



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 / 2024

MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté et soutenu par :
Gagui Asma

Le : lundi 10 juin 2024

Optimisation de la production de cellulases par différents microorganismes

Jury :

Dr. Dendouga Wassila	MCA	Université Biskra	Président
Dr. Hebal Hakim	MCA	Université Biskra	Rapporteur
Dr. Widad BOUGUENOUN	MCB	Université Biskra	Examineur

Année universitaire : 2023 - 2024

Remerciements

*En premier lieu, je remercie Allah qui m'a donné le courage, la patience et
la volonté
pour réaliser ce modeste travail.*

Je remercie mon promoteur Mr Hebal

*Mes remerciements chaleureux aux membres de jury, c'est pour moi le grand
honneur*

*Enfin je tiens à exprimer mes vifs remerciements à mes enseignants, mes
collègues d'étude et toutes les personnes qui m'ont aidé ne serait-ce qu'avec un
mot d'encouragement.*

Dédicace

Je dédie ce modeste a travail a mes chers parents

Mes frères et soeurs

A tout ma famille

Mes amies que je l'aime

Table des matières

Remerciments
Dédicace

Liste des tableaux.....	I
Liste des figures.....	II
Liste des Abréviations.....	III
Introduction.....	1

Première partie : Partie bibliographique

Chapitre 1. Matières lignocellulosiques

1.1 Cellulose.....	3
1.2 Hémicellulose.....	3
1.3 Lignine	4
1.4 Enzymes lignocellulosique	5
2 Cellulases	6
2.1 Nomenclature	6
2.2 Généralités.....	7
2.3 Enzymes cellulolytiques.....	7
2.3.1 Endoglucanase ou Glucanohydrolase (EC 3.2.1.4).....	7
2.3.2 Exoglucanase ou Cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91).....	7
2.3.3 β -glucosidase (EC 3.2.1.21).....	8
2.4 Structure	8
2.5 Mécanismes d'action.....	9
2.6 Sources	9
2.7 Applications	10
3 Substrats pour la production des Cellulases :	12
3.1 Techniques de culture :	12
3.2 Composants de milieu de culture pour la production de cellulases	13
3.3 paramètres physique pour la production de cellulases	13

3.4	Approches biotechnologiques pour la production de cellulases	13
-----	--	----

Deuxième partie : Partie expérimentale

Chapitre 3. Matériel et méthodes

4	Collecte des échantillons.....	15
4.1	Prélevement d'échantillons	15
4.2	Isolement	16
4.3	Sélection	16
4.3.1	Sur milieu solide.....	16
4.3.2	Sur milieu liquide.....	18
4.4	Mesure de l'activité enzymatique	19
4.5	Optimisation de la production de cellulases produites par des souches microbiennes... ..	20
4.5.1	Effet de PH.....	20
4.5.2	Effet de période d'incubation.....	20
4.5.3	Effet des sources de carbone et d'azote sur production de cellulase.....	20
4.5.4	Effet de la température.....	20
4.5.5	Effet de la concentration d'inoculum.....	21

chapitre 4. Résultats et discussion

22

5.1	Isolement	22
5.2	Sélection sur un milieu liquide et solide	23
5.2.1	Sur milieu solide.....	23
5.2.2	Sur milieu liquide.....	25
5.3	Mesure de l'activité enzymatique	25
5.4	Optimisation de la production de cellulases.....	27
5.4.1	Effet de pH.....	23
5.4.2	Effet de période d'incubation.....	27
5.4.3	Effet des sources de carbone et d'azote sur production de cellulase.....	28
5.4.4	Effet de la temperature.....	30
5.4.5	Effet de la concentration d'inoculum.....	31

Conclusion.....	34
-----------------	----

Références bibliographiques	35
-----------------------------------	----

Résumé

Liste des tableaux

Tableau 1. Domaines d'application de cellulase dans l'industrie	11
Tableau 2. Sites d'échantillons de l'étude.....	15
Tableau 3. Elements nutritifs et la méthode.....	17
Tableau 4. Différentes méthodes utilisée dans la sélection dans un milieu liquide	18
Tableau 5. Méthode de mesure de l'activité enzymatique.....	19
Tableau 6. Test de dépistage de la cellulase sur des isolats thermophiles.....	23
Tableau 7. optimisation de pH.....	27

Liste des figures

Figure 1. Structure de cellulose	3
Figure 2. Principales unités structurelles de l'hémicellulose	4
Figure 3. Structure de la Lignine.	5
Figure 4. Enzymes lignocellulolytiques différentes sont classées en fonction de leurs systèmes enzymatiques.....	6
Figure 5. Organigramme de la production d'enzymes avec la méthode SmF conventionnelle comparée à la méthode SSC.....	12
Figure 6. Test congo	25
Figure 7. Synthèse de cellulose par des souches bactériennes isolées.	26
Figure 8. Effet de la période d'incubation.....	28
Figure 9. L'influence des différentes sources de carbone sur la production de cellulase chez les souches <i>Pantoea dispersa</i> MLTBY6 (MT646430.1), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MLTBM2 (MT646431.1), <i>Pseudomonas monteilii</i> MLTBC10 (MT674682.1), <i>Bacillus subtilis</i> MLTBC5 (MT674681.1) et <i>Lysinibacillus fusiformis</i> MLTBB7	29
Figure 10. Effet de la source d'azote sur les souches <i>Pantoea dispersa</i> MLTBY6 (MT646430.1); <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MLTBM2 (MT646431.1); <i>Pseudomonas monteilii</i> MLTBC10 (MT674682.1); <i>Bacillus subtilis</i> MLTBC5 (MT674681.1) and <i>Lysinibacillus fusiformis</i> MLTBB7	30
Figure 11. Effet de la temperature sur l'ctivité du cellulose.	31
Figure 12. Influence de concentration d'inoculum	32

Liste des Abréviations

CMC: Carboxyméthylcellulose

DNS: 3,5- acide dinitro salicylique.

EC : Enzyme commission.

p/v : Masse par volume.

rpm : Rotation par minute.

U/I : Unité internationale

Introduction

Introduction

Lignocellulosique biomasse, qui est principalement obtenue à partir de déchets agricoles et de déchets forestiers, est une ressource organique abondante et abordable dans la nature. De plus, est un élément essentiel de la production de biocarburants et d'autres produits bioraffinés dans le processus de bioraffinage (Liu, 2019). Pour la production de biocarburants, la décomposition de la biomasse lignocellulosique en sucres fermenticibles est une méthode efficace de hydrolyse cellulaire (Limayem et Ricke, 2012). Toutefois, le coût élevé de la production de cellulase est l'un des problèmes majeurs rencontrés par le développement de biocarburants renouvelables dans la production industrielle (Muhammed et Hafiz, 2020).

La cellulose est le principal composant de la paroi cellulaire des plantes vertes et elle est également sécrétée par une variété de microbes, y compris des algues, des champignons, des bactéries et des oomycètes. Parce que la cellulose est composée de nombreux atomes de carbone, d'hydrogène et d'oxygène, elle est classée comme un composé organique. Les cellules ont des caractéristiques telles que leur insolubilité dans les principaux solvants organiques et l'eau, leur absence de goût et d'odeur et leur capacité à être biodégradable (Pramanik, 2021).

Les trois enzymes de cellulose sont endoglucanase, exoglucanase et glucosidase, qui fonctionnent en synergie pour l'hydrolyse de la cellulose. C'est pourquoi la cellulase est une enzyme industriellement importante, car elle représente environ 20% du marché mondial des enzymes (Singh, 2021).

Dans divers secteurs tels que l'industrie textile (biostoning, biopolissage et blanchiment du denim), l'application d'enzymes cellulolytiques est en augmentation (Singh, 2019) industrie du papier (traitement de la pâte et désencrage), santé (remplacement des antibiotiques par *Pseudomonas* pour produire des biofilms) (Lavanya, 2011) l'industrie des aliments et des boissons (transformation et clarification des jus de fruits), la biotechnologie (production de bioéthanol et valorisation de fruits transformés) biomasse lignocellulosique) agents de lavage et détergents (Singh, 2019; Bhati, 2021).

Selon de nombreux chercheurs, les bactéries aérobies et anaérobies (Singhania, 2017) (Kumar, 2019), fungi, et actinomycètes (Shida, 2016; Kumar, 2019; Ramesh, 2020) sont bon

pour produire des cellulases . Ces microbes présentent une décomposition enzymatique efficace et sécrètent des cellulases libres ou liées à la surface cellulaire. Les bactéries sont les dégradeurs de cellulose les plus efficaces parmi les différents types de microbes car elles se développent rapidement et ont une activité synergique cellulase élevée (Muhammed et Hafiz, 2020).

Il est donc crucial de chercher de nouvelles cellulases présentant des caractéristiques intéressantes sur le plan industriel. De nombreux efforts ont été déployés ces dernières années pour sélectionner des microorganismes cellulolytiques et utiliser des mutations génétiques pour créer des souches hyper productives (Marques, 2018) . Le pH, la température, la taille de l'inoculum, le type de cellulose, l'aération, le temps d'incubation et les inducteurs sont tous des facteurs qui affectent leurs rendements en cellulase (Kognou, 2022).

Le présent travail, qui représente une synthèse des articles scientifiques, dont leur objectif est l'exploitation des microbes isolés des différents milieux dans la sécrétion des cellulases.

Le travail est composé de deux parties : la première est purement bibliographique, elle comporte deux chapitres dont le premier est matières lignocellulosiques et le second chapitre porte comme titre production de cellulases. La deuxième est expérimentale consacré au matériel utilisée et méthode suivies, un autre chapitre qui explique les différents résultats obtenus et en fin on a terminé par une conclusion générale.

Partie Bibliographique

Chapitre 1

Matières lignocellulosiques

1.1 Cellulose

Le polymère d'origine naturelle le plus abondant sur Terre est la cellulose. La photosynthèse est un processus biochimique qui produit principalement cette macromolécule. Il produit environ 1011 à 1012 tonnes par an. Les molécules qui composent la cellulose sont fibrilles présentes dans toutes les espèces végétales dans des proportions très variables. Le bois (résineux ou feuillus) contient entre 40 et 50 % de cellulose en masse sèche, tandis que les fibres de coton contiennent entre 85 et 95 % (Krassig et Schurz, 2002). Les parois cellulaires des végétaux sont soutenues et protégées par les fibrilles cellulosiques. Une bactérie biosynthétise également ce polysaccharide selon un processus différent. On De plus, certaines algues contiennent de la cellulose sous une forme très cristalline (Le Roux, 2003 ; Fischer, 2006).

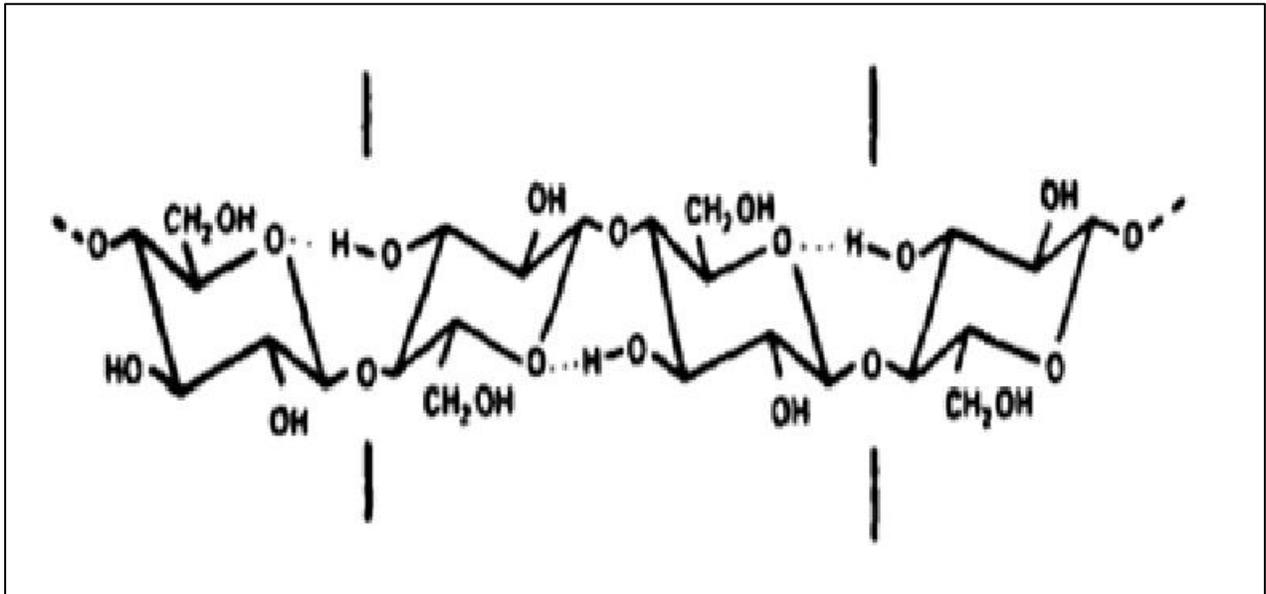


Figure 1. Structure de cellulose (Atia, 2014)

1.2 Hémicellulose

L'hémicellulose, le deuxième polysaccharide le plus abondant dans les plantes, représente 20 à 35 % du poids total des parois cellulaires végétales.

