



## AVIS DE SOUTENANCE DE THESE

Le Doyen de la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz –Fès – annonce que

Mme (elle) : **TOUIJER Hanane**

Soutiendra : le 24/12/2021 à 15h

Lieu : Centre de Visioconférence

### Une thèse intitulée :

*Production des Cellulases par des Levures issues du microbiote intestinal d'un Insecte coprophage  
et de Son Biotope - Caractérisation- Optimisation-Utilisation-*

### En vue d'obtenir le Doctorat

FD : Molécules Bioactives, Santé et Biotechnologie (MBSB)

Spécialité: Biochimie et Biotechnologie

### Devant le jury composé comme suit :

	NOM ET PRENOM	GRADE	ETABLISSEMENT
<b>Président</b>	Pr BOUSTA Dalila	PES	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz - Fès
<b>Directeur de thèse</b>	Pr BEKKARI Hicham	PES	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz - Fès
<b>Rapporteurs</b>	Pr BELHAJ Abdelhak	PES	Faculté des Sciences - Meknès
	Pr HAMMANI Khalil	PES	Faculté Polydisciplinaire - Taza
	Pr GHAZAL Hassane	PH	CNRST-RabaT
<b>Examineurs</b>	Pr BENCHEMSI Najoua	PES	Faculté des Sciences et Techniques - Fès
	Pr JANATI IDRISSE Abdellatif	PES	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz - Fès
	Pr HAMDI Salsabil	PH	Institut Pasteur - Casablanca
<b>Invité</b>	Pr IAFAN Mohammed	PES	Université Sargodha –Pakistan

## Résumé :

Les cellulases représentent un des groupes d'enzymes pour lesquelles l'industrie porte une attention toute particulière grâce à leur grand potentiel biotechnologique et industriel (agroalimentaire, industrie du textile et des détergents...). La production des cellulases par les levures peut aussi contribuer à la biodégradation et la bioconversion des déchets lignocellulosiques (agricoles, forestiers) en sucre fermentescible pour la production de bioénergie renouvelable telle que l'éthanol.

Dans notre étude, nous avons établi une collection de 96 isolats de levures, isolées de niches écologiques variées ; tube digestif du Scarabéidé *G. sturmi* et de la bouse des ruminants, source de nourriture de cet insecte coprophage. 30 isolats TD et 24 isolats BR se sont avérés cellulolytiques. L'isolat *Mor-L11a*, le plus performant dans les tests qualitatifs, qui présente qualitativement la meilleure activité CMCCase avec la source de carbone FC (0,14 U/mL ; 1,75 U/mg) et une activité CMCCase importante sur milieu CMC (0,17 U/ml, 3,4 UI/mg), a été utilisé pour des tests d'optimisation de sa production de CMCCase et FPase ainsi que l'optimisation des conditions de mesure des activités de ces enzymes. La méthodologie de surface de réponse a été aussi utilisée pour améliorer la production de CMCCase et de FPase, en utilisant CMC ou FC comme source de carbone. Trois variables étaient prises en considération ; La température de production des cellulases, la concentration de la source de carbone et le pH initial du milieu de culture.

Nos résultats ont montré que la souche d'intérêt a pu croître sur une large gamme de température allant de 30°C à 45°C. La production maximale des cellulases est obtenue avec un taux d'inoculation de 1%, sulfate d'ammonium (1,4 g/L), peptone (10 g/L) et extrait de levure (10 g/L), sous agitation à 240 rpm.

Les enzymes produites ont une grande capacité à hydrolyser les différents substrats ; solubles (CMC) et insolubles (FC et PF). Les activités mesurées sont maximales à une température d'incubation de 55°C, à pH 5 pour CMCCase et à pH allant de 4 à 6 pour la FPase, avec une concentration optimale de 100 mg/mL du substrat CMC ou PF et après 10 min d'incubation pour CMCCase, 15 min d'incubation et 24h de préincubation du PF pour FPase.

Les conditions optimales de culture avec FC ont permis d'augmenter la production de CMCCase et de FPase qui deviennent proches de celles obtenues dans le milieu avec CMC.

En plus de la souche d'intérêt, 9 autres isolats cellulolytiques ont été identifiés. Leur arbre phylogénétique est construit par comparaison des séquences d'un fragment de 550 pb de l'ADNr 5.8S de la région ITS1-ITS4 avec des séquences obtenues à partir de la base de données NCBI. Tous les isolats appartiennent au genre *Trichosporon* et présentent une grande homologie avec les espèces ; *Trichosporon sp.* D59, *Trichosporon sp.* D54, *Trichosporon sp.* D60, *Trichosporon faecale* et *Trichosporon coremiiforme*.

L'évaluation de la production des cellulases par les isolats identifiés est réalisée aussi après optimisation des conditions de production et de mesure des cellulases. Dans le milieu de culture avec CMC, l'activité spécifique CMCCase a augmenté de neuf fois pour la souche *Mor-L11c* (18,03 UI/mg). L'activité spécifique FPase la plus élevée (11 UI/mg) est obtenue avec la souche *Mor-L11a*, soit 8 fois plus importante. Avec le milieu FC, neuf souches présentent des activités cellulases spécifiques de 2 à 20 fois supérieures à celles obtenues avant optimisation. L'activité spécifique CMCCase la plus élevée est observée chez la souche *Mor-L2a* (11,55 UI/mg) et l'activité spécifique FPase la plus importante est obtenue par la souche *Mor-L11a* (9,01 UI/mg).

