



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de
la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :
Ahlam HADJAZ

Le : mardi 29 septembre 2020

Thème

Isolement de souches productrices de cellulases et optimisation de la production enzymatique

Jury :

Mme. Boukharouba Khadidja	Pr	Université de Biskra	Président
M. Hakim HEBAL	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme. Fatiha BENGUERAICHI	MAB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2019 - 2020

Remerciements

Je remercie Dieu Tout-Puissant que la première raison pour laquelle je suis
arrivé à

Ce stade, et dans la réalisation de ce travail Je remercie mes plus vifs
remerciements à mon promoteur **Hakim Hebel** pour avoir bien voulu
m'encadrer, pour la documentation qu'il m'a procurée, pour ses précieux
Conseils, pour son suivi tout au long de la réalisation de ce mémoire. J'espère
qu'il Trouve ici l'expression de ma profonde gratitude

Je remercie aux membres du jury qu'ils trouvent ici toute ma gratitude et
mes

Remerciements pour avoir accepté de faire partie du jury et pour avoir bien
voulu Évaluer ce travail

Je remercie tous les membres du Laboratoire de département des sciences de la
Nature et de la vie El hadjeb Biskra

Je tiens enfin, à remercier mes amies et collègues, qui étaient là pour
m'offrir Un grand soutien moral durant la préparation de mon mémoire.
Enfin, je remercie tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin, durant mon
cursus universitaires

Dédicace

Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour à mes parents
ceux Qui m'ont donnés l'espoir et le courage nécessaire pendant mon long
trajet d'étude

Ma chère mère la source de tendresse : **Sekkel Massouda**

La personne qui occupe la meilleure place dans mon cœur,

Mon cher père **Hadjaz Ali**

Que dieu les accorde une longue et heureuse vie.

Ma chère amie **Thawab herzellah**

Pour son soutien moral,

Qui a toujours été à côté de moi je lui souhaite une vie heureuse

Un grand merci à mon ami **Zineb Sakhri** d'être avec moi

A mes très chers **frères** et **sœurs** que Dieu les préserve

N'oublierai jamais Mon fiancé **Abedelrahmen**

Je lui souhaite un bonheur continu

Table des matières

Remerciements

Dédicace

Table des matières

Liste des Tableaux.....	III
Liste des Figures.....	IV
Liste des abréviations	V
Introduction	1

Première Partie: PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. LA CELLULOSE

1.1. La cellulose	3
1.2. La structure et la propriété de la cellulose	3
1.3. Nomenclature	4
1.4. Mode d'action	4
1.4.1. Les endoglucanases (EG).....	4
1.4.2. Les exoglucanases.....	5
1.4.3. Les β -(1,4)-glucosidases	5
1.5. Mécanisme d'action des cellulases	5
1.6. Facteurs liés aux conditions opératoires.....	6
1.6.1. Inhibiteurs	6
1.6.2. Activité enzymatique.....	6
1.6.3. PH optimum.....	7
1.6.4. Température optimale.....	7

Chapitre 2. LES MICROORGANISMES THERMOPHILES ET CELLULITIQUES

2.1. Généralité	9
2.2. Les microorganismes thermophiles	9
2.3. Thermoenzyme	10
2.4. Les bactéries thermophiles cellulolytique.....	10
2.5. Quelques bactéries cellulolytiques	11
2.5.1. <i>Clostridium thermocellum</i>	11
2.5.2. <i>Bactériode succinogenes</i>	11
2.5.3. <i>Ruminococcus</i>	11

2.5.4. <i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	12
2.5.5. <i>Les Cellulomonas</i>	12

Deuxième partie : PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 3. MATERIEL ET METHODES

3.1. Prélèvement d'échantillon d'eau.....	13
3.2. Isolement direct	13
3.3. Enrichissement.....	13
3.4. Identification bactérienne.....	13
3.5. Milieu de production d'enzymes	13
3.6. Estimation de l'activité de la cellulase par la méthode DNS	14
3.7. Dosage enzymatique	14
3.8. Optimisation de la production de cellulase.....	14
3.8.1. Effet des sources de carbone et d'azote sur production de cellulase	14
3.8.2. Effet de la température	15
3.8.3. Effet des ions métalliques sur la production de cellulase	15
3.8.4. Effet de la concentration de carboxyméthylcellulose sur la production de cellulase	15
3.8.5. Effet de la période d'incubation sur la production d'enzyme	15
3.8.6. Effet de la concentration du substrat	15

Chapitre 4. RESULTATS ET DESCUSSION

4.1. Isolement de bactéries thermophiles productrices de cellulases.....	16
4.2. Identification des isolats bactériens	16
4.3. Les conditions d'optimisation de la production de cellulase.....	18
4.3.1. Effet de la température	18
4.3.2. Effet des sources de carbone sur la cellulase production.....	19
4.3.3. Effet des sources d'azote sur la production de cellulase	20
4.3.4. Effet des ions métalliques	21
4.3.5. Effet de la concentration du substrat	22
4.3.6. Effet de la période d'incubation sur la production d'enzyme	22
Conclusion.....	24
Bibliographie.....	25

Annexes

Résumés

Liste des Tableaux

Tableau 1. Application de cellulase dans diverses industries (Kuhad <i>et al.</i> , 2011).....	7
Tableau 2. Caractérisation biochimique des bactéries productrices de cellulase (Nandimath <i>et al.</i> , 2016)	17

Liste des Figures

Figure 1. La chaine de la cellulose (Mazza, 2009).....	4
Figure 2. Mode d'action synergique des cellulase (Claisse, 2012).....	5
Figure 3. Mécanisme d'hydrolyse de la cellulose par la cellulase (Leghlimi, 2013)	6
Figure 4. Isolements des bacteries thermophiles productrice de cellulase (Kazue <i>et al.</i> , 2006)	16
Figure 5. Effet de la température sur la production de cellulose par Bacillus sp. et CDB 27 et CDB 30 (Shaikh <i>et al.</i> , 2013).....	19
Figure 6. Effet des carbonne sur la production de cellulase (Assareh <i>et al.</i> , 2012)	20
Figure 7. Effet des sources d'azote sur la production de cellulase (Assareh <i>et al.</i> , 2012).....	21
Figure 8. Effet des sels métalliques des surfactants sur la production de cellulase par B. <i>altitudinis</i> et B. <i>licheniformis</i> (Sreeja <i>et al.</i> , 2020).....	21
Figure 9. Effet de concentration du carboxymethyle cellulose sur la production de cellulase par la souche Bacillus sp. CDB27 et CDB30 (Shaikh <i>et al.</i> , 2013).....	22
Figure 10. Effet de la période d'incubation sur la production de cellulase (U/ml) par <i>Aspergillus niger</i> (Gautam <i>et al.</i> , 2011).....	23

Liste des abréviations

CMC : Carboxyméthylcellulose

DNS : Dinitrosalicylicacide

EDTA : L'acide éthylène diamine tétraacétique

DP : Degré de polymérisation

EG : Les endoglucanases (EG)

FAO : L'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

Introduction

Introduction

Les énergies renouvelables constituent une réelle opportunité pour répondre à nos besoins énergétiques qui ne cessent de croître (Meunier, 2008). La bioénergie est considérée comme une voie prometteuse pour les énergies renouvelables surtout que les énergies fossiles commencent à se raréfier (Vechiu, 2005). La biomasse lignocellulosique représente une des ressources renouvelables les plus abondantes sur terre, et certainement une des moins coûteuses (Kapseu *et al.*, 2012). Sa conversion en éthanol usage carburant devrait permettre de subvenir à une partie des besoins énergétiques, couverts jusqu'à présent essentiellement par les produits dérivés du pétrole, tout en générant de nouvelles opportunités pour le monde agricole. La ressource de biomasse lignocellulosique provient aussi bien des résidus agricoles et forestiers ou des sous-produits de transformation du bois que de cultures dédiées, qu'il s'agisse de plantes ligneuses ou de plantes herbacées (Diallo *et al.*, 2015). La matière lignocellulosique est le constituant principal de la paroi cellulaire des plantes. Elle est la source de carbone renouvelable la plus abondante de la planète. Elle est constituée de trois éléments majeurs qui sont la cellulose, l'hémicellulose et la lignine (Hugues *et al.*, 2013). A l'intérieur de la biomasse lignocellulosique, ces trois macromolécules s'entremêlent et forment une structure tridimensionnelle complexe et très résistante, maintenue par des liaisons hydrogène et des liaisons covalentes, qui résiste aux attaques de phytopathogènes et qui confère de la rigidité aux plantes. Le contenu en lignine est la première caractéristique importante de la biomasse lignocellulosique pour la conversion biochimique. La ressource sera d'autant mieux adaptée à une conversion biochimique si elle contient une proportion basse de lignine. En effet, celle-ci n'est pas biologiquement convertible en biocarburant. De plus, elle joue le rôle de « ciment » et assure la stabilité de la structure lignocellulosique. De ce fait, elle constitue « un frein » au processus d'hydrolyse enzymatique. En revanche, après séparation, elle sera utilisée pour fournir l'énergie nécessaire au procédé de conversion. Par ailleurs, dans la mesure où la transformation biologique des pentoses en éthanol n'est pas actuellement suffisamment performante, les matières lignocellulosiques contenant peu d'hémicellulose, comme certaines espèces de bois, seront les mieux adaptées au processus de conversion biologique (Berlioz, 2007). Le principal atout que présente la biomasse lignocellulosique tient au fait qu'elle soit très abondante et renouvelable. Il y a donc de nombreux avantages à privilégier la production de biocarburants à partir de la biomasse cellulosique : compétition limitée entre usage alimentaire et non alimentaire des produits agricoles et sur les terres à usage agricole ; valorisation complète de la plante (le grain pour

