



Université Mohamed Khider de Biskra Faculté des
sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :

SLIMANI Fahima

Le :

Thème

Production d'une xylanase à partir une souche xylanolytique

Jury :

Mr. GUEMEZ Fateh	MAA	Université de Biskra	Président
Mr. HEBAL Hakim	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mr. BENKADOUR Bachir	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2017 - 2018

Remerciement

Nos remerciements s' adressent d' abord à Allah le tout puissant et à son prophète pour les chances qui nous sont offertes pour réaliser ce travail.

Nos remerciements s' adressent également à Notre encadreur monsieur Hebal Hakim, pour avoir accepté de diriger ce travail. Son soutien, sa clairvoyance et ses compétences nous ont été d' une aide inestimable et pour sa disponibilité, sa gentillesse et ses précieuses directives tout au long de l' élaboration de ce travail nous ont beaucoup impressionnées.

Nos remerciements vont aussi au madame Mocrani Djamila le chef de département et à tous les enseignants de département biologie appliquée.

On ne terminera pas sans avoir exprimé des remerciements envers toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail aux êtres les plus chers au monde :

*À mes très chers parents qui m'ont toujours soutenu
avec leurs encouragements et qui m'ont donné un magnifique
modèle*

de labeur et de persévérance

À toute ma famille

Mon frère et mes soeurs

A mes amis

A toute la promotion de M2 en Microbiologie

Sommaire

Remerciement	
Dédicace	
Listes de tableau.....	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations.....	III
Introduction.....	1

Chapitre I : Partie bibliographique

1.1. La biomasse lignocellulosique	3
1.1.1. Compositions de la matière lignocellulosique	3
1.1.1.1. Cellulose	3
1.1.1.2. Lignine	4
1.1.1.3. Hémicellulose	5
1.1.1.4. Xylane	6
1.2. Les xylanases	7
1.2.1. Structure des xylanases.....	7
1.2.2. Mécanisme d'action.....	9
1.2.3. Production.....	9
1.2.4. Applications.....	12

Chapitre II : Matériels et Méthodes

2.1. Isolement et sélection de Microorganismes producteurs de xylanases :.....	13
2.2. Production de xylanase	13
2.3. Effet de quelques paramètres environnementaux et nutritionnels	14
2.3.1. Effet de la température et du pH sur l'activité enzymatique :.....	14
2.3.2. Effet de la salinité sur l'activité enzymatique :	14
2.3.3. Effet de la source de carbone sur la production de xylanase.....	15

2.3.4. Optimisation de la taille de l'inoculum.....	15
2.4. Microorganisme xylanolytique et Fermentation Submergée	15
2.5. Déterminations cinétiques	16
Chapitre III : Résultats et Discussion	
3.1. Sélection des micro-organismes.....	17
3.2. Conditions de production de xylanase	18
3.2.1. Effet de la concentration de NaCl, du pH et de la température :.....	18
3.2.2. Effet de la source de carbone sur la production d'enzymes :	21
3.2.3. Effet de la taille de l'inoculum sur la production de xylanase.....	21
3.3. Micro-organisme xylanolytique et fermentation submergée initiale	22
3.4. Cinétique enzymatique.....	23
Conclusion	24
Références.....	25
Résumé	

Listes de tableau

Tableau 1. Comparaison entre la FMS et FML (Sobal, 2002)	11
Tableau 2. Applications de xylanases dans les différentes industries (Collins <i>et al</i> , ...	12

Liste des figures

Figure 1: Structure de la biomasse lignocellulosique (Shleser et al.,1994).....	3
Figure 2: Représentation de la molécule de cellulose (Mazza, 2009)	4
Figure 3: Structure de la lignine (Mussatto et al., 2012)	5
Figure 4: Différents modèles d'hémicelluloses .a)Hémicellulose composée d'unités répétées de xylose substituées avec des groupes O-acétyl ou de l'acide 4-O-méthylglucuronique ; b)Hémicellulose composée d'unités répétées de xylose substituées avec de l'acide 4-O-méthylglucuronique et de l'arabinose ; c)Représentation schématique de la matrice cellulose-hémicellulose(Sassen,1993)	6
Figure 5: Structures chimiques d'une chaîne de xylane (Harris et Ramalingam, 2010). 7	
Figure 6: Structure de xylanase (famille 10 et famille 11).	8
Figure 7 : Activité de xylanase et variation de pH obtenues par SSFavec $K_m=10^{-2}$ LPB 326 (Giselle Maria et al.,2009).....	18
Figure 8: Évolution temporelle de la croissance de <i>B. halodurans</i> PPKS-2 sur 0,2 % d'avoine xylane splat, peptone 0,5 % ou hydrolysats de plumes 0,5 %, pH 11 à 37 °C. . 19	
Figure 9: Effet du pH (a), de la température (b) et du NaCl (c) sur la croissance.....	20
Figure 10: Effet de la taille de l'inoculum sur la production de xylanase. L'inoculum consistait en une suspension de spores contenant 2×10^7 spores/m.(Bijender et Narendera ;2010).	22
Figure 11: Dosage cinétique de la xylanase. (a) Effet de la concentration du substrat (xylane de bouleau) sur l'activité de l'enzyme xylanase produite par Bacille sp. NTU-06. (b) Double tracé réciproque pour déterminer les valeurs V_{max} et K_m de la xylanase.(Wang et al.,2009).	23

Liste des abréviations

Abréviation	Nom complet
FMS	Fermentation en milieu solide
FML	Fermentation en milieu liquide
MO	Micro-organisme
NaCl	Chlore de sodium
pH	Potentiel d'hydrogène
K ₂ HPO ₄	Hydrogénophosphate de dipotassium
MgSO ₄	Sulfate de magnésium
H ₂ O	L'eau
CaCl ₂	Calcium chloride
NaNO ₃	Nitrate de sodium
FeSO ₄	Sulfate ferreux
ZnSO ₄	Sulfate de zinc
MnSO ₄	Sulfate de manganèse
V _{max}	Vitesse maximale
Fig	Figure

Introduction

Introduction

Des millions de tonnes de biomasse lignocellulosiques sont rejetés chaque année sous forme de déchets solides agro-industriels et forestiers sans traitements appropriés, ce qui engendre la prolifération de parasites et la pollution de l'environnement en général (Zha *et al.*, 2012; Dar *et al.*, 2013; Ang *et al.*, 2015). La biomasse lignocellulosique représente une des ressources renouvelables la plus abondante sur terre, et certainement une des moins coûteuses. Cette dernière est composée essentiellement de trois polymères à savoir : la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. La teneur en ces constituants varie d'une espèce végétale à une autre. En effet, Les hémicelluloses, représentent environ 20 à 40 % de la biomasse végétale. et constituent le second polymère naturel et le plus abondant sur terre après la cellulose (Coughlan, 1992; Privas, 2014).

En 2010, représentait la première forme d'énergies renouvelables et la quatrième source d'énergies primaires consommées dans le monde (10,0%) après le pétrole (32,4%), le charbon (27,3%) et le gaz naturel (21,4%) (Energy, A. I, 2012).

L'hydrolyse biologique de la biomasse lignocellulosique nécessite des réactions synergiques entre les enzymes ligninolytiques, cellulolytiques et hémicellulolytiques pour la dégradation complète de ce complexe (Woiciechowski *et al.*, 2013; Ang *et al.*, 2015). Le prétraitement de la biomasse lignocellulosique est nécessaire, car les enzymes ne peuvent pas accéder aux polysaccharides à cause de leur taille, d'une part, et d'autre part, en raison de la couverture des polysaccharides par la lignine (Watanabe, 2013).

De nombreux microorganismes s'impliquent dans l'hydrolyse biologique, les moisissures disposent des potentialités d'applications biotechnologiques très étendues, grâce à une dissémination efficace, une croissance rapide et un arsenal enzymatique très développé, due à un patrimoine génétique particulier qui explique leur grande capacité d'adaptation (Leveau et Bouix, 1993). Les *Ascomycètes* qui sont des moisissures filamenteux retrouvés partout dans la nature jouent un rôle essentiel dans le recyclage des matières organiques en puisant leur énergie à partir des sources carbonées externes (Chabasse *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2014).

Les principales enzymes capables de dégrader les hémicelluloses sont des hydrolases nommées hémicellulases. Dans le cas des xylanes, c'est la xylanase. En raison de la complexité structurale des xylanes, leur dégradation complète implique tout

un système xylyanolytique comprenant une variété d'enzymes, dont les unes hydrolysent la chaîne principale et les autres clivent les liaisons entre les substituants et les résidus xylose de la chaîne principale (Puls et Schuseil, 1993).

L'objectif principal du présent travail vise à étudier la production de xylanase (hémicellulase), par des souches xylyanolytiques. Et ce, dans le but de fournir à l'industrie les enzymes performantes nécessaires à la valorisation de la biomasse lignocellulosique.

Chapitre I : Partie bibliographique

1.1. La biomasse lignocellulosique

La biomasse lignocellulosique est une matière organique, constituée principalement, de trois polymères à savoir ; la cellulose, l'hémicellulose et la lignine en proportions variables. En effet, La cellulose est de l'ordre de 40 à 60 %, l'hémicellulose est de l'ordre de 20 à 40 %, enfin, la lignine est de l'ordre de 10 à 25 % (O'Donohue, 2008). D'autres matériaux tels que les pectines et les protéines peuvent être trouvés en petites quantités (Mathew *et al.*, 2008; Dashtban *et al.*, 2009). A l'intérieur de la biomasse lignocellulosique (figure1), ces macroéléments s'entremêlent et forment une structure tridimensionnelle complexe et très résistante, maintenue par des liaisons hydrogènes et des liaisons covalentes, qui résistent aux attaques de phytopathogènes en conférant de la rigidité aux plantes (Saidi, 2011).

