



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

MÉMOIRE DE MASTER

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

Réf. :

Présenté et soutenu par :
ELGUESS Marwa et SLIMANI Saida Manar

Le : jeudi 23 juin 2022

Optimisation de la production de cellulase par des souches de *Bacillus* isolées de différentes sources

Jury :

Dr.	DERRADJI Yasine	MAA	Université de Biskra	Président
Mme.	BENGUERAICHI Fatiha	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme.	BOUCIF Asma	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2021 - 2022

Remerciements

Nous remercions, en premier lieu, le grand DIEU pour nos avoir donné la force et la résolution pour réaliser ce travail.

Nous remercierons vivement :

Madame: BENGURAICHI F, notre directeur de mémoire, pour l'intérêt qu'elle a portée à ce travail, ses compétences scientifiques et son soutien.

Des remerciements également aux membres du jury qui ont accepté de juger ce modeste travail.

Nous remercions, enfin tous ceux qui d'une manière ou autre ont contribué à l'élaboration de ce modeste travail.

Dédicaces

MANAR

AVANT TOUS, TOUT CELA EST DÛ À LA GRÂCE DE DIEU TOUT-
PUISSANT À LA FACULTÉ DE LA SCIENCE DE LA VIE ET TOUS LES
CAMARADES EN BIOCHIMIE

À CELUI QUI M'A AIDÉ ET SOUTENU.

MA CHÈRE MAMAN KAIMA

À CEUX QUI PARTAGENT MES JOIES ET MES PEINES, À LA FEMME LA
PLUS MERVEILLEUSE QUI SOIT

MON CHER PÈRE LARBI

À CELUI QUI M'A APPRIS QUE LE MONDE SUFFIT, À L'HOMME LE PLUS
MERVEILLEUX DE L'UNIVERS

À MES CHÈRES SŒURS ET FRÈRES

MOHAMED, SADJDA, ZIAN, AHMED

À MES CHERS AMIS

AUX ÂMES SŒURS ET À LA TRANQUILLITÉ D'ESPRIT CHAHINAZ.S,
SARA.A ET MERIEM.S

À MES TANTES AINSI QU'À TOUT LES MEMBRES DE MA FAMILLE

FINALEMENT

ENFIN J'AI LEVÉ MON CHAPEAU ADIEU LES ANNÉES PASSÉES.

MANAR

Dédicaces

MARWA

AVANT TOUS, TOUT CELA EST DÛ À LA GRÂCE DE DIEU TOUT-
PUISSANT À LA FACULTÉ DE LA SCIENCE DE LA VIE ET TOUS LES
CAMARADES EN BIOCHIMIE

À CELUI QUI M'A AIDÉ ET SOUTENU.

MA CHÈRE MAMAN LAILA

À CEUX QUI PARTAGENT MES JOIES ET MES PEINES, À LA FEMME LA
PLUS MERVEILLEUSE QUI SOIT

MON CHER PÈRE ABDERRAHMANE

À CELUI QUI M'A APPRIS QUE LE MONDE SUFFIT, À L'HOMME LE PLUS
MERVEILLEUX DE L'UNIVERS

À MES CHÈRES SŒURS ET FRÈRES

RIADH, MANEL, AYA, KHADIJA

À MES CHERS AMIS

AUX ÂMES SŒURS ET À LA TRANQUILLITÉ D'ESPRIT YOUSRA .A,
SOUMIA.M ET AICHA.KH

FINALEMENT

ENFIN J'AI LEVÉ MON CHAPEAU ADIEU LES ANNÉES PASSÉES

Marwa

Table des matières

Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations	IV
Introduction.....	1

Partie Bibliographique

Chapitre 1. Cellulases

1.1. Enzymes hydrolases	2
1.2. Glycosides hydrolases.....	2
1.3. Cellulases	2
1.3.1. Définitions des cellulases.....	2
1.3.2. Nomenclature des cellulases	
1.3.3. Mode d'action des cellulases.....	3
1.3.4. Origines des cellulases	3
1.3.3.1. Origine animale	4
1.3.3.2. Origine végétale	4
1.3.3.3. Origine microbienne.....	5
1.3.5. Applications des cellulases.....	6
1.3.5.1. Industrie alimentaire humaine et animale.....	6
1.3.5.2. Industrie des textiles.....	7
1.3.5.3. Industrie des pâtes et papiers.....	7
1.3.5.4. Biocarburant	

Chapitre 2. *Bacillus*

2.1. Définition	7
2.2. Habitat.....	7
2.3. Classifications.....	7
2.4. Production des enzymes	8
2.5. Production des cellulases.....	8

Partie Expérimentale**Chapitre 3. Matériel et méthodes**

3.1. Échantillonnage	9
3.2. Isolement et criblage des bactéries productrices de cellulase	9
3.3. Identification des souches isolées	11
3.3.1. Identification morphologique	11
3.3.2. Identification biochimique	11
3.3.3. Identification moléculaire	11
3.3.3.1. Extraction d'ADN génomique	11
3.3.3.2. Amplification du fragment d'ADN 16S	11
3.3.3.3. Analyse électrophorétique des fragments amplifiés	12
3.3.3.4. Séquençage de l'ADN 16S	12
3.4. Production de la cellulase	12
3.5. Dosage de la cellulase	13
3.6. Optimisation pour une production maximale de cellulase	13
3.6.1. pH	14
3.6.2. Température	14
3.6.3. Source de carbone	14
3.6.4. Sources d'azote	14
3.6.5. Concentrations d'inoculum	14
3.6.6. Temps d'incubation	14
Chapitre 4. Résultats et discussion	
4.1. Isolement et criblage de bactéries productrices de cellulase	15
4.2. Identification des bactéries	17
4.3. Optimisation de la production de cellulase	22
Conclusion	33
Références bibliographiques	34

Liste des tableaux

Tableau 1. Présentation des sites de prélèvement.	9
Tableau 2. Composition du mélange réactionnel de PCR.	12
Tableau 3. Programme d'amplification de la PCR.	12
Tableau 4. Nombre des souches productrices des cellulases.	15
Tableau 5. Identification moléculaire des isolats	17
Tableau 6. Genres probables et pourcentage de similarité des isolats avec les espèces relative	21
Tableau 7. Résultats des différents échantillons ont été optimisés pour leur potentiel cellulolytique dans différentes conditions.	22

Liste des figures

Figure 1. Mode d'action de la cellulase	3
Figure 2. Structure de bactérie <i>bacillus</i>	7
Figure 3. Préparation des dilutions	10
Figure 4. L'activité cellulasique de <i>Bacillus albus</i> cultivée sur milieu CMC.	16
Figure 5. Arbre phylogénétique construit par la méthode de Neighbor-joining.	18
Figure 6. Criblage des souches bactériennes productrices de cellulase.....	19
Figure 7. Arbre phylogénétique des bactéries cellulolytiques isolées des systèmes intestinaux de <i>H. armigera</i>	20
Figure 8. Effet de la température sur l'activité cellulase de différents isolats.....	23
Figure 9. Effet du pH sur l'activité cellulosique des différents isolats	23
Figure 10. Effet des sources de carbone sur l'activité cellulase de différents isolats	24
Figure 11. Effet de la température sur la production de cellulase par <i>Bacillus albus</i>	24
Figure 12. Effets du pH initial du milieu sur la production de cellulase par <i>Bacillus albus</i> ...	24
Figure 13. Effet de différentes sources de carbone (1%, p/v) sur la production de cellulase par <i>Bacillus albus</i>	24
Figure 14. Effet de différentes sources d'azote (1%, p/v) sur la production de cellulase par <i>Bacillus albus</i>	24
Figure 15. Effet du temps d'incubation sur la production de cellulase par <i>Bacillus albus</i>	25
Figure 16. Effet de la concentration des inoculum sur la production de cellulase par <i>Bacillus albus</i>	25
Figure 17. Optimisation des paramètres de culture et de l'activité enzymatique	25
Figure 18. Optimisation de différents paramètres de processus.....	26
Figure 19. Effet de la température, du pH et du temps d'incubation sur la croissance des cellules bactériennes et la cellulase et la production de cellulase	27
Figure 20. Effet du pH sur l'activité de dégradation de la cellulose des bactéries potentielles.	27

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CMC	CarboxyMéthylCellulose
EMB	Eosin Methylene Blue
NCBI	National Centre for Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaction

Introduction

Introduction

Ces dernières années, il y a une demande croissante d'enzymes importantes sur le plan industriel, parmi lesquelles les enzymes cellulosiques, qui se classent au troisième rang mondial dans les industries enzymatiques.

L'intérêt des cellulases s'est développé à travers le monde, en raison de leurs applications industrielles multiples telles que l'industrie du papier et de la pâte, des textiles, des biocarburants, aussi dans l'extraction de jus de fruits et légumes. En outre, les cellulases étaient commercialement valables pour plus de 30 ans, et présentent une cible pour les recherches aussi bien académiques ou industrielles (Bahouli et Zidalmal, 2020).

Les cellulases sont un groupe complexe d'enzymes contient trois constituants principaux : les exoglucanase (EC3.2.1.74), les β -glucosidases (EC3.2.1.21) et les endoglucanase (EC3.2.1.4) (Abada et *al.*, 2021) qui sont sécrétées par un large éventail de micro-organismes, notamment des champignons filamenteux, des bactéries et des levures (Sandhya et *al.*, 2005 ; Khelil, 2017).

Cependant, la production de cellulases bactériennes à l'échelle commerciale a été limitée en raison de sa complexité ainsi que de la difficulté de l'extraction et de la purification. Un large éventail de recherche a été initié sur l'application de cellulase bactériennes (Bhagat et Kokitkar, 2021).

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

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

Partie Bibliographique

Chapitre 1.

Cellulases

Chapitre 1. Cellulases

1.1. Enzymes hydrolases

Les hydrolases sont le groupe d'enzymes qui catalysent les clivages de liaison et fixent les radicaux H et OH de l'eau sur les valences libérées (P. Hoyos et *al.*, 2017). Ces enzymes ne nécessitent pas généralement de coenzymes, elles sont activables par des cations. Elles interviennent sur les fonctions éthers, acétals, esters phosphoriques, liaisons O-Odesperoxydes, C-N des amides. Elles forment le troisième groupe de la classification « Enzyme Commission (CE) » des enzymes. Leurs représentants comprennent des peptidases, des nucléases, des phosphatases, des glucosidases, des estérases.....(Bornscheuer, 2002).

1.2. Glycosides hydrolases

Les O-glycosides hydrolases (EC 3, 2, 1, X) sont des enzymes cataboliques dont l'action consiste à hydrolyser le lieu O-glycosidique entre les monoméries d'un disaccharide ou d'un polysaccharide ou entre un saccharide et un groupement aglycone. Ces enzymes sont nécessaires aux organismes, autotrophes comme hétérotrophes, pour utiliser les sources de carbone contenues sous forme de sucres qui sont produites à la base par les organismes autotrophes (Masri, 2003).

1.3. Cellulases

1.3.1. Définitions des cellulases

Les cellulases sont des O-glycosyl-hydrolases (GH) qui hydrolyser les liaisons glycosidiques β -1,4 dans la cellulose. Les cellulases ont traditionnellement été divisées en :

- les exoglucanase (1,4- β -D-glucane cellobiohydrolase, EC 3.2.1.91).
- les endoglucanase [1,4-(1,3;1,4)- β -D-glucane 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.4].
- β -(1,4)-glucosidase ou cellobiase (EC 3.2.1.21) (Hilden et Johansson, 2004).

1.3.2. Nomenclature des cellulases

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- β -(1,4)-glucanase, Cellulase carboxyméthylque, β -(1,4)-endoglucanhydrolase, Celludextrinase, Avicelase, etc (Reffas, 2017).

1.3.3. Mode d'action des cellulases

Le mécanisme d'action de cellulases agit directement sur la dégradation de la cellulose par la dénaturation des liens glycosidiques ce qui produit des glucoses.

Les endoglucanase, les exoglucanase et les β -glucosidases sont des trois classes de la cellulases :

- L'endoglucanase : effectue le clivage interne de la cellulose, ce qui produit des chaînes plus courtes.
- L'exoglucanase : quant à elle produit des cellobiases à partir de la chaîne non réductrice de la cellulose.
- les β -glucosidases : hydrolyse les cellobiases en glucose.

Ces trois classes agissent en synergismes (Lanteigne Roch, 2010).

