



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 :

**BOUALAM karima**

Le : samedi 3 juillet 2021

### Thème

**Amélioration de production de cellulases par une souche bactérienne isolée à partir des excréments de chameaux (Biskra)**

---

#### Jury :

M.	BENKADOUR BACHIR	MAA	Université de Biskra	Président
M.	HEBAL HAKIM	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme.	BACHA BAHIA	MAB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2020 - 2021

## Remerciement

Nous tenons à remercier en premier lieu **ALLAH**, le tout Puissant de nous avoir donné courage, santé et patience pour achever ce travail.

Nos remerciements les plus sincères s'adressent à notre honorable encadreur monsieur **HEBAL HAKIM**, qui a bien voulu, par son aimable bienveillance, diriger cette étude, qui a fait preuve d'une grande patience. Ses conseils, ses orientations, sa compétence, sa gentillesse et ses intérêts portés pour ce sujet de recherche nous ont permis de mener à terme ce travail.

Son encadrement était le plus exemplaire.

Nos remerciements vont aussi à **BENKADOUR BACHIR** d'avoir eu l'aimabilité d'accepter volontairement et aimablement de présider ce Jury.

Nous tenons à remercier également **BACHA BAHIA**, d'avoir acceptée, d'examiner ce travail. Qu'elle trouve ici nos sincères sentiments de gratitude et de respect.

Notre reconnaissance et nos grand respect s'adressent à la source de bonheur «nos parents» qui nos soutenue avec patience et prouvé leur confiance.

Nous leur exprime notre éternelle gratitude

Nous nous permettons d'adresser nos remerciements à nos familles, qui ont contribués Beaucoup d'une manière ou d'une autre, durant toute la période de ce travail.

À tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à réaliser ce travail, auxquels

Nous disons tout simplement merci.

Merci à tout le personnel du laboratoire de microbiologie pour leur accueil, leur soutien et leur aide.

Merci à tous mes camarades de promotion du SNV microbiologie master 2 pour tous les bons moments partagés ensemble.

**Dédicace**

*Je remercie tout d'abord, Allah,  
Le tout puissant et clément de m'avoir aidé à réaliser ce travail.*

*Je dédie ce travail*

*A*

*Mes chers parents (Ali), ma raison de vie maman (Massoudda)*

*A*

*Mes sœurs : Zakia ; Mounira ; Latifa ; Hanane*

*A*

*Mes frères : Hakim, Ramadhan*

*A*

*Ma belle famille,*

*A*

*Tous mes professeurs :*

*Leur générosité et leur soutien m'oblige de leurs témoigner mon profond  
Respect et ma loyale considération.*

*A*

*Tous mes amis et mes collègues :*

*Ils vont trouver ici le témoignage d'une fidélité et d'une amitié infinie.*

*A*

*Tous ceux qui m'aiment.*

# **Table des matières**

## Sommaire

<b>Remerciement</b> .....	<b>3</b>
<b>Dédicace</b> .....	<b>4</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>5</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>I</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>II</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>III</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre 01 : Synthèse Bibliographique</b> .....	<b>3</b>
<b>1. Biomasse lignocellulosique</b> .....	<b>4</b>
1.1. Cellulose.....	4
1.2. Hémicellulose .....	5
1.3. Lignine .....	5
<b>2. Etude de la cellulose</b> .....	<b>5</b>
2. 1. Origine de la cellulose .....	5
2.2. Structure de cellulose .....	5
<b>3. Cellulase</b> .....	<b>6</b>
3.1. Généralités.....	6
3.2. Nomenclature : .....	6
3.3. Caractéristiques .....	7
<b>4. Enzymes cellulolytiques :</b> .....	<b>7</b>
4.1. Définition.....	7
4.2. Mode d'action.....	7
4.2.1. Endo-1,4- $\beta$ -glucanases (EC 3.2.1.91).....	7
4.2.2. Exo-1,4- $\beta$ -D-glucanases (EC 3.2.1.74) .....	7
4.2.3. $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21).....	7
4.3. Origine.....	8
4.3.1. Source microbienne .....	8
4.3.2. Source animale .....	8

4.3.3. Source végétale.....	8
<b>5. Utilisation industrielle des cellulases .....</b>	<b>8</b>
5.1. Industrie agro-alimentaire .....	9
5.2. Industrie du textile et des détergents .....	9
5.3. Industrie du papier ou papetière .....	9
5.3. Nutrition animale.....	9
5.4. Domaine thérapeutique.....	10
5.5. Production de biocarburants .....	10
<b>6. Microorganismes cellulolytiques.....</b>	<b>10</b>
6.1. Les bactéries cellulolytiques .....	10
6.2. Dégradation bactérienne de la cellulose .....	11
<b>7. Amélioration de production de cellulase .....</b>	<b>11</b>
<b>Chapitre 02 : Matériels et méthodes.....</b>	<b>12</b>
<b>1. Matériel biologique.....</b>	<b>13</b>
<b>2. Matériel analytique .....</b>	<b>13</b>
<b>3. Cultivation de la souche de Micrococcus luteus .....</b>	<b>14</b>
3.1. Revivification .....	14
3.2. Ensemencement sur la gélose .....	14
3.3. Ensemencement sur le milieu à base de CMC .....	14
<b>4. Optimisation des conditions de cultures pour la production des cellulases .....</b>	<b>14</b>
4.1. Effet de la température .....	14
4.2. Effet du pH .....	15
4.3. Effet des sources de carbone .....	15
4.4. Effet des sources d'azote.....	15
4.5. Effet des L'aération .....	16
4.6. Effet de tempe d'incubation .....	16
<b>6. Mesure de l'activité enzymatique.....</b>	<b>18</b>
<b>Chapitre 03 : Résultats et discussion .....</b>	<b>21</b>
<b>1. Matériel biologique.....</b>	<b>22</b>

1.1. L'espèce <i>Micrococcus Luteus</i> .....	22
1.2. Classification taxinomique .....	22
<b>2. Revivification et culture de la souche <i>Micrococcus luteus</i> .....</b>	<b>23</b>
2.1. Sur le milieu gélose : .....	23
2.2. Sur le milieu CMC : .....	23
<b>3. Optimisation de la production de cellulases : .....</b>	<b>24</b>
3.1. Effet de la température .....	25
3.2. Effet du pH .....	26
3.3. L'effet de source de carbone .....	26
3.4. L'effet de source d'azote sur la production de cellulase .....	28
3.5. L'effets de l'aération .....	29
3.6. Effet de tempe d'incubation .....	30
<b>Conclusion.....</b>	<b>33</b>
<b>Référence bibliographique.....</b>	<b>36</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>44</b>

**Liste des tableaux**

Tableau 1: Liste de matériel analytique. .... 13

Tableau 2 : classification taxinomique de genre Micrococcus..... 22

Tableau 3 : Effet des sources de carbone sur la production de cellulase par Bacillus  
thuringiensis. .... 27

Tableau 4 : Effet des sources d'azote sur la production de cellulases par Bacillus alcalophilus  
S39 et Bacillus amyloliquefaciens C2..... 28



**Liste des figures**

Figure 1 : La structure tridimensionnelle de la biomasse lignocellulosique (Olga, 2002).....	4
Figure 2 : Représentation la chaîne de cellulose (Mazza, 2009).....	6
Figure 3 : la centrifugation de culture bactérienne a10000 g, de température 4°C.....	17
Figure 4 : La récupération de l'extrait enzymatique. ....	17
Figure 5 : Mélange réactionnel de tampon de phosphate/extrait enzymatique. ....	18
Figure 6 : Milieux réactionnelle de DNS. ....	19
Figure 7 : Aspet des colonies de <i>Micrococcus luteus</i> sur la gélose nutritive.....	23
Figure 8 : Aspet des colonies de <i>Micrococcus luteus</i> sur milieu CMC solide.....	24
Figure 9 : Effet de la température sur la production de cellulase par <i>Micrococcus</i> sp. SAMRC-UFH3. Les données sont présentées comme moyenne $\pm$ écart-type de trois répétitions. Les graphiques à barres avec différentes lettres montrent des différences ( $p < 0,05$ ). ....	25
Figure 10 : Activité enzymatique d'endoglucanase (U/mL) en présence de différentes concentrations (0,5-2%) de substrat à pH différent (5-9) par <i>Micrococcus spp.</i> ....	26
Figure 11 : Effet de la vitesse d'agitation sur la production de cellulases par <i>Micrococcus</i> sp. SAMRC-UFH3. Les données sont présentées comme écart-type moyen de trois réplias. Les graphiques à barres avec des lettres différentes montrent une différence significative ( $p < 0,05$ ). ....	30
Figure 12 : Effet du temps d'incubation sur la carboxyméthyl cellulase production d'enzymes par <i>Bacillus</i> sp. 313SI sous stationnaire et secouer les conditions de croissance. Les valeurs de la figure sont des moyennes de trois répliations avec un écart type.....	31

**Liste des abréviations**

**CMC** : carboxyméthyle cellulose

**DNS** : Acide 3,5dinitrosalicylique

**FMS** : Fermentation sur milieu solide

**GN** : Gélose Nutritive

# **Introduction**

## Introduction

Durant les dernières années, des recherches intensives ont été réalisées pour trouver des énergies renouvelables ou alternatives autres que le pétrole, en raison des prix élevés de ce dernier, son emplacement ainsi que l'épuisement de cette ressource, En effet la production de biocarburant est aujourd'hui en plein essor (Galbe et Zacchi., 2002) la microbiologie est qualifiée aujourd'hui de participant majeur de l'industrie globale, spécialement des industries pharmaceutiques, alimentaires et chimiques. Dans ce contexte, les microorganismes et leurs enzymes disposent de possibilités d'applications biotechnologiques très étendues. Actuellement, elles sont de plus en plus utilisées dans la production d'enzymes (Mechakra et *al.*, 2002).

La matière lignocellulosique est considéré comme l'une des principales sources d'énergies renouvelables, en raison de son abondance, sa disponibilité et sont cout très réduits (Urs.S et *al.*, 2018). Elle est constituée principalement de cellulose, hemicellulose et lignine (Eloutassi et *al.*, 2014).

La cellulose est constituée de cellulose, les hémicelluloses, la lignine (Jendoubi, 2011) Sa dégradation requière l'intervention de plusieurs enzymes qui agissent synergiquement, notamment, les endoglucanase qui dégradent de façon aléatoire la chaîne de glucose. Les cellobiohydrolase qui dégradent la chaîne de glucose aux extrémités réductrices et non réductrices et les glucosidases qui dégradent le cellobiose en glucose (Lynd *et al.*, 2002).

Les enzymes produites par les micro-organismes sont des biocatalyseurs potentiels des réactions biochimiques. Généralement, les enzymes dérivées d'une source microbienne sont considérées comme des biocatalyseurs robustes, à haute spécificité et rendement économique important. Aujourd'hui, la recherche est beaucoup plus focalisée pour obtenir de nouvelles enzymes et améliorer les caractéristiques fonctionnelles à une large gamme de température, de pH, de salinité ou d'autres conditions extrêmes (Mukhtar *et al.*, 2017).

Les enzymes d'origine microbienne présentent des propriétés et des spécificités diverses. Ces propriétés reflètent de plus en plus leurs utilisations dans divers domaines d'applications, tels que l'industrie alimentaire humaine et animale, (Botton *et al.*, 1990).

Parmi les enzymes d'intérêt industriel, il existe des cellulases pour lesquelles l'industrie porte une attention toute particulière grâce à leur grand potentiel biotechnologique,

industriel (industries du textile, des détergents, du papier, les industries agro-alimentaires, pharmaceutiques et de l'alimentation animale) et le recyclage de la biomasse cellulosique (Leghlimi, 2013).

La production de cellulases par les microorganismes s'est bien développée ces dernières années. Cependant, elle utilise des procédés de fermentation faisant intervenir des substrats relativement onéreux, tels que l'extrait de levure, le glucose ou le maltose. Par ailleurs, un grand nombre de milieux de culture à base de substrats, autres que le son de blé, ont été mis au point telle que l'utilisation de lactosérum par exemple (Acourène, 2001).

Dans notre recherche, porte sur l'optimisation de la production de cellulases par une souche bactérienne de *Micrococcus luteus* isolée à partir des excréments de chameaux (Biskra). L'approche par un point a été suivie dans cette optimisation, qui consiste à faire varier un paramètre tout en maintenant les autres paramètres constants. Les paramètres étudiés dont la température, le pH, la source de carbone, la source d'azote et l'aération.

Ce mémoire est organisé en trois parties ; une étude bibliographique qui cadre le sujet, une partie expérimentale dans laquelle nous avons procédé à l'optimisation de la production des cellulases chez la souche bactérienne isolée à partir des excréments de chameaux (Biskra) par méthode classique, et enfin résultats et discussion.

# **Chapitre 01 : Synthèse Bibliographique**

## 1. Biomasse lignocellulosique

La biomasse est définie comme étant l'ensemble des matières organiques renouvelables, provenant directement d'un processus biologique. (Martinez, et *al.*, 2005), Elle est considérée comme l'une des sources les plus prometteuses pour la production de bioénergies renouvelables alternatives et d'autres produits de valeur (Khelil, 2017),

La biomasse lignocellulosique est le composant essentiel de la paroi cellulaire des plantes (Tian, 2016). Il est composée de trois fractions majeures (la cellulose, les hémicelluloses et la lignine) (Fig1), qui forment une structure tridimensionnelle complexe et résistante maintenue par des liaisons hydrogènes et covalentes (Balat, 2011). Les ressources lignocellulosique sont nombreuses et très abondantes par exemple : des déchets agricoles, des déchets d'exploitation forestière, des déchets de l'industrie du bois et du papier (Jendoubi, 2011).