l'alimentation et le résidu pour le carburant) ; biomasse lignocellulosique constituant le gisement énergétique le plus prometteur la biomasse forestière représente une source d'énergie prometteuse permettant d'obtenir des combustibles solides (bûches, granules), des combustibles liquides (bioéthanol et biodiesel) et des combustibles gazeux (biogaz). Ces produits remplaceraient avantageusement les combustibles issus du pétrole (Hardy, 2016). La cellulose est aujourd'hui le polymère organique le plus abondant sur terre. La production annuelle mondiale de cellulose est estimée à 1012 tonnes (Klemm, 2005). Les industries du papier et du carton sont les principaux consommateurs de cellulose. Seulement 2% de la cellulose utilisée (3,2 millions de tonnes en 2003) sert à la production de fibres, de films de cellulose régénérée et à la synthèse d'esters ou d'éthers de cellulose (Eloutassi *et al.*, 2014). Les enzymes utilisées pour dégrader la lignocellulose sont appelées cellulases. Ces protéines sont généralement composées d'une structure modulaire avec un domaine catalytique. Et un domaine de liaison au substrat nommé C.B.M. pour « Carbohydrate Binding Modules ». Les deux domaines sont attachés l'un l'autre par une séquence protéique appelée lieur pour « linker ». Le mécanisme d'hydrolyse enzymatique de la cellulose implique l'action en synergie de différents types d'enzymes, les endoglucanases (EC 3.2.14), les exoglucanases ou cellobiohydrolases (EC 3.2.191) et les β -glucosidases (EC 3.2.121). Par synergie, il faut entendre que l'ensemble de ces enzymes (ou cocktail enzymatique) présente une activité globale supérieure à la somme des activités individuelles de ces mêmes enzymes. Chaque type d'enzyme catalyse des réactions différentes. Une grande partie du coût de cette transformation revient au coût élevé de production de cellulases (Hugues *et al.*, 2013). L'optimisation des conditions de cultures pour une meilleure production de cellulases thermophiles 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 (Islam *et al.*, 2019).

Cette étude porte sur l'optimisation de certains paramètres de production de cellulase par une souche thermophile. 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.

Partie
Bibliographique

Chapitre 1.

La cellulose

1.1. La cellulose

La cellulose est le polymère d'origine naturelle le plus abondant sur terre. Cette macromolécule est produite essentiellement par le processus biochimique de photosynthèse. Sa production annuelle est estimée entre 1011 et 1012 tonnes. Les molécules de cellulose sont présentes dans toutes les espèces végétales sous la forme de fibrilles avec des proportions très variables. Le bois (résineux ou feuillus) contient entre 40 et 50 % en masse sèche de cellulose alors que les fibres de coton entre 85 et 95 % (Krassig et Schurz, 2002). Les fibrilles cellulosiques assurent le soutien et la protection des parois cellulaires des végétaux. Ce polysaccharide est également bio synthétisé selon un processus différent par une bactérie. On trouve aussi de la cellulose sous une forme très cristalline dans certaines algues (Le Roux, 2003 ; Fischer, 2006).

1.2. La structure et la propriété de la cellulose

La cellulose est une macromolécule à très longue chaîne stéréo régulière et appartient à la famille des β -D glucanes. Elle est constituée exclusivement d'unités β -D -glucose reliées entre elle par des liaisons osidiques de type β (1-4). L'unité répétitive composée de l'association de deux monomères de glucoses, est appelée cellobiose (Figure 1) (Crépy, 2010). Le cellobiose (dimère de glucose) est le motif répétitif de la cellulose. Cette conformation explique la linéarité de la molécule qui se trouve stabilisée par un réseau de liaisons hydrogène inter moléculaires et intramoléculaires. Le nombre d'unités glucose constituant une chaîne de cellulose, appelé degré de polymérisation DP, dépend de l'origine et du traitement subi par la cellulose au cours de sa purification (Soumaya et Ladjama, 2014).

L'extrémité réductrice du polymère correspond à l'unité glucose dont l'hydroxyle en position anomérique est libre, la forme héli-acétate est en équilibre avec la forme aldéhyde réductrice minoritaire. L'extrémité non réductrice est nommée ainsi car le groupement hydroxyle anomérique est engagé dans une liaison osidique. Le nombre de maillons glucose, ou degré de polymérisation (DP) varie selon l'espèce végétale (Ghemati, 2011).

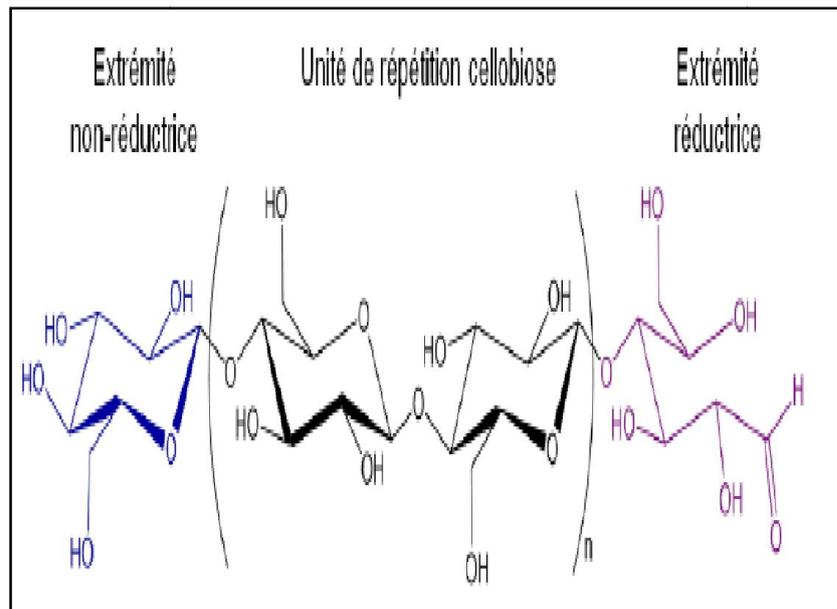


Figure 1. La chaîne de la cellulose (Mazza, 2009)

Les cellulases sont les enzymes responsables de l'hydrolyse de la cellulose et font partie de la famille des glycoside-hydrolases. Elles sont secrétées par des champignons, ou associées à la surface des micro-organismes où elles forment des cellulosomes (Claisse, 2012).

1.3. Nomenclatureur

Nom codifié : E.C.3.2.1.4

Nom systématique : 1,4-(1,3 ; 1,4)- β -D-Glucan 4-glucanohydrolase.

Nom recommandé : Cellulase.

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

1.4. Mode d'action

L'enzyme cellulase, un complexe multi-enzyme composé de plusieurs protéines, catalyse la conversion de la cellulose en glucose dans une hydrolyse enzymatique (Maryam *et al.*, 2018). Parmi les cellulases, trois types d'enzymes se distinguent par la particularité de leur mode d'action hydrolytique sur la cellulose.

1.4.1. Les endoglucanases (EG)

Sont des enzymes qui ont la propriété de réaliser des coupures aléatoires dans le milieu des chaînes de cellulose amorphe.

1.4.2. Les exoglucanases

(Nommé aussi les cellobiohydrolases) : (CBH) hydrolysent la cellulose de manière processive, c'est à dire qu'elles s'ancrent sur la chaîne de cellulose pour réaliser la dépolymérisation, et se déplacent le long de la chaîne. Les cellobiohydrolases I (CBHI) hydrolysent les chaînes en direction de leurs extrémités réductrices pour libérer du cellobiose, tandis que les cellobiohydrolases II (CBHII) agissent en direction de leurs extrémités non-réductrices.

1.4.3. Les β -(1,4)-glucosidases

(cellobiases) : hydrolysent le cellobiose ainsi que les cellodextrines solubles en glucose (Claisse, 2012).

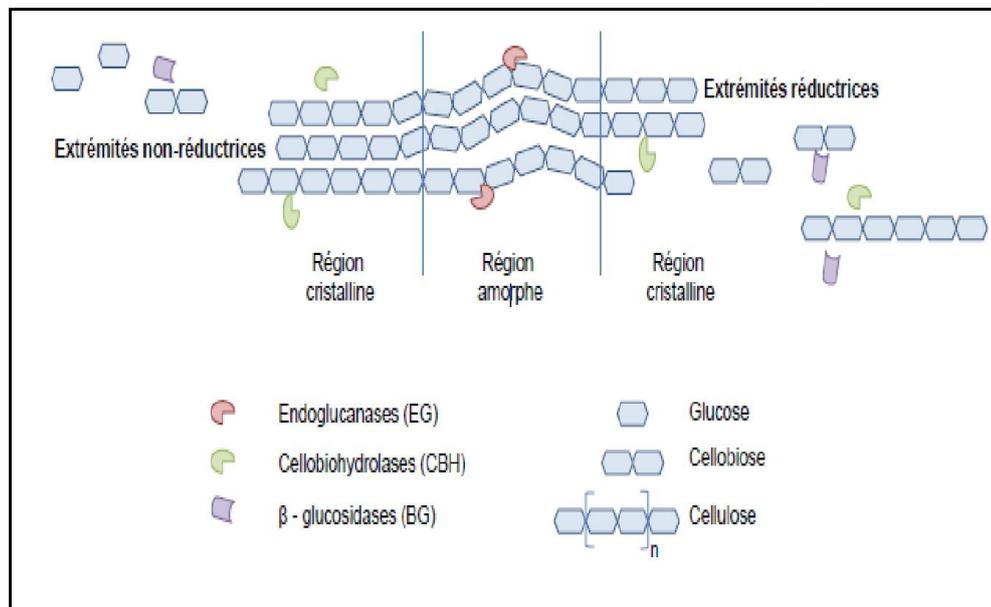


Figure 2. Mode d'action synergique des cellulase (Claisse, 2012)

1.5. Mécanisme d'action des cellulases

Le mécanisme d'action est de type acide/base, exigeant un donneur de proton et une base nucléophile (Figure 3). Cette hydrolyse se fait avec rétention ou inversion de la configuration anomérique. Les produits d'hydrolyse sont ainsi libérés par conservation ou inversion globale de la configuration anomérique du carbone alpha à l'extrémité réductrice.