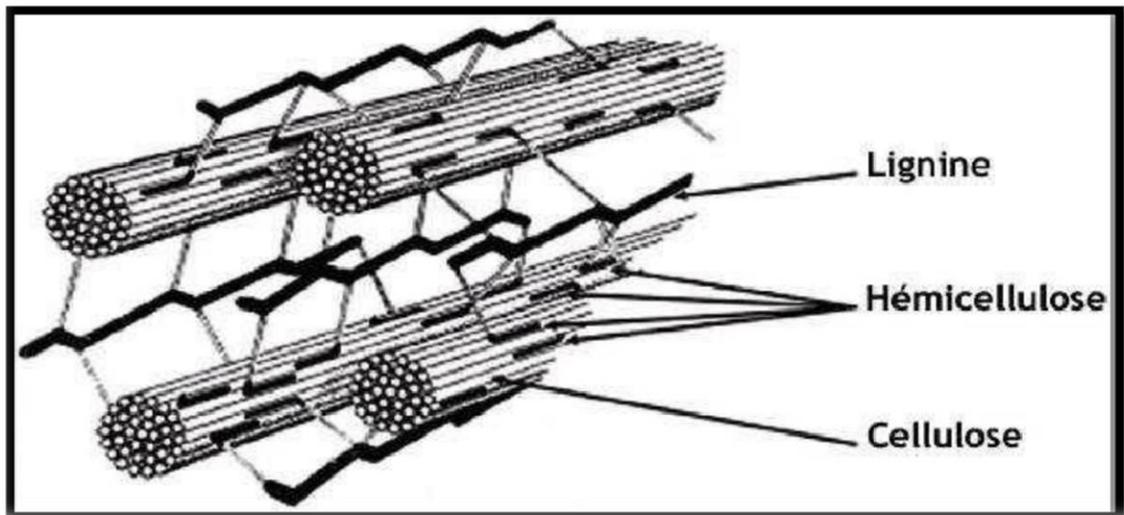


Figure 1: Structure de la biomasse lignocellulosique (Shleser *et al.*, 1994).

1.1.1. Compositions de la matière lignocellulosique

1.1.1.1. Cellulose

La cellulose est le composant principal de la biomasse lignocellulosique. C'est le biopolymère le plus abondant sur Terre. Il s'agit d'un homopolymère linéaire constitué d'unités de glucose liées entre elles par des liaisons β -1,4 glycosidiques au sein de structures cristallines appelées microfibrilles (fig 02). Ces chaînes peuvent être liées les unes aux autres par des liaisons hydrogène, des interactions hydrophobes et des forces de van der Waals (Dashtban *et al.*, 2009).

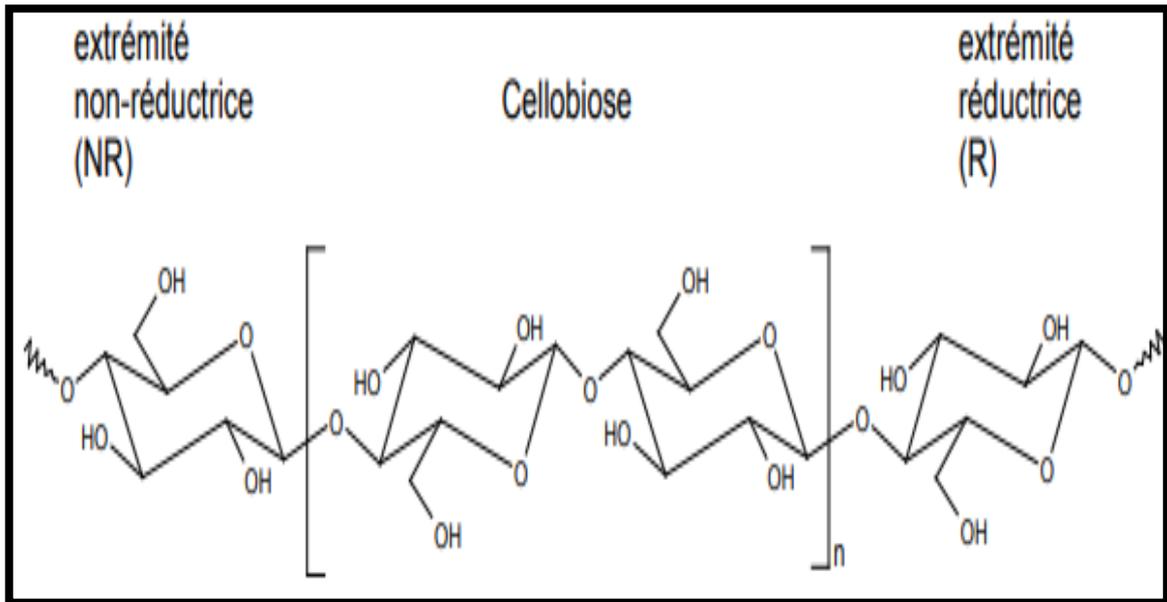


Figure 2: Représentation de la molécule de cellulose (Mazza, 2009)

1.1.1.2. Lignine

La lignine est la troisième composante majeure de la biomasse lignocellulosique et la composante principale de l'espace intercellulaire (fig 3). Elle est considérée comme une macromolécule réticulée composée principalement de trois alcools aromatiques: l'alcool p-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique (Dashtban *et al.*, 2009). C'est la matière la plus récalcitrant de la biomasse lignocellulosique (Raulo, 2016). Son rôle est de renforcer la structure de la paroi pour lui donner de la rigidité et agisse ainsi comme protecteur contre les enzymes dégradant la paroi cellulaire (Dodd et Cann, 2009).

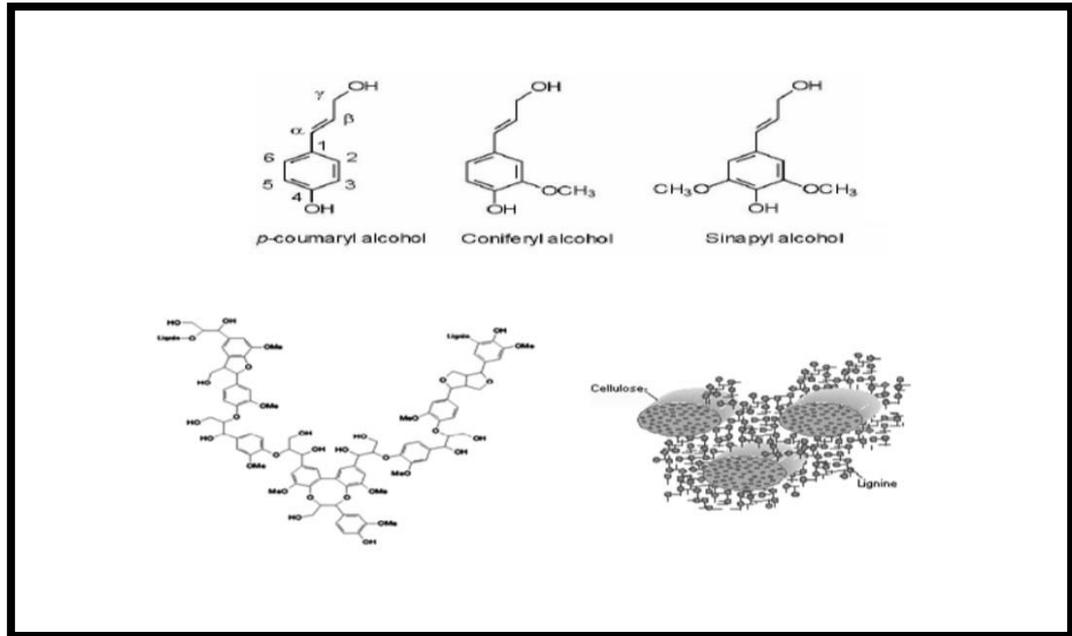


Figure 3: Structure de la lignine (Mussatto et al., 2012) .

1.1.1.3. Hémicellulose

Les hémicelluloses sont des hétéropolysaccharides (sucres majoritaires), complexes, linéaires ou ramifiés de faible Degré de Polymérisation (DP) (entre 150 et 200) (Mirande, 2009; Chauve, 2011). Alors que, les homopolysaccharides sont des hémicelluloses minoritaires, à savoir les xylanes, les glucanes et les mannanes (Joseleau, 1980). Le xylane représente le sucre le plus abondant des hémicelluloses et constitue par des monomères de xylose (Juhász *et al.*, 2005; Seiboth et Metz, 2011). Les hémicelluloses sont liées à la lignine, formant une structure très rigide par les groupes acétyles hémicellulosiques (figure 4)(Dodd et Cann, 2009).

Les hémicelluloses sont synthétisées à partir de nucléotides-sucres par des Glycosyl Transférases (GTs), localisées dans les membranes de Golgi et transportées à la paroi par des vésicules sécrétoires (Wertz, 2011). La majorité des enzymes impliquées dans la synthèse de polysaccharides hémicellulosiques sont des protéines membranaires intrinsèques (Somerville *et al.*, 2004). Les hémicelluloses sont très hydrophiles et se dégradent assez facilement par des traitements acides ou alcalins (Dashtban *et al.*, 2009).

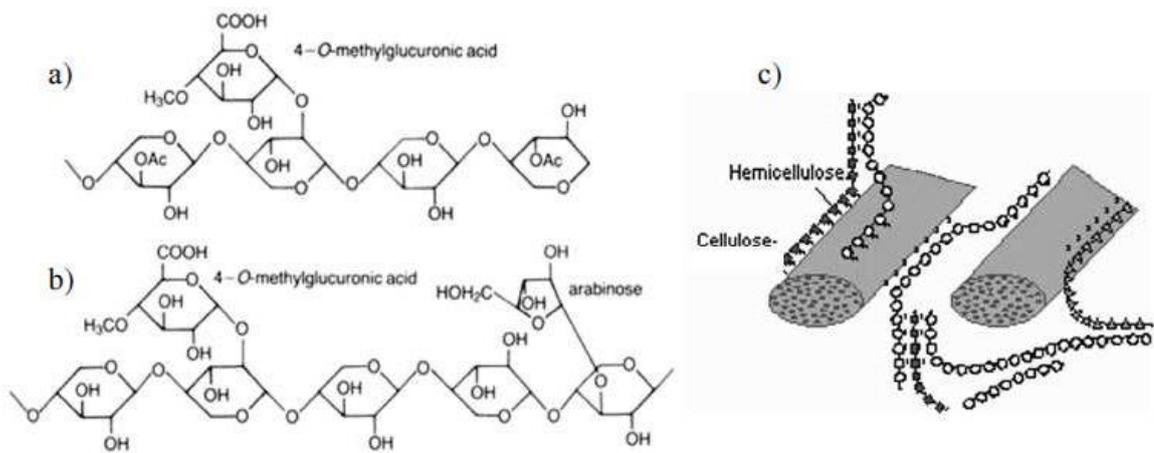


Figure 4: Différents modèles d'hémicelluloses .a)Hémicellulose composée d'unités répétées de xylose substituées avec des groupes O-acétyl ou de l'acide 4-O-méthylglucuronique ; b)Hémicellulose composée d'unités répétées de xylose substituées avec de l'acide 4-O-méthylglucuronique et de l'arabinose ; c)Représentation schématique de la matrice cellulose-hémicellulose(Sassen,1993)

1.1.1.4. Xylane

Le xylane est le principal polysaccharide hémicellulosique trouvée dans la paroi cellulaire des végétaux et particulièrement des bois durs (Srinivasan et Meenakshi,2008). Il représente 30 % de la masse sèche des plantes et environ un tiers du carbone organique renouvelable sur terre, étant essentiellement un constituant de la paroi secondaire, il est associé à la lignine.