L'hémicellulose est un polysaccharide polyphasé à faible poids moléculaire composé d'unités de sucre C-6 et C-5. De nombreux types d'hémicellulose ont une structure complexe et une chaîne moléculaire courte.

En fonction de leurs différences structurales, les hémicelluloses sont généralement classées en xylanes, mannanes, b-glucanes et xyloglucanes (Guoshuai et *al.*, 2023).

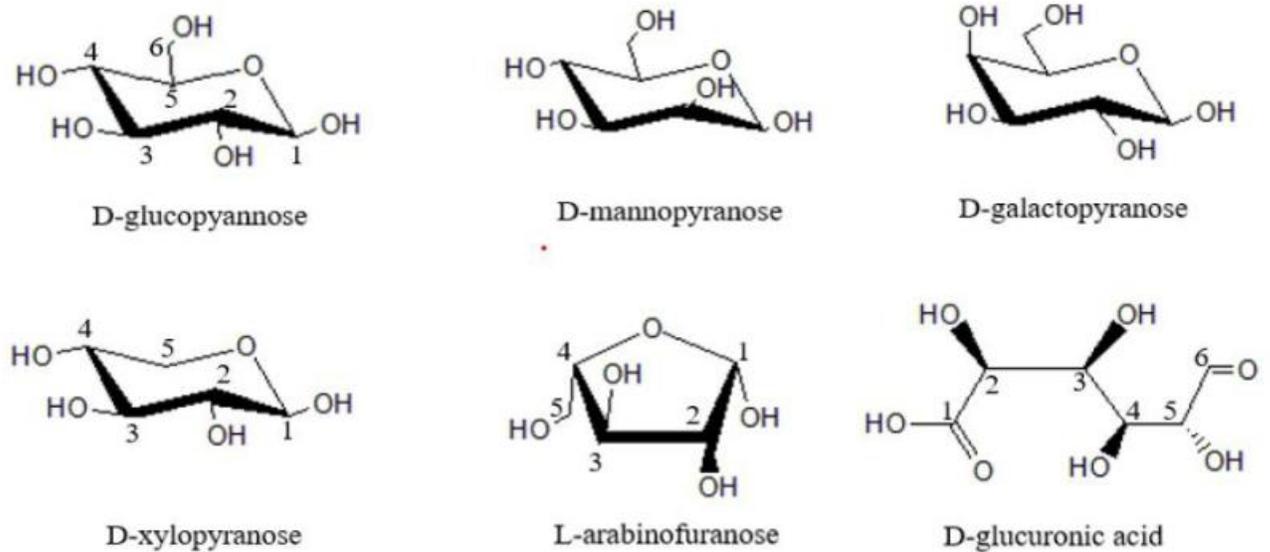


Figure 2. Principales unités structurales de l'hémicellulose (Guoshuai et *al.*, 2023)

1.3 Lignine

La lignine est un biopolymère naturel provenant de la biomasse lignocellulosique qui contient principalement les unités G, S et H, qui sont liées par des liaisons carbone-carbone et éther. (Boerjan et *al.*, 2003 ; Tran et *al.*, 2021 ; Abu-omar et *al.*, 2023).

Lorsque l'acide cinnamique est créé, il est converti en trois monomères d'alcools : p-coumaryl, coniferyl et sinapyl.

Des processus oxydases et peroxydases comme l'acide caféique O méthyltransférase, l'alcool cinnamylique déshydrogénase et la férulate 5-hydroxylase. Le contenu et la structure de la lignine dans les graminées et les bois (résineux et feuillus) diffèrent considérablement en raison de diverses enzymes biosynthétiques (jing, 2023).

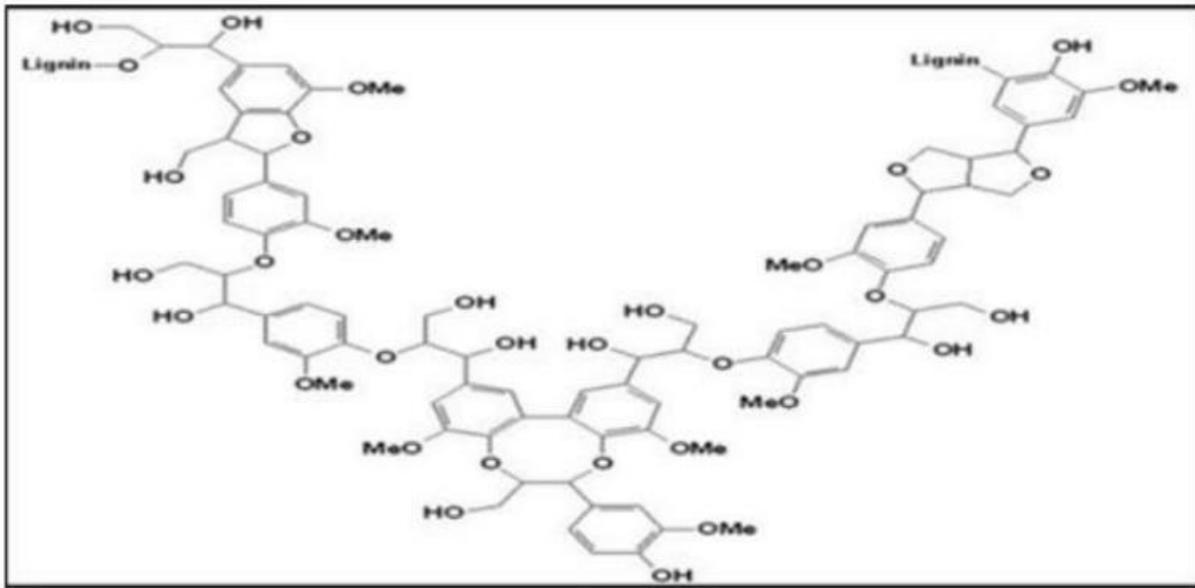


Figure 3. Structure de la Lignine (Paillet, 2013).

1.4 Enzymes lignocellulosique :

Les enzymes lignocellulolytiques sont des biocatalyseurs qui décomposent la lignine et la cellulose des matériaux en leurs composants afin qu'ils puissent être hydrolysés plus tard pour produire des produits utiles. Toutes les enzymes connues sont classées dans l'une des six classes principales suivantes : ligases, isomérases, hydrolases, lyases, transférases et oxydoréductases (Lehninger et *al.*, 2004).

Les enzymes hydrolytiques font partie de la classe des hydrolases, tandis que les enzymes ligninolytiques font partie des oxydoréductases. (Singh et *al.*, 2019).

Mais la production d'enzymes bactériennes lignocellulolytiques présente les caractéristiques suivantes : Les bactéries sont capables d'avoir des complexes multi-enzymes et se développent plus rapidement que leurs homologues fongiques sont capables d'avoir des complexes multi-enzymes qui possèdent des fonctionnalités accrues et sont plus spécifiques, et peuvent gérer beaucoup plus rapidement que leurs homologues fongiques, sont capables d'avoir des complexes multi-enzymes qui possèdent des fonctionnalités accrues et sont plus spécifiques, et peuvent gérer beaucoup plus rapidement que leurs homologues fongiques (Chukwuma et *al.*, 2020).

Sur la base de leurs systèmes enzymatiques, les enzymes lignocellulolytiques sont soit ligninolytiques, soit hydrolytiques (Chukwuma et *al.*,2020).

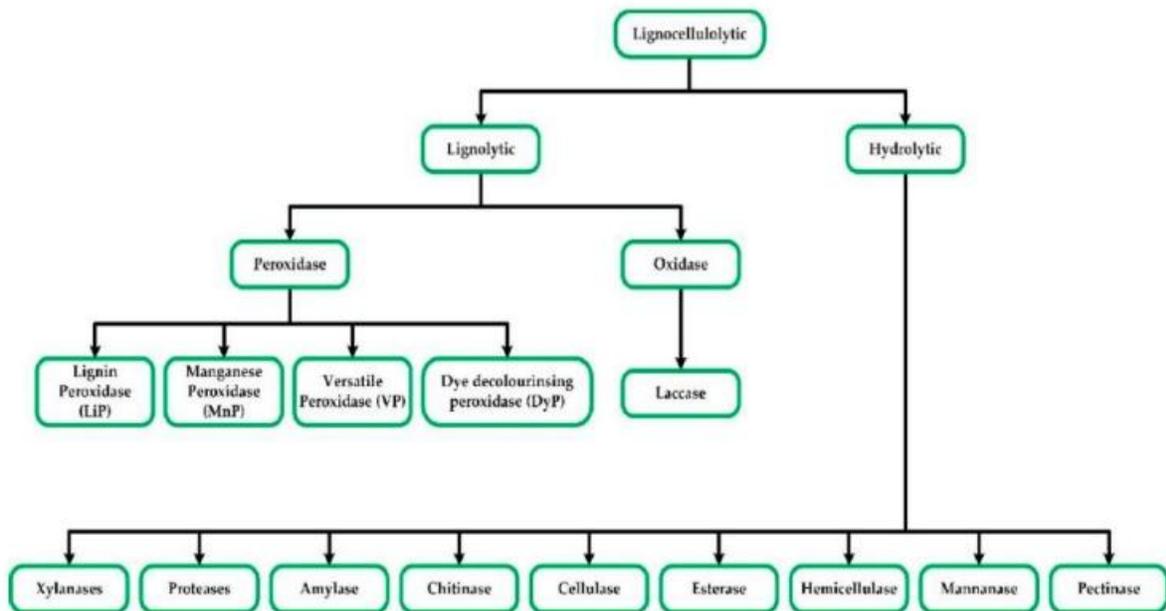


Figure 4. Des enzymes lignocellulolytiques différentes sont classées en fonction de leurs systèmes enzymatiques (Chukwuma et *al.*,2020).

2 Cellulases

2.1 Nomenclature

Nom codifié : EC. 3.2.1.4

Nom systématique : 1,4 - (1,3 ; 1,4) - beta-D - Glucan4 –glucanohydrolase

Nom recommandé : Cellulase

Synonymes : Endoglucanase, Endo-1,4-β-Glucanase, Cellulase carboxyméthylrique, β-1,4-endoglucanhydrolase, Celludextrinase, Avicelase, ect. (Schamburg et Salzman, 1991).

2.2 Généralités

Les cellulases [1,4-(1,3 ; 1,4)- β -D-Glucanohydrolase] se rapportent à un groupe d'enzymes qui, agissant ensemble, hydrolysent la cellulose en sucres simples (Kader et al.,1999; Korish, 2003). Elle est l'une des principaux membres de la famille des glycosideshydrolases. C'est un système enzymatique complexe, composé de trois types principaux d'enzymes: Endo β (1-4)-glucanase ou endocellulase (EC 3.2.1.4), Exo β (1-4)- glucanase ou cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91), β (1-4)-glucosidase ou cellobiase (EC 3.2.1.21) (Annamalai et al.,2016).