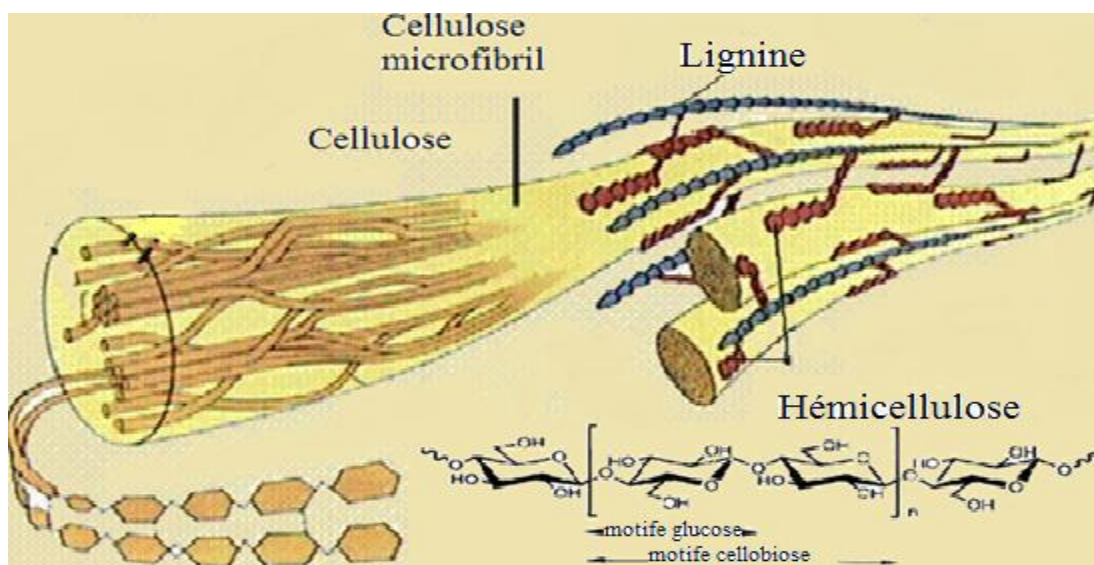


Figure 1 : Structure tridimensionnelle de la biomasse lignocellulosique (Olga, 2002)

### 1.1. Cellulose

La cellulose  $[C_6H_{10}O_5]_n$  a été découverte en 1838 par Anselme Payen (Claisse, 2006). Il est l'une des macromolécules les plus abondantes à la surface de la terre. (Lopez, 2007). La cellulose est le plus important polysaccharide de la planète. Elle représente entre 20 et 50% de la matière sèche des parois cellulaires végétales (Prevot, 2013). Par ailleurs, la cellulose est le produit de l'utilisation de l'énergie solaire et du dioxyde de carbone par les végétaux via la photosynthèse. C'est le bio polymère le plus abondant, et la seule source de carbone renouvelable sur terre (Leghlimi, 2013).

## 1.2. Hémicellulose

Ce terme est introduit par Schulze en 1891 (Desvaux, 2001). Les hémicelluloses sont des homo ou heteropolymères composés soit d'unités de type pentose (xylose et arabinose) ou bien d'unités de type hexose (glucose, mannose et galactose) (Arnoul.J, 2006).

Le groupe des hémicellulases est un groupe varié d'enzymes hydrolysant de façon synergique les différentes structures composant l'hémicellulose afin d'obtenir une dégradation complète (Prevot, 2013).

## 1.3. Lignine

Selon Desvaux (2001), la structure de lignine est très complexe. Ce sont des polymères hautement condensés, formés par la déshydrogénation et la polymérisation de trois alcools à noyaux phénylpropane C6-C3 : les alcools trans-p-coumarylique, trans-coniférylique et trans-sinapylique.

La lignine, de par sa nature, constitue une fraction récalcitrante que les enzymes cellulolytiques ne peuvent pas fractionner. Elle forme une barrière physique réduisant ainsi l'accessibilité du biocatalyseur aux fractions hydrolysables (Lebaz, 2015).

## 2. Etude de la cellulose

### 2. 1. Origine de la cellulose

La cellulose est le polymère d'origine naturelle et aussi le plus intéressant technologiquement. Les fibres cellulosiques proviennent habituellement du bois, soit des feuillus soit des résineux (conifères) mais ce sont également des fibres de tiges et feuilles comme les pailles de céréales ..., Le tableau (Annexe 01) représente l'inventaire des principales fibres disponibles à l'échelle mondiale (Reguant et Rinaudo ,1999).

### 2.2. Structure de cellulose

La cellulose est un polysaccharide linéaire constitué d'un enchaînement d'unités glucosyles liées en  $\beta$ 1-4 (Claisse, 2006). Les unités du glucose sont reliées par des liaisons glycosidiques entre les carbones C1 et C4 des unités glucopyranose par des liaisons  $\beta$  (1-4). Chaque unité de glucose est tournée  $180^\circ$  par rapport aux molécules voisines formant ainsi une molécule dissaccharidique de cellobiose. Cette rotation de  $180^\circ$  fait que la cellulose soit



très symétrique puisque la chaîne a un nombre égal de groupements hydroxyles de chaque côté (Zhang et Lynd, 2004).

Comme illustré par la figure 02, le polymère de la cellulose contient une extrémité réductrice (R) qui correspond à l'unité glucopyranose dont le carbone anomérique n'est pas engagé dans une liaison avec une autre unité glucidique. L'unité glucose située au côté opposé de la chaîne est appelée extrémité non-réductrice (NR) car son carbone anomérique est engagé dans une liaison glycosidique (Mazza, 2009).

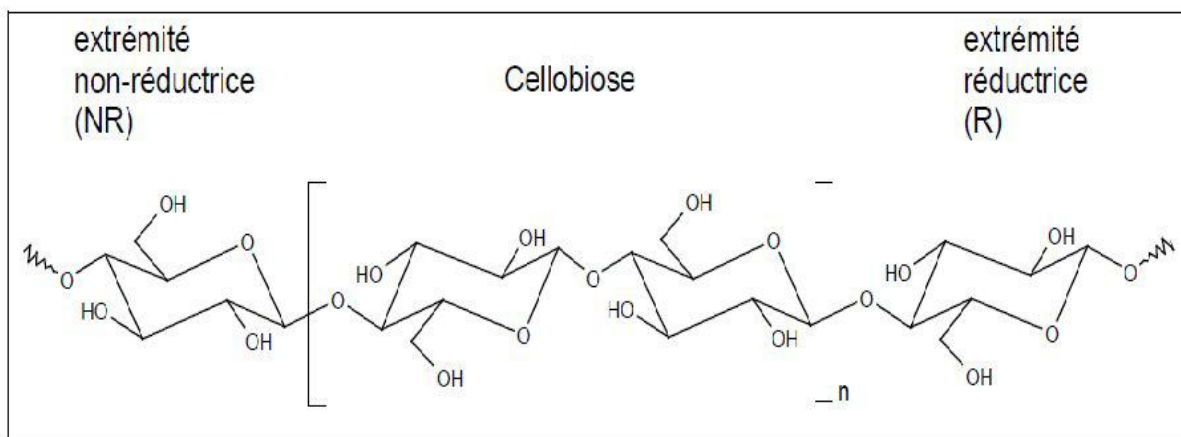


Figure 2 : Représentation la chaîne de cellulose (Mazza, 2009).

### 3. Cellulase

#### 3.1. Généralités

Le terme général de « cellulase » est employé pour caractériser les enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose (Jouany, 1994). Les cellulases sont un groupe d'enzymes hydrolytiques capables de dégrader les matières lignocellulosiques. (Acharya, 2008). Ils sont des enzymes inductibles synthétisées par une grande diversité de microorganismes comprenant à la fois des champignons, les bactéries et les actinobactéries au cours de leur croissance sur la matière cellulosique (Ramesh *et al.*, 2015 ; Refasse, 2017).

#### 3.2. Nomenclature :

**Nom codifié :** E.C.3.2.1.4

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

**Nom recommandé :** Cellulase.

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

### 3.3. Caractéristiques

Le tableau (annexe 02) donne quelques caractéristiques des cellulases (Bensmira, 2006).

## 4. Enzymes cellulolytiques :

### 4.1. Définition

Les enzymes sont des protéines complexes que l'on retrouve partout autour de nous (Chenel, 2011), La cellulolyse correspond à l'hydrolyse de la cellulose en sucres simples (cellobiose, glucose) (Tchuden, 1990). Dans le processus biologique, l'hydrolyse est catalysée par des enzymes appelées génériquement cellulases (Eloutassi et *al.*, 2014).

### 4.2. Mode d'action

La dégradation enzymatique de la cellulose est un processus complexe qui nécessite la participation d'au moins trois types d'enzymes (Bhavsar et *al.*, 2015). Le figure (annexe 03) présente le mode d'action de cellulase.

#### 4.2.1. Endo-1,4- $\beta$ -glucanases (EC 3.2.1.91)

Endoglucanases coupées au hasard sur des sites amorphes internes dans le polysaccharide de cellulose chaîne, générant des oligosaccharides de différentes longueurs et par conséquent de nouvelles extrémités de chaîne. C'est généralement actif contre la cellulose amorphe gonflée à l'acide, les dérivés solubles de la cellulose comme la CMC, les cellooligosaccharides (Sadhu et Maiti. T, 2013).

#### 4.2.2. Exo-1,4- $\beta$ -D-glucanases (EC 3.2.1.74)

Agissent sur les extrémités de la chaîne de la cellulose et libèrent le  $\beta$ -cellobiose comme produit final (Scriban, 1993).

#### 4.2.3. $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21)

Les  $\beta$ -glucosidases hydrolysent les cellodextrines solubles et le cellobiose en glucose à partir de non réducteurs fin. Il est inactif contre la cellulose cristalline ou amorphe. La  $\beta$ -glucosidase est l'enzyme clé dans l'efficacité de la biodégradation de la cellulose (Saradouni, 2004).

### 4.3. Origine

Les cellulases sont largement répandues dans la nature (Xu *et al.*, 2000). Elles sont produites par diverses sources, par exemple des champignons, des bactéries, des levures et des plantes. Les fluctuations saisonnières ont beaucoup gêné la production de cellulases à partir de plantes. (Urs.S *et al.*, 2018).

#### 4.3.1. Source microbienne

Les microorganismes cellulolytiques sont principalement des dégradeurs de cellulose, mais ils n'utilisent généralement pas de lipides ou de protéines comme source d'énergie (Lynd *et al.*, 2002).

Les champignons filamenteux sont bien connus comme une ressource rentable pour les cellulases industrielles. Un des champignons les plus étudiés est *T. reesei* qui est capable d'hydrolyser la cellulose native (Khelil, 2017).

#### 4.3.2. Source animale

Plusieurs espèces animales utilisent la cellulose comme source d'énergie, malgré leur incapacité à produire des cellulases endogènes. Ceci est dû, selon Smant *et al.*, (1998), à une vie symbiotique des communautés microbiennes qui peuplent le biotope digestif des ruminants. Il est estimé que les bactéries et les champignons présents dans le tube digestif des ruminants contribuent approximativement à 80% de l'activité de dégradation de cellulose (Fonty et Chaucheyras.D, 2007).

#### 4.3.3. Source végétale

Les cellulases jouent un rôle important dans la maturation des fruits où elles participent à la libération des arômes (Cordonnier *et al.*, 1986). Ces enzymes végétales sont généralement obtenues par extraction à partir des fruits tels que les grains de raisin, les amandes douces, de l'avocat *Persea american*, des céréales tels que l'orge et le riz (Xu *et al.*, 2000).

### 5. Utilisation industrielle des cellulases

Depuis plus de 35 ans, les cellulases sont disponibles dans le commerce pour les applications industrielles. Le potentiel biotechnologique de la cellulase dans une gamme d'industries comprend l'alimentation, la brasserie et la vinification, l'alimentation animale,

l'agriculture, le raffinage de la biomasse, les pâtes et papiers, le textile et la lessive (Chatterjee et *al.*, 2015).

### **5.1. Industrie agro-alimentaire**

En industrie agro-alimentaire, les cellulases sont utilisées pour faciliter la filtration des diverses suspensions riches en fibres cellulosiques manipulées par ce type d'industrie (Leghlimi, 2013). Les cellulases sont utilisées pour contrôle des pathogènes et des maladies des plantes ; génération de protoplaste végétaux et fongiques ; amélioration de la germination des graines et système racinaire amélioré ; amélioration de la croissance et de la floraison des plantes ; amélioration de la qualité du sol ; dépendance réduite à engrais minéraux (Kuhad et *al.*, 2011).

### **5.2. Industrie du textile et des détergents**

Dans le traitement par voie humide des textiles à base de cellulose, les cellulases sont généralement les enzymes les plus importantes pour l'amélioration de l'apparence. En outre, la cellulase a une fonction dans le biostoning des jeans, le développement de la qualité des tissus et l'élimination des excès de colorant ...ect (Chatterjee et *al.*, 2015).

Les détergents à base de cellulase ont un meilleur pouvoir nettoyant et éliminent la saleté sans endommager les fibres. L'application de cellulases avec lipase et protéase dans les détergents est un nouveau domaine d'application (Kuhad et *al.*, 2011).

### **5.3. Industrie du papier ou papetière**

L'addition de cellulases aux suspensions de pâtes (en cours de lavage) ou en suspension de pâtes de papiers de recyclage, améliore significativement leur filtrabilité et conduit à des économies importantes de consommation d'eau (Scriban, 1993). De plus, les cellulases sont largement utilisées dans l'industrie textile (Urs.S et *al.*, 2018).

### **5.3. Nutrition animale**

C'est un autre marché qui pourrait s'ouvrir pour ces enzymes utilisées comme additifs pour l'alimentation de bétail car L'addition de cellulases aux aliments pour volailles ou porcins améliore la digestibilité de leur fraction cellulosique et permettre ainsi de réduire à la

fois, les consommations de sources d'énergie (amidon) et l'excrétion de cellulose non digérée (la charge polluante des excréments) (Gusakov *et al.*, 2000).

#### **5.4. Domaine thérapeutique**

La cellulase est bénéfique pour les allergies alimentaires et environnementales. n. La cellulase joue un rôle important dans le sevrage des médicaments, quelques exemples sont des syndromes de désintoxication cellulaire, de côlon, de nettoyage et de douleur candida infection à levures, gaz, buvardage, allergies alimentaires aiguës, douleur fasciale ou paralysie (Urs *et al.*, 2018).

#### **5.5. Production de biocarburants**

Les combustibles fossiles, tels que le pétrole et le charbon, sont une source principale d'énergie. Cependant, cette source d'énergie a de nombreux effets néfastes sur l'environnement. Dans un effort de réduire ces effets néfastes sur l'environnement, des sources énergétiques alternatives sont mis en évidence (Smeets *et al.*, 2004).

### **6. Microorganismes cellulolytiques**

Les bactéries ont été moins étudiées que les champignons (Tchunden, 1990). Cependant, les sources microbiennes sont la source préférée de production de cellulases en particulier à partir de champignons en raison de leur courte durée de leur période de croissance luxuriante et plus grande quantité de sécrétion enzyme en un minimum de temps (Urs.S *et al.*, 2018).

Les microorganismes cellulolytiques sont présents dans tous les biotopes où la cellulose s'accumule (Desvaux, 2001), Les cellulases sont produites par de nombreux microorganismes : par les bactéries, les actinomycètes et les champignons (Kuhad *et al.*, 2011).Le tableau (annexe 04) regroupe les différents microorganismes producteurs de la cellulase. (Tchunden, 1990).