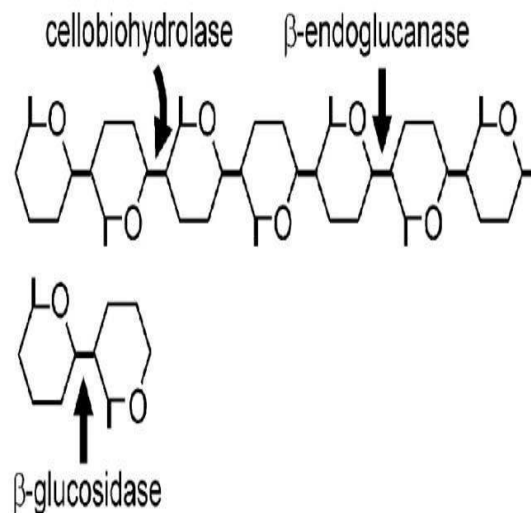


Figure 1. Mode d'action de la cellulase

1.3.4. Origines des cellulases

Les cellulases se trouvent dans un large éventail d'organismes comme les bactéries, les champignons, les plantes etc. En conséquence, les cellulases peuvent provenir d'une variété

d'origines, y compris des sources animales, végétales et microbiologiques (Benkerrou et Hamaili, 2012).

1.3.4.1. Origine animale

Certains insectes cellulolytiques fabriquent leurs propres cellulases et conservent en leur sein des bactéries cellulolytiques symbiotiques. Le mécanisme précis par lequel les cellulases générées par les différents organismes présents dans les intestins des insectes décomposent la cellulose est inconnu. Il y a aussi quelques autres animaux qui produisent cellulases, dont plusieurs types de mollusques en particulier escargots, limaces et vers de terre (D.B. Wilson, 2009).

Les animaux cellulolytiques contribuent de manière significative à la dégradation des parois cellulaires végétales en réduisant la biomasse en particules minuscules, ce qui permet aux enzymes dégradant les parois cellulaires de leur système digestif d'atteindre et d'hydrolyser les polymères de sucre beaucoup plus facilement. En fait, les mammifères prétraitent la biomasse qu'ils consomment pour la rendre plus appétissante pour leurs propres enzymes et celles des micro-organismes symbiotiques avec lesquels ils partagent leur corps (D B. Wilson, 2009).

1.3.4.2. Origine végétale

Diverses cellulases végétales qui obtenues à partir d'extraction des fruits et produire à partir de coquille d'arachide, okara, de la sciure de bois, une peau de banane, de la paille de riz, de la bagasse, un épi de maïs, une jacinthe d'eau et une paille de sorgho par voie conventionnelle processus (Abada *et al.*, 2021)

Cellulases peuvent jouer des fonctions très différentes dans la physiologie d'une plante. Par exemple, certaines cellulases végétales participent bien à la dégradation de la cellulose, malgré une augmentation des extrémités réductrices. Bien que le processus spécifique de fragmentation des particules soit inconnu, il pourrait inclure la structure des pores de la cellulose (Wilson, D B. 2009).

1.3.4.3. Origine microbienne

Les microorganismes sont à l'origine de la majeure partie de la dégradation de la cellulose qui se produit dans la nature. Ils relèvent ce défi à l'aide d'un système multi-enzymes. Ils comprennent des champignons et des bactéries, des aérobies et des anaérobies, des mésophiles et des thermophiles et occupent une variété d'habitats (Saranraj *et al.*, 2012).

➤ Champignons

Les principaux producteurs de cellulase sont les champignons (Saranraj *et al.*, 2012). Ils sont les microorganismes les plus étudiés pour la production de cellulase en raison de leur un rendement enzymatique plus élevé et leur capacité à sécréter un complexe cellulase complet extracellulaire principalement. Ce sont *Trichoderma reesei*, *Penicillium pinophilum*, *Penicillium funiculosum*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Sclerotium rolfsii* et *Humicola sp* (Singhania R *et al.*, 2017).

➤ Bactéries cellulolytiques

Les microbes cellulolytiques sont principalement des dégradeurs de glucides et sont généralement incapable d'utiliser les lipides ou les protéines comme source d'énergie pour la croissance. L'ordre *Actinomycètes* comprend deux genres qui produisent des cellulases, qui sont *Microbispora* et *Thermomonospora*. Les formes aérobies et anaérobies des bactéries sont impliquées dans la dégradation de la cellulose (R. Singhania *et al.*, 2017).

Les bactéries anaérobies se trouvent dans le sol, sur les matières végétales en décomposition. Les bactéries cellulolytiques anaérobies avec les systèmes de cellulase les mieux caractérisés comprennent : *Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium aldrichii*, *Clostridium cellobioparum* (R. Singhania *et al.*, 2017), *Cellulomonas sp.*, *Cellvibrio sp.*, *Accetivibrio cellulolyticus*, *Clostridium thermocellum*, *Bacteriodes succinogenes*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Ruminococcus flavefaciens* et *Ruminococcus albus* (Saranraj *et al.*, 2012).

Les bactéries aérobies se trouvent généralement dans le sol, dans l'eau, sur les matières végétales, dans l'humus, dans excréments d'animaux, dans les champs de canne à sucre et dans la litière de feuilles. Ce sont *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus* et ect (R. Singhania *et al.*, 2017).

1.3.5. Applications des cellulases

Les cellulases occupent la troisième place parmi les groupes d'enzymes utilisées dans l'industrie. Les cellulases microbiennes sont maintenant produites commercialement par de nombreuses industries dans le monde et sont largement utilisées dans diverses industries (Shweta A. 2012).

Les cellulases ont été initialement étudiées il y a plusieurs décennies pour la bioconversion de biomasse, ce qui a donné lieu à des recherches sur les applications industrielles de l'enzyme dans l'alimentation, l'alimentation animale, les textiles, les détergents et dans l'industrie du papier. Avec la pénurie de combustibles fossiles et la nécessité croissante de trouver une source alternative d'énergie et de combustibles renouvelables, il y a un regain d'intérêt pour la bioconversion de la biomasse lignocellulosique à l'aide de cellulases et d'autres enzymes. Dans les autres domaines, cependant, les technologies et les produits utilisant les cellulases ont atteint un stade où ces enzymes sont devenues indispensables (Saranraj *et al*, 2012).

1.3.5.1. Industrie alimentaire humaine et animale

Les cellulases sont utilisées dans l'industrie alimentaire pour :

- extraction et clarification des jus de fruits et de légumes ;
- extraction d'huile d'olive ;
- extraction des caroténoïdes lors de la production de colorants alimentaires ;
- amélioration de la fermentation de l'orge dans l'industrie de la bière;
- amélioration de la qualité nutritionnelle des fourrages, améliorant l'indice de conversion alimentaire et/ou augmentant la digestibilité d'un aliment à base de céréales ;
 - meilleure texture et qualité des produits de boulangerie
 - augmentation de la viscosité des purées de fruits ;
 - augmentation de la texture, de la saveur et des propriétés volatiles de fruits et légumes ;
- amertume contrôlée des agrumes ;
- libération des antioxydants des marcs de fruits et de légumes (Shweta A. 2012).

1.3.5.2. Industrie des textiles

- Remplacer l'utilisation de pierres ponce pour le biodé lavage et la libération de l'excès de teinture indigo des vêtements en jean pour leur donner de la douceur et un aspect délavé ;
- Digérer les extrémités des fibres qui dépassent du tissu pour une meilleure finition ;
- Adoucissement, défibrillation et procédés de fournissant une variation localisée de la densité de couleur de fibres (Shweta A. 2012).

1.3.5.3. Industrie du papier et de la pâte à papier

- La réduction en pâte mécanique, y compris le broyage et le raffinage des matières ligneuses ;
- Les cellulases sont très efficaces pour hydrolyser les petites particules générées lors du raffinage, améliorant ainsi la capacité de drainage de la pulpe ;
- Les cellulases sont utilisées pour éliminer l'encre des revêtements et les toners du papier ;
- La bio-caractérisation des fibres de pâte est une autre application où les cellulases microbiennes sont utilisées.
- L'enzyme est employée dans la fabrication de papier doux, y compris les serviettes en papier et le papier hygiénique ;
- Les cellulases sont utilisées pour créer de produits facilement biodégradables, papier, carton (Saranraj *et al*, 2012).

1.3.5.4. Biocarburant

L'expression biocarburant indique que ce carburant est obtenu à partir de matière organique (biomasse), par opposition aux carburants issus de ressources fossiles. La production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique nécessite la transformation préalable de cette biomasse en sucres fermentescibles. Cette transformation est réalisée par voie biologique grâce aux cellulases (N. Hardy *et al.*, 2015).

Aujourd'hui il existe deux grandes filières de production de biocarburants :

1. La filière éthanol qui comprend l'éthanol et l'ETBE pour les véhicules essence.
2. La filière des huiles végétales avec l'EMHV pour les véhicules diesel.

Chapitre 2.

Bacillus

Chapitre 2 : *Bacillus*

2.1. Définition

Le genre *Bacillus* renferme des germes telluriques aérobies stricts ou aéro-anaérobies, sporogènes, se présentant sous forme de bâtonnets à Gram positif généralement mobile, qui utilisent une large gamme de sources de carbone pour une croissance hétérotrophe ou, rarement, autotrophe (Abriouel *et al.*, 2014).

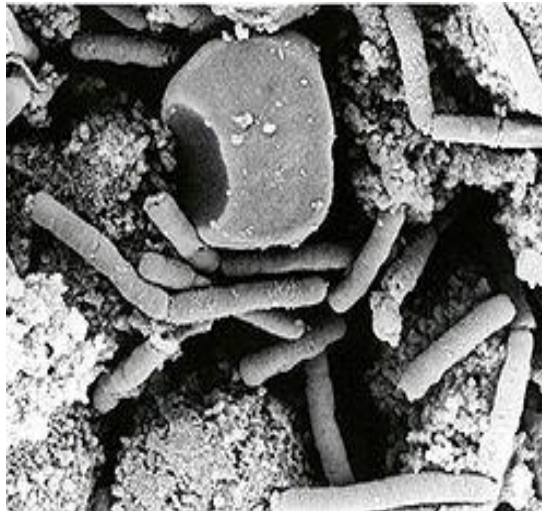


Figure 2. Structure de bactérie *bacillus*

2.2. Habitat

Le genre *Bacillus* omniprésents dans l'environnement, ils peuvent être trouvés dans le sol (habitants communs), l'eau, les sédiments, la poussière ou l'air mais aussi dans les animaux, la litière, les denrées alimentaires et les aliments pour animaux (y compris les produits laitiers, les viandes, les aliments pour bébés) (Abriouel *et al.*, 2014)

2.3. Classifications

Classification de *Bacillus* :

- **Règne :** *Bacteria*
- **Embranchement :** *Firmicutes*
- **Classe :** *Bacilli*
- **Ordre :** *Bacillales*
- **Famille :** *Bacillaceae*
- **Genre :** *Bacillus* (Soule M. H, 1932) .

- **Espèce de *Bacillus***
 - *Bacillus anthracis*
 - *Bacillus cereus*
 - *Bacillus coagulans*
 - *Bacillus megatérium*
 - *Bacillus licheniformis*
 - *Bacillus subtilis*
 - *Bacillus thuringiensis ect* (Auger *et al.*, 2008).

2.4. Production des enzymes

Les bactéries ont été considérée comme des producteurs de cellulases robustes et versatiles en raison de leur taux de croissance élevé, de leur stabilité à des conditions extrêmes et de la présence de complexes multienzymatiques. Parmi les bactéries les espèces de *Bacillus* peuvent produire plusieurs enzymes extracellulaires hydrolysent des polysaccharides. Cependant, l'étude des cellulases de *Bacillus* n'est pas très approfondie par rapport à celle des enzymes fongique (khelil, 2017).

2.5. Production des cellulases

La cellulase produite à partir de l'espèce *Bacillus* a été largement étudiée pour son utilisation dans les détergents à lessive (Jayasekara *et al.*, 2019). Les bactéries peuvent être préférées aux champignons pour la production de cellulases à l'échelle industrielle en raison de leur taux de croissance élevé (Sethi *et al.*, 2013). De plus, les manipulations génétiques des bactéries sont plus faciles par rapport aux champignons (Saini *et al.*, 2017).

Partie Expérimentale

Chapitre 3.

Matériel et méthodes

Chapitre 3. Matériel et méthodes

3.1. Échantillonnage

Diverses sources ont été utilisées pour isoler les bactéries productrices de cellulases. Le tableau 1 résume les sites d'échantillonnage.

Tableau 1. Présentation des sites de prélèvement.

