



*Université Mohamed Khider de Biskra*  
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie  
Département de la biologie  
Sciences biologique

Référence ..... / 2021

# MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie Appliquée

---

Présenté et soutenu par :  
**Ben harzaallah Sabrina**

Le: lundi 28 juin 2021

## **Les microorganismes halophiles producteurs de cellulase dans les régions de Biskra**

---

**Jury:**

*Mme.* **BoukharoubaKhadidja** **Pr** Université de Biskra **Président**

*M.* **Hebal Hakim** **MCB** Université de Biskra **Rapporteur**

*Mme.* **Baba Arbi Souad** **MCB** Université de Biskra **Examineur**

Année universitaire : 2020/2021

## **Remerciement**

Tous d'abord je remercie ALLAH Tout-Puissant, qui m'a inspiré de sa force pour mener bien ce travail, a éclairé mon chemin et m'a permis de réussir dans ma mission scientifique.  
« Al hamdo li Allah »

Je tiens à remercier sincèrement Docteur **Hebal Hakim**, pour la confiance qu'il m'a accordé en acceptant d'encadrer ce travail et pour me guidez et me conseille, ainsi que pour son soutien tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Je souhaite remercier chacun des membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail.

En fin, Je de remercier tous les enseignants qui ont assuré notre formation au cours des années d'étude.

A tous ceux qui nous aidés et encouragé de près ou de loin

**Merci à vous tous**

## Dédicace

Au meilleur des papas dans le monde **Abed el Allah**

Tu as toujours été pour moi un exemple du père respectueux et courageux qui se sacrifie pour le bonheur de ses enfants. Merci mon père pour ton amour, ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Puisse Dieu, le très Haut, vous accorder santé et long vie.

A ma chère mère **Samia**

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour et ma considération pour vos sacrifices innombrables qui m'a encouragé. Merci énormément ma chère maman pour ton tendresse, pour vos prière et vos soutien. Puisse Dieu, tout puissant vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une longue vie.

A ma chère grand- mère **Rebiha**

Ma chère **Nana**, je vous dédie ce travail comme le meilleur cadeau que je puisse t'offrir pour vos tendresse et vos amour, tu es toujours à mes côtés et vivant dans mon cœur. Je demande à Dieu d'avoir pitié de toi avec sa grande miséricorde.

A mon chère oncle **Yazid** et ma chère tante **Amel** et **Souad**

Je vos dédie ce travail en guise de remerciement pour vos soutiens. Merci énormément pour vos amours et vos tendresses. Je prie Dieu Tout-Puissant vous combler de santé et longue vie et de protéger vos fils **Omar**, **Boutahra**, **Rima** et **Selma**

A mes chers frères et famille

Je dédie ce travail à mes frère **Abdou**, **Zinou**, **Yahia** et **Mohamed**, **Nasrou** et à ma chère grand-mère **Hafiza** à mes tantes **Fatima**, **Maissa** et **Salima**, **Aicha** et à mes oncles **Abed el Rahman** et **Hamoudi** à mon oncle **Ali** et sa femme **Nabila** et ses fils **Nacer** et **Salah** et mon oncle **Hmida** et sa femme **Samira**, à ma tante **Saida** et **Khadidja** et ses filles **Imen** et **Souria** et à mes cousins **Nacira** et **Nabila**, **Sana**, **Khalida** et ses filles **Mariem** et **Tasnim** et **Hadil**, **Lina**, **Sara** et à mes chères amies **Selma**, **Maria**, **Radja**, **Amira**, **Lamia**, **Akila**, **Nour**, **Chaima(z)** et à tous ceux qui porte le nom **Benharzallah**, **Boughambouz**.

## Table des matières

Remerciement	
Dédicace	
Table de matière	
Liste des tableaux .....	IV
Liste des figures .....	V
Liste des abréviations .....	VI
Introduction .....	1
<b>Partie 1 : Synthèse Bibliographique</b>	
<b>Chapitre 1 :</b>	
I. Biomasse lignocellulosique .....	5
I. 1. Constituent majeur de lignocellulose .....	5
I. 1. 1. Cellulose .....	5
I. 2 Définition de cellulase .....	6
I. 3 Nomenclature .....	6
I. 4 Structure de cellulase .....	6
I. 4 Mode action de cellulase .....	7
I. 4. 1 Exo- $\beta$ -(1,4)-glucanase : (EC 3 .2.1.9.1) .....	7
I. 4. 2 Endo-- $\beta$ -(1,4) glucanase :(EC3.2.1.4) .....	7
I. 4. 3 $\beta$ -(1,4) – glucoside :(EC3.2.1.2.1) .....	7
I. 5 Quelques caractéristiques de cellulase .....	7
I. 5. 1 Réaction et la spécificité .....	8
I. 5. 2. Substrat naturels .....	8
I. 5. 3. Inhibiteur .....	8
I. 5. 4. Activité enzymatique .....	8
I. 6. Application de cellulase .....	9
I. 7. Microorganismes producteurs de cellulase .....	9

I. 7.1. Champignons .....	9
I. 7.2. Bactéries .....	9
<b>Chapitre 2</b>	
II. Définition du halo- tolérance .....	11
II. 1. Micro-organismes halophiles .....	11
II. 2. Halophiles producteurs de cellulase .....	12
II. 2.1. Fungi .....	13
a). <i>Aspergillus flavus</i> .....	13
b). <i>Aspergillus terrus</i> Uni MAP AA6 6 .....	13
II. 2.2. Bactéries .....	13
A). <i>Halocella cellulolytica</i> (Z-10151(=DSM7362) .....	13
<b>Partie 2 : Partie expérimentale</b>	
<b>Chapitre 3 : Matériel et méthodes</b>	
III. Isolement .....	16
III.1. Echantonnage .....	16
III.1.1. Prélèvement d'échantillon de sol .....	16
III.1.2. Prélèvement d'échantillon de sédiment salin .....	16
III.2. Sélection des microorganismes halophiles producteurs de cellulase .....	16
III.2.1. Identification des microorganismes .....	17
III.2.1.1. Identification morphologique et biochimique .....	17
III.2.1.2. Identification moléculaire .....	17
IV. Production de cellulase .....	17
IV.1. Dosage enzymatique par DNS .....	18
IV.2. Effet de source de carbone sur la production et l'activité de cellulase .....	18
IV.3. Effet de pH sur l'activité et stabilité de cellulase .....	18
IV.4. Effet de température sur l'activité de cellulase .....	18
IV.5. Effet de différents sels sur l'activité de cellulase .....	19
IV.6. Effet des ions métalliques et détergents sur l'activité de cellulase .....	19
IV.7. Effet de NaCl sur l'activité et stabilité de cellulase .....	19

### Chapitre 4 : Résultats et discussions

V. Isolement des microorganismes halophiles producteur de cellulase .....	21
V.1. Identification des microorganismes halophiles .....	21
VI. Meilleures conditions pour production de cellulase halophile .....	23
VI.1. Effet pH sur l'activité et stabilité de cellulase .....	23
VI.2. Effet de température sur l'activité et stabilité de cellulase .....	24
VI.3. Effet de source de carbone sur la production et l'activité de cellulase .....	25
VI.4. Effet de différents sels sur l'activité de cellulase .....	26
VI.5. Effet des ions métalliques et détergents sur l'activité de cellulase .....	29
VI.6. Effet de NaCl sur l'activité de cellulase .....	32
Conclusion .....	33
Bibliographie .....	35
Annexe	
Résumé	

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Caractère morphologique et biochimique de <i>Salinivibrio</i> sp.NTU05...	22
<b>Tableau 2.</b> Effet de différents substrats sur cellulase purifié a partir <i>B.halodurans</i> . CAS1.....	27
<b>Tableau 3.</b> Effet de différents sels sur la production de cellulase de <i>Gracilibacillus</i> sp.SK1.....	28
<b>Tableau 4.</b> Effet des ions métalliques et réactifs chimiques sur l'activité de cellulase de <i>Gracilibacillus</i> sp.SK1.....	31

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Structure chimique partielle de cellulose.....	6
<b>Figure 2.</b> Différents microorganismes halophiles producteurs de cellulase.....	12
<b>Figure 3.</b> Formation de zone claire après coloration par rouge de Congo.....	21
<b>Figure 4.</b> Effet de pH sur l'activité de cellulase de <i>Bacillus flexus</i> .....	23
<b>Figure 5.</b> Effet de pH sur la stabilité de cellulase de <i>Bacillus flexus</i> .....	24
<b>Figure 6.</b> Effet de température sur l'activité et stabilité de cellulase purifié à partir de <i>Bacillus flexus</i> .....	25
<b>Figure 7.</b> Effet de différentes sources de carbone sur la production de cellulase purifié de souche <i>Salinivibrio</i> sp. NTU05 .....	26
<b>Figure 8.</b> Effet de différentes concentrations de NaCl sur l'activité de cellulase de <i>Thalossobacillus</i> sp.LY18.....	32

## Liste des abréviations

**CAM** : Molécule activatrice de cellulase

**CBH** : Cellobiohydrolase

**CBM**: Carbohydrate Banding Module

**CMC**: Carboxyméthylcellulose

**DNS** : Dinitrosalicylicacide

**EDTA** : Acide éthylène diamine tétraacétique

**NCBI** : Centre national de l'information sur la biotechnologie

**PMSF** : Florure de phenylméthyl sulfonyle

**SDS** : Sodium dodecyl sulfate

# **Introduction**

## Introduction

La pollution est considérée comme l'un des plus grands problèmes qui menacent l'environnement et la santé humaine à l'heure actuelle, comme l'éminent professeur Australien Frank Fenner a prédit avant sa mort que la race humaine s'éteindra environ 100 ans et cela est dû à l'exploitation et à la consommation massives des ressources naturelles et l'augmentation de la densité de population, qui se traduit par une augmentation de déchet et de la pollution de la planète qui entraîne à la propagation de plusieurs maladies et épidémies, cela nécessite le développement de mode de vie et la recherche d'alternatives plus durables comme les énergies renouvelables (**Khelil, 2017**).