La solubilité du xylane dépend non seulement de sa masse moléculaire mais aussi de la nature des chaînes latérales. Généralement, ce substrat est plus soluble en milieu alcalin qu'en milieu neutre ou acide (Mouranche et Costes, 1985). Son degré de polymérisation se situe entre 100 à 200 unités de xylose (Beguin et Aubert, 1992).

Le xylane est un hétéropolymère linéaire d'unités de xylose (de 50 à 200 résidus d'xylose) reliées entre elles par des liaisons β (1-4) (Belmokhtar, 2012), qui peut être substituée par du D-galacturonate en α (1,2) (lui-même pouvant être O-méthylé en position 4 ; glucuronoxylane), par des résidus de L-arabinose en α (1,2) ou α (1,3) (arabinoxylanes), ou par les deux (glucurono-arabinoxylanes GAX) (Figure 05). Souvent, la structure du xylane comporte diverses chaînes latérales telles que les groupements acétyl-arabinofuranosyl et méthyl-glucuronyl sur lesquelles viennent se greffer des composés aromatiques (acide ferulique et acide para-coumarique) (GEROIS *et al*, 2000). Ces chaînes latérales déterminent la solubilité, la conformation physique et

la réactivité de la molécule xylane avec les autres composants héli-cellulosiques et donc une grande influence sur le mode et le degré de clivage enzymatique.

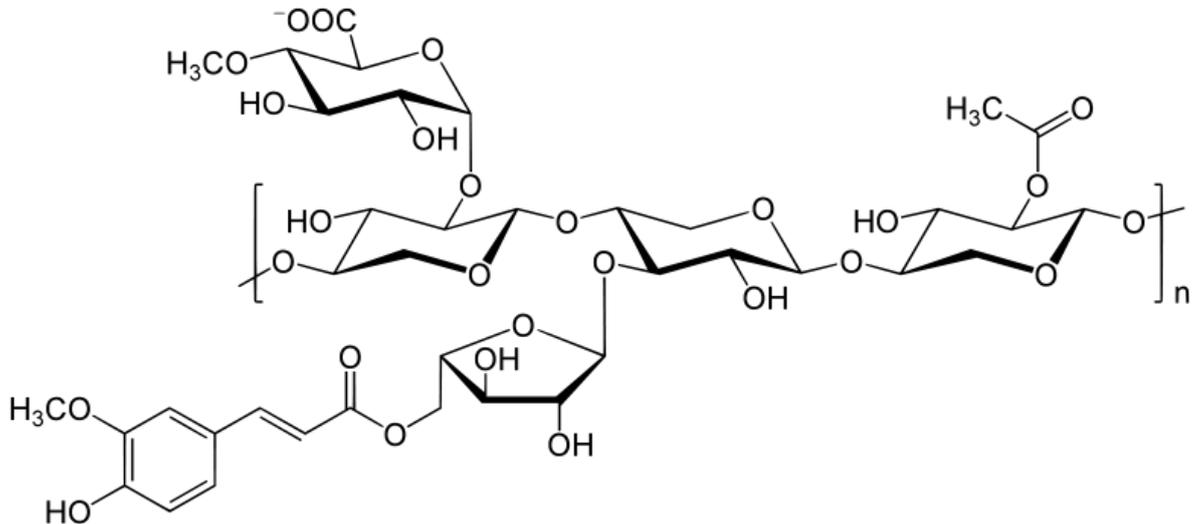


Figure 5: Structures chimiques d'une chaîne de xylane (Harris et Ramalingam, 2010).

1.2. Les xylanases

Les xylanases sont des glycosides hydrolases qui catalysent l'hydrolyse des liaisons β (1 \rightarrow 4)-D-xylosidiques dans les régions non substituées des chaînes de xylane pour libérer du xylose. Ce dernier est réduit pour donner un polyol non naturel le xylitol, brisant ainsi l'hémicellulose, l'une des principales composantes de la paroi (Karunakaran *et al*, 2014).

Elles sont secrétées par une grande variété d'organismes incluant les bactéries, les champignons (thermophiles), les levures, les algues, les plantes et d'autres sources naturelles (Mouranche et Costes, 1985 Leur nom officiel est endo-1,4- β - xylanase, mais des termes synonymes couramment utilisés comprennent xylanase, endoxylanase, le 1,4- β -D-xylane-xylanohydrolase, endo-1,4- β -D-xylanase, β -1,4- xylanase et β -xylanase.

1.2.1. Structure des xylanases

Les endoxylanases de faible masse moléculaire (famille G ou GH11) ont une structure cristalline qui comporte trois feuillets β anti-parallèles et une hélice α qui forment une main droite partiellement fermée, laissant apparaître une large crevasse sur l'un des cotés de la molécule ainsi que le « pouce » de l'enzyme. Ce dernier est suspecté

de contribuer à la spécificité du substrat pouvant entrer dans la crevasse catalytique, et d'être de surcroît la cible d'inhibiteurs protéiques (Sa-Pereira *et al*, 2003).

Les xylanases sont constituées de domaines dits fonctionnels et d'autres dits non fonctionnels reliés par des régions fortement enrichies en acides aminés hydroxylés. Tous les domaines ne sont pas retrouvés au sein d'une même famille. Les xylanases de la famille 10, généralement plus volumineuses, possèdent souvent un nombre plus élevé de domaines fonctionnels que celles de la famille 11 (fig06). Parmi ces domaines, il existe :

Un domaine catalytique (DC) qui permet la coupure de la liaison glycosidique reliant deux xyloses. La majorité des xylanases possèdent un DC mais il existe celles qui possèdent deux DC, généralement le cas d'un plus grand nombre de xylanase de la famille 10 par exemple (fig06), la xylanase de *Ruminococcus flavefaciens*. Les séquences d'acides aminés des DC de xylanases appartenant à la même famille ont des taux d'homologie importants, proche de 50% .

Un domaine de liaison aux polysaccharides qui fixe la xylanase sur les xylanes. La présence d'un XBD apporterait des propriétés intéressantes pour l'enzyme (Gilkes *et al*, 1991).

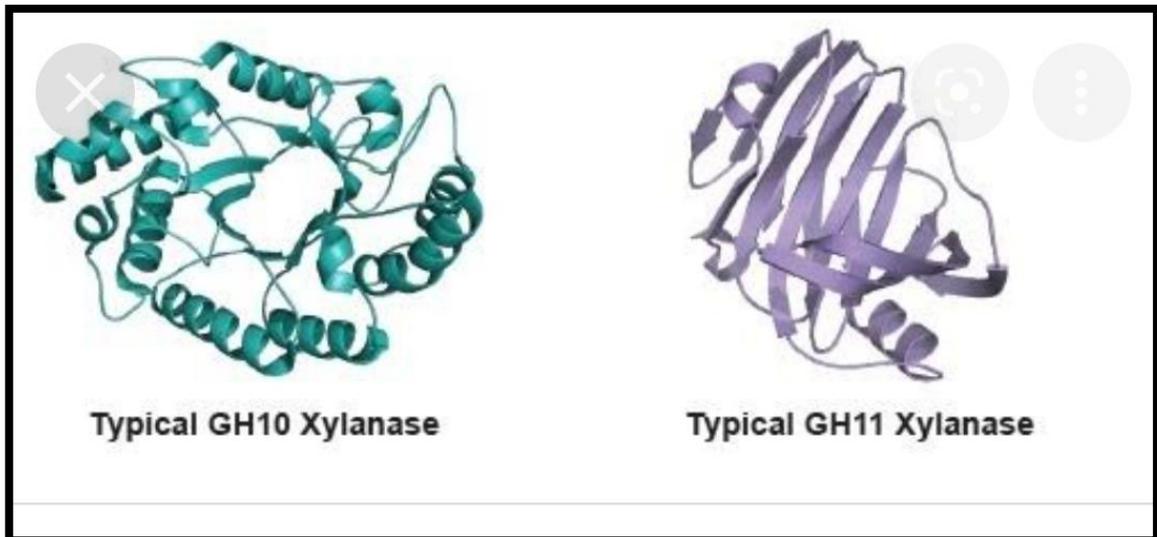


Figure 6: Structure de xylanase (famille 10 et famille 11).(site web1)

1.2.2. Mécanisme d'action

L'hydrolyse des xylanes nécessite l'intervention de systèmes enzymatiques hétérogènes constitués de différents types d'activités xylanolytiques, principalement les endoxylanases, les β -xylosidases et les enzymes débranchantes.

Les endo-D-xylanases, β -D-(1,4) xylane xylanohydrolase (EC 3.2.1.8), dégradent leurs substrats par une attaque intramoléculaire de type β (1-4) xylosidiques en libérant des oligomères de petite taille.

Les exo-xylanases et les β -xylosidases (EC 3.2.1.37) hydrolysent les petits oligomères libérés par les endoxylanases, en xylose et provoquent une inversion de configuration du Dxylose libéré (Guerfali, 2011)

Les enzymes accessoires ou enzymes de débranchement éliminant les chaînes latérales sont aussi nécessaires. Ce sont les α -L-arabinofuranosidases ou xylanes-1,4- β -xylonidases (EC 3.2.1.55), les α -glucuronidases, les acétyl-estérases, acetyl-xylane estérases et coumarique et ferulique estérases (Guerfali, 2011).

1.2.3. Production

Les champignons filamenteux sont des producteurs particulièrement intéressants de xylanases parce qu'ils sécrètent des enzymes dans le milieu et leur taux de production est beaucoup plus élevé que celui des levures et des bactéries.

Les genres fongiques *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium* et *Pichia* sont considérés comme de grands producteurs de xylanases . En plus des xylanases, les champignons produisent plusieurs enzymes auxiliaires nécessaires pour la dégradation de xylane substitué (Polizeli *et al*, 2005).

Les xylanases sont produites soit par fermentation solide (FMS) ou par fermentation submergée (FML) (Agnihotri *et al*, 2010). Cette production repose essentiellement sur le choix du substrat inducteur et la composition optimale du milieu de fermentation. La plupart des xylanases industrielles sont produites par des procédés de fermentation en milieu liquide (Polizeli *et al*, 2005). Cependant la fermentation en milieu solide est également importante. La productivité de l'enzyme via la fermentation solide est beaucoup plus élevée que celle de la fermentation submergée (Agnihotri *et al*, 2010).

La fermentation solide est définie comme une fermentation impliquant des particules solides humides en absence ou presque d'eau libre. Elle reproduit les conditions de vie naturelles des microorganismes, en particulier celles des champignons supérieurs, en permettant leur développement (adhésion) à la surface d'un support organique.

