'Algérie en dispose (Aziza, 2010).

La bioconversion est définie par l'utilisation de microorganismes pour la réalisation de réactions biochimiques (Bousseboua, 2002).

Une méthode pratique pour épurer les environnements contaminés est la bioremédiation ou dépollution biologique. La bioremédiation est définie par l'utilisation d'organismes vivants pour détruire les polluants *environnementaux* (Perry *et al.*, 2004).

Parmi les bactéries cellulolytiques figurent des bactéries appartenant aux genres *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Streptomyces*, *Ruminococcus* et *Clostridium*.

La cellulose offre les meilleures perspectives en terme de réduction des coûts de production par son abondance et son prix potentiellement inférieur aux autres substrats et ce, malgré la complexité des procédés de transformation.

La cellulose constitue des enjeux importants dans la recherche notamment en matière

de biocarburants. (Sederberg *et al.*, 2003). Les principales enzymes capables de dégrader les celluloses sont des hydrolases appelées enzymes cellulolytiques. En raison de la complexité structurale des celluloses, leur dégradation complète implique tout un système comprenant une variété d'enzymes dont les endoglucanases, les exoglucanase et les  $\beta$ -glucosidases (McCaig *et al.*, 2001).

Les cellulases montrent une large gamme d'applications dans plusieurs secteurs tels que la chimie, l'alimentation humaine et animale, les pâtes et papiers, le textile, l'automobile, l'électronique et, surtout, l'énergie (Roberts *et al.*, 2012). Le mécanisme d'hydrolyse enzymatique de la cellulose implique l'action en synergie de différents types d'enzymes, les endoglucanases, les exoglucanases ou cellobiohydrolases et les  $\beta$ -glucosidases.

L'optimisation des conditions de cultures pour une meilleure production de cellulases est nécessaire pour réduire le prix de ces enzymes. Des progrès considérables ont été conçus pour une production élevée de cellulase par optimisation des conditions de fermentation.

Cette étude porte sur l'optimisation de certains paramètres de production de cellulase par des souches bactériennes. Les paramètres étudiés sont la température, l'effet des sources de carbone et d'azote, l'effet des sels, l'effet de la concentration du substrat et l'effet de la période d'incubation.

Ce travail est divisé en trois parties : une synthèse bibliographique des récentes connaissances sur le sujet, une partie expérimentale et une partie résultats et discussion. A la fin des conclusions et perspectives sont retirées de ce travail.

**Première partie**

**Partie bibliographique**

# **Chapitre 1**

## **Matière lignocellulosique et enzymes cellulolytiques**

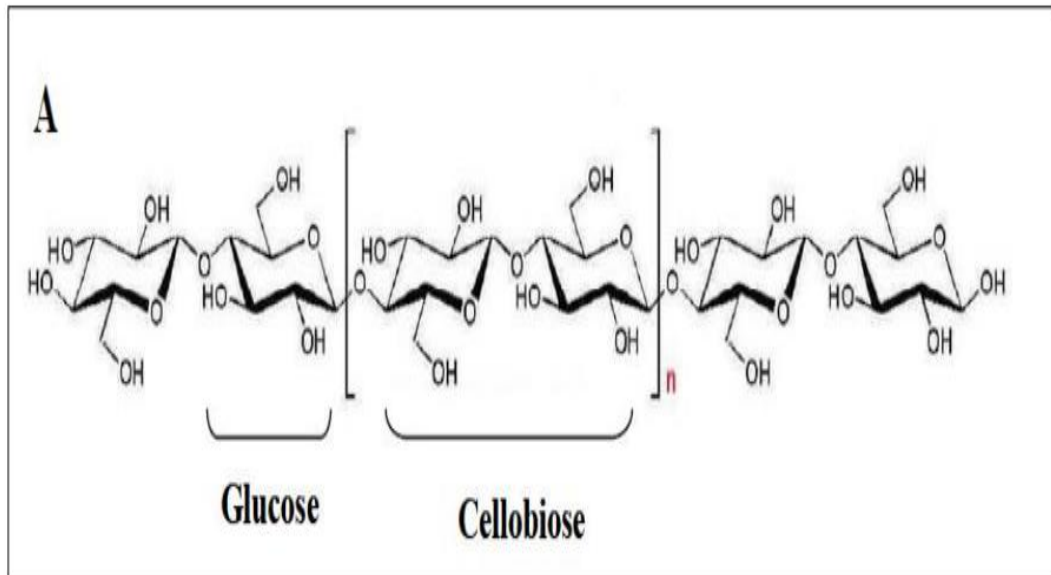
## 1.1 Etude de la cellulose

### 1.1.1 Cellulose

La cellulose est une molécule organique la plus abondante sur terre, de structure polysaccharidique de base des parois des cellules végétales, représente environ 50 % de la masse totale et une production mondiale annuelle de  $1.5 \times 10^{12}$  tonnes (Fig. 1) (Deguchi *et al.*, 2006).

La cellulose  $[C_6H_{10}O_5]_n$  est un polyholoside à longues chaînes d'unités de cellobiose, constitués d'anhydroglucoses liés par des ponts  $\beta$ -1,4 et se présente sous forme amorphe ou cristalline, générée grâce à la mise en place de liaisons d'hydrogène entre les différentes chaînes (Kolpak *et al.*, 1976; Min *et al.*, 2005).

La cellulose est présente dans les plantes sous forme de microfibrilles, possédant un diamètre de 20-30 nanomètres (Ray *et al.*, 2007) une longueur de 100 -40000 nanomètres. Chaque molécule de cellulose contient 2000 à plus de 15000 sous-unités de cellobiose. La cellulose présente un nombre variable de fibrilles élémentaires. En effet, les plantes supérieures possèdent approximativement 36 chaînes élémentaires de cellulodextrines, contre plus de 1200 chaînes chez les algues cellulosiques.



**Figure 1.** Structure moléculaire de la cellulose (Mirande, 2009).

### 1.1.2 Hémicelluloses

Les hémicelluloses constituent la matrice des parois qui assure la liaison des microfibrilles de cellulose entre elles par des liaisons hydrogènes. Ces composés forment un groupe mixte d'hétéro polymères linéaires et ramifiés comportant principalement cinq sucres monomériques : D-glucose, mannose D-galactose, Dxylose et L'arabinose (Fengel *et al.*, 1984; Kuhad *et al.*, 1997).

De manière générale les hémicelluloses s'associent entre elles par liaisons  $\beta$  -1-4 glucosidiques (Fig. 2). Elles sont insolubles dans l'eau chaude ou froide et les acides dilués chauds (Cho *et al.*, 1997).

Les hémicelluloses font partie des substances ayant des effets critiques, c'est une source d'oligosaccharides, de sucres, d'alcools et d'autres composés organiques qui peuvent être libérés sous l'action des hémicelluloses (Zelenina *et al.*, 1992).

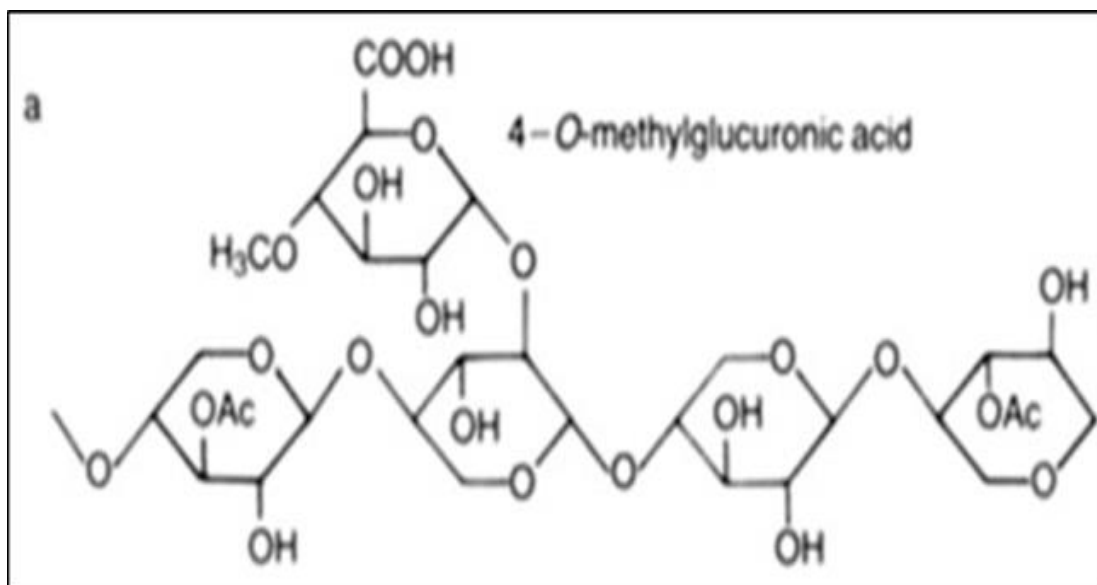


Figure 2. Structure moléculaire d'hémicellulose (Scriban *et al.*, 1993).

### 1.1.3 Lignine

La lignine est un hétéro polymère tridimensionnel provenant de la polymérisation oxydative de trois composés phénoliques : les alcools coniférylique, sinapylique et *p*coumarilique (ou *p*-hydroxyphényl) (Odier *et al.*, 1985) et se dépose au niveau des parois primaires et secondaires des cellules végétales, renforçant les microfibrilles de cellulose. sa structure forme un polymère tridimensionnel insoluble, dense et résistant qui cimente les

fibres entre elles, assure le transport de l'eau et confère au bois toute sa rigidité, peu sensible à la dégradation biologique (Fig.3) (Fengel et Wegener, 1984) .

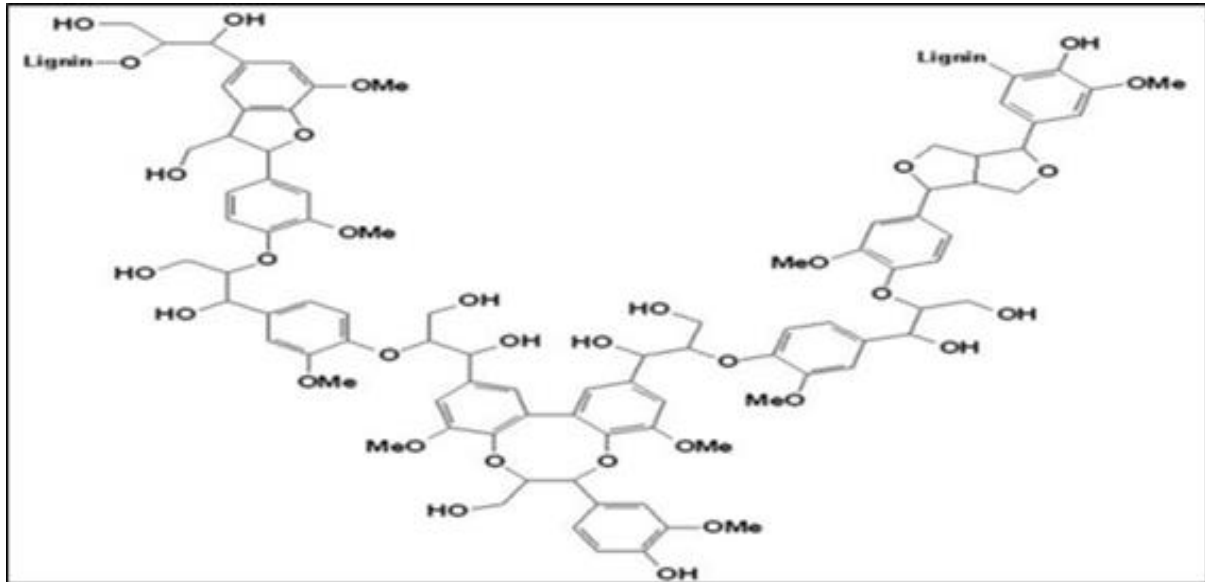


Figure 3. Structure de la lignine(Paillet, 2013).

#### 1.1.4 Sensibilité de la cellulose aux différents traitements

La sensibilité de la cellulose à l'hydrolyse enzymatique dépend étroitement de l'état du substrat, notamment de trois caractéristiques qui conditionnent la vitesse et le rendement de l'hydrolyse (Barnoud, 1980 ; Vidaud, 1984).

Le degré de polymérisation varie selon les sources (10.000 unités glucosidiques pour un poids moléculaire de 1.5 million avec une longueur de 5 $\mu$ m pour la cellulose de bois) (Mouranche *et al.*, 2002).

### 1.2 Etude des cellulases

#### 1.2.1 Définition des cellulases

Les cellulases [1,4-(1,3;1,4)- $\beta$ -D-Glucanohydrolase] se rapportent à un groupe d'enzymes agissant ensemble et hydrolysent la cellulose en sucres simples (Kader *et al.*, 1999 ; Korish, 2003).



### 1.2.2 Mode d'action

L'hydrolyse enzymatique complète de la matière cellulosique requière différents types de cellulases à savoir : les endoglucanases, les cellobiohydrolases et les  $\beta$ -glucosidases (Acharya *et al.*, 2012) .

#### **Endo $\beta$ (1-4)-glucanase ou endocellulase (EC 3.2.1.4)**

Elles coupent la cellulose aléatoirement à l'intérieure de la chaine de cellulose et au niveau des zones amorphes, générant de nouvelles extrémités libres (Murashima *et al.*, 2002).

#### **Exo $\beta$ (1-4)- glucanase ou cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91)**

Elles attaquent les polymères de cellulose par les extrémités non réductrices et libèrent des résidus cellobiose (Linton *et al.*, 2004).

#### **Les $\beta$ -glucosidases ou cellobiase (EC 3.2.1.21)**

Elles sont impliquées dans l'hyrdolyse des oligosaccharides court, du cellobiose et du glucose, ce qui diminue l'inhibition de la production des cellobiohydrolases (Linton et Greenaway, 2004).

La complémentarité de leurs actions pour la réalisation d'une hydrolyse totale de la cellulose, le complexe enzymatique de la cellulase fonctionne en synergie, ce qui explique l'interaction entre les trois enzymes, auxquelles le produit de réaction enzymatique est utilisée comme en substrat pour une autre réaction (Gao *et al.*, 2008).

Quatre formes de synergie sont décrites : une synergie endo-exo entre endoglucanases et exoglucanases (Lemos *et al.*, 2003). une synergie exo-exo entre exoglucanases agissant aux extrémités réductrices des chaînes de cellulose et celles agissant aux extrémités non-réductrices, une synergie entre les exoglucanases et les  $\beta$ - glucosidases qui permet l'hydrolyse de cellobiose, un produit final caractérisé par son important pouvoir d'inhibition des cellobiohydrolases et une synergie intramoléculaire entre domaines catalytiques et CBM (Lynd *et al.*, 2002).