Parmi les énergies renouvelables on trouve la biomasse lignocellulosique est considérée comme une source d'énergie propre et renouvelable, elle est abondante et se classe à la troisième source d'énergie après le pétrole et le charbon. Elle également utilisé dans le bois- énergie car elle est considéré comme un moyen prometteur de produire l'énergie en est dû à sa grande flexibilité par rapport aux autres sources d'énergie renouvelables en raison de sa facilité de stockage (**Khelfa, 2009**). Elle est composée essentiellement de trois polymères (la cellulose, l'hémicellulose et la lignine), dont les teneurs sont variables d'une espèce végétale à l'autre en plus de ces composants il y d'autre élément tel que pectine (**Diddern et al., 2010**). La biomasse lignocellulosique provient de plusieurs sources comme résidus agricole et forestier, les déchets urbain et industrielle ou à partir de sous- produit de transformation de bois (**Ballerini et al., 2011**). La production annuelle de la biomasse est estimé 20 milliards de tonne, dont seulement 6 milliards sont actuellement exploité dans des applications alimentaire et non alimentaire (**Chambon, 2011**). Ainsi la bioconversion de la biomasse lignocellulosique en biocarburant qui est relativement peu coûteuse, peut efficacement soulager et diminuer la pression sur les approvisionnements énergétiques et bénéficier ainsi au développement durable (**Gahfif et al., 2020**). Les microorganismes dégradant la biomasse lignocellulosique ont reçu une grande attention dans divers domaines industriels en raison de leur capacité à produire de grandes quantités des enzymes lignocellulosique extracellulaire (**Gahfif et al., 2020**).

Parmi ces enzymes il y a cellulase qui convertit la cellulose en glucose, qui peut être fermenté en éthanol. Comme elle est utilisée dans nombreuses applications telles que l'industrie alimentaire ; dans le domaine des additifs alimentaire ; dans les sciences biomédicale et dans les industries chimiques. La biomasse est également traitée avec des acides et des alcalis pour libérer de la cellulose qui est éliminée en utilisant de grandes quantité d'eau, ce qui entraîne des quantités importantes de sel ce qui est nécessite des micro-organismes halophiles tels que les bactéries et champignons pour produire de cellulase halo-stable qui s'adapte bien dans une salinité élevée et à haute pressions osmotique et ce qui contribue à réduire la consommation d'eau par rapport à la cellulase ordinaire (**Zhang *et al.*, 2012**).

Cette caractéristique a rendu l'enzyme cellulase d'une grande importance dans la biotechnologie, ce qui rend son coût très élevée ce qui nécessite optimisation et amélioration de production de cellulase dans milieux salin à partir de microorganisme halophile pour obtenir une quantité importante de cellulase halostable avec un coût moindre.

L'objectif de ce travail est mis en évidence l'identification des microorganismes halophile producteur de cellulase et étude les conditions tels que la température et pH pour une meilleure production de cellulase.

Ce travail est divisé en trois parties : une synthèse bibliographique sur les récentes connaissances sur les cellulases et microorganismes halophiles producteur de cellulase, une partie expérimentale et une partie de résultats et discussion. En fin des conclusions et perspectives sont retirées de ce travail.

# **Synthèse**

# **Bibliographique**

# Chapitre 1

## I. Biomasse lignocellulosique

La biomasse lignocellulosique est la biomasse la plus importante et la plus abondante en terre (**Khelil, 2017**), elle appartient à plusieurs sources telles que l'agriculture (paille de céréales, tiges de colza, rafles de maïs...), des résidus des exploitations forestières, déchets de l'industrie de bios et de papier et à partir de cultures précises de plantes annuelles, prénées à rotation rapide (*miscanthus*...) (**Boukari, 2010**).

### I. 1. Constituant majeur de lignocellulose

La paroi lignocellulosique est un complexe des fibres qui compose de cellulose, hémicellulose qui se forme avec cellulose l'holocellulose (**Djaafri, 2020**) et lignine qui présente 30% de lignocellulose et assure la rigidité (**Reid, 1995**).

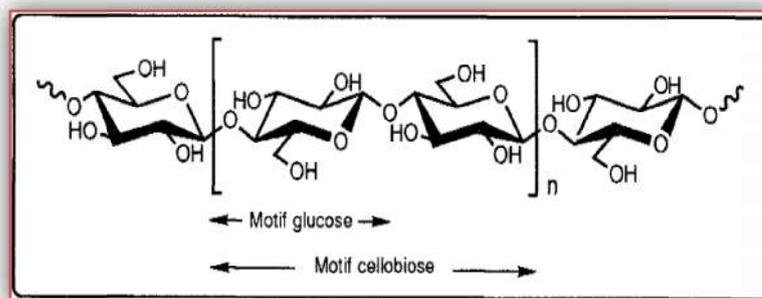
#### I. 1. 1. Cellulose

Est le bio polymère (**Reffas, 2017**) plus abondant dans la nature sous forme pure (**Bisaria et Ghose, 1981**) le principal composé de la biomasse lignocellulosique (**Reffas, 2017**) il représente de 35 à 50% de la paroi végétale (**Chauve, 2011**), est polymère de glucose (ou  $\beta$ -D-glucopyranose) lié entre eux par des liaisons glucosidiques  $\beta(1-4)$  (**Hardy, 2016**).

Est un composé insoluble et très résistant aux certains microorganismes pathogènes à cause de sa structure cristalline qui est formée par l'association de microfibrilles de 2 à 6  $\mu$ m de diamètre formant des fibrilles de diamètre entre 60 et 360 nm (**Khelfa, 2018**), il est constitué de 2 types de structures :

Structure cristalline : c'est la structure la plus résistante résulte par association des chaînes linéaires de cellulose par des liaisons hydrogène où il est difficile de détruire (**Bensmira, 2006**).

Structure amorphe : c'est la structure la plus facile à décomposer et hydrolyser car elle ne contient pas des liaisons qui maintiennent sa dureté et rigidité (**Bensmira, 2006**).



**Figure1.** Structure chimique partielle de cellulose (**Ouali et Tidjet, 2012**).

## I. 2 Définition de cellulase

Est un enzyme lignocellulosique composé de polysaccharide de D-glycopyranosyl (GLC) lié par des liaisons  $\beta$  (1-4) répété (**Wang et al., 2012**), il est responsable de la dégradation de cellulose et produite par divers microorganismes tel que les bactéries, les champignons (**Bisaria et Ghose, 1981**) .

Cellulase est un système enzymatique complexe regroupé 3 type des enzymes : endoglucanase, exoglucanase et cellobiose qui coopèrent entre elles pour hydrolyser et dégrader la cellulose ( **Bisaria et Ghose, 1981**) .

## I. 3 Nomenclature

Nom codifié : E.C.3.2.1.4

Nom systématique : 1,4- (1,3 ; 1,4)-  $\beta$ -D-Glucan4-glucanohydrolase.

Nom recommandé : Cellulase

Synonymes : Endoglucanase, Endo-1,4- $\beta$  Glucanase, cellulose carboxyméthylque,  $\beta$ -1,4endoglucanhydrolase, celludextrinase, Avicelase (**Leghlimi, 2013**).

#### I. 4 Structure de cellulase

La Cellulase est une enzyme lignocellulosique catalyseur de nature glycoprotéique, elle caractérise par une structure modulaire et contient deux parties fonctionnelles (**Bensmira, 2006**): 1<sup>er</sup> partie présente le domaine catalytique (Catalytic Domain) ou se trouve le site actif le lieu de la réaction hydrolytique (**Bensmira, 2006**) et une 2eme partie qui présente le domaine de fixation de substrat sur l'enzyme c'est le CBM( carbohydrate binding module) (**Hardy, 2016**) les deux sites lié entre eux par une peptide glycosylé qui nommé « linker »(**Bensmira, 2006**).

#### I. 4 Mode action de cellulase

La cellulase est un complexe multienzymatique, elle contient 3 types des enzymes qui ont un effet synergique sur la dégradation de cellulose cristalline (**Bisaria et Ghose, 1981**).

##### I. 4. 1 Exo- $\beta$ -(1,4)-glucanase : (EC 3 .2.1.9.1)

Où nommé cellobiohydrolase(CBH) dégrade les extrémités réductrices par le CBH1 et non réductrice par les CBH2 (**Chauve, 2011**) de la chaine cellulose et libère le dimère de cellubiose selon la spécificité d'enzyme (**Badrana, 2017**) il a un rôle important dans la dégradation de cellulose cristalline (**Bensmira, 2006**).

##### I. 4. 2 Endo-- $\beta$ -(1,4) glucanase :(EC3.2.1.4)

Appelé endocellulose, il clive les liaisons interne glucosidique entre deux résidus D-glucose (**Badrana, 2017**). Le clivage et l'attaque aléatoire de cette enzyme dans la région amorphe de la chaine cellulosique (**Desvaux, 2001**) conduit à la formation des nouveaux extrémités non réductrices qui deviennent à leur tour des sites réactifs pour les cellobiohydrolases a fin de coopérer avec endocellulose pour dégrader le cellulose cristalline et libérer cellodextrine , cellubiose et glucose(**Bensmira, 2006**).