Les champignons filamenteux sont particulièrement bien adaptés à ces cultures du fait de leur résistance à une faible A_w et à une pression osmotique élevée (Assamoi *et al.*, 2009 ; Duchiron et copinet, 2011). Le développement des champignons filamenteux en FMS s'effectue par extension et ramification des filaments formant le mycélium. Après l'inoculation d'un substrat par des conidies, les hyphes se développent pour former un tapis mycélien qui s'étend à la surface des particules solides. A partir de ce tapis mycélien, des filaments se développent dans les espaces gazeux et des filaments pénètrent à l'intérieur des particules ou dans les espaces inter particulaires à la recherche de composés nutritifs, notamment dans les pores remplis de liquide. A des taux normaux d'humidité, les espaces entre les filaments aériens sont remplis de gaz tandis que les filaments en contact avec le substrat sont remplis d'eau. Les activités métaboliques se produisent principalement près de la surface où à l'intérieur des pores, mais les filaments aériens peuvent présenter une activité due à des phénomènes de diffusion. Les enzymes hydrolytiques diffusent dans la matrice solide et dégradent les polymères afin de permettre la production de molécules assimilables par le champignon (Pandey, 2003 ; Rahardjo *et al.*, 2006).

Les avantages des procédés de FMS plus FML comprennent un faible coût de culture pour la fermentation, un risque plus faible de contamination (BEG *et al.*, 2001), une meilleure stabilité de l'enzyme, mimant l'habitude naturelle du champignon et la production d'enzymes avec des activités spécifiques plus élevées (tab01).

Les conditions de FMS sont particulièrement appropriées pour la croissance des champignons, étant donné que ces organismes sont capables de croître à des activités relativement faibles, contrairement à la plupart des bactéries et des levures, qui ne peuvent pas proliférer dans ces conditions de culture (Subramaniyan and Vimala, 2012).

La fermentation submergée permet un meilleur contrôle des conditions durant la Fermentation (Subramaniyan et Vimala, 2012). La FML de micro-organismes aérobies est un procédé largement utilisé pour la production de cellulase et de xylanase (Garcia-Kirchner *et al.*, 2002).

Tableau 1. Comparaison entre la FMS et FML (Sobal, 2002)

Facteur	Fermentation liquide	Fermentation solide
Substras	Substrats solubles (sucres)	Substrats polymères insolubles
Conditions aseptiques	Stérilisation par la chaleur/ aseptie contrôlée	Traitement à la vapeur, conditions non stériles
L'eau	Grands volumes d'eau utilisés et d'effluents pollués	Consommation limitée d'eau /peu d'effluent
Chaleur métabolique	Contrôle de la température facile	Faible capacité de transfert thermique
Aération	Limitée à l'oxygène soluble, haut niveau d'air requis	Aération simple et haute (échange d'air / substrat)
Contrôle du Ph	Facile	Substrat solide tamponné
Agitation mécanique	Bonne homogénéisation	Conditions statiques
Echelle	Equipements industriels Disponibles	Besoin de conception de nouveaux équipements
Inoculation	Inoculation simple/ procédé continu	Par spores ou mycélium
Contamination	Risques de contaminations	Risque ,notamment si le microorganisme pousse lentement
Consommation d'énergie	Consommation élevée	Faible consommation
Volume de l'équipement	Grand volume et grand coût	Petit volume et petit coût
Effluents et pollution	Grands volumes d'effluents pollués	Absence d'effluents, moins de Pollution
Concentration S/produits	30-80/L	100-300/L

1.2.4. Applications

Les xylanases sont fréquemment utilisées dans la formulation d'aliments pour les animaux (amélioration de la digestibilité et de la valeur nutritive), en industries des jus de fruits et brassicoles (amélioration de l'extraction ou la filtration). En industrie du papier, ces enzymes améliorent la pureté de la cellulose, par une réduction de 50 % de la quantité de chlore nécessaire au blanchiment du papier et de la quantité d'organochlorés rejetés dans l'environnement.

Les applications de xylanases sont nombreuses, elles se résument dans le tableau 2

Tableau 2. Applications de xylanases dans les différentes industries (Collins *et al*, 2005).

Industries	Applications
Alimentaires	Bioblanchiment de la pâte kraft, ce qui augmente sa brillance ; Séparation des encres; Amélioration de la manipulation de la pâte et la qualité des produits cuits au four.
Pates et papiers	Préparation des fibres par trempage et macération remplaçant les procédés chimiques
Textiles	Production des composés fermentescibles, carburants renouvelables (bioéthanol), et tensio-actifs
Bioconversions	Génération d'édulcorant naturel utilisé dans les dentifrices et divers produits Pharmaceutiques

Chapitre II : Matériels et Méthodes

2.1. Isolement et sélection de Microorganismes producteurs de xylanases :

La souche utilisée dans ce travail a été sélectionnée parmi 20 champignons souches (isolées et de culture de laboratoire) par des méthodes qualitatives et quantitatives. Le test qualitatif a été réalisé par la méthode de dépistage sur plaque de xylane-agar (Whitaker et Wong,2002) utilisant 0, 2% de xylane de bouleau (Sigma, USA) comme semelle source de carbone.

La fraction d'hémicellulose a également été extraite à partir d'échantillons de bagasse de canne à sucre selon la méthode de Lopez et Delmas(1999) . et utilisé dans le test qualitatif afin vérifier la possibilité de remplacer le xylane commercial dans tests de dépistage des souches productrices d'hémicellulases.

Les souches, qui a montré une activité xylanase vis-à-vis des plaques de xylane-agar ont été criblés quantitativement par SSF (milieu composé de sel minéral, bagasse de canne à sucre et tourteau de soja) pendant sept jours avec des échantillons prélevés pour l'enzyme test à 1, 3, 5 et 7 jours de culture. Meilleur producteur souches ont ensuite été analysées par SSF pendant 10 jours avec échantillonnage quotidien. La souche sélectionnée a été maintenue en culture de pomme de terre gélose dextrose à 28°C pendant 5 jours. Les spores ont été suspendues par ajouter une solution de Tween 80 (0,1%) sous agitation avec un agitateur magnétique et compté dans une chambre Neubauer-Improved (LO - Laboroptik GmbH, Allemagne).(Giselle Maria Maciel *et al.*,2009).

Un autre travail a utilisé une autre méthode pour sélectionner les souches xylanolytique les plus performantes. L'organisme a été cultivé sur des plaques de gélose composées de 0,2 % (p/v) xylane d'épeautre d'avoine, 0,5 % (p/v) dans un milieu de sel minéral (Prakash et al, 2010). Après incubation à 37°C pendant 48h, le la zone d'hydrolyse a été visualisée en colorant les plaques avec une solution aqueuse de rouge Congo à 0,2 % (p/v) pendant 15 min, puis décoloré avec du NaCl 1 M (Silveira *et al.*, 1997).(P.Prakash *et al.*,2011).

2.2. Production de xylanase

La production de xylanase a été réalisée en mélangeant dans un Erlenmeyer flacon (250 mL), 10 g de substrat (65% de canne à sucre bagasse et 35% de tourteau de soja), et suffisamment de minéraux solution saline pour ajuster la teneur en humidité (85%).la solution de sel minéral était composée de (g/L) : K₂HPO₄, 0,23 ;MgSO₄.7H₂O, 0,05 ;

CaCl₂, 0,005 ; NaNO₃, 0,05 ; FeSO₄ · 7H₂O, 0,009; ZnSO₄, 0,002 ; et MnSO₄, 0,012. Le milieu solide a été autoclavé (15 min à 121°C) et puis inoculé avec une suspension de spores de 10⁶ spores/g de matière sèche. Après homogénéisation du milieu, les flacons ont été incubés à 30°C pendant 4 jours. (Qiselle Maria Maciel *et al.*, 2009).

Dans un autre travail, Production d'enzymes La souche PPKS-2 a été cultivée dans un flacon Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml du milieu de fermentation ci-dessus à 37°C de pH 11,0 contenant 0,2 % (p/v) de xylane et 0,5 % (p/v) peptone ou hydrolysate de plumes dans le susdit milieu sel minéral. Production de xylanase réalisée par inoculer avec 1 ml d'une culture de 24 h et incubé à 37°C sur un agitateur rotatif à 200 tr/min pendant 48 h. Les flacons ont été prélevés à intervalles réguliers et le contenu centrifugé à 6,2009g pendant 10 min à 4°C et le surnageant a été utilisé pour le dosage de l'activité xylanase et cellulase.

La croissance a été contrôlée en mesurant la densité optique à 660 nm dans un spectrophotomètre (UV-6450 ; Jenway, UK). (P.Prakash *et al.*, 2011).

2.3. Effet de quelques paramètres environnementaux et nutritionnels

2.3.1. Effet de la température et du pH sur l'activité enzymatique :

Pour étudier l'effet de la température sur l'activité enzymatique, le mélange de dosage enzymatique a été incubé à différentes températures à savoir. 30, 40, 50, 60 et 70 °C, et l'activité enzymatique a été déterminé en mesurant la quantité de sucres réducteurs libérés par l'enzyme à l'aide de 3,5-méthode à l'acide dinitro-salicylique. Pour déterminer l'effet du pH sur l'activité enzymatique, le l'enzyme a été dosée à l'aide de différents tampons (50 mM) tels que le citrate, le phosphate ou le tri tampon, qui ont un pH différent (4,0–10,0). Pour étudier la stabilité thermique, la préparation enzymatique a été incubée à 50 °C pendant différents intervalles de temps (15, 30, 45 et 60 min), et l'activité résiduelle a été dosée.

Toutes les expériences analytiques ont été menées en triple, et les données présentées ici sont la moyenne de trois expériences différentes. Le coefficient de variation était inférieur à 7 %. (Wang *et al.*, 2009).

2.3.2. Effet de la salinité sur l'activité enzymatique :

La salinité optimale de l'activité xylanase purifiée avec 1 % (p/v) de xylane de bouleau a été mesuré dans Tampon phosphate 50 mM (pH 8,0) contenant divers

concentrations de NaCl (0–25 %, p/v). L'enzyme l'activité a été dosée pendant 30 min en laissant 10 µg de enzyme (150 U mL⁻¹) pour réagir avec 50 µL (0,5 mg) solution de substrat à 40°C. Pour déterminer la stabilité de l'activité enzymatique à différents niveaux de salinité, l'enzyme purifiée (150 U) a été diluée par 10 dans une solution de la salinité indiquée et incubée pendant 24h à 40°C avec 50 µL de tampon phosphate (50 mM, pH8.0). L'activité enzymatique restante a été mesurée à 4h. intervalles pendant cette période de 24 heures.(Wang *et al.*,2009).