### 1.2.3 Nomenclature des cellulases

Nom codifié : E.C.3.2.1.4

Nom systématique : 1,4-(1,3 ; 1,4)- $\beta$ -D-Glucan 4-glucanohydrolase.

Nom recommandé : Cellulase.

Synonymes : Endoglucanase, Endo-1,4- $\beta$ -Glucanase, Cellulase carboxyméthylrique,  $\beta$ -1,4-endoglucanhydrolase, Celludextrinase, Avicelase, etc (Schomburg *et al.*, 1991).

#### 1.2.4 Classification des cellulases

Les cellulases sont classées en plusieurs familles de glucoside hydrolases sur la base de leur similarité de séquence (Tab. 1) (Sadhu *et al.*, 2013).

**Tableau 1.** Classification des enzymes cellulolytiques et leur système (Sadhu et Maiti, 2013).

Enzyme	nombre E.C.	Réaction	Autre nom	Famille
Endo -1,4 $\beta$ -D-glucanglucanohydrolydase	E. C. 3. 2. 1.4	Casse la liaison interne de cellulose amorphe et libérant les Oligosaccharides	Endoglucanase, Endo-1,4- $\beta$ -glucanase, Carboxymethyl cellulase, $\beta$ -1,4-endoglucohydrolase, Endocellulase	5, 6, 7, 8, 10, 12, 44, 51, 61, 74
$\beta$ - Glucosidases ou $\beta$ -D-glucoside gluco-hydrolases	E.C.3.2.1.21	Hydrolyse la cellobiose et libérant le glucose	Gentobiase, Cellobiase, Amygdalase.	1, 3, 9
Exoglucanase or 1,4- $\beta$ -D-glucan-Cellobiohydrolases (cellobiohydrolases)	E.C.3.2.1.91	Hydrolyse la liaison 1,4-bêta-D-glucosidique de cellulose et libérant de cellobiose	Exoglucanase, Exocellobiohydrolase, 1,4- $\beta$ -cellobiohydrolase	5, 6, 7, 9, 10, 48

### **1.2.5 Différentes origines de la cellulase**

Les cellulases sont largement répandues dans la nature. Elles sont recensées chez des organismes très divers : bactéries, champignons, plantes, protozoaires, vers, insectes mollusques etc... (Odier et Rouau, 1985).

#### **1.2.5.1 Origine animale**

Plusieurs espèces animales utilisent la cellulose comme source d'énergie, malgré leur incapacité à produire des cellulases endogènes, mais ceci est dû à une vie symbiotique des microorganismes dans leur système digestif (Clementi, 1922).

#### **1.2.5.2 Origine végétale**

Les cellulases jouent un rôle important dans la maturation des fruits où elles participent à la libération des arômes. Ces enzymes végétales sont généralement obtenues par extraction à partir des fruits tels que les grains de raisin, les amandes douces de l'avocat *Persea americana* (Combo *et al.*, 2011).

#### **1.2.5.3 Origine microbienne**

Les bactéries et les moisissures utilisent la cellulose pour la production de quantités substantielles d'enzymes extracellulaires qui sont alors facilement récupérées du milieu de culture après fermentation bien que ces enzymes, peuvent être présentes sur la surface des cellules (Odier et Rouau, 1985).

### **1.2.6 Etude des microorganismes cellulolytiques**

Ces microorganismes appartiennent à des groupes taxonomiques très variés pouvant être groupés suivant leur appartenance au groupe Eucaryotes ou Procaryotes, leur température de croissance qui permet de distinguer les microorganismes mésophiles et les microorganismes thermophiles (Tchunden, 1990).

#### **1.2.6.1 Microorganismes procaryotes**

Ce groupe comprend les bactéries cellulolytiques et pseudocellulolytiques. Suivant le mode de respiration, on distingue les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aérobies-anaérobies facultatives.

## 1.2.6.2 Bactérie cellulosique

*Clostridium thermocellum* est la bactérie cellulolytique la mieux connue et la plus étudiée; elle permet la conversion directe de la cellulose en éthanol, en acides organiques et en gaz (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>). C'est l'une des rares bactéries qui produit des cellulases aussi efficaces dans l'hydrolyse de la cellulose cristalline que les cellulases de *Trichoderma reesei*, *Cl. thermocellum* est une bactérie anaérobie saprophyte. Son système enzymatique est très étudié. Les cellulases secrétées par cette bactérie ont tendance à s'associer en un complexe de haute masse molaire appelé cellulosome (Tab. 2) (Bayer *et al.*, 1983).

Les bactéries sont moins étudiées que les champignons. Cependant certaines d'entre elles ont fait l'objet de nombreux travaux.

**Tableau 2** . principaux microorganismes cellylytiques etv pseudocellulolytiques (Bayer *et al.*, 1983) .

Organisme	Température de croissance	Métabolisme énergétique
<i>Les prokaryote</i>	M	Ae
<i>Pseudomonadaceae</i>	M	Ae
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	M	Ae
<i>Cellvibrio gilvus</i>	M	Ae
<i>Cellvibrio fulvus</i>	M	Ae
<i>Cellvibrio vulgaris</i>	M	Ae
<i>Cellvibrio mixtus</i>	M	Ae
<i>Bacteroidaceae</i>	M	Ae
<i>Bactroides succinogenes</i>	M	An
<i>Bacteroides cellulosolvans</i>	M	An
<i>Butyvibrio fibrisolvans</i>	M	An
<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	M	An
<i>Acetivibrio cellulosolvans</i>	M	An
Bacillaceae	M	An
<i>Bacillus circulans</i>	M	Ae/ An
<i>Bacillus coagulans</i>	M	fac

**M:** mésophile, **T:** thermophile, **M/Tt:** mésophile thermotolérant, **Ae:** aérobie, **An:** anaérobie, **Ae/An**

**fac:** aérobie, anaérobie facultative.

**1.2.7 Facteurs liés aux conditions opératoires de cellulase****1.2.7.1 Réaction et spécificité**

Elle est représentée par l'endohydrolyse des liaisons (1,4- $\beta$ -D-glucosidiques de la cellulose et des lignines et l'hydrolyse des liaisons 1,4 et 1,3 en  $\beta$ -D- glucanes (Schneider-Poetsch *et al.*, 1991).

**1.2.7.2 Substrats naturels**

La cellulase intervient dans la dégradation de différents substrats naturels tels que : la cellulose, les Xyloglucanes le coton, dont la dégradation complète nécessite une action complémentaire des enzymes cellulolytiques (Aruoma *et al.*, 1989).

**1.2.7.3 Inhibiteurs**

L'activité cellulolytique est inhibée par la présence de différents éléments tels que :  $Hg^{2+}$ , élément minéral qui peut être restauré en par la cystéine ou le NaCl, le glucose ,le cellobiose , la glucosamines , les gluconolactones, le sodium dodecyl sulfate, le dithiothreitol, les dextranses ... etc (Schomburg et Salzmann, 1991).

**1.2.7.4 Activité enzymatique**

L'activité cellulolytique est exprimée en unités internationales, qui correspond à la quantité d'enzymes produite, intervenant dans la dégradation de (CMC) en carbohydrates réduits (1  $\mu$ mole de glucose /minute). L'activité cellulasique varie considérablement entre 60-1168 Unités (Kolpak et Blackwell, 1976).

**1.2.7.5 Poids moléculaire**

Les cellulases ont des poids moléculaires très variables qui dépendent de leurs origines. les endoglucanases ont des poids moléculaires de 30-90 KDa, lorsque d'autres sont de dimensions beaucoup plus faibles 13 KDa (Odier et Rouau, 1985).Les exoglucanases ont des poids moléculaires de 30-50 KDa (Kuhad *et al.*, 1997) , alors que les  $\beta$ -glucosidases ont des masses moléculaires plus élevées variant de 90-240 KDa (Ekström *et al.*, 1988).

**1.2.7.6 pH optimum**

Les enzymes cellulolytiques caractérisés par des valeurs de pH optimales de 3-7. Cependant, les cellulases d'origine fongique ont des valeurs de pH optimal limité de 4-5. Cependant, les valeurs de pH optimale de le cellulase bactérienne sont proches de la neutralité (Buchholz, 1983).

### **1.2.7.7 Température optimale**

Les enzymes cellulolytiques fongiques caractérisés par des températures optimales entre 40-70°C. Cependant, les cellulases bactériennes ont des températures optimales entre 50 et 100°C, ce qui explique l'intérêt porté à cette classe enzyme par leur utilisation en industrie du textile (Ando *et al.*, 2002).

### **1.2.8 Applications industrielles des cellulases**

La biotechnologie des cellulases a débuté vers les années 1980 dans l'alimentation animale et en suite dans l'industrie du textile, de la lessive et du papier.

Actuellement, elle occupe environ 20% du marché mondial des enzymes (Deguchi *et al.*, 2006 ; Acharya *et al.*, 2012). Les performances élevées atteintes leurs ouvrent des perspectives intéressantes pour différentes applications industrielles (Scriban et Arnaud, 1993). L'une des applications potentielles des cellulases est la production d'éthanol-carburant à partir de la biomasse lignocellulosique (Gao *et al.*, 2008).

## **1.3 Optimisation de la production de la cellulase**

### **1.3.1 Influence du pH**

Chaque micro-organisme exige un pH optimum pour sa croissance et son activité. Le initial du milieu peut influencer beaucoup les systèmes enzymatiques et le transport des enzymes à travers la membrane des cellules. Ainsi, le pH optimum pour la production d'enzymes change d'une bactérie à une autre. C'est un facteur très important qui affecte d'une manière significative la production des cellulase (Haltrich *et al.*, 1997).

### **1.3.2 Influence de la source de carbone**

Les substrats carbonés servent à la fois comme source de croissance et d'énergie aux microorganismes. Plusieurs travaux rapportent que la cellulose est un excellent inducteur de la synthèse de cellulase chez les micro-organismes.

Les sucres solubles (cellulose, saccharose, arabinose...etc) n'induisent que très faiblement la synthèse de cellulase, alors que les résidus agricoles insolubles (paille et son de blé, écorce d'orange ...etc) induisent fortement la synthèse de ces enzymes (Assamoi *et al.*, 2009).

### **1.3.3 Influence de la salinité**

Chez les micro-organismes producteurs de cellulase la salinité joue un rôle important pour la production enzymatique. Le besoin en NaCl est variable allant de 0 à 200 g/l (Enache et Kamekura, 2010). Les effets de la salinité se manifestent par la modification de la conformation structurelle de l'enzyme (Gaur *et al.*, 2015), par l'augmentation de la perméabilité membranaire et par le maintien de l'équilibre osmotique cellulaire (Strub, 2008).

### **1.3.4 Influence du taux d'inoculation**

La taille de l'inoculum doit être suffisamment grande pour coloniser toutes les particules du substrat (Sikyta, 1983). Un certain taux d'inoculation est nécessaire pour maintenir l'équilibre entre la biomasse cellulaire et les nutriments disponibles afin d'obtenir la meilleure production enzymatique.

Une faible activité enzymatique obtenue avec un taux d'inoculum élevé pourrait résulter d'une consommation nutritive rapide. D'ailleurs, un taux élevé d'inoculum n'est pas préconisé dans une application industrielle (Abdullah *et al.*, 2016).

### **1.3.5 Teneur en humidité**

La teneur en humidité est généralement considérée comme un facteur qui affecte le transfert d'oxygène et l'accessibilité des nutriments dans la FSS. Une humidité élevée favorise la croissance fongique, le transport des nutriments et les activités enzymatiques, mais limite le transfert d'oxygène et facilite la contamination. Une large gamme de taux d'humidité allant de 50 à 89,5% a été utilisée dans diverses études pour la production de cellulase en utilisant *A. niger* (Abdullah *et al.*, 2016).

**Deuxième partie**

**Partie expérimentale**



# **Chapitre 2**

## **Matériel et méthodes**

## 2.1 Isolement et identification des souches cellulolytiques

Les bactéries ont été isolées des sols par la plaque de dilution à l'aide d'un support de CMC Agar. Les plaques ont été incubées à 45, 50 et 55°C pendant 24 heures.

Pour visualiser la zone d'hydrolyse, les plaques ont été inondées d'une solution aqueuse de 0,1% de rouge Congo pendant 15 min et lavé avec 1 M NaCl.

Pour indiquer l'activité de la cellulose des organismes, le diamètre de la zone claire autour des colonies sur (CMC) Agar a été mesuré. En outre, une méthode de dosage plus quantitative a été utilisée pour déterminer l'activité de cellulose de l'isolat bactérien sélectionné dans le milieu liquide. L'activité de la cellulase de chaque culture a été mesurée en déterminant la quantité de sucres réductrices libérées en utilisant une méthode DNS. Un isolat bactérien avec l'activité la plus élevée a été sélectionné pour l'optimisation de la production de cellulose.

Les isolats bactériens étaient identifiés au moyen d'examen morphologiques et de certaines caractérisations biochimiques. Les résultats ont été comparés au manuel de Bergey de bactéries déterminantes (Sethi *et al.*, 2013).

Les échantillons de déchets solides municipaux étaient collectés de différentes localités de Jabalpur. Il a été pris par des moyens de spatules stérilisées et collectées dans des sacs en polythène stériles. Ils ont été collectés pour l'isolement des champignons.

Un gramme a été transféré dans des aliquotes de 9 ml d'eau distillée stérile dans un tube à essai. Il a été agité vigoureusement à vitesse constante pendant 15 min.

La suspension MSW a ensuite été soumise à des dilutions en série de la plaque appropriée en duplicata.

Dans une méthode de dosage de plaque utilisant 1% de (CMC) dans un support de sel basal, respectivement, selon à la période d'incubation, 0,1% de solution rouge Congo a été ajoutée 1 M NaCl pendant 15-20 min. La technique d'état stationnaire a été utilisée et 150 ml de ballon Erlenmeyer rempli de 50 ml du milieu. Chaque ballon était inoculé avec deux disques (diamètres de 7 mm) de la périphérie de la culture de 4 jours d'*Aspergillus niger* et *Trichoderma* sp. Les flacons ont ensuite été incubés à 30° C dans l'état stationnaire (Gautam *et al.*, 2011).

Un total de 13 échantillons de compost différents ( $T > 50^{\circ}\text{C}$ ) ont été collectés dans des récipients stériles. Les tas de compost ont été séchés à l'air et chauffés à  $55^{\circ}\text{C}$  pendant 1 semaine, puis séchés à l'air pour réduire les isolats mésophiles et anaérobies.