2.3 Enzymes cellulolytiques

L'hydrolyse enzymatique totale de la matière cellulosique nécessite divers types de cellulases, à savoir les endoglucanases, les cellobiohydrolases et les β -glucosidases .

2.3.1 Endoglucanase ou Glucanohydrolase (EC 3.2.1.4)

Ces enzymes, les endoglucanases, hydrolysent de manière aléatoire les parties amorphes de la cellulose, principalement les chaînes de surface des microfibrilles, ce qui génère des oligosaccharides de différentes tailles, ainsi que de nouvelles extrémités de chaînes. Il est important de noter que ces enzymes n'agissent pas sur la cellulose cristalline, mais elles sont efficaces sur la carboxyméthylcellulose (CMC), qui est une forme soluble de la cellulose. Les endoglucanases sont parfois également appelées CMCases (Bayer et al.,1998).

2.3.2 Exoglucanase 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).

2.3.3 β -glucosidase (EC 3.2.1.21)

Ces enzymes sont impliquées dans l'hydrolyse des oligosaccharides courts, tels que le cellobiose et le glucose, ce qui réduit l'inhibition de la production des cellobiohydrolases (Linton et Greenaway , 2004).

La complémentarité de leurs actions est essentielle pour l'hydrolyse complète de la cellulose. Le complexe enzymatique de la cellulase fonctionne en synergie, ce qui signifie que les trois enzymes interagissent entre elles, et les produits de réaction enzymatique sont utilisés comme substrats pour d'autres réactions (Gao et *al.*, 2008).

Il existe quatre formes de synergie décrites :

1. Synergie endo-exo entre les endoglucanases et les exoglucanases (Lemos et *al.*, 2003).
2. Synergie exo-exo entre les exoglucanases qui agissent aux extrémités réductrices des chaînes de cellulose et celles qui agissent aux extrémités non-réductrices.
3. Synergie entre les exoglucanases et les β -glucosidases, ce qui permet l'hydrolyse du cellobiose, un produit final caractérisé par son pouvoir d'inhibition important des cellobiohydrolases.
4. Synergie intramoléculaire entre les domaines catalytiques et les domaines de liaison à la cellulose (CBM) (Lynd et *al.*, 2002).

2.4 Structure

Il est produit par des actinomycètes, des protozoaires, des plantes, des champignons, des bactéries et des animaux. La base de données Enzymes Carbohydrate-Active contient des données sur les familles de glycosides hydrolases. Sur la base des similitudes de séquences d'acides aminés et de structures cristallines, les glycosides hydrolases, y compris la cellulase, ont été classées en 115 familles. Plusieurs gènes de cellulase ont été clonés et caractérisés. Ils appartiennent à 13 familles distinctes. Plus de cinquante cellulases sont également présentes dans des structures 3D. Les liaisons β -1,4-glycosidiques sont clivées par toutes les cellulases. Cependant, ils présentent une variété de topologies, allant de toutes les protéines de feuille à toutes les protéines hélicoïdales à tous les barils/protéines (Jayasekara, 2019).

2.5 Mécanismes d'action

Les modules catalytiques et non catalytiques sont présents dans la structure de la cellulase. En fonction de leurs séquences d'acides aminés et de leurs structures cristallines, les modules catalytiques des cellulases ont été classés en de nombreuses familles. Un module catalytique peut contenir des modules non catalytiques de liaison aux glucides (CBM) et/ou d'autres modules fonctionnellement connus ou inconnus à l'extrémité N ou C. La cellulase fongique et bactérienne ont généralement deux ou plus de domaines structurels et fonctionnels. Cette enzyme est produite par des micro-organismes aérobies et anaérobies. Par conséquent, les systèmes cellulaires non complexes et complexes sont les deux catégories. Les micro-organismes cellulolytiques aérobies produisent un système de cellulase non complexe qui est un mélange d'enzymes coopératives extracellulaires dans une unité (Jayasekara,2019).

Les cellulases sont catalytiques par deux processus. Ils sont simplement présentés comme des mécanismes de retenue et d'inversion. En utilisant une catalyse à base d'acide, les cellulases clivent les liaisons glucosidiques. Deux résidus catalytiques de l'enzyme, un acide général (donneur de protons) et un nucléophile/base, contribuent à l'hydrolyse. La position spatiale des résidus catalytiques détermine le mécanisme catalytique qui se produit. Les deux mécanismes qui hydrolysent la cellulose sont la rétention et l'inversion de la configuration anomérique de la cellulose. Même après une hydrolyse à double déplacement avec deux étapes clés de glycosylation ou de déglycosylation, les cellulases "de rétention" maintiennent la même configuration de C anomérique, transportant la liaison glucosidique cible.

Après une seule hydrolyse par déplacement nucléophile, les cellulases « inversées » inversent la configuration de la configuration anomérique C (Vocaldo et Davis,2008).

2.6 Sources

La cellulase n'est pas l'une des seules enzymes. Il s'agit d'un groupe d'enzymes principalement composé d'endoglucanases et d'exoglucanases, y compris les cellobiohydrolases et la glucosidase. On sait que les champignons, les bactéries et les actinomycètes produisent efficacement des enzyme cellulase dans l'environnement naturel. Ces micro-organismes sécrètent des cellulases liées à la surface cellulaire ou libres. La composition du complexe enzymatique et

l'efficacité de production d'enzymes diffèrent toujours. Les enzymes sont produites par des micro-organismes aérobies et anaérobies, mais les champignons cellulolytiques aérobies, tels que *Trichoderma viride* et *Treesei*, ont été largement étudiés (Jayasekara,2019).

2.7 Applications

Les cellulases ont joué un rôle essentiel en tant que biocatalyseurs pendant de nombreuses décennies. Ils ont démontré leur potentiel dans de nombreuses industries. Les principales industries utilisant des cellulases microbiennes sont le textile, le papier et la pâte à papier, la lessive et les détergents, l'agriculture, la médecine et l'alimentation humaine et animale. En 2017, l'industrie textile est le marché dominant des cellulases, selon Coherent Market Insights. Selon la majorité des rapports d'études de marché sur les enzymes publiés en 2018, les principaux marchés seraient les aliments et les boissons, l'industrie textile, l'alimentation animale et les biocarburants. domaines d'applications spécifiques (Kuhad et *al.*, 2011).

Tableau 1. Domaines d'application de cellulase dans l'industrie(Kuhad et *al.*, 2011)

Industrie	Application
Agriculture	création de protoplastes végétaux et fongiques; amélioration de la germination des graines et du système racinaire; augmentation de la croissance et de la floraison des plantes; augmentation de la qualité du sol ; diminuer la dépendance aux engrais minéraux.
Bioconversion	Production d'aliments pour animaux riches en énergie, conversion de matériaux cellulosiques en éthanol, amélioration de la qualité nutritionnelle de l'alimentation animale ; meilleure digestion et la conservation du fourrage de haute qualité.
Détergents	Les détergents à base de cellulase offrent une action de nettoyage supérieure sans endommager les fibres, éliminent la saleté et améliorent la luminosité des couleurs.
Fermentation	Amélioration du maltage et de l'écrasement des raisins, amélioration du pressage et de l'extraction des couleurs des raisins, amélioration de l'arôme des vins la fermentation primaire et la qualité de la bière, améliorer la filtrabilité et la viscosité du moût, améliorer la clarification de la production de vin, augmenter le taux de filtration et la stabilité du vin.
Pate et papier	Coadditive dans le blanchiment de la pulpe, la pulpe biomécanique, la réduction de la demande d'énergie et la réduction des besoins en chlore augmenter la luminosité des fibres, production de carton biodégradable, de serviettes en papier et de papier hygiénique ; amélioration du drainage des papeteries.

Chapitre 2

Production des cellulases

3 Substrats pour la production des Cellulases:

La fermentation à l'état solide (SSF) et la fermentation submergée (SmF) ont produit des cellulases fongiques. L'espèce fongique est cultivée en SSF sur un ou plusieurs substrats solides tels que la paille de riz, le son de blé, la balle de maïs, le tourteau de manioc ou la bagasse de canne à sucre, sans ou très faible teneur en eau. En revanche, dans le SMF, des micro-organismes sont cultivés à l'aide d'un liquide à écoulement libre comme la mélasse et/ou de bouillons contenant divers nutriments (Ahmed et Bibi, 2017).

Pour produire de la BC, la fermentation est effectuée en mode statique et agité ou remué. Avec le changement de mode, diverses formes de cellulose sont produites (Lahiri et al., 2021), Une pellicule réticulaire interconnectée tridimensionnelle a été observée dans des conditions statiques tandis que les conditions agitées et agitées produisaient une cellulose de forme irrégulière en forme de sphère particule (SCP) (Esa et al., 2014).

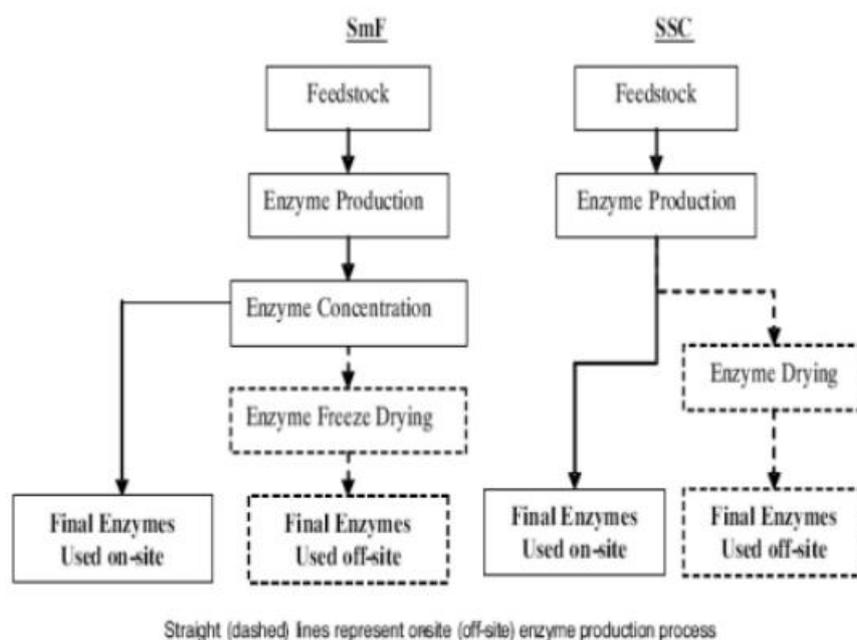


Figure 5. Organigramme de la production d'enzymes avec la méthode SmF conventionnelle comparée à la méthode SSC (Sadhu et Kanti M, 2013)

3.1 Techniques de culture :

L'élimination des granulés bruts impurs de BC, qui comprennent des substances métaboliques et des résidus de nutriments avec le BC, suit le mécanisme de fermentation.

Pour éliminer les cellules bactériennes, le BC peut être traité avec une solution alcaline à 1000° C pendant 15 à 20 minutes. Après cela, les pastilles sont lavées avec de l'eau distillée pour récupérer les pastilles BC et les valeurs de pH (Petersen et Gatenholm , 2011).

Le milieu de fermentation est incubé pendant 1 à 14 jours avec l'inoculum à un pH de 4 à 7 et à 28 à 30 ° C, jusqu'à ce que le récipient soit rempli de cellulose. La formation et l'aération appropriées dans la production de BC, le CO₂ contrôle l'activité métabolique. La culture agitée est plus coûteuse que la culture statique en raison de l'agitation continue, qui augmente le rendement de production (Islam et *al*, 2015).