3.3.3. Effet de la source de carbone sur la production de xylanase

L'effet de diverses sources de carbone sur la production de xylanase a été évalué en triple en cultivant NTU-06 dans milieu salin à 37°C. Environ 0,5 % (p/v) de arabinose, cellobiose, glucose, saccharose, xylose, bois de bouleau le xylane, le xylane d'épeautre d'avoine (tous de Sigma) ou la carboxyméthylcellulose (Fluka, Buchs, Suisse) ont été séparément ajouté au milieu. Après 72 h de croissance en secousse flacons, les différentes cultures ont été centrifugées à 4°C et 10000 g pendant 20 min. L'activité xylanase du surnageant a été estimée comme décrit plus loin.(Wang *et al.*,2009).

2.3.4. Optimisation de la taille de l'inoculum

Différents volumes de suspension de spores (0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 et 3,0 ml), préparés à partir de culture sporulée de 5 jours de *Streptomyces sp.* 7b ayant 2×10⁷ spores/ml, ont été utilisés pour ensemercer le XPM.(Bajaj et Singh,2010)

2.4. Microorganisme xylanolytique et Fermentation Submergée

Échantillons de déjections avicoles, humus, sol sous paille de riz ou de blé, fumier de bouse de vache, la balle de riz dégradante, la sciure de bois, les déchets de l'industrie papetière et d'autres ont été inoculés dans bouillon nutritif ayant un pH de 8 à 11 (1,0 g/100 ml) et incubé à 50 °C sous agitation conditions (200 tr/min). Les échantillons enrichis ont été prélevés après différents intervalles de temps (24–72 h) et étalés sur des plaques d'agar au xylane et les plaques ont été incubées à 50 °C pendant 48 h. Les colonies apparues sur des plaques de gélose au xylane ont été soumises à une coloration au rouge Congo(Sharma et Bajaj ,2005). Colonies montrant un halo clair autour d'eux ont été ramassés, purifiés davantage en striant sur du xylane gélose. Les isolats purifiés ont été prélevés et conservés et soumis à la production de xylanase en fermentation immergée. La culture activée a été inoculée dans un bouillon de xylane (50 ml) et

incubé à 50°C sous agitation (200 rpm). Des échantillons ont été prélevés périodiquement après 24 à 96 h, et l'enzyme a été dosée. Un total de 41 bactéries isolats a été criblé pour la production de xylanase en fermentation submergée, et enfin, un isoler 7b, identifié comme *Streptomyces sp.* et désigné comme *Streptomyces sp. 7b*, a été trouvé être le plus grand producteur et sélectionné pour poursuivre ses études. (Bajaj et Singh,2010).

2.5. Déterminations cinétiques

Les taux de réaction initiaux en utilisant du xylane de bouleau comme substrat ont été déterminés à des concentrations de substrat de 0,5–10 mg mL⁻¹ dans un tampon phosphate 50 mM (pH 8,0) à 40°C. Les constantes cinétiques, Km et Vmax, ont été estimées en utilisant la méthode de régression linéaire de Lineweaver et Burk (1934).(Wang *et al.*,2009).

Chapitre III : Résultats et Discussion

3.1. Sélection des micro-organismes

Le test qualitatif réalisé en gélose au xylane a révélé que parmi toutes les souches (15 isolats et 5 souches de la culture de laboratoire), 16 micro-organismes pourraient produire zones claires à la suite de l'utilisation de xylane. Parmi ceux-ci productrices de xylanase positives, 7 souches ont été sélectionnées pour la test quantitatif, en raison du diamètre de halo le plus élevé produit (halo de consommation de xylane/halo de diamètre de colonie > 1,2cm). Selon (Ten *et al.*,2004) le diamètre de la zone de halo est très utile pour prédire le rendement enzymatique, comme aide pour sélectionner des souches à haut niveau de dégradation des polysaccharides.

La méthode qualitative utilisant l'hémicellulose de la bagasse de canne à sucre a montré des résultats similaires à ceux obtenus avec xylane commercial. La meilleure concentration de fraction d'hémicellulose était de 0,5 %. Dans le test quantitatif, les mêmes conditions pour la fermentation à l'état solide ont été utilisées pour toutes les souches et ont été choisies selon les données de la littérature (Pandey *et al.*,1999 ;Haltrich *et al.*,1996 ;Kulkarni *et al.*,1999), visant à fournir les champignons avec les nutriments de base, la température, l'humidité initiale et le pH nécessaires à la croissance. Les micro-organismes avec les activités de xylanase les plus élevées étaient de l'espèce *A. niger* et figuraient également parmi les meilleurs halo producteurs lors du test qualitatif. Les meilleures souches productrices de xylanase sélectionnées pour l'étude cinétique étaient *A. niger LPB 3* et *A. niger LPB 326*, tous deux issus de la collection de cultures de la Division Génie des bioprocédés et biotechnologie. L'activité xylanase la plus élevée a été obtenue par LPB 326, sur 4ème jour de fermentation, correspondant à 1 477 UI/gdm, avec un pH de 6,21 et une aw de 0,987. Le profil de production de xylanase et le pH de la souche LPB 326 sont présentés à la Fig.07.(Giselle Maria *et al.*,2009).

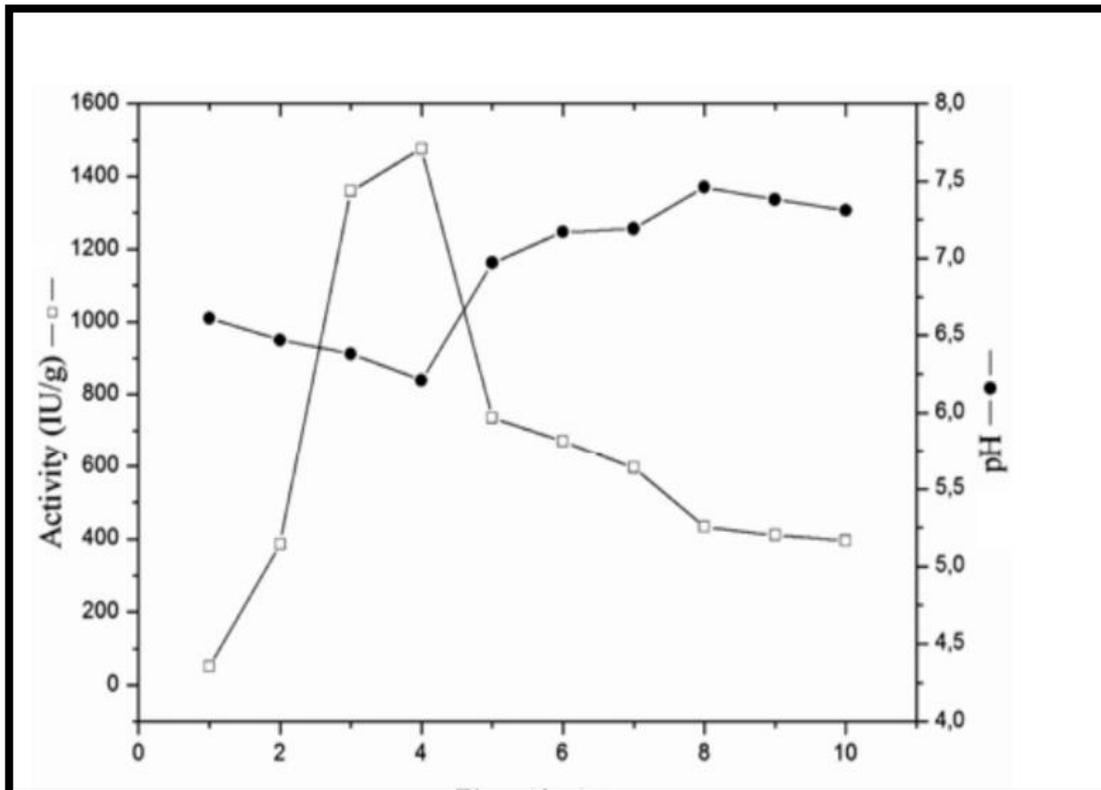


Figure 7 : Activité de xylanase et variation de pH obtenues par SSF avec *B. halodurans* LPB 326 (Giselle Maria et al., 2009).

3.2. Conditions de production de xylanase

3.2.1. Effet de la concentration de NaCl, du pH et de la température :

Évolution dans le temps de la production de xylanase par *B. halodurans* La souche PPKS2 a été étudiée dans un milieu contenant 0,2 % xylane d'épeautre d'avoine, 0,5 % de peptone à pH 11 et température 37°C. La figure 08 montre que la production de xylanase a atteint teneurs maximales après 48 h d'incubation et ensuite, est restée presque constante jusqu'à 60 h et y a diminué après (non illustré). L'organisme s'est développé sur une large gamme de valeurs de pH initiales de 5,0 à 12,0 (Fig. 09a). Le plus haut des productions de xylanase ont été observées à pH 11,0. Sur 60 à 80 % de la production a été conservée à un pH de 9,0 à 10,0 et plus pH 12,0. La température optimale était de 37°C et 85% de la production d'enzymes a été conservée à 40 °C (Fig. 09b). Le nature alcalinophile et halotolérante de *B. halodurans* La souche PPKS-2 était évidente du fait qu'elle se développait dans présence ou absence de NaCl (Fig. 09c). Croissance optimale et la production de xylanase a été obtenue avec 12% de NaCl, par conservant une activité de 70 à 80 % à 14 % de NaCl.

La souche *Bacillus halodurans* PPKS-2 a montré les zones claires sur des plaques de gélose au xylane Birchwood suivies d'une coloration avec Solution de rouge Congo à 1%, indiquant qu'il sécrète des quantités considérables de xylanase. La production de xylanase par *halodurans B* PPKS-2 était élevée lorsque la population cellulaire est entrée dans la phase stationnaire, suggérant que l'enzyme la sécrétion n'est pas associée à la croissance.