#### **6.1. Les bactéries cellulolytiques**

La cellulase d'une source bactérienne peut être plus utile car de leur taux de croissance élevé et de leur plus large éventail d'habitats. Bactérien espèces telles que *Erwinia*, *cellomonase*, *pseudomonas*, *Thermonospora*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Bactérodés*, *Acetivibrio*, *Clostridium* et *Ruminococcus* ont été signalés pour production de cellulase (Karim *et al.*, 2015), Les bactéries ont été largement explorées pour la cellulase production en raison de leur

taux de croissance élevé, expression de complexes multi enzymes, stabilité à température extrême et pH, moindre inhibition de rétroaction et capacité à résister variété de stress environnemental (Deka *et al.*, 2013).

## 6.2. Dégradation bactérienne de la cellulose

Les bactéries jouent un rôle essentiel dans le recyclage de la matière organique. Elles prolifèrent surtout dans les milieux riches en azote, à pH neutre ou légèrement alcalin à température variant + 20 et 40°C. Les bactéries produisent surtout des enzymes qui agissent sur les étapes finales de dépolymérisation de la cellulose (Sall, 2004).

La capacité de dégradation des parois cellulaires végétales (lignocellulose) ou capacité lignocellulolytique est très répandue chez les micro-organismes (Prevot, 2013).

La dégradation de la cellulose est principalement connue chez certaines espèces bactériennes du sol de type filamenteux qui sont les actinomycètes (Eubactéries ramifiées), ces bactéries jouent un rôle dans la dégradation de la matière organique naturelle telle que les biopolymères complexes comme la cellulose, (Jaradat *et al.*, 2008 ; Zermane, 2008). Et suit les étapes de dégradation de cellulose (annexe 05) (Beaugrand, 2004).

## 7. Amélioration de production de cellulase

L'utilisation de la cellulase est la plus prometteuse technologie dans la conversion de biomasse lignocellulosique et La production de cellulase dépend de la composition du milieu de fermentation. Optimisation de la surproduction de l'enzyme est une étape importante et implique un nombre de paramètres physico-chimiques (Bhavsar, 2015).

Un extrémophile est un organisme dont les conditions de croissance optimales sont situées en dehors des environnements qualifiés de normaux (Kristjansson et Hreggvidsson, 1995).

La période d'incubation, le pH, température et agent mouillant, et disponibilité de substrat de divers agro déchets en fermentation à l'état solide. Pour le optimisation initiale du milieu, la méthode traditionnelle d'une variable à un l'approche temporelle a été utilisée en changeant des paramètre à la fois. Des études ont été réalisées pour différentes conditions de fermentation pour hyper production de cellulase (Bhavsar, 2015).

la fermentation à l'état solide (FMS) est le processus le plus économique pour la production d'enzymes cellulolytiques par des moisissures (Iwashita *et al.*, 2002).

# **Chapitre 02 : Matériels et méthodes**

Le but principal du présent travail est de faire une amélioration de production de cellulases par une souche bactérienne isolée à partir des excréments de chameaux (Biskra).

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Mohamed Khaider Biskra.

### 1. Matériel biologique

Les expériences ont été réalisées sur la souche de *Micrococcus luteus*, isolée au laboratoire à partir des excréments d'un dromadaire (*Camelus dromedarius*) (Biskra). C'est une bactérie cellulolytiques mésophiles, est un coccus à Gram positif ne formant pas des spores, immobile catalase et oxydase positive (Elhadi, 2019).

### 2. Matériel analytique

Le tableau suivant représente le matériel, l'appareillage et la verrerie utilisés dans ce travail

Tableau 1: Liste de matériel analytique.

Appareillage	Verrerie et autre matériel
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agitateur-plaque chauffante ;</li> <li>• Autoclave;</li> <li>• Bain marrie;</li> <li>• Balance analytique à affichage digital ;</li> <li>• Balance de précision à 0.01mg ;</li> <li>• Bec- benzène ;</li> <li>• Centrifugeuse réfrigérée ;</li> <li>• Congélateur ;</li> <li>• Etuve ;</li> <li>• Four pasteur ;</li> <li>• Hotte ;</li> <li>• Ph mètre électronique;</li> <li>• Réfrigérateur ;</li> <li>• Spectrophotomètre ;</li> <li>• Vortex.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erlen de 250 ml et 500 ml ;</li> <li>• Eprouvettes ;</li> <li>• Fioles jaugées ;</li> <li>• Béchers :</li> <li>• Flacons de 180ml, 250 ml et 500ml ;</li> <li>• Boites de Pétri en plastiques ;</li> <li>• Pipettes graduées ;</li> <li>• Disques de filtration ;</li> <li>• Pipettes pasteurs ;</li> <li>• Micropipettes ;</li> <li>• Tubes à essai ;</li> <li>• Spatules ;</li> <li>• Papier aluminium ;</li> <li>• Portoir.</li> </ul>



Avant chaque utilisation, la verrerie doit être soigneusement lavée, rincée, séchée et stérilisée au four Pasteur à 180°C pendant 2 heures.

### **3. Cultivation de la souche de *Micrococcus luteus***

#### **3.1. Revivification**

La souche est repiquée sur un milieu gélose nutritif solide (GN). Ce milieu permet dans un premier temps d'activer la souche de *Micrococcus luteus* en vue de les repiquer plus tard sur un milieu à base de CMC (annexe 06).

#### **3.2. Ensemencement sur la gélose**

La souche est maintenue sur milieu gélose nutritive. Le pH du milieu est ajusté à 7.2 avant l'addition du glucose et de l'agar à raison de 20g/l. Le milieu est autoclavé à 121°C pendant 16 min, puis coulé dans des boîtes de Pétri à raison de 15ml/boîte. L'incubation se fait à 37°C pendant 07 jours (jusqu'à ce que la surface de la boîte soit recouverte de colonie).

#### **3.3. Ensemencement sur le milieu à base de CMC**

Par la suite, la souche est ensemencée de manière stérile sur le milieu à base de CMC. L'ensemencement est réalisé à l'aide d'une pipette pasteur stérile. L'incubation se fait à 37°C jusqu'à la formation d'une zone claire autour de leur colonie. Une zone claire indique une production de cellulases extracellulaires.

### **4. Optimisation des conditions de cultures pour la production des cellulases**

Dans ce contexte et afin de produire une meilleure activité cellulolytiques par la souche *Micrococcus luteus*, nous avons étudié l'effet de certains paramètres sur la production enzymatique par méthode classique, qui consiste à faire varier chaque paramètre, tout en maintenant les autres constants (Haberra, 2014). On a étudié différents paramètres tels que source de carbone, source d'azote, vitamine source, pH, température, temps d'incubation, taux d'inoculum, vitamines, acides aminés, inhibiteur métabolique, antibiotiques et le taux d'agitation.

#### **4.1. Effet de la température**

La température est un paramètre essentiel pour les réactions enzymatiques. En général, l'augmentation de la température devrait activer l'enzyme (Aljawish, 2013).

L'étude de l'effet de la température sur la production des enzymes sur milieu liquide à base de CMC aux températures 28°C, 30°C, 37°C, 45°C, 50°C et 55°C. Le milieu de culture préparé est ajusté au pH optimum 7.5. L'incubation se fait toujours pendant 72h.

Après incubation, la culture est arrêtée puis centrifugée à froid (4°C) avec une vitesse de 10000 tours par minute pendant 15 minutes. Les surnageants sont filtrés puis utilisés pour mesurer l'activité enzymatique par méthode de Miller (1959) à 540nm après incubation enzymatique. Toutes les expériences sont réalisées en duplicate.

#### **4.2. Effet du pH**

Les enzymes sont des polymères polyioniques, c'est-à-dire qu'ils possèdent différents ions ; les variations de pH vont donc changer certaines propriétés des enzymes. (Chenel, 2011). Le pH d'activité enzymatique optimal dépend généralement du type d'enzyme (Aljawish, 2013).

Le pH optimum pour la culture de souche *Micrococcus luteus* a été étudié en variant le pH du milieu de culture d'une unité de 01 pour une gamme de pH allant de 5.5 à 10.5.

Après incubation à 37 °C pendant 24 h, la culture est arrêtée et centrifugée à 4°C avec une vitesse de 10000 tours par minute pendant 10 minutes. Les surnageants sont filtrés puis utilisés pour mesurer l'activité enzymatique par méthode de Miller (1959) à 650nm après incubation enzymatique. Toutes les expériences sont réalisées en triplicate.

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

L'effet des sources de carbone dans le milieu de culture a été examiné en utilisant le glucose, le galactose, le lactose, la xylose, l'amidon à une concentration de 0,5 %, L'effet de différentes concentrations de son de blé sur la production des cellulases a été testé à une gamme de concentration de 0,5 à 4 (g/100 ml) avec intervalles de 0,5. Les surnageants sont utilisés pour mesurer l'activité enzymatique par méthode de Miller (1959) à 545 nm après incubation enzymatique.

#### **4.4. Effet des sources d'azote**

L'effet des différentes sources d'azote (Peptone, extrait de levure, extrait de viande, urée, NaNO<sub>2</sub>, KNO<sub>3</sub>, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) ; a également été essayé à une

concentration de 0.5%. Le filtrat de culture de la souche est utilisé pour détecter l'activité cellulolytiques par la mesure du pouvoir réducteur à 545nm, après incubation enzymatique.

#### **4.5. Effet des L'aération**

L'aération des cultures solides joue quatre fonctions, à savoir le maintien des conditions d'aérobies, l'élimination du dioxyde de carbone, la régulation de la température de culture et la régulation de la teneur en eau (Raimbault, 1998).

L'aération est un facteur important (essentiel) en fermentation en milieu solide puisqu'elle va permettre : l'oxygénation, la dissipation de la chaleur métabolique (régulation de la température du milieu) et l'élimination des produits du métabolisme (CO<sub>2</sub>, vapeur d'eau, composés volatils) .Elle peut être passive (de surface) ou active (forcée par l'injection d'air humidifiée afin de ne pas assécher le milieu) (Prevot, 2013).

#### **4.6. Effet de tempe d'incubation**

La période de fermentation est un paramètre important pour la production d'enzymes. Dans cette étude, l'expérience de fermentation a été réalisé jusqu'à 7 jours et cadence de production a été mesurée toutes les 24 h (Bhavsar, 2015).

### **5. Récupération de la cellulase**

Un prélèvement d'un volume de 1ml de la culture des souches sélectionnées productrices de la cellulase, inoculé dans le milieu de fermentation est récolté dans un Eppendorf stérile, soumis à une centrifugation de 10000 g, à une température de 4°C, pendent un intervalle de 10 minutes.

Le surnageant obtenus est utilisé comme source de la cellulase brute (Fig. 03 ; 04 ).



Figure 3 : la centrifugation de culture bactérienne a10000 g, de température 4°C.

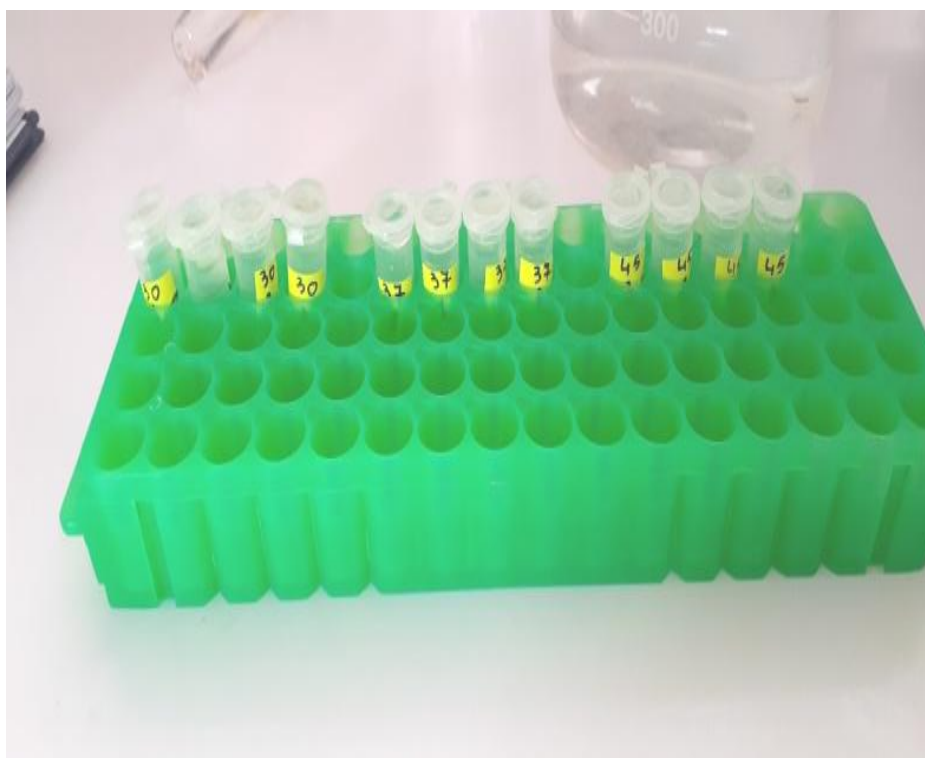


Figure 4 : La récupération de l'extrait enzymatique.

## 6. Mesure de l'activité enzymatique

Il existe un grand nombre de méthodes permettant de quantifier le niveau d'activité d'une enzyme, utilisant des substrats naturels ou synthétiques (Linder, 1996). Pour remonter à la concentration des sucres réducteurs, nous utilisons le protocole de dosage par l'acide dinitrosalicylique (DNS), (annexe 07) (Miller, 1959). La production de cellulase est appréciée par l'apparition de zones claires autour des colonies (Benkahoul, 2017).

Le protocole DNS est simple à mettre en place, très peu coûteux et rapide et peut même être automatisé (Lebaz, 2015).

Cette activité a permis de quantifier l'action des endoglucanases une unité « CMC<sub>Case</sub> » a été définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à la libération d'une  $\mu\text{M}$  de sucres réducteurs, équivalent glucose, par minute selon les conditions réactionnelles (Prevot, 2013).

La teneur en sucres réducteurs est déterminée par la méthode de l'acide dinitrosalicylique (DNS). La méthode phénol-acide sulfurique est utilisée pour évaluer la proportion de chaque sucre monomère, issu de l'hydrolyse (Eloutassi et *al.*, 2014).

La mesure de l'activité enzymatique est effectuée par l'introduction d'un volume de 0.1 ml de la solution enzymatique, additionnée d'un volume de 90 ml de la solution de 0,05M tampon de phosphate (annexe 08) contenant une concentration de 1% de cellulose (Fig.05).