3.2 Composants de milieu de culture pour la production de cellulases :

Les milieux de culture doivent contenir du carbone, de l'azote et d'autres micro et macronutriments nécessaires à la croissance des micro-organismes, et la proportion de ces composantes ont un impact direct ou indirect sur la formation du produit (Speretto et *al* ,2021).

Les facteurs de croissance, qui sont des composés organiques, sont également nécessaires aux micro-organismes, La présence d'autres éléments est cruciale pour la croissance idéale du micro-organisme car ils effectueront des fonctions importantes telles que la synthèse des protéines ou l'activation enzymatique comme les coenzymes (Tortora et *al* .,2012).

3.3 Paramètres physique pour la production de cellulases :

De plus, l'optimisation de paramètres tels que le pH et la température est cruciale pour la production d'enzymes car ces paramètres physico-chimiques affectent la croissance des micro-organismes, ce qui entraîne la production de bioactifs, le temps d'incubation ,En plus du temps considérable nécessaire pour effectuer de nombreuses expériences, l'OVAT est considéré comme une technique laborieuse, fastidieuse et trompeuse car ces paramètres sont indépendants et les OVAT ont tendance à ignorer les interactions entre eux (Ahmed et Bibi,2018).

3.4 Approches biotechnologiques pour la production de cellulases

La cellulose bactérienne, est un biopolymère polyvalent avec une efficacité antimicrobienne et antibiofilm, peut être utilisée avec succès dans des approches thérapeutiques. Outre sa biodégradabilité et sa biocompatibilité (Lahiri et *al* , 2021).

Un travail remarquable a été réalisé sur la production et la caractérisation des cellulases de différents champignons, et les études futures devraient se concentrer sur la manipulation de la recherche cellulase par le génie génétique et protéique pour améliorer l'efficacité de la dégradation et de la bioconversion de la biomasse. Une autre limite de la recherche sur la cellulose est l'utilisation des techniques statistiques pour optimiser la production de cellulase sur SmC et SSF à partir de champignons. De même, comprendre comment réguler la transcription de la cellulose et la dégradation des enzymes dans les biomasses est crucial pour créer les meilleures conditions de culture pour la production des meilleures enzymes (Ahmed et Bibi ,2018).

Partie Expérimentale

Chapitre 3

Matériel et méthodes

4 Collecte des échantillons

4.1 Prélèvement d'échantillons

Pour la détermination et optimisation de l'activité enzymatique de ce dernier les auteurs ont utilisé différents sites d'échantillonnage , dans le tableau ci-dessous nous avons pu regrouper le site et le nombre d'échantillons utilisés :

Tableau 2. les sites d'échantillons de l'étude

Références	La région d'étude	Le site	Nombre d'échantillons
Sharif et al.,(2023)	La source thermal de Tata pani	lacs	4
Subramaniam et al.,(2023)	Inde	terre de termitière	126
El-morsy et al.,(2023)	Le gouvernorat de damiette , Egypte	Déchets municipaux , sol et déchets d'herbivores	12
Mokale k et al.,(2022)	Université de Manitoba (Congo)	sol	6
Lingouangou et al.,(2022)	Brazaville (congo)	sol	5
Sathyapriya et al.,(2022)	Tamilnadu district de Sivagangai	sol	24
Bhati et al.,(2023)	Inde	sol	581

Ojeda et al.,(2022)	Venezuela	Université de Carabobo	1
Khadka et al.,(2022)	Pokhara (Nepal)	Eau de source	1
Sahrawat et Garg P.,(2022)	Meruut (Inde)	Rizière	1
Baltaci,(2022)	Turque	Les abattoirs de rumen de Erzurum	17
Bhagat et Kokitkar,(2021)	Maharashtra (Inde)	sol	7
Li et al .,(2021)	China	Isoleé a partir d'un microorganisme	1
Abdullah et al.,(2021)	(Pakistan)	Profondeur du sol	1
Karnataka et al.,(2023)	Inde	Sol du campus de (NIIST)	1

4.2 Isolement

La plupart des auteurs ont utilisé la méthode de dilution pour isoler les microorganismes, (El-morsy et al .,2023) , (Sathyapriya et al .,2022) , (Bhati et al.,2023) , (Sahrawat et Garg P,2022) , (Baltaci,2022) , (Bhagat et Kokitkar,2021) et (Abdullah et al.,2021).

La méthode est comme suit Des dilutions en série des échantillons de sol ont été préparées en utilisant 0,85 % une solution saline et les dilutions les plus élevées ont été étalées sur le crible.

Le milieu composé de carboxyméthylcellulose (CMC) (0,5%), NaNO₃ (0,1 %), K₂HPO₄ (0,1 %), KCl (0,1 %), MgSO₄ (0,05 %), extrait de levure (0,05 %) et agar agar (2,0 %) (Bhagat et Kokiktar,2021).

4.3 Sélection

4.3.1 Sur milieu solide

Les auteurs qui ont utilisées le milieux carboxymethylcellulose (CMC) sont : (Sharif et al.,2023), (Subramaniam et al.,2023) , (El-morsy et al .,2023) , (Sathyapriya et al .,2022) (Bhati et al.,2023), , (Baltaci,2022) et (Bhagat et Kokitkar,2021) a l'exception De (Mokale k et al.,2022) et (Khadka et al.,2022).

Après la méthode de dilution

Le milieu contient les éléments suivants :

Tableau 3.éléments nutritifs et la méthode

Auteurs	Composant du milieu	Méthode
Sharif et al.,(2023)	LB agar (1% CMC)	LB agar avec 1% CMC incubé 70°C pendant 24 heures .
Subramaniam et al.,(2023)	CMC agar fraîche	Dilué et incubé dans nutrient agar media a 37°C pendant 48h . et transmet dans CMC agar.
El-morsy et al .,(2023)	CMC agar	Après des series de dilution ils ont transferées dans CMC agar et incubé a50°C pendant 10 jours .
Sathyapriya et al .,(2022)	CMC media (: cellulose 1%, K ₂ HPO ₄ 0.2%, MgSO ₄ 0.03%, peptone 1%, (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.2%) pH a 7	Après l'agar est solidifiée ils ont incubé a 37°C pendant 24h.
Bhati et al.,(2023)	1% w/v CMC	Après la solidification de l'agar incubation 35°C pendant 48h.
Baltaci.,(2022)	carboxymethyl cellulose (CMC) – Bushnell Haas medium (BHM) agar (10 g/L CMC, 1 g/L K ₂ HPO ₄ , 1 g/L KH ₂ PO ₄ , 0.2 g/L MgSO ₄ ·7H ₂ O, 1 g/L NH ₄ NO ₃ , 0.05 g/L FeCl ₃ ·6H ₂ O, 0.02 g/L CaCl ₂ , and 20 g/L agar).	Après la dilution de échantillons ces derniers transmis dans deux mileux de culture BHM et CMC agar ,incubation fait a 35°C pendant 48h.
Bhagat et Kokitkar.,(2021)	(CMC) (0.5%), NaNO ₃ (0.1%), K ₂ HPO ₄ (0.1%), KCl (0.1%), MgSO ₄ (0.05%), yeast extract (0.05%), and agar agar (2.0%)	Les échantillons sont dilués a 0.85% est placeés dans les milieux de culture , incubation a 37°C pendant 48h .

4.3.2 Sur milieu liquide

Cette sélection est basée sur la mesure de l'activité cellulase (CMCase) du surnageant d'une culture sur milieu liquide.

Le milieu utilisé pour produire de la cellulase contient 0,5 g de glucose (g/L), 0,75 g de peptone, 0,01 g de FeSO₄, 0,5 g de KH₂PO₄ et 0,5 g de MgSO₄. Un flacon de 50 millilitres a été utilisé pour extraire dix millilitres du milieu. Les flacons contenant le milieu ont été autoclavés pendant 15 minutes à 121 ° C. Après refroidissement, une culture bactérienne cultivée pendant la nuit a été ajoutée. Le milieuensemencé a été incubé pendant 24 heures au four à 37 degrés Celsius. Après la fin de la période de fermentation, le milieu de culture a été centrifugé pendant 20 minutes à 6 000 rpm pour obtenir l'extrait brut, qui a servi d'enzyme (Lingouangou et al.,2022).

Tableau 4.les différentes méthodes utilisée dans la sélection dans un milieu liquide

L'Auteur	Méthode
Sharif et al.,(2023)	Environ 100 µl de cultures fraîchement développées ont été transférées dans des tubes de bouillon LB et placées pendant 24 heures à 70°C. 1 millilitre de milieu de croissance a ensuite été centrifugé pendant 10 minutes à 8 000 tr/min et à 4 °C. Le catalyseur brut a été utilisé dans la couche supérieure de l'échantillon.
Subramaniam et al.,(2023)	Les isolats choisis ont été inoculés dans un bouillon de méthylcellulose Carboxy et ont été incubés dans un shaker pendant 72 heures à 37 degrés Celsius. La culture est centrifugée à 6000 xg pendant 15 minutes pour obtenir des surnageants acellulaires.
Sathyapriya et al .,(2022)	culture contenant (g/L) 1 g de carboxyméthylcellulose (CMC), 0,75 g de peptone, 0,01 g de FeSO ₄ , 0,5 g de KH ₂ PO ₄ , 0,5 g de MgSO ₄ et incubé à 37 °C pendant 24 heures. même milieu de production et incubé à 37°C pendant 48 heures sous agitation constante à 130 tr/min à l'aide d'un agitateur incubateur, le milieu de production incubé a ensuite été centrifugé pendant 10 minutes à 4°C à 10 000 tr/min

Khadka et al.,(2022)	Culture contient CMC comme seul carbone source. La composition du milieu était de 10 g/L de CMC, 2 g/L tryptone, 4 g/L KH ₂ PO ₄ , 4 g/L Na ₂ HPO ₄ , 0,2 g/L MgSO ₄ .7H ₂ O, 0,001 g/L CaCl ₂ •2H ₂ O, 0,004 g/L FeSO ₄ •7H ₂ O, et pH 7,0 [24]. Le milieu de production inoculé a été cultivé à 60°C et 100 rpm pendant 24 heures, le bouillon de culture a ensuite été centrifugé à 5000 rpm à 4°C pendant 10min.
Bhagat et Kokitkar.,(2021)	un milieu liquide contenant 1 % de CMC, 0,1 % de NaNO ₃ , 0,1 % de K ₂ HPO ₄ , 0,1 % de KCl, 0,05 % de MgSO ₄ et 0,05 % d'extrait de levure (pH 7,0) et incubé à 37 °C pendant 24 heures. le milieu a été centrifugé à 10 000 rpm pendant 10 minutes.

4.4 Mesure de l'activité enzymatique

Tous les auteurs ont suivis la méthode de (Miller,1959) pour déterminer les sucres réducteurs de CMase, a l'exception de (Ojeda et al.,2022) qui a utilisé la méthode de (Noguera et al., 2019).

Tableau 5.méthode de mesure de l'activité enzymatique

L'auteur	Méthode	Principe de la méthode
Sharif et al.,(2023), El-morsy et al .,(2023) Mokalek et al.,(2022) Lingouangou et al.,(2022) Sathyapriya et al .,(2022) Bhati et al.,(2023) Subramaniam et al.,(2023) Khadka et al.,(2022) Sahrawat et Garg P.,(2022) Baltaci.,(2022)	Méthode de Miller	L'activité cellulase a été déterminée en mesurant la quantité de sucres réducteurs libérés à partir d'une solution 1% (p/v) de carboxymethyl cellulose (CMC) ou d'avicel suivant la méthode au DNS (L'acide3,5-dinitrosalicylique).

Bhagat et Kokitkar.,(2021) Li et al.,(2021)		
Ojeda et al.,(2022)	Noguera-Machado et al	effectué pour déterminer le glucose libre dans une solution de 0,25 % de cellulose dans 100 mM de tampon phosphate (pH = 7).