Deux protocoles ont été utilisés pour isoler les bactéries thermophiles productrices de cellulase. Un gramme de tas de compost a été dilué en série afin de réduire le nombre initial de micro-organismes. La dilution appropriée a ensuite été étalée directement sur un milieu de gélose CMC ou un bouillon de cellulose enrichi et étalée sur de la gélose (CMC).

Toutes les incubations ont été faites à  $55^{\circ}\text{C}$  pendant 2-4 semaines avec une agitation à 120 rpm dans un agitateur à environnement contrôlé (Ibrahim *et al.*, 2007).

Bran de riz d'une usine de riz locale dans le sud du sud Taiwan a été prétraité par la fraiseuse. Tous les médias de la culture des bactéries étaient de laboratoires.

Le *Bacillus subtilis* YJ1, isolé des aliments fermentés dans le laboratoire, a été cultivé dans un milieu contenant 2% de son de riz, 1% de caséine, 1% de sotytone et 0,1% de chlorure de sodium. Après 36 h incubation à  $37^{\circ}\text{C}$  avec secouant à 150 tr/min, la culture Le bouillon a été centrifugé à  $8000 \times g$  pendant 20 min et passa à travers une membrane de  $0,45 \mu\text{m}$  pour éliminer les cellules (Yin *et al.*, 2010).

Une souche élevée de *Streptomyces* C188 productrices de cellulase a été isolée d'échantillon de sol en Arabie Saoudite (Jaradat *et al.*, 2008). La souche a été purifiée par une chargeuse sur l'agar de nitrate d'amidon amidon soluble de 20 g, 2 g  $\text{KNO}_3$ , 1 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4$ , 0,5 g  $\text{NaCl}$ , 3 g  $\text{CaCO}_3$ , 0,01 g  $\text{FeSO}_4$ , 0,01 g  $\text{MnCl}_2$ , 0,01 g  $\text{ZnSO}_4$ , 20 g agar par litre).

La productivité enzymatique par la souche testée a été déterminée, une suspension spore de 4 à 5 jours de cultures anciennes a été préparée dans une solution saline normale et utilisée comme inoculum pour un compte final de 103 CFU/ml dans un milieu liquide de 50 ml de (CMC) dans des flacons erlenmeyer de 250 ml et incubés dans un incubateur de secousses rotatif (S19R-2, Sheldon MFG, USA) à 250 tr/min et  $30^{\circ}\text{C}$  pendant 9 jour (Yassien *et al.*, 2014).

### **2.1.1 Optimisation de la production de cellulase**

#### **2.1.1.1 Effet du pH**

Flacons avec bouillon contenant le con La centralisation du substrat et de la source de carbone est prise et le pH du bouillon est ajusté à 7, 8, 9, 10 et 11 dans différentes flacons en

utilisant 1 N HCl et 1 N NaOH et stérilisé. Les cultures sont inoculées et incubées à la température particulière. À la fin de la période d'incubation, le filtrat de culture sans cellules est obtenu et utilisé comme source d'enzyme (Sethi *et al.*, 2013).

Déterminer pH optimal, *A. niger* et *Trichoderma* sp ont été cultivés dans un ballon de 150 ml contenant 50 ml de milieu optimisé avec différent pH de 3 à 9.

Le pH du milieu a été ajusté en utilisant 1 N HCl ou 1 N NaOH. Les flacons ont été conservés à l'étape stationnaire à 37°C pendant 5 jours de culture (Gautam *et al.*, 2011).

Pour détermination, la valeur optimale du pH pour la production de cellulase par *Pleurotus*, un milieu basal a été ajusté à des valeurs de pH variables 5, 6, 8 et 9 tandis que le pH 7 utilisé comme contrôle. La procédure de culture pour les espèces de *Pleurotus* sur un milieu basal avec différentes valeurs de pH a été réalisée dans les mêmes conditions décrites dans les expériences précédentes et l'activité de la cellulose a été évaluée comme mentionnée ci-dessus.

La couleur développée a été lue sur le spectrophotomètre Jenway 6305 UV / VIS. à 540 nm (Elsebaay *et al.*, 2018).

Afin de déterminer le pH optimal de l'essai, pour l'activité de la cellulase, l'essai a été effectué à différents tampons utilisés à divers pH étaient : Acétate de sodium 0,05 M (pH 3-4,5), citrate de sodium 0,05 M (pH 5-5,5) et tampon phosphate de sodium 0,05 M (pH 6-8) (Oyekola, 2003; Ariffin *et al.*, 2006 ; Ray *et al.*, 2007).

La cellulase purifiée a été incubée dans des tampons avec divers pH (pH 3-7: tampon citrate de 50 mm ; pH 6-9: tampon phosphate de 50 mm; pH 8-11: tampon de carbonate de 50 mm) à 25°C pendant 30 min. L'activité résiduelle a été mesurée selon Miller (Yin *et al.*, 2010).

Le milieu de bouillon CMC modifié a été préparé avec une large gamme de pH initial (5-9,5) (Yassien *et al.*, 2014).

D'autres études ont été effectuées avec 0,05 m de phosphate tampon (pH 5.5-7.5) pour contrôler le pH du milieu de fermentation tout au long de la période d'incubation. La plus grande productivité enzymatique (25084 U/l) a été obtenue lorsque le pH de fermentation a été maintenu sur la période d'incubation à pH 6,5 (Yassien *et al.*, 2014).

### **2.1.1.2 Effet de la température**

Le milieu de production à pH 7 était inoculé avec une souche bactérienne sélectionnée de nuit. Le bouillon a été incubé à différentes températures de 35, 40, 45, 50, 55 et 60°C pendant 24 h. À la fin de la période d'incubation, le filtrat de culture sans cellules est obtenu et utilisé comme source d'enzyme (Sethi *et al.*, 2013).

En ordre déterminer l'effet Température pour le produit de la cellulase par l'*A. niger* et *Trichoderma* sp. la fermentation a été effectuée à des intervalles de 10°C dans la gamme de 20 à 80 ± 2°C (Gautam *et al.*, 2011).

L'effet de différentes températures sur la production de cellulase par champignon Pleurote a été étudié à l'aide de milieu basal. Le milieu inoculé avec un disque fraîchement 5 mm de Le mycélium du champignon pleurote a été cultivé pendant 6 jours sur l'incubateur de Shaker à différentes températures 25, 30, 35, 40 et 45°C.

À la fin de l'expérience, l'activité de cellulase produite a été déterminée dans le bouillon culturel clair après avoir été filtrée et centrifugée. La couleur développée a été lue sur le spectrophotomètre (Elsebaay *et al.*, 2018).

Le profil de température entre 30°C et 80°C, pour l'activité de la Cellulase, à un pH optimal a été déterminé. L'extrait d'enzyme soluble a été incubé avec le substrat (CMC) à différentes températures (30-80°C) (Oyekola, 2003; Ariffin *et al.*, 2006 ; Ray *et al.*, 2007).

La cellulase purifiée en tampon de phosphate de 20 mm (pH 7,0) était incubé à diverses températures (0, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90°C) pendant 30 min. L'activité résiduelle a été mesurée Selon Miller (Yin *et al.*, 2010).

Pour étudier l'effet de la température de l'activité d'enzyme, 900 µl de 1% CMC en 20 mm de tampon de phosphate (pH 7) ont été mélangés à 100 µl d'enzyme pure et la température optimale pour l'activité de la cellulase a été déterminée entre 30 et 80°C. La thermostabilité des enzymes a été étudiée en incubant la solution CMC en tampon de phosphate de 50 mm (pH 7) à des températures de 30 à 90°C pendant 30 minutes (Yassien *et al.*, 2014).

### **2.1.1.3 Effet des sources de carbone.**

L'effet de diverses sources de carbone Tels que l'amidon, le glucose, le maltose, le lactose et le fructose à la concentration de 1 à 5% ont été examinés dans le milieu de production (Sethi *et al.*, 2013).

Effets de divers composés de carbone, nommément, la cellulose, la CMC, le glucose, le saccharose et le maltose ont été utilisés pour étudier. Le bouillon a été distribué en des flacons et 0,5 à 3% de chaque source de carbone ont ensuite été ajoutés avant l'inoculation de la tension et de l'inoculation de la culture, les flacons ont été incubés pendant 5 jours à  $45 \pm 2^\circ\text{C}$  (Gautam *et al.*, 2011).

Différentes sources de carbone telles que la cellulose, carboxyméthyle, l'amidon, le fructose, le lactose, le saccharose, le glucose et le dextrose ont été étudiés en utilisant chacune d'elles comme une source de carbone unique pour le milieu basal fongique au même niveau (1%).

Une centaine de ml de chaque milieu basal préparé avec une source de carbone différente, ont été distribuées dans des flacons Erlenmeyer de 250 ml et stérilisés à  $121^\circ\text{C}$  pendant 15 minutes, refroidi, puis inoculé avec un disque 5 mm de culture de mycélium de pleurote désirée. Les flacons ont été incubés sur un incubateur de shaker (120 tr/min) à  $30^\circ\text{C}$  pendant 6 jours.

Après 6 jours, l'enzyme extracellulaire présente dans le filtrat de culture a été obtenue par filtration. Le filtrat de culture a ensuite été centrifugé et le surnageant clair a été analysé pour une activité de cellulase. La couleur développée a été lue sur le spectrophotomètre (Elsebaay *et al.*, 2018).

À identifier la source de carbone appropriée pour la production de cellulase par les organismes de test, le carbone suivant sources ont été testés. Le milieu de production contenant de la voiture boxyméthyle la cellulose agit en tant que source de carbone, ce CMC était remplacé En ajoutant du glucose, du saccharose, du fructose, du maltose, Lactose, mannitol et sorbitol. Ces sources de carbone ont été testés individuellement à la concentration de 1% avec sec substrat (Sreeja *et al.*, 2013).

#### **2.1.1.4 Effet de la Sources d'azote**

Diverses sources d'azote comme la levure Des extraits, de la peptone, de l'urée et du sulfate d'ammonium ont été examinés pour leur effet sur la production d'enzymes en remplaçant la peptone de 0,5% dans le milieu de production (Sethi *et al.*, 2013).

Dans La présente étude, nous visons à détecter la source d'azote appropriée pour la production de cellulase par l'*A. niger* et *Trichodera* sp .Le milieu de fermentation a été complété avec Composés biologiques et inorganiques (peptone, extrait de bœuf, nitrate

d'ammonium, nitrate de sodium et extrait de levure) à un niveau de 0,5 à 3,0%, remplaçant la source d'azote prescrite du milieu de fermentation (Gautam *et al.*, 2011).

L'effet de la source d'azote sur la production d'enzymes a été étudié en remplaçant la source d'azote dans un milieu basal fongique avec une source de base de l'organisme différente, une source d'asile de bœuf et une source d'azote inorganique telle que le chlorure d'ammonium, le sulfate d'ammonium, l'extrait de levure utilisé comme une contrôler 100 ml de chaque milieu basal préparé avec différentes sources d'azote, ont été versées dans des flacons erlenmeyer de 250 ml puis stérilisés à 121°C pendant 15 minutes, refroidis, puis inoculé avec un disque 5 mm de culture de mycélium de pleurotus désirée.

Les flacons ont été incubés sur un incubateur de shaker (120 tr/min) à 30°C pendant 6 jours. Après avoir cultivé l'enzyme produite présente dans le filtrat de culture a été obtenue par filtration. Le filtrat de culture a ensuite été centrifugé et le surnageant clair a été analysé pour une activité de cellulase. La couleur développée a été lu sur le spectrophotomètre (Elsebaay *et al.*, 2018).

### **2.1.1.5 Effet de la période d'incubation sur la production d'enzyme**

La période de mention était un paramètre important pour la production d'enzymes par *A. niger* et *Trichoderma* sp. une expérience de fermentation a été effectuée jusqu'à 7 jours et le taux de production a été mesuré à des intervalles de 24 h (Gautam *et al.*, 2011).

### **2.1.1.6 Matériaux des déchets à base d'agro.**

Pour découvrir la pertinence des déchets agro aux comme substrat pour la production d'enzymes, différents substrats, c'est-à-dire gâteau d'arachide, gâteau de coco, gâteau de soja et son de blé, sont pris dans le milieu de croissance sous condition submergée. L'activité enzymatique est mesurée après 24 h pour la production d'enzymes (Sethi *et al.*, 2013).

Dans la précédente étude, déterminer la Concentration appropriée des résidus de déchets solides municipaux pour la production de cellulase par l'*A. niger* et *Trichoderma* sp. Le milieu de fermentation a été complété par des résidus de déchets solides municipaux à 1à 6%, remplaçant la source de carbone prescrite du milieu de fermentation (Gautam *et al.*, 2011).

### **2.1.1.7 Effet de divers sels métalliques et inhibiteurs**

L'effet de divers sels métalliques sur la production de cellulase a été déterminé en ajoutant des sels métalliques différents dans le milieu basal fongique sans sels métalliques.

Les sels métalliques sélectionnés pour l'étude actuelle sont  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$  et  $\text{NaCl}$  à 0,1% de concentration.

L'activité de la cellulase a été déterminée après 6 jours à 30 jours par méthode DNS. La couleur développée a été lu sur le spectrophotomètre (Elsebaay *et al.*, 2018).

La cellulase purifiée dans un tampon tris-hcl de 20 mm pH 7 avec divers métaux ( $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Sr}^+$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) ou des inhibiteurs ( $\beta$ -mercaptoethanol, Dithiothréitol, acide éthylène diamine Tétra-Acétique, Acide iodoacétique, p-chloromercuribenzoate, p-cmb; Dodécyl sulfate de sodium, urée) ont été incubés à 25°C pendant 30 min. Les concentrations finales de métaux et Les inhibiteurs étaient 1, 5, 10 mm. Après incubation, l'activité résiduelle a été mesurée selon Miller (Yin *et al.*, 2010).

### 2.1.1.8 Effet de la spécificité du substrat

La capacité hydrolytique contre 1% CMC, avicel, coton, filtre papier, xylan et p-nitrophénol- $\beta$ -d-glucopyrananoside dans un tampon de phosphate de 20 mm (pH 7) ont été déterminés à évaluer la spécificité du substrat de la cellulase purifiée (Yin *et al.*, 2010).

Pour évaluer l'effet de la concentration du substrat sur la production de cellulase le milieu de production a été incorporé par des concentrations différentes de CMC comprenant 0,2%, 0,5%, 1% et 1,5% (Shaikh *et al.*, 2013).



# **Chapitre 3**

## **Résultats et discussion**

### 3.1 Isolement des bactéries productrices de cellulase

Les bactéries productrices de cellulase ont été isolées du sol. Basé sur les caractéristiques morphologiques et biochimiques, les isolats ont été identifiés comme *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* et *Serratia marcescens* (Sethi *et al.*, 2013).