L'hydrolyse enzymatique se fait en deux étapes réactionnelles : dans la première étape, la base nucléophile attaque le centre anomérique du substrat, d'autre part, le donneur de protons (un premier acide aminé de la cellulase) protone l'oxygène de la liaison osidique,

provoquant ainsi la coupure de la liaison C1 – O et la libération du premier fragment du substrat. Cependant, l'autre fragment, fixé à l'enzyme de façon instable, sera stabilisé par un second acide aminé de l'enzyme chargé négativement, qui arrache un hydrogène à une molécule d'eau formant ainsi un groupement hydroxyle (OH-) qui agit comme un nucléophile sur un carbone d'une molécule de glucose. La liaison glycosidique se trouve ainsi rompue et libère l'autre fragment du substrat (Leghlimi, 2013).

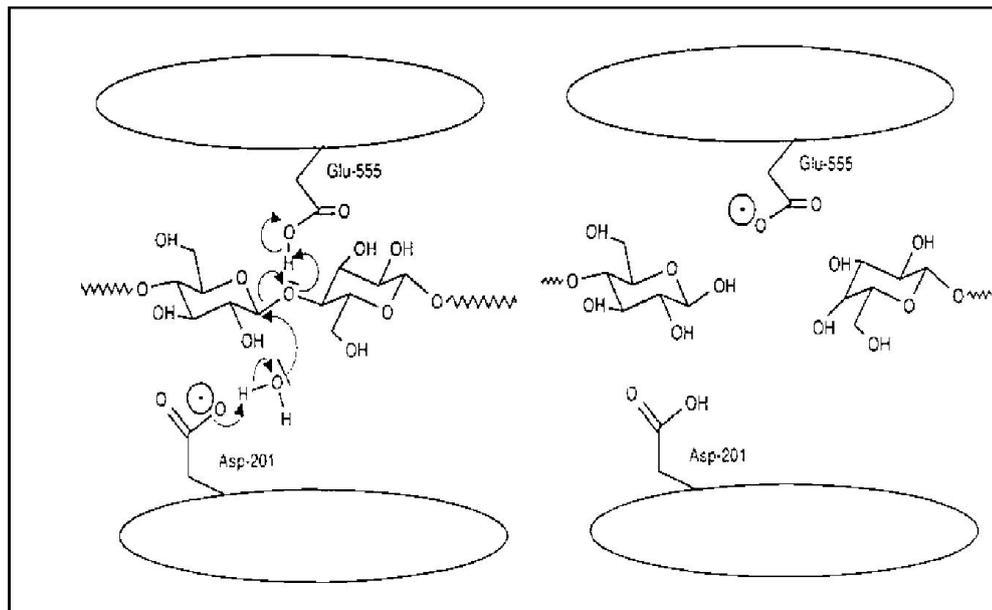


Figure 3. Mécanisme d'hydrolyse de la cellulose par la cellulase (Leghlimi, 2013)

Asp : Acide aspartique en position 201 de la séquence de l'enzyme.

Glu : Acide glutamique en position 555 de la séquence de l'enzyme.

1.6. Facteurs liés aux conditions opératoires

1.6.1. Inhibiteurs

L'inhibition de l'activité cellulolytique est engendrée par la présence de différents éléments tel que : Hg^{2+} , élément minéral qui peut être restauré en partant de la cystéine ou le NaCl (Eriksson et Peterson, 1968), le N-bromosuccinimide, l'arséniate, le sodium dodecylsulfate, le dithiothéitol, les dextrines etc (Schamburg *et al.*, 1991).

1.6.2. Activité enzymatique

L'activité cellulolytique est exprimée en unités internationales, qui correspond à la quantité d'enzyme produite, intervenant dans la dégradation de carboxyméthylcellulose en carbohydrate réduits (1 μ mole de glucose / minute) (Okada, 1976 ; Schulein, 1988).

1.6.3. PH optimum

La plupart des enzymes cellulolytiques caractérisés ont des valeurs de pH optimales de 3-7 (Lynd *et al.*, 2002). Cependant, les cellulases d'origine fongique ont des valeurs de pH optimale limitée de 4-5. Cependant, les valeurs de pH optimale de la cellulase bactérienne sont proches de la neutralité (Buchholz *et al.*, 1983).

1.6.4. Température optimale

Les enzymes cellulolytiques fongiques caractérisées ont 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). Applications industrielles des cellulases.

Tableau 1. Application de cellulase dans diverses industries (Kuhad *et al.*, 2011)

Industrie	Application
Agriculture	génération de protoplastes végétaux et fongiques; l'amélioration de la germination des graines et système racinaire amélioré; croissance et floraison accrues des plantes; amélioration de la qualité du sol; réduction de la dépendance à l'égard de engrais minéraux.
Bioconversion	Conversion de matériaux cellulosiques en éthanol, production d'aliments pour animaux riches en énergie; amélioration de la qualité nutritionnelle de l'alimentation animale; amélioration de la digestion et de l'absorption des aliments; conservation du fourrage de haute qualité.
Détergents	Détergents à base de Cellulase; une action de nettoyage supérieure sans endommager les fibres; amélioration de la luminosité des couleurs et élimination de la saleté.
Fermentation	Amélioration du maltage et de l'écrasement; amélioration du pressage et de l'extraction des couleurs des raisins; l'arôme amélioré des vins; amélioration de la fermentation primaire et de la qualité de la bière; l'amélioration de la viscosité et de la filtrabilité du moût; amélioré doit clarification dans la production de vin; amélioration du

	taux de filtration et de stabilité du vin.
Pâte et papier	Coaditive dans le blanchiment de pulpe; la pulpe biomécanique; réduction de l'énergie l'exigence; réduction des besoins en chlore; amélioration de la luminosité des fibres, l'amélioration du drainage dans les papeteries; production de carton biodégradable, de serviettes en papier et papier hygiénique.

Chapitre 2.
Les microorganismes
thermophiles et
cellulotiques

2.1. Généralité

La relation des organismes vivants à la température a longtemps été considérée en biologie comme un élément de base de classification. Trois groupes majeurs sont définis selon les températures optimales de croissance (Top) : les psychrophiles qui ont des Top inférieures à 20°C, les mésophiles qui poussent de façon optimale entre 20 et 45-55°C et les thermophiles. Traditionnellement, les organismes qui ont une température maximale de croissance Tmax supérieure à 50°C avaient été décrits comme thermophiles (Madigan *et al.*, 2003). Brock (1978) a proposé de fixer la limite de thermophile au-dessus de 60°C en se basant sur deux arguments :

- 1- Les températures en-dessous de cette limite sont courantes dans la nature alors que des températures plus élevées sont généralement associées à des activités géothermales et industrielles.
- 2- Certains invertébrés peuvent survivre à des expositions à des températures proches de 100°C, mais ne peuvent croître au-delà de 50°C.

Le monde thermophile serait alors strictement procaryote. Il est intéressant de noter que la gamme des températures correspondant à la thermophile couvre la moitié supérieure de l'échelle des températures compatibles avec la vie (Postec, 2005).

2.2. Les microorganismes thermophiles

Les organismes thermophiles non seulement tolèrent des températures élevées mais les requièrent, c'est-à-dire que de telles températures sont nécessaires à leur croissance et leur survie. En fonction de leur température optimale de croissance, sont précisément distingués les organismes thermophiles dont les optima de température se situent au-delà de 45°C et les organismes hyper thermophiles dont les optima de température dépassent les 80°C.

Des distinctions encore plus précises peuvent être effectuées entre thermophiles modérés, thermophiles extrêmes et hyper thermophiles ; les températures optimales de croissance de ces organismes se situent alors respectivement entre 40 et 60°C, entre 60 et 85°C et au-delà de 85°C.

Les limites supérieures de température qui permettent le développement de microorganismes eucaryotes, à savoir des champignons, ne dépassent pas les 60-62°C. Seule la vie procaryote s'avère capable de se développer au-delà de ces températures et le domaine *Archaea* est le plus représenté à mesure que la température de l'environnement augmente (Lossouarn, 2014).

2.3. Thermoenzyme

Les enzymes thermostables (thermo enzyme) sont des macromolécules issues de microorganismes thermophiles de nature protéique caractérisées par leur activité catalytique qui gouverne des réactions biochimiques spécifiques, Grâce à leurs caractéristiques physico-chimiques qui en font des outils particulièrement intéressants pour de nombreuses applications, les thermo-enzymes sont souvent plus stables, faciles à utiliser, elles permettent, d'une part, de réduire le nombre d'étapes dans certains procédés industriels, d'augmenter la productivité, et d'autre part d'accéder à des nouveaux domaines d'applications du fait de leurs résistances vis-à-vis de la température. Les principaux facteurs qui contribuent à la stabilité des enzymes thermophiles sont : l'augmentation du pairage ionique, l'augmentation des interactions hydrophobes (ex : à l'interface des sous-unités), une diminution du ratio surface/volume, l'augmentation du nombre de ponts disulfures et hydrogènes, une diminution des contraintes conformationnelles et une stabilité des boucles. Les enzymes thermostables arrivent au premier rang des molécules d'intérêt biotechnologique (Bouacem, 2016).

2.4. Les bactéries thermophiles cellulolytiques

Les premières caractérisations de bactéries en tant que cellulolytiques doivent être considérées avec précaution. En effet, ce terme a longtemps été utilisé pour désigner des micro-organismes possédant une activité endoglucanase qui est facilement détectable par l'utilisation de dérivés solubles de la cellulose tels que la carboxy méthylcellulose (CMC), alors qu'une enzyme active sur la CMC n'hydrolyse pas nécessairement la cellulose native cristalline. Une cellulolyse efficace de la cellulose native requiert nécessairement un ensemble d'activités enzymatiques de spécificités différentes. Les premières bactéries cellulolytiques isolées ont été des espèces thermophiles comme.

