



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA)

THÈSE
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTORAT

Domaine : Science de la Nature et de la Vie **Filière :** Sciences Biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présentée par
Lamia MEDOUNI

Thème

**Bioamélioration du grignon d'olive et production
d'enzymes par culture de souches d'actinobactéries**

Soutenue le : 12 Mai 2018

Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom	Grade		
Mr TOUATI Abdelaziz	Professeur	Univ. de Béjaia	Président
Mr KECHA Mouloud	Professeur	Univ. de Béjaia	Rapporteur
Mr ZAIDI Farid	Professeur	Univ. de Béjaia	Co-rapporteur
Mr RIBA Amar	Professeur	Univ. de Boumerdès	Examineur
Mme BOUANANE Amel	MCA	Univ. des STHB- Alger	Examinatrice
Mme BOUCHERBA Nawel	MCA	Univ. de Béjaia	Invitée

Année Universitaire : 2017/2018

Résumé

Le grignon d'olive est un résidu agroindustriel à bas prix et abondant dans les pays méditerranéens, y compris l'Algérie. Le but de cette étude est le biotraitement du grignon d'olive avec des souches d'actinobactéries afin de produire des enzymes lignocellulolytiques et d'améliorer la valeur nutritive du grignon d'olive pour l'incorporer dans l'alimentation du bétail. Un isolement des souches d'actinobactéries a été réalisé. Les isolats d'actinobactéries ont été séparés à partir des sols environnants des décharges naturels de trois huileries algériennes en utilisant quatre milieux dont trois ont été à base de grignon d'olive. Les isolats ont été sélectionnés pour leurs activités cellulases, xylanase et laccases sur milieu solide et liquide. 90 isolats d'actinobactéries ont été isolés des échantillons de sol. Le milieu M3 s'est avéré le meilleur milieu d'isolement. Parmi les 90 isolats, 19 isolats ont présenté le plus grand diamètre de zone d'activité (<30mm). Les isolats S1M3I, S1M3II et S1M3III présentaient les valeurs les plus élevées. Ceux-ci ont été cultivés sur FMS à base de grignon d'olive à 30°C pendant 10 jours et ensuite, les activités enzymatiques lignocellulolytiques (xylanase, CMCase et laccase), la capacité des micro-organismes ont été déterminés. Aucune activité enzymatique n'a été enregistrée. Les trois souches de *Streptomyces* étudiées, dans les conditions expérimentales, étaient incapables de croître et de produire des enzymes lignocellulolytiques sur FMS à base de grignons d'olive. Par ailleurs, les conditions de fermentation submergée de la souche *Streptomyces* sp.S1M3I ont été optimisées, d'abord par la méthode à un facteur à la fois, puis par la méthodologie de surface de réponse (RSM). La production maximale de xylanase (11,28U / mL) a été obtenue lorsque la souche a été développée en milieu minéral additionné de 3% (p/v) de poudre de grignons d'olive et de 0,3% (p/v) de sulfate d'ammonium à pH 7,4 et une température d'incubation de 40 °C. L'étude du biotraitement du grignon d'olive a été réalisée dans les conditions optimales obtenues. La souche *Streptomyces* sp. S1M3I a été cultivée en fermentation submergée à base de grignon d'olive à 40 °C pendant 30 jours, puis les activités lignocellulolytiques, la viabilité du micro-organisme et la composition chimique du substrat résultant ont été déterminées. *Streptomyces* sp. S1M3I présentait des activités de 11,2 U / mL pour la xylanase, de 1,44 U / mL pour la cellulase et de $1,21 \times 10^{-2}$ U / mL pour la laccase. Une diminution significative ($p < 0,05$) de la teneur en hémicellulose, en cellulose et en lignine a été enregistrée et un maximum de viabilité ($2,71 \times 10^9$ spores / mL) de *Streptomyces* sp.S1M3I a été enregistré. Les résultats obtenus suggèrent que les souches *Streptomyces* sont de bons producteurs d'enzymes dégradant la paroi cellulaire en utilisant le grignon d'olive comme source de carbone qui peut être valorisée par culture submergée. Considérant le rapport entre les titres élevés des enzymes produites et le faible coût du grignon d'olive et le fait qu'il s'agit d'un résidu agricole très abondant en Algérie.

Mots clés: Actinobactéries - Enzymes lignocellulolytiques - Grignons d'olive - Optimisation - *Streptomyces*.