### **I. 4. 3 $\beta$ -(1,4) – glucoside :(EC3.2.1.2.1) :**

Où nommé cellulobiase hydrolyse et clive les liaisons  $\beta$ - glucosidique de cellulose (Bensmira, 2006) ou Glucooligosaccharide et libre glucose (Badrana, 2017) et il devient moins active lorsque la chaine cellulose s'allongent (Tchunden, 1990).

## **I. 5 Quelques caractéristique de cellulase**

### **I. 5. 1 Réaction et la spécificité**

La réaction enzymatique est représenté par l'endohydrolase des liaisons 1,4  $\beta$ -D-glucosidique de la cellulose et peut aussi dégrader la lignine (schumberg et Salzman, 1991).

### **I. 5. 2. Substrat naturels**

La cellulase peut interagir et dégrader divers substrats naturels tel que : la cellulose, xyloglucanase et coton, cette dégradation nécessite une coopération des enzymes cellulotique (Reffas, 2017).

### **I. 5. 3. Inhibiteur**

Les inhibiteurs sont des composés naturels ou chimiques qui ont un effet sur la vitesse de réaction enzymatique, parmi les inhibiteurs de l'activité de cellulase : Hg<sup>+2</sup>(restauré par la cystéine ou NaCl) ; Fe <sup>+2</sup> ; le N- bromosuccinimide ; Dextranes ; Oietylpyrocarbonate (schumberg et Salzman, 1991).

### **I. 5. 4. Activité enzymatique**

L'activité enzymatique est un terme qui définit la vitesse de la réaction catalytique exprime en unités internationales(IU) (Bensmira, 2006). Elle présente la quantité enzymatique nécessaire pour dégrader et convertir la carboxymethylcellulose (le substrat CMC) en carbohydrate réduits (1  $\mu$ mol de substrat glucose par 1min) (Schülein, 1988).

## I. 6. Application de cellulase

La cellulase est parmi les enzymes les plus importants dans le domaine de la biotechnologie. La 1<sup>ère</sup> fois est utilisée pendant les années 1980 dans l'alimentation animale, l'industrie de textile et l'industrie de papier et élimination d'encre (**Leghlimi, 2013**), il joue un rôle important dans la bioconversion de la biomasse.

En raison de rôle de cellulase dans la dégradation des fibres lignocellulosique, elles sont utilisées dans la nutrition animale comme un supplément dans l'alimentation du bétail afin de faciliter le processus de digestion (**Ouali et Tidjet, 2012**).

## I. 7. Microorganismes producteurs de cellulase

### I. 7.1. Champignons

Les champignons filamenteux sont parmi les producteurs les plus courant de ce type d'enzyme, ils pénètrent dans la biomasse lignocellulosique formant des hyphes, ces hyphes emprisonnent alors la cellulase produite à travers les cavités. Ce phénomène est connu sous le nom de système de cellulase non complexe, il permet de production de cellulase dans espace étroit ce qui assure une hydrolyse efficace (**Hardy, 2017**).

Parmi les espèces productrices de cellulase : *Hypocrea jecorina* (anamorphe de *Trichoderma reesei*) (**Acharya et Chaudhary, 2012**), *Trichoderma reesei*, *Trichoderma konijii*, *T. lignorum*, *Penecillium funiculosum* (**Bisaria et Ghose, 1981**).

### I. 7.2. Bactéries

Les microorganismes cellulolytiques sont rencontrés dans une grande variété de genres bactériens : *Cytophaga*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora* et *Ruminococcus* (**Ouali et Tidjet, 2012**).

*Clostridium thermocellum* est la bactérie cellulolytique la mieux connue et la plus étudiée (**Tchunden, 1990**) est une bactérie aérobie saprophyte permet de transformation direct de cellulose cristalline en éthanol (**Reffas, 2017**).

# Chapitre 2

## II. Définition du halo- tolérance

Le terme « halo tolérance » définit les microorganismes qui croissent en présence de chlorure de sodium NaCl, des fois il est difficile de définir l'halophilisme à cause de plusieurs facteurs tels que la température ; la présence ou l'absence de différents types de sels ; la concentration de certains éléments qui ont un effet sur la réponse des bactéries au NaCl (**Saker, 2018**).

Les bactéries nécessitent moins de 1% (w/v) de concentration de sel pour leur multiplication sont considérées comme des bactéries non halophile (**Saker, 2018**).

Il existe deux types majeurs d'environnement qui contiennent des milieux hyper salins ou le sel agit sur les microorganismes qui sont l'eau et le sol (**Kharroub, 2007**).

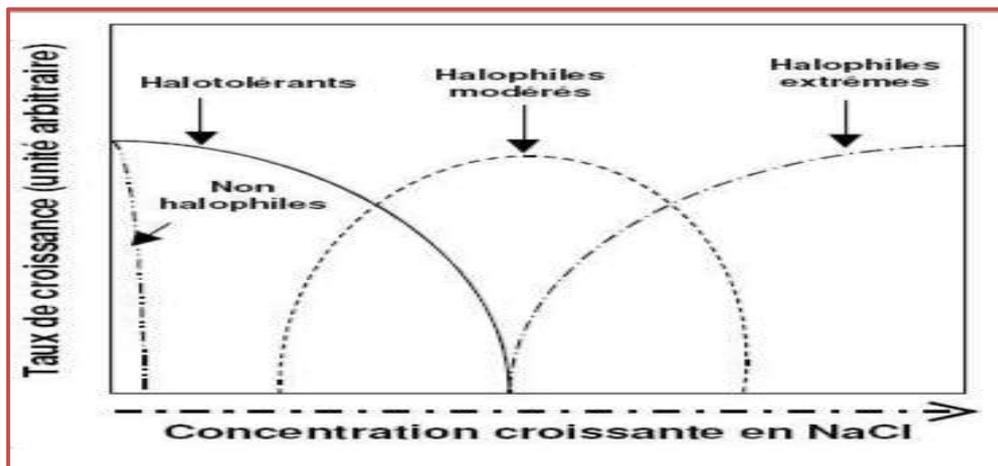
Tout d'abord on a les sols qui contiennent de 0,2% (p/v) de concentration de sel soluble on les trouve dans les zones sèches et arides (**Kharroub, 2007**).

L'eau salin est contenue de supérieure de 0,3% (p/v) de la salinité, on considère l'eau qui a des concentrations de sel minéraux supérieures à celle trouvée dans l'eau de mer comme des eaux hyper salines (**Kharroub, 2007**).

### II. 1. Micro-organismes halophiles

Les halophiles dont des microorganismes appartiennent aux 3 domaines du vivant : Archea ; Bactérie ; Eucarya. Qui multiplient et vivent dans des milieux riches en NaCl, ils sont classés en trois groupes selon leur exigence de sel pour leur croissance (**Khallef, 2019**). On a les halophiles extrêmes qui vivent en milieux hyper salins qui nécessitent une concentration entre 15 et 30% (p/v) (2,5 et 5,2 M) de NaCl pour leur optimum de croissance (**Bouras, 2016**). Les halophiles modérés multiplient de manière optimale quand la concentration de NaCl est entre 3 et 15% (p/v) (0,5 et 2,5 M) et les faibles halophiles qui ont besoin pour leur croissance maximale de concentration de sel entre 1% et 3% (p/v) (0,2 et 0,5 M). (**Bouras, 2016**) ; par contre les bactéries halotolérantes peuvent vivre dans des milieux qui ont des concentrations moyennes de NaCl mais il n'est pas obligatoire pour leur multiplication (**Kharroub, 2007**).

Parmi les microorganismes halophiles : *Natranaerobius thermophilus* est une bactérie halophile alcalo-thermophile, elle se multiplie dans des milieux de concentration optimum 3,3 et 3,9 M de sel, (Khallef, 2019) ; *Halobacteriaceae* qui sont des Archea halophile extrême se trouve dans les lacs alcalin hyper- salins et colorer les lacs en rouge à cause de pigment catenoïde en fore concentration de sel (Kharroub, 2007) et d'autre espèces *Actinopolyspora alba*; *Actinopolyspora erythraea* qui sont des halophiles modérées et leur concentration de NaCl pour leur croissance entre 0,5 à 2,5 (2,9-14,5%), *Halobacterium salinarium*; *Halococcus morrhuae* leur concentration de sel optimum pour leur croissance 2,5 à 5,2 (14,5-30%) (SAKER, 2018).



**Figure 2.** Différents microorganismes halophiles producteurs de cellulase (Kharroub, 2007).

## II. 2. Halophiles producteurs de cellulase

La dégradation de la biomasse lignocellulosique par cellulase dans le processus de prétraitement les liquides ionique et efficace pour cette processus et comme ces sont des sels liquides c'est ce qu'il faut produire des cellulases halophiles pour éviter des problèmes au cours de l'hydrolyse et saccharification de la lignocellulose (Gunny *et al.*, 2015) et parmi les microorganismes producteur de cellulase halophile.

### II. 2.1. Fungi

Les champignons sont parmi les microorganismes qui produisent l'extracellulase qui dégrade la biomasse lignocellulosique, divers espèces tel qu'*Aspergillus*, *Penicillium* et *Tridermoid* ( **Bano et al., 2019** ).