Clostridium thermocellum dont le potentiel d'application industrielle réside dans la fermentation de la cellulose en éthanol. La cellulolyse était estimée plus efficace et plus rapide chez les thermophiles que chez les mésophiles mais progressivement les recherches se sont tournées vers les bactéries mésophiles, des études ayant montré que la vitesse de dégradation de la cellulose par ces micro-organismes pouvait être comparable à celles des thermophiles (Desvaux, 2001).

La plupart des bactéries cellulolytiques thermophiles peuvent en fait être qualifiées d'extrêmes thermophiles puisque leur température optimale de croissance est généralement supérieure ou égale à 65° (Elle est par exemple de 65°C pour *Clostridium stercorarium* et de 80°C pour *Thermotoga gammatima* qui peut même se développer jusqu'à 90°C. Jusqu'à présent,

Acido thermus cellulolyticus et *Clostridium thermocellum* sont les deux seules bactéries cellulolytiques thermophiles faisant exception à cette règle puisque leur température optimale de croissance reste comprise entre 55 et 60°C (Desvaux, 2001).

La seule espèce de bactéries cellulolytiques acidophile est *Acidothermus*. Cette bactérie aérobie thermophile peut être qualifiée d'extrémophile puisque son pH optimal de croissance est de 5 mais qui peut croître et dégrader la cellulose jusqu'à pH 3 (Desvaux, 2001).

2.5. Quelques bactéries cellulolytiques

2.5.1. *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 (CO₂, H₂). 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*. *C. 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 haut poids moléculaire (2 millions de daltons) appelé cellulosome (Lamed *et al.*, 1983; Bayer *et al.*, 1983), Cet agrégat est résistant à la plupart des agents dénaturants mais un traitement en présence du dodécyl sulfate de sodium (SDS) au-dessus de 70°C permet de dissocier le complexe (Lamed *et al.*, 1983), ont observé que la composition polypeptidique du cellulosomes varie avec la source de carbone présente dans le milieu de culture. Les cellulases de *C. thermocellum* ne sont pas sensibles à l'oxygène.

2.5.2. *Bactériode succinogenes*

qui est capable de dégrader les celluloses les plus cristallines. Elle adhère fortement aux fibres de cellulose. Le système cellulolytique de cet organisme semble particulièrement complexe (Schellhorn et Forsberg, 1984). Elle fermente le cellobiose, le glucose et quelques souches sont capables d'utiliser les pectines et l'amidon mais pas les xylanes (Tchunden, 1990).

2.5.3. *Ruminococcus*

sont capables d'assimiler de nombreux substrats carbonés. *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens* sont capables d'utiliser le xylane et le cellobiose mais ne fermentent pas les oses simples. De plus, *Ruminococcus albus* stocke les réserves sous la forme de granules intracellulaires de glycogène (Tchunden, 1990).

2.5.4. *Acetivibrio cellulolyticus*

Bactérie anaérobie mésophile ne semble capable de fermenter que la salicine, le cellobiose et la cellulose en produisant principalement de l'acide acétique et des gaz (H₂, CO₂). Mais il est possible d'adapter cette souche à pousser sur glucose; de plus cette bactérie présente une forte activité cellulase sur différents types de substrats cellulotiques.

Les bactéries aérobies et aérobies-anaérobies facultatives comprennent les genres *Pseudomonas*, *Cellvibrio* et *Cellulomonas* (Tchunden, 1990).

2.5.5. Les *Cellulomonas*

Sont des organismes capables d'utiliser de nombreuses sources de carbone et entre autres les hémicelluloses comme le xylane (Richard et Lauglin, 1980; Richard et Peiris, 1981), La fermentation de ces sucres conduit à la production d'acétone, de lactate, de formiate, de succinate, d'éthanol et de gaz carbonique.

Les protéines cellulaires de plusieurs souches de *Cellulomonas* sont très riches en lysine et acides aminés essentiels par rapport aux normes de la FAO (Tchunden, 1990).

Partie

Expérimentale

Chapitre 3.

Matériel et méthodes

3.1. Prélèvement d'échantillon d'eau

Des échantillons d'eau et de sol ont été recueillis dans des conteneurs stériles à partir d'une source chaude égyptienne, Hammam pharaon, au Sinaï dessert à l'est de l'Égypte sur la plage de la mer rouge. La température de l'eau était comprise entre 70° C et 90°C selon le site de collecte. Le pH de l'eau était d'environ 7,5, pour l'isolement de souches bactériennes productrices de cellulases thermophiles (Ibrahim et El-diwany, 2007).

3.2. Isolement direct

Les échantillons de sol recueillis ont été suspendus et dilués en série dans de l'eau distillée stérile jusqu'à 10^{-4} . 100 µl de chaque échantillon de dilution et d'eau (sans dilution) ont été étalés sur des plaques d'agar et incubés à 70 ° C pendant 1-2 semaine. Les plaques ont été colorées au rouge Congo, décolorées avec une solution de NaCl 1 M et notées pour un halo clair entourant la colonie (Ibrahim et El-diwany, 2007).

3.3. Enrichissement

Pour l'enrichissement des échantillons d'eau et de sol par des souches bactériennes productrices de cellulases thermophiles, 5 g de CMC et 5 g d'avicel ont été ajoutés à des échantillons de sol / eau, mélangés et incubés pendant 3-4 semaines à 70 ° C. Les échantillons ont été dilués dans de l'eau distillée stérile, étalés sur milieu gélose et incubés à 70°C pendant 1-2 semaine. Le milieu gélose contient: acide nitrilotriacétique (100 mg / l), CaSO (60 mg / l), MgSO (100 mg / l), KNO₃ (103 mg / l), NaNO₂ (689 mg / l), Na₂HPO₄ (111 mg / l), MnSO (2,2 mg / l), ZnSO₄ (0,5 mg / l), CuSO (0,016 mg / l), H₃BO₃ (mg / l), Na₂MoO₄ (0,025 mg / l), CoCl (0,046 mg / l), FeCl (0,28 mg / l), 1 g / l trypton, 1 g / l extrait de levure, 10 g / l de CMC et gélose 25 g / l (Ibrahim et El-diwany, 2007) .

3.4. Identification bactérienne

Les isolats bactériens sont identifiés au moyen d'un examen morphologique et de certaines caractérisations biochimiques. Les paramètres étudiés comprenaient la morphologie coloniale, la réaction de Gram, la formation d'endospores, la production de catalase, la réaction de Voges Proskauer (VP), la production d'indole, l'hydrolyse de l'amidon, l'utilisation du citrate et l'hydrolyse de la gélatine. Les résultats ont été comparés au Manuel de Bergey sur les bactéries déterminantes (Nandimath *et al.*, 2016).

3.5. Milieu de production d'enzymes

Les bactéries ont été cultivé dans un milieu contenu (g / L) glucose 0,5 g, peptone 0,75 g, FeSO₄ 0,01 g, KH₂PO₄ 0,5 g et MgSO₄ 0,5 g. Dix millilitres de milieu ont été prélevés dans une fiole conique de 100 ml. Les flacons étaient stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant

15 min. Après refroidissement, le flacon a été inoculé avec une culture bactérienne cultivée pendant une nuit. Le milieu inoculé a été incubé à 37°C dans un agitateur incubateur pendant 24 h. À la fin de la période de fermentation, le milieu de culture a été centrifugé à 5000 tr / min pendant 15 min pour obtenir l'extrait brut, qui a servi de source d'enzyme (Sethi *et al.*, 2013).

3.6. Estimation de l'activité de la cellulase par la méthode DNS

Les souches bactériennes sélectionnées ont été inoculées dans un milieu de production d'enzyme contenant la composition suivante : 20 g de carboxyméthylcellulose, 5 g d'extrait de levure 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 g de K_2HPO_4 , 10 g de NaCl dans 1000 ml à pH 7 et incubés pendant une nuit à 37 ° C dans un agitateur. Après incubation, la culture a été centrifugée et le surnageant a été utilisé pour le dosage de la cellulase (Lokhande *et al.*, 2017).

3.7. Dosage enzymatique

Un essai sur papier filtre a été utilisé pour estimer l'activité totale de la cellulase dans l'extrait brute. Un papier filtre de dimension 1,0 ×6 cm (50 mg) ont été placés dans chaque tube à essai. La bande de papier filtre Whatman était saturée de 0,5 ml de tampon Na-citrate (0,05 M, pH 4,8) et a été équilibré pendant 10 min à 50 ° C dans un bain d'eau. 0,5 ml de l'extrait brut dilué de manière appropriée (dans un tampon Na – citrate, 0,05 M; pH 4,8) a été ajoutée au tube et incubée à 50 ° C pendant 60 min. Des contrôles appropriés sont également été effectués avec le test. À la fin de la période d'incubation, les tubes ont été retirés du bain-marie, et la réaction a été arrêtée par addition de 3 ml de 3,5-dinitrosalicylic acide par tube. Les tubes ont été incubés pendant 5 min dans un bain d'eau bouillante pour le développement de la couleur et ont été refroidis rapidement. Le mélange réactionnel a été dilué de manière appropriée et a été mesurée contre un blanc à 540 nm dans un spectrophotomètre UV-VIS.

La concentration de glucose libérée par l'enzyme a été déterminée en comparant avec une courbe standard construite de façon similaire avec des concentrations connues de glucose. Une unité de l'activité cellulase a été définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 μ M de glucose par millilitre par minute et a été exprimé en U/g (unités par gramme de substrat sec) (Mekala *et al.*, 2008).