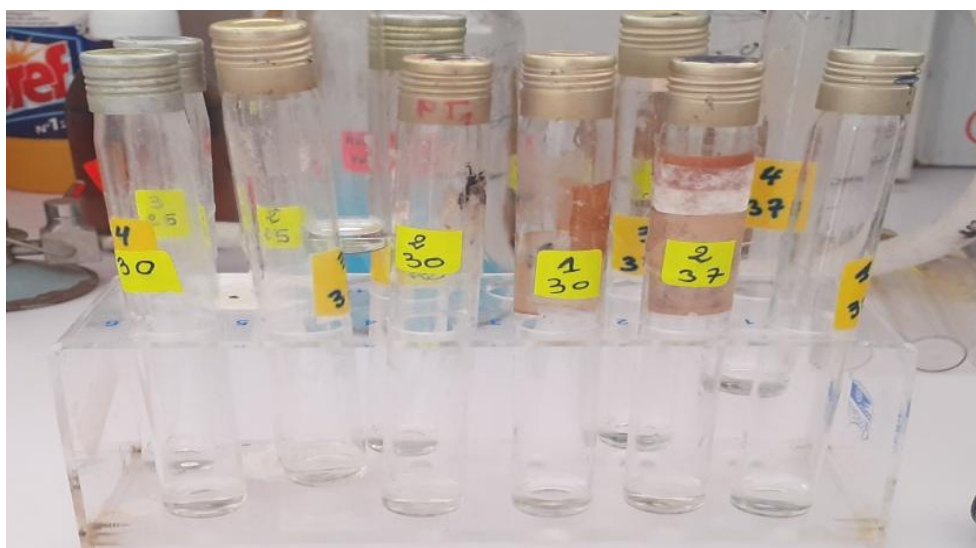


Figure 5 : Mélange réactionnel de tampon de phosphate/extrait enzymatique.

La réaction enzymatique est amorcée par l'incubation du mélange réactionnel dans un bain marie à une température de 50°C pendant 30 minutes, stoppée par l'ajout d'un volume de 1.5 ml du réactif de DNS (Fig. 06) et incubée ensuite à une température de 100°C pendant 05 minutes.

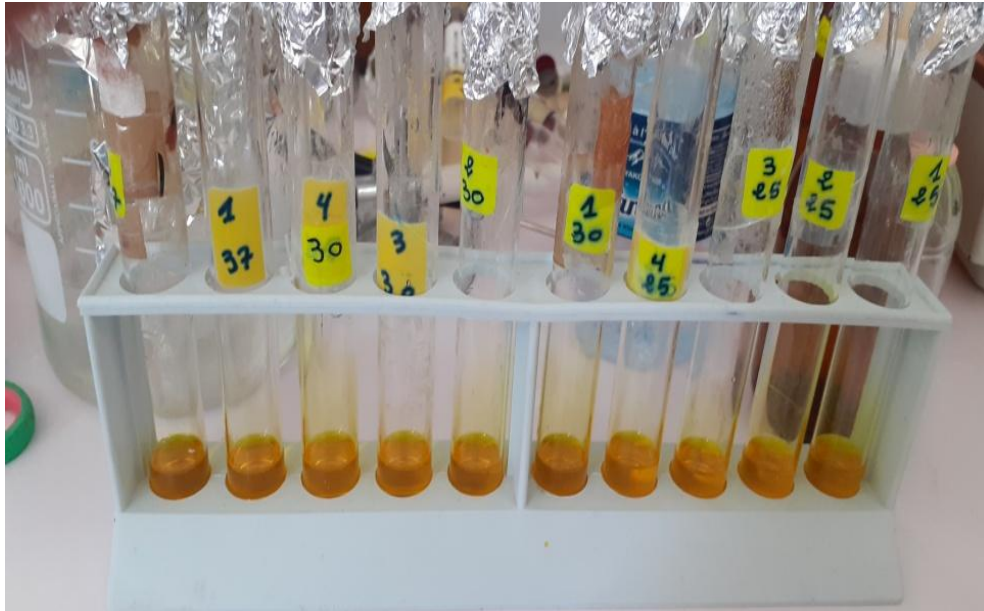


Figure 6 : Milieux réactionnelle de DNS.

Le mélange par la suite est refroidi dans une eau glacée. Le mélange témoin correspond à la solution de CMC ou avicel incubée sans le surnageant, celui-ci étant ajouté après le DNS.

La lecture est effectuée par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde 540 nm et la concentration en sucres réducteurs est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage du glucose (La courbe standard de glucose est établie lors de la préparation des étalons dilués et traités avec le réactif de DNS. La lecture est effectuée lors par de l'absorption à une longueur d'onde de 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre et les valeurs obtenues sont utilisées pour tracer une courbe d'étalonnage du glucose), dont les concentrations varient de (0-0,2-0,4-0,6-0,9-1,2 mg/ml).

L'activité CMCase a été calculée d'après la relation suivante :

$$\text{Activité enzymatique (UI)} = (\text{Cx} - \text{Ctb}) \times \text{D/t}$$

Cx : Concentration des sucres réducteurs du mélange réactionnel ( $\mu\text{mole/ml}$ ).

CTb : Concentration des sucres réducteurs du mélange témoin ( $\mu\text{mole/ml}$ ).

D : facteur de dilution

T : temps d'incubation (minutes)

Les sucres libérés ont été déterminés. Une unité (UI) d'activité enzymatique est exprimée comme la quantité d'enzyme, qui est nécessaire pour libérer 1  $\mu\text{mol}$  de glucose par minute dans les conditions de dosage standard. (Nisha, 2015).

# **Chapitre 03 : Résultats et discussion**



## 1. Matériel biologique

Les expériences ont été réalisées sur la souche de *Micrococcus luteus*, isolée au laboratoire à partir des excréments d'un dromadaire (*Camelus dromedarius*) (Biskra) en 2019, Elle est conservée sur gélose incliné à 4°C.

### 1.1. L'espèce *Micrococcus Luteus*

Le genre *Micrococcus* a été décrit pour la première fois par Cohn (1872) (Wieser ,2002), sont des cocci à Gram positif qui sont habitants normaux de la peau humaine qui causent rarement maladies infectieuses telles que l'arthrite septique, la méningite et l'endocardite valvulaire prothétique (Miltiadous et Elisaf, 2011).

*Micrococcus luteus* est une bactérie Gram-positif, sphérique, saprophyte faisant partie de la famille des Micrococcaceae. Aérobie obligatoire, *M. luteus* est une bactérie du sol, des poussières, de l'eau et de l'air et fait partie de la flore naturelle de la peau des mammifères. La bactérie peut aussi coloniser la bouche et des voies respiratoires supérieures humaines (Khan et al., 2019).

*Micrococcus luteus* Il peut être trouvé dans beaucoup d'autres endroits dans l'environnement, ainsi, comme l'eau, la poussière et le sol. *M. luteus* peut bien pousser dans des environnements avec peu d'eau ou de fortes concentrations de sel. Ils se développent de façon optimale à 37 ° C et peuvent être facilement cultivées sur gélose d'azote inorganique ou citrate gélose de Simmon. (Wieser et al., 2002).

Bien que *M. luteus* n'est pas pathogène et est considéré comme un contaminant naturel, cette bactérie pourrait être un pathogène émergent engendrant des maladies nosocomiales chez des patients immunodéprimés (Greenblat et al., 2004).

### 1.2. Classification taxinomique

Tableau 2 : classification taxinomique de genre *Micrococcus*

Règne	Bacteria
Embranchement	Actinobactérie
Classe	Actinobactérie
Ordre	Actinomycetales

Famille	Micrococcaceae
Genre	<i>Micrococcus</i>
Espèce	<i>Micrococcus luteus</i>

## 2. Revivification et culture de la souche *Micrococcus luteus*

### 2.1. Sur le milieu gélose :

Après 07 jours d'incubation à 37°C sur gélose nutritive, des colonies de la souche semblables et identiques ont été obtenues, indiquant la pureté de la souche (Fig. 07). Les colonies sont blanchâtres, de surfaces lisses, plates, à bords irréguliers, de 3mm de diamètre. Le temps long pour l'apparition des colonies est dû à la longue conservation de la souche à 4°C. En effet, le froid peut provoquer des lésions dans la membrane cytoplasmique dont la réparation nécessite du temps.



Figure 7 : Aspet des colonies de *Micrococcus luteus* sur la gélose nutritive.

### 2.2. Sur le milieu CMC :

Après 15 jours d'incubation a 37°C, des colonies de la souche *Micrococcus luteus* ont été obtenues sur milieu à base de CMC. Le temps prolongé pour l'apparition des colonies sur ce milieu peut s'expliquer par l'adaptation de la bactérie à son nouveau milieu

(déclenchement de l'expression de nouveaux gènes, synthèse de nouvelles protéines et enzymes).

L'observation macroscopique sur milieu CMC agar (Fig. 08) révèle le même aspect des colonies que sur le milieu gélose nutritive, avec l'apparition de zones claires autour des colonies. Une zone claire indique une production de cellulases extracellulaires.

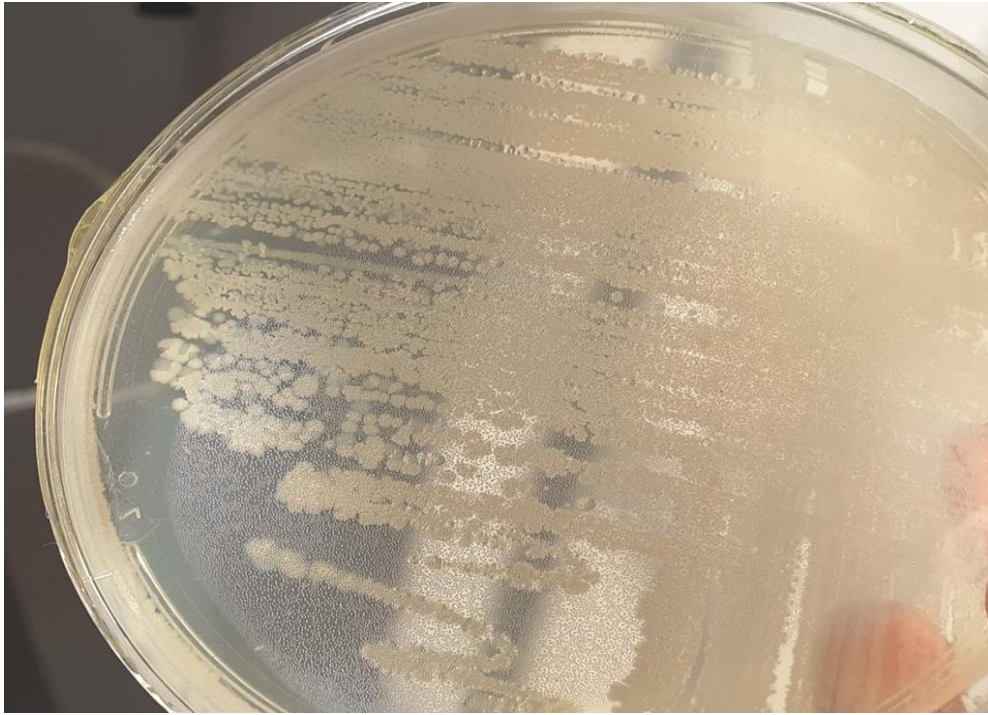


Figure 8 : Aspect des colonies de *Micrococcus luteus* sur milieu CMC solide

### 3. Optimisation de la production de cellulases :

Plusieurs études ont montré l'importance de l'optimisation des paramètres physicochimiques pour la production d'une quantité élevée d'enzymes en peu de temps (Ziyanda et al., 2016 ; Immanuel et al., 2006 ; Shilpa et Pethe, 2017 ; Abou-Taleb et al., 2009 ; Goyal et al., 2014 ; Ray et al. 2007 ; Thakkar et Saraf., 2014). Cette optimisation permettrait le cout de ces enzymes. il est effectuée selon l'approche un point qui consiste faire varier un paramètre tout en maintenant les autres constants (Thakkar et Saraf., 2014). Les paramètres étudiés sont la température, le pH, la source de carbone, la source d'azote et effet de tempe d'incubation et l'effet des L'aération.

### 3.1. Effet de la température

La température est un facteur important dans la stabilité des enzymes et influençant leurs activités. Les résultats de l'effet de la température sur la production de cellulases par la souche *Micrococcus sp* sont présentés sur la figure 09. Il a été observé que la température optimale pour l'activité cellulase était de 25 °C avec une activité enzymatique de 198 U/ mL ; et une activité cellulase diminuait avec l'augmentation de la température jusqu'à 40°C après quoi une augmentation graduelle a été observée jusqu'à 50 °C (Ziyanda.M et *al.*, 2016).

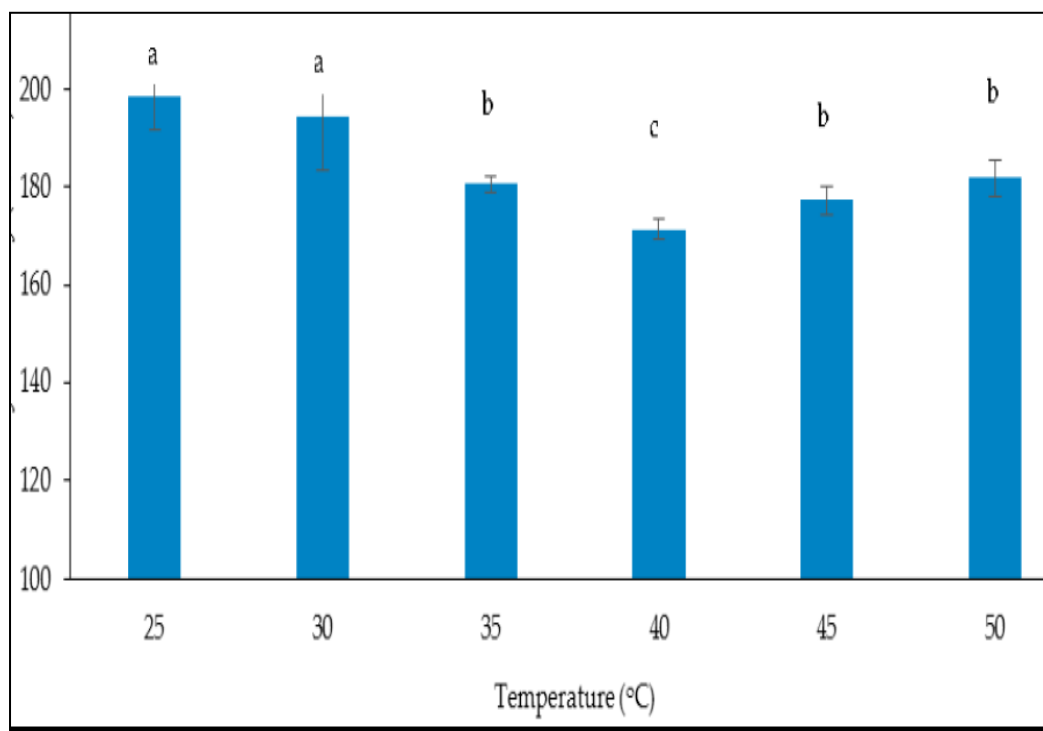


Figure 9 : Effet de la température sur la production de cellulase par *Micrococcus sp.* SAMRC-UFH3. Les données sont présentées comme moyenne  $\pm$  écart-type de trois répétitions. Les graphiques à barres avec différentes lettres montrent des différences ( $p < 0,05$ ).