L'activité xylanase était le plus élevée après 48 h d'incubation et a diminué sur d'autres augmentation du temps d'incubation. Alors que les xylanases produites par *Bacillus sp.* se sont avérés associés à la croissance, atteignant un maximum après 36 h, et la production d'enzymes est restée plus ou moins la même jusqu'à 48 h (Anuradha et coll, 2007). D'autre part, *Bacillus* SSP-34 a produit maximum de xylanase lorsqu'il est cultivé pendant 96 h (Subramaniyan et coll. 2001).(P.Prakash *et al.*,2011)

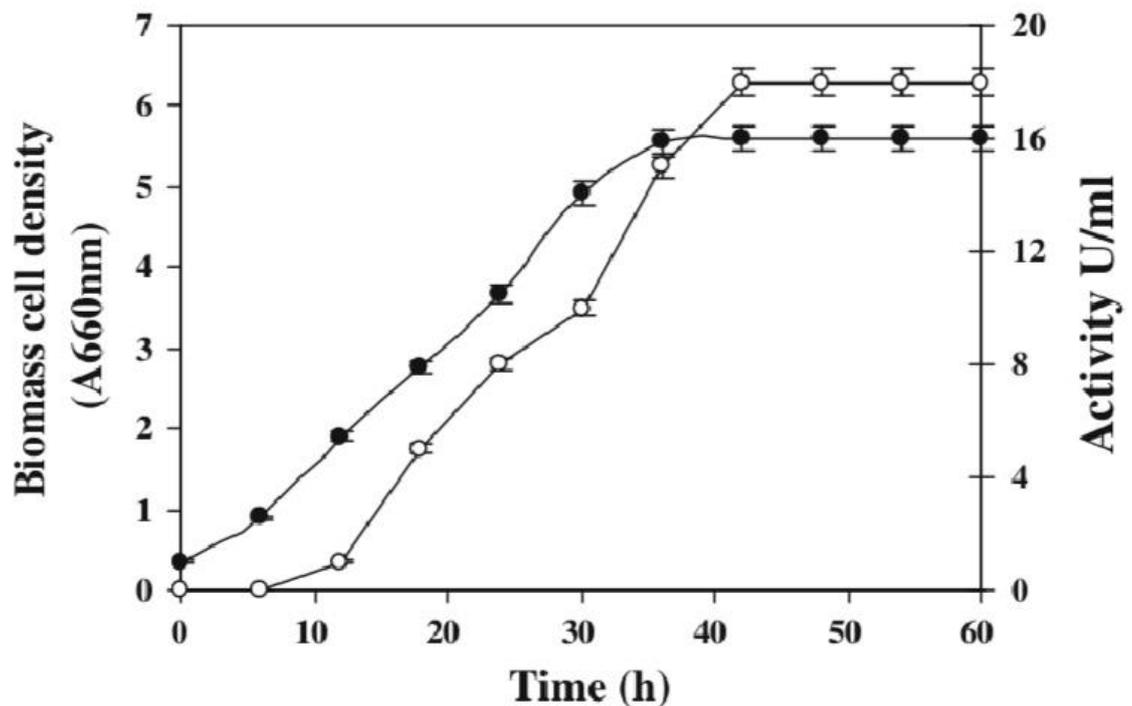


Figure 8: Évolution temporelle de la croissance de *B. halodurans* PPKS-2 sur 0,2 % d'avoine xylane splot, peptone 0,5 % ou hydrolysats de plumes 0,5 %, pH 11 à 37 °C.

Croissance (cercle plein) et activité (cercle vide). Chaque valeur représente la moyenne \pm SD de trois expériences indépendantes.(P.Prakash *et al.*.,2011).

La bactérie pourrait croître au maximum entre 35 et 40C, suggérant des propriétés mésophiles. La souche PPKS-2 a montré une croissance élevée et une production de xylanase sur une large plage de pH de 7,0 à 13,0 avec un maximum à pH 11,0 (Fig. 09). La production de xylanases a été observée à pH 7,0 à 12,0 sont évidemment différents des autres *Bacillus subtilis* ASH et *Bacillus pumilus* ASH (Battan et al. 2007 ; Sanghi et al. 2009) respectivement.(P.Prakash *et al.*,2011).

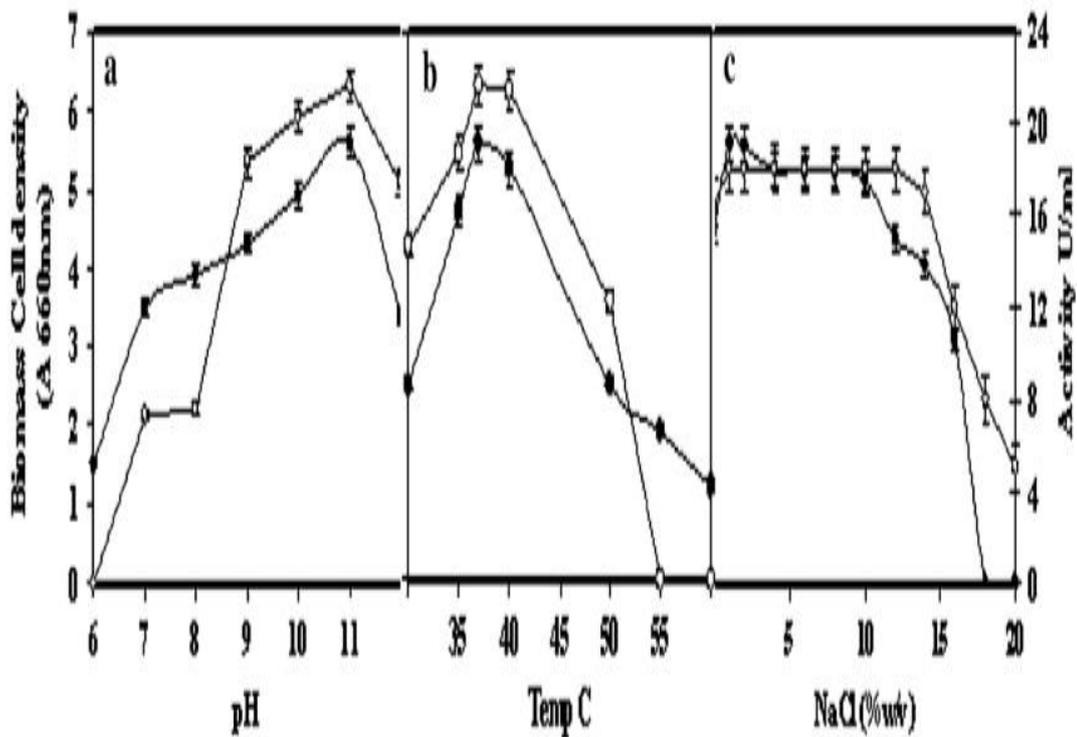


Figure 9: Effet du pH (a), de la température (b) et du NaCl (c) sur la croissance (cercle plein) et production de xylanase alcaline (cercle vide) par B.(P.Prakash *et al.*,2011)

Diverses sources de carbone dans le milieu de croissance a influencé la capacité de la bactérie à produire de la xylanase. La souche PPKS-2 a montré la production de xylanase la plus élevée lorsque le milieu de croissance était additionné de xylane , et le comportement de la l'enzyme était similaire à celle des xylanases d'autres souches (Gessesse et Mamo 1999).(P.Prakash *et al.*,2011).

Les résultats montrent que le les glucides arabinose, xylose et saccharose n'ont pas soutenu la production d'enzymes. Des résultats similaires ont été rapportés pour la

production de xylanase par *Arthrobacter sp.* MTCC5214 (Khandeparkar et Bhosle 2006b).(P.Prakash *et al.*,2011).

3.2.2. Effet de la source de carbone sur la production d'enzymes :

Diverses sources de carbone dans le milieu de croissance ont influencé la capacité de la bactérie à produire de la xylanase. Isoler NTU-06 a montré la production de xylanase la plus élevée lorsque le milieu de croissance a été complété avec du xylane de bouleau ou xylane d'épeautre d'avoine , et le comportement de l'enzyme était similaire à celle des xylanases d'autres souches (Gessesse & Gashe, 1997; Mamo *et al.*, 2006). Culture sur glucose et xylose supportée modérée activités de 72 % et 56 % de l'optimum, respectivement, qui supportent autrement un faible niveau d'activité xylanase. L'activité soutenue par le cellobiose était la plus faible activité à 18%. Les résultats montrent que les glucides l'arabinose, le cellobiose et le xylose n'ont pas favorisé l'augmentation production d'enzymes. Ce résultat était similaire à celui de Khandeparkar et Bhosle (2006b), qui ont observé des production d'enzyme en présence de xylane de bouleau d'*Arthrobacter sp.* MTCC5214 que de l'arabinose, cellobiose et xylose. Prakash et al. (2008) ont observé production maximale d'enzymes avec des polysaccharides plutôt qu'avec des sucres simples, ce qui est cohérent avec notre observation. (Wang et al,2009).

3.2.3. Effet de la taille de l'inoculum sur la production de xylanase

Différents volumes de suspension de spores contenant 2×10^7 spores/ml ont été inoculés dans le milieu de production pour analyser l'effet de la taille de l'inoculum sur la production de xylanase. Enzyme la production a augmenté linéairement avec l'augmentation de la taille de l'inoculum jusqu'à l'inoculation niveau de 2,0 ml (Fig. 10), et par la suite, une petite ou aucune augmentation de la production d'enzymes a été observé. Ainsi, le niveau d'inoculum de 2,5 ml de suspension de spores a été considéré comme le optimal pour obtenir des titres maximum de xylanase (2 660 U/g). (Bajaj et Singh,2010)

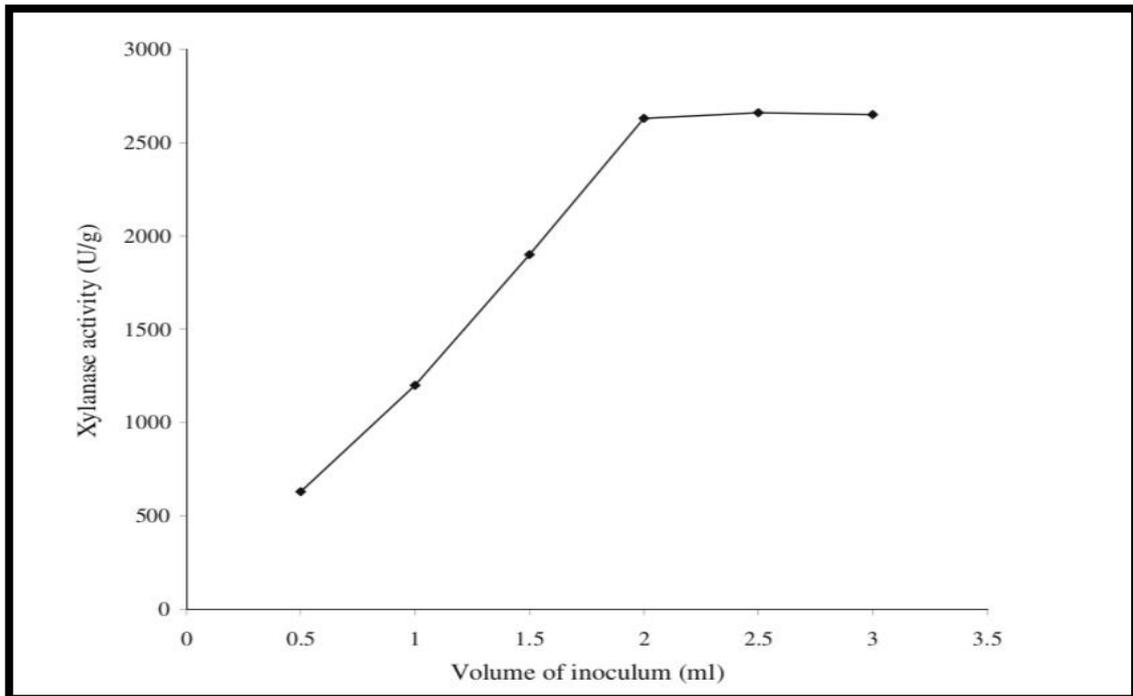


Figure 10: Effet de la taille de l'inoculum sur la production de xylanase. L'inoculum consistait en une suspension de spores contenant 2×10^7 spores/ml. (Bijender et Narendera ;2010).