Echantillon	Source	Lieu	Référence
E1	Neuf échantillons de sol différents	différentes régions du district de Raigad, Maharashtra, India	(Bhagat et Kokitkar, 2021)
E2	Divers échantillons de sol ont été recueillis	Jazan, Sabia et Abu Arish, Jazan, KSA	(Abada <i>et al.</i> , 2021)
E3	La mélasse a été collectée dans une zone de l'industrie sucrière	région de Katakali de la ville de Rajshahi dans Bangladesh.	(Islam et Roy, 2018)
E4	La bagasse de canne à sucre	Rajshahi Sugar Mills Ltd. Bangladesh	(Pramanik <i>et al.</i> , 2021)
E5	Des microorganismes ont été isolés à partir d'échantillon de bouse de vaches	de Katakali de la ville de région Rajshahi dans Bangladesh.	(Malik <i>et al.</i> , 2021)
E6	Vingt individus de la fin du 5 ^{ème} stade larvaire de <i>H.armigera</i>	région de Saswad (18,55°N 74,00°E à Pune, Maharashtra), en Inde.	(M.A. Dar <i>et al.</i> , 2021)

3.2. Isolement et criblage des bactéries productrices de cellulase

Afin d'isoler des bactéries capables de produire les cellulases à partir des différents échantillons, le protocole a été suivi :

- Un gramme de l'échantillon prélevé a été mis en suspension dans 9 ml d'eau physiologique stérile et homogénéisé pendant 10 min à l'aide d'un vortex ;

• Cette suspension représente la solution mère à partir de laquelle d'autres dilutions sont préparées jusqu'à 10^{-6} (séries de dilutions décimales de 10^{-1} à 10^{-6}) ;

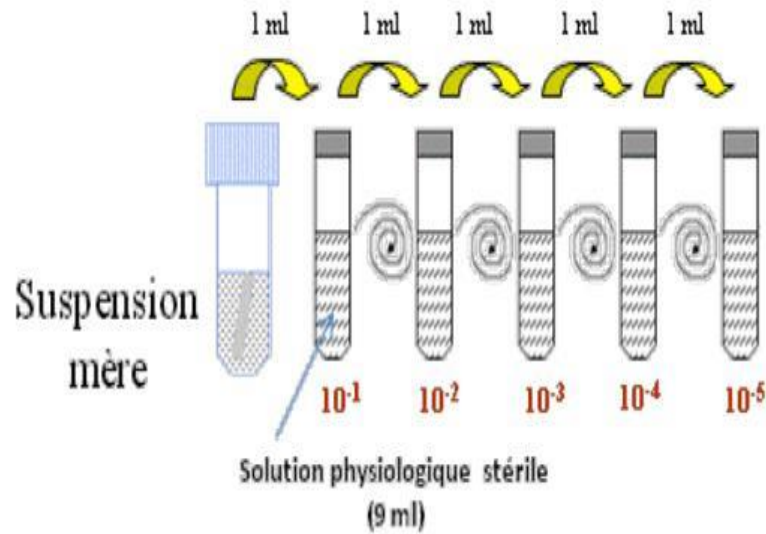


Figure 3.préparation des dilutions

• Les dilutions ont été étalées sur un milieu de criblage contenant 0,5% de carboxyméthylcellulose (CMC) (annexe) ;

• Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 48 heures ;

• L'activité enzymatique peut être confirmée par diverses méthodes telles que la méthode de rouge congo, le réactif d'iode de Gram et la dégradation du papier filtre (Maravi et Kumar, 2020; Kasana *et al.*, 2008).

- Après une croissance suffisante des souches, les boîtes ont été inondées avec une solution au rouge Congo (0.1 %) pendant 30 min puis ont été lavées avec une solution de NaCl (1M) pendant 1 heure (kasana *et al.*, 2008).

- Les boîtes incubées ont été recouvertes d'une solution d'iode (1 %) pendant 15 min, puis lavées avec une solution de NaOH (1N) pour la décoloration (Dar *et al.*, 2020 ; Abada *et al.*, 2021 ; Bhagat et Kokitkar, 2021; Pramanik *et al.*, 2021) Ou

- Les isolats bactériens ont été inoculés dans un milieu salin basal contenant du papier filtre pour tester leur d'activité cellulosique (Islam et Roy, 2018).

L'apparition d'une zone claire transparente autour des colonies indique la présence de cellulases extracellulaires. L'activité a été déterminée en fonction du diamètre en centimètres de la zone claire autour des colonies comme faible (1,0-2,0 cm), moyenne (2,1-3,0 cm) et élevée (au-dessus de trois cm) (Dar *et al.*, 2020). Par conséquent, les colonies entourées d'une zone claire ont été sélectionnées comme souche productrice de cellulase.

• Les souches sélectionnées ont été repiquées sur la même gélose CMC jusqu'à l'obtention d'une souche pure dans chaque boîte de Pétri. Ces boîtes ont été conservées à 4 °C (Bhagat et Kokitkar, 2021 ; Abada *et al.* 2021; Pramanik *et al.*, 2021 ; Malik *et al.*, 2021 ;Islam et Roy, 2018 ; Dar *et al.*, 2020).

3.3. Identification des souches isolées

3.3.1. Identification morphologique

Les bactéries isolées en cultivant une suspension bactérienne pendant la nuit et en effectuant une coloration de gram pour identifier leur morphologie. Cette technique a été utilisée pour distinguer les bactéries gram positives et négatives (Abada *et al.*, 2021 ; Bhagat et Kokitkar, 2021).

3.3.2. Identification biochimique

Les isolats bactériens ont été identifiés en effectuant plusieurs tests biochimiques tels que le test de fermentation, le test de catalase, le test d'utilisation du citrate, le test de rouge de méthyle, la production de H₂S et le test de Voges – Proskauer par des méthodes standard (Islam et Roy, 2018).

3.3.3. Identification moléculaire

L'identification moléculaire des isolats bactériens producteurs de cellulase a été réalisée par séquençage du gène de l'ARN 16S. Cette méthode a été réalisée comme suit :

3.3.3.1. Extraction d'ADN génomique

Les bactéries isolées ont été soumises à une extraction d'ADN à l'aide de kit de purification de l'ADN génomique bactérien.

3.3.3.2. Amplification du fragment d'ADN 16S

L'amplification est faite par PCR grâce à un couple d'amorces spécifiques :

Amorce sens 16F27 5'AGAAGTTTGATCMTGGCTCAG3'

Amorce anti-sens 16R1492 5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT3' (Bhagat et Kokitkar, 2021)

La PCR est réalisée dans un volume final de 50 µl ; le mélange réactionnel de la PCR est résumé dans le tableau suivant.

Tableau 2. Composition du mélange réactionnel de PCR (Heni, 2010).

Constituants du mélange réactionnel	Volume par réaction en μL
H₂O	38.5
Tampon de PCR	5
dNTP (10 mM)	1
Amorce sens (20 μM)	2
Amorce anti-sens (20 μM)	2
Taq polymérase 5 U/μL	0.5
ADN (20 ng/μL)	1

Le programme d'amplification est le suivant.

Tableau 3. Programme d'amplification de la PCR.

Nombre de cycles	étape	Température(C°)	temps
1	Dénaturation initiale	95	5min
	Dénaturation	95	30s
34	Hybridation	55	30s
	Elongation	72	1min30s
1	Elongation finale	72	7min

3.3.3.3. Analyse électrophorétique des fragments amplifiés

L'électrophorèse de résolution des amplicons est effectuée sur gel horizontal d'agarose à 1%. Le gel est préparé dans le tampon TBE 0,5X (Tris base 0.89 M, Acide borique 0.89 M, EDTA [pH 8,0] 0,02 M), il est coloré avec une solution de bromure d'éthidium (BET) de l'ordre de 10 $\mu\text{g/mL}$ et la migration est effectuée sous un voltage de 80 V (Heni, 2010).

3.3.3.4. Séquençage de l'ADN 16S

Après purification des produits de PCR, les fragments du gène ARNr 16S a été séquencés. Les données de séquençage ont été analysées par Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) avec les séquences les plus proches extraites de la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Altschul *et al.*, 1990).

3.4. Production de la cellulase

La production de cellulase a été effectuée par plusieurs isolats producteurs de cellulase.

- ✓ Les isolats ont été inoculés dans un milieu liquide contenant : 1% CMC, 0,1% NaNO_3 , 0,1% K_2HPO_4 , 0,1 % KCl , 0,05 % MgSO_4 et 0,05 % extrait de levure (pH 7,0) et incubé à 37°C pendant 24 heures ;
- ✓ Les cultures en croissance ont ensuite été transférées dans le milieu de production de la même composition et incubé pendant 72 heures d'un agitateur-incubateur avec agitation constante à 130 rpm à 37°C;
- ✓ Le milieu de production a été centrifugé à 10 000 rpm pendant 10 minutes pour obtenir le surnageant qui a été utilisé comme extrait enzymatique brut pour le dosage de la cellulase (Bhagat et Kokitkar, 2021).

3.5. Dosage de la cellulase

- ✓ Pour la détermination de l'activité cellulosique, le milieu réactionnel est composé de 100 μl d'une solution de CMC à 1 % (P/V) préparé dans le tampon acétate (20 mM pH 4,5) et de 100 μl d'extrait brut enzymatique ;
- ✓ Après 20 min de réaction à 37 °C, les sucres réducteurs libérés ont été dosés selon la méthode de Miller (1959) en ajoutant 100 μl de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNSA) au mélange réactionnel pour arrêter la réaction ;
- ✓ Le milieu a ensuite été porté au bain-marie bouillant pendant 5 min, puis refroidi dans un bain de glace ;
- ✓ L'intensité de la coloration a été déterminée à 540 nm contre le témoin contenant tous les réactifs, excepté l'enzyme ;
- ✓ La solution étalon pour le dosage des sucres réducteurs est une solution de glucose à 1mg/ml ;
- ✓ L'Unité Internationale est définie comme étant la quantité d'enzyme libérée une micromole de sucres réducteurs par minute dans les conditions standards (Sea et *al.*, 2006).

3.6. Optimisation pour une production maximale de cellulase

L'optimisation des conditions de culture a été réalisée pour production maximale d'enzyme. Les paramètres analysés pour l'optimisation sont : le pH, la température, la source de carbone, effet des concentrations d'inoculum, effet du temps d'incubation et effet des sources d'azote.

3.6.1. pH

L'effet du pH sur la production d'enzymes a été étudié en cultivant les isolats dans un milieu de production ajusté à différents pH de 2, 4, 6, 7, 8 et 10. Le pH des milieux a été ajusté en utilisant NaOH 1N et HCl 1N (Bhagat et Kokitkar, 2021).

3.6.2. Température

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

3.6.3. Source de carbone

L'effet de la source de carbone sur la production d'enzymes a été examinée en préparant le milieu de production en remplaçant la source de carbone CMC par du glucose, du saccharose, de l'amidon et du maltose (Bhagat et Kokitkar, 2021).

3.6.4. Effet des sources d'azote

L'effet de la source de d'azote sur la production d'enzymes a été étudié en préparant le milieu de production en remplaçant la source d'azote extrait de levure par différents composés azotés inorganiques et organiques, comme $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, NaNO_3 et la peptone à 1 %.(p/v) (Abada *et al.*, 2021).

3.6.5. Effet des concentrations d'inoculum

L'effets des concentrations d'inoculum sur la production d'enzymes a été analysée en ajoutant des concentrations de 1 %, 2 %, 3 %, 4 % et 5 v/v) au milieu de production (Abada *et al.*,2021) .

3.6.6. Effet du temps d'incubation

L'effet de la période d'incubation sur la production d'enzymes a été déterminé en incubant le milieu de fermentation pendant différentes périodes d'incubation en heures, c'est-à-dire 24, 48, 72, 96, 120 heures (Abada *et al.*, 2021).

Chapitre 4.

Résultats et discussion

Chapitre 4. Résultats et discussion

4.1. Isolement et criblage de bactéries productrices de cellulase

Les résultats concernant l'isolement des souches productrices des cellulases sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4. Nombre des souches productrices des cellulases.

Echantillon	1	2	3	4	5	6
Nombre des Souches	7	5	3	2	7	25

Le potentiel cellulolytique des isolats a été confirmé en inondant les boîtes avec 0,1% de rouge Congo. L'iode de Gram a également été utilisé et aussi la dégradation du papier filtre pour le criblage des colonies bactériennes cellulolytiques. La zone claire autour de la colonie est un indicateur du potentiel cellulolytique des isolats (Dabhiet *et al.*, 2014).

Echantillon 1

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

Echantillon 2

20 isolats ont été collectés à partir de divers sols dans les régions de Jazan. Sur tous les isolats, seulement 5 isolats ont montré une activité cellulosique (Figure 4) (Abada *et al.*, 2021).