Il a été suggéré que la température influencerait la sécrétion d'enzymes extracellulaires, par modification des propriétés physiques de la membrane cellulaire (Ziyanda. M et *al.*, 2016).

### 3.2. Effet du pH

La figure 10 montre l'effet de variation du pH sur l'activité endoglucanase de *Micrococcus sp.* Cultivée sur différente concentration poudre de fibre de coco prétraitée (0.5 à 2%). Les résultats montrent un effet de la concentration du substrat sur le profil pH d'activité. En effet, alors que le pH optimal d'activité enzymatique est de 7 aux concentrations de CMC 0.5% et 1.5%, il est de 8 à la concentration 1% et 7-8 à la concentration 2% (Immanuel et *al.*, 2006).

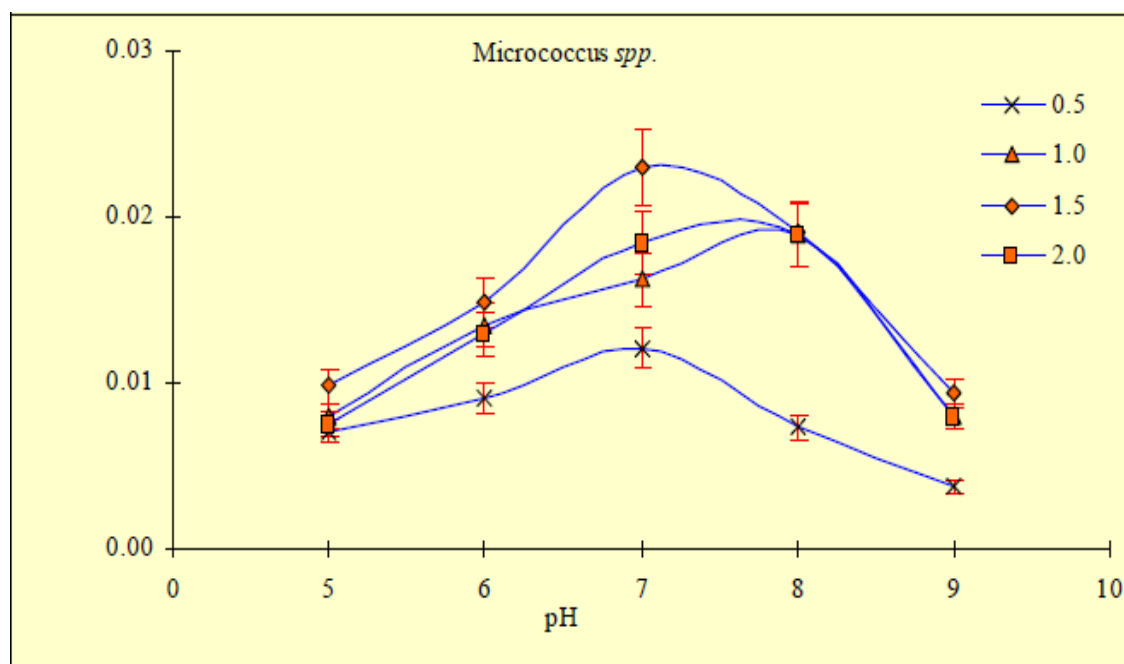


Figure 10 : Activité enzymatique d'endoglucanase (U/mL) en présence de différentes concentrations (0,5-2%) de substrat à pH différent (5-9) par *Micrococcus spp.*

Cette étude montre également que la concentration 1.5% de poudre de fibre de coco prétraitée est la concentration qui a donné l'activité enzymatique la plus élevée (0,023 U/mL) à pH 7 (Immanuel et *al.*, 2006).

### 3.3. L'effet de source de carbone

Les sources de carbone testées pour la production d'enzyme cellulase par *B. thurigiensis* étaient la cellulose, la carboxyméthylcellulose, le dextrose, le lactose et le saccharose allant de 0,5 à 2,5% (p / v) (Tableau 3).

Les CMC s'est révélée être la meilleure source de carbone pour la production d'enzymes par *B. thuringiensis*. La production maximale d'exoglucanase (2,11 UI / mL), d'endoglucanase (2,02 UI / mL) et de  $\beta$ -glucosidase (2,08 UI / mL) a été obtenue dans une culture contenant 1,0% de carboxyméthylcellulose. Parmi les différentes sources de carbone utilisées, la cellulose était la deuxième meilleure source de carbone (1,0%) pour la production de cellulase par *B. thuringiensis* suivie du dextrose, de la cellulose, du lactose et du saccharose (Shilpa et Pethe, 2017).

Tableau 3 : Effet des sources de carbone sur la production de cellulase par *Bacillus thuringiensis*.

Conc %		0.5	1.0	1.5	2	2.5
Cellulose	1	0.61	1.91	1.50	0.89	0.55
	2	0.49	1.90	1.41	0.86	0.45
	3	0.41	1.85	1.39	0.81	0.49
Carboxymethyl Cellulose	1	0.71	2.11	1.81	0.99	0.70
	2	0.69	2.02	1.71	0.97	0.62
	3	0.67	2.08	1.76	0.81	0.66
Dextrose	1	0.72	1.97	1.61	1.25	0.86
	2	0.68	1.89	1.56	1.11	0.71
	3	0.63	1.90	1.45	1.18	0.69
Lactose	1	0.41	1.83	1.51	1.11	0.71
	2	0.35	1.71	1.45	1.02	0.69
	3	0.34	1.63	1.46	1.09	0.65
Sucrose	1	0.55	1.51	1.21	0.88	0.51
	2	0.41	1.40	1.22	0.86	0.43
	3	0.40	1.49	1.22	0.76	0.42

Exoglucanase, 2) Endoglucanase, 3)  $\beta$ -glucosidase

La production de cellulase augmentait avec des augmentations de la concentration initiale en sucre de 1,0 à 1,5%, tandis que des augmentations supplémentaires de la

concentration en sucre réduisaient légèrement le rendement. L'utilisation de CMC comme source de carbone est la meilleure pour la production de cellulase (Shilpa et Pethe, 2017).

### 3.4. L'effet de source d'azote sur la production de cellulase

Pour évaluer l'effet de la source d'azote sur la formation de la cellulase, la source d'azote dans le médium basal a été remplacée par différentes sources d'azote. Les données ont révélé que la supplémentation en sources d'azote organique et inorganique a stimulé le rendement et l'activité de la cellulase. L'utilisation des sources d'azote organiques s'est révélée être meilleure que les sources inorganiques. Parmi les sources d'azote testées, l'efficacité dans le soutien de la production de cellulase et de l'activité cellulolytiques par les deux souches de *Bacillus* de manière significative dans l'ordre suivant : extrait de levure> peptone> extrait de bœuf> NH cl.

Les résultats indiquent clairement que l'extrait de levure est la meilleure source d'azote, donnant 2,07 et 2,17U/ ml de CMC<sub>Case</sub>, 0,99 et 1,01U/ml de FPase et 2,18 et 2,55U/ml d' $\alpha$ -glucosidases pour *Bacillus alcalophilus* S39 et *Bacillus amyloliquefaciens* C2, respectivement. (Abou-Taleb et al., 2009).

Tableau 4 : Effet des sources d'azote sur la production de cellulases par *Bacillus alcalophilus* S39 et *Bacillus amyloliquefaciens* C2.

Sources d'azote	<i>Bacillus alcalophilus</i> S39				<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> C2			
	Biomass g/100ml	Activite de Cellulase (U/ml)			Biomass g/100ml	Activite de Cellulase (U/ml)		
		CMC <sub>Case</sub>	FPase	$\beta$ -glucosidases		CMC <sub>Case</sub>	FPase	$\beta$ -glucosidases
Extrait de bœuf	0.417 <sup>c</sup>	2.05 <sup>b</sup>	0.98 <sup>c</sup>	2.04 <sup>c</sup>	0.420 <sup>b</sup>	0.99 <sup>e</sup>	0.99 <sup>e</sup>	2.25 <sup>b</sup>
Casein	0.395 <sup>gh</sup>	0.41 <sup>l</sup>	0.04 <sup>n</sup>	0.67 <sup>lmn</sup>	0.413 <sup>d</sup>	0.03 <sup>n</sup>	0.01 <sup>e</sup>	0.64 <sup>mn</sup>
Malt	0.356 <sup>p</sup>	1.18 <sup>j</sup>	0.01 <sup>o</sup>	0.73 <sup>lm</sup>	0.380 <sup>k</sup>	0.31 <sup>m</sup>	0.04 <sup>mn</sup>	0.68 <sup>lmn</sup>

Peptone	0.407 <sup>e</sup>	2.05 <sup>b</sup>	0.99 <sup>c</sup>	2.16 <sup>b</sup>	0.381 <sup>k</sup>	2.14 <sup>a</sup>	1.00 <sup>b</sup>	2.47 <sup>a</sup>
Tryptone (Control)	0.360 <sup>o</sup>	1.83 <sup>f</sup>	0.87 <sup>i</sup>	1.34 <sup>h</sup>	0.387 <sup>i</sup>	1.88 <sup>ef</sup>	0.89 <sup>i</sup>	1.41 <sup>gh</sup>
Urea	0.375 <sup>lm</sup>	1.50 <sup>h</sup>	0.47 <sup>k</sup>	0.70 <sup>lm</sup> n	0.385 <sup>ij</sup>	1.64 <sup>g</sup>	0.64 <sup>j</sup>	0.75 <sup>kl</sup>
Levure	0.404 <sup>ef</sup>	2.07 <sup>b</sup>	0.99 <sup>c</sup>	2.18 <sup>b</sup>	0.417 <sup>e</sup>	2.17 <sup>a</sup>	1.01 <sup>a</sup>	2.55 <sup>a</sup>
KNO <sub>3</sub>	0.404 <sup>e</sup>	1.24 <sup>i</sup>	0.06 <sup>l</sup>	1.06 <sup>j</sup>	0.420 <sup>b</sup>	0.81 <sup>k</sup>	0.05 <sup>m</sup>	0.81 <sup>k</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0.378 <sup>l</sup>	0.41 <sup>l</sup>	0.05 <sup>m</sup>	0.64 <sup>n</sup>	0.395 <sup>gh</sup>	1.14 <sup>j</sup>	0.02 <sup>e</sup>	0.98 <sup>j</sup>
NaNO <sub>3</sub>	0.374 <sup>lm</sup>	1.88 <sup>ef</sup>	0.89 <sup>h</sup>	1.62 <sup>e</sup>	0.370 <sup>lm</sup> n	1.90 <sup>ef</sup>	0.90 <sup>g</sup>	1.10 <sup>i</sup>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.397 <sup>g</sup>	1.88 <sup>ef</sup>	0.90 <sup>gh</sup>	1.42 <sup>fg</sup>	0.371 <sup>lm</sup> n	1.89 <sup>ef</sup>	0.92 <sup>f</sup>	1.55 <sup>f</sup>
NH <sub>4</sub> Cl	0.359 <sup>o</sup>	1.97 <sup>cd</sup>	0.96 <sup>e</sup>	1.77 <sup>d</sup>	0.361 <sup>e</sup>	1.93 <sup>edc</sup>	0.98 <sup>e</sup>	1.80 <sup>d</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.424 <sup>a</sup>	1.91 <sup>de</sup>	0.92 <sup>f</sup>	1.49 <sup>f</sup>	0.417 <sup>e</sup>	1.91 <sup>de</sup>	0.97 <sup>d</sup>	1.55 <sup>f</sup>

Les valeurs dans la même colonne suivie de la même lettre ne diffèrent pas significativement de chacune d'elle, selon Duncan au niveau de 5%.

Les données sont conformes aux résultats de Ray et *al.* (2007) qui ont rapporté les sources d'azote organique se sont avérées plus adaptées à l'optimisation de la production de cellulase par *Bacillus subtilis* et *Bacillus circulans* que les sources inorganiques.

### 3.5. L'effets de l'aération

En ce qui concerne l'effet de la vitesse d'agitation sur la production d'enzyme par *Micrococcus* sp. SAMRC-UFH3, aucune différence appréciable entre statique et 50 tr/min pour la production de cellulase n'était observée, bien que l'activité la plus élevée ait été obtenue à 50 tr/min avec une activité de 173U/ mL (figure 11) (Ziyanda. M et *al.*, 2016).



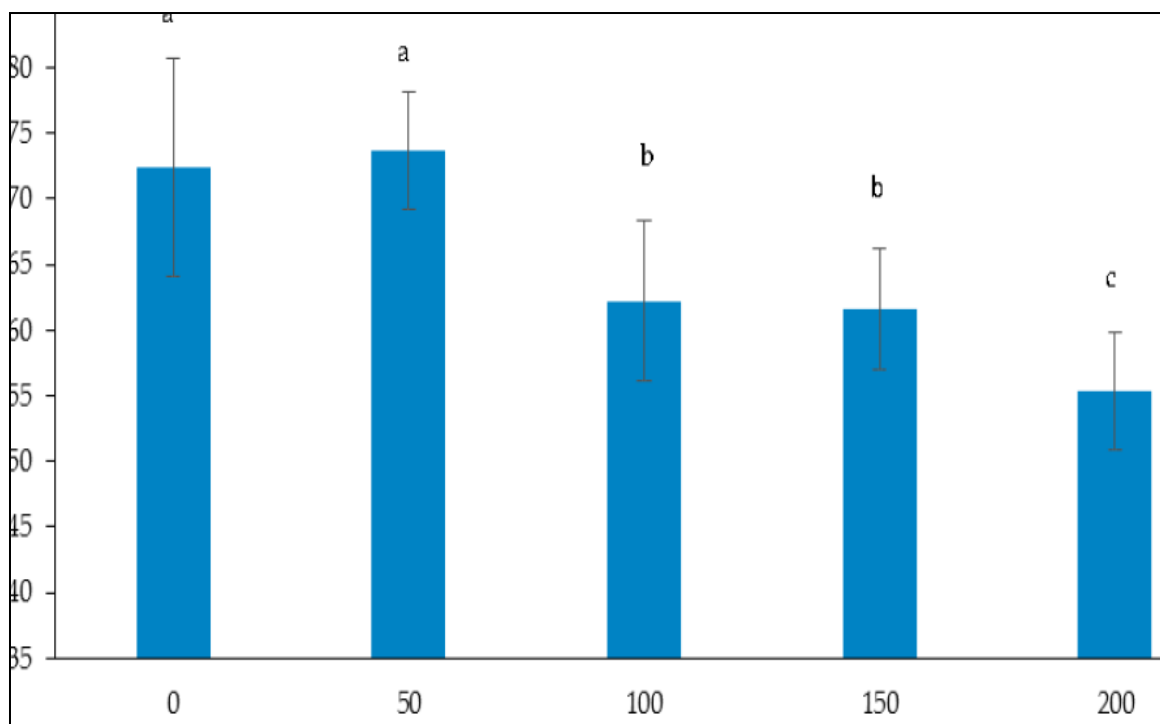


Figure 11 : Effet de la vitesse d'agitation sur la production de cellulases par *Micrococcus* sp. SAMRC-UFH3. Les données sont présentées comme écart-type moyen de trois répliques. Les graphiques à barres avec des lettres différentes montrent une différence significative ( $p < 0,05$ ).