3.8. Optimisation de la production de cellulase

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

Différentes sources de carbone telles que saccharose, maltose, glucose et cellobiose et sources d'azote telles que $(NH_4)_2SO_4$, peptone, extrait de levure et $NaNO_3$ ont été incorporés

à une concentration finale de 0,5% (w / v) dans le milieu de production. La bactérie a été cultivée dans le milieu avec différentes sources de carbone et d'azote pendant 96 h à température ambiante. Les surnageant était collectés par centrifugation et utilisés pour l'estimation de l'activité cellulase (Mekala *et al.*, 2008).

3.8.2. Effet de la température

Pour déterminer la température optimale pour la production de cellulase, la fermentation est effectuée à différentes températures : 25°C, 35°C, 45°C, 55°C et 65°C (Shaikh *et al.*, 2013).

3.8.3. Effet des ions métalliques sur la production de cellulase

Normalement, le support de production contient CaCl₂, MgSO₄, FeSO₄, MnSO₄ et ZnSO₄. Dans la présente étude pour améliorer la production de cellulase Chlorure de calcium, magnésium sulfate, sulfate ferreux, sulfate manganéux, sulfate de zinc, Chlorure de baryum, sulfate de cuivre, chlorure mercurique et EDTA ont été testés comme source d'ions métalliques. Ils étaient incorporés individuellement dans le milieu de production à la concentration de 0,02%. L'effet a été déterminé après 48 h d'incubation (Sreeja *et al.*, 2013).

3.8.4. Effet de la concentration de carboxyméthylcellulose sur la production de cellulase

Trois concentrations différentes de carboxyméthylcellulose, à savoir 0,5, 1,0 et 1,5% étaient inclus dans le support de production et l'activité de la cellulase a été estimée à l'aide de la méthode décrite plus haut (Karthikeyan *et al.*, 2010).

3.8.5. Effet de la période d'incubation sur la production d'enzyme

La période de fermentation est un paramètre important pour la production de cellulases. Dans cette étude, des cultures de *Aspergillusniger* et *Trichodermasp.* ont été incubées jusqu'à 7 jours et le taux de production a été mesuré à des intervalles de 24 h. (Gautam *et al.*, 2011).

3.8.6. Effet de la concentration du substrat

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 4.

Résultats et discussion

4.1. Isolement de bactéries thermophiles productrices de cellulases

Les thermophiles sont adaptés pour survivre à haute température dans les sources chaudes. Ces micro-organismes produisent des biocatalyseurs uniques qui fonctionnent dans des conditions extrêmes comparables à celles qui prévalent dans divers processus. Les enzymes des thermophiles présentent donc un grand intérêt pour les applications industrielles (Haki et Rakslit, 2003).

Des bactéries thermophiles productrices de cellulases ont été isolé en incubant des échantillons de sol et d'eau d'une source chaude de Hammam pharaon avec de la cellulose pendant environ 4 semaines à 70 ° C. Trois souches différentes ont montré des zones claires après coloration au rouge Congo (Fig.1). Ces résultats indiquent clairement le faible nombre de producteurs de cellulases dans cette source chaude, ce qui est probablement dû à la faible teneur de matière organique dans les échantillons d'eau de la source chaude et a indiqué l'importance d'une étape d'enrichissement pour l'isolement de cellulases (Kazue *et al.*, 2006).

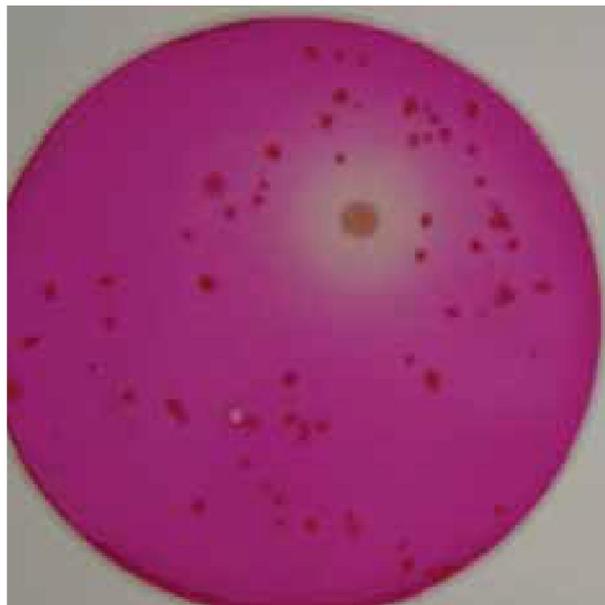


Figure1. Isollements des bacteries thermophiles productrice de cellulase (Kazue *et al.*, 2006)

4.2. Identification des isolats bactériens

Parmi 40 bactéries différentes productrices de cellulases, les souches 2b et 38b étaient prometteuses et ont fait l'objet d'une caractérisation de leurs propriétés morphologiques, culturelles et biochimiques. Les résultats sont présentés dans le tableau1. Sur la base des caractères morphologiques, culturels et biochimiques, les isolats 2b et 38b ont été identifiés comme *Pseudomonas sp* et *Bacillus sp* (Nandimath *et al.*, 2016).

Tableau1. Caractérisation biochimique des bactéries productrices de cellulase
(Nandimath *et al.*, 2016)

S/N	Test biochimique	<i>Pseudomonas sp.2b</i>	<i>Bacillus sp.38b</i>
1	Coloration Gram	Tiges à Gram négatif	Tiges à Gram négatif
2	La motilité	Motile	Motile
3	Production d'indole	Positif	Negatif
4	Rouge de méthyle	Négatif	Positif
5	VogesProskauer	Positif	Positif
6	Utilisation du citrate	Positif	Négatif
7	Oxydase		Positive
8	Formation endospore	Négatif	Positive, central non bulging spore
9	Catalase	Positif	Positif
10	Hydrolyse de la gélatine	Positif	Positif
11	Hydrolyse de l'amidon	ND	Positif
12	Uréase	Positif	Négatif
13	Réduction des	ND	ND

	nitrate		
14	Production de H ₂ S	Négatif	Négatif
15	Tests de fermentation des glucides	-	-
A	Arabinose	Négatif	Positif
B	Xylose	Négatif	Positif
C	Maltose	Négatif	Positif
D	Saccharose	Négatif	Positif
E	Mannitol	ND	Positif
F	Glucose	Positif	Négatif
G	Lactose	Négatif	Négatif

4.3. Les conditions d'optimisation de la production de cellulase

4.3.1. Effet de la température

Les données illustrées dans la Figure 2 indiquent clairement que l'optimum de production de cellulase par *Bacillus* sp CDB27 est enregistré à 40°C. Contre chez la souche *Bacillus* sp CDB30, l'activité enzymatique augmente progressivement avec l'augmentation de la température et atteint un optimum à 50 °C.

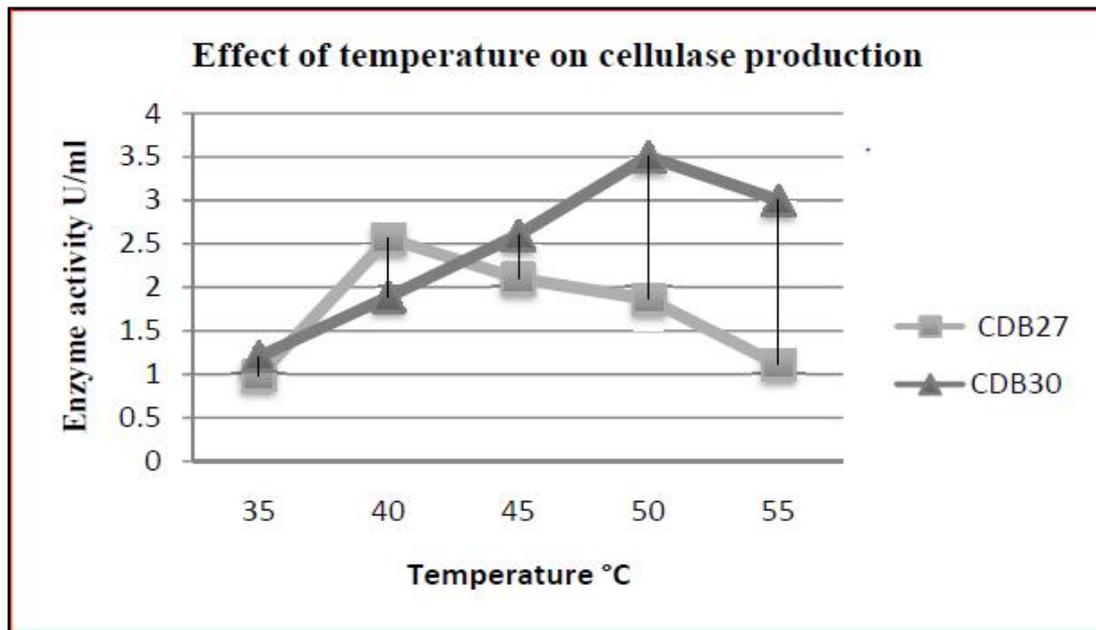


Figure2. Effet de la température sur la production de cellulase par *Bacillus sp.* et CDB 27 et CDB 30 (Shaikh *et al.*, 2013)

4.3.2. Effet des sources de carbone sur la cellulase production

Des sources de carbone telles que le glucose, le saccharose, le maltose et la cellobiose à une concentration finale de 0,5% (p/v) a été incorporé dans le milieu et la bactérie a été cultivée pendant différentes périodes comme 24, 48, 72 et 96 h. La bactérie *Cornybacterium lipophiloflavum* a produit la plus grande quantité d'enzyme cellulase (14,1 U/mL) dans le milieu incorporé de glucose après 72 h d'incubation suivie du milieu incorporé avec la cellobiose et le saccharose. Le maltose induit le moins d'activité cellulase parmi les sources de carbone utilisées (0,72 U / ml) (Fig.3). La production de cellulase la plus élevée a été observée 72 h après incubation. La quantité d'enzyme produite a diminué lorsque le temps d'incubation est diminué ou augmenté à partir de 72 h (Mekala *et al.*, 2008).