Une souche élevée de *Streptomyces* C188 productrices de cellulase a été isolée d'échantillon de sol en Arabie Saoudite. a été purifiée par une chargeuse sur l'agar de nitrate d'amidon amidon (Fig. 4) (Yassien *et al.*, 2014).



**Figure 4.** Projection des bactéries cellulolytiques sur la plaque d'agar CMC (Yassien *et al.*, 2014).

Projections des champignons pour leur activité cellulase ont été effectués par l'hydrolyse du substrat incorporant dans le milieu de sel basal. Après une période d'incubation, des activités d'enzymes ont été détectées par l'apparition de zones par des dégagements sous substrat ou de la coloration et de la décoloration autour des colonies fongiques *A. niger* et *Trichoderma* sp ont été montrés à la plus haute zone autour de la colonie, utilisée pour une étude ultérieure (Gautam *et al.*, 2011) .

Dans l'étude, 10 bactéries thermophiles et 15 bactéries thermotolérantes ont été isolées des tas de compost.

Elles ont été identifiées comme étant *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus* spp, *Cellulomonas cellulans*, *Geobacillus* spp et *Penibacillus* spp. étaient des bactéries communes. Les isolats cellulolytiques thermophiles les plus puissants était *Bacillus subtilis* (McCaig *et al.*, 2001) .

La composition chimique des MSW a été évaluée comme décrit dans les méthodes (Tab. 3). Les résultats ont montré que le MSW contenait des niveaux significatifs de cellulose, d'hémicellulose et de lignine (Abdullah *et al.*, 2016) .

**Tableau 3.** Composition chimique des déchets solides municipaux (Abdullah *et al.*, 2016)

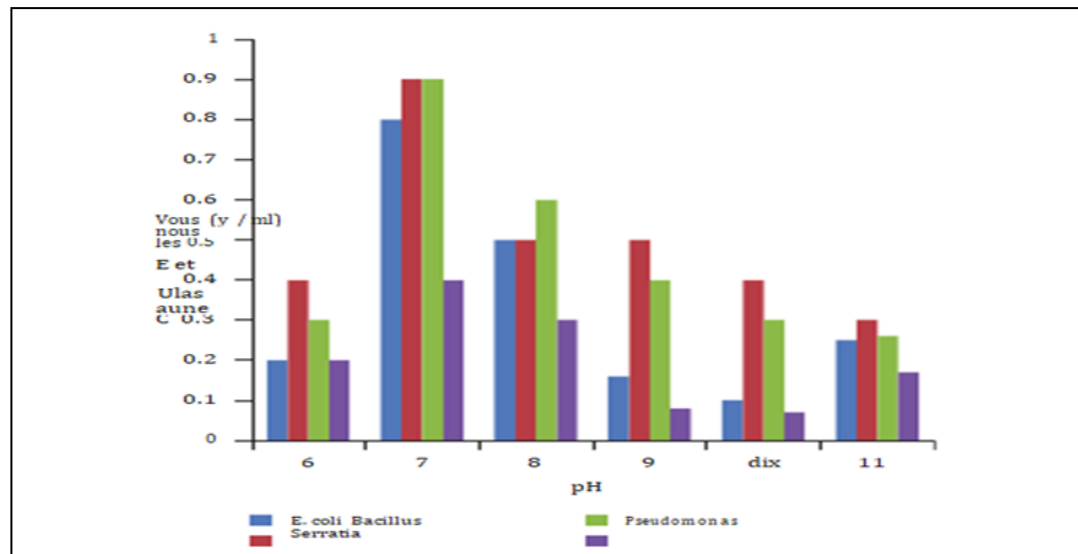
Composant structurel	g/100g
Cellulose	27.8 ± 0.1
Hémicellulose	15.45 ± 0.07
Lignine	17.7 ± 0.05
Lipides	11.2 ± 0.1
Protéine	5.9 ± 0.2

L'échantillon de MSW contenait des concentrations élevées de plusieurs des éléments essentiels et de certains des métaux toxiques. Les principales sources de métaux lourds dans les MSW sont généralement les piles (Ni, Zn et Cd), en raison de la faible disponibilité d'installations de recyclage pour les déchets dangereux et de la mauvaise attitude du public en matière de gestion des déchets (Abdullah *et al.*, 2016).

### 3.2 Optimisation des conditions de culture pour la production de cellulase

#### 3.2.1 Effet du pH sur la production d'enzyme.

Tous les quatre isolats ont été autorisés à grandir dans les médias de différents pH (**Fig.5**), allant de 6 à 11. Une activité d'enzyme maximale a été observée à moyen de pH 9-11 dans le cas de *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, et *Serratia marcescens* (Sethi *et al.*, 2013).

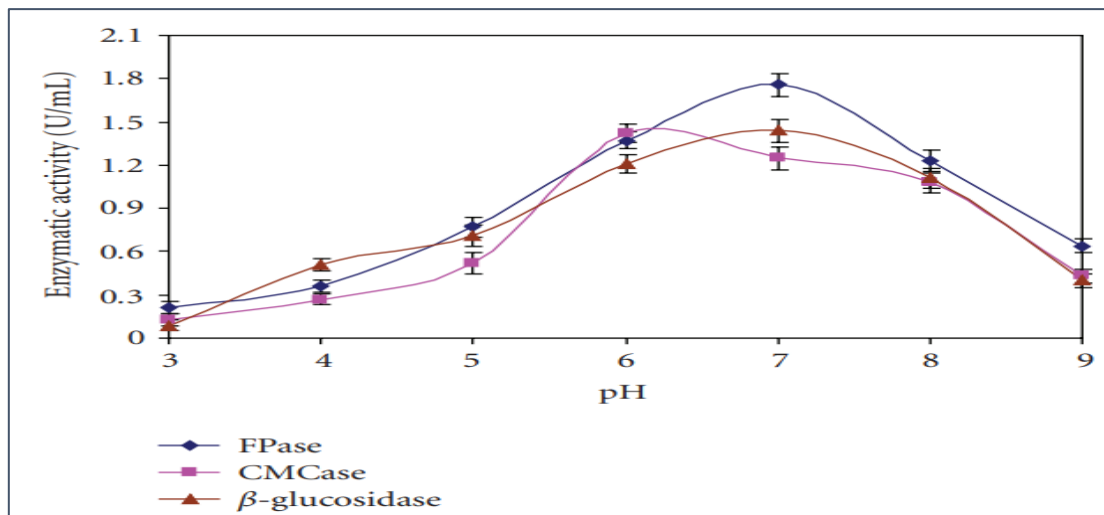


**Figure 5.** Effet du pH sur l'activité des cellulases d'*E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* et *Serratia marcescens* (Sethi *et al.*, 2013).

Les pH optimaux pour l'activité de la cellulase ont été trouvés à pH 6.5. L'activité enzymatique augmenta progressivement lors de l'augmentation du pH jusqu'à l'optimum suivi d'une activité complète progressive. Il a également été noté que l'activité d'enzyme était stable à pH de 5-8 l'effet de pH sur la production de cellulase par ces champignons soutient les conclusions de qui ont signalé que les activités CMCase, Avicelase et Fpase présentent un pH optimum d'environ 4, tandis que le pH optimal de La  $\beta$ -glucosidase était entre le pH (5-6) (Gautam *et al.*, 2011).

Le pH de croissance de la croissance est l'un des paramètres physiques les plus importants qui ont joué un rôle important dans la sécrétion d'enzyme. La plage de pH observée pendant la croissance des microbes affecte également la stabilité du produit dans le support (Deka *et al.*, 2013). La plupart des études précédentes ont révélé que le champignon avait besoin d'un pH légèrement acide pour une croissance optimale. La valeur du pH est connue pour affecter la synthèse et la sécrétion d'enzymes de cellulase, comme sa stabilité.

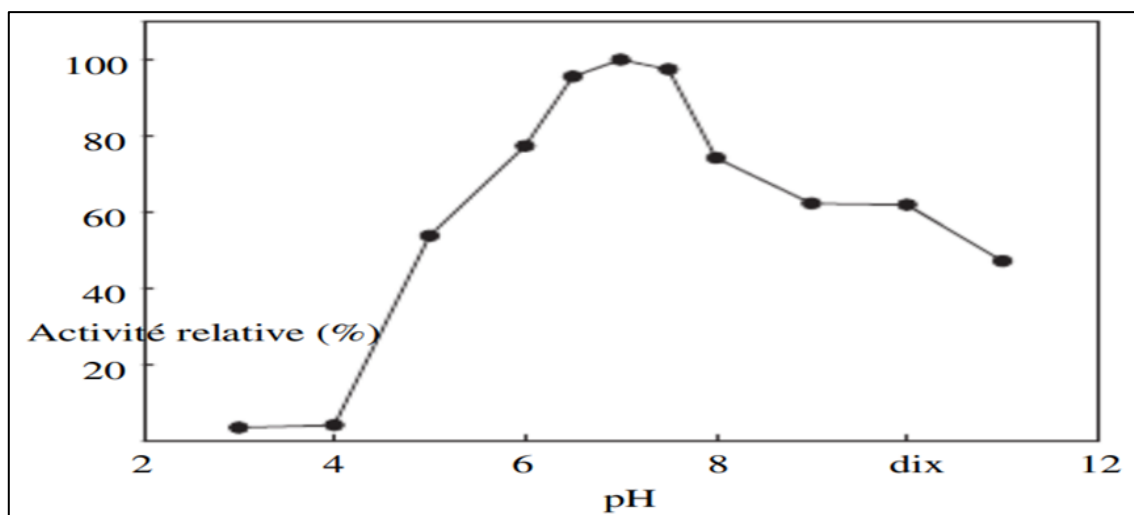
Ainsi, l'effet du pH sur la production de cellulase par *Pleurotus sapidus* (P969) et *Pleurotus citrinopileatus* P096 a été étudié à différents pH (5, 6, 7, 8, et 9) (Fig.6). La production maximale d'enzymes a été observée à la table pH 5 (Elsebaay *et al.*, 2018).



**Figure 6.** Effet du pH sur la production de cellulase (U/mL) par *A. niger* (Gautam *et al.*, 2011).

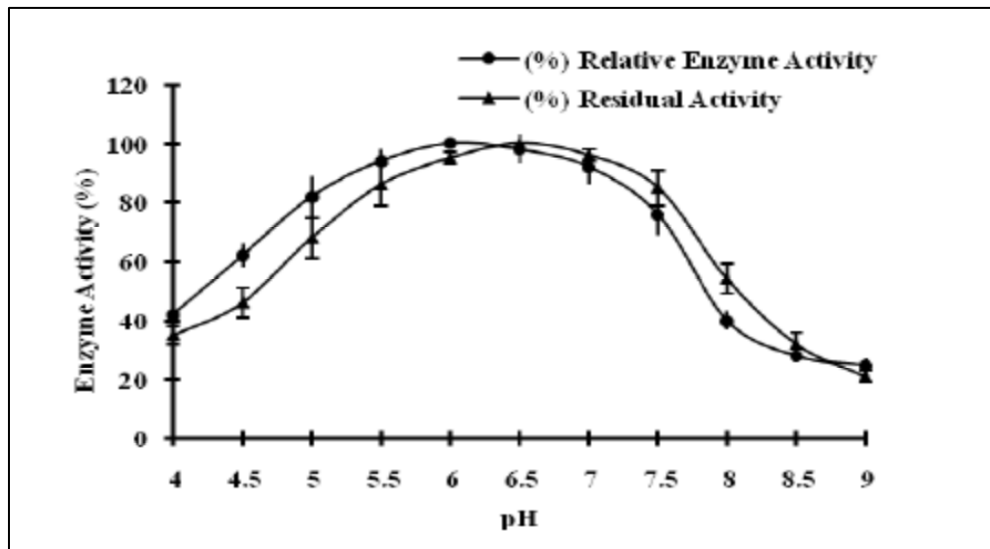
L'activité enzymatique de *Bacillus subtilis* était maximale à pH 7,2 à 50°C. Cependant, *Bacillus subtilis* a conservé son activité de pH 6,6 à 9.

*Bacillus subtilis* YJ1 leur Cellulase présentait une activité la plus élevée à pH 6-6.5 et était stable entre pH 6,5 et 7,5 Selon certaines études précédentes, le pH optimal était de 5 à 6,5 pour ceux des souches *Bacillus*, 6-7 de *Aspergillus niger* et 5-7 de *Lysobacter sp.* Le cellulase purifiée était stable à pH 6,5-7.5, qui était plus élevée que celles de *Mucor circinelloides*, 4-7 et *Bacillus circulans* 4.5-7.0. (Yin *et al.*, 2010).



**Figure 7.** Effet du pH sur la cellulase purifiée de *Bacillus subtilis* YJ1 (Yin *et al.*, 2010).

En ce qui concerne le pH, une activité enzymatique maximale (moins de 10% de réduction) été obtenue à la plage de pH 5.5 -7, avec une plage de pH optimale à 6 à 6,5. En cas de stabilité enzymatique, la préparation d'enzymes retenait 85% ou plus de son activité entre pH 5,5 et 7,5, tandis que le pH optimal est de 6,5 (Fig.8) (Yassien *et al.*, 2014) .

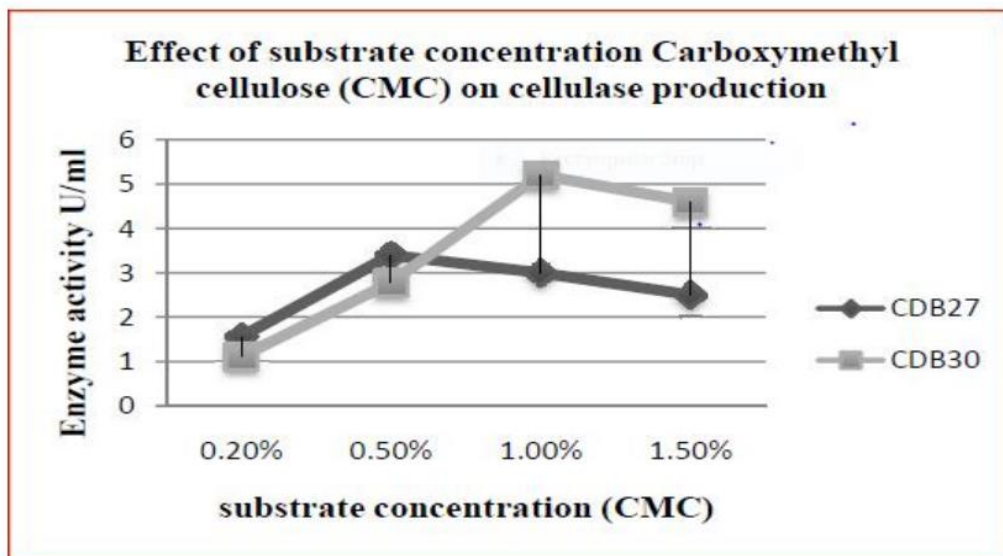


**Figure 8.** Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la cellulase de *Streptomyces C188* (Yassien *et al.*, 2014).