Il a été rapporté que l'agitation affecte le niveau d'aération et mélange des nutriments dans le milieu de fermentation. La production maximale de cellulase a été enregistrée à 50 tr/min avec une activité enzymatique de 173 U / mL. Le travail d'EI-Refai et *al.* (2011) est en d'accord avec ces résultats, en montrant que la meilleure vitesse d'agitation pour la production de cellulases par *Micrococcus* sp se situait entre 0 et 50 tr / min (Ziyanda M et *al.*, 2016).

### 3.6. Effet de temps d'incubation

D'après Goyal et *al.* (2014) : Pour déterminer temps l'incubation optimale de la production de l'enzyme carboxyméthyl cellulase par *Bacillus* sp. 313SI du cours de temps de paille de riz prétraité de la culture a été enregistrée jusqu'à 84 h.

La production d'enzymes cellulase Carboxyméthyl augmentait avec l'augmentation de temps d'incubation et activité est  $2,40 \pm 0,07$  U / mL a été optimisé à 60 h en conditions stationnaires et  $2,97 \pm 0,06$  U / mL à 48 h dans des conditions d'agitation comme illustré à la figure 12.

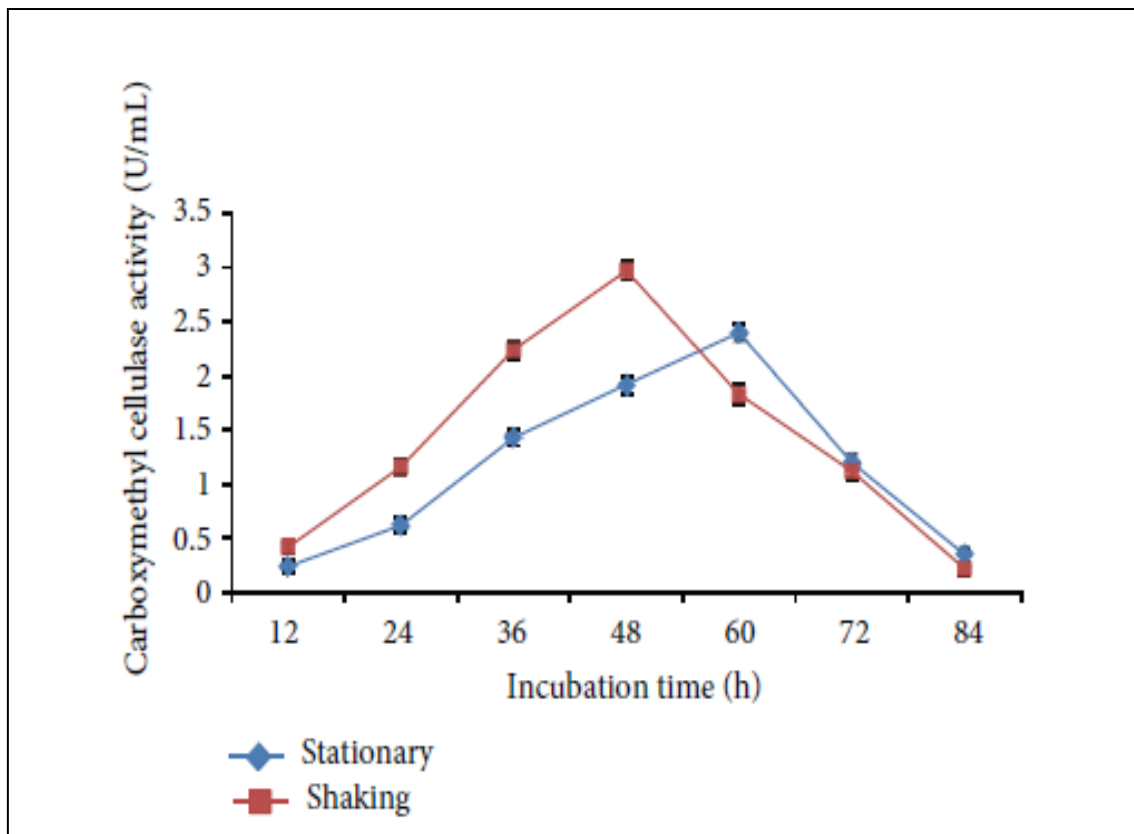


Figure 12 : Effet du temps d'incubation sur la carboxyméthyl cellulase production d'enzymes par *Bacillus* sp. 313SI sous stationnaire et secouer les conditions de croissance. Les valeurs de la figure sont des moyennes de trois réplifications avec un écart type.

Le maximum d'activité enzymatique de la carboxyméthyl cellulase trouvé chez *Bacillus subtilis* Souche KO après 24 h d'incubation. Heck et *al.* (2002) et Amritkar et *al.* (2004) ont trouvé un maximum de carboxyméthyl cellulase activité enzymatique chez *Bacillus* spp. B21, *Bacillus pumilus* et *Bacillus subtilis* après 72 h d'incubation. Poorna et Prema, (2007) ont rapporté l'enzyme maximum carboxyméthyl cellulase activité chez *Bacillus pumilus* après 120 h d'incubation (Goyal et *al.*, 2014) .

# **Conclusion**

## Conclusion

L'objectif principal visé dans votre travail consiste à déterminer les facteurs optimaux de production de cellulases par la souche bactérienne *Micrococcus luteus* isolée à partir des excréments de chameaux (Biskra) en 2019.

Il a été observé que la température optimale pour l'activité cellulase était de 25 °C avec une activité enzymatique de 198 U/mL et une activité cellulase diminuait avec l'augmentation de la température jusqu'à 40 °C après quoi une augmentation graduelle a été observée jusqu'à 50 °C. La production de cellulases à cette température permet la production à température ambiante réduisant ainsi le coût de production en réduisant l'énergie consommée dans le réchauffement des cultures microbiennes.

Parmi les concentrations de fibre de coco prétraitée testées, 1,5% t a montré une activité enzymatique plus élevée 0,023 U / mL à pH 7 pour *Micrococcus* sp. L'utilisation de ce déchet dans la production de cellulases permettrait de réduire le coût de la production

La production maximale d'exoglucanase (2,11 UOI / mL), d'endoglucanase (2,02 UI / mL) et de  $\beta$ -glucosidase (2,08 UI / mL) a été obtenue dans une culture contenant 1,0% de carboxyméthylcellulose, parmi les différentes sources de carbone utilisées. La production optimale de cellulases après croissance de la souche sur la CMC et la cellulose, en comparaison avec les autres sources montre que la souche produit des enzymes inductibles. La production de cellulases dans les cultures à bases de monosaccharides indique les enzymes produites sont constitutive.

La souche se cultive mieux sur les sources organiques que les sources inorganiques. Ceci indique que la souche est habituée à l'utilisation des sources organiques qui sont présentes dans les excréments de chameaux. Pour évaluer l'effet de la source d'azote sur la formation de la cellulase, les résultats montrent que l'extrait de levure la meilleure source d'azote pour les deux trains, donnant 2,07 et 2,17 U / ml de CMCase, 0,99 & 1,01 U / ml de FPase et 2,18 & 2,55 U / ml d' $\alpha$ -glucosidases pour *Bacillus alcalophilus* S39 et *Bacillus 3 amyloliquefaciens* C2, respectivement. La richesse de L'extrait de levure est également une source disponible.

La production maximale de cellulase a été enregistrée à 50 tr/min avec une activité enzymatique de 173 U / mL par souche *Micrococcus* sp. SAMRC-UFH3.

Le temps d'incubation optimale de la production de l'enzyme carboxyméthyl cellulase par *Bacillus sp.* 313SI de paille de riz prétraité est incubation à 60 h.

En perspectives, des études approfondie doivent compléter ce modeste travail ont propose de :

Deux autres voies de recherche seraient pertinentes pour la compréhension des mécanismes de dégradation des substrats cellulosesiques.

L'amélioration génétique de la souche *Micrococcus luteus*, qui pourrait optimiser la production des enzymes, sur le plan de la production des enzymes et aussi la composition du complexe cellulasique.

La séparation et la purification des différentes enzymes du complexe cellulasique, par les techniques de chromatographie ; l'obtention de ces enzymes à l'état pur permettrait une connaissance beaucoup plus fine des forces et des faiblesses de ce spectre, par exemple, l'obtention de la séquence d'acides aminés de certaines de ces enzymes pourrait permettre d'élucider le mécanisme de leur thermostabilité.

**Référence**  
**bibliographique**

## Référence bibliographique

- 1) **Abou-Taleb, K.A.A., Mashhoor, W.A., Nasr-Sohair, A., Sharaf, M.S., Abdel-Azeem., Hoda H.M. (2009).** “Nutritional and environmental factors affecting cellulase production by two strains of cellulolytic *Bacilli* Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 3(3): 2429-2436.
- 2) **Acharya, P.B., Acharya, D.K., Modi, H. A. (2008).** Optimization for cellulase production by *Aspergillus Niger* using sawdust as substrate African Journal of Biotechnology.7. (22). 4147-4152.
- 3) **Acourene, S., Tama, M. (2001).** Utilisation des Dattes de Faible Valeur Marchande (Rebut de Deglet-Nour, Tunisie et Tanttoucht) Comme Substrat pour la Fabrication de la Levure Boulangère. Station I.N.R.A.A, Touggourt. *Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation – Biomasse, p : 1-10.*
- 4) **Aljawish, A. (2013).** Fonctionnalisation enzymatique du chitosane par des composés phénoliques : évaluation des propriétés biologiques et physico-chimiques de ces nouveaux biopolymères. Thèse De Docteur De L’université De Lorraine.
- 5) **Arnoul, J, B. (2006).** Extraction des hémicelluloses de pâtes papetières pour la production de pâte à dissoudre. Thèse De Docteur De L’université Grenoble Alpes.
- 6) **Balat, M. (2011).** Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management* 52: 858–875.
- 7) **Beaugrand, J. (2004).** Bases cytologiques et moléculaires de la dégradation enzymatique du son de blé tendre [en ligne]. Thèse de doctorat : biochimie. Reims : Université de Reims Champagne-Ardenne
- 8) **Benkahoul, M., Talhi, A., Boulefkhad, N. (2017).** Bactéries des environnements chauds Algériens: isolement et mise en évidence de la production d’hydrolases. *Sciences & Technologie*, n°45. pp : 25-35.
- 9) **Bensmira, S. (2006).** Isolement et caractérisation de souches fongiques de milieux extrêmes (sol Sebkhha de la région de Biskra) productrices de cellulase thermostable à intérêt industriel. Mémoire de Magistère en biochimie- microbiologie appliquée. Faculté des sciences. Université Mentouri-Constantine.p : 7-8.
- 10) **Bhavsar, N.H., Raol, B.V., Amin, S.S., Raol, G.G. (2015).** Production, Optimization and Characterization of Fungal Cellulase for Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Agro-waste. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 4(3): 30-46.

- 11) **Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier S., Guy P.H., Larpent. J.P., Reymond P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y., Veau, P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. p : 34-428
- 12) **Chatterjee, S., Sharma, S., Prasad. K, R., Datta, S., Dubey, D., Meghvansi, M.K., Vairale, M.G., Veer, V. (2015).** Cellulase enzyme based biodegradation of cellulosic materials: an overview. South Asian J Exp Biol; 5 (6): 271-282.
- 13) **Chenel.P, J. (2011).** Production De Protéases Thermostables par des bactéries thermophiles en utilisant des boues d'epuration municipales comme substrat. These de *philosophiae doctor* (ph.d.) En sciences de l'eau. Université du Québec.
- 14) **Claisse, N. (2006).** Préparation et modification d'oligosaccharides de cellulose par chimie douce bioinspirée . Thèse De Docteur De L'université De Grenoble.
- 15) **Cordonnier, R.E., Bayonone, C.L., Baumes, R.L. (1986).** Données récentes sur les précurseurs d'arômes du raisin, perspectives de leurs exploitations en vinification. Rev. Fr. Oenol. 102.p :29-41.
- 16) **Deka, D., Das, S.P., Sahoo, N., Das. D., Jawed, M., Goyal.D., Goyal, A., (2013).** Enhanced Cellulase Production from *Bacillus subtilis* by Optimizing Physical Parameters for Bioethanol Production. ISRN Biotechnology.p11.
- 17) **Desvaux, M. (2001).** La Fermentation de la Cellulose par *Clostridium cellulolyticum* : Métabolisme Modèle d'un *Clostridium* Cellulolytique Mésophile. Thèse De Docteur De L'université Henri Poincaré, Nancy 1 En Biologie Structurale, Moléculaire Et Cellulaire. Université De Lorraine.
- 18) **Elhadi, R. (2019).** Isolement et sélection d'une souche bactérienne productrice de cellulase a partir des excrement d'un dromadaire (*Camelus dromedarius*) (Biskra). .mémoire de master. microbiologie applique .p
- 19) **Eloutassi, N., Louaste, B., Boudine, L., Remmal, A. (2014).** hydrolyse physico-chimique et biologique de la biomasse lignocellulosique pour la production de bio-éthanol de deuxième génération. Revue « Nature & Technologie ». C- Sciences de l'Environnement, p11-13.
- 20) **Fonty, G., Chaucheyras-Durand F. (2007).** Les écosystèmes digestifs. (Eds),Technique & Documentation, Paris, pp. 79-94 ; 158-187 ; 204-217 ; 252-265.
- 21) **Galbe, M., Zacchi, G. (2002).** A review of the production of ethanol from softwood, Appl Microbiol Biotechnol,N°59, pp. 618–28.
- 22) **Goyal, V., Mittal, A., Kumari, A. B.,Gulab, S., Yadav, A., Kumar,N.A. (2014).** Parametric Optimization of Cultural Conditions for Carboxymethyl Cellulase