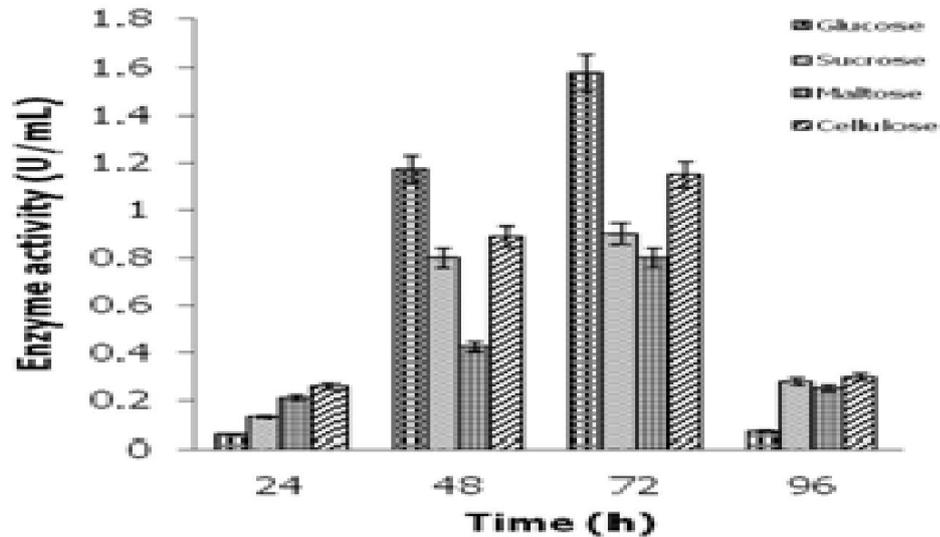


Figure3. Effet des carbonne sur la production de cellulase (Assareh *et al.*, 2012)

4.3.3. Effet des sources d'azote sur la production de cellulase

Différentes sources d'azote telles que la peptone, l'extrait de levure, le sulfate d'ammonium et le nitrate sodium ont été incorporés dans le milieu à une concentration finale de 0,5% (p/v) et incubé pendant 24, 48, 72 et 96 h. Comme le montre la figure 3, la bactérie a produit le plus haut niveau de cellulase dans le milieu incorporé à l'extrait de levure suivi de peptone (0,392 U/ml et 0,27 U/ml) (Fig.4). Le sulfate d'ammonium et le nitrate de sodium n'ont pas du tout induit la production d'enzyme. La production de cellulase est plus prononcée après 72h et elle diminué si le temps d'incubation est diminué ou augmenté à partir de 72 h (Mekala *et al.*, 2008 ; Assareh *et al.*, 2012).

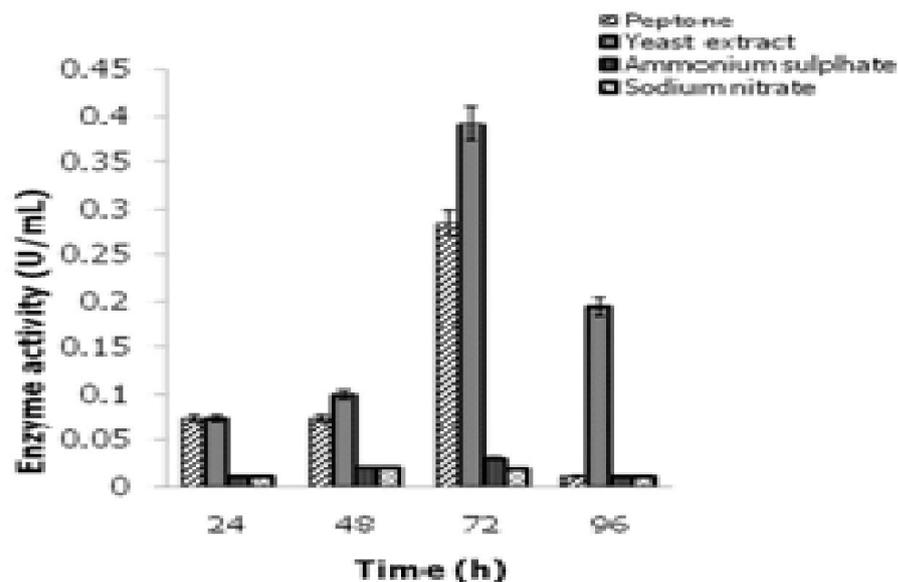


Figure 4. Effet des sources d'azote sur la production de cellulase (Assareh *et al.*, 2012)

4.3.4. Effet des ions métalliques

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 manganèse 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 milieux ensemencés respectivement par *B. altitudinis* et *B. licheniformis* (Fig. 5) (Sreeja *et al.*, 2013).

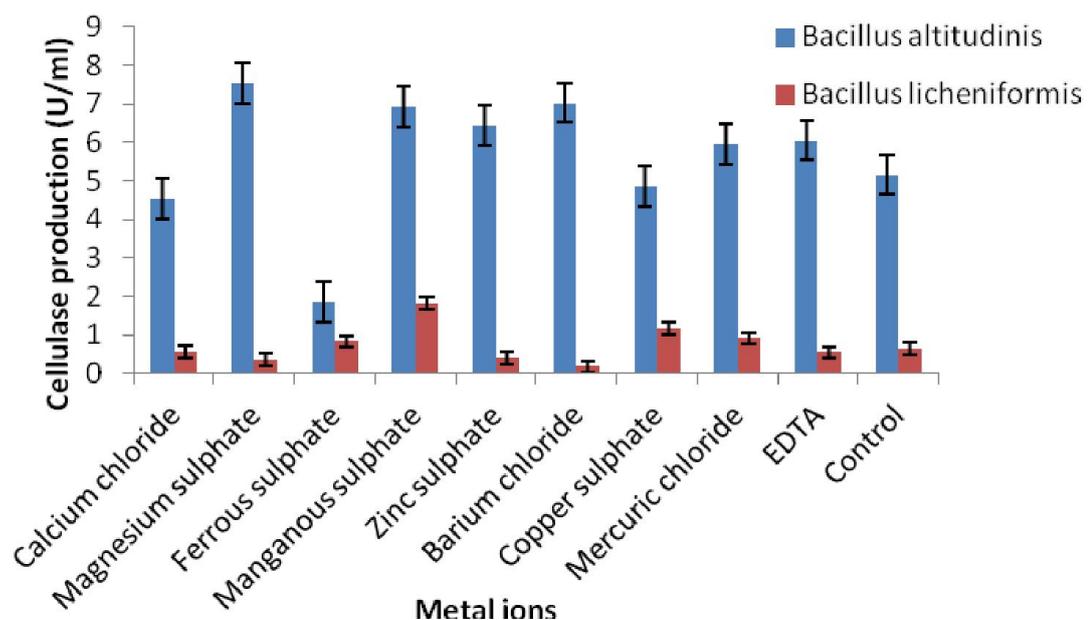


Figure 5. Effet des sels métalliques des surfactants sur la production de cellulase par *B. altitudinis* et *B. licheniformis* (Sreeja *et al.*, 2020).

Les ions métalliques tels que Ca, Mg, Fe, Co et Zn étaient nécessaires à la synthèse de la cellulase par *Trichoderma viride* QM6a (Mandel et Reese, 1999).

Li *et al.* (2012) ont rapporté que la production de cellulase par *Bacillus thuringiensis* est activée par K⁺ et Mn⁺.

4.3.5. Effet de la concentration du substrat

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. 6) (Soni *et al.*, 1999).

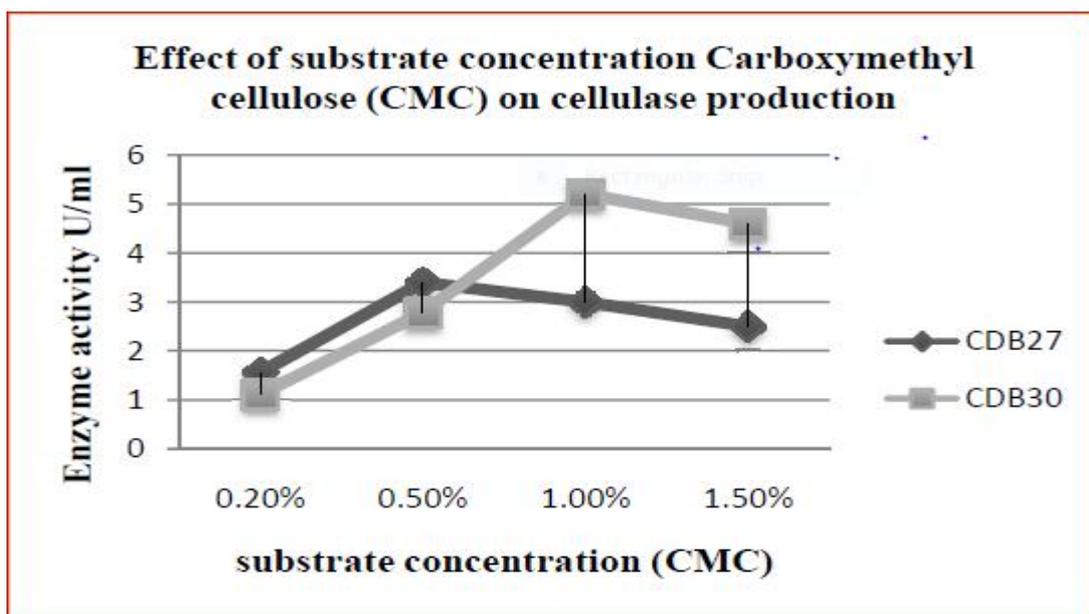


Figure 6. Effet de concentration du carboxyméthyle cellulose sur la production de cellulase par la souche *Bacillus* sp. CDB27 et CDB30 (Shaikh *et al.*, 2013)

4.3.6. 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 figure 7.