#### a). *Aspergillus flavus*

Est un fungi appartient de genre *Aspergillus*, ce sont des colonies de couleur vert-jaune avec une marge blanche de 1à2 mm, peut produire des aflatoxine de type  $\beta$  et acide cyclopiazonique ( **Makhlouf, 2019** ), il peut produit des enzymes qui ont un intérêt industrielle comme enzyme de cellulase.

Ces champignons sont considérés comme des producteurs de cellulase dont la masse a été estimée à 55kda ou la CMC (carboxymethylcellulose) qui est utilisé comme substrat pour déterminer l'activité spécifique d'enzyme laquelle il a été constaté que cellulase qui purifié d'après *Aspergillus flavus* a une affinité avec CMC ( **Bano et al., 2019** ).

#### b) *Aspergillus terrus* Uni MAP AA6 6

*Aspergillus terrus* Uni Map AA.6 est une nouvelle souche identifier et ajouté au base de donné Gene Bank sous le numéro KF364668. Elle a la capacité de s'adapter aux milieux riche en NaCl et elle produit le cellulase halophile qui présente une activité maximale a des concentration élevées de NaCl (15%) ( **Gunny et al., 2015** ).

### II. 2.2. Les bactéries

#### a) *Halocella cellulolytica* (Z-10151(=DSM7362)

Est une bactérie appartient de famille *haloanaerobiaceae* de genre *halocella*, sont des colonies bâtonnet, non sporulent à gram négative, mobile à l'aide de pétriche flagellé, mésophile sa température optimale pour leur croissance est 39(°c). Elle multiplie de manière optimale à 15% de NaCl. On les trouve au niveau de sédiment anaérobie et dans les lacs et ont de salinité variable ( **Simankova et al., 1993** ).

# **Partie expérimentale**

# **Chapitre 3**

## **Matériel et méthodes**

### **III. Isolement**

#### **III.1. Echantonnage**

Les microorganismes halophiles ont plusieurs source pour isolement tel que les sol salin (**Hakobyan et al., 2013**), (**Yu et Li, 2015**), (**Li et al., 2012**) et l'eau de mer (**Hirasawa et al., 2006**), sédiment marin (**chen et Liu, 2013**), (**Annamalai et al., 2011**), saline solaire artificielle (**Bano et al., 2019**).

##### **III.1.1. Prélèvement d'échantillon de sol**

L'isolat halophile a été prélevé à partir de sol salin de lac de Van qui se trouve en Anatolia oriental en Turquie, l'échantillon a été pasteurisé à température 80(°c) pendant 10min pour (**Aygan et al., 2011**) suivi l'identification de microorganisme halophile.

##### **III.1.2. Prélèvement d'échantillon de sédiment salin**

Les échantillons ont été collectés à partir de sable salin et boue salin et de saumure qui se trouve au niveau de sédiment salin situé dans l'île de Xiangishan où la température était entre 20(°c)-3(°c) et le pH des échantillons prélevés entre 6,4 et 8,2 où les échantillons isolé ont été dans des récipient en plastique stérile et laissés pendant 18h (**Chen et Liu, 2013**).

#### **III.2. Sélection des microorganismes halophiles producteurs de cellulase**

Après les prélèvements des échantillons à partir de sol de szut- seu qui un ancienne salin contenant 7,5% (p/v) de sel situé au sud de Taiwan, ont été dissous le sédiment de sol salin dans l'eau distillé stérile après dilué en série des solution de 5,10,15(p/v) de NaCl puis ont été étale sur plaque de milieu salin enrichi par 0,5% extrait de levure, 0,5% acide casaminé, 0,5% MgSO<sub>4</sub>, 0,3% de citrate trisodique, 7H<sub>2</sub>O, 0,2% KCl, 5% de chlorure de sodium, 0,5% (p/v) de substrat de carboxyméthyl –CMC puis sont été ajouté l'agar a pH 7 qui a été modifié en ajoutant 1M de KOH. Après on suivi par coloration de rouge de Congo, décoloré avec 0,1% de NaCl pour sélectionné les colonies qui entouré avec une zone clair (**Wang et al., 2009**).

### **III.2.1. Identification des microorganismes**

#### **III.2.1.1. Identification morphologique et biochimique**

Identification morphologique a été effectuée par ensemencement des isolats sur un milieu gélosé et incubé pendant 24h puis ont été observé les caractères morphologiques sur microscope tel que la mobilité, formation de spore .... Par contre identification biochimique ont été réalisé par des tests conventionnelle comme test catalase et oxydase, production H<sub>2</sub>S, coloration de gram, fermentation de glucose ...etc (**chen et Liu, 2013**).

#### **III.2.1.2. Identification moléculaire**

Pour identification précise des isolats ont été utilisé ont été utilisé amplification du gène ARNr16s. Tous d'abord ont été purifié ADN puis ont été extrait les acides nucléiques à l'aide du kit ensuite ont été utilisé deux amorces universelles qui sont 9F et 1492R qui s'hybrident spécifiquement avec gène ARNr16s après les amplicons ont été séquencé et comparé avec résultats de base de donné NCBI (**Wang et al., 2009**).

### **IV. Production de cellulase**

Les isolats ont été cultivé dans un milieu qui contenant 10g /l du substrat CMC, 5g/l de peptone, 5g/l extrait de levure, 1g/l du KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et de 10%(P/v) de NaCl. Ont été réglé le pH initiale de milieu à 10 après autoclavage par addition de 10% de Na<sub>2</sub>co<sub>3</sub>, dans un agitateur ont été placé les cultures qui sont été multiplié a 200tr a 37c° puis ont été éliminé des cellules par centrifugation et récupéré le surnageant pour autre travail (**Aygan et al., 2011**).

#### IV.1. Dosage enzymatique par DNS

Pour mesurer l'activité enzymatique de cellulase ont utilisé le méthode de DNS. Dans un 1ml de tampon de phosphate 0,1M ont été dissous 2% de carboxyméthylase (CMC) puis ajouté 0,1 ml de solution enzymatique de cellulase et 200g/l de NaCl a pH=10 et incubé a 60(°c)pendant 10min , après arrêté la réaction par addition de 3ml de réactif 3,5 DNS puis ont été posé les tubes dans un bain d'eau bouillante pendant 5min après ajouté une autre fois 10ml d'eau distillé et mesuré l'intensité de l'absorbance ont été mesuré à 540nm par spectrophotomètre UV-VIS . L'unité d'activité enzymatique (U) est définie par la quantité de cellulase nécessaire pour produit 1µmol de glucose par 1min (**Bano et al., 2019**).

#### IV.2. Effet de source de carbone sur la production et l'activité de cellulase

pour déterminer de différente source de carbone sur la production de cellulase ont été cultivé l'isolat dans un flacons contenant un milieu salin puis ajouté de concentration 5% de chacun de source de carbone suivant : saccharose, avicel, arabinose, glucose, cellulose, xylène de bios de Bouleau, xylène d'épeautre d'avoine puis ont été mettre la solutions dans un agitateur et incubé a 37(°c) pendant 72h , après la multiplication ont centrifugé la solution à 4(°c) et 10,000 × g pendant 20min ensuite ont été récupéré le surnagent pour estimation de l'activité de cellulase (**Wang et al., 2009**).

#### IV.3. Effet de pH sur l'activité et stabilité de cellulase

Pour déterminer la pH optimale de l'activité de cellulase, ont été cultivé un mélange réactionnel avec de concentration 50mM de chacun de ces solutions tampon qui ont de différents degrés de pH : citrate de sodium a pH (3-6), phosphate de sodium a pH ( 6-8), glycine -NaOH (9-11), NaOH(12-13) puis incubé le bouillon réactionnel a 50c° pendant 1h, puis ajouté 10 L de solution enzymatique de cellulase avec 190 l de les solutions tampons qui nous avons ajouté au mélange réactionnelle et incubé pendant 24h pour tester la stabilité de structure de cellulase (**Annamalai et al., 2013**).

#### **IV.4. Effet de température sur l'activité de cellulase**

Pour tester la stabilité de température pendant l'activité de cellulase ont été mélangé une solution de cellulase avec divers concentration de sel (1 à 3M) à différentes degré de température de 4 jusqu' à 90(°c) ont été déterminé l'activité de cellulase après 1h d'incubation (**Gunny *et al.*, 2014**).

#### **IV.5. Effet de différents sels sur l'activité de cellulase**

Pour déterminé l'effet de différente sels sur l'activité de cellulase ont étéensemencé l'isolat dans un bouillon CM contenant de concentration 1%(v/w) de substrat ccarboxyméthylcellulose puis mettre le dans un agitateur et incubé à 37(°c) puis mesuré l'activité se cellulase par spectrophotomètre après ajouté des différente de concentration de divers sels tel que : KCl, NaCl, NaNo3, Na2so4, citrate de sodium et incubé à 37c° pendant 60h après ont été centrifugé la solution de culture 10,000 g pendant 12min à 4 c° puis ont été récupéré le surnagent et doser dans un spectrophotomètre pour estimer l'activité de cellulase (**Yu et Li, 2015**).

#### **IV.6. Effet des ions métalliques et détergents sur l'activité de cellulase**

Parmi les composants qui affectent l'activité de cellulase les ions métalliques et détergents pour cela ont été mélangé une solution réactionnelle avec des ions métalliques et différentes types de détergents tel que : SDS, desoxycholate de sodium, le triton x -100, le tween 80 ont concentration 0,5 ( w/v) et quelque détergents commercial comme Ariel, Henko, Rin, Tide puis incubé pendant 30min après mesuré l'activité de la réaction enzymatique de cellulase ( **Annamalai *et al.*, 2011**).