Parmi les souches de levures identifiés, quatre ont été sélectionnées comme de potentielles productrices d'éthanol à 40°C. Dans le milieu CMC à 4%, la concentration maximale d'éthanol produit, suite au procédé de saccharification et fermentation simultanées, par les souches *Mor-L11a*, *Mor-L4a*. est de 22,63 g/L. Dans le milieu de culture avec FC à 4%, la concentration maximale d'éthanol (25,62 g/L) est produite par la souche *Mor-L11a*.

Notre travail nous permet de conclure que certaines des souches identifiées étudiées, notamment la souche *Mor-L11a*, seraient de bonnes candidates pour la production des enzymes cellulases à des fins industrielles, et éventuellement pour la production de l'éthanol à une échelle plus importante.

**Mots-clés :** *Gymnopleurus sturmi* ; *Trichosporon sp.* ; Levures ; Cellulose, cellulases ; Ethanol.

# PRODUCTION OF CELLULASES BY YEASTS FROM THE INTESTINAL MICROBIOTE OF A CO-GROWING INSECT AND ITS BIOTOPE - CHARACTERIZATION - OPTIMIZATION - USE -

## Abstract :

Cellulases have attracted special attention thanks to their great biotechnological and industrial potential (agrifood, textile and detergent industry, etc.). The production of cellulases by yeasts can also contribute to the biodegradation and bioconversion of lignocellulosic waste (agricultural, forestry) into fermentable sugar for the production of renewable bioenergy such as ethanol.

In our study, we established a collection of 96 yeast isolates, obtained from various ecological niches; digestive tract of the beetle (DTB) *G. sturmi* and dung ruminant (DR), the food source of this coprophagous insect. 30 isolates from DTB and 24 isolates from DR were found to be cellulolytic. The *Mor-L11a* isolate, the best performing in qualitative tests, which qualitatively exhibited the best CMCase activity with the carbon source FC (0.14 U/mL; 1.75 U/mg) and significant CMCase activity on CMC medium (0.17 U/ml, 3.4 IU/mg), was used for optimization tests of its production of CMCase and FPase as well as the optimization of the conditions for measuring the activities of these enzymes. Response surface methodology has also been used to enhance the production of CMCase and FPase, using CMC or FC as a carbon source. Three variables were considered; temperature of cellulase production, concentration of the carbon source and initial pH of the culture medium.

Our results showed that the strain of interest was able to grow over a wide temperature range from 30°C to 45°C. Maximum cellulase production was obtained with an inoculation rate of 1%, ammonium sulfate (1.4 g/L), peptone (10 g/L) and yeast extract (10 g/L), with stirring at 240 rpm.

The enzymes produced have a great capacity to hydrolyze the various substrates; soluble (CMC) and insoluble (FC and PF). The maximum measured activities were obtained at an incubation temperature of 55 ° C, at pH5 for CMCase and at pH ranging from 4 to 6 for FPase, with an optimal concentration of 100 mg/mL of CMC or PF substrate and after 10 min of incubation for CMCase, 15 min of incubation and 24 h of pre-incubation of PF for FPase.

The optimal culture conditions with FC allowed to increase the production of CMCase and FPase which become close to those obtained in the medium with CMC. In addition to the strain of interest, 9 other cellulolytic isolates were identified. Their phylogenetic tree is constructed by comparing the sequences of a 550 bp fragment of 5.8S rDNA from the ITS1-ITS4 region with sequences obtained from the NCBI database. All isolates belong to the genus *Trichosporon* and show high homology with the species; *Trichosporon sp.* D59, *Trichosporon sp.* D54, *Trichosporon sp.* D60, *Trichosporon faecale* and *Trichosporon coremiiforme*.

The evaluation of the cellulases production by the identified isolates was also carried out after conditions optimization for the production and measurement of cellulases. In the culture medium with CMC, the specific CMCase activity increased nine-fold for the *Mor-L11c* 1 strain (18.03 IU/mg). The highest specific FPase activity (11 IU/mg) was obtained with the *Mor-L11a* strain, 8 times greater. With FC medium, nine strains exhibit specific cellulase activities 2 to 20 times greater than those obtained before optimization. The highest CMCase specific activity is observed in strain *Mor-L2a* (11.55 IU/mg) and the highest specific FPase activity is obtained in strain *Mor-L11a* (9.01 IU/mg).

Among the yeast strains identified, four were selected as potential ethanol producers at 40°C. In 4% CMC medium, the maximum concentration of ethanol produced, following the process of simultaneous saccharification and fermentation, by the *Mor-L11a* and *Mor-L4a* strains was 22.63 g/L. In the culture medium with 4% FC, the maximum concentration of ethanol (25.62 g/L) was produced by the *Mor-L11a* strain.

Our study allows us to conclude that some of the identified and studied strains, in particular the *Mor-L11a* strain, would be good candidates for the cellulase enzymes production for industrial purposes, and possibly for the ethanol production at a larger scale.

**Keywords:** *Gymnopleurus sturmi*; *Trichosporon sp.* ; Yeasts; Cellulose, cellulases; Ethanol.