- Production Using Pretreated Rice Straw by *Bacillus sp. 313SI* under Stationary and Shaking Conditions. *Biotechnology Research International*. p : 07.
- 23) **Greenblatt, C.L., Baum, J., Klein, B.Y., Nachshon, S., Koltunov, V., Cano, R.J. (2004).** *Micrococcus luteus* - Survival in Amber. ResearchGate.
- 24) **Gusakov, A.V., Sinitsyn, A.P., Markov, A.V., Skomarovsky, A.A., Sinitsyna, O.A., Berlin, A.G., Ankudimova, N.V. (2000).** Indigo-binding domain in cellulose molecule. *Biocatalysis fundamentals and applications*.
- 25) **Haberra, S., (2014).** Production, optimisation et étude de xylanases chez une nouvelle souche d'Actinomycète thermophile isolée du compost de poulet. diplôme de Doctorat Annaba. University de Badji Mokhtar.
- 26) **Immanuel, G., Dhanusha, R., Prema, P., Palavesam, A. (2006).** Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. *Effect Int. J. Environ. Sci. Tech.*, Vol 3(1): 25-34.
- 27) **Iwashita, K. (2002).** Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. *J. Biosci. Bioeng.*, 94: 530-535
- 28) **Jaradat, J., Dawaagrah, A., Ababnah, Q., Saadoun I., (2008).** Influence of culture conductions on cellulose production by *Streptomyces sp.* *Jordan journal of biological sciences*. Vol 1. No.4. pp : 141- 146.
- 29) **Jendoubi, N. (2011).** Mécanismes de transfert des inorganiques dans les procédés de pyrolyse rapide de la biomasse. Impacts de la variabilité des ressources lignocellulosiques sur la qualité des bio-huiles. Thèse De Docteur De L'INPL. L'institut National Polytechnique De Lorraine.
- 30) **Jouany, J-P. (1994).** Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. INRA station de recherches sur la Nutrition des herbivores. Theix 63122 St Genès Champanelle. Vol.7. No.3 : p : 207-225.
- 31) **Juturu, V., Wu, J. C. (2014).** Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.077>
- 32) **Karim, A., Asif. N., M, Aman, A., Qader, S.A. (2015).** Hyper production of cellulose degrading endo (1,4) b-D-glucanase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB2. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. p : 161- 165.

- 33) **Khan, A., Aung, T.T., Chaudhuri. (2019).** The First Case of Native Mitral Valve Endocarditis due to *Micrococcus luteus* and Review of the Literature. *Case Reports in Cardiology*. p : 1-3.
- 34) **Khelil, O. (2017).** Production de cellulase et d'enzymes associées par des souches de *Bacillus sp.* : Le rôle des prétraitements et l'effet des polyphénols, des flavonoïdes et des biosurfactants. thèse de doctorat en Biotechnologie Végétale.
- 35) **Krisstjansson, J.K., Hreggvidsson, G.O. (1995).** Ecology and habitats of extremophiles. *World J. of Microbiol. and Biotech.*, 11:17-25.
- 36) **Kuhad, R.C., Gupta R., Khasa, Y.P. (2011)** Bioethanol production from lignocellulosic biomass: an overview. In: *Wealth from Waste*. B Lal (Ed). Teri Press, New Delhi, India.
- 37) **Lebaz, N., (2015).** Modélisation de l'hydrolyse enzymatique de substrats lignocellulosiques par bilan de population. Thèse Du Doctorat De L'université De Toulouse.
- 38) **Leghlimi, H. (2013).** Cellulase de souches fongiques issue du sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales). Sélection des souches et étude des caractéristiques des enzymes. Thèses de Doctorat. De L'universite Constantine & Docteur De L'universite De Reims Champagne.
- 39) **Linder, M. (1996).** Optimisation d'un procede de valorisation de co-produits d'abattage par hydrolyse enzymatique. proprietes fonctionnelles et nutritionnelles des hydrolysats. These de docteur de l'i. N. P. L institut national polytechnique de lorraine.
- 40) **Lopez, M. (2007).** Hydrolyses et synthèses chimio-enzymatiques appliquées à la préparation de xylogluco-oligosaccharides pour l'étude des interactions xyloglucanes-cellulose. Thèse De Docteur De L'université Joseph Fourier .Université Joseph Fourier - Grenoble 1.
- 41) **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*, Vol 66 No 3, pp: 506-577.
- 42) **Martinez, A., Speranza, M., Ruiz-Duenas, F., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F. (2005).** *Biodegradation of lignocellulosic: microbial, chemical and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin.* *Internation Microbiology*.
- 43) **Mazza, M. (2009).** Modification chimique de la cellulose en milieu liquide ionique et CO<sub>2</sub> super critique. Thèse de doctorat. Institut Nationale Polytechnique de Toulouse. France.

- 44) **Mechakra. M. A., Gheribi.A, Z., Meraihi1, Z., Bousseboua,H. (2002).** Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de la protéase acide par *aspergillus niger*. *Sciences & Technologie*. pp. 59-63.
- 45) **Miller, G. (1995).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.*;31:426-428.
- 46) **Miltiadous, G., Elisaf, M. (2011).** Native valve endocarditis due to *Micrococcus luteus*: a case report and review of the literature ,*Journal of Medical Case Reports*, vol. 5( 1), p. 251.
- 47) **Mukhtar, S., Ahmad, Z., Dalaq, A., Kauser, A.M., Mehnaz, S. (2017).** Actinomycetes: A Source of Industrially Important Enzymes. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*. Vol, 10, p: 316-319.
- 48) **Nisha, P., 2015.** Cellulase production optimization using cellulolytic bacteria. *International Journal Of Pharmaceutical, Chemical And Biological Sciences*. ISSN: 2249-9504. 5(1), 262-266.
- 49) **Olga, B. (2002).** Etude physico-chimique des solutions de cellulose dans la n-methylmorpholine- oxyde, thèse de Doctorat pp 10, Ecole des mines de Paris.
- 50) **Prevot, V. (2013).** Comparaison de la production de complexes enzymatiques par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu liquide. Thèse de doctorat .Université de Reims Champagne-Ardenne. France.
- 51) **Raimbault, M. (1998).** General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electron. J. Biotechnol., Laboratoire de Biotechnologie Microbienne Tropical*. *EJB Electronic Journal of Biotechnology* .Vol 1 (3), p 1-15.
- 52) **Ramesh, C., Rishi, G., Ajay, S., (2011).** Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Journal of SAGE-Hindawi*.10 pages.vol 10.4061.
- 53) **Ray, A.K., Bairagi, K.S., Ghosh, A., Sen, S.K. (2007).** Optimization of fermentation conditions for cellulase production by *Bacillus subtilis* CY5 and *Bacillus circulans* TP3 isolated from fish gut. *Acat IchEtPist*; 37: 47– 53.
- 54) **Reffas, F.Z.I. (2017).** Isolement et caractérisation de bactéries productrices de cellulase. Thèse de Doctorat 3ème Cycle En Sciences. Université Djillali Liabes De Sidi Bel Abbes.
- 55) **Reguant, J., Rinaudo, M. (1999).** Etude bibliographique sur les matériaux issus de la biomasse végétale. *Centre National De La Recherche Scientifique* ; pp 1-164.
- 56) **Sadhu, S., Maiti, T. K. (2013).** Cellulase production by bacteria: a review. *British Microbiology Research Journal*. Vol 3(3).p : 235-258.

- 57) **Sall, S.N. (2004).** L'importance des relations résidus végétaux- communautés microbiennes sur les processus de décomposition dans un sol ferrugineux tropical (Sénégal): effet de la disponibilité de l'azote. Thèse de Doctorat. Université Paris XII Val De Maane.108p.
- 58) **Saradouni, N., Penninckx, M., Mohand-Oussaid, O., Benallaoua, S. (2004).** Recherche d'un milieu optimal pour la production de la  $\alpha$ -glucosidase chez *aspergillus fumigatus* (*fresenius*) mutant *albino* . *Sciences & Technologie C – N°21*, pp. 11-17.
- 59) **Schamburg, D., Salzman, M.G.B.F. (1991).** Cellulase. *In: Enzyme Handbook.* Springer-Verlag Berlin, Vol IV, p: 1-11.
- 60) **Scriban, R. (1993).** Biotechnologie. 4eme édition. Tech. et Doc. Lavoisier. Paris. pp. 396-356.
- 61) **Shilpa, L., Pethe, A. (2017).** Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production. *Int. J. of Life Sciences*, Vol 5 (2): 277-282.
- 62) **Smant, G., Stokkermans, J.P.W.G., Yan, Y., De-Boerù, J.M., Baum, T.J., Wang, X., Hussey, R.S., Gommers, F.J., Henrissat, B., Davis, E.L., Helder, J., Schots, A., Bakker J. (1998).** Endogenous cellulases in animals: Isolation of  $\beta$ -1,4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. *Biochemestery*. Vol 95, No 9. pp: 4906 4911.
- 63) **Tchunden, J. 1990.** Cellulolyse anaérobie mésophile :étude de l'amélioration de la production de cellulases par *ci. cellulolyticum* ATCC 35 31 9. These De Doctorat En Biochimie Appliquee. Universite De Nancy I.
- 64) **Thakkar, A., Saraf, M. (2014).** Application of Statistically Based Experimental Designs to Optimize Cellulase Production and Identification of Gene. *Nat. Prod. Bioprospect.*4 :341–351.
- 65) **Tian, T.H., (2016).** Étude d'un prétraitement biologique des biomasses lignocellulosiques par une approche microbiologique et de bioprocédé. thèse de doctorat. niversité de rennes 1.
- 66) **Urs.S, M., Umar, M.D., Noomrio, M.H. (2018).** Hydrochloric acid pretreated agro wastes as carbon source on CM-cellulases production by *Aspergillus niger*. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*. Vol 5 (6). p : 369- 376.
- 67) **Wieser, M., Denner .E.B., Kampfer, P., Schumann ,P., Tindall .B., Steiner .U .,Vybiral .D., Lubitz. W., Maszenan. A.M., Patel .B.K., Seviour .R.J., Radax .C., Busse, H.J., 2002.** Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus*

*luteus* (cohn1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos et al,1974).International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.52. p: 629-637.

- 68) **Xu, B., Hellman U., Ersson, B., Janson, J. C. (2000).** Purification, characterization and aminoacid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo- $\beta$ -1,4-glucanase from Blue Mussel, *Mytilus edulis*. Euro J Biochem. 267: 4970-4977
- 69) **Zermane, F. (2008).** Etude des caractéristiques culturales des Actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques des composés organiques de synthèse. Mémoire de Magistère en Microbiologie appliquée. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Mentouri-Constantine.126p.
- 70) **Zhang, Y-HP., L.R. Lynd. (2004).** Toward an aggregate d unders tanding of enzymatic hydrolysis ofncellulose: noncomplexed cellulose sys tems . Biotechnol. Bioeng., 88: 797-824.
- 71) **Ziyanda, M.K., 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 .Vol, 8 (1168).p 15.

# **Annexes**

## Annexes

## Annexe 01 :

Tableau : Inventaire des principales fibres disponibles à l'échelle mondiale (Reguant et Rinaudo, 1999).

Source de fibres	Milliers tonnes fibres sèches
Bois	1 750 000
Pailles (Blé, riz, orge, avoine, seigle, lin)	1 145 000
Tiges (maïs, sorgho, coton)	970 000
Bagasse de canne à sucre	7 5 000
Roseaux	30 000
Bambou	30 000
Fibres de Coton	15 000
Tiges (jute, kénaif, chanvre)	8 000
Papyrus	5 000
Péribériennes (jute, kénaif, chanvre)	2 900
Linters de coton	1 000
Alfa	500
Feuilles (sisal, abaca, henequen)	480
Sabai (herbe à éléphant)	200

## Annexe 02 :

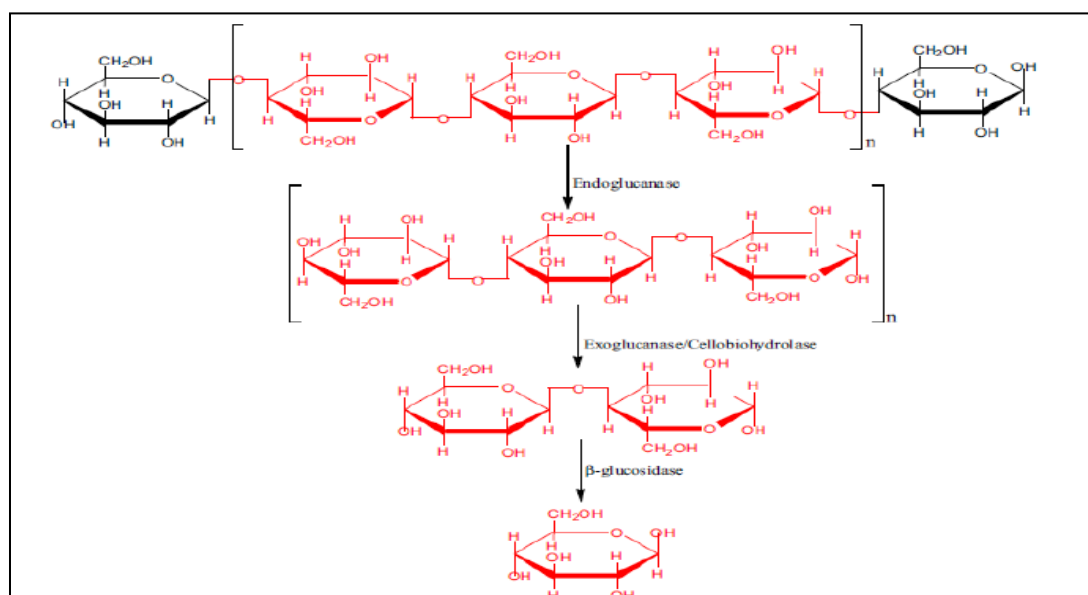
Tableau : Caractéristiques des cellulases (Bensmira, 2006).

	Description
<b>Réaction et spécificité</b>	Elle est représentée par l'endohydrolyse des liaisons 1,4- $\beta$ -D-glucosidiques de la cellulose et des lignines mais aussi l'hydrolyse des liaisons 1,4 et 1,3 en $\beta$ -D- glucanes.
<b>Substrats naturels</b>	la cellulose

<b>Inhibiteurs</b>	Hg <sup>2+</sup> , le glucose, le cellobiose, la glucosylamine, les gluconolactones, le N-bromosuccinimide, l'arsenate, le sodium dodecyl sulfate, le dithiothreitol, les dextrans.
<b>Activité enzymatique</b>	Correspond à la quantité d'enzymes dégradant la carboxyméthylcellulose en carbohydrates réduits (1 micromole de glucose par minute). Elle varie de 60U à 1168 U et plus pour les enzymes immobilisées.
<b>Poids Moléculaire</b>	Les cellulases ont des poids moléculaires très variables qui dépendent principalement de leurs origines. Certaines endoglucanases ont des poids moléculaires de 30 à 90 KDa.
<b>pH optimum</b>	La plupart des préparations cellulolytiques étudiées ont un pH optimum variant de 3 à 7 ; Celles d'origine fongique ont une gamme plus limitée (pH de 4 à 5). Contrairement aux cellulases bactériennes dont le pH optimum est proche de la neutralité.
<b>Température optimale</b>	La température optimale des cellulases fongiques varie entre 40 et 70 °C alors que celle des bactéries varie entre 50 et 100°C, ce qui explique leur utilisation en industrie du textile.