#### **IV.7. Effet de NaCl sur l'activité et stabilité de cellulase**

Au but de détermination la stabilité de cellulase dans milieu salin, ont été mélangé la cellulase avec une solution tampon citrate de concentration 0,05M à pH 4,8 puis ajouté différente concentration de NaCl de 0 jusqu'à 20% et incubé a 30(°c) (**Gunny *et al.*, 2014**).

# **Chapitre 4**

## **Résultats et discussions**

## V. Isolement des microorganismes halophiles producteur de cellulase

Cette étude basée sur la recherche sur des microorganismes qui présentent des nouvelles sources qui peuvent produire cellulase dans les conditions halophiles sont les bactéries et les champignons ce dernier étant principale source de production extra-cellulase (**Bano *et al.*, 2019**).

Ont été isolé ces microorganismes à partir de sol salin après la coloration avec rouge de Congo la formation de halo clair autour de colonie sur plaque d'agar ce que signifie que l'isolat produit de quantité importante de cellulase qui dégrade le substrat CMC et formé la zone clair (**Wang *et al.*, 2009**).



**Figure .3** formation la zone clair après coloration par rouge de Congo qui présente activité enzymatique (**Trivedi *et al.*, 2011**).

### V.1. Identification des microorganismes halophiles

L'isolat a été identifié morphologiquement et biochimiquement les résultats sur tableau 1, il a été déposée dans la base de donnée de Gene Bank sous le numéro EF541484 par la détermination de la séquence moléculaire du gène ARNr16s et en la comparant avec d'autre gène d'ARNr16s qui se trouve sur cette base de donnée. Le résultat montre qu'il y a une grande similarité entre la séquence de gène d'ARNr16s d'isolat et gène d'ARNr16s de

*Salinivibrio budaii* (numéro d'accès EF583688) donc cette souche était déterminé comme une souche de genre *Salinivibrio* sous le nom *Salinivibrio* sp NTU05 (Wang *et al.*, 2009).

D'après les résultats de nombreuses études, il a été constaté que les souches de genre *Salinivibrio* sont considérées comme l'une des bactéries halophile modérées et leur capacité à produire de cellulase dans des conditions difficiles et c'est ce qui les a rendues d'une grande importance dans la biotechnologie industrielle ( Ashengroph , 2017).

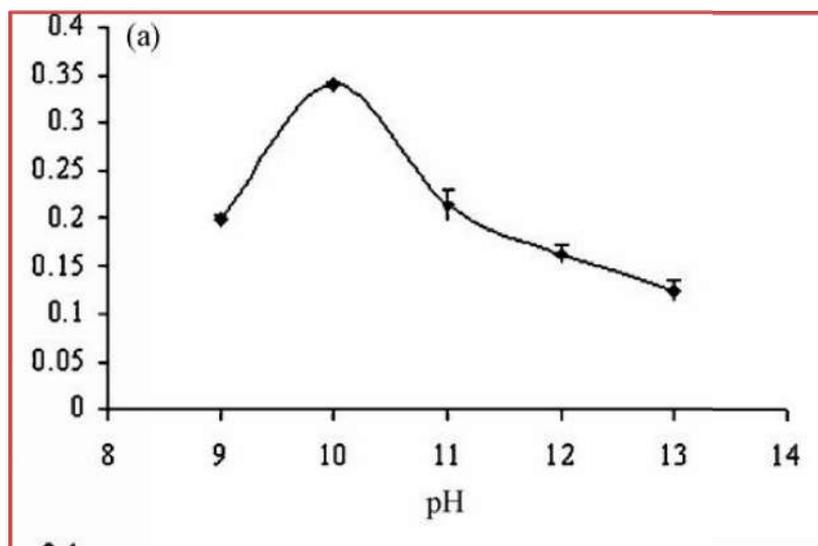
**Tableau1.** Caractère morphologique et biochimique de *salinivibrio* sp. NTU05 (Wang *et al.*, 2009).

Caractère	<i>Salinivibrio. sp</i>
Forme de spore	Tige courte et incurve
taille de cellule (m)	0,4-0,6*0,8-2,0
spore	-
Coloration de gram	-
pigmentation	Blanc crème
croissance anaérobie	-
Catalase	+
oxydase	+
Réduction de nitrate	+
Production H <sub>2</sub> S	-
motalité	motile
Hydrolyse de caséine	+
Hydrolyse de gélatine	-
Fermentation de galactose	+
Fermentation de glucose	+

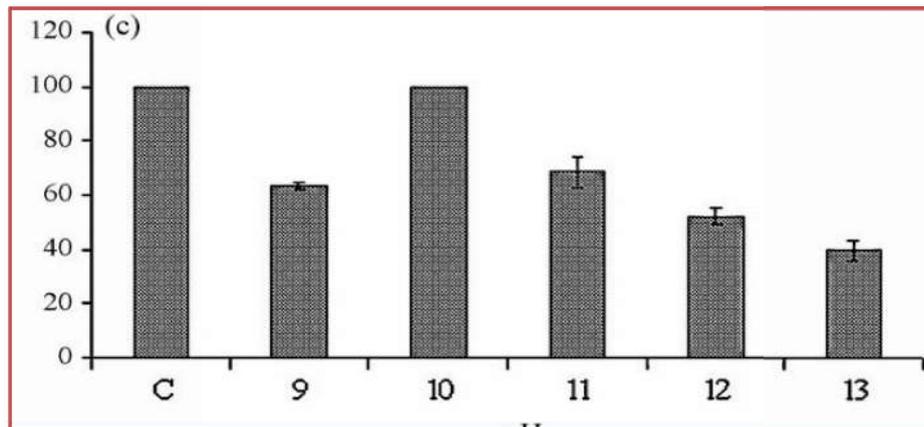
## VI. Meilleures conditions pour production de cellulase halophile

### VI.1. Effet pH sur l'activité et stabilité de cellulase

D'après les résultats des fig.4, l'activité enzymatique de cellulase augmente au maximum (0,35 U/ml) au pH10 et à partir de fig.5 montre que la cellulase conserve sa pleine activité(100%) dans cette degré de ph pendant 30min après l'incubation et reste stable pendant la plage de pH de 8 à 12 cela indique que la structure d'enzyme n'a pas détruite pendant cette plage donc *Bacillus flexus* est parmi les *Bacillus alcaliphile* et halotérant qui produit cellulase tolérant aux pH alcalin . les études actuelle sont basé sur des rapport antérieurs sur des microorganisme productrices de extra-cellulase tolérant au ph alcalin tel que *Marinobacter* sp. Ms 1032 et *Bacillus* sp- HsH-810, *Vibrio*-sp G21, qui caractérise de plage de pH 1 à 6 et leur capacité de croissance au cette plage de pH (Trivedi *et al.*, 2011).



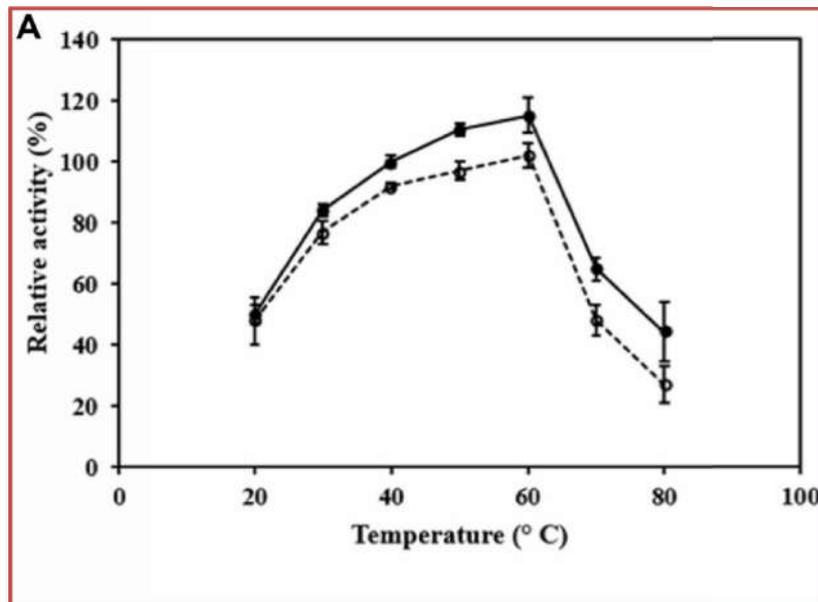
**Figure 4.** Effet de pH sur l'activité de cellulase de *Bacillus flexus* (Trivedi *et al.*, 2011) .



**Figure 5.** Effet de pH sur la stabilité de cellulase de *Bacillus flexus* (Trivedi *et al.*, 2011) .

#### VI.2. Effet de température sur l'activité et stabilité de cellulase

Le résultat de fig.6 indique que l'activité de cellulase augmente au maximum jusqu'au degré de température optimale 60°C et *Bacillus* sp22 produit cellulase qui conserve leur activité 100%, cette température plus conserve 30% de l'activité à des températures plus élevées 80°C) et quand ont été incubé 1h sous différentes températures, la cellulase conserve leur stabilité de 40% à 70°C) (Dos Santos *et al.*, 2018). Sur la base de ce résultat et d'études précédentes, il a été montré que cellulase purifiée à partir de plusieurs microorganismes halophiles sur milieux salins tels que : *Aspergillus terreus* uniMap A-66, *Gracibacillus* et *B. agoradhaerens*, *Streptomyces* sp.S36.2 capable de maintenir son activité et sa stabilité à des températures plus élevées, cela peut être dû à l'augmentation des charges à la surface de l'enzyme ce qui entraîne des modifications sur la membrane cytoplasmique, ce qui conduit à l'adaptation de cellulase aux températures élevées et devient une enzyme thermostable (Gunny *et al.*, 2014).