4.5 Optimisation de la production de cellulases produites par des souches microbiennes

4.5.1 Effet de pH

L'effet du pH sur la production d'enzymes a été étudié en cultivant les isolats dans un milieu de production ajusté à différents pH de (5.0, 6.0, 7.0, 9.0) Le pH des milieux a été ajusté en utilisant 0.1 HCL and 0.1 NaoH (Sahrawat et Garg , 2022).

4.5.2 Effet de période d'incubation

L'effet de la période d'incubation sur la production d'enzymes a été déterminé en incubant le milieu de fermentation pendant 5 jours . le taux de production a été mesuré à des intervalles de 24h (Mokale et al.,2022) .

4.5.3 Effet des sources de carbone et d'azote sur production de cellulase

Les microorganismes isolées de sol sont inoculée dans un milieu qui contient 0.5 % tant que amidon ,glucose , sucrose, galactose, fructose, mannose et nitrogen sources a concentration de 0.5% tant que peptone, yeast extract et ammonium sulphate et urea (Lingouangou et al.,2022).

4.5.4 Effet de la température

L'effet de la température sur la production d'enzymes a été réalisé en incubant le milieu de production à des températures de 4°C, 10°C, 28°C, 37°C et 50°C (Bhagat et Kokitkar, 2021).

4.5.5 Effet de la concentration d'inoculum

L'effets des concentrations d'inoculum sur la production d'enzymes a été analysée en ajoutant des concentrations de (0.5-2.5% v/v) au milieu de production (Bhati et *al.*.,2023).

Chapitre 4

Résultats et discussion

5 Resultants et discussion

5.1 Isolement

Echantillon 1

Huit espèces cellulolytiques thermophiles ainsi que sept genres distincts ont été obtenus à partir de différentes zones thermogéniques dans le gouvernorat de Damiette, en Égypte. Cette procédure d'isolement a impliqué l'utilisation du milieu gélosé Czapek Dox, dans lequel le CMC a été utilisé en substitution du glucose(El-morsy et *al* .,2023).

Echantillon 2

Vingt-quatre isolats cellulolytiques ont été choisis en raison de leur capacité à former une zone de dégagement sur des plaques contenant du CMC utilisant 0,1 % de rouge Congo. Les vingt-quatre souches bactériennes ont toutes présenté une zone de dégagement autour des colonies. Cette zone de dégagement autour de la colonie est un indicateur de la propriété d'hydrolyse de la cellulose des isolats(Sathyapriya et *al* .,2022) .

Echantillon 3

Dans le cadre de cette étude en cours, un total de cinq cent quatre-vingt-un isolats bactériens ont été récoltés, Parmi toutes les échantillons, c'est l'échantillon de sol de la serre qui a présenté la plus grande concentration de bactéries. Le sol abrite une diversité de micro-organismes spécialisés dans la dégradation de la cellulose (Bhati et *al*.,2023).

Echantillon 4

Les sacs en nylon contenant la paille de riz ont été récupérés des fosses après une période de 15 jours d'incubation, en vue de l'isolement des champignons (Sahrawat et Garg P,2022).

Echantillon 5

Les isolats présentant les activités enzymatiques les plus élevées, telles qu'indiquées par les diameters de zone maximum , étaient OZ(16,2 U/mL),OZ5(14,4U/mL) et OZ(12,7 U/mL) (Baltaci,2022).

Echantillon 6

Quarante-cinq colonies bactériennes différentes ont été isolées à partir de neuf échantillons de sol. Cependant, 4 isolats n'ont pas montré la zone claire avec 0,1 % de rouge Congo mais ils sont significativement visibles avec l'iode de Gram. Les sept isolats présentant le plus grand potentiel cellulolytique sur les boîtes de criblage ont ensuite été sélectionnés pour la caractérisation morphologique et l'identification moléculaire (Bhagat *et al.*, 2021).

Echantillon 7

Le choix d'une souche fongique appropriée est une étape fondamentale pour la production hyperactive de cellulases, les souches ont été isolées à partir du sol et compost et identifiées comme *Talaromyces thermophilus* sur la base de caractéristiques morphologiques (Abdullah *et al.*, 2021).

5.2 Sélection sur un milieu liquide et solide

5.2.1 Sur milieu solide

Echantillon 1

Huit (8) souches thermophiles au total ont été choisies en vue de produire de la cellulase. Parmi ces souches, quatre isolats ont présenté une zone transparente sur un agar à 1 % de CMC, ce qui les a qualifiés pour des étapes ultérieures de recherche (Sharif *et al.*, 2023).

Tableau 6. Test de dépistage de la cellulase sur des isolats thermophiles (Sharif *et al.*, 2023)

Isolats	Test de cellulase	Nom de l'espèce	Numéro d'accès
MBT001	+ve	<i>Anoxybacillus mongoliensis</i>	OM918280
MBT002	+ve	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	OM918281
MBT003	+ve	<i>Anoxybacillus mongoliensis et mongoliensis flavithermus</i>	OM918282

MBT004	+ve	<i>Bacillus</i>	OM918283
MBT005	-ve	Non identifié	
MBT006	-ve	Non identifié	
MBT007	-ve	Non identifié	
MBT008	-ve	Non identifié	

Echantillon 2

Un milieu de culture sélectif contenant de la cellulose comme seule source de carbone a été utilisé pour l'isolement des bactéries productrices de cellulase. Un total de 126 isolats bactériens ont été obtenus à partir de 57 échantillons. Les colonies produisant une zone transparente de diamètre $\geq 7,5$ mm ont été choisies pour les études de production d'enzymes. Environ 45 isolats ont été éliminés lors du dépistage primaire. L'isolat B12 a produit le diamètre maximum de zone transparente de 21 mm, suivi de B64 (19 mm) et B25 (18 mm) (Subramaniam et *al.*,2023).

Echantillon 3

Les espèces isolées sont identifiées morphologiquement au niveau du genre (El-morsy et *al.*.,2023).

Echantillon 4

24 bactérie ont été identifiée avec congo test (Sathyapriya et *al.*.,2022).

Echantillon 5

Dans tous les échantillons, la concentration la plus élevée de bactéries a été relevée dans l'échantillon de sol provenant de la serre(bhati et *al.*,2021)

Echantillon 6

Les bactéries ont été déterminé par congo test et la spectrophotométrie avec les diamètres suivantes : OZ2(16.2 U/mL), OZ5 (14.4 U/mL), and OZ17 (12.7 U/mL) (Baltaci,2022).

Les résultats dans la (fig.7).

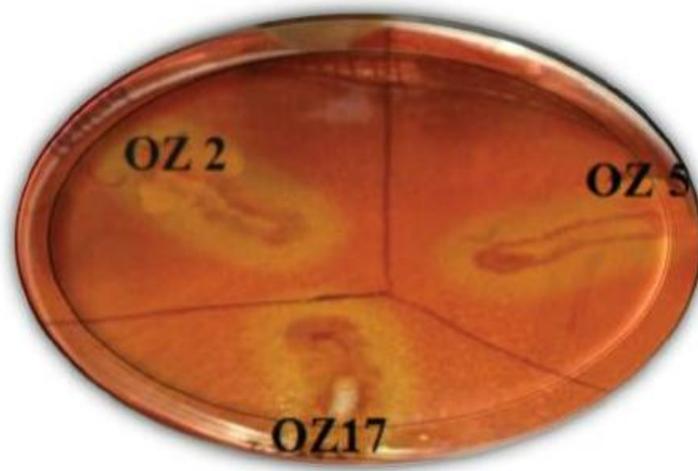


Figure 7.test congo (Baltaci.,2022)

Echantillon 7

La méthode utilisée pour la sélection des bactéries productrices de cellulase est le congo test puis elle est déterminée par Gram iodine .

5.2.2 Sur milieu liquide

Cinq souches de cellulase sélectionnées, qui ont été isolées à partir des sols de Brazzaville, À partir de ces souches, une analyse de la cinétique de la cellulase a été entreprise, accompagnée d'une optimisation des paramètres physiques et des conditions nutritionnelles visant à atteindre une production maximale de cellulase brute. (Lingouangou et *al.* ,2022).

5.3 Mesure de l'activité enzymatique

Echantillon 2

L'activité bactérienne est optimale à 35°C. À ces températures, l'inactivation des enzymes résulte de faibles interactions intermoléculaires qui perturbent la stabilité de leur structure, entraînant une diminution de leur capacité catalytique. À des températures inférieures, le transport des substrats à travers la cellule est inhibé, tandis qu'à des températures plus élevées, les enzymes se déplient et perdent leur activité en raison de la dénaturation thermique (Mokale et *al.*,2022).

Echantillon 3

Environ 20 % des échantillons d'eau douce et de sol montrent la présence de bactéries décomposant la cellulose après un processus d'enrichissement. Toutefois, il est à noter que certains échantillons ne renferment pas ce type de bactéries, Cette variation s'explique par la présence de micro-environnements offrant des conditions différentes propices à la croissance de bactéries décomposant la cellulose. Ces bactéries sont généralement présentes dans les sols issus de fumiers de fosse (Lingouangou et *al.*,2022).

Echantillon 4

L'activité cellulolytique observée pour les souches bactériennes était respectivement de $0,98 \pm 0,01$ U ml⁻¹, $0,46 \pm 0,01$ U ml⁻¹ et $1,75 \pm 0,01$ U ml⁻¹ après 48 heures d'incubation. comme elle est montré dans la (fig.8) .

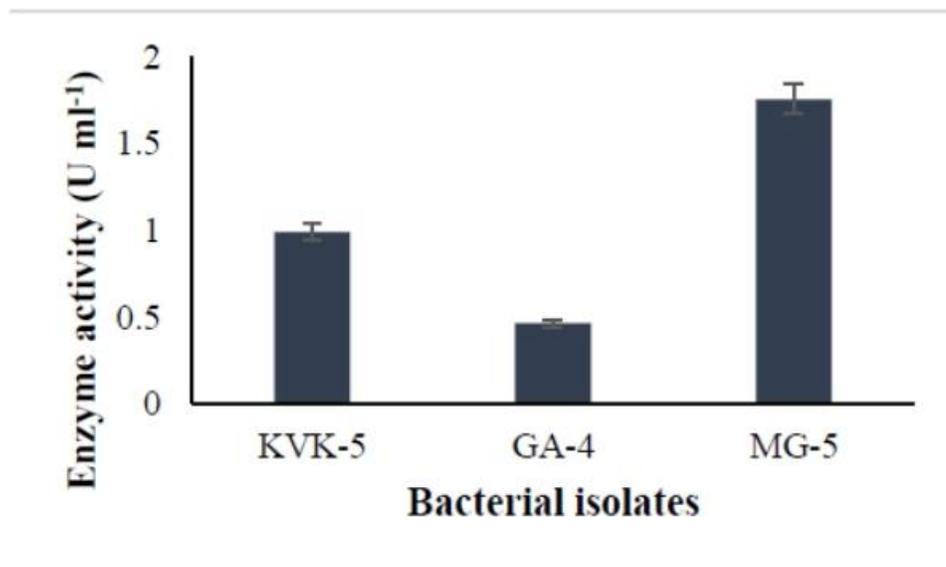


Figure 8.La synthèse de cellulose par des souches bactériennes isolées (Bhati et *al.*,2023).

L'isolat MG-5 a montré la plus grande activité et a donc été sélectionné pour une caractérisation plus approfondie. Mahdi et al. (2010) ont signalé une activité maximale

d'exoglucanase de 1,13 U ml⁻¹. Une étude a rapporté que l'isolat ME27-1 a montré la plus forte activité cellulase (0,17 U ml⁻¹) après incubation pendant 60 heures dans un milieu liquide de base (Bhati et *al.* 2023).

5.4 Optimisation de la production de cellulases

5.4.1 Effet de pH

Les trois répliques ont été cultivées dans des milieux à différents niveaux de pH, notamment 5,0, 6,0, 7,0 et 9,0. Les activités de CMase les plus élevées ont été observées dans un milieu de pH 7,0 (2,672 UI/ml), tandis que l'activité de Fpase atteignait 0,130 UI/ml, comme indiqué dans la (tab.9).