### 3.2.2 Effet de température sur la production d'enzymes.

La souche *Bacillus* sp CDB27 montre un optimum de production de cellulases (3,4 U/ml) à une concentration de 0,5% de Carboxy méthyl cellulose, alors que la souche CDB30 montre cet optimum (5,4 U/ml) et une concentration de 1% de CMC de cellulase (Fig. 9) (Soni *et al.*, 1999).

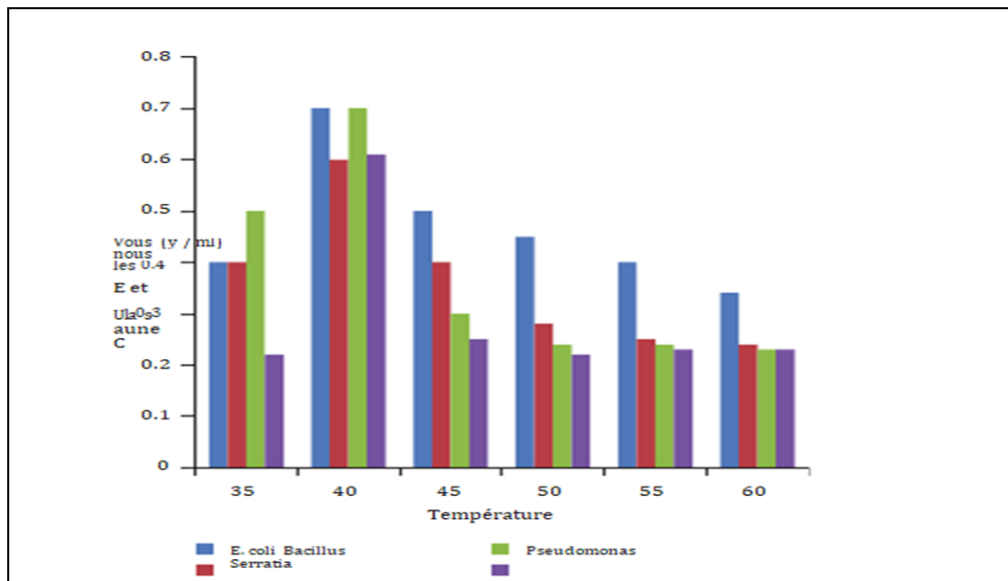
Activité enzymatique enregistré à différentes températures révélées que toutes les quatre bactéries produisaient une production maximale de cellulase à 40°C La température a été constatée pour influencer la sécrétion d'enzyme extracellulaire, éventuellement en modifiant les propriétés physiques de la membrane cellulaire.



**Figure 9.** Effet de la concentration du carboxyméthyle cellulose sur la production de cellulase par la souche *Bacillus* sp. CDB27 et CDB30 (Shaikh *et al.*, 2013).

Température concentrations de sources de carbone sur lesquelles sont utilisées optimale pour une croissance maximale de *Bacillus subtilis* était de 40°C. Ces résultats sont fermés ceux de (Okieimen *et al.*, 2005). Qui a constaté que l'enzyme de cellulase produite par de source de carbone a apporté la production de cellulase.

La fluorescence de *Pseudomonas* a été activée à 30 à 35°C la température optimale à 35°C. et le rendement minimal de la cellulase a été observé lorsque la fermentation a été effectuée à 45°C, tandis que le rendement maximal a été obtenu à 40°C par *Bacillus subtilis* et *Bacillus Circulans* (Fig.10). l'activité d'endoglucanase maximale dans les *Cellulomonas*, *Bacillus* et *Micrococcus* sp. à 40°C et pH neutre (Sethi *et al.*, 2013).



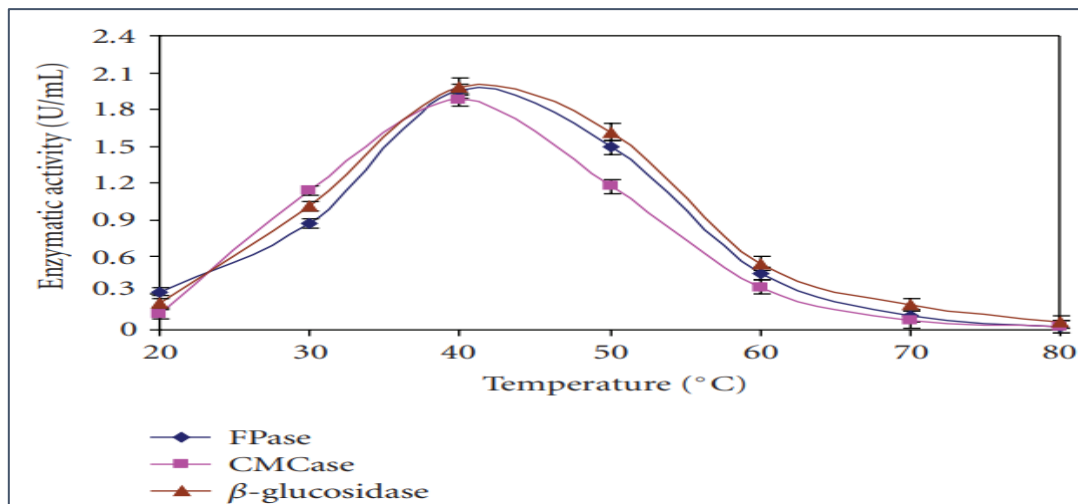
**Figure 10.** Effet de la température sur l'activité de la cellulase d'*E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* et *Serratia marcescens* (Sethi et al., 2013).

L'effet de la température sur l'activité de la cellulase a été déterminé par incubation du ballon à une plage de température de 20, 30, 40, 50, 60, 70 et 80°C.

Les résultats du test effectué à différentes valeurs des températures ont montré que la température optimale pour l'exoglucanase (1,95 U/ml) et l'activité endoglucanase (1,88 U/ml) produite par *A. niger* était comprise entre 40 et 50°C tandis que la température optimale pour  $\beta$ -glucosidase activité (1,98 u/ml) entre 45 et 55°C (Fig.11).

En raison de la haute température (ci-dessus 65°C), les résultats ont montré que l'activité d'enzyme a été réduite lorsque la température augmentait au-dessus de 65°C. Cependant, la production d'enzymes maximale par *Trichoderma* sp. a été trouvée être (1,95 u/ml exoglucanase) (1,88 U/ml endoglucanase) et (1,88 Activité  $\beta$ -glucosidase) entre 40 et 50°C (Gautam et al., 2011).

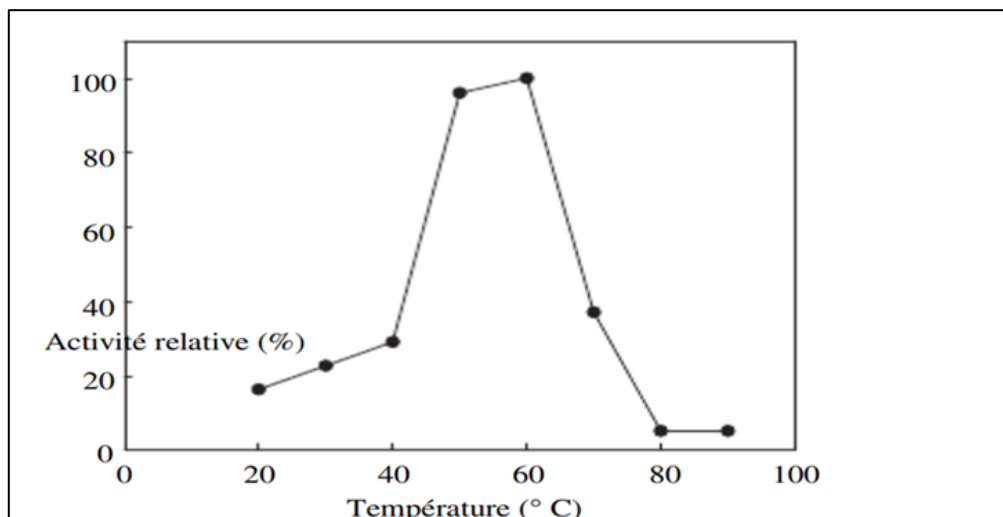




**Figure 11.** Effet de la température sur la production de cellulase (U/mL) par *A. niger* (Gautam *et al.*, 2011).

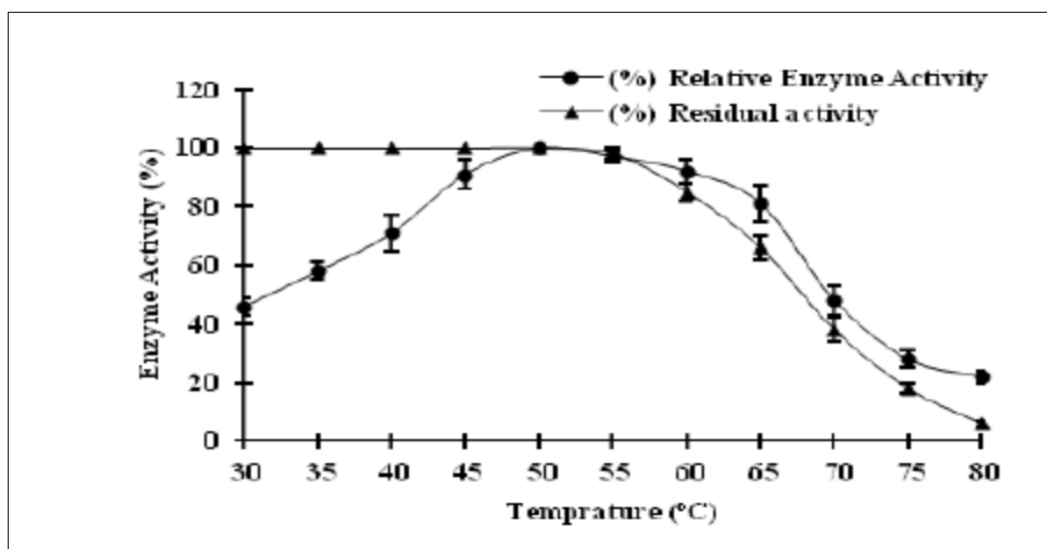
La température optimale pour la cellulase purifiée a été trouvée être 60°C à pH 7

La cellulase purifiée était stable à des températures de moins de 5°C, tandis que la température pour 50 était 60°C. La température optimale de la cellulase purifiée était inférieur à certaines des autres souches de *Bacillus* [65°C (CH43) et 70°C (rh68)] mais plus élevé que les *Mucor circinelloïdes* (55°C). La stabilité thermique de la cellulase purifiée (0-50°C) (Fig.12) (Yin *et al.*, 2010).



**Figure 12.** Effet de la température sur la cellulase purifiée de *Bacillus subtilis* YJ1 (Yin *et al.*, 2010).

Une activité enzymatique maximale a été obtenue à la température d'incubation de 50°C. Bien que la stabilité thermique de l'enzyme cellulase de *Streptomyces* C188 atteignait jusqu'à 55°C et la réduction de l'activité a été atteinte à 15% lorsque la température augmente jusqu'à 60°C (Fig.13) (Yassien *et al.*, 2014).



**Figure 13.** Effet de la température sur l'activité et la stabilité de la cellulase de *Streptomyces* C188 (Yassien *et al.*, 2014).

### 3.2.3 Effets de sources de carbone sur la production d'enzymes

Les sources de carbone jouent un rôle vital dans le métabolisme cellulaire et la synthèse de la cellulase l'effet de sources de carbone sur la production d'enzyme par *A. niger* et *Trichoderma* sp. a été étudiée.

Les sources de carbone testées pour la production d'enzyme de cellulase par *A. niger* étaient du glucose, du saccharose, de la cellulose, de la (CMC) et du maltose allant de 0,5 à 3% (W/V).

La cellulose et la CMC ont été jugées les meilleures sources de carbone pour la production d'enzymes par *A. niger*. Cependant, la production maximale d'exoglucanase (1.97 u/ml), endoglucanase (1,67 u/ml), et  $\beta$ -glucosidase (2.31 U/ml) a été obtenu dans la culture contenant 1% de cellules perdant.

Parmi les différentes Sources de carbone utilisées, la CMC était la deuxième meilleure source de carbone (1%) pour la production de cellulase par *A. niger*, suivie de saccharose, de glucose et de maltose, tandis que le saccharose (1%) était jugé le meilleur carbone de la production de cellulase par *Trichoderma* sp. suivi de glucose, de maltose de cellulose et de CMC.

La production de cellulase a augmenté avec des augmentations de la concentration de sucre initiale de 1 à 1,5% tandis que des augmentations de la concentration en sucre ont légèrement réduit le rendement.

La production de cellulase a augmenté avec des augmentations de la concentration de sucre initiale de 1 à 1,5% tandis que des augmentations supplémentaires de la concentration en sucre ont légèrement réduit le rendement.

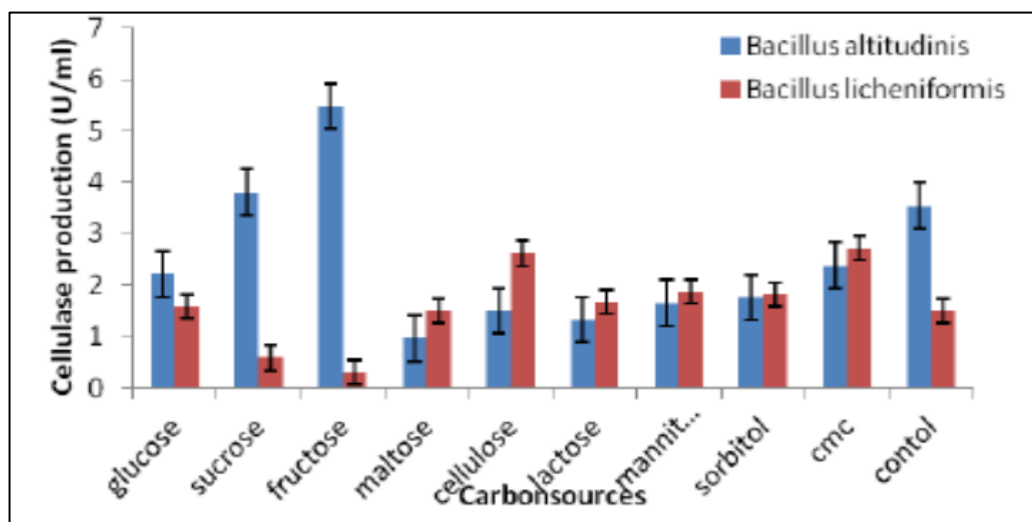
La production de cellulase a salué pour atteindre les conditions de limitation de l'azote et le rendement de cellulase a diminué lorsque l'excès de peptone a été présentée, diverses sources d'azote inorganiques ont été optimisées par différents travailleurs pour la production de cellulase (Gautam *et al.*, 2011).