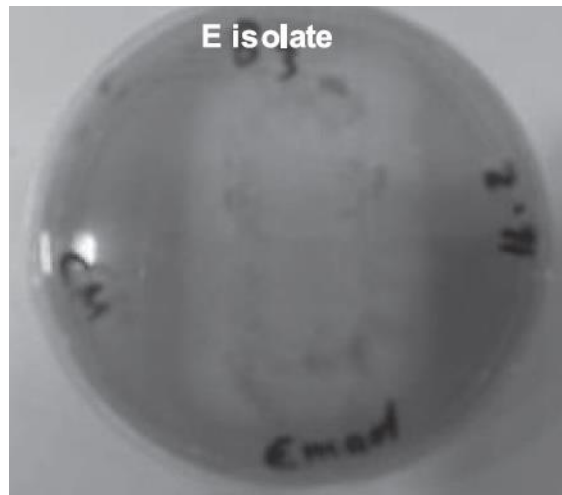


Figure 4. L'activité cellulosique de *Bacillus albus* cultivée sur milieu CMC contient un colorant rouge Congo. La zone claire est un indicateur de la dégradation de la cellulose.

Echantillon 3

3 isolats ont été collectés.

Dans le test de dégradation du papier filtre, il a été constaté que toutes les souches dégradent complètement le papier filtre avec un temps d'incubation de 7 jours, ce qui indique que les souches isolées sont des bactéries cellulolytiques. (Islam et Roy, 2018).

Echantillon 4

Trente isolats bactériens ont été produits sur des boîtes de gélose CMC. Parmi ces isolats, seuls deux isolats ont été sélectionnés par la coloration de l'iode de Gram (Pramanik *et al.*, 2021).

Echantillon 5

Un nombre total de 250 colonies ont été observées après l'étalement des échantillons de bouse de vache dilués en série. Cependant, seuls 37 isolats ont été trouvés cellulolytiques en fonction de la zone claire autour des colonies. Lors du criblage secondaire, sur les 37 isolats bactériens, sept isolats présentaient une forte activité cellulosique (Malik *et al.*, 2021).

Echantillon 6

25 isolats ont montré une zone claire significative autour des colonies indiquant un répertoire cellulolytique potentiel. 4 isolats ont montré des zones claires plus grandes et ont ensuite été sélectionnés (M.A. Daret *et al.*, 2021).

Une variété de microorganismes cellulolytiques ont été isolés de différents environnements, tels que le sol (K.I. Dantur *et al.*, 2015).

4.2. Identification des bactéries

Echantillon 1

Les sept isolats sont Gram-positifs et en forme de bâtonnet (Bhagat *et al.*, 2021).

Les sept isolats bactériens ont été identifiés par séquençage basé sur le gène de l'ARN 16S qui a été effectué au NCIM, CSIR-NCL, Pune. L'analyse BLAST de NCBI a suggéré que tous les isolats ont été identifiés comme *Bacillus* mais appartiennent à des espèces différentes : *Bacillus subtilis*, *Bacillus flexus*, *Bacillus licheniformis* et *Bacillus paralicheniformis*. Le tableau ci-dessous montre les détails de l'identification de tous les isolats.

Tableau 5. Identification moléculaire des isolats (Bhagat *et al.*, 2021) .

Isolat	Organisme trouvé avec identité	Pourcentage identité
1	<i>B. subtilis</i>	100%
2	<i>B. flexus</i>	100%
3	<i>B. subtilis</i>	100%
4	<i>B. licheniformis</i>	99,86%
5	<i>B. licheniformis</i>	100%
6	<i>B. paralicheniformis</i>	99%
7	<i>B. licheniformis</i>	100%

Echantillon 2

lors de la réalisation d'une expérience de coloration de Gram, les résultats ont indiqué que les cinq isolats étaient des bacilles Gram positifs lorsqu'ils étaient observés au microscope (Abada *et al.*, 2020).

D'après l'étude moléculaires par analyse du gène de l'ARNr16S, l'ADN génomique a été séparé; purifié et identifié; Alors que la séquence obtenue a été étudiée pour identifier des séquences similaires dans la base de données <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>. L'alignement de la séquence du gène de l'isolat a indiqué que la séquence d'ADN était homologue à 99,6 % avec les séquences du gène de l'ARNr 16S de *Bacillus albus*. L'isolat a été identifié comme étant *Bacillus albus* comme indiqué dans l'arbre phylogénétique (figure 5) (Abada *et al.*, 2020).

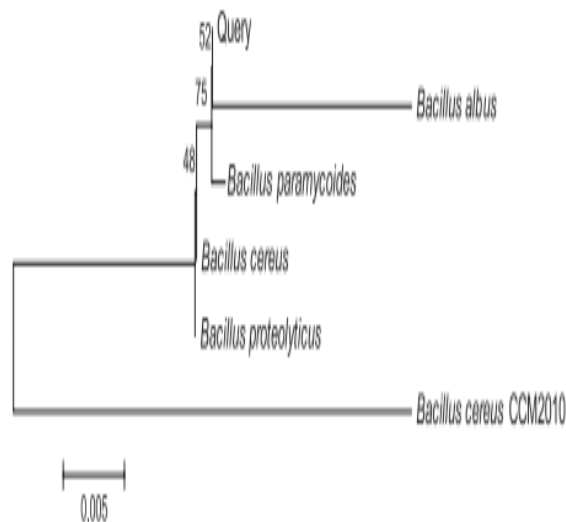


Figure 5. Arbre phylogénétique construit par la méthode de Neighbor-joining basé sur l'ensemble de données du gène ARNr 16S (Abada *et al.*, 2020).

Echantillon 3

Trois isolats ont été collectés : deux isolats (C1 et C2) sont Gram-positifs et en forme de bâtonnet, un isolat (C3) est Gram-négatif et en forme de bâtonnet court

Sur la base des caractéristiques biochimiques et morphologiques, les souches isolées ont été identifiées comme étant *Paenibacillus sp.*(C1), *Bacillus sp.* (C2) et *Aeromonas sp.*(C3) (Islam et Roy, 2018).

Echantillon 4

La souche productrice de cellulase efficace (Isolat A) est en forme de bâtonnet, Gram positif, aérobic, mobile, avec TSI positif, rouge de méthyle, catalase, hydrolyse de l'urée, test BSA et EMB. L'isolat B est gram positif, non mobile, avec un test positif au rouge de méthyle, à la catalase, à l'hydrolyse de l'urée et à l'hydrolyse de l'amidon. Les deux isolats se sont développés sur une large gamme de pH (4,0–8,0) et de température (25–50 °C).

À base des caractéristiques morphologiques, biochimiques et moléculaires, les souches efficaces ont été identifiées comme *Bacillus pseudomycoides* et *Bacillus massilianrexius* (Pramanik *et al.*, 2021).

Echantillon 5

L'isolat CD001 est un puissant producteur de cellulase, forme des colonies blanches rondes et lisses lors de la caractérisation phénotypique et a été reconnu comme un bacille sporulé Gram positif. La souche a donné des résultats positifs pour l'hydrolyse de la caséine, de l'amidon et de la gélatine, la réduction des nitrates, la catalase et l'hydrolyse de l'esculine

lors de l'analyse biochimique. Les acides produits à partir de glucides ont présenté des réactions positives pour le fructose, le cellobiose, la salicine et le mannitol. La bactérie s'est également avérée tolérante à la concentration élevée en sel allant jusqu'à 8% de NaCl, au pH élevé et à la tolérance modérée à la température.

La souche bactérienne CD001 a montré la plus grande similarité de séquence (99,93 %) avec *B. subtilis subsp. inaquosorum* suivi de *B. subtilis subsp. subtilis* (99,86 %) et *B. subtilis subsp. stercoris* (99,84 %). Une telle étendue de similitude de séquence et d'analyse phylogénétique basée sur la méthode de neighborjoining indique que l'isolat CD001 est une espèce du genre *Bacillus*. Par conséquent, l'isolat CD001 a été confirmé comme étant *B. subtilis* (Maliket *et al.*, 2021).

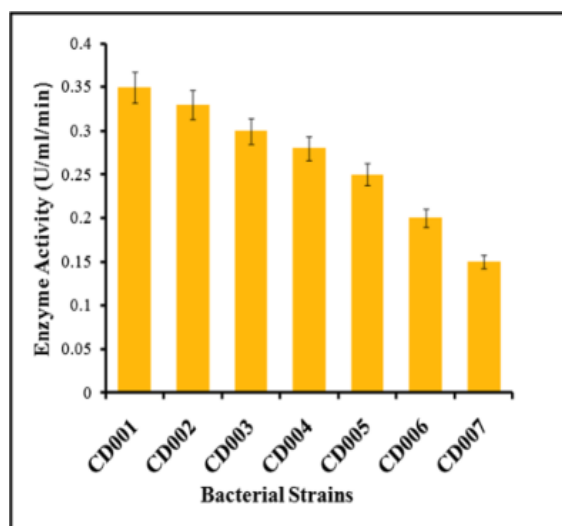


Figure 6. Criblage des souches bactériennes productrices de cellulase les plus puissantes sur la base de l'activité CMCase (Malik *et al.*, 2021).

Echantillon 6

D'après l'identification moléculaire, les 4 isolats appartiennent aux genres *Bacillus* et *Klebsiella*, à savoir, *B. subtilis* IF23, *K. pneumoniae* IM12, *K. pneumoniae* IM16 et *B. subtilis* IH17 (M.A. Daret *et al.*, 2021).

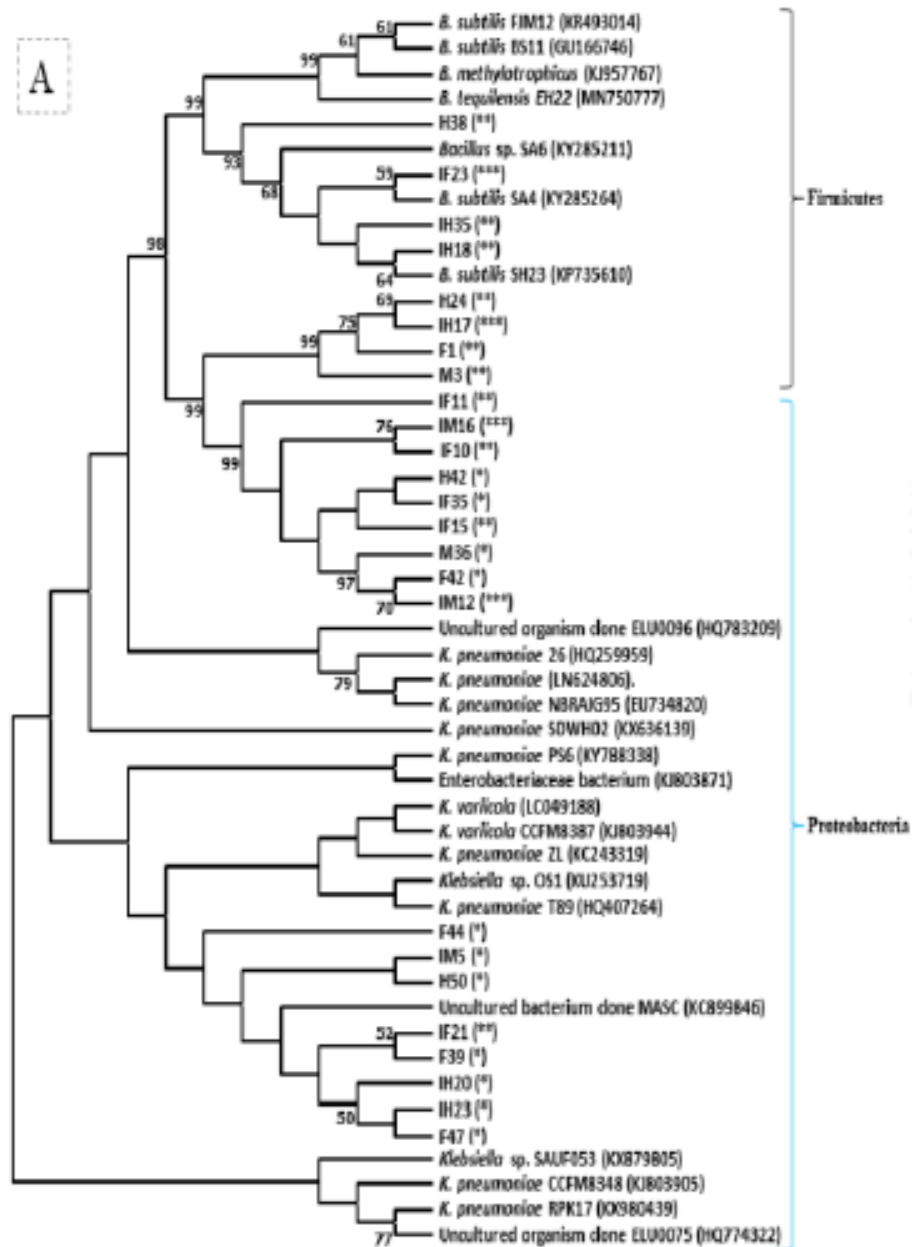


Figure 7. Arbre phylogénétique des bactéries cellulolytiques isolées des systèmes intestinaux de *H. armigera*. Les valeurs bootstrap sont indiquées aux nœuds (M.A. Dar *et al.*, 2021).