Tableau 7. optimisation de pH (Sahrawat et Garg ,2022)

pH	CMase(IU/ml)	Fpase(IU/ml)
5.0	1.084±0.89	0.050±0.07
6.0	1.943±1.51	0.105±0.07
7.0	2.672±2.30	0.130±0.13
9.0	0.993±0.81	0.080±0.06

Ces résultats divergent de l'étude Sharma et *al.* (2017), qui avait signalé que l'activité maximale des enzymes CMase et FPase était à pH 6,5. En revanche, cette étude concorde avec les conclusions de Barapatre et *al.* (2020), lesquelles suggèrent que la production maximale de cellulase est obtenue à pH 7,0 par des espèces d'*Aspergillus*.

5.4.2 Effet de période d'incubation

Il est important de noter que toutes les souches n'ont pas montré une production de cellulase à 50 °C, et aucune croissance cellulaire n'a été observée à cette température, Les résultats sont illustrés dans la (Fig. 10).

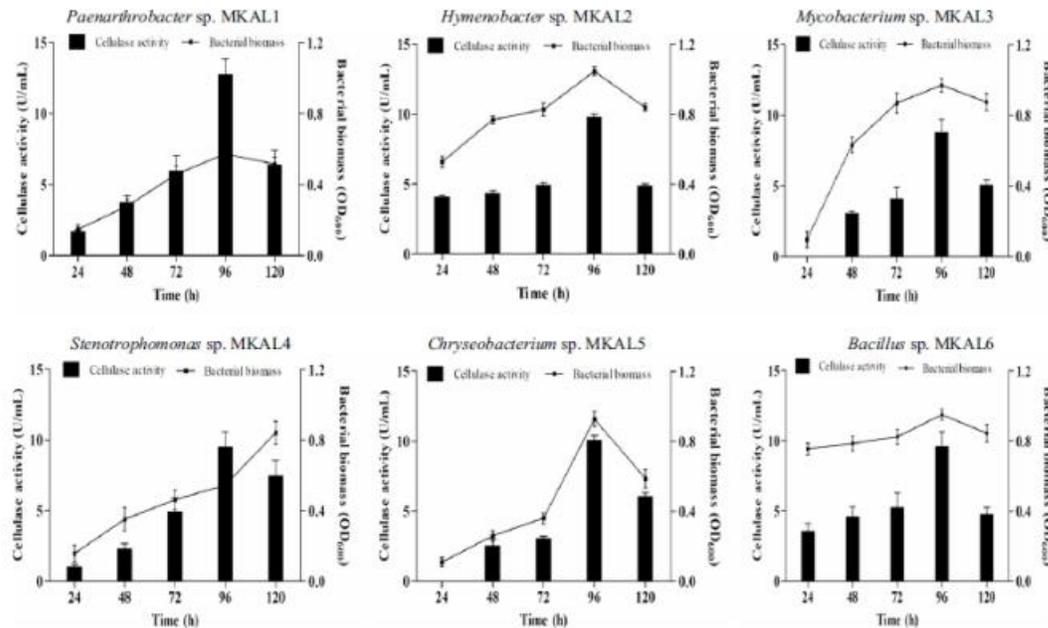


Figure 10. Effet de la période d'incubation (Mokale et al.,2022)

Une production optimale de cellulase a été obtenue après une période d'incubation de 96 heures. Au-delà de cette période, l'activité de l'enzyme a diminué. Cela est dû à l'épuisement des nutriments dans le milieu de fermentation, à l'inhibition par les produits finaux ou à la production de sous-produits. L'épuisement des nutriments provoque un stress bactérien conduisant à l'inactivation de la sécrétion d'enzyme et à la mort cellulaire Ariffin et al.,(2006). *Micrococcus sp.* SAMRC-UFH3 Mmango et al.,(2016), *Bacillus amyloliquefaciens* AK9 Irfan et al .,(2017) et *Bacillus albus* Abada et al .,(2021) ont été signalés comme produisant une cellulase maximale après 96 heures d'incubation.

5.4.3 Effet des sources de carbone et d'azote sur production de cellulase

Les résultats de l'effet des sources de carbone sur la production de cellulase ont montré que *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas monteilii* ont montré une meilleure production de cellulase (0,49 UI/ml ; 0,633 UI/ml) (Lingouangou et al.,2022).

Ces résultats démontrent que toutes les souches bactériennes n'ont pas les mêmes besoins en sources de carbone. En effet, dans cette étude que la source de carbone dépend d'une souche à l'autre. En résumé, les résultats de l'étude est similaire à ceux trouvés par Robson et Chambliss (1984) , Shabeb et al en 2010 et Reffas en 2017 , qui ont démontré la variabilité et les préférences des sources de carbone d'une souche à l'autre avec des taux de production de

cellulase de (0,93 ; 1,43 ; 1,61 UI/ml) dans différentes espèces bactériennes telles que *Cellulomonas sp.*, *Clostridium* et *Bacillus sp.*

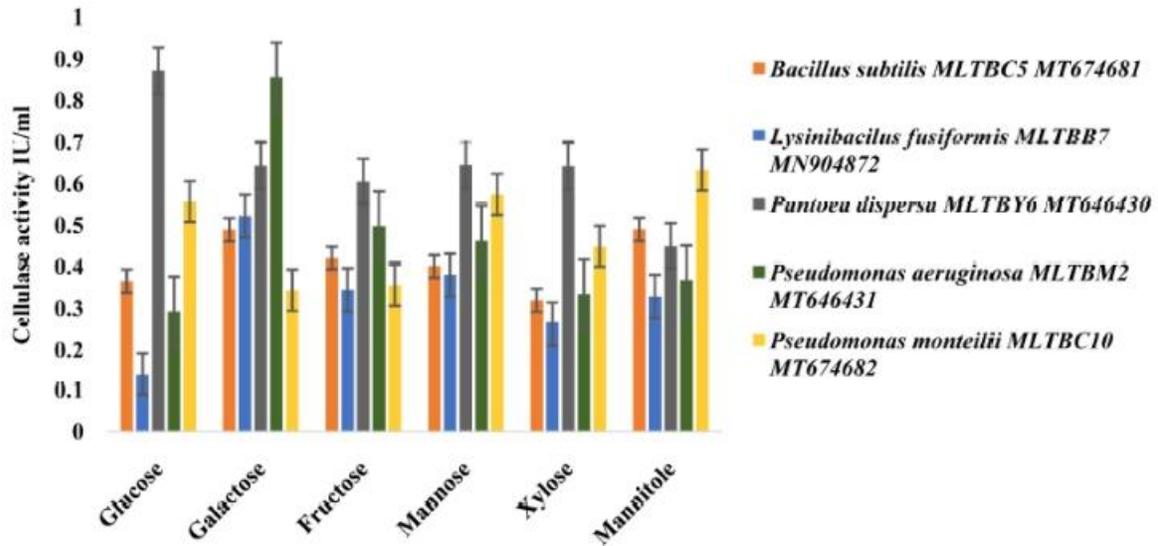


Figure 11. L'influence des différentes sources de carbone sur la production de cellulase chez les souches *Pantoea dispersa* MLTBY6 (MT646430.1), *Pseudomonas aeruginosa* MLTBM2 (MT646431.1), *Pseudomonas monteilii* MLTBC10 (MT674682.1), *Bacillus subtilis* MLTBC5 (MT674681.1) et *Lysinibacillus fusiformis* MLTBB7(Lingouangou et al.,2022)

Les résultats de la source d'azote montrent une excellente production de cellulase en présence de sulfate d'ammonium comme source d'azote.

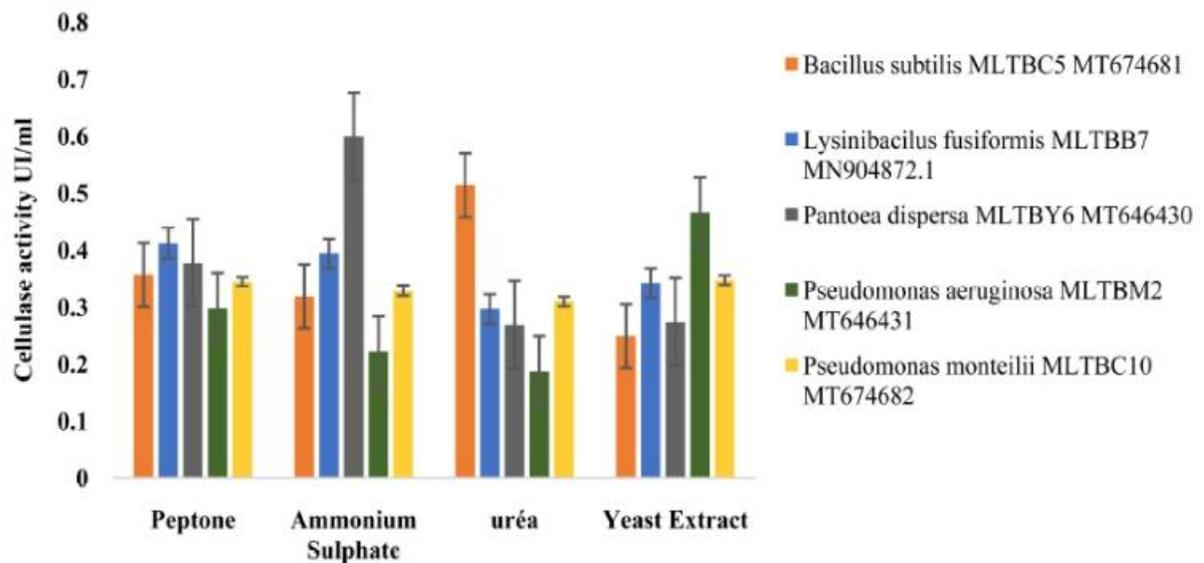


Figure 12. Effet de la source d'azote sur les souches *Pantoea dispersa* MLTBY6 (MT646430.1); *Pseudomonas aeruginosa* MLTBM2 (MT646431.1); *Pseudomonas monteilii* MLTBC10 (MT674682.1); *Bacillus subtilis* MLTBC5 (MT674681.1) et *Lysinibacillus fusiformis* MLTBB7 (Lingouangou et al., 2022)

Chez *Pantoea dispersa*, avec un taux de production de 0,599 UI/ml. Cette variabilité est une preuve suffisante que le choix et la préférence des sources d'azote diffèrent d'une souche à l'autre dans cette étude. Les résultats sont en parfait accord avec ceux trouvés par Reffas en 2017.

5.4.4 Effet de la température

Les isolats identifiés sous les noms S1-1, S1-4, S3-3, S4-2, S7-2 et S7-6 ont révélé leur activité cellulotique maximale à une température de 27°C. L'activité maximale est de S7-6 de valeur 4.544 U/ml.

Des résultats similaires ont été rapportés par Islam et al. (2019) pour une souche de *Bacillus* bien connue, où la production maximale de cellulase a été observée à 35°C, et la production de l'enzyme a été réduite avec l'augmentation de la température de fermentation au-dessus de 40°C. Rasul et al. (2015) ont également rapporté que l'activité de l'enzyme augmente progressivement jusqu'à 40°C et diminue à des températures plus élevées.