**Figure 6.** Effet de température sur l'activité de cellulase (circule fermé)

Et stabilité (circule ouverte) purifié à partir de *Bacillus* sp. SR22 (Dos Santos *et al.*, 2018) .

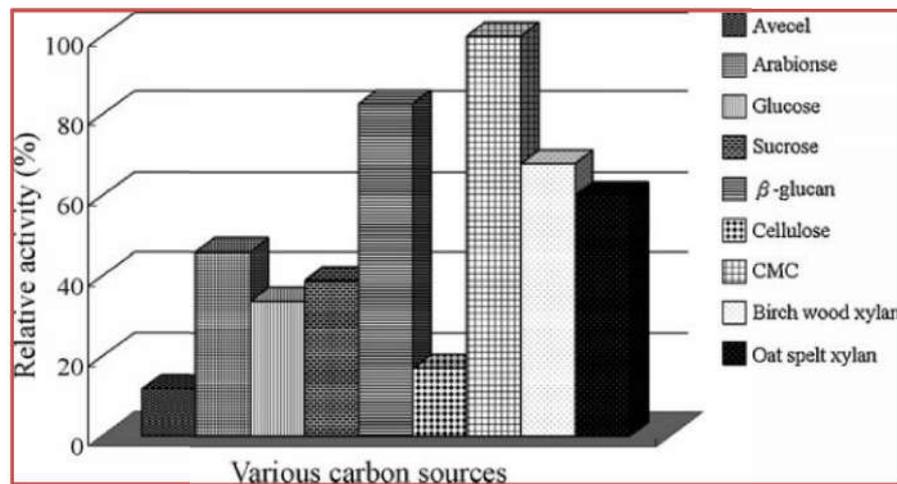
### VI.3. Effet de source de carbone sur la production et l'activité de cellulase

Après l'utilisation de différente de source de carbone a concentration 0,5% , après incubation les résultat présente sur fig.6 qui indique que l'activité de cellulase étaient maximum de pourcentage 100% pour le substrat CMC avec de pourcentage 83% d'activité enzymatique remarquée pour le B-glucane , par contre le xylane de Bouleau et xylane d'épeautre d'avoine l'activité de cellulase était moyenne environ 60% et 68% , pour Avicel l'activité enzymatique de cellulase était très faible , elle était estimé 30% (Wang *et al.*, 2009).

Ces résultats démontrent que CMC et B-glucane sont les meilleures sources de carbone pour l'activité de cellulase, ces résultats sont très proche des résultats de tab. 2 qui indique que l'activité de cellulase est plus élevée pour substrat CMC ( $100 \pm 1,7$ ) après cellulobiose ( $2,8 \pm 24,6$ ) et il n'a pas décomposé Avicile (cellulose cristalline) et cellulose (poudre) qui sont difficile à dissoudre (Annamalai *et al.*, 2013), grâce à l'activité de

cellulase, il possible de divisée les types de substrat en fonction de leur solubilité donc la cellulase est plus active sur substrat soluble et difficile d'hydrolyser substrat insoluble donc cela indique que la production maximale de cellulase nécessite des polysaccharide (sucre simple) et des substrat soluble( **Wang et al., 2009**).

Aussi plusieurs études ont montré que notamment Chez champignons halophile *Aspergillus terreus UniMap AA-6* la production élevée de cellulase en présence de CMC indique que substrat stimule la production de cellulase en activant la protéine CAM (molécule Activatrice de cellulase) qui est un régulateur de cellulose (**Gunny et al., 2015**).



**Figure 7.** Effet de différentes sources de carbone sur la production de cellulase purifié à partir de souche *Salinivibrion.sp NTU-05* (**Wang et al., 2009**).

#### VI.4. Effet de différents sels sur l'activité de cellulase :

Après l'incubation mélange réactionnel avec différentes et à partir de résultat de tab.3 ont été observé une augmentation de production de cellulase, en présence de NaCl à une concentration de 10% ou l'activité enzymatique a été estimé à (107,8 U /ml-1) et la production de cellulase en présence de KCL atteignant environ (79 U / ml-1) mais ne présence de Na2so4 et citrate de sodium une faible production de cellulase a été observé (5,1U/ml-1)(4,4 U /ml-1), pour NaNo3 il n'y a pas eu de production de cellulase (**Yu et Li, 2015**).

Donc les microorganismes halophile ne peuvent pas croitre et fabriquer des enzymes hydrolyse la biomasse lignocellulosique tel que cellulase sauf en présence de sel qui l'une des conditions pour leur multiplication.

**Tableau 2.** Présente effet de différents substrats sur cellulase purifié à partir *B. halodurans* CAS 1 (Annamalai *et al.*, 2013).

Substrat	Activité relative
Avicel	-
CMC	100 ± 1,7
cellobiose	24,6 ± 2,8
cellulose	-
PNPG	-
Xylane	16,4 ± 1,3

**Tableau 3.** Effet de différents sels sur la production de cellulase de *Gracilibacillus* sp. SK1 ( Yu et Li, 2015).

sel	croissance	activité
NaCl		
5%	Ɔ	15.3 ± 0.3
10%	Ɔ	107.8 ± 2.4
15%	Ɔ	59.2 ± 1.6
20%	Ɔ	12.4 ± 0.4
Kcl		
5%	Ɔ	6.3 ± 0.1
10%	Ɔ	79.0 ± 1.2
15%	Ɔ	30.1 ± 1.2
20%	Ɔ	10.1 ± 0.2
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		
5%	Ɔ	4.4 ± 0.1
10%	Ɔ	57.5 ± 0.9
15%	Ɔ	21.1 ± 0.8
20%	e	0
NaNO <sub>3</sub> (5%e20%)	Ɔ	e

Sodium citrate	P	6.3 ± 0.2
5%	P	12.1 ± 0.3
10%	P	5.1 ± 0.3
15%	e	0
20%		

### VI.5. Effet des ions métalliques et détergents sur l'activité de cellulase

Après l'incubation de cellulase avec différentes ions métalliques tel que : ( $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  et  $Mg^{2+}$ , les résultats dans le tab. 4 qui montre que l'activité de cellulase était très élevée en présence d'ions métalliques, où l'activité atteignait 99% en présence de  $Ca^{2+}$ , puis il a été réduit et inhibé par  $Hg^{2+}$ . En présence de EDTA et PMSF (un modificateur de sérine) il y a une inhibition de l'activité de cellulase ou elle a perdu 80% de son activité ce qui indique que le sérine est parmi les acides aminés qui composent le site actif de cellulase, cela indique que cellulase est une métallo-enzyme (Yu et Li, 2015). Ces résultats sont similaires dans de nombreux microorganismes halophiles y compris *Bacillus sphaericus* (Li et al., 2012), *Bacillus. sp* (Annamalai et al., 2011).

Donc ce résultat montre que les bactéries halophiles produisent la cellulase halotolérante qui se caractérise par des propriétés qui l'aident à mettre en évidence son activité dans des conditions inappropriées, comme c'est une métallo-enzyme donc la présence des ions métalliques n'affecte pas son activité cela est dû à la présence des sites spéciaux sur les ions métalliques n'affecte pas son activité cela est dû à la présence des sites spéciaux sur la structure d'enzyme pour ces ions.

Cela signifie que les ions stimulent l'activité de cellulase halophile (Gunny et al., 2015).

**Tableau 4.** Effet des ions métalliques et réactif chimique sur l'activité cellulase (Yu et Li, 2015).

<b>substrat</b>	<b>Concentration (mM)</b>	<b>Activité résiduelle(%)</b>
control	e	100
Ca <sup>2p</sup>	5	98.9 ± 1.2
Zn <sup>2p</sup>	5	96.1 ± 1.1
Fe <sup>2p</sup>	5	92.7 ± 1.2
Fe <sup>3p</sup>	5	94.5 ± 0.7
Cu <sup>2p</sup>	5	91.2 ± 1.3
Mn <sup>2p</sup>	5	82.5 ± 1.2
Mg <sup>2p</sup>	5	97.1 ± 1.5
Hg <sup>2p</sup>	5	21.9 ± 0.6
EDTA	5	17.9 ± 0.8
PMSF	5	10.1 ± 0.3

DEPC	5	92.7 ± 1.2
PAO	5	88.6 ± 0.9
b-Mercaptoethanol	5	82.3 ± 1.1

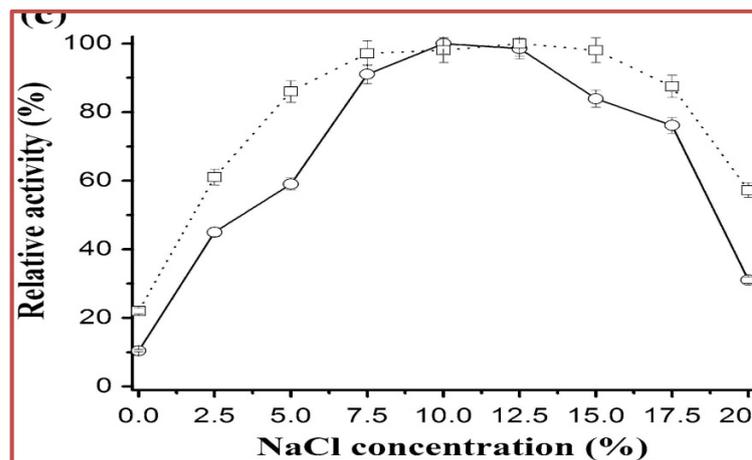
La cellulase a également montré une activité importante et stable en présence de détergent commerciaux, où en présence de Rin l'activité enzymatique était de 83%, en présence d'Ariel l'activité atteignait 58%, comme pour Henko et Ted l'activité était de 72% et 61%, respectivement. Cela confirme que cellulase ne doit pas perdre son activité dans l'industrie de détergents en présence de détergents commerciaux, cette caractéristique la distingue des cellulase précédentes et cela en fait un candidat pour une utilisation comme un additif efficace dans le traitement de cellulase (**Annamalai et al., 2011**).