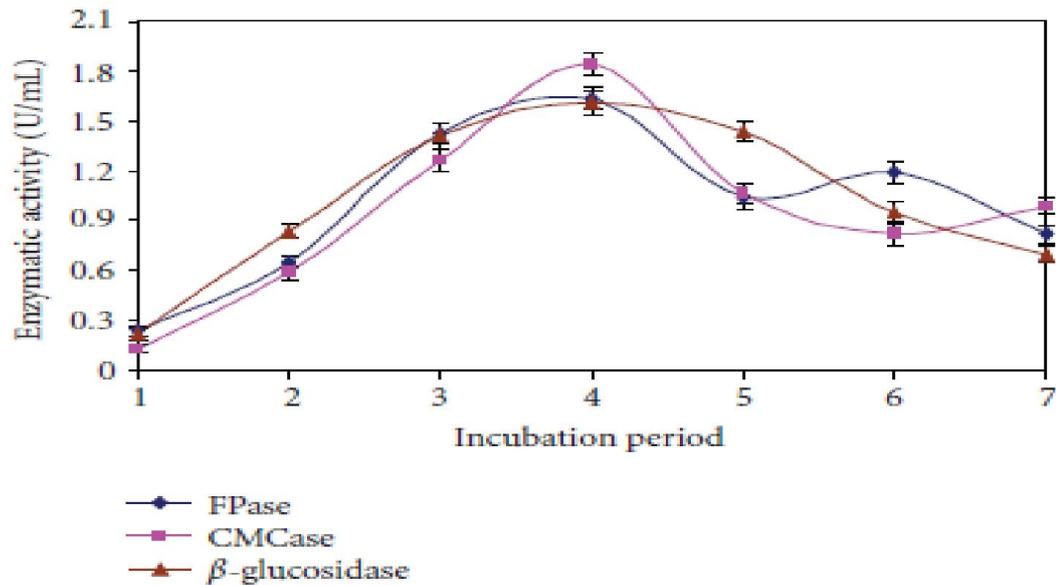


Figure 7. Effet de la période d'incubation sur la production de cellulase (U/ml) par *Aspergillus niger* (Gautam *et al.*, 2011)

Une augmentation de production de différents types de cellulase est observée pendant les premiers jours pour atteindre un maximum entre le troisième et le cinquième jour pour la β-glucosidase (1,61 U/ml), et le quatrième jour pour l'exoglucanase (1,64 U/ml) l'endoglucanase (1,84 U/ml) (Soni *et al.*, 1999). La période optimale de production de cellulases par *Trichoderma* est de 5 jours (Gautam *et al.*, 2011). Ces périodes conviennent d'un point de vue économique. La diminution de la production de cellulases au-delà de ces périodes pourrait être due à l'épuisement des nutriments dans le milieu. (Ray *et al.*, 2007)

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. Des bactéries dégradant la cellulose ont été isolées du sol parmi 40 isolats bactériens différents. Deux des isolats, 2b et 38b, ont montré des activités cellulases élevées. La souche 2b a été qualifiée pour appartenir à *Pseudomonas* sp. Et la souche 38b à *Bacillus* sp.

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 (3.4U/ml) et à pH 5 pour la souche *Bacillus* sp CDB30 (5,4U/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 à *Bacillus* sp.

Une concertation de substrat CMC de 1% donne la meilleure production de cellulases par la souche *Bacillus* sp. CDB27. La quantité maximale de production d'enzyme a été observée dans un milieu au sulfate de magnésium.

Pour l'effet de période d'incubation les résultats indiquent que la production optimale d'enzyme observée dans les premiers jours. Ces périodes conviennent d'un point de vue économique. La diminution de la production de cellulases après un temps prolongé d'incubation pourrait être dû à l'épuisement des nutriments dans le milieu.

Bibliographie

- 1-Ando S., Ishia H., Kosugi Y. IshikawaK .2002. Hyper thermostable endoglucanase from *pyrococcus horikoshii*. Applied and environmental microbiology. 86(1) p : 430-433.
- 2- Buchholz K. Rapp P., Zadrzil F.1983. Methods of enzymatic analysis. Volume II.. Edition Bergmaeyer, H.U. Verlag chemie, Weinheim. P : 178-180. 7 - BAYER, E.A, R KENIG and R IAMED. 1983. J. Bacteria 1. 156 : 818-827.
- 3- Bouacem, K. (2016). Caractérisation de souches bactériennes isolées à partir de sources thermales du Nord-Algérien" étude des propriétés enzymatiques" (Doctoral dissertation).
- 4 - Brock, T. D. 1978. Thermophilic microorganisms and life at high temperatures. New-York, USA: Springer-Verlag.
- 5 - BAYER, E.A, R KENIG and R IAMED. 1983. J. Bacteria 1. 156 : 818-827.
- 6 -Berlioz, S. (2007). *Etude de l'estérification de la cellulose par une synthèse sans solvant. Application aux matériaux nanocomposites* (Doctoral dissertation).
- 7 -Claisse, N. (2012). Préparation et modification d'oligosaccharides de cellulose par chimie douce bio-inspirée (Doctoral dissertation, Grenoble).
- 8 -Crépy, L. (2010). Conception et mise en forme de nouveaux matériaux à partir de macromolécules naturelles (Doctoral dissertation, Artois).
- 9 -Diallo, M. D., Saleh, M. M., Bassene, C., Wood, S. A., Diop, A., &Guisse, A. (2015). Influence de la litière foliaire de cinq espèces végétales tropicales sur la diversité floristique des herbacées dans la zone du Ferlo (Senegal). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9(2), 803-814.
- 10-Desvaux, M. (2001). La fermentation de la cellulose par *Clostridium cellulolyticum*: Métabolisme modèle d'un *Clostridium cellulolytique* mésophile (Doctoral dissertation, Université Henri Poincaré-Nancy 1).

- 11-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.
- 12 -Eriksson K.E. ,Petersson G .1968. Studies on cellulolytic enzymes archi biochemibiophy, 124,p : 160-166. homologiesHypothesis on phytochrome-mediated signal-transduction. *FEBS letters*, 281(1-2), 245-249.
- 13-Fischer, F. (2006). Synthèse et étude de matériaux nanostructurés à base d'acétate de cellulose pour applications énergétiques (Doctoral dissertation)
- 14 -Ghemati, D. (2011). Modification chimique des polymères cellulosique: griffage et formation de complexes d'inclusion avec la cyclodextrine (Doctoral dissertation).15 -Gautam, S. P., Bundela, P. S., Pandey, A. K., Khan, J., Awasthi, M. K., &Sarsaiya, S. (2011). Optimization for the production of cellulase enzyme from municipal solid waste residue by two novel cellulolytic fungi. *Biotechnologyresearch international*, 2011.
- 16 -Hardy, N. (2016). *Identification des critères d'extrapolation du procédé de production de cellulases par Trichodermareesei en utilisant l'approche «scale-down»* (Doctoral dissertation).
- 17 - Hugues, P., Rousseau, J., &Assoumou, E. (2013). Le secteur bioénergie français. Technologies et ressources pour répondre à la demande en 2050.
- 18 - Islam, M., Sarkar, P. K., Mohiuddin, A. K. M., &Suzauddula, M. (2019). Optimization of fermentation condition for cellulase enzyme production from Bacillus sp. *Malaysian Journal of Halal Research*, 2(2), 19-24
- 19 - 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), 473-4783
- 20 -Koppram, R., Tomás-Pejó, E., Xiros, C., & Olsson, L. (2014). Lignocellulosic ethanol production at high-gravity: challenges and perspectives. *Trends in biotechnology*, 32(1), 46-53.

- 21 -Kapseu, C., Djongyang, N., Nkeng, G. E., Petsoko, M., & Egbe, D. A. M. (2012). *Energies renouvelables en Afrique subsaharienne*. Paris: Harmattan.
- 22 -Kuhad, R. C., Gupta, R., & Singh, A. (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme research*, 2011
- 23 -Krassig H., Schurz J., 2002, Cellulose, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th ed, Wiley.
- 24 -Lokhande, S., & Pethe, A. S. (2017). Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production. *International J. of Life Sciences*, 5(2), 277-282
- 25 -Lossouarn, J. (2014). Découverte et caractérisation des premiers virus de Thermotogales (bactéries thermophiles et anaérobies) issus de sources hydrothermales océaniques profondes (Doctoral dissertation).
- 26 -Leghlimi, H. (2013). Cellulases de souches fongiques issues du sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales). Sélection des souches et étude des caractéristiques des enzymes (Doctoral dissertation, Reims).
- 27 -Le Roux, J. (2003). Modification des fibres cellulosiques: amélioration des propriétés hydrophiles des pâtes bisulfites (Doctoral dissertation, Bordeaux 1).
- 28 -Lynd, L. R., Weimer P. J., VAN, ZYL., W. H., Pretorius I.S. 2002. Microbial cellulose utilization : Fundamentals and biotechnology and molecular biology reviews, 66(3), p: 506-577.
- 29 -Lamed, R, E. setter) r kenlgand e.abayer 1983 b. biotechnol. bioengin. symp. 13: 163-181.
- 30 - Maryam, B., Qadir, A., Zameer, M., Ahmad, S. R., Nelofer, R., Jamil, N., ... & Afzaal, R. (2018). Production of Cellulases by *Bacillus cellulosilyticus* Using Lignocellulosic Material. *Polish Journal of Environmental Studies*, 27(6).
- 30 -Mazza, M., (2009). Modification chimique de la cellulose en milieu liquide ionique et CO₂ supercritique. Thèse de doctorat Sciences des agro ressources, Toulouse, 171p