Diverses sources de carbone tel que Comme l'amidon, le fructose, le maltose et le saccharose ont été utilisés pour remplacer le glucose qui était la source de carbone d'origine dans le milieu de croissance. Les résultats obtenus ont montré que le glucose apportait la production de cellulase la plus élevée par rapport à d'autres sources de carbone à une incubation de 24h (Fig.14).Le lactose et le fructose ont également montré une production élevée de cellulase à 24 h d'incubation. Par conséquent, le glycose s'est avéré être la meilleure source de Production de cellulase (Sethi *et al.*, 2013).

Le glycérol est le meilleur substrat de la production de cellulase avec l'efficacité de 28,7% sur le poids du substrat ajouté. l'utilisation de la D-xylose en tant que source de carbone pour la production de source de carbone pour la production de cellulase et déduite que la xylose n'est pas bien métabolisée par des souches bactériennes présentant une production élevée de cellulose dans le milieu de glucose, tandis que le saccharose, le glucose et le mannitol ont été jugés appropriés pour des niveaux optimaux de production de cellulase (Sethi *et al.*, 2013).

Les sources des carbones tels que le glucose, le saccharose, les fructoses, maltose, cellulose, lactose, mannitol et sorbitol étaient incorporé individuellement dans le milieu au taux de 1% et Les bactéries ont été cultivées individuellement pendant 48h.

La bactérie, *B.altitudinis* a produit le montant le plus élevé ( $5,48 \pm \pm 0,25$  U/ml) de cellulase dans le milieu complété avec fructose, alors que la quantité d'enzyme la plus faible ( $0,96 \pm 0,21$ u/ml) production a été enregistré au milieu fourni au maltose. la capacité de production de cellulase par *B. Licheniformis* était plus ( $2.71 \pm 0,18$  U/ml) à la CMC m'a fourni (Sreeja *et al.*, 2013).



**Figure 14.** Production de cellulase de *B. altitudinis* et *B. licheniformis* dans les médias complétés par différents Sources de carbone entiers (Sreeja *et al.*, 2013).

### 3.2.4 Effets de sources d'azote sur la production d'enzymes.

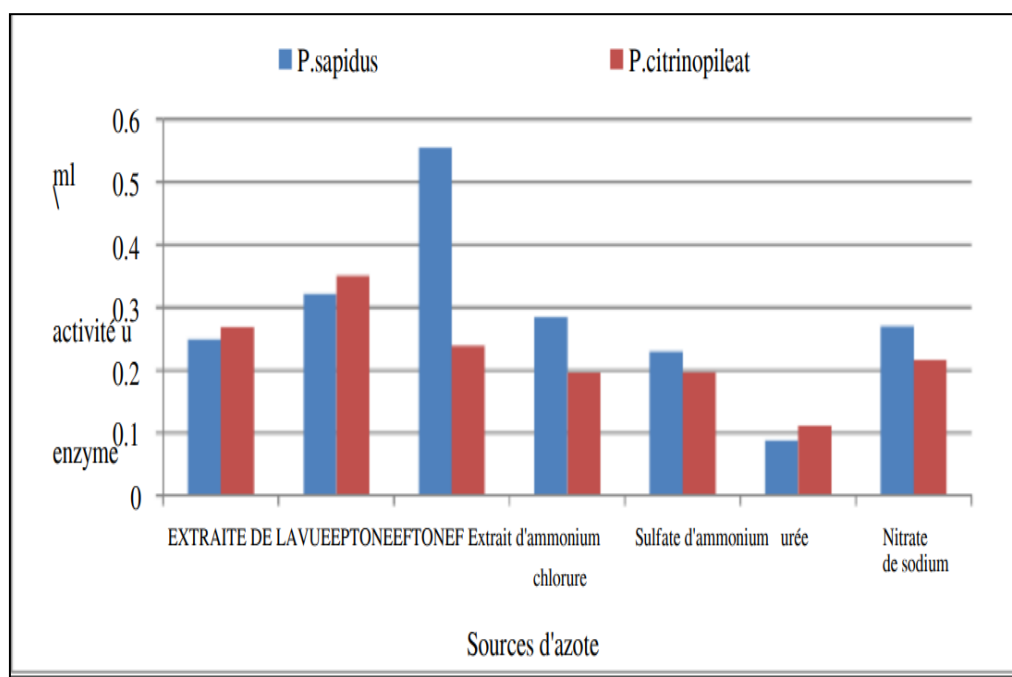
L'effet de différentes sources d'azote sur le production d'enzyme de cellulase par *A. niger* et *Trichoderma* sp. a été étudiée. Les sources d'azote testées ont été testées de 0,5 à 3,0% (W/V) peptone, extrait de bœuf, extrait de levure, nitrate d'ammonium et nitrate de sodium .

Parmi des sources d'azote, le la plus haute production de cellulase (exoglucanase (1,78 u/ml), endoglucanase (1,44 u/ml), et  $\beta$ -glucoside (1.97 U/ml)) a été signalé à partir de 1% de peptone et de production a diminué de manière significative ci-dessous et au-dessus de cette concentration par *A. niger*. Peptone a produit une cellulase maximale suivie de extrait de nitrate d'ammonium et d'extrait de bœuf tandis que l'extrait de levure et le nitrate de sodium produisaient presque la même, moindre, quantité de cellulase par *A. niger* tandis que les sources d'azote ont été marquées sur l'enzyme produite par *Trichoderma* sp.

Les activités d'enzymes maximales ont été obtenues avec extrait de levure (1%) qui provoquent une amélioration de tous les trois composants cellulase, y compris l'exoglucanase (2.40 U/ml), endoglucanase (2.28 U/ml), et  $\beta$ -glucosidase (1,99 U/ml).

Lorsque la peptone produit également la deuxième source d'azote produisant la plus cellulase de *Trichoderma* sp. Il a été signalé qu'un bon rendement en cellulase peut être obtenu avec un composé d'ammonium comme source d'azote. Bien que l'ajout de sources d'azote organiques telles que l'extrait de bœuf et la peptone a entraîné une croissance accrue et une enzyme (Gautam *et al.*, 2011).

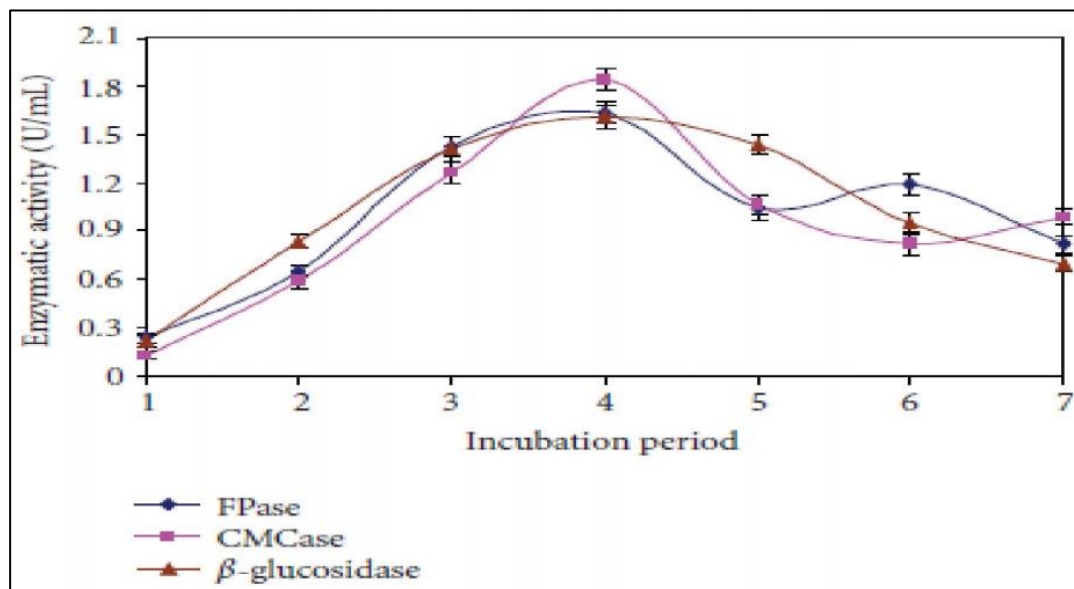
La cellulase a été montrée sensible à la répression par différentes sources de glucides et d'azote. L'effet des sources d'azote ont été étudiées dans le milieu de croissance, où la peptone a été remplacée par un sulfate d'ammonium, une urée et un extrait de levure. Parmi les différentes sources d'azote testées, le sulfate d'ammonium a été constaté comme la meilleure source d'azote pour la production de cellulase L'azote est l'une des principales protéines cellulaires et la stimulation de l'activité de la cellulase par le sel d'ammonium du sulfate peut être due à leur entrée directe dans la synthèse des protéines (Fig.15) (Elsebaay *et al.*, 2018).



**Figure 15.** Effet de source d'azote sur l'enzyme cellulase produite par les *pleuréatus trains* (Elsebaay *et al.*, 2018)

### 3.2.5 Effet de la période d'incubation sur la production d'enzyme

La période d'incubation est directement liée à la production d'enzyme et d'autres métaboliques dans une certaine mesure. La cinétique de production de cellulases par une souche d'*Aspergillus niger* pendant 7 jours d'incubation est montrée sur la (Fig.16) (Gautam *et al.*, 2011).



**Figure 16.** Cinétique de la production d'enzyme en (U/ml) par *Aspergillus niger* (Gautam *et al.*, 2011).

### 3.2.6 Effets de résidus de déchets solides municipaux dans Production d'enzyme

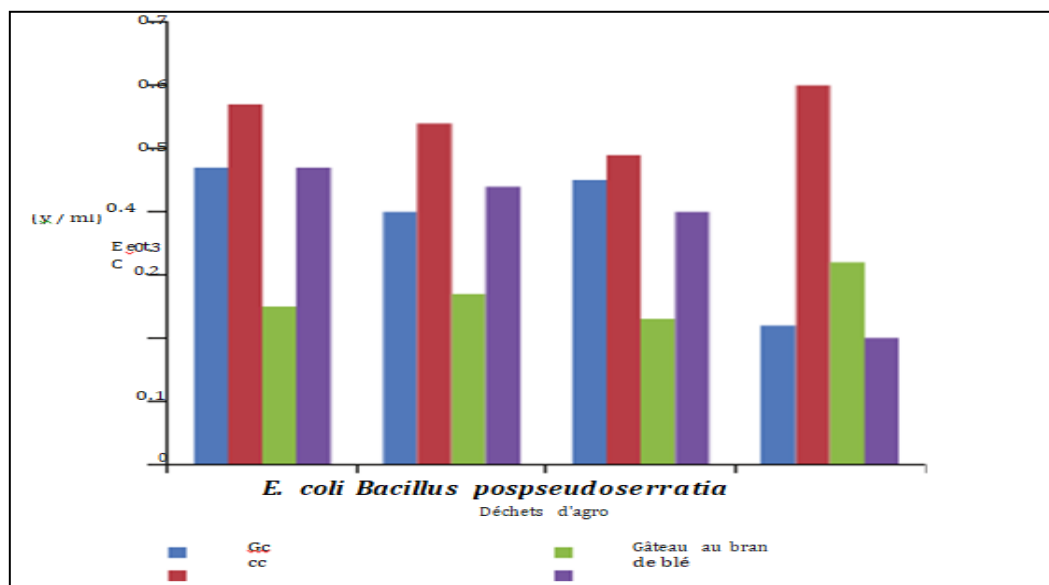
Dans la présente enquête, solide municipal Les résidus de déchets ont été utilisés comme source de carbone bon marché et facilement disponible pour la production d'enzymes cellulase.

Les résultats ont révélé que le résidu MSW (4%) était le meilleur substrat de carbone pour Exoglucanase (1.19 U/ML), endoglucanase (1.504 U/ML) et β-glucosidase (1.39 u/ml) par *A. niger*, alors que dans le cas de *Trichoderma sp.* 4% MSW le résidu a été le meilleur pour la cellulase (Exoglucanase (1.77 U/ML), endoglucanase (1,95 U/ml) et β-glucosidase (1.66 u/ml)) Production d'enzymes.

Ces résultats ont été confirmés par les résultats de .Cette variation peut être attribuée à la nature chimique et à la disponibilité des éléments nutritifs des substrats utilisés. (Gautam *et al.*, 2011).

Les sous-produits à base de substrat alternatif sur la production cellulaire bactérienne sous la fermentation ont été étudiés par plusieurs travailleurs.

Dans la cette étude, le gâteau à la noix de coco était le meilleur inducteur de la production d'enzymes cellulase par tous isolats bactérienne est montrée sur la (Fig.17) (Sethi *et al.*, 2013).