Tableau 6. Genres probables et pourcentage de similarité de l'activité potentielle montrant des isolats avec les espèces relatives NCBI déterminées par la recherche BLASTn.

Activité (Cm) : Faible (0,5-1,9) ; Moyen (2,0-3,5); Élevé (3,6) (M.A. Dar *et al.*, 2021).

Isolate code	Accession no.	Likely genus	% Similarity	Activity
F1	MT052342	<i>Bacillus subtilis</i> FJM12	97	Medium
IF10	MT052333	<i>Klebsiella pneumonia</i> NBRAJG95	99	Medium
IF11	MT052340	<i>Klebsiella pneumoniae</i> RPK17	98	Medium
IF15	MT052337	Uncultured organism clone ELU0096	98	Medium
IF21	MT052335	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ZL	96	Medium
IF23	MT052343	<i>Bacillus subtilis</i> SA4	98	High
IF35	MT052341	Uncultured organism clone ELU0075	98	Low
F39	MT052339	<i>Klebsiella pneumoniae</i> T89	96	Low
F42	MT052338	<i>Klebsiella pneumoniae</i> SDWH02	100	Low
F44	MT052336	<i>Klebsiella</i> sp. OS1	98	Low
F47	MT052334	<i>Klebsiella variicola</i> CCFM8387	97	Low
M3	MT052344	<i>Bacillus tequilensis</i> EH22	100	Medium
IM12	MT052346	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99	High
IM5	MT052345	Uncultured bacterium clone MASC	99	Low
IM16	MT052347	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 26	97	High
M36	MT052348	<i>Klebsiella pneumoniae</i> PS6	99	Low
IH17	MT052352	<i>Bacillus subtilis</i> FJM12	98	High
IH18	MT052355	<i>Bacillus subtilis</i> SH23	97	Medium
IH20	MT052356	<i>Klebsiella</i> sp. SAUF053	97	Low
IH23	MT052357	<i>Klebsiella variicola</i>	97	Low
H24	MT052353	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	97	Medium
IH35	MT052351	<i>Bacillus</i> sp. SA6	96	Medium
H38	MT052354	<i>Bacillus subtilis</i> BS11	95	Medium
H42	MT052350	Enterobacteriaceae bacterium CCFM8314	98	Low
H50	MT052349	<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCFM8348	96	Low

Bacillus sp. a été isolé de la mélasse (F.Rasul *et al.*, 2015). *Bacillus subtilis* isolé de l'industrie du coton a montré une activité enzymatique élevée (R. Gautam *et al.*, 2012)

Les données suggèrent que l'espèce *Bacillus* a un grand potentiel pour produire des enzymes cellulolytiques (Bhagat *et al.*, 2021). Maravi et Kumar (2020) ont isolé et identifié deux souches cellulolytiques, dont l'une est *B. licheniformis*. Saha *et al.* (2019) ont isolé huit bactéries cellulolytiques à partir d'échantillons de sol. Trois de ces huit espèces bactériennes ont été identifiées comme étant *Bacillus* sp., *Bacillus cereus* et *Bacillus megaterium*. Outre les espèces de *Bacillus*, d'autres genres bactériens ont également la capacité de produire des enzymes cellulolytiques.

4.3. Optimisation de la production de cellulase

L'amélioration des milieux est un paramètre puissant dans le développement de la technologie de fermentation, tandis qu'un milieu rentable permet des réductions ultérieures des coûts des enzymes.

Les isolats mentionnés ci-dessus ont été optimisés pour leur potentiel cellulolytique dans différentes conditions. L'effet du pH, de la température, des différentes sources de carbone, des différentes sources d'azote, l'effet du temps d'incubation et l'effet des concentrations d'inoculum sur l'activité cellulolytique des isolats sélectionnés ont été étudiés (tableaux 07).

Tableau 7. Résultats des différents échantillons ont été optimisés pour leur potentiel cellulolytique dans différentes conditions.

	E1	E2	E3	E4	E5	E6
Température	Max AC : 27°C Min AC : 50°C	Max AC : 35°C Min AC : 45°C	40°C	40°C	45°C	/
pH	6-8	6	7	7	7	5
Source de carbone	CMC : meilleure source de carbone L'amidon : AE négligeable	CMC meilleure source de carbone	CMC: meilleure source de carbone Peptone : effet profond sur la production de cellulase	Bagasse de canne à sucre la meilleure source de carbone	/	/
Source d'azote	/	L'extrait de levure	/	L'extrait de levure	/	/
Temps d'incubation	/	96h	24h	72h	72h	/
Concentrations	/	3%	1%	/	/	2%

d'inoculum						
références	(Bhagat et al., 2021) .	(Abada et al., 2020).	(Islam et Roy, 2018)	(Pramanik et al., 2021)	(Malik et al., 2021) .	(M.A. Dar et al., 2021)

Échantillon 1

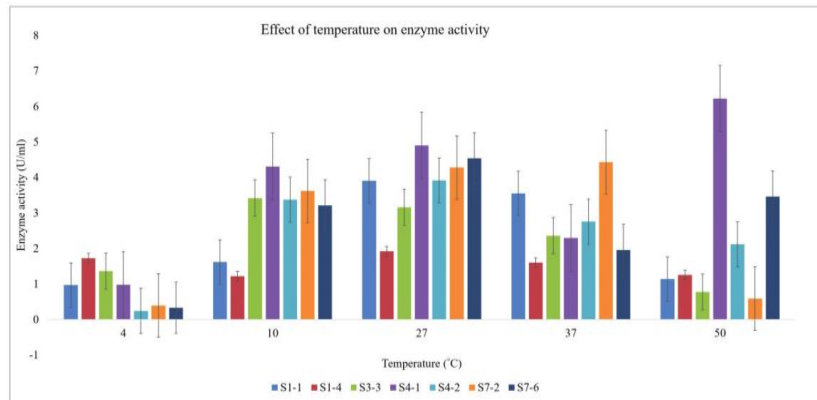


Figure 8. Effet de la température sur l'activité cellulase de différents isolats (Bhagat et al., 2021) .

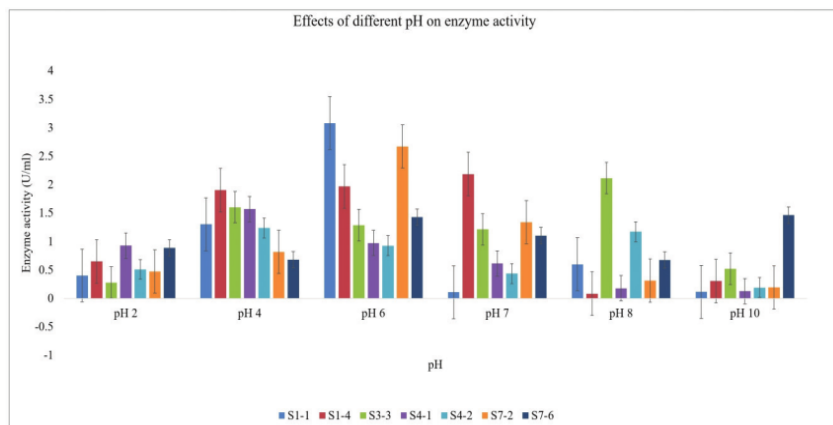


Figure 9. Effet du pH sur l'activité cellulosique des différents isolats (Bhagat et al., 2021).

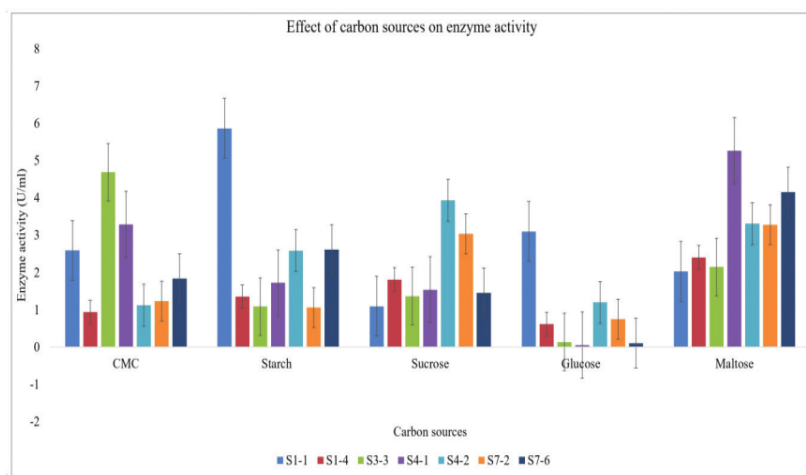


Figure 10. Effet des sources de carbone sur l'activité cellulase de différents isolats (Bhagat *et al.*, 2021) .

Échantillon 2

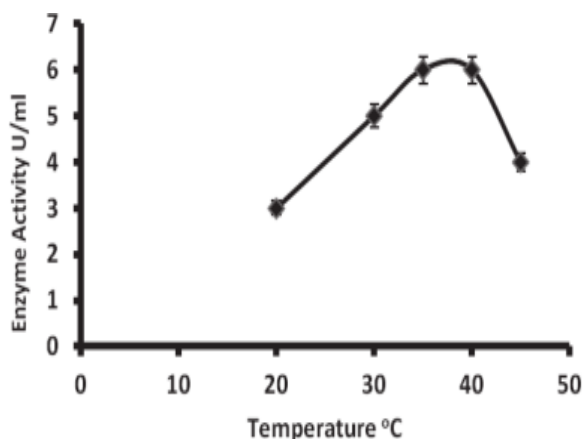


Figure 11. Effet de la température sur la production de cellulase par *Bacillus albus* (Abada *et al.*, 2020).

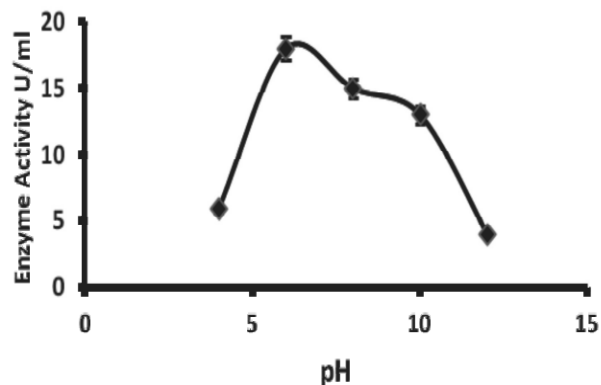


Figure 12. Effets du pH initial du milieu sur la production de cellulase par *Bacillus albus* (Abada *et al.*, 2020).

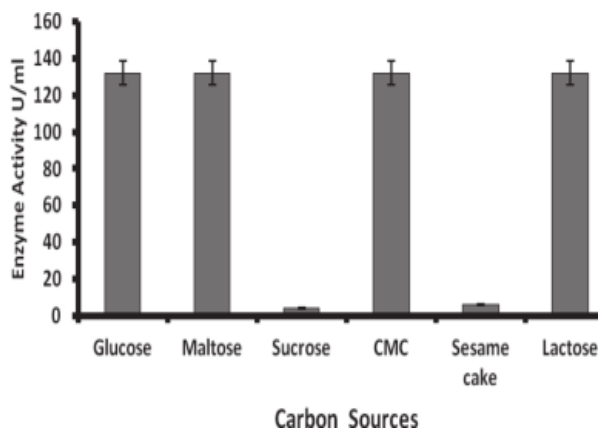


Figure 13. Effet de différentes sources de carbone (1%, p/v) sur la production de cellulase par *Bacillus albus* (Abada *et al.*, 2020).

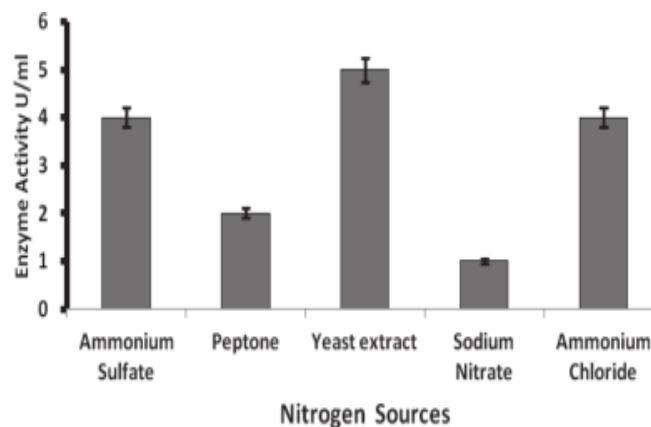


Figure 14. Effet de différentes sources d'azote (1%, p/v) sur la production de cellulase par *Bacillus albus* (Abada *et al.*, 2020).