### VI.6. Effet de NaCl sur l'activité de cellulase

Plusieurs concentration de NaCl de 0 à 20% (p/v) ont été utilisé a fin déterminer son effet sur la l'activité de cellulase. Fig. 7 montre une augmentation maximal significative de l'activité de cellulase en présence 10% NaCl (concentration élevée) où son activité atteignait le maximum 100 % donc il y a une production maximal de cellulase purifié de *Thalassobacillus* cela signifié sa nature halotolérante (Li *et al.*, 2012).

Pour déterminer la stabilité de cellulase ont été incubé l'enzyme avec différents concentration de NaCl à 30(°c) pendant 24h, d'après les résultats dans fig.7 et l'enzyme maintient plus 80% de son activité et reste stable puis l'activité augmente à la concentration jusqu'à atteindre 100% mais en absence de NaCl l'activité de cellulase est plus faible ce que montre que cellulase nécessite de sel pour leur activité et son stabilité. Donc le cellulase halotolérant est important pour les applications biotechnologiques qui nécessitent haute salinité ou des pressions osmotiques (Li *et al.*, 2012).

A partir des études qui ont suggéré que la stabilité de l'activité de cellulase à des concentrations élevées de sel pourrait être causée par la présence d'acide aminé en excès sur surface de cellulase qui empêche l'agrégation avec des particules de sel pendant la réaction (Gunny *et al.*, 2014).



**Figure 8.** Effet de différente concentration de NaCl sur l'activité de cellulase (ligne solide) et stabilité (pointillé) purifié à partir de *Thalossobacillus* sp. LY18 (Li *et al.*, 2012) .

# **Conclusion**

Ce travail concerne l'isolement des souches bactériennes et des certaines espèces de champignons productrice de cellulase à partir des sols salins et sédiment à partir des lacs salin et montré l'importance de l'optimisation des conditions pour une meilleure production de cellulase.

Ont été isolé une souche à partir de sol salin et sélectionner sur un milieu liquide enrichi au extrait de levure et acide casiminé et chlorure de sodium et contient 15% NaCl et CMC la souche qui montre une activité élevée de cellulase, cette souche est halophile appartiendrait au genre *Salinivibrio* qui montre une similarité avec souche type espèce *Salinivibrio budii*, ce dernier est une nouvelle espèce de *Salinivibrio* sous le nom *salinivibrio.sp* NTU05.

Dans ce travail ont été étudié différentes paramètres tel que la température et pH sur l'activité et production de cellulase. Dans une température de 60(°c) il y a une activité maximum de cellulase cela signifie que *Bacillus sp22* produit cellulase et à pH 10 il y a une production de cellulase à partir de *Bacillus flexus* ce qui montre que cellulase halophile à des caractéristiques thermostable et alcalophile. Dans une concentration élevée de 10% de NaCl il y a une activité optimale de cellulase purifié à partir de *Thalassobacillus*, cellulase montre une stabilité avec différentes ions métallique et détergents, une production élevée de cellulase a été observer avec CMC,  $\beta$ -glucane et cellulobiose cela signifié qui sont les meilleurs sources de carbone pour production de cellulase.

**Référence**

**Bibliographie**

Acharya, S., Chaudhary, A. (2012). Bioprospecting thermophiles for cellulase production. *a review*. Brazilian Journal of Microbiology, 43(3), 844-856.

Annamalai, N., Rajeswari, M. V., Elayaraja, S. et Balasubramanian, T. (2013). Thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus halodurans* CAS 1 by conversion of lignocellulosic wastes. Carbohydrate polymers, 94(1), 409-415.

Annamalai, N., Thavasi, R., Vijayalakshmi, S., Balasubramanian, T. (2011). A novel thermostable and halostable carboxymethylcellulase from marine bacterium *Bacillus licheniformis* AU01. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27(9), 2111-2115.

Ashengroph, M. (2017). *Salinivibrio costicola* GL6, a novel isolated strain for biotransformation of caffeine to theobromine under hypersaline conditions. Current microbiology, 74(1), 34-41.

Aygan, A., Karcioğlu, L., Arıkan, B. (2011). Alkaline thermostable and halophilic endoglucanase from *Bacillus licheniformis* C108. African Journal of Biotechnology, 10(5), 789-796.

Badrina, L. (2017). Création d'enzymes multimodulaires à façon dédiées à la dégradation de substrats complexes. (Doctoral dissertation, INSA de Toulouse).

Ballerini, D., Lome, D., Prieur, A. (2011). Les ressources en la biomasse lignocellulosique. In: Les biocarburants: répondre aux défis énergétiques et environnementaux des transports (éd. Tchénip 25 rue Ginoux 75015 Paris). Paris, France, p:189

Bano, A., Chen, X., Prasongsuk, S., Akbar, A., Lotrakul, P., Punnapayak, H., ... et Ali, I. (2019). Purification and characterization of cellulase from obligate halophilic *Aspergillus flavus* (TISTR 3637) and its prospects for bioethanol production. Applied biochemistry and biotechnology, 189(4), 1327-1337.

Bensmira, S. (2006). Isolement et caractérisation de souches fongiques de milieux extrêmes (sol et sebkha de la région de Biskra) productrices de cellulase thermostable à intérêt industriel. Doctoral dissertation, Université Mentouri - Constantine, Constantine.

Bisaria, V. S., Ghose, T. K. (s.d.). Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme and Microbial Technology*, 3(2), 90-104.

Boukari, I. (2010). Définition des critères d'efficacité d'une hémicellulase pour l'hydrolyse de substrats lignocellulosiques complexes et insolubles. Doctoral dissertation, Université de Reims Champagne Ardenne.

Bouras, B. (2016). Mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires de microorganismes halophiles et halotolérants des environnements hypersalins sahariens. Doctoral dissertation, Université Frères Mentouri Constantine .

Chambon, F. (2011). Transformation de la cellulose par catalyse hétérogène. Doctoral dissertation, Université Claude Bernard-Lyon I, Lyon.

Chauve, M. (2011). Modélisation cinétique de l'hydrolyse enzymatique des substrats cellulose. Influence de la structure et morphologie du substrat. Doctoral dissertation, L'université de Grenoble.

Chen, W. Q., Liu, Y. Y. (2013). Isolation and identification of *Halomonas* sp. ZSCW-10: a moderately halophilic bacteria strain with cellulase activity. (T. T. Ltd, Éd.) In *Advanced Materials Research*, 749, 236-241.

Desvaux, M. (2001). La fermentation de la cellulose par *Clostridium cellulolyticum*: métabolisme modèle d'un *Clostridium* cellulolytique mésophile. Doctoral dissertation, Université Henri Poincaré-Nancy 1.

Didderen, I., Destain, J., Thonart, P. (2010). La production de bioéthanol à partir de biomasse lignocellulosique. *Forêt. Nature*(104), 43-49.

Djaafri, M. (2020). Amélioration de la digestion anaérobie des déchets organiques dans un digesteur en continu. Université Abd el Hamid Ibn Badis Mostaganem Algéria, Mostaganem .

Dos Santos, Y. Q., De Veras, B. O., De Franca, A. F. J., Gorlach-Lira, K., Velasques, J., Migliolo, L., Dos Santos, E. A. (2018). A new salt-tolerant thermostable cellulase from a marine *Bacillus* sp. strain. *Journal of microbiology and biotechnology*, 28(7), 1078-1085.

Gahfif, O., Souaghi, Y., Azzouz, Z., Nouari, S., Amghar, Z. A. Z., Boucherba, N., ... et Bettache, A. (2020). Isolation and Screening of Fungal Culture Isolated From Algerian Soil for the Production of Cellulase and Xylanase. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 10(5-s), 108-113.

Gunny, A. A. N., Arbain, D., Gumba, R. E., Jong, B. C., Jamal, P. (2014). Potential halophilic cellulases for in situ enzymatic saccharification of ionic liquids pretreated lignocelluloses. *Bioresource technology*, 155, 177-181.

Gunny, A. A. N., Arbain, D., Jamal, P., Gumba, R. E. (2015). Improvement of halophilic cellulase production from locally isolated fungal strain. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(4), 476-483.

Hakobyan, A., Panosyan, H., Trchounian, A. (2013). Production of cellulase by the HaloAlkalophilic strains of *Stryptomyces* isolated from saline Alkaline soils of ARARAT plain, Armenia. *ЕСТЕСТВЕННЫЕ НАУКИ*, 2(21).

Hardy, N. (2016). Identification des critères d'extrapolation du procédé de production de cellulases par *Trichoderma reesei* en utilisant l'approche «scale-down». Doctoral dissertation, Université Paris-Saclay, Paris.