- 31-Mekala, N. K., Singhania, R. R., Sukumaran, R. K., & Pandey, A. (2008). Cellulase production under solid-state fermentation by *Trichoderma reesei* RUT C30: statistical optimization of process parameters. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151(2-3), 122-131
- 34 - Meunier, F. (2008). *Les énergies renouvelables*. Le Cavalier bleu.
- 35 -Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. 2003. Brock, Biology of Microorganisms, 10th ed. Prentice-Hall International, Upper Saddle River, New Jersey, USA.
- 36 -Mekala, N. K., Singhania, R. R., Sukumaran, R. K., & Pandey, A. (2008). Cellulase production under solid-state fermentation by *Trichoderma reesei* RUT C30: statistical
- 37 -Nandimath, A. P., Kharat, K. R., Gupta, S. G., & Kharat, A. S. (2016). Optimization of cellulase production for *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. soil isolates. *African Journal of Microbiology Research*, 10(13), 410-419.
- 38 -Okada. G. 1976. J. Bbiochem,80 , p : 913-922.
- 39 -Postec, A. (2005). Diversité de populations microbiennes thermophiles d'une cheminée hydrothermale océanique: cultures d'enrichissement en bioréacteur et isolement d'espèces nouvelles (Doctoral dissertation, Aix-Marseille 1).
- 40 -RICHARD, P,AD, and S.P. PEIRIS . 1981. Biotechno 1. lett, 3 : 39-44
- 41- RICHARD, P.AD. et T.A LAUGHLIN , 1980.Dans les" Polymères Végétaux" , B. Montiès (ed.), Gauthier, Villars 46-65.
- 41-Soumaya, H., &Ladjama, A. (2014). Production, optimisation et étude de xylanases chez une nouvelle souche d'Actinomycète thermophile isolée du compost de poulet (Doctoral dissertation, Université Badji Mokhtar-Annaba).
- 42 -Sethi, S., Datta, A., Gupta, B. L., & Gupta, S. (2013). Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil. *International Scholarly Research Notices*, 2013.

- 43 - Shaikh, N. M., Patel, A. A., Mehta, S. A., & Patel, N. D. (2013). Isolation and Screening of Cellulolytic Bacteria Inhabiting Different Environment and Optimization of Cellulase Production. *Universal Journal of Environmental Research & Technology*, 3(1).
- 44 -Sreeja, S. J., Jeba, M. P. W., Sharmila, J. F. R., 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*. *Int J Adv Res & Technol*, 2(4), 401-6
- 45 -Sakthivel, M., Karthikeyan, N., Jayaveny, R., &Palani, P. (2010). Optimization of culture conditions for the production of extracellular cellulase from *Corynebacterium lipophilum*. *Journal of Ecobiotechnology*.
- 46 -Soni, R., Sandhu, D. K., &Soni, S. K. (1999). Localisation and optimisation of cellulase production in *Chaetomium erraticum*. *Journal of biotechnology*, 73(1), 43-51.
- 47 -Schamburg D., Salzman M G B F. (1991).Cellulase. *In: Enzyme Handbook, Vol IV*.Springer-Verlag Berlin, p: 1-11
- 48 - Schneider-Poetsch, H. A., Braun, B., Marx, S., & Schaumburg, A. (1991). Phytochromes and bacterial sensor proteins are related by structural and functional
- 49 -Schamburg. D., Salzmann. M.G.B.F.1991. Cellulasep : 1-11. *In : Enzymes HandBook . Volume IV* Springer-Verlag Berlin.
- 50 -Schulein.M. 1988. *Methods enzymol*, 160, p : 234-242.
- 51 -SCHELIHORN) H,E, and C.W, FORSBERG, 1984 *Can, J. Microbiol.* 30: 930-937.
- 51 -Tchunden, J. (1990). Cellulolyse Anaérobie Mésophile: étude de l'amélioration de la production de cellulases par *Cl. cellulolyticum* ATCC 35319 (Doctoral dissertation, - Université Henri Poincaré-Nancy 1).
- 52 -Vechiu, I. (2005). Modélisation et analyse de l'intégration des énergies renouvelables dans un réseau autonome (Doctoral dissertation).

Annexes

Annexe 1 : Les articles utilisé dans la partie expérimentale

- 1 Assareh, R., Zahiri, H. S., Noghabi, K. A., & Aminzadeh, S. (2012). Characterization of the newly isolated *Geobacillus* sp. T1, the efficient cellulase-producer on untreated barley and wheat straws. *Bioresource technology*, 120, 99-105.
- 2 Das, A., Bhattacharya, S., & Murali, L. (2010). Production of cellulase from a thermophilic *Bacillus* sp. isolated from cow dung. *AM Eurasian J Agric Environ Sci*, 8, 685-691.
- 3 El-Ghonemy, D. H., Ali, T. H., & Moharam, M. E. (2014). Optimization of culture conditions for the production of extracellular cellulases via solid state fermentation. *Microbiology Research Journal International*, 698-714. *Journal of Applied Sciences*, 7(1), 56-62.
- 4 Gautam, S. P., Bundela, P. S., Pandey, A. K., Khan, J., Awasthi, M. K., & Sarsaiya, S. (2011). Optimization for the production of cellulase enzyme from municipal solid waste residue by two novel cellulolytic fungi. *Biotechnology research international*, 2011.
- 5 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
- 6 Lokhande, S., & Pethe, A. S. (2017). Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production. *International J. of Life Sciences*, 5(2), 277-282
- 7 Mekala, N. K., Singhanian, R. R., Sukumaran, R. K., & Pandey, A. (2008). Cellulase production under solid-state fermentation by *Trichoderma reesei* RUT C30: statistical optimization of process parameters. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151(2-3), 122-131

-
- 8 Nandimath, A. P., Kharat, K. R., Gupta, S. G., & Kharat, A. S. (2016). Optimization of cellulase production for *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. soil isolates. *African Journal of Microbiology Research*, 10(13), 410-419
- 9 Sethi, S., Datta, A., Gupta, B. L., & Gupta, S. (2013). Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil. *International Scholarly Research Notices*, 2013.
- 10 Shaikh, N. M., Patel, A. A., Mehta, S. A., & Patel, N. D. (2013). Isolation and Screening of Cellulolytic Bacteria Inhabiting Different Environment and Optimization of Cellulase Production. *Universal Journal of Environmental Research & Technology*, 3(1).
- 11 Sreeja, S. J., Jeba, M. P. W., Sharmila, J. F. R., 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*. *Int J Adva Res & Technol*, 2(4), 401-6.
- 12 Samsu, B. A., Nafis, R. M., Abd, H. L. S., Najib, A. M., Suraini, A. A., Abdul, R. N. A., ... & Yoshihito, S. (2010). Isolation and characterization of thermophilic cellulase-producing bacteria from empty fruit bunches-palm oil mill effluent compost. *American*
- 13 Sakthivel, M., Karthikeyan, N., Jayaveny, R., & Palani, P. (2010). Optimization of culture conditions for the production of extracellular cellulase from *Corynebacterium lipophiloflavum*. *Journal of Ecobiotechnology*.
- 14 Soni, R., Sandhu, D. K., & Soni, S. K. (1999). Localisation and optimisation of cellulase production in *Chaetomium erraticum*. *Journal of biotechnology*, 73(1), 43-51.
- 15 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.

Résumés

ملخص

تركز هذه الدراسة على الاستفادة المثلى من العزلات البكتيرية التي تنتج السليولاز للحصول على عائد إنزيمي أفضل. تم عزل بكتيريا السليولاز المهيمنة من التربة بين 40 عزلة بكتيرية مختلفة ، اثنتان من العزلات البكتيرية 2 ب و 38 ب ، كانت مؤهلة للانتماء إلى *Pseudomonas sp.* و *Bacillus sp.* ، على التوالي. تم إجراء التحسين الأمثل لوسط التخمير لتحقيق أقصى إنتاج للسليولاز للسلاطين 2 ب و 38 ب. كانت الظروف المثلى التي تم العثور عليها لإنتاج السليوليز هي 30 درجة مئوية عند درجة الحموضة 5 ، والسيلوبيوز والسكروز كأفضل مصدر للكربون ، ومستخلص الخميرة كأفضل مصدر للكربون. تم الحصول على إنتاج عالي من السليولاز على CMC بتركيز 1٪ خلال الأيام الأولى من الحضارة ، وأظهرت الدراسات التي أجريت على السليولاز المنقى جزئياً نشاطاً عالياً للتحلل في *Pseudomonas sp.*

الكلمات المفتاحية: *Bacillus sp.* ، إنتاج Cellulase ، pH ، *Pseudomonas*

Résumés

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 parmi 40 isolats bactériens différents, deux des isolats bactériens, 2b et 38b, ont été qualifiés pour appartenir à *Pseudomonas* sp. et à *Bacillus* sp., respectivement. L'optimisation du milieu de fermentation pour une production maximale de cellulase a été réalisée pour les deux souches de 2b et 38b. 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 de carbone. Une production élevée de cellulase est obtenue sur CMC à la concentration 1% pendant les premiers jours d'incubation. L'études sur la cellulase partiellement purifiée, a montré une activité *cellulolytique* élevée chez *Pseudomonas* sp.

Mots clés: *Bacillus* sp., Production de cellulase, pH, *Pseudomonas* sp

Abstract

This study focuses on the optimization of bacterial cellulase-producing isolates for better enzymatic yield. Degrading cellulosic bacteria were isolated from the soil among 40 different bacterial isolates, two of the bacterial isolates 2b and 38b were eligible for affiliation with *Pseudomonas* sp. And *Bacillus* sp. Successively. Optimization of the fermentation medium was carried out to achieve maximum cellulase production for strains 2b and 38b. The optimal conditions found for cellulase production were 30 ° C at pH 5, cellobiose and sucrose as the best source of carbon, and yeast extract as the best source of carbon. High cellulase production was obtained on CMC at a concentration of 1% during the first days of incubation, and studies on partially purified cellulase showed high hydrolysis activity in *Pseudomonas* sp.

Key words: *Bacillus* sp., cellulase production, pH, *Pseudomonas* sp.