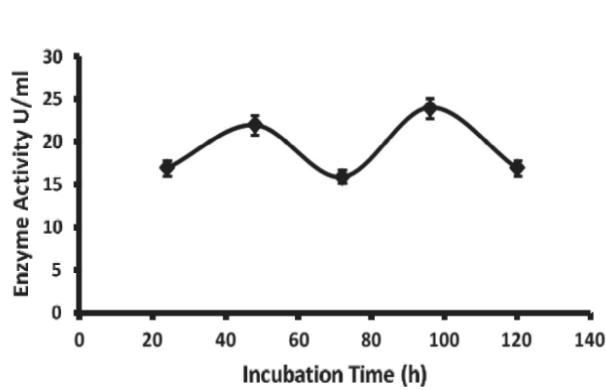


Figure 14. Effet du temps d'incubation sur la production de cellulase par *Bacillus albus* (Abada *et al.*, 2020).

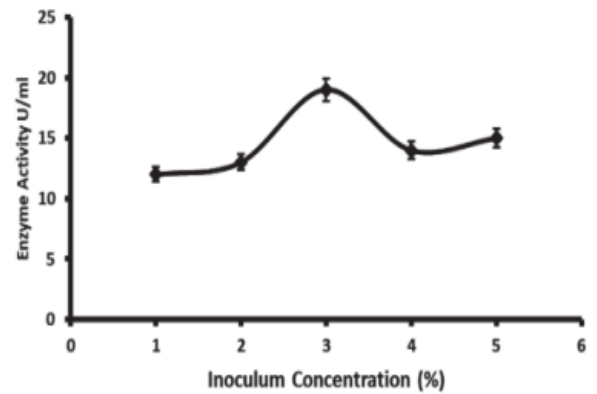


Figure 15. Effet de la concentration des inoculum sur la production de cellulase par *Bacillus albus* (Abada *et al.*, 2020).

Échantillon3

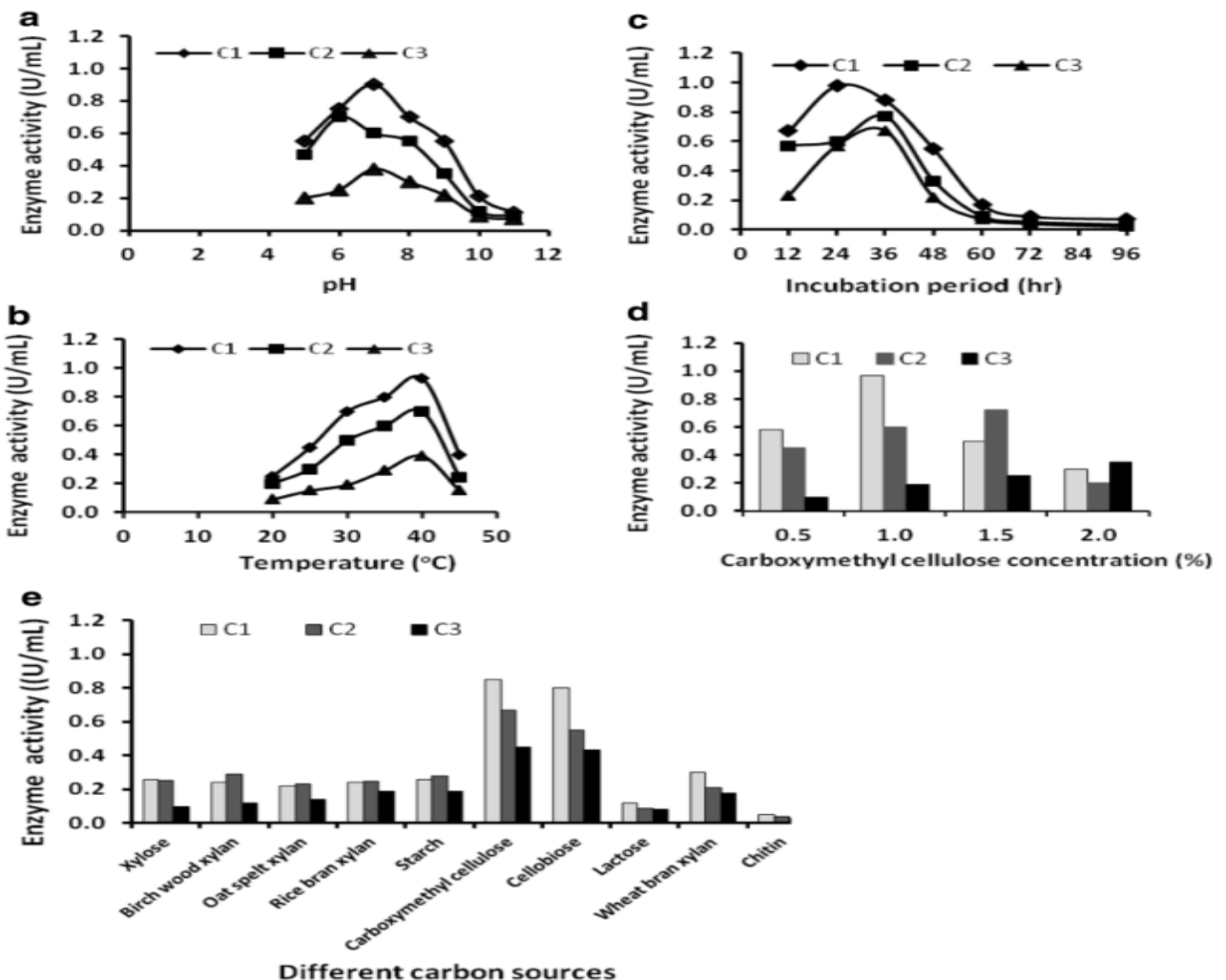


Figure 16. Optimisation des paramètres de culture et de l'activité enzymatique : a effet du pH, b effet de la température, c effet de la période d'incubation, d effet de la concentration du substrat et e effet des sources de carbone sur la production de cellulase (Islam et Roy, 2018).

Échantillon4

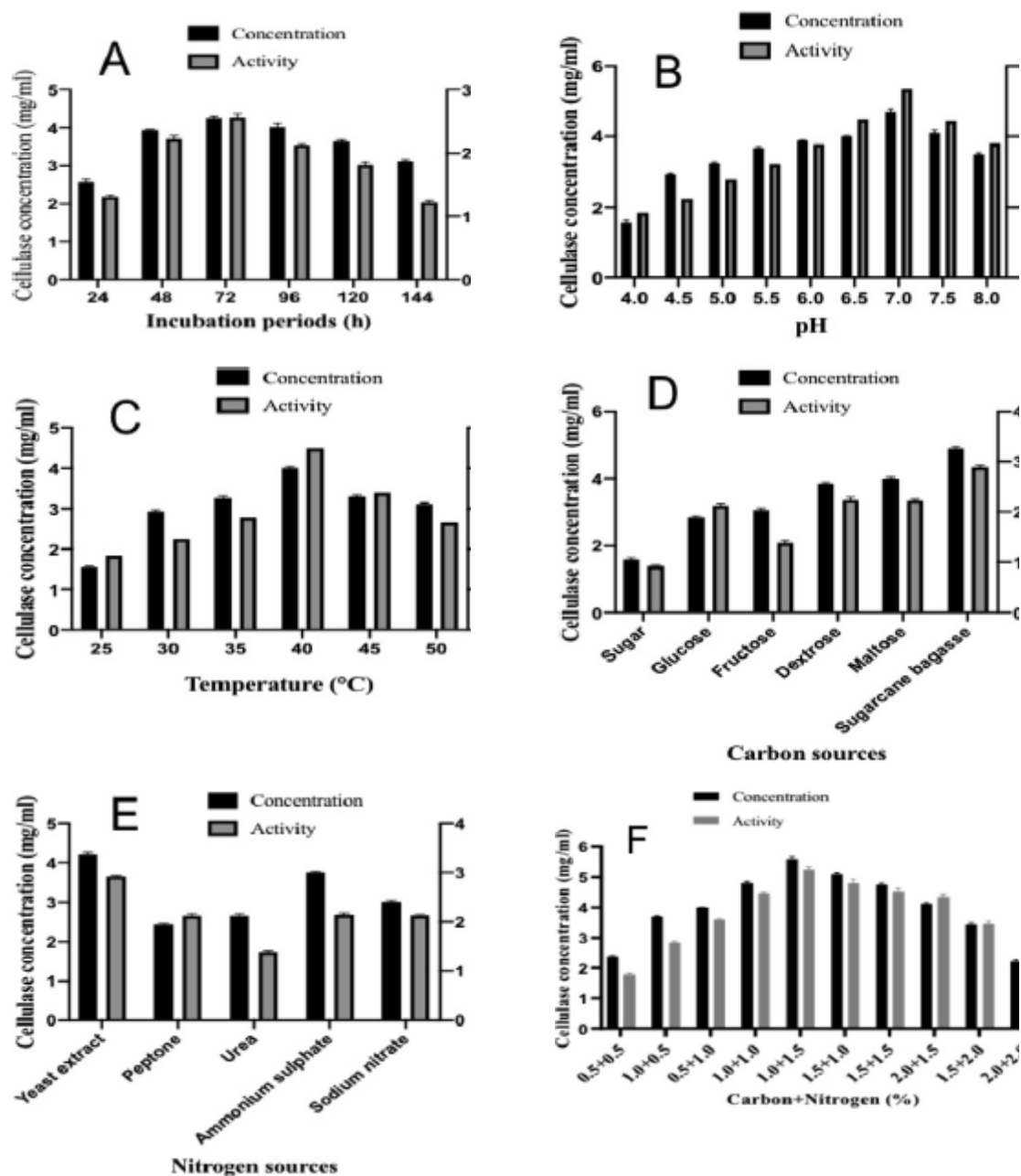


Figure 17. Optimisation de différents paramètres de processus pour atteindre une production maximale de cellulose et augmenter l'activité de la cellulase par *Bacillus pseudomycolides*. Les barres d'erreur présentées signifient \pm écart type des triplicats de trois expériences indépendantes. A. Influence des périodes d'incubation ; B. Effet du pH ; C. Effet de la température ; D. Effet des sources de carbone ; E. Effet des sources d'azote ; F. Effet combiné des sources de carbone et d'azote (Pramanik *et al.*, 2021).

Échantillon 5

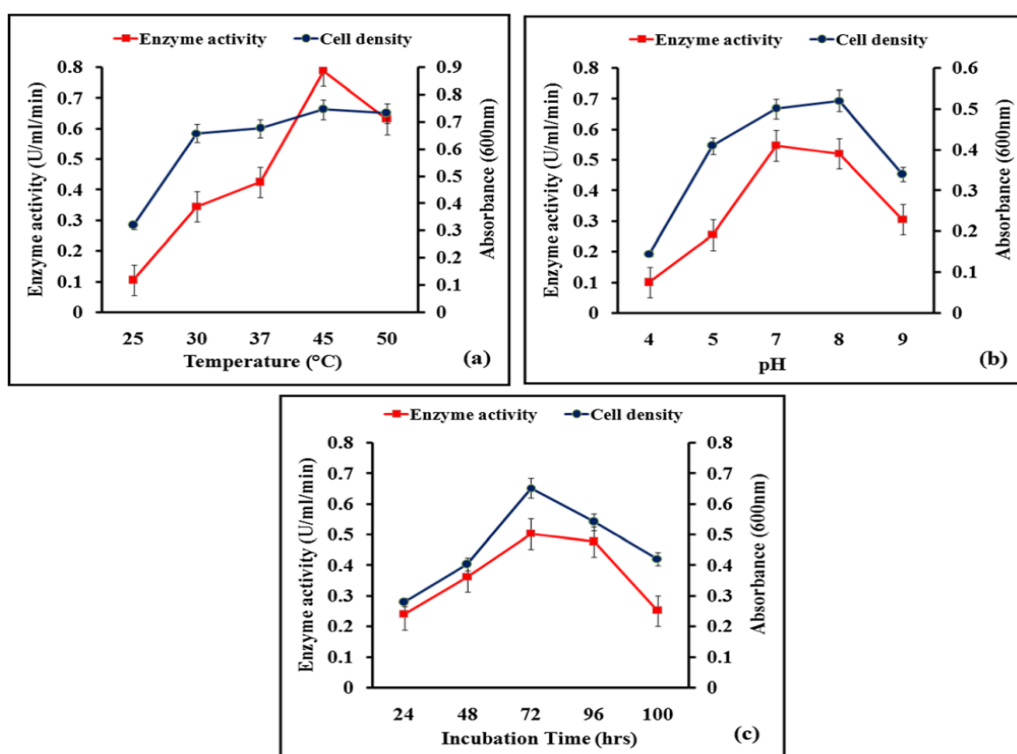


Figure 18. Effet de la température, du pH et du temps d'incubation sur la croissance des cellules bactériennes et la cellulase et la production de cellulase (Maliket *al.*, 2021) .