Abstract

Olive pomace is an abundant low-cost agro-industrial residue in Mediterranean countries, including Algeria. The aim of this study is the biotreatment of olive pomace with actinobacteria strains in order to produce lignocellulolytic enzymes and to upgrade the nutritional value of olive pomace for incorporating in the livestock feed. An isolation of actinobacteria strains has been realised. Isolates of Actinobacteria were separated from soils around oil mills using four isolation media, among them three were enriched by olive pomace. The isolates were screened for their cellulolytic, xylanolytic and ligninolytic activities. Isolates with potential of producing lignocellulose-degrading enzymes were selected under solid and submerged fermentation based olive pomace. A total of 90 of actinobacteria were separated from soil samples. M3 medium was the best isolation medium. Among the 90 isolates, 19 isolates were presented the largest zone diameter (<30mm). S1M3I, S1M3II and S1M3III isolates were exhibited the highest values. These three isolates were cultured on solid state fermentation based olive pomace at 30°C for 10 days, and subsequently, the lignocellulolytic enzyme activities (xylanase, CMCase and laccase), the viability of the microorganisms, were determined. *Streptomyces* strains, under the experimental conditions, were unable to grow and produce lignocellulolytic enzymes in solid state fermentation based olive pomace. The conditions of the submerged fermentation of the strain *Streptomyces* sp.S1M3I have been optimized, firstly, through one-factor-at-a-time method, then with response surface methodology (RSM). Maximum xylanase production (11,28U/mL) was obtained when the strain was developed in mineral medium supplemented with 3% (w/v) of olive pomace powder and 0,3% (w/v) of ammonium sulfate, at a pH 7,4 and an incubation temperature of 40°C. The study of the biotreatment of olive pomace was carried out in the optimal conditions obtained. The strain *Streptomyces* sp.S1M3I was cultivated in submerged fermentation based olive pomace at 40°C for 30 days, and subsequently, the lignocellulolytic activities, the viability of the microorganism and the chemical composition of the resulting substrate, were determined. *Streptomyces* sp. S1M3I exhibited activities, of 11,2 U/mL for xylanase, 1,44 U/mL for cellulase and $1,21 \times 10^{-2}$ U/mL for laccase. A significant ($p < 0,05$) decrease in the hemicellulose, cellulose and lignin content was registered. Maximum of viability ($2,71 \times 10^9$ spores/mL) of *Streptomyces* sp.S1M3I has been registered. The results obtained suggest that *Streptomyces* strains are a good producer of cell-wall degrading enzymes using olive pomace as a carbon source which can be valorized by submerged culture. Considering the ratio between the high titers of enzymes produced and the low olive pomace cost and the fact that is a very abundant agricultural residue in Algeria.

Key words: Actinobacteria - Lignocellulolytic enzymes - Olive pomace - Optimization - *Streptomyces*.

ملخص

ثفل الزيتون هو عبارة عن بقايا زراعية منخفضة التكلفة وفيرة في بلدان البحر الأبيض المتوسط، بما في ذلك الجزائر. الغرض من هذه الدراسة هو المعالجة الحيوية لثفل الزيتون بواسطة سلالات أكتينوبكتيريا لإنتاج الإنزيمات lignocellulolytic وتحسين القيمة الغذائية للثفل الزيتون لإدراجها في علف الماشية. وقد تم التوصل إلى عزل سلالات أكتينوبكتيريا. تم فصل العزلات البكتيرية عن التربة المحيطة بالمطاحن الطبيعية لثلاثة مطاحن الزيتون الجزائرية باستخدام أربع وسائط غذائية، ثلاثة منها تتكون من ثفل الزيتون. تم اختيار العزلات لأنشطتها من Cellulase، xylanase و laccase على الوسائط الصلبة والسائلة. تم عزل 90 سلالة من الأكتينوبكتيريا من عينات التربة. كان الوسط M3 أفضل وسيلة عزل. من بين 90 عزلة، كانت 19 عزلة تشكل أكبر قطر (> 30مم). S1M3I و S1M3II و S1M3I كانت تمثل أعلى القيم. تم زرع هذه العزلات الثلاثة على ثفل الزيتون في الوسط الصلب (FMS) تحت 30 درجة مئوية لمدة 10 أيام وبعد ذلك تم تحديد الأنشطة الإنزيمية xylanase، CMCase و laccase، وتم تحديد بقاء الكائنات الحية الدقيقة. انخفضت جدوى جميع سلالات *الستربتومييسيس (Streptomyces)* خلال الأيام الأربعة الأولى من الحضارة لتصل إلى 0 بوغ / غ من البقاء. لم تسجل أي أنشطة الأنزيمية. السلالات الثلاثة درسوا في ظروف تجريبية، لم يتمكنوا من النمو وإنتاج الإنزيمات على ثفل الزيتون في الوسط الصلب. تم تحسين ظروف النمو وإنتاج الإنزيمات في الوسط السائل للسلالة *الستربتومييسيس (Streptomyces sp.)*، SIM3I و SIM3II تم دراسة تأثير درجة الحموضة ودرجة الحرارة وتركيز ثفل الزيتون وكبريتات الأمونيوم على إنتاج xylanase أولاً باستخدام طريقة العامل الواحد ومن ثم المنهجية الاستجابية المساحة السطحية. تم الحصول على الحد الأقصى من الإنتاج (11,28 وحدة/مل) عند زرع في الوسط المعدني المتكون من 3٪ مسحوق ثفل الزيتون و 3,0 ٪ كبريتات الأمونيوم في 7.4 درجة الحموضة ودرجة حرارة الحضارة من 40 درجة. تمت دراسة المعالجة الحيوية لثفل الزيتون بواسطة زرع SIM3I *Streptomyces sp.* في الوسط السائل عند 40 درجة مئوية لمدة 30 يوم، ثم تم تحديد الأنشطة لينوسيلوليتيك (lignocellulolytic)، بقاء الكائنات الحية الدقيقة والتركيب الكيميائي الناتجة عن ذلك. تم الحصول على أنشطة 11.2 وحدة/مل xylanase، 1.44 وحدة/مل cellulase و 1.21×10^{-2} وحدة/مل laccase. نتج انخفاض نسبي ($p < 0.05$) في محتوى هيميسيلولوز، السيلولوز واللنين. تم تسجيل الحد الأقصى للبقاء (2.71×10^9 بوغ / غ) للسلالة *الستربتومييسيس SIM3I*. نظرا للعلاقة بين النسبة العالية من للأنزيمات المنتجة وانخفاض تكلفة ثفل الزيتون وكونه بقايا زراعية وفيرة جدا في الجزائر. فإن سلالات أكتينوبكتيريا تعتبر منتجات لا بأس بها للأنزيمات المحللة للجلد الخلية باستخدام ثفل الزيتون كمصدر الكربون في الوسط السائل.

الكلمات الرئيسية: إزيمات لينوسيلوليتيك- تحسين الظروف- سترتومييسيس.