**Figure 17.** Effet des sources de déchets agroalimentaires (Sethi *et al.*, 2013).

L'activité enzymatique de la cellulase de *Bacillus subtilis* était optimale à 50°C. Cependant, le résultat était similaire à celui rapporté précédemment (Murashima *et al.*, 2002)

### 3.2.7 Effet d'inhibiteurs et d'autres réactifs sur la production d'enzyme

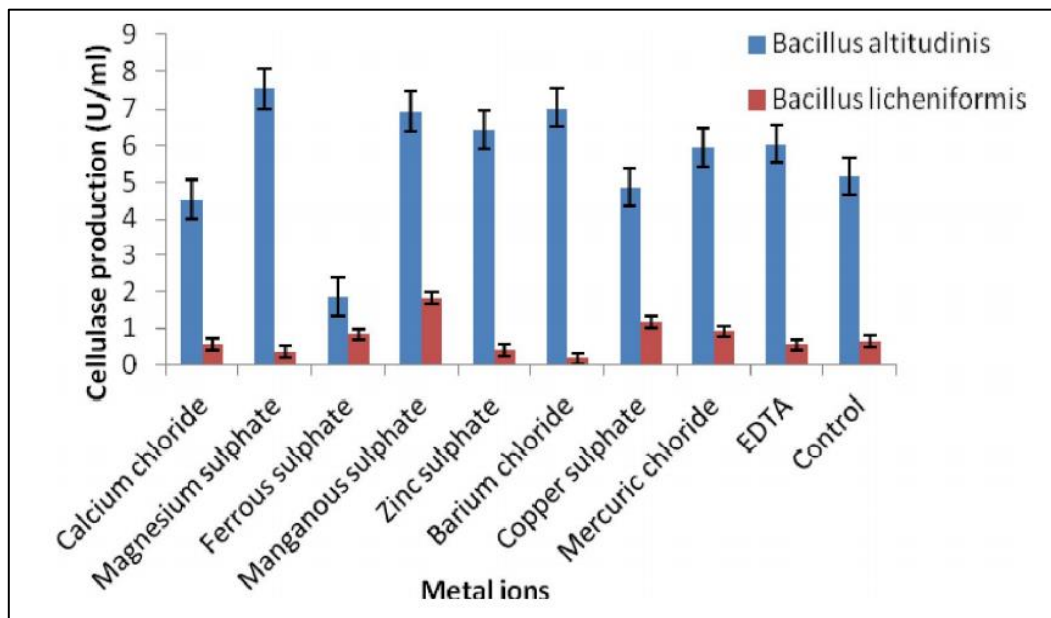
10 mM SDS, IAA, inhibition du PCMB environ 95, 67, 44% de l'activité enzymatique, tandis que 10 mm  $\beta$ -me et DTT a activé son activité. étant donné que l'IAA et la PCMB peuvent se lier avec le groupe SH avec une interaction différente de degré et inhiber ultérieurement l'activité, si l'oxydation ou l'agrégation de ces protéines enzymatiques se produit pendant la purification et le stockage. Ces phénomènes ont suggéré que le site actif de l'enzyme contient -Sh groupe (Yin *et al.*, 2010).

### 3.2.8 Effet des ions métalliques sur la production d'enzyme

La plupart des ions métalliques (K au  $\text{NH}_4^+$ ) N'a pas affecté l'activité, tandis que  $\text{CO}_2^+$  et  $\text{Mn}_2^+$  grandement activé la cellulase purifiée. Cependant,  $\text{CD}_2^+$ ,  $\text{Fe}_2^+$  et  $\text{HG}_2^+$  inactivé

l'activité de cellulase purifiée. Ce phénomène a également confirmé que le site actif de la cellulase purifiée contenait SH group. Ces résultats sont presque similaires à ceux de *Catharanthus rostrus* (Yin *et al.*, 2010).

Parmi les ions métalliques testés, la quantité maximale de production d'enzyme a été enregistrée par *B.altitudinis* dans un milieu au sulfate de magnésium ( $7,52 \pm 0,37$  U/ml). Elle était au maximum de  $1,80 \pm 0,42$  U/ml dans un milieu contenant le sulfate manganéux inoculé par *B. licheniformis*. Cependant, la quantité minimale de production de cellulase a été induite par le sulfate ferreux et le chlorure de baryum dans des milieuxensemencés respectivement par *B. altitudinis* et *B. licheniformis* est montrée sur la (Fig.18) (Sreeja *et al.*, 2013) .



**Figure 18.** Effet des sels métalliques des surfactants sur la production de cellulase par *B. altitudinis* et *B. licheniformis* (Sreeja *et al.*, 2013).

### 3.2.9 Effet de la Spécificité du substrat sur la production d'enzyme

Spécificité du substrat L'enzyme purifiée a montré une activité la plus élevée contre la CMC. Il n'y avait presque aucune capacité d'hydrolyse contre les substrats cristallins d'avicel, de fibre de coton, de papier filtre, de xylan ou de p-npg. C'est donc, en conséquence, la cellulase purifiée est une endo-1,4-glucanase (Yin *et al.*, 2010).



### 3.3 Discussion

Les bactéries productrices de cellulase ont été isolées du sol et identifiées comme *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* et *Serratia marcescens*.

L'optimisation du milieu de fermentation pour une production maximale de cellulase a été effectuée. Les conditions de la culture comme le pH, la température, les sources de carbone et les sources d'azote ont été optimisés.

Les conditions optimales trouvées pour la production de cellulase étaient de 40°C au pH 10 avec du glucose comme source de carbone et sulfate d'ammonium comme source d'azote et le gâteau de cocotique stimule la production de cellulase. Parmi les bactéries, *Pseudomonas fluorescens* est le meilleur producteur de cellulase parmi les quatre suivis de *Bacillus subtilis*, *E. coli* et *Serratia marcescens* (Sethi *et al.*, 2013).

*Bacillus subtilis*, était une bactérie cellulotique thermophile puissante. L'activité enzymatique de la cellulase de *B. subtilis* était optimale à pH 7,2 à 50°C et à une concentration de substrat de 1% de CMC. La dégradation enzymatique potentielle des déchets cellulotiques par les enzymes cellulases thermotolérantes a été suggérée comme une alternative faisable pour la conversion des lignocellulosiques en sucres fermentables et en éthanol carburant (Acharya *et al.*, 2012).

*Bacillus subtilis* YJ1 pourrait utiliser des déchets naturels tels que le bran de riz que substrat pour la croissance et produire des niveaux élevés de cellulase. Par conséquent, cette cellulase a été purifiée à une homogénéité électrophoretique par précipitations de sulfate d'ammonium, échangeur d'ions de la macro-préparation et chromatographie bio-gel P-100.

La cellulase produite a été considérée comme endoglucanase et profite fortement à l'application industrielle.

L'optimisation supplémentaire de la production d'échelle commerciale pour la cellulase utilisant cette souche est en cours actuellement (Yin *et al.*, 2010).

L'optimisation des conditions de production de la cellulase décrite ci-dessus utilisait une incubation fixe de 120 heures pour le SSF. L'effet de l'extension de cette durée de culture de 5 à 7 jours a donc été examiné. Cette fermentation prolongée de la production de cellulase de  $18,53 \pm 0,19$  à  $26,10 \pm 3,09$  UPF/g.

Les durées de fermentation plus longues n'ont pas été explorées car elles ont été jugées commercialement insignifiantes.

La durée de la période d'incubation est une préoccupation majeure pour le développement d'un processus commercial de production de cellulase et 7 jours peuvent ne pas être viables. Diverses études ont montré que la production maximale de cellulase à partir de *T. reesei* pouvait être atteinte dans un délai de 72 à 96 heures, l'optimum étant atteint à 72 heures avec la bagasse de manioc, le son de blé ou la paille de riz.

De même, la production maximale de cellulase à partir de marc de pomme (2,3 FPU/g) a été obtenue après 120 heures.

La période prolongée de production de cellulase est peut-être due aux caractéristiques de ce substrat de déchets solides municipaux, qui contient des composés toxiques et des substrats provenant de diverses ressources carbonées. Par rapport aux substrats homogènes, les cellules fongiques ont eu besoin d'un temps plus long pour se développer et exprimer les enzymes de la cellulase.

En conclusion, les résultats obtenus ici montrent que la SSF utilisant les DSM comme substrat pourrait représenter une méthode économique pour la production d'enzyme cellulase avec de faibles coûts opérationnels, car les DSM sont une matière première bon marché et abondante (Abdullah et al., 2016).

L'activité de la cellulase a été affectée par le pH et la température perturbe du mélange réactionnel. Il a été observé que la condition optimale de l'activité d'enzymes par *Streptomyces* C188 était pH 6-6,5 et 50°C en accord avec celle rapportée par d'autres enquêteurs (Figueira *et al.*, 2005). Cependant, une température optimale légèrement supérieurs.

Pour l'activité de la cellulase par *S. malaysiensis* (Naissance *et al.*, 2009) et *Streptomyces* sp.J12 (Jaradat *et al.*, 2008) et une température optimale inférieure de *S. ruber* (El-Sersy *et al.*, 2010)

Dans le cas du pH optimal, un pH plus acide (pH 4 et 4.9) a été observé pour l'activité de la cellulase par *S. malaysiensis* et *S. viridobunneus* (Da Vinha *et al.*, 2011).

En outre, plus large La gamme de pH optimum (entre 5,5 et 7,5) a été rapportée pour l'activité de la cellulase par *S. reticuli* (Wachinger *et al.*, 1998).

La variation du pH et de la température optimales pour l'activité de la cellulase peut être due à la différence entre les types de souches du producteur. L'enzyme de cellulase est modérément thermostable (jusqu'à 55°C). Comparativement, sa stabilité thermique optimale était légèrement supérieure à celle produite par *S. viridobrunneus* et plus basse que celle produite par *Mucor circinelloides*. En ce qui concerne l'effet du pH sur la stabilité de l'enzyme, le pH optimal (6,5) était similaire à celui produit par *Bacillus subtilis* YJ1 (Yin *et al.*, 2010).

Ainsi un isolat de *Streptomyces* productrices haute cellulase, identifiée comme *S. longispororubeuse*, a été isolée de l'Arabie saoudite et sa productivité enzymatique a été améliorée en modifiant les conditions nutritionnelles et le pH du milieu de fermentation. L'enzyme de cellulase produite de 42KDA et son activité enzymatique maximale a été obtenue à 50°C et pH 6,5, tandis que la stabilité maximale était à 55°C et pH 6-6,5 (Yin *et al.*, 2010).

La capacité de dégrader la cellulose est un personnage distribué parmi une grande variété d'aérobies, facultatif aérobie, Bactéries anaérobies et champignons. Dans la présente étude, deux différents microbes cellulolytiques tels que *B. altitudinis* et *B. licheniformis* ont été isolés et identifiés de l'intestin d'un poisson *E. suratensis*.

De nombreux efforts ont été pris pour générer des microorganismes avec une capacité élevée à produire de la cellulase qui peut dégrader la cellulose indigène (Aristidou *et al.*, 2000).

Il a été rapporté que, les facteurs physico-chimiques influencent la croissance des organismes et de la production de cellulase (Lokhande *et al.*, 2017).

Deux souches bactériennes cellulolytiques ont été isolées de l'intestin d'une étropole de poisson 4 et ils étaient identifiés comme *Bacillus altitudinis* et *Bacillus licheniformis*.

La capacité de production de cellulase des souches candidates a été optimisée à travers certains paramètres nutritionnels tels que les sources de carbone, les sources d'azote, les sources de phosphate, les tensioactifs et les ions métalliques. Dans les souches testées, le fructose et la CMC ont induit une production maximale de cellulase parmi diverses sources de carbone testées.

Parmi les sources d'azote testées, le carbonate d'ammonium et le carbonate d'hydrogène et la production de cellulase améliorée de sulfate d'ammonium a un maximum d'étendue de *Bacillus altitudinis* et de *Bacillus licheniformis*, respectivement.

De même, la production de cellulase était maximale dans dihydrogène sodique ortho phosphate par les deux souches.

Dans les ions métalliques testés, une quantité maximale d'enzyme La production a été enregistrée au sulfate de magnésium et aux supports administrés par le sulfate manganoux par *B. altitudinis* et *B. licheniformis*, respectivement (Sreeja *et al.*, 2013).

# **Conclusion**

## Conclusion

L'objectif de notre travail était d'optimiser la production des cellulases par des isolats bactériens producteurs de cellulase pour un meilleur rendement enzymatique.

Parmi les bactéries productrices de cellulase ont été isolées du sol et identifiées comme *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* et *Serratia marcescens* et *Streptomyces* C188, L'optimisation du milieu de fermentation pour une production maximale de cellulase a été effectuée. Les conditions de la culture comme le pH, la température, les sources de carbone et les sources d'azote ont été optimisés.

Les travaux étudiés dans ce mémoire ont montré l'importance de l'optimisation des conditions de croissance de la souche pour une meilleure production de cellulases. Une production optimale de cellulases est obtenue à la température 40°C. Pour la souche *Bacillus* sp CDB27 (3.4 U/ml) et à pH 5 pour la souche *Bacillus* sp CDB30 (5,4 U/ml). Une bonne production de cellulases est observée dans le milieu incorporé à l'extrait de levure suivi de peptone, comme source d'azote, et la cellobiose ainsi que le saccharose comme source de carbone. Le maltose induit le moins d'activité cellulase parmi les sources de carbone utilisées. L'extrait de levure et la peptone sont des sources d'azote organiques riche en vitamines favorisant ainsi la croissance de la bactérie et ainsi la production de cellulases.

La meilleure activité sur le cellobiose et le saccharose indique que les cellulases produites sont des glucosidases. On parle à *Pseudomonas* sp et *Bacillus* sp.

Une concentration de substrat CMC de 1% donne la meilleure production de cellulases par la souche *Bacillus* sp CDB27.

Parmi les ions métalliques testés, la quantité maximale de production d'enzyme a été enregistrée par *B.altitudinis* dans un milieu au sulfate de magnésium ( $7,52 \pm 0,37$  U/ml). Elle était au maximum de  $1,80 \pm 0,42$  U/ml dans un milieu contenant le sulfate manganeux inoculé par *B. licheniformis*.

Pour l'effet de période d'incubation les résultats indiquent que la production optimale d'enzyme observée dans les premiers jours. Pouvait être atteinte dans un délai de 72 à 96 h, l'optimum étant atteint à 72 heures avec la bagasse de manioc, le son de blé ou la paille de riz. Ces périodes conviennent d'un point de vue économique.

# **Références bibliographiques**

**Références bibliographiques**

- Abdullah, J. J., Greetham, D., Pensupa, N., Tucker, G. A., & Du, C. (2016). Optimizing cellulase production from municipal solid waste (MSW) using solid state fermentation (SSF). *Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications*, 6(3), 1-10 .
- Acharya, A., Joshi, D., Shrestha, K., & Bhatta, D. (2012). Isolation and screening of thermophilic cellulolytic bacteria from compost piles. *The Scientific World Journal*, 10(10), 43-46 .
- Ariffin, H., Abdullah, N., Umi Kalsom, M., Shirai, Y., & Hassan, M. (2006). Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. *International Journal of Technology and Engineering Studies*, 3(1), 47-53 .
- Aristidou, A., & Penttilä, M. (2000). Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Current opinion in biotechnology*, 11(2), 187-198 .
- Aruoma, O., Halliwell, B., Gajewski, E., & Dizdaroglu, M. (1989). Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. *Journal of Biological Chemistry*, 264(34), 20509-20512 .
- Assamoi, A. A., Destain, J., & Thonart, P. (2000). (9Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- $\beta$ -1, 4-xylanases de moisissures: le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(2), 281-294 .
- Aziza, M. A. (2010). Perspectives de développement de la bioénergie en Algérie. *Bulletin des Energies Renouvelables*(17).
- Barnoud, F. (1980). *Penetrometre Statique. Demande De Brevet Europeen*(0032648).
- Bayer, E. A., Kenig, R., & Lamed, R. (1983). Adherence of *Clostridium thermocellum* to cellulose. *Journal of bacteriology*, 156(2), 818-827. doi:10.1128/jb.156.2.818-827.1983
- Bousseboua, H. (2002). Eléments de microbiologie générale .
- Buchholz, K. (1983). Rapp, P., Zadrzil, F.(1983). *Methods of enzymatic analysis*, 2, 178-180 .
- Cho, H.-T., & Kende, H. (1997). Expansins and internodal growth of deepwater rice. *Plant Physiology*, 113(4), 1145-1151 .
- Clementi, A. (1922). La désamidation enzymatique de l'asparagine chez les différentes espèces animales et la signification physiologique de sa présence dans l'organisme. *Archives Internationales de Physiologie*, 19(4), 369-398 .