Échantillon 6

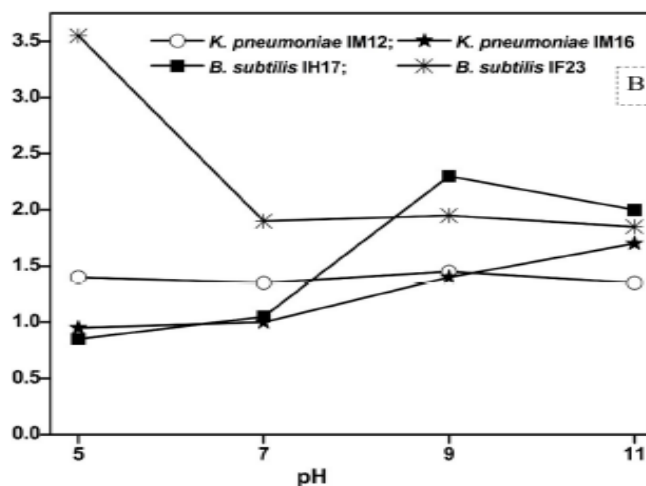


Figure 19. Effet du pH sur l'activité de dégradation de la cellulose des bactéries potentielles.

Les résultats varient quant à la température optimale pour optimiser l'activité enzymatique entre E1, E2, E3, E4 et E5 allant de 27°C à 45°C. Ces résultats ont été trouvés pour être comparables aux résultats de Premalatha et *al.*, (2015) dans lesquels des espèces d'*Enhydrobacter* ont été isolées d'un échantillon de compost de litière de feuille pour la

production de l'enzyme de cellulase et l'activité s'est avérée être la plus élevée à 30°C. Les isolats ont montré des activités presque comparables à 37°C. Comparativement, la cellulase de *Bacillus pumilis* a montré l'activité la plus élevée lorsqu'elle a été cultivée à 35°C (Kanmani *et al.*, 2011). Sriariyanun *et al.* (2016) qui ont été démontré que la meilleure température pour la production de chitinase par le *Bacillus laterosporus* est de 35°C.

La gamme de pH la plus appropriée pour la production de cellulase qui mentionne dans les résultats précédents pour E1 allant de 6-8, pour E2 est de 6, pour E6, le pH optimale est de 5, tandis que les résultats des trois derniers échantillons ont convenu que le pH optimal est de 7. Les données sont comparables aux résultats rapportés par Maryam *et al.*, (2018) sur *Bacillus cellulosilyticus* qui a montré une production optimale de cellulase à pH 5 en utilisant un isolat de *Bacillus*. Production de cellulase à pH 5 en utilisant un substrat traité à l'alcali comme source de carbone. Arushaet *et al.*, (2016) ont isolé *Bacillus* et les espèces de *Pseudomonas* ayant un potentiel cellulolytique. Le pH optimal pour la production de cellulase par ces deux isolats a été trouvé comme étant de 5. Les données indiquent que les espèces de *Bacillus* ont la capacité de produire une enzyme cellulase dans une large gamme de pH. De plus, le pH optimal de la cellulase purifiée de *Bacillus sp.* est pH 6 (Wita *et al.*, 2019).

Selon les résultats mentionnés précédemment, la meilleure source de carbone est le CMC pour tous les échantillons sauf pour E4, la bagasse qui est la meilleure source de carbone. Des résultats comparable de Junganget *et al.*, (2017) ont mentionné que le lactose est la meilleure source de carbone pour la production idéale de cellulase par *B. subtilis*. En revanche, Sethi *et al.*, (2013) ont trouvé que le glucose est la meilleure source de carbone pour produire de la cellulase par les isolats bactériens.

La période d'incubation entre l'échantillon est déférente allant de 24h, 72h et 96h. De même, il a été montré que les augmentations de l'activité cellulolytique ont été obtenues par de *B. amyloliquefaciens-ASK11* pendant 96 h (A.F. Mohammed, 2020).

La concentration d'inoculum la plus appropriée en fonction des résultats de l'échantillon 2 est 3%, pour E3 1% et pour E6 est 2%. Des autres résultats ont été rapportés concernant la production maximale de cellulase à une taille d'inoculum de 3% (v/v). L'activité maximale de la CMCase était de 19 UI/mL pour *Bacillus cereus* (Ahmad *et al.*, 2013). Il a été démontré que l'inoculum de 3% était le meilleur pour la production de cellulase par *Bacillus sp.* (Nehad *et al.*, 2019). De même, une taille d'inoculum de 3% a été prouvée pour une production maximale de cellulase par *Bacillus subtilis* (Yang *et al.*, 2014).

Parmi les différentes sources d'azote, l'extrait de levure a augmenté la production de cellulase c'est-à-dire l'extrait de levure est la meilleure source d'azote pour activité enzymatique idéal selon Abada *et al.*, (2020) ; Islam et Roy (2018). *B. licheniformis* a produit un maximum de cellulase en présence d'un milieu substitué par du sulfate d'ammonium. D'autres chercheurs ont également trouvé que le sulfate d'ammonium donnait une production maximale de cellulase par *B. pumilis.*, *B. pumilus*, *Ruminococcus albus*, *Bacillus sp. B21* et *Streptomyces sp.* (Wood *et al.*, 1982). Il a été signalé que l'activité cellulasique maximale de *Bacillus subtilis MUS1a* été obtenue avec un extrait de levure (Tabssum *et al.*, 2018). De plus, il a été conclu que les sources d'azote organique sont plus appropriées pour une production maximale de cellulase que les sources inorganiques (Goyal *et al.*, 2014 ; Sinjaroonsak *et al.*,2020). Certains composés organiques et inorganiques présents dans l'extrait de levure peuvent actuellement induire la production d'une enzyme extracellulaire (Arusha *et al.*, 2016).

Conclusion

Conclusion

Dans ce mémoire, nous avons étudié plusieurs articles scientifiques visant à isoler et cribler des souches de *Bacillus* productrices de cellulase. Les espèces de *Bacillus* ont un grand potentiel pour produire les enzymes cellulolytiques utilisées dans l'industrie.

De ce fait plusieurs échantillons de sol, de mélasse, de bagasse de canne à sucre, des microorganismes isolés à partir de bouse de vache et de larvaire de *H. armigera* ont été prélevés.

L'isolement et le criblage des bactéries ont été réalisés sur de la gélose contenant la CMC. Les souches cellulolytiques ont été sélectionnées en fonction du diamètre de la zone claire et transparente entourant les colonies. Plusieurs souches ont été isolées et purifiées sur le même milieu. L'étude des caractères morphologiques, biochimiques et du marqueur ARNr16S permet d'identifier les souches suivantes: *Bacillus subtilis*, *Bacillus flexus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus paralicheniformis*, *Bacillus albus*, *Paenibacillus sp.*, *Bacillus sp.*, *Aeromonas sp.*, *Bacillus pseudomycoïdes*, *Bacillus massilioanrexius*, *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella pneumoniae*.

L'accent a été mis sur l'optimisation de la production de cellulase afin que les conditions idéales pour les six échantillons soient les suivantes : pour les premiers échantillons du sol, le pH optimum se situe entre 6 et 8, la température optimale de 50°C et les sources idéales de carbone sont le CMC et l'amidon. Pour les deuxièmes échantillons du sol, le pH optimum est de 6, la température optimale est de 35°C, la source de carbone idéal est le CMC, l'extrait de levure est la meilleure source d'azote pendant la période d'incubation de 96 h et la concentration d'inoculum est de 3%. Pour l'échantillon de la mélasse et de la bagasse de canne à sucre, la température optimale est de 40°C, le pH optimum est de 7, le temps d'incubation de la souche de *Bacillus sp* est de 24 h, le CMC est utilisé comme une bonne source de carbone. Pour le *Bacillus pseudomycoïdes* et le *Bacillus massilioanrexius* le temps d'incubation est de 72 h et les sources de carbone et d'azote sont le CMC et l'extrait de levure respectivement. Pour le *B. subtilis*, le pH optimum est de 7, la température optimale est de 45°C et le temps d'incubation est de 72 h. Pour le sixième échantillon, le pH optimum est de 5. L'étude de ces paramètres physico-chimiques est importante pour la production idéale de l'enzyme cellulase.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Abada E. A., Elbaz R. M., Sonbol H., Korany S. M. 2021. Optimization of cellulase production from *Bacillus albus* (MN755587) and its involvement in bioethanol production. Polish Journal of Environmental Studies 30(3): 2459-2466.
2. Abriouel H., Benomar N., Huch M., Franz C. M., Gálvez A. 2014. The genera *Bacillus*, *Geobacillus* and *Halobacillus*. Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy: 555-570.
3. Ahmad B., Nigar S., Shah S. S. A., Bashir S., Ali J., Yousaf S., Bangash J. A. 2013. Isolation and identification of cellulose degrading bacteria from municipal waste and their screening for potential antimicrobial activity. World Appl. Sci. J 27(11): 1420-1426.
4. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215(3): 403–10.
5. Arusha P. N., Kiran R. K., Shanti G. G., Arun S. K. 2016. Optimization of cellulase production for *Bacillus sp.* and *Pseudomonas sp.* soil isolates. African Journal of Microbiology Research 10(13) : 410-419.
6. Bahouli M., Zidalmal B. 2020. Valorisation des déchets lignocellulosique par fermentation en milieu solide pour la production de cellulases microbiennes. Mémoire de Master en Biochimie, Université des Frères Mentouri, Constantine 1. Algérie.
7. Bekhouche F., Breton A., Gaillard-Martinie B. 1994. Champignons cellulolytiques du sol des zones arides du Sahara Algérien mise en évidence de l'activité cellulosique. Cryptogamie. Mycologie 15(2) : 141-147.
8. Bhagat S. A., Kokitkar S. S. 2021. Isolation and identification of bacteria with cellulose-degrading potential from soil and optimization of cellulase production. Journal of Applied Biology and Biotechnology 9(6): 1-6.
9. Bond, K., and Stutzenberger F. (1989). A note on the localization of cellulosome formation in *Thermomonospora curvata*. J. Appl. Bacteriol 6: 605-609.
10. Bornscheuer T. 2002. Microbial carboxylesterases. Classification, properties, and application in biocatalysis. FEMS Microbiology Reviews: 73-81.
11. Dabhi B.K, Vyas R.V, Shelat H.N. 2014. Use of banana waste for the production of cellulolytic enzymes under solid substrate fermentation using bacterial consortium. Int J Curr Microbiol Appl Sci 3(1):337–46.

12. Dantur K.I., Enrique R., Welin B., Castagnaro A.P. 2015. Isolation of cellulolytic bacteria from the intestine of *Diatra easaccharalis* larvae and evaluation of their capacity to degrade sugarcane biomass. *AMB Exp* 5: 15.
13. Dar M. A, Shaikh A. F, Pawar K. D, Xie R, Sun J, Kandasamy, S, Pandit, R. S. 2021. Evaluation of cellulose degrading bacteria isolated from the gut-system of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* and their potential values in biomass conversion. *Peer* 9 : e11254.
14. 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.
15. Denis F., Alain S. 2007. *Bactériologie médicale: Techniques usuelles*. Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson.
16. Gautam R., Sharma J. 2014. Production and optimization of alkaline cellulase from *Bacillus subtilis* in submerged fermentation. *Int J Sci Res* 3 : 1186-1194.
17. Gautam R., Sharma J. Optimization, purification of cellulase produced from *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* under solid state fermentation and its potential applications in denim industry. *Int. J. Sci. Res* 3: 1759- 2012.
18. Giese E. C., Dussán K J., Pierozzia M., Chandela A K., Pagnocad F C., da Silva S S. 2017. Cellulase Production by *Trichosporon laibachii*. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry* 9(4): 271-278. <http://dx.doi.org/10.17807/orbital.v9i4.1024>.
19. Goyal V., Mittal A., Bhuwal A. K., Singh G., Yadav A., Aggarwal N. K. 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*.
20. N. Hardy, I. Henaut , F. Augier , C. Béal et F. Ben Chaabane. 2015. Rhéologie des champignons filamenteux : un outil pour la compréhension d'un procédé de production de biocatalyseurs utilisés pour la production de bioéthanol. *Rhéologie*, Vol. 27, 43-48.
21. Heni S. 2010. Isolement, caractérisation et valorisation de bactéries de la mine de Gafsa pour des applications en bioremediation. thèse de doctorat. Université 7 novembre à Carthage, Tunisie.
22. Hilden L. Johansson G. 2004. Recent developments on cellulases and carbohydrate-binding modules with cellulose affinity. *Biotechnology letters* 26(22) : 1683-1693.
23. Hoyos P, Hernaiz M.J., Alcántara A.R. 2017. Biocatalyzed Production of Fine Chemicals. *Comprehensive Biotechnology* 3: 334-373;
24. Hoyos P., Hernáiz M.J., Alcántara A.R.. 2017. Biocatalyzed Production of Fine Chemicals.