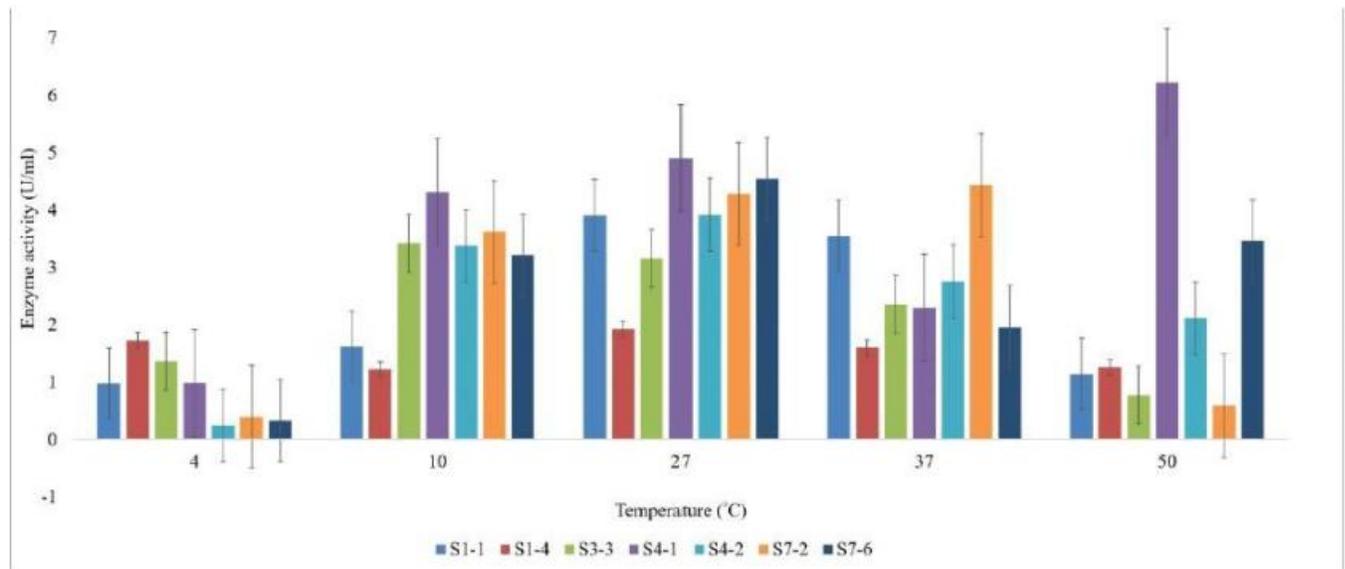


Figure 13. Effet de la température sur l'activité du cellulose (Bhagat et Kokitkar, 2021).

L'isolat nommé S4-1 a montré la plus grande activité, soit 6,226 U/ml à 50°C, ce qui suggère que cette souche de *Bacillus* peut être un type de bactérie thermotolérante. Les résultats étaient comparables à ceux de Sadhu et *al.* (2013) La souche de *Bacillus* isolée dans cette étude a montré une activité maximale de cellulase à 50°C. Gautam et *al.* (2011) ont également rapporté la découverte de champignons cellulolytiques novateurs issus de déchets solides municipaux, qui ont été trouvés pour produire l'enzyme cellulolytique à des températures comprises entre 40°C et 50°C.

5.4.5 Effet de la concentration d'inoculum

L'influence de la concentration de l'inoculum de la souche bactérienne sur la production de cellulase est manifeste. Différents volumes d'inoculum (0,5-2,5 % v/v) ont été incorporés aux milieux de fermentation pour examiner leur impact sur la production d'enzymes cellulolytiques, comme illustré dans la (Fig.14).

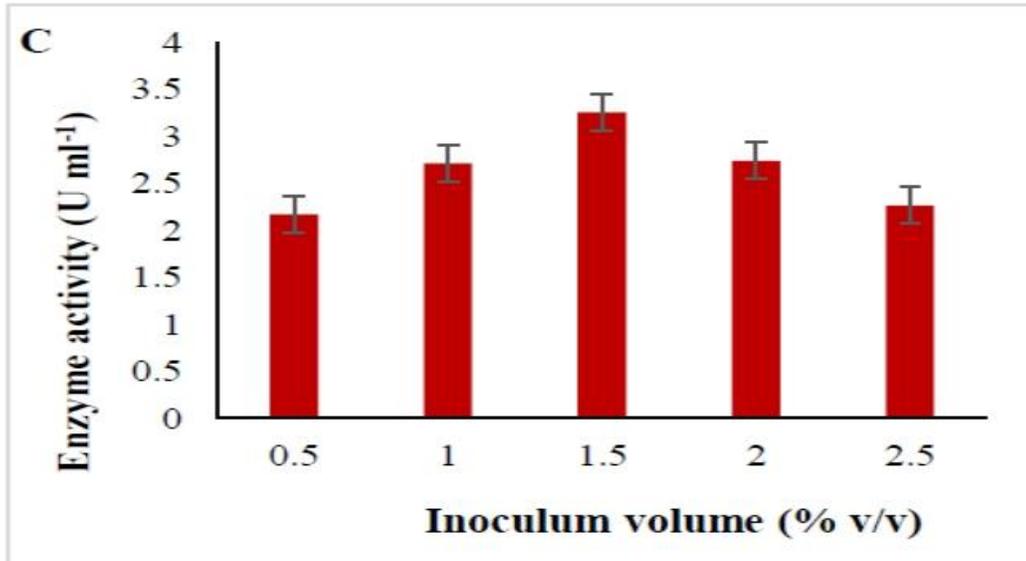


Figure 14. Influence de concentration d'inoculum (Bhati et al .,2023)

La taille optimale de l'inoculum a été observée à 1,5% v/v ($3,25 \pm 0,01$ U ml⁻¹) pour une production améliorée de cellulose Bhati et al .,(2023), L'augmentation subséquente de la concentration a conduit à une réduction de l'activité de l'enzyme en raison de l'épuisement des nutriments, entraînant une diminution de l'activité métabolique (Singh et al .,2012).

L'équilibre entre la biomasse en croissance et les nutriments disponibles est essentiel pour une production optimale de l'enzyme. Le volume optimal d'inoculum était de 10% v/v pour *Bacillus sp* (Singh et al .,2012).

Conclusion

Conclusion

D'après notre étude était d'optimiser la production d'enzymes cellulases par des bactéries isolées qui ont la capacité de produire de la cellulase, afin d'obtenir un rendement enzymatique plus élevé.

Parmi les bactéries qui produisent de la cellulase, des souches ont été extraites du sol et identifiées comme *Bacillus albus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Micrococcus sp Pantoea dispersa*, *Pseudomonas monteilii* et *Aspergillus*. Une recherche visant à optimiser les conditions de fermentation pour obtenir une production maximale de cellulase a été menée. Les paramètres de culture tels que le pH, la température, les sources de carbone et les sources d'azote ont été ajustés pour atteindre cet objectif.

Les recherches examinées dans ce mémoire ont mis en évidence l'importance de l'optimisation des conditions de croissance de la souche pour améliorer la production de cellulases. Il a été observé que la production optimale de cellulases se situe dans une plage de température comprise entre 35 °C et 40 °C. pour la souche *Aspergillus* a pH 7 l'activité enzymatique est élevé (2,672 UI/ml). Une production efficace de cellulases est constatée lorsque le milieu de culture est enrichi en tryptone comme sources d'azote, et lorsque la sucrose est utilisé comme sources de carbone. En revanche, le glucose induit la moins grande activité cellulase parmi les sources de carbone testées. la tryptone est la sources d'azote organiques riches en vitamines qui stimulent la croissance bactérienne et, par conséquent, la production de cellulases .

Une concertation de substrat CMC de 1.5% donne la meilleure production de cellulases par la souche *Bacillus sp*.

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 96 h, l'optimum étant atteint à 72 heures .Ces périodes conviennent d'un point de vue économique.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abada, E. A., Elbaz, R. M., Sonbol, H., & korany, SM. (2021). Optimization of cellulase production from *Bacillus albus* (MN755587) and its involvement in bioethanol production. *Polish Journal of Environmental Studies*, 30, 2459–2466.

Abdullah, R., Tahseen, M., Nisar, K., Kaleem, A., Iqtedar, M., Saleem, F., & Aftab, M. (2021). Statistical optimization of cellulases by *Talaromyces thermophilus* utilizing *Saccharum spontaneum*, a novel substrate. *Electronic Journal of Biotechnology*, 51, 79-87.

Ahmed, A., & Bibi, A. (2018). Fungal cellulose production and applications: minireview life. *International Journal of Health and Life Sciences*, 4(1), 19–36.

Annamalai, N., Rajeswari, M.V., Balasubramanian, T. (2016). Endo-1,4- β -glucanases: Role, Applications and Recent Developments. In: Gupta, V. (eds) *Microbial Enzymes in Bioconversions of Biomass. Biofuel and Biorefinery Technologies*, vol 3. Springer, Cham.

Ariffin, H. N., Abdullah, M. S., Umi Kalsom, Y., & Shirai Hassan, M. A. (2006). Production and

Aristide Laurel Mokale Kognou., C. C. H. (2022, june 10). Characterization of Cellulose Degrading Bacteria Isolated from Soil and the Optimization of Their Culture Conditions for Cellulase Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* .

Baltaci, M. O. (2022). Enhancement of cellulase production by co-culture of *Streptomyces ambofaciens* OZ2 and *Cytobacillus oceanisediminis* OZ5 isolated from rumen samples. *Biocatalysis and Biotransformation*, 40(2), 144-152.

Barapatre, S., Rastogi, M., Savita, & Nandal, M. (2020). Isolation of fungi and optimization of pH and temperature for cellulase production. *Nature Environment and Pollution Technology*, 19(4), 1729–1735.

Bhagat, S. A., & Kokitkar, S. S. (2021). Isolation and identification of bacteria with cellulose-degrading potential from soil and optimization of cellulase production. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 9(6), 154-161.

Bhati N, S. A. (2021). Cost- effective cellulase production, improvement strategies, and future challenges. *J Food Process Eng* , pp. 1-11.

Bhati, N., & Sharma, A. K. (2022). Isolation, screening and optimization of cellulase production by a novel bacterial isolate *Enterococcus durans*. *The Applied Biology & Chemistry Journal (TABCIJ)*, 3(4), 71-78.

Boerjan, W., Ralph, J., & Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 519–546.

Chukwuma, O. B., Rafatullah, M., Tajarudin, H. A., & Ismail, N. (2020). Lignocellulolytic enzymes in biotechnological and industrial processes: a review. *Sustainability*, 12(18), 7282.

Dina, S., & Thankamani, V. T. (2023). Optimization of cellulase production from *Apergillus flavipes* by submerged and solid state fermentation. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 12(5), e4754-e4754.

EL-Morsy, E. L., El-Metwally, M. M., Mohesien, M. T., & Shabara, S. A. (2023). Cellulolytic activities of thermophilic *Thermoascus aurantiacus* MW559792 and *Mycothermus thermophilus* MZ723073. *Scientific Journal for Damietta Faculty of Science*.

Esa, F., Tasirin, S. M., & Rahman, N. A. (2014). Overview of bacterial cellulose production and application. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 113–119.

Fischer, M. M. J. (2006). Culture and Cultural Analysis. *Theory, Culture & Society*, 23(2–3), 360–364.

Gao, J., Weng, H., Zhu, D., Yuan, M., Guan, F., & Xi, Y. (2008). Production and geophysically defined aquifer framework. *The Leading Edge*, 32(7), 758-765 .

Gautam, S., Bundela, P. S., Pandey, A., Khan, J., Awasthi, M. K., & Sarsaiya, S. (2011). Optimization for the Production of Cellulase Enzyme from Municipal Solid Waste Residue by Two Novel Cellulolytic Fungi. *Biotechnology Research International*, 2011, 1–8.

Guodong Liu, Y. Q. (2019, july-august). Engineering of filamentous fungi for efficient conversion of lignocellulose: Tools, recent advances and prospects. *Biotechnology Advances* , pp. 519-529.

Irfan, M., Tayyab, A., Hasan, F., Khan, S., Badshah, M., & Shah, A. A. (2017). Production and characterization of organic solvent-tolerant cellulase from bacillus amyloliquefaciens AK9 isolated from hot spring. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182, 1390–1402.

Islam M, Sarkar PK, Mohiuddin AK, Suzauddula M. (2019). Optimization of fermentation condition for cellulase enzyme production from Bacillus sp. *Malays J Halal Res*,2(2),19–24;

Jarvis, M. (2003). Cellulose stacks up. *nature* , pp. 611-612.