- Combo, A. M. M., Aguedo, M., & Paquot, M. (2011). Les oligosaccharides pectiques: production et applications possibles. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 15(1), 1.164-53.
- Davinha, F. N. M., Gravina-Oliveira, M. P., Franco, M. N., Macrae, A., da Silva Bon, E. P., Nascimento, R. P., & Coelho, R. R. R. (2011). Cellulase production by *Streptomyces viridobrunneus* SCPE-09 using lignocellulosic biomass as inducer substrate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(3), 256-267 .
- Deguchi, S., Tsujii, K., & Horikoshi, K. (2006). Cooking cellulose in hot and compressed water. *Chemical Communications*(31), 3293-3295.
- Deka, D., Das, S. P., Sahoo, N., Das, D., Jawed, M., Goyal, D., & Goyal, A. (2013). Enhanced cellulase production from *Bacillus subtilis* by optimizing physical parameters for bioethanol production. *International Scholarly Research Notices*, 2013 .
- Ekström, P., Sanyal, S., Narfström, K., Chader, G., & van Veen ,T. (1988). Accumulation of glial fibrillary acidic protein in Müller radial glia during retinal degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*, 29(9), 1363-1371 .
- El-Sersy, N. A., Abd-Elnaby, H., Abou-Elela, G. M., Ibrahim, H. A., & El-Toukhy ,N. M. (2010). Optimization, economization and characterization of cellulase produced by marine *Streptomyces ruber*. *African Journal of Biotechnology*, 9(38), 6355-6364 .
- Eloutassi, N., Louaste, B., Boudine, L., & Remmal, A. (2014). Valorisation de la biomasse lignocellulosique pour la production de bioéthanol de deuxième génération. *Revue des Energies Renouvelables*, 17(4), 600-609 .
- Elsebaay, A., Abuadma, M. A., & Ramadan, M. (2018). Analyzing The Effect of Motor Loads and Introducing a Method for Selection of Electric Generator Power Rating. *Paper presented at the 2018 Twentieth International Middle East Power Systems Conference*.
- Enache, M., & Kamekura, M. (2010). Hydrolytic enzymes of halophilic microorganisms and their economic values. *Romanian Journal of Biochemistry*, 47(1), 46-59 .
- Fengel, D., & Wegener, G. (1984). Wood: chemistry, ultrastructure. *Reactions*, 613, 1960-1982 .
- Figueira, E. M. d. A. P., Gusmão Lima, A. I., & Pereira, S. I. A. (2005). Cadmium tolerance plasticity in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae: glutathione as a detoxifying agent. *Canadian journal of microbiology*, 51(1), 7-14 .
- Gao, J., Weng, H., Zhu, D., Yuan, M., Guan, F., & Xi, Y. (2008). Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus*

- terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. *Bioresource technology*, 99(16), 7623-7629 .
- Gaur, R., Tiwari, S., Rai, P., & Srivastava, V. (2015). Isolation, production, and characterization of thermotolerant xylanase from solvent tolerant *Bacillus vallismortis* RSPP-15. *International Journal of Polymer Science*, 2015 .
- Gautam, S., Bundela, P., Pandey, A., Khan, J., Awasthi, M., & Sarsaiya, S. (2011). Optimization for the production of cellulase enzyme from municipal solid waste residue by two novel cellulolytic fungi. *Biotechnology research international*, 2011 .
- Ibrahim, A. S. S., & El-diwany, A. I. (2007). Isolation and identification of new cellulases producing thermophilic bacteria from an Egyptian hot spring and some properties of the crude enzyme. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1(4), 473-478 .
- Jaradat, O. K., Al-Omari, A., & Momani, S. (2008). Existence of the mild solution for fractional semilinear initial value problems. *Nonlinear Analysis: Theory, Methods & Applications*, 69(9), 3153-3159 .
- Kader, A. J., Omar, O., & Feng, L. S. (1999). Isolation of cellulolytic fungi from the Bario Highlands, Sarawak. *Asean review of Biodiversity and Environmental Conservation* .
- Koike, H., Misu, K.-i., Ikeda, S.-i., Ando, Y., Nakazato, M., Ando, E., Japan, S. G. f. H. N. i. (2002). Type I (transthyretin Met30) familial amyloid polyneuropathy in Japan: early- vs late-onset form. *Archives of neurology*, 59(11), 1771-1776 .
- Kolpak, F., & Blackwell, J. (1976). Determination of the structure of cellulose II. *Macromolecules*, 9(2), 273-278 .
- Korish, M. (2003). *Production, Purification, Properties and Application of the Cellulases from a Wild type Strain of a Yeast isolate* .
- Kuhad, R. C., Singh, A., & Eriksson, K.-E. L. (1997). Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. *Biotechnology in the pulp and paper industry*, 45-125 .
- Lemos, M. A., Teixeira, J., Domingues, M., Mota, M., & Gama, F. (2003). The enhancement of the cellulolytic activity of cellobiohydrolase I and endoglucanase by the addition of cellulose binding domains derived from *Trichoderma reesei*. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(1), 35-40 .
- Linton, S. M., & Greenaway, P. (2004). Presence and properties of cellulase and hemicellulase enzymes of the gecarcinid land crabs *Gecarcoidea natalis* and *Discoplax hirtipes*. *Journal of experimental biology*, 207(23), 4095-4104 .

- Lokhande, S., & Pethe, A. (2017). Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production. *International Journal of Life Sciences*, 5, 277-282 .
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(577-506).
- Marcos Mirande, J. (2009). Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). *Cladistics*, 25(6), 574-613 .
- McCaig, A. E., Grayston, S. J., Prosser, J. I., & Glover, L. A. (2001). Impact of cultivation on characterisation of species composition of soil bacterial communities. *Federation of European Microbiological Societies*, 35(1), 37-48 .
- Min, B., Kim, J., Oh, S., Regan, J. M., & Logan, B. E. (2005). Electricity generation from swine wastewater using microbial fuel cells. *Water research* .4968-4961 ,(20)39 ,
- Mouranche, A., & Costes, C. (2002). Pascal and Francis Bibliographic Databases .
- Murashima, K., Nishimura, T., Nakamura, Y., Koga, J., Moriya, T., Sumida, N., Kono, T. (2002). Purification and characterization of new endo-1, 4-β-D-glucanases from *Rhizopus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(3), 319-326 .
- Odier, E., & Rouau, X., X. (1985). Les cellulases et les enzymes de depolymerisation de la lignine. In *Hydrolases et depolymerases. Enzymes d'interet industriel*. Paris (france): Gauthier-Villars.
- Okieimen, F. E., Pavithran, C., & Bakare, I. O. (2005). Epoxidation and hydroxlation of rubber seed oil: one-pot multi-step reactions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107(5), 330-336 .
- Oyekola, O. O. (2003). *The enzymology of sludge solubilisation under biosulphidogenic conditions: isolation, characterisation and partial purification of endoglucanases*. Rhodes University ,
- Paillet, F. (2013). Cross-borehole flow profiling delineating subsurface flow paths within a geophysically defined aquifer framework. *The Leading Edge*, 32(7), 758-765 .
- Perry, J. J., Stanley, J. T., Lory, S., & Grandadam, M. (2004). *Microbiologie: cours et questions de révision*: Dunod.
- Ray, A. K., Bairagi, A., Ghosh, K. S., & Sen, S. K. (2007) Optimization of fermentation conditions for cellulase production by *Bacillus subtilis* CY5 and *Bacillus circulans* TP3 isolated from fish gut. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 1(37), 47-53 .

- Roberts, K. G., Morin, R. D., Zhang, J., Hirst, M., Zhao, Y., Su, X., Harvey, R. C. (2012). Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Cancer cell*, 22(2), 153-166 .
- Sadhu, S., & Maiti, T. K. (2013). Cellulase production by bacteria: a review. *Microbiology Research Journal International*, 235-258 .
- Schneider-Poetsch, H. A., Braun, B., Marx, S., & Schaumburg, A. (1991). Phytochromes and bacterial sensor proteins are related by structural and functional homologies Hypothesis on phytochrome-mediated signal-transduction. *Federation of European Biochemical Societies letters*, 281(1-2), 245-249 .
- Schomburg, D., & Salzmann, M. (1991). Enzyme handbook. In *Enzyme Handbook* (pp. 1-1175): Springer.
- Scriban, R., & Arnaud, A. (1993). *Biotechnologie:Entièrement refondue, actualisée et augmentée* :Technique & Documentation-Lavoisier.
- Sederberg, P. B., Kahana, M. J., Howard, M. W., Donner, E. J., & Madsen, J. R. (2003). Theta and gamma oscillations during encoding predict subsequent recall. *Journal of Neuroscience*, 23(34), 10809-10814 .
- Sethi, S., Datta, A., Gupta, B. L., & Gupta, S. (2013). Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil. *International Scholarly Research Notices*, 2013 .
- Shaikh, N. M., Patel, A., Mehta, S., & Patel, N. (2013). Isolation and Screening of Cellulolytic Bacteria Inhabiting Different Environment and Optimization of Cellulase Production. *Universal Journal of Environmental Research & Technology*, 3(1) .
- Sikyta, B. (1983). Development of microbial process. *Microbial Culture Methods*, 250-274 .
- Soni, R., Sandhu, D., & Soni, S. (1999). Localisation and optimisation of cellulase production in *Chaetomium erraticum*. *Journal of biotechnology*, 73(1), 43-51 .
- Sreeja, S., Jeba, M., Sharmila, J., Steffi, T., Immanuel, G., & Palavesam, A. (2013). Optimization of cellulase production by *Bacillus altitudinis* APS MSU and *Bacillus licheniformis* APS2 MSU, gut isolates of fish *Etroplus suratensis*. *International Journal of Advanced Biotechnology Research*, 2(4), 401-406 .
- Strub, C. (2008). *Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez Saccharothrix algeriensis* .
- Tchunden, J. (1990). Cellulolyse Anaérobie Mésophile: étude de l'amélioration de la production de cellulases par *Cl. cellulolyticum* ATCC 35319. *Université Henri Poincaré-Nancy* .

- Vidaud, C. (1984). *Contribution à l'étude de l'induction du système cellulosique de Trichoderma sp. par utilisation d'analogues de substrat thiosaccharidiques* .
- Wachinger, M., Kleinschmidt, A., Winder, D., von Pechmann, N., Ludvigsen, A., Neumann, M., Brack-Werner, R. (1998). Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. *Journal of General Virology*, 79(4), 731-740 .
- Yassien, M. A.-M., Jiman-Fatani, A. A. M., & Asfour, H. Z. (2014). Production, purification and characterization of cellulase from *Streptomyces* sp. *African Journal of Microbiology Research*, 8(4), 348-354 .
- Yin, L.-J., Huang, P.-S., & Lin, H.-H. (2010). Isolation of cellulase-producing bacteria and characterization of the cellulase from the isolated bacterium *Cellulomonas* sp. YJ5. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(17), 9833-9837 .
- Zelenina, D., Kulaeva, O., Smirnyagina, E., Solovyev, A., Miroshnichenko, N., Fedorkin, O., Atabekov, J. (1992). Translation enhancing properties of the 5-leader of potato virus X genomic RNA. *Federation of European Biochemical Societies letters*, 296(3), 267-270 .

## ملخص

تركز هذه الدراسة على تحسين العزلات البكتيرية المنتجة للسليولاز من أجل إنتاج إنزيم أفضل. تم عزل البكتيريا المهيمنة للسليولوز من التربة وتم التعرف عليها على أنها *Serratia marcescens* و *E. coli* ، *Bacillus subtilis* ، *Pseudomonas fluorescens* و *Streptomyces C188*. تم إجراء تحسين وسط التخمر لتحقيق أقصى إنتاج للسليولاز. للسلاطات البكتيرية. كانت الظروف المثلى لإنتاج السليولاز هي 30 درجة مئوية عند درجة الحموضة 5 ، والسيلوببوز والسكروز كأفضل مصدر للكربون و خلاصة الخميرة كأفضل مصدر للنيتروجين. يتم الحصول على إنتاج عالي من السليولاز على (CMC) بتركيز 1% خلال الأيام الأولى من الحضانة (72 ساعة). قد يكون الاختلاف في درجة الحموضة ودرجة الحرارة المثلى لنشاط السليولاز بسبب الاختلاف بين أنواع سلالة المنتج

## Résumé

Cette étude porte sur l'optimisation des isolats bactériens producteurs de cellulases pour un meilleur rendement enzymatique. Des bactéries dégradant la cellulose ont été isolées du sol et identifiées comme *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* et *Serratia marcescens* et *Streptomyces C188*. L'optimisation du milieu de fermentation pour une production maximale de cellulase a été effectuée. Pour les souches bactériennes, les conditions optimales trouvées pour la production de cellulase étaient de 30°C à pH 5, la cellobiose et le saccharose comme meilleure source de carbone et l'extrait de levure comme meilleur source d'azote. Une production élevée de cellulase est obtenue sur (CMC) à la concentration 1% pendant les premiers jours d'incubation (72 heure). La variation du pH et de la température optimales pour l'activité de la cellulase peut être due à la différence entre les types de souches du producteur.

**Mots clés:** *Bacillus* sp, production de cellulase, pH, optimisation, enzyme.

## Abstract

This study focuses on the optimization of cellulase-producing bacterial isolates for better enzyme yield. Cellulose degrading bacteria were isolated from soil and identified as *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* and *Serratia Marcescens* and *Streptomyces C188*, Optimization of fermentation medium for maximum cellulase production was performed. For bacterial strains. The optimal conditions found for cellulase production were 30°C at pH 5, cellobiose and sucrose as the best carbon source and yeast extract as the best nitrogen source. High cellulase production was obtained on (CMC) at 1% concentration during the first days of incubation (72 hours). The variation of optimal pH and temperature for cellulase activity may be due to the difference between the types of producer strains .

**Key words:** *Bacillus* sp, Cellulase production, pH, optimization, enzyme.