3.3. Micro-organisme xylanolytique et fermentation submergée initiale

Parmi 41 isolats bactériens testés pour la production de xylanase sur milieu gélosé et en fermentation submergée, l'isolat 7b a montré la capacité de production de xylanase la plus élevée et a été sélectionné pour des études ultérieures. L'organisme a été étudié morphologiquement, physiologiquement et biochimiquement pour son identification. Sur gélose au xylane, l'organisme s'est formé discret, lisses, légèrement dressées, coriaces, d'abord blanc cassé devenant plus tard des colonies de environ 8 à 10 mm de diamètre ; le revers était blanc cassé à légèrement brun sans pigments diffusibles; le mycélium n'était pas fragmenté; le mycélium aérien possédait des chaînes de spores ; et les spores avaient une surface lisse.

L'isolat 7b a montré une bonne croissance sur la plage de pH de 5 à 11 et à une température de 25 à 55 °C. Organisme fortement hydrolysé d'amidon et de lipides, mais ne pouvait pas hydrolyser la gélatine et la caséine et possédait de l'acide L-diaminopimélique. Basé sur les critères du manuel de bactériologie systématique de Bergey (Holt *et al.*,1993) l'organisme 7b a été calé sur le genre *Streptomyces sp.* et désigné comme *Streptomyces sp.* 7b. (Bajaj et Singh,2010).

3.4. Cinétique enzymatique

Les paramètres cinétiques K_m et V_{max} de l'enzyme ont été déterminés à partir de la double réciproque de Lineweaver-Burk tracés de l'activité xylanase à 40° C en utilisant diverses concentrations de xylane de bouleau comme substrat (Fig. 11). Le K_m et Les valeurs V_{max} de la xylanase étaient de 3,45 mg mL⁻¹ et de 387,3 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$, respectivement. Cette valeur de K_m était inférieure que celles obtenues pour *Bacillus halodurans* (Mamo et al.,2006) et *Enterobacter sp.* MTCC 5112 (Khandeparkar &Bhosle, 2006a), indiquant que la xylanase de *Bacillus sp.* NTU-06 avait une affinité plus élevée pour le xylane de bouleau.(Wang et al.,2009).

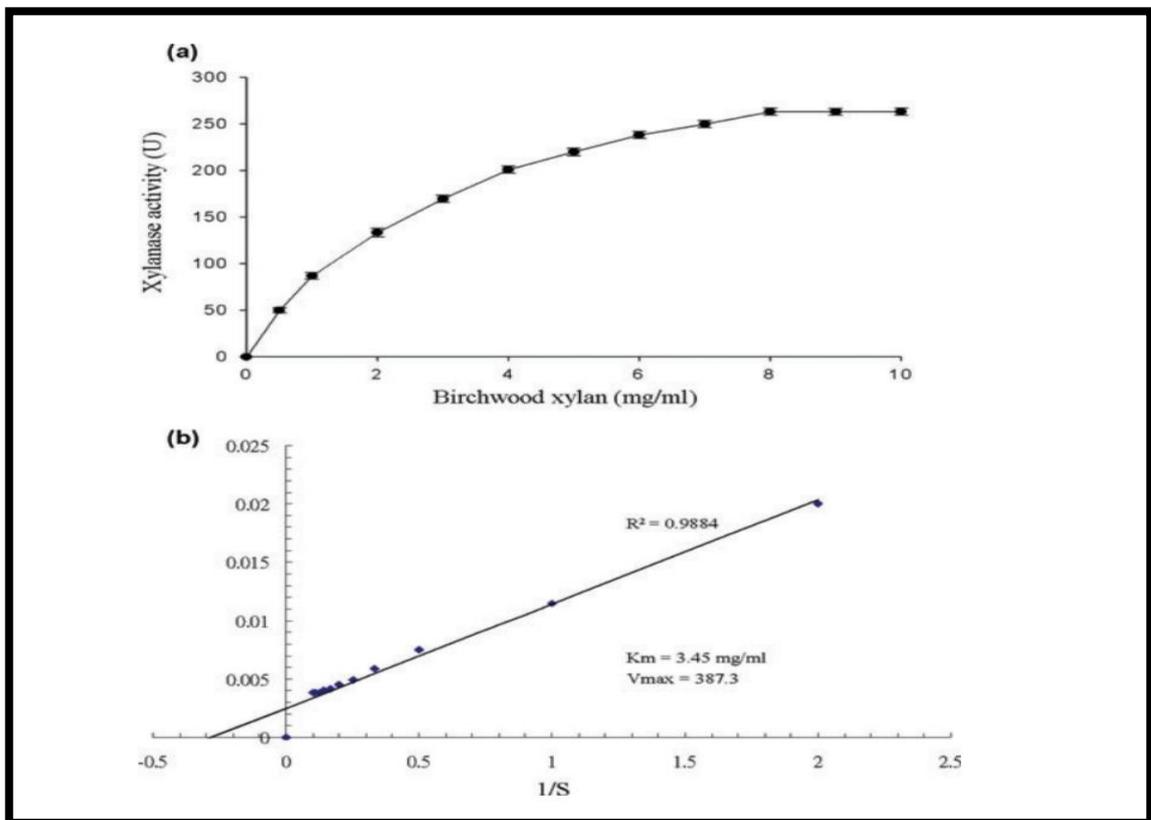


Figure 11: Dosage cinétique de la xylanase. (a) Effet de la concentration du substrat (xylane de bouleau) sur l'activité de l'enzyme xylanase produite par *Bacille sp.* NTU-06. (b) Double tracé réciproque pour déterminer les valeurs V_{max} et K_m de la xylanase.(Wang et al.,2009).

Conclusion

Conclusion

Xylane obtenu à partir de thermophiles et alcalophiles micro-organismes est actuellement utilisé dans divers domaines, y compris l'alimentation, les textiles et la lessive, la fabrication de papier et l'agriculture, ainsi que dans des domaines de recherche en expansion et développement (Beg *et al.*, 2001). Cependant, les industriels les processus sont conduits dans des conditions physiques et des conditions chimiques qui ne peuvent pas toujours être réglées de manière optimale les valeurs requises pour l'activité des enzymes disponibles. En conséquence, les enzymes halophiles et halotolérantes sont d'intérêt scientifique général en raison de leur spécificité adaptation aux milieux à faible potentiel hydrique (Margesin & Schinner, 2001). La xylanase halotolérante a applications potentielles dans le traitement des déchets ainsi que dans la bioremédiation des déchets contenant du xylane matériaux pour une production biosourcée durable. En outre, il peut être utilisé pour produire de la bioénergie.(Wang *et al.*,2009).

Références bibliographiques

Références

- Agnihotri S., Dharm Dutt D., Tyagi C. H. Kumar A., Upadhyaya J. S. Production and biochemical characterization of a novel cellulase-poor alkali-thermo-tolerant xylanase from *Coprinellus disseminatus* SW-1 NTCC 1165. World J Microbiol Biotechnol (2010) 26:1349–1359.
- Ang .S.K., Suraini. A.Y., Madihah. A.A., Madihah. M.S. 2015.Isolation, Screening and Anuradha P,Vijayalakshmi K,Prasanna ND, Sridevi K (2007)Production and properties of alkaline xylanases from *Bacillus sp.*isolated from sugarcane fields.Curr Sci 90:1283-1286.
- Assamoi. A.A., Destain. J., Thonart. P.(2009). Aspects microbiologiques de la production. par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment .13(2). 281-294.
- Battan B, Sharma J, Dhiman SS, Kuhad RC (2007) Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. Enzyme Microb Technol 41:733–739
- Beg Q.K.,Kapoor M.,Mahajan L.,Hoondal G.S.(2001) Microbial xylanases and their industrial applications:a review. Applied Microbiology and Biotechnology,56,326-338.
- Beguin P. et Aubert J.P. (1992). La dégradation de la cellulose par les microorganismes.ANN. Inst Pasteur /Actualité., 3. 91-115.
- Belmokhtar N. Etude de la saccharification enzymatique du miscanthus par des cocktails cellulolytiques de *Trichoderma reesei*. These de doctorat. 2012. Université de Reims Champagne-Ardenne. 195 pages.
- Bijender Kumar Bajaj, Narendera Pratap Singh.2010.Production of xylanaseb from An Alkalitolerant *Streptomyces sp.*7b under Solid-state fermentation, Its purification,and characterisation.Biochemistry and biotechnology 162:1804-1818.
- C.Y.Wang,H.T.Lin&Y.T.Shyu.2009.Production, purification and characterisation of a novel halostable xylanase from *Bacillus sp.*NTU-06.Annals of applied biology:187-197.