### Annexe 03 :

Figure : Mode d'action des trois principaux types d'enzymes constituant le complexe cellulasique (Juturu et *al.*, 2014).





**Annexe 04 :**

Tableau : Exemples des microorganismes producteurs de la cellulase

<b>Microorganismes</b>	<b>Espèces</b>
<b>Levures</b>	<i>Candida molischiana</i> , <i>C. pulcherrima</i> , <i>C. stellata</i> , <i>C. wickerhamii</i> , <i>Cryptococcus flavus</i> , <i>Kloeckera apiculata</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Rhodotorulaglu</i> , <i>Saccharomyces fibuligeratinis</i> , <i>Trichosporon cutanum</i>
<b>Moisissures</b>	<i>Neocallimastix frontalis</i> , <i>Sphaeromonas communis</i> , <i>Piromonas commmunis</i> , <i>Chytridomycètes</i> , <i>Trichoderma viridae</i> , <i>T. reesei</i> , <i>T. koningii</i> , <i>Aspergillus aculeatus</i> <i>A.nidulans</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A niger</i> , <i>A. terreus</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Sporotrichumpulver lentum</i> , <i>Chaetomium cellulolyticum</i> , <i>Humicolain solens</i>
<b>Bactéries</b>	<b>Aérobies :</b> <i>Sporocytophaga</i> , <i>Myxococcoides</i> , <i>Baccillus subtilis</i> , <i>Cellulomonas</i> et <i>Pseudomonas</i> <b>Anaérobies strictes :</b> <i>Clostridium thermocellum</i> , <i>C. stercorarium</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>R. flavefasciens</i> , <i>Bactéroï des succinogenes</i> <b>Anaérobies facultatives :</b> <i>Erwinia chrysantharum</i> <b>Anaérobies strictes:</b> <i>Clostridium thermocellum</i> , <i>C. stercorarium</i> , <i>Ruminococcusalbus</i> , <i>R. flavefasciens</i> et <i>Bactéroï des succinogenes</i>
<b>Actinomycètes</b>	<i>Thermomonospora fusca</i> , <i>Cellulomonas fimi</i> , <i>C.bioazotea</i> , <i>C.uda</i> , <i>Streptomyces drozdowiczii</i> , <i>S.lividans</i>

**Annexe 05 :**

Les étapes de dégradation de cellulose :

Etape 1 : Transfert de l'enzyme du milieu aqueux vers le polysaccharide insoluble et adsorption des enzymes (cellulases) sur le substrat à l'interface liquide-solide via le module de liaison grâce à des interactions non covalentes (hydrogène, électrostatique ou hydrophobe);

Etape 2 : Localisation d'une liaison susceptible d'être hydrolysée à la surface du substrat ;

Etape 3 : Formation du complexe enzyme-substrat (par insertion de l'extrémité de chaîne dans le tunnel catalytique pour initier l'hydrolyse) ;

Etape 4 : Hydrolyse de la liaison  $\beta$ -glycosidique et glissement simultanée vers l'avant de l'enzyme le long de la chaîne de cellulose ;

Etape 5 : Désorption des cellulases du substrat ou répétition de l'étape 4 ou des étapes 2/3 si ce n'est que le domaine catalytique se détache de la chaîne ;

Etape 6 : Transfert des produits de dégradation du polysaccharide vers le milieu aqueux et hydrolyse du cellobiose en glucose par la  $\beta$ -glucosidase (si cette enzyme est présente dans le cocktail enzymatique).

#### **Annexe 06 :**

La composition de milieux à base CMC

L'eau distillée.....	800ml
NaOH.....	16g
DNS.....	10g
Tartrate.....	300g

#### **Annexe 07 :**

Solution à base d'acide dinitrosalicylique (DNS)

Acide dinitrosalicylique .....	10 g.
Soude .....	16 g.
Tartrate de potassium sodique.....	300 g.
Eau distillée .....	1L.

La solution est préparée dans l'obscurité puis conservée dans un flacon opaque à température ambiante.

#### **Annexe 08 :**

Tampon phosphate de sodium (50mM) à pH 7 :

- $K_2HPO_4$ .....	5,2 g
- $KH_2PO_4$ .....	10,7 g
- d'eau distillée.....	1L

**Annexe 09 :**

Liste de référence qui utilise dans le parti matérielle et méthode, résultat et discussion

- 1) **Abou-Taleb, K.A.A., Mashhoor, W.A., Nasr-Sohair, A., Sharaf, M.S., Abdel-Azeem., Hoda H.M. (2009).** “Nutritional and environmental factors affecting cellulase production by two strains of cellulolytic *Bacilli* Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 3(3): 2429-2436.
- 2) **Aljawish, A. (2013).** Fonctionnalisation enzymatique du chitosane par des composés phénoliques : évaluation des propriétés biologiques et physico-chimiques de ces nouveaux biopolymères. Thèse De Docteur De L’université De Lorraine.
- 3) **Benkahoul, M., Talhi, A., Boulefkhad, N. (2017).** Bactéries des environnements chauds Algériens: isolement et mise en évidence de la production d’hydrolases. *Sciences & Technologie*, n°45. pp : 25-35.
- 4) **Bhavsar, N.H., Raol, B.V., Amin, S.S., Raol, G.G. (2015).** Production, Optimization and Characterization of Fungal Cellulase for Enzymatic Saccharification of Lignocelulosic Agro-waste. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 4(3): 30-46.
- 5) **Chenel, P, J. (2011).** Production De Protéases Thermostables par des bactéries thermophiles en utilisant des boues d'epuration municipales comme substrat. These de *philosophiae doctor* (ph.d.) En sciences de l'eau. Université du Québec.
- 6) **Elhadi, R. (2019).** Isolement et sélection d'une souche bactérienne productrice de cellulase a partir des excrement d'un dromadaire (*Camelus dromedarius*) (Biskra). .mémoire de master. microbiologie applique .
- 7) **Eloutassi, N., Louaste, B., Boudine, L., Remmal, A. (2014).** hydrolyse physico-chimique et biologique de la biomasse lignocellulosique pour la production de bio-éthanol de deuxième génération. *Revue « Nature & Technologie »*. C- Sciences de l'Environnement, p11-13.
- 8) **Goyal, V., Mittal, A., Kumari, A. B., Gulab, S., Yadav, A., Kumar, N.A. (2014).** Parametric Optimization of Cultural Conditions for Carboxymethyl Cellulase Production Using Pretreated Rice Straw by *Bacillus sp. 313SI* under Stationary and Shaking Conditions. *Biotechnology Research International.* p : 07.
- 9) **Greenblatt, C.L., Baum, J., Klein, B.Y., Nachshon, S., Koltunov, V., Cano, R.J. (2004).** *Micrococcus luteus* - Survival in Amber. ResearchGate.

- 10) **Haberra, S., (2014).** Production, optimisation et étude de xylanases chez une nouvelle souche d'Actinomycète thermophile isolée du compost de poulet. diplôme de Doctorat Annaba. University de Badji Mokhtar.
- 11) **Immanuel, G., Dhanusha, R., Prema, P., Palavesam, A. (2006).** Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. Effect Int. J. Environ. Sci. Tech., Vol 3(1): 25-34.
- 12) **Khan, A., Aung, T.T., Chaudhuri. (2019).** The First Case of Native Mitral Valve Endocarditis due to *Micrococcus luteus* and Review of the Literature. Case Reports in Cardiology.p : 1-3.
- 13) **Lebaz, N., (2015).** Modélisation de l'hydrolyse enzymatique de substrats lignocellulosiques par bilan de population. Thèse Du Doctorat De L'université De Toulouse.
- 14) **Linder, M. (1996).** Optimisation d'un procede de valorisation de co-produits d'abattage par hydrolyse enzymatique. proprietes fonctionnelles et nutritionnelles des hydrolysats. These de docteur de l'i. N. P. L institut national polytechnique de lorraine.
- 15) **Miller, G. (1995).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem.;31:426-428.
- 16) **Miltiadous, G., Elisaf, M. (2011).** Native valve endocarditis due to *Micrococcus luteus*: a case report and review of the literature ,Journal of Medical Case Reports, vol. 5( 1), p. 251.
- 17) **Nisha, P., 2015.** Cellulase production optimization using cellulolytic bacteria. International Journal Of Pharmaceutical, Chemical And Biological Sciences. ISSN: 2249-9504. 5(1), 262-266.
- 18) **Prevot, V. (2013).** Comparaison de la production de complexes enzymatiques par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu liquide. Thèse de doctorat .Université de Reims Champagne-Ardenne. France.
- 19) **Raimbault, M. (1998).** General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. Electron. J. Biotechnol., Laboratoire de Biotechnologie Microbienne Tropical. EJB Electronic Journal of Biotechnology .Vol 1 (3), p 1-15.
- 20) **Ray, A.K., Bairagi, K.S., Ghosh, A., Sen, S.K. (2007).** Optimization of fermentation conditions for cellulase production by *Bacillus subtilis* CY5 and *Bacillus circulans* TP3 isolated from fish gut. Acat IchEtPist; 37: 47– 53.

- 21) **Shilpa, L., Pethe, A. (2017).** Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production. *Int. J. of Life Sciences*, Vol 5 (2): 277-282.
- 22) **Thakkar, A., Saraf, M. (2014).** Application of Statistically Based Experimental Designs to Optimize Cellulase Production and Identification of Gene. *Nat. Prod. Bioprospect.* 4 :341–351.
- 23) **Wieser, M., Denner .E.B., Kampfer, P., Schumann ,P., Tindall .B., Steiner .U .,Vybiral .D., Lubitz. W., Maszenan. A.M., Patel .B.K., Seviour .R.J., Radax .C., Busse, H.J., 2002.** Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (cohn1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos et al,1974). *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52. p: 629-637.
- 24) **Ziyanda, M.K., 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* .Vol, 8 (1168).p 15.

# Résumé

## الملخص

يهتم هذا العمل بتحسين معاملات إنتاج إنزيم السيليلاز من سلالة *Micrococcus luteus* ، مثل درجة الحموضة؛ درجة حرارة الحضانة؛ وقت الحضانة ؛ مصدر الكربون ؛ مصدر النيتروجين وتأثير التهوية . تظهر نتائج البحوث السابقة أن تأثير درجة الحرارة يظهر نشاطاً عالياً قدره 198 وحدة / مل عند 25 درجة مئوية ، وعند درجة الحموضة 07 يبلغ النشاط الإنزيمي أفضله 0.023 وحدة / مل بالنسبة لسلالة *B. thurigiensis* . يعد CMC أفضل مصدر للكربون لإنتاج السيليلاز و من بين مصادر النيتروجين التي تم اختبارها في دعم فعالية إنتاج السيليلاز ونشاط التحلل السليوليت بواسطة سلالاتي العصيات بشكل كبير بالترتيب التالي: مستخلص الخميرة > البيبتون > مستخلص اللحم البقري > NH Cl . معدل التحريك على إنتاج الإنزيم بواسطة *Micrococcus sp. SAMRC-UFH3* تم الحصول عليه عند 50 دورة في الدقيقة مع نشاط 173 وحدة / مل . إنتاج إنزيم carboxymethyl cellulase بواسطة *Bacillus sp. 313SI* على قش الأرز يزداد مع زيادة وقت الحضانة . تم تحسينه عند 60 ساعة في ظل ظروف ثابتة و  $2.97 \pm 0.06$  وحدة / مل .

الكلمات المفتاحية : *Micrococcus luteus* ; *Bacillus sp* ; *B. thurigiensis* ; CMC ; السيليلاز.

## Résumé

Ce travail s'intéresse à l'optimisation des paramètres de production de enzyme cellulase à partir d'une souche *Micrococcus luteus* , tels que le pH, la température d'incubation, le temps d'incubation, la source de carbone et la source d'azote et l'effet d'aération. Les résultats de recherches précédentes montrent que l'influence de la température montre une grande activité de 198 U / mL à 25 C, au pH 07 une meilleure activité enzymatique de 0,023 U / mL. Pour la souche *B. thurigiensis* la CMC est la meilleure source de carbone pour la production de cellulase. Parmi les sources d'azote testées, l'efficacité dans le soutien de la production de cellulase et de l'activité cellulolytiques par les deux souches de *Bacillus* de manière significative dans l'ordre suivant : extrait de levure> peptone> extrait de bœuf> NH Cl. La vitesse d'agitation sur la production d'enzyme par *Micrococcus sp. SAMRC-UFH3* été obtenue à 50 tr/min avec une activité de 173U/ mL. La production de l'enzyme carboxyméthyl cellulase par *Bacillus sp. 313SI* sur la paille de riz augmente avec l'augmentation de temps d'incubation. Elle a été optimisée à 60 h en conditions stationnaires et  $2,97 \pm 0,06$  U/mL.

Mots clés : *Micrococcus luteus* ; CMC ; *Bacillus sp* ; *B. thurigiensis* ; cellulase.

## Abstract

This work is interested in the optimization of the production parameters of cellulase enzyme from a strain *Micrococcus luteus*, such as the pH, the incubation temperature, the incubation time, the carbon source and the source of "Nitrogen and aeration effect. The results of previous research show that the influence of temperature shows a high activity of 198 U / mL at 25 C, at pH 07 a better enzymatic activity of 0.023 U / mL. For the *B. thurigiensis* strain, CMC is the best source of carbon for cellulase production. Among the nitrogen sources tested, the efficacy in supporting cellulase production and cellulolytic activity by the two *Bacillus* strains significantly in the following order: yeast extract> peptone> beef extract> NH Cl. The rate of stirring on enzyme production by *Micrococcus sp. SAMRC-UFH3* was obtained at 50 rpm with an activity of 173U / mL .The production of the enzyme carboxymethyl cellulase by *Bacillus sp. 313SI* on rice straw increases with increasing incubation time. It was optimized at 60 h under stationary conditions and  $2.97 \pm 0.06$  U / mL .

Keywords: *Micrococcus luteus*; CMC; *Bacillus sp*; *B. thurigiensis*; cellulase.