Jayasekara, S., & Ratnayake, R. (2019). Microbial cellulases: an Overview and Applications. In *IntechOpen eBooks*.

Jiang, B., Jiao, H., Guo, X., Chen, G., Guo, J., Wu, W., & Liang, Z. (2023). Lignin- Based Materials for Additive Manufacturing: Chemistry, Processing, Structures, Properties, and Applications. *Advanced Science*, 10(9), 2206055.

Kader, A. A., Singh, P. R. & Mannappe- ruma, J. D. (1998). Technologies to extend the refrigerated shelf life of fresh fruits. In: *Food Storage Stability* eds I.A. Taub and R.P.

Singh. CRC, Boca Raton, FL Korish, M. (2003) Production, Purification, Properties and Application of the Cellulases from a Wild Type Strain of a Yeast Isolate. Johannes Gutenberg University of Mainz, Mainz.

Khadka, S., Khadka, D., Poudel, R. C., Bhandari, M., Baidya, P., Sijapati, J., & Maharjan, J. (2022). Production Optimization and Biochemical Characterization of Cellulase from *Geobacillus sp.* KP43 Isolated from Hot Spring Water of Nepal. *BioMed Research International*, 2022, 1–12.

Kognou, A. L. M., Chio, C., Khatiwada, J. R., Shrestha, S., Chen, X., Han, S., Li, H., Jiang, Z., Xu, C. C., & Qin, W. (2022). Characterization of Cellulose-Degrading Bacteria Isolated from Soil and the Optimization of Their Culture Conditions for Cellulase Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194(11), 5060–5082.

Krassig H, Schurz J (2002) Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th edn. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

Kumar VA., K. R. (2019). Role of cellulases in food, feed, and beverage industries (In Parameswaran B., Varjani S., & Raveendran S., ed.), *Green Bioprocesses: Enzymes in Industrial Food Processing*. Springer Singapore , pp. 323-343.

Lahiri, D., Nag, M., Dutta, B., Dey, A., Sarkar, T., Pati, S., Edinur, H. A., Kari, Z. A., Noor, N. H. M., & Ray, R. R. (2021). Bacterial cellulose: production, characterization, and application as antimicrobial agent. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12984.

Lavanya, D., Parthasarathi, K., Mudit, D., Prudhvi, K. R. . (2011). Sources of cellulose and their applications-A review. *Int J Drug Form Res* , pp. 19-38.

Roux A. (2003). *Didactique de la géographie*, Presses universitaires de Caen, 268 p. », *Cybergeo: European Journal of Geography [En ligne]*, Revue de livres, mis en ligne le 17 décembre 2004, consulté le 10 septembre 2023. URL :

Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.C.(2004)., *Cell Biochemistry and Function*. Lehninger: Principles of Biochemistry, 4th ed.; Nelson, D.L., Cox, M.C., Eds.; W. H. Freeman & Co.: New York, NY, USA, Volume 23, p. 1119.

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.

Li, H., Dou, M., Wang, X., Guo, N., Kou, P., Jiao, J., & Fu, Y. (2021). Optimization of cellulase production by a novel endophytic fungus *Penicillium oxalicum* R4 isolated from *Taxus cuspidata*. *Sustainability*, 13(11), 6006.

Limayem, A., & Ricke, S. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Prog. Energy Combust. Sci.* , pp. 449-467.

Lingouangou, T. M., Ampa, R., Nguimbi, E., Bissombolo, P. M., Mabika, F. A. S., Ngoulou, T. B., & Nzaou, S. A. E. (2022). Optimization of Cellulase Production Conditions in Bacteria Isolated from Soils in Brazzaville. *Journal of Biosciences and Medicines*, 10(8), 14-28.

Linton, S. M., & Greenaway, P. (2004). Presence and properties of cellulase and hemicellulase enzymes of the gecarcinid land crabs *Gecarcoidea natalis* and *Discoplax hirtipes*. *The Journal of Experimental Biology*, 207(23), 4095–4104.

Liu, G., Shi, K., & Sun, H. (2023). Research Progress in Hemicellulose-Based Nanocomposite Film as Food Packaging. *Polymers*, 15(4), 979.

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(3), 506–577.

Tran, M. H., Phan, D., & Lee, E. Y. (2021). Review on lignin modifications toward natural UV protection ingredient for lignin-based sunscreens. *Green Chemistry*, 23(13), 4633–4646.

M. M. Abu-Omar, K. Barta, G. T. Beckham, J. S. Luterbacher, J. Ralph, R. Rinaldi, Y. Román-Leshkov, J. S. M. Samec, B. F. Sels, F. Wang, *Environ. Sci.* 2021, 14, 262.

Marques, N. P. (2018). Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. *Industrial Crops and Products* , pp. 66–75.

Mmango-Kaseke, Z., Okaiyeto, K., Nwodo, U. U., Mabinya, L. V., & Okoh, A. I. (2016). Optimization of cellulase and xylanase production by *Micrococcus* species under submerged fermentation. *Sustainability*, 8, 1168.

Ojeda, L., Noguera-Machado, N., Pérez-Ybarra, L., Pizzani, P., & Fernández, J. (2022). Statistical optimization of cellulases production from a *Streptomyces sp.* Strain. *Revista Agrollania de Ciencia y Tecnología*, 21.

P. Tomme, R. A. (1995). Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Advances in Microbial Physiology* , pp. 1-81.

Paillet, F. L. (2013). Cross-borehole flow profiling delineating subsurface flow paths within a within a geophysically defined aquifer framework. *The Leading Edge*, 32(7), 758–765.

Petersen, N., & Gatenholm, P. (2011). Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(5), 1277–1286.

Pramanik SK, M. S. (2021, december). Fermentation optimization of cellulase production from sugarcane bagasse by *Bacillus pseudomycooides* and molecular modeling study of cellulase. *Current Research in Microbial Sciences* .

Ramesh, A. D. (2020). Commercial applications of microbial enzymes (In Arora N.K., Mishra J., & Mishra V., ed.), *Microbial enzymes: Roles and applications in industries*. springer nature , pp. 137–184.

Rasul, F., Afroz, A., Rashid, U., Mehmood, S., Sughra, K., & Zeeshan, N. (2015). Screening and characterization of cellulase producing bacteria from soil and waste (molasses) of sugar industry. *International Journal of Biosciences*, 230–238.

Reffas, F.Z.I. (2017) Isolement et caracterisation des bacteries productrices de la cellulase. These de doctorat .

Robson, L.M. and Chambliss, G.H. (1984) Characterization of the Cellulytic Activity of a *Bacillus* Isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 47, 1039-1046.

Sadhu, S., Saha, P., Sen, S., Mayilraj, S., & Maiti, T. K. (2013). Production, purification and characterization of a novel thermotolerant endoglucanase (CMCase) from *Bacillus* strain isolated from cow dung. *SpringerPlus*, 2(1).

Sahrawat, R., & Garg, A. P. (2022). Optimization of Production Conditions of Cellulase Enzyme from Micro-Fungi *Aspergillus Fumigatus* for Agriculture Application. *International Journal of Plant & Soil Science*, 34(24), 193-199.

Sathyapriya, A., Mohanapriya, B., Suresh, S. N., & Latheef, S. A. (2022). Isolation and Optimization of Cellulase Producing Microbes from Forest Soil Sample. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 5863-5870.

Schamburg D., Salzman M G B F. (1991). Cellulase. In: *Enzyme Handbook*, Vol IV. Springer-Verlag Berlin, p: 1-11.

Shabeb, M.S., Younis, A.M., Hezayen, F.F. and Nour-Eldein, M.A. (2010) Production of Cellulase in Low-Cost Medium by *Bacillus subtilis* KO Strain. *World Applied Sciences Journal* , 8, 35-42.

Sharif, S., Shah, A. H., Fariq, A., Jannat, S., & Rasheed, S. (2023). Production, characterization and applications of cellulase from thermophilic *Anoxybacillus* and *Bacillus*. *Research Square (Research Square)*.

Sharma, H. K., Xu, C. C., & Qin, W. (2017). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and bioproducts: An Overview. *Waste and Biomass Valorization*, 10(2), 235–251.

Zhang, F., Bai, F., & Zhao, X. (2016). Induction and regulation of cellulase expression in filamentous fungi: a review. *PubMed*, 32(11), 1481–1495.

Singh A, B. S. (2021, june). An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. *Bioresour Technol Rep* , p. 100652.

Singh J, Kaur P (2012). Optimization of process parameters for cellulase production from *Bacillus sp.* JS14 in solid substrate fermentation using response surface methodology. *Braz Arch Biol Technol*; 55:505-512.

Singh S, J. D. (2019, july 02). Developing efficient thermophilic cellulose degrading consortium for glucose production from different agro-residues. *front energy res* , pp. 1-13.

Singh, R.S.; Singh, T.; Pandey, A. Microbial Enzymes—An Overview. In *Advances in Enzyme Technology*; Elsevier BV: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 1–40.

Singhania, R. A. (2017). Cellulases (In Pandey A., Negi S., Soccol C. R., ed.), *Current developments in biotechnology and bioengineering-Production, isolation and purification of industrial products*. Elsevier, pp. 73-101.

Sperotto, G., Stasiak, L. G., Godoi, J. P. M. G., Gabiatti, N. C., & De Souza, S. S. (2021). A review of culture media for bacterial cellulose production: complex, chemically defined and minimal media modulations. *Cellulose*, 28, 2649-2673.

Subramaniam, S., Gomathi, V., & Jackson, K. M. (2023). Exploring and optimizing the Termite Hill bacterial diversity for cellulase production. *Ecology, Environment and Conservation*, 29, 89–93.

Tortora GJ, Funke BR, Case Cl (2012) *Crescimento microbiano*. In: *Microbiologia*, 10th edn. Artmed, Porto Alegre, pp 156–183

Ul-Islam, M., Khan, S., Ullah, M. W., & Park, J. K. (2015). Bacterial cellulose composites: Synthetic strategies and multiple applications in bio-medical and electro-conductive fields. *Biotechnology Journal*, 10(12), 1847–1861.

Vocadlo DJ, Davies GJ. • Mechanistic insights into glycosidase chemistry. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2008;12:539-555

ملخص

تركز هذه الدراسة على تحسين العزلات البكتيرية المنتجة للسيلولاز من أجل انتاج انزيم أفضل ، ثم عزل البكتيريا المهيمنة للسيلولاز من التربة وتم التعرف عليها على أنها ، *Bacillus amyloliquefaciens* ، *Micrococcus sp Pantoea dispersa* ، *Bacillus albus* ، *Bacillus subtilis* ، *Pseudomonas monteilii* et *Aspergillus* . تم اجراء وسط لتحسين تخمير لتحقيق أقصى انتاج للسيلولاز . للسلاطات البكتيرية . كانت الظروف المثلى لانتاج السيلولاز هي درجة 35 مئوية عند درجة الحموضة 7 ، و السيلوببوز و السكروز كأفضل مصدر للكربون . يتم الحصول على انتاج عالي من السيلولاز على (CMC) بتركيز 1.5 بالمئة خلال الايام الاولى من الحضانة (96 ساعة) . قد يكون الاختلاف في درجة الحموضة ودرجة الحرارة المثلى لنشاط السيلولاز 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 *Bacillus albus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Micrococcus sp Pantoea dispersa*, *Pseudomonas monteilii* et *Aspergillus*. 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 35°C à pH 7, 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 1,5% pendant les premiers jours d'incubation (96 heures). 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 *Bacillus albus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Micrococcus sp Pantoea dispersa*, *Pseudomonas monteilii* et *Aspergillus*. Optimization of fermentation medium for maximum cellulase production was performed. For bacterial strains. The optimal conditions found for cellulase production were 35°C at pH 7, cellobiose and sucrose as the best carbon source and yeast extract as the best nitrogen source. High cellulase production was obtained on (CMC) at 1,5% concentration during the first days of incubation (96 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.