25. Islam F., Roy N. 2018. Screening, purification and characterization of cellulase from cellulase producing bacteria in molasses. *BMCResearch notes* 11(1) :1-6.
26. Jensen G.B., Hansen B.M., Eilenberg J., Mahillon J. 2003. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environ. Microbiol* 5: 631–40.
27. Jungang W., Binbin H., Xiaofen W., Zongjun C. 2017. Characteristics of cellulase in cellulose-degrading bacterium strain *Clostridium straminisolvens* (CSK1). *African Journal of Microbiology Research* 11(10) : 414-421.
28. Kanmani R, Vijayabaskar P., Jayalakshmi S. 2011. Sachaarification of banana-agro waste and clarification of apple juice by cellulase enzyme produced from *Bacillus pumilis*. *World Applied Sciences Journal* 12(11) : 2120-2128.
29. Kasana R. C., Salwan R., Dhar H., Dutt S, Gulati A. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current microbiology* 57(5) : 503-507.
30. Khlil 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, Université Mohamed Boudiaf-Oran.
31. Lanteigne Roch L. M. 2010. Utilisation des enzymes lipase et laccase pour améliorer la blancheur d'une pâte désencrée de papier journal. Thèse de doctoral, Université du Québec, canada.
32. Logan N.A. , de Vos P. 2009 . *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, Vol. 3, The Firmicutes. New York: Springer: 21–128 .
33. Malik W. A., Khan H. M., Javed S. 2021. Bioprocess optimization for enhanced production of bacterial cellulase and hydrolysis of sugarcane bagasse. *BioEnergy Research* : 1-14.
34. Maravi P, Kumar A. 2020. Isolation, screening and identification of cellulolytic bacteria from soil. *Biotechnol. J. Int* 24 : 1-8.
35. 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).
36. Masri N. 2003. exploration de la spécificité de substrat des glucosides hydrolases du clan GH-A .thèse de doctorat, Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique ; 145.

37. Mohammed A. F. 2020. Optimization of cellulase and chitinase enzymes production by plant growth promoting rhizobacteria. *Novel Research in Microbiology Journal* 4(1): 641-652.
38. Nehad E. A., Yoness M. F., Reem A. A. 2019. Optimization and purification of cellulase produced by *Penicillium decumbens* and its application. *Egyptian Pharmaceutical Journal* 18(4): 391..
39. Nevalainen K., Palva E. T. 1978. Production of extracellular enzymes in mutants isolated from *Trichoderma viride* unable to hydrolyze cellulose. *Applied and Environmental Microbiology* 35(1) : 11-16.
40. Pramanik S. K., Mahmud S., Paul G. K., Jabin T., Naher K., Uddin M. S., Saleh M. A. 2021. Fermentation optimization of cellulase production from sugarcane bagasse by *Bacillus pseudomyoside* and molecular modeling study of cellulase. *Current research in microbial sciences* 2: 100013.
41. Premalatha N., Gopal N. O., Jose P. A., Anandham R., Kwon S. W. 2015. Optimization of cellulase production by *Enhydrobacter sp.* ACCA2 and its application in biomass saccharification. *Frontiers in Microbiology* 6: 1046.
42. Radulovic O., Petrić M., Raspor M., Stanojević O., Janakiev T., Tadić V., Stanković S. 2018. Culture-dependent analysis of 16S rRNA sequences associated with the rhizosphere of *Lemna minor* and assessment of bacterial phenol-resistance: Plant/bacteria system for potential bioremediation—Part II. *Polish Journal of Environmental Studies* 28(2): 811-822.
43. Rasul F., Afro z A., Rashid U., Mehmood S., Sughra K. Screening and characterization of cellulase producing bacteria from soil and waste (molasses) of sugar industry. *Int. J. Biosci* 6: 230- 2015.
44. Receveur V., Czjek M., Schulein M., Panine P., Henrissat B. 2002. Dimension, shape, and conformational flexibility of two domains of fungal cellulases in solution probed by small angle X-ray scattering. *The journal of Biological Chemistry* 277 (43): 40887-40892.
45. Reffas F. Z. I. 2017. Isolement et caractérisation de bactéries productrices de cellulase. Thèse de doctorat en Microbiologie moléculaire et protéomique, Université de Sidi bel Abbes, Algérie.
46. Saha B, Roy S, Hossen F. 2019. Isolation and identification of cellulolytic bacteria from soil sample and their antibiogram. *Am J Microbiol Res*;7(3):83–90.
47. Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry* 40(8): 2689-2694.

48. Saranraj P, Stella, D. Reetha, D. 2012. Microbial cellulases and its applications. *International Journal of Biochemistry and Biotechnology Science* 1: 1-12.
49. Séa T. B., Saki S. J., Coulibaly A. F., Yebouaa F., Diopoh K. J. 2006. Extraction, purification et caractérisation de deux cellulases du termite, *Macrotermes subhyalinus* (Termideae). *Agronomie africaine* 18(1) : 57-65.
50. Sethi S., Datta A., Gupta B. L., Gupta S. 2013. Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil. *International Scholarly Research Notices*.
51. Shweta A. 2012. Cellulases of bacterial origin and their applications: A review. *International Journal of Science and Research* 3(10): 1652.
52. Siddiq M., Ahmed J, Lobo M. G. Ozadali F.2012. Tropical and subtropical fruits: postharvest physiology, processing and packaging. John Wiley.
53. Singhania R. R. Adsul, M.Pandey, A.Patel, A K. 2017. Cellulases. In *Current developments in biotechnology and bioengineering* : 73-101.
54. Sinjaroonsak S., Chaiyaso T. 2020. Optimization of cellulase and xylanase productions by *Streptomyces thermocoprophilus* TC13W using low cost pretreated oil palm empty fruit bunch. *Waste and Biomass Valorization* 11(8): 3925-3936.
55. Soule M. H. 1932. Identity of *Bacillus subtilis*, Cohn 1872. *The Journal of Infectious Diseases* 191-215.
56. Sriariyanun M., Tantayotai P., Yasurin P., Pornwongthong P., Cheenkachorn K. 2016. Production, purification and characterization of an ionic liquid tolerant cellulase from *Bacillus sp.* isolated from rice paddy field soil. *Electronic journal of biotechnology* 19: 23-28.
57. Sudharhsan S., Senthilkumar S., Ranjith K. 2007. Physical and nutritional factors affecting the production of amylase from species of *Bacillus* isolated from spoiled food waste. *African Journal of Biotechnology* 6(4).
58. Tabssum F., Irfan M., Shakir H. A., Qazi, J. I. 2018. RSM based optimization of nutritional conditions for cellulase mediated Saccharification by *Bacillus cereus*. *Journal of biological engineering* 12(1) : 1-10.
59. Vidaud C. 1984. Contribution à l'étude de l'introduction du système cellulasique de *Trichoderma sp* par utilisation d'analogie de substrat thiosaccharidique. Thèse de doctorat, Université de Grenoble, France.
60. Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A, Lane D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology* 173(2) : 697-703.
61. Wilson, D B. 2009. Cellulases and biofuels. *Current opinion in biotechnology* .20(3) : 295-299.

62. Wita A., Białas W., Wilk R., Szychowska K., Czaczyk K. 2019. The influence of temperature and nitrogen source on cellulolytic potential of microbiota isolated from natural environment. *Polish Journal of Microbiology* 68(1): 105-114.

63. Wood T. M., Wilson C. A., Stewart C. S. 1982. Preparation of the cellulase from the cellulolytic anaerobic rumen *bacterium Ruminococcus albus* and its release from the bacterial cell wall. *Biochemical Journal* 205(1) : 129-137.

64. Yang W., Meng F., Peng J., Han P., Fang F., Ma L.,Cao B. 2014. Isolation and identification of a cellulolytic *bacterium* from the Tibetan pig's intestine and investigation of its cellulase production. *Electronic Journal of Biotechnology* 17(6): 262-267.

Annexes

Annexe 1 :

Pour préparer 0.5 % de CMC :

- NaNO_30.1 %
- K_2HPO_40.1 %
- KCl0.1 %
- MgSO_40.05 %

Résumés

ملخص

يعتبر السليلاز من الانزيمات المصنفة وفقا للتسمية الدولية (EC 3.2.1.4) التي تستخدم على نطاق واسع في الصناعة التكنولوجية الحيوية. الهدف من هذا العمل هو استغلال بكتيريا *Bacillus* المعزولة من عدة اوساط مختلفة المتمثلة في التربة, دبس التفل, قصب السكر, كائن حي دقيق معزول من روث البقر و يرقات *H.armigera* في افراز السليلاز. تم فحص السلالات المنتجة للسليلاز على جيلوز كربوكسي مثيل سيليلاز و تم قياس قطر المنطقة الشفافة حول المستعمرة. و سمحت لنا الدراسة المورفولوجية, الكيمائية و الجزيئية بالتعرف على أن السلالات المعزولة هي من انواع مختلفة من جنس *Bacillus* بالاضافة الى دراسة عدة معايير متنوعة من بينها درجة الحرارة درجة الحموضة مصدر الكربون و النيتروجين تركيز الابواغ و وقت الحضانة بغرض تحسين و ضمان افضل الشروط لانتاج السليلاز. النتائج التي تم الحصول عليها تشير الى ان درجة الحرارة المثلى تتراوح بين 40-50 درجة مئوية و لوحظ تغير في درجة الحموضة على مجال متغير بين 5-8, الحضانة مدتها بين 24-72 ساعة و يعتبر كربوكسي مثيل سيليلاز و خلاصة الخميرة من افضل مصادر الكربون و النيتروجين على التوالي في جميع العزلات.

الكلمات المفتاحية: السليلاز، *Bacillus*، التحسين، الفرز، كربوكسي مثيل سيليلاز

Résumé

Les cellulases sont des enzymes hydrolases (EC 3.2.1.4) largement utilisées dans l'industrie biotechnologique. L'objectif de ce travail est l'exploitation des bactéries *Bacillus* isolés des différents milieux, sol, mélasse, bagasse de canne à sucre, microorganisme isolés à partir de bouse de vache et de larvaire de *H.armigera*, dans la sécrétion des cellulases. Les souches productrices de cellulase ont été criblées sur gélose de CMC et le diamètre de la zone claire autour de la colonie a été mesuré. L'étude morphologique, biochimique et phylogénétique permet d'identifier les souches isolées aux différentes espèces du genre *Bacillus*. En plus d'étudier diverses variables, température, pH, source de carbone et d'azote, concentrations d'inoculum et temps d'incubation, dans le but d'améliorer et d'assurer les meilleures conditions pour la production de cellulases et aussi pour son fonctionnement dans des conditions optimales. Les résultats obtenus indiquent que : la température optimale est entre 40°C et 50°C, le pH est varié en large gamme 5-8, temps d'incubation pendant 24h- 72h et Lacarboxyméthylcellulose et l'extrait de levure sont les meilleures sources de carbone et d'azote, respectivement, dans tous les isolats.

Mots clés : cellulase, *Bacillus*, optimisation, criblage, carboxyméthylcellulose.

Abstract

Cellulases are hydrolase enzymes (EC 3.2.1.4) widely used in the biotechnology industry. The objective of this work is the exploitation of *Bacillus* bacteria isolated from different media, soil, molasses, sugar cane bagasse, microorganisms isolated from cow dung and *H.armigera* larvae, in the secretion of cellulase. Cellulase-producing strains were screened on CMC agar and the diameter of the clear zone around the colony was measured. The morphological, biochemical and phylogenetic study makes it possible to identify the strains isolated to the different species of the genus *Bacillus*. In addition to studying various variables, temperature, pH, carbon and nitrogen source, inoculum concentrations and incubation times, with the aim of improving and ensuring the best conditions for the production of cellulases and also for its operation under optimal conditions. The results obtained indicate that: the optimum temperature is between 40°C and 50°C, the pH is varied in a wide range 5-8, incubation time for 24h-72h and carboxymethylcellulose and yeast extract are the best sources of carbon and nitrogen, respectively, in all isolates.

Keywords: cellulase, *Bacillus*, optimization, screening, carboxymethylcellulose.