Hirasawa, K., Uchimura, K., Kashiwa, M., Grant, W. D., Ito, S., Kobayashi, T., Horikoshi, K. (2006). Salt-activated endoglucanase of a strain of alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 89(2), 211-219.

Khallef, S. (2019). Etude de la flore bactérienne halophile cultivable des zones humides de Ouargla (Algérie). Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri.

Kharroub, K. (s.d.). Identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebkha Ezzemoul (Ain M'Lila). Doctoral dissertation, PhD thesis, Mentouri University, Constantine, Algeria, (in French).

Khelfa, A. (2009). Etude des étapes primaires de la dégradation thermique de la biomasse lignocellulosique. Doctoral dissertation, Université Paul Verlaine-Metz, France.

Khelil, O. (2017). Production de cellulase et d'enzymes associées par des souches de *Bacillus*. Doctoral dissertation, Université Mohamed Boudiaf des sciences et de la technologie, Oran.

Li, X., Wang, H. L., Li, T., Yu, H. Y. (2012). Purification and characterization of an organic solvent-tolerant alkaline cellulase from a halophilic isolate of *Thalassobacillus*. *Biotechnology letters*, 34(8), 1531-1536.

Makhlouf, J. (2019). Caractérisation de la biodiversité des souches d'*Aspergillus* de la section Flavi isolées d'aliments commercialisés au Liban: approche moléculaire, métabolique et morphologique. Doctoral dissertation, Université de Toulouse .

Ouali, S., Tidjet, S. (2012). Production de cellulases par *Bjerkandera* sp et *Trichoderma reesei* par fermentation en milieu solide. Béjaïa, Faculté des sciences de la nature et de vie , Département de Microbiologie , Algérie.

Reffas, F. Z. I. (2017). Isolement et caractérisation de bactéries productrices de cellulase. Doctoral dissertation, Université Djilalli de Sidi Bel Abbès, Sidi Bel Abbès.

Reid, I. D. (s.d.). Biodegradation of lignin. (P.-C. John's Boulevard, Éd.) Canadian Journal of Botany, 73(S1), 1011-1018.

Saker, R. (2018). Recherche de nouveaux taxons d'actinobactéries halophiles des sols sahariens et potentialités antagonistes. Doctoral dissertation, Université Ferhat Abbas Sétif 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie .

Schomburg, D., Salzmann, M. (1991). cellulase . In: enzyme Handbook (Vol. IV ). (B. H. Springer, Éd.), p:1-4

Schüleïn, M. (1988). Cellulases of *Trichoderma reesei*. Methods in enzymology, 160, 234-242.

Simankova, M. V., Chernych, N. A., Osipov, G. A., Zavarzin, G. A. (1993). *Halocella cellulolytica* gen. nov., sp. nov., a new obligately anaerobic, halophilic, cellulolytic bacterium. Systematic and applied microbiology, 16(3), 385-389.

Tchunden, J. (1990). Cellulolyse Anaérobie Mésophile: étude de l'amélioration de la production de cellulases par *Cl. cellulolyticum* ATCC 35319 . Doctoral dissertation, Université Henri Poincaré-Nancy 1.

Trivedi, N., Gupta, V., Kumar, M., Kumari, P., Reddy, C. R. K., Jha, B. (2011). An alkali-halotolerant cellulase from *Bacillus flexus* isolated from green seaweed *Ulva lactuca*. Carbohydrate polymers, 83(2), 891-897.

Wang, C. Y., Hsieh, Y. R., Ng, C. C., Chan, H., Lin, H. T., Tzeng, W. S., Shyu, Y. T. (2009). Purification and characterization of a novel halostable cellulase from *Salinivibrio* sp. strain NTU-05. Enzyme and Microbial Technology, 44(6-7), 373-379.

Yu, H. Y., Li, X. (2015). Alkali-stable cellulase from a halophilic isolate, *Gracilibacillus* sp. SK1 and its application in lignocellulosic saccharification for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 81, 19-25.

# **Annexe**

## Annexe I

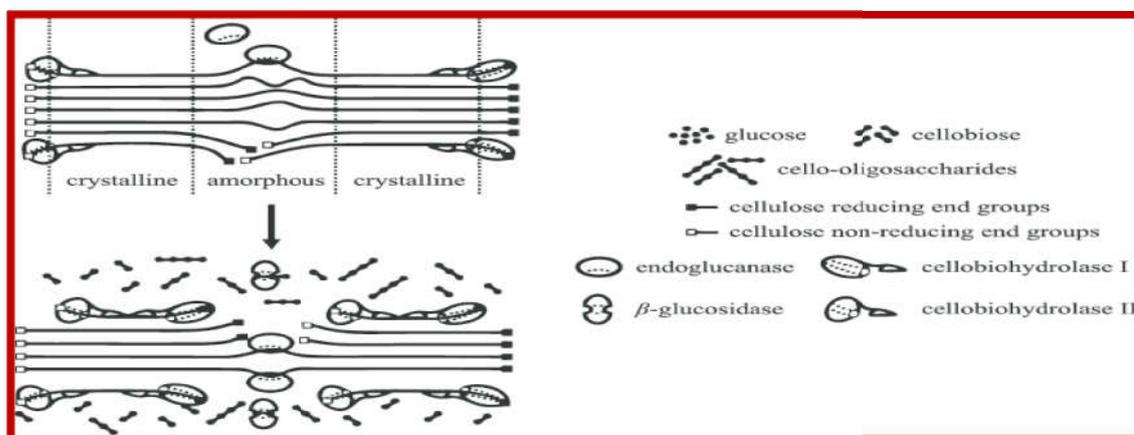


Figure présente mécanisme de de mode d'action de différentes familles de cellulases sur la cellulose.

## Annexe II

Tableau présente propriétés biochimique de certain cellulase

La souche	Température	pH optimum	Thermostabilité (°C)	Halostabilité (%)	Poid moléculaire (Kda)
Bacillus sp. VG1	65	9-10	60	ND	85
Bacillus sphaericus JS1	60	7.0	60	ND	42

Bacillus licheniformis AU0	50	9-10	70-80	20-30	35
Halophilic archaea	-	-	-	15	-
Bacillus subtilis subsp. subtilis A-53	50	6.5	50	ND	56
Bacillus amyloliquefaciens DL-3	50	9-10	70-80	20-30	33

ND : non déterminé

## Résumés

### ملخص

الهدف من هذا العمل هو عزل سلالات بكتيرية و فطريات المحبة للملح و القادرة على انتاج السليلاز و التي تم عزلها من خلال التربة المالحة او رواسب المياه المالحة من بين السلالات المنتجة للسليلاز ظهرت سلالة جديدة تنتمي الى *Salinivibrio* و التي سميت *Salinivibrio .sp NTU05* كما انه تمت دراسة مختلف العوامل التي لها تأثير على انتاج و نشاط الانزيم من اجل اجراء التحسين الامثل للحصول على عائد انزيمي افضل حيث تم ايجاد ان درجة الحرارة المثلى لنشاط الانزيم  $60(^{\circ}c)$  هذا ما يجعل الانزيم يتميز بخاصية الثبات الحراري و درجة الحموضة التي سجل فيها نشاط الانزيم عاليا هي 10 كما تم تحديد ان  $\beta$ -glucane و CMC و السيلوبيوز كأفضل مصدر للكربون كما ان السليلاز اظهر نشاطا عاليا عند تركيز 10% NaCl هذا ما يؤكد ان السليلاز قادر على التأقلم مع الاوساط الملحية

**الكلمات المفتاحية :** السليلاز ; المحبة للملح ; الثبات الحراري; التحسين الامثل ; *Salinivibrio sp. NTU05*

### Résumés

L'objectif de ce travail est d'isoler des souches de bactéries et espèce de champignons halophile capable de produire cellulase qui ont été isolées de sol salin ou de sédiments d'eau salée. Parmi les souches productrices de cellulase salin une nouvelle souche est apparue appartenant au genre *Salinivibrio* nommée *Salinivibrio .sp NTU05*. Différentes paramètres ont été étudiées afin d'effectuer une optimisation pour obtenir un meilleurs rendement enzymatique. Il a été constaté que la température optimale pour est  $60(^{\circ}c)$  c'est ce qui a rendu cellulase caractérisée par la thermo -stabilité et à pH 10 et CMC,  $\beta$ -glucane et cellulobiose sont la meilleure source de carbone. La cellulase présentait une activité élevée 10% NaCl ce qui confirme que cellulase est halotolérant capable s'adapter aux conditions salin.

**Mot clés :** cellulase ; halophile ; thermostabilité ; halotolérant ; bactéries ; champignons

### Abstract

The objective of this work is to isolate strains of bacteria and fungi halophilic capable of producing cellulose, which have been isolated from saline soils or salt water sediments. Among the strain producing halophile cellulase, a new strain appeared belonging to *Salinivibrio*, was named *Salinivibrio sp. NTU05*, various parameters were studied which have an effect on the production and activity of the enzyme, it was found that optimum temperature for activity of cellulase is  $60(^{\circ}c)$  what make cellulase characterized by thermal stability à pH 10 and CMC,  $\beta$ -glucane et cellulobiose was the best Carbone source and cellulase showed high activity in 10% of NaCl which confirms that cellulase able to adapt to salty conditions and have characteristic salt stability.

**Key word:** cellulase; halophilic; thermal stability, *Salinivibrio sp. NTU05*, salt stability