- cbabasse, D., Bouchara, J.P., Gentile, L., Brun, S., Cimon, B., Penn, P. (2002). Cahier de formation N°25 : Les moisissures d'insert médical. 230, bd Raspail 75014 Paris, 47: 11-15
- Chauve, M., 2011. Modélisation cinétique de l'hydrolyse enzymatique des substrats cellulosiques. Influence de la structure et morphologie du substrat.
- Collins, T., Gerday, C., Feller, G., 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 29 (1), 3–23
- Coughlan MP (1992) Vers une compréhension du mécanisme d'action des xylanases clivant la chaîne principale. Dans : Visser J, Beldman G, Kusters-van Someren MA (eds) Xylanes et xylanases. Elsevier, Amsterdam, p. 111-139.
- Dashtban, M., Schraft, H., Qin, W., 2009. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *International Journal of Biological Sciences* 578–595. <https://doi.org/10.7150/ijbs.5.578>.
- Dashtban, M., Schraft, H., Qin, W., 2009. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *International Journal of Biological Sciences* 578–595. <https://doi.org/10.7150/ijbs.5.578>.
- De Lopez, S., M. Tissot, and M. Delmas (1996) Integrated cereal straw valorization by an alkaline preextraction of hemicellulose prior to soda-anthraquinone pulping: case study of barley straw. *Biomass and Bioenergy* 10: 201-211.
- Dodd, D., Cann, I.K.O., 2009. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *GCB Bioenergy* 1, 2–17. <https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2009.01004.x>.
- Duchiron. F., copinet. E. (2011). Fermentation en milieu solide. Document (Doc. BIO 620) université de Reims.1-16.
- Dar. R.A., Saba. I., Shahnawaz. M., Sangale. M.K., Ade.A.B., Rather. S.A., Qazi. P.H 2013.Isolation, purification and characterization of carboxymethyl cellulase (CMCase) from endophytic *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin. *Advances in Enzyme Research* 1(4) : 91-96.
- Energy, A. I. (2012). *Key World Energy Statistics*. Paris: International Energy.
- Garcia-Kirchner, O., Muñoz -Aguilar, M., Pérez-Villalva, R., Huitrón-Vargas, C. (2002). Mixed Submerged Fermentation with Two Filamentous Fungi for Cellulolytic

- and Xylanolytic Enzyme Production. In: Finkelstein, M., McMillan, J.D., Davison, B.H. (eds) *Biotechnology for Fuels and Chemicals. Applied Biochemistry and Biotechnology*. Humana Press, Totowa, NJ.
- Gerois J., Grianotta F., De Buyl E., Garnier B. and Frere J.M. (2000). Purification and properties of three endo β -1,4 xylanases produced by *Streptomyces sp.* Strain S38. *Enzyme Microb. Technol.*, 26, 178-186.
- Gessesse A, Mamo G (1999) High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus sp.* by using solid-state fermentation. *Enzyme Microb Technol* 25:68–72
- Gessesse A., Gashe BA. (1997) Production of alkaline xylanase by an alkaliphilic *Bacillus sp.* isolated from an alkaline soda lake. *Journal of Applied Microbiology*, 83,402-406.
- Gilkes NR, Henrissat B, Kilburn DG, Miller RC Jr, Warren RA. 1991. Domains in microbial β -1,4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiol Rev* 55:303 – 315.
- Giselle Maria Maciel^{1*}, Luciana Porto de Souza Vandenberghe¹, Ricardo Cancio Fendrich¹, Bianca Eli Della Bianca¹, Charles Windson Isidoro Haminiuk², and Carlos Ricardo Soccol¹. 2009. Study of Some Parameters which Affect Xylanase Production: Strain Selection, Enzyme Extraction Optimization, and Influence of Drying Conditions. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 14:748-755.
- Guerfali M., Gargouri A., Belghith H. 2011. Catalytic properties of *Talaromyces thermophilus* α -L-arabinofuranosidase and its synergistic action with immobilized endo- β -1,4-xylanase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 68: 192-199.
- Haltrich, D., B. Nidetzky, K. D. Kulbe, W. Steiner, and S. Zupanic (1999) Production of fungal xylanases. *Bio-resour. Technol.* 58:137-161.
- Harris A et Ramalingam C. (2010). Xylanases and its Application in Food Industry. Identification of Potential Cellulolytic and Xylanolytic Producers for Biodegradation of *J Exp Sci.* 1, 01-11.
- Joseleau, J.P., 1980. Les hémicelluloses Les Polymères Végétaux, Polymères Pariétaux et Alimentaires Non Azotés, in: *Les Polymères Végétaux*. Gauthier-Villars, pp. 87–121.
- Juhász, T., Szengyel, Z., Réczey, K., Siika-Aho, M., Viikari, L., 2005. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon

sources. Process Biochemistry 40, 3519–3525.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.057>.

Karunakaran S., Saravanan A., Dhanasekaran S., Senbagam D. And Senthil Kumar. B. (2014). Xylanase Production from *Aspergillus niger*. Int. J. Chem Tech Res., 6(9), 4206-4211.

Khandeparkar R, Bhosle N (2006b) Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by *Arthrobacter sp.* MTCC 5214 when grown in solid-state fermentation. Enzyme Microb Technol 39:732–742.

Kulkarni,N.,A.Shendye, and M.Rao(1999) Molecular and biotechnological aspects of xylanases.FEMS Microbiol.Rev.23:411-456.

Leveau J.Y et Bouix M. (1993). Les microorganismes d'intérêt industriel collection science et techniques agroalimentaires.Technique & Documentation. Edition Lavoisier,Paris.Page :112,128,163.

M.G. Adsul , J.E. Ghule , H. Shaikh , R. Singh , K.B. Bastawde , D.V. Gokhale, A.J. Varma. 2005. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. Carbohydrate Polymers 62 6–10.

Mamo G, Hatti-kaul R, Mattiasson B (2006) A thermostable alkalineactive endo-b1-4-xylanase from *Bacillus halodurans* S7. Puri- fication and characterization. Enzyme Microb Technol 39:1492–1498.

Mathew, G.M., Sukumaran, R.K., Singhanian, R.R., Pandey, A., 2008. Progress in research on fungal cellulases for lignocellulose degradation 11.

Mazza, M., 2009. Modification chimique de la cellulose en milieu liquide ionique et CO supercritique.

Mirande, C., 2009. Dégradation des fibres pariétales et système xylanolytique de *Bacteroides xylanisolvens* XB1AT et *Roseburia intestinalis* XB6B4, espèces bactériennes du microbiote intestinal humain.

Moore, D., Robson, G.D., Trinci, A.P.J., 2011. 21st Century Guidebook to Fungi. Cambridge University Press.New York.706.

- Mouranche A. and Costes C. (1985). Les Hémicellulases Hydrolases et dépolymérase, enzymes d'intérêt industriel. Eds. Gauthier-Villars, Paris ; 165-197.
- Mussatto, S.I., Ballesteros, L.F., Martins, S., Teixeira, J.A., 2012. Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes. Industrial Waste. <https://doi.org/10.5772/36310>.
- Ochs, M., 2012. Synthèse de xylosides et d'oligoxylosides par voie enzymatique. O'Donohue, M.J., 2008. La production de carburants à partir de biomasse lignocellulosique par voie biologique : état de l'art et perspectives. Oléagineux, Corps gras, Lipides 15, 172–177. <https://doi.org/10.1051/ocl.2008.0190>.
- P.Prakask ,S.K.Jayalakshmi,B.Prakash,M.Rubul & K.Sreeramulu.2011.Production of alkaliphilic, halotolerant,thermostable cellulase free xylanase by *Bacillus halodurans* PPKS-2 using agro waste : single step purification and characterisation.Microbiol biotechnol.
- Pandey,A.,P.Selvakumar,C.R.Soccol, and P.Nigam(1999)Solid state fermentation for the production of industrial enzymes.Curr.Sci.77:149-162.
- Pandey. A.(2003). Solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal. 13 (3).81-84.
- Polizeli ML, Rizzatti AC, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Appl Microbiol Biotechnol 2005;67:577–91.
- Prakash P,Jayalakshmi SK,Sreeramulu K(2010)Production of keratinase by free and immobilized cells of *Bacillus halodurans* strain PPKS-2 partial characterization and its application in feather degradation and dehairing of the goat skin.Appl biochem biotechnol 160:1909-1920 .
- Privas E. 2013. Matériaux lignocellulosiques “élaboration et évaluation”. Thèse de Doctorat. L'École nationale supérieure des mines de Paris (France). 168 pages.
- Puls I, Schuseil I (1993) Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. Portland Press, London, pp 1–28.

- Rahardjo, Y.S.P., Tramper, J., Rinzema, A., 2006. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. *Biotechnol. Adv.* 24, 161–179.
- Rahardjo. Y.S.P., Tramper. J., Rinzema. A.M.(2006). conversion and transport phenomena in solid state fermentation: A review and perspectives. *Biotechnology Advances.* 24(2).161-179.
- Raulo, R., 2016. Expression of Glycoside Hydrolases in 257.
- Saidi, A., 2011. La biomasse lignocellulosique et la bioénergie 4–5..
- Sanghi A, Garg N, Kuhar K, Kuhad RC, Gupta VK (2009) Enhanced production of cellulose-free xylanase by *Bacillus Subtilis* ASH and its potential application in biobleaching of kraft pulp. *Bio resources* 4:1109-1129.
- Sá-Pereira, P., Paveia, H., Costa-Ferreira, M. et al. A new look at xylanases. *Mol Biotechnol* 24, 257–281 (2003).
- Sassen MMA, Wolters-Arts AMC (1992) Cell wall texture in shoot apex cells. *Acta Bot Neerl* 41: 25–29.
- Seiboth, B., Metz, B., 2011. Fungal arabinan and l-arabinose metabolism *Applied Microbiology and Biotechnology* 89, 1665–1673. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3071-8>.
- Shleser, R., Hawaii, Department of Business, E.D.& T., 1994. Ethanol production in Hawaii: processes, feedstocks, and current economic feasibility of fuel grade ethanol production in Hawaii : final report. Hawaii State Dept. of Business, Economic Development & Tourism, Energy Division, Honolulu, Hawaii.
- Silveira FQP, Melo IS, Filho EXF(1997) Carbohydrate-hydrolysing enzyme activity production by solid-state cultures of *Trichoderma harzianum* strains. *Rev Microbiol* 28:152-156.
- Site web1:<https://en.engormix.com/bioresource-international-inc/xylamax-xylanase-poultry-nutrition-sh15138-pr37682.htm>.

- Sobal. M. (2002). Physiologie de la croissance mycélienne de *Pleurotus ostreatus* et dégradation des polyphénols de la pulpe et des coques de café. Thèse de doctorat, Université de Provence, Aix-Marseille I. 207.
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredez, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S., Youngs, H., 2004. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* 306, 2206–2211. <https://doi.org/10.1126/science.1102765>.
- Srinivasan M.C., Meenakshi V.R. (2008). Microbiol xylanase for paper industry. *Biochemecal sciences division. India.* 12-13.
- Subramaniyam, R. and R. Vimala, 2012. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: A comparative study. *Int. J. Sci. Nat.*, 3: 480-486..
- Subramaniyan S, in Sandhia GS, Prema P (2001) Control of xylanase production without protease activity *Bacillus sp.* by selection of nitrogen source. *Biotechnol Lett* 23:369–371.
- Ten, L.N., W-T. Ima, M-K.M.S. Kanga, and S-T. Leea (2004) Development of a plate technique for screening polysaccharide-degrading microorganisms by using a mixture of insoluble chromogenic substrates. *J. Microbiol. methods* 56:375-382.
- Watanabe, T. (2013). Introduction: Potential of Cellulosic Ethanol. In: Faraco, V. (eds) *Lignocellulose Conversion*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Whitaker, J. R., A. G. J. Voragen, and D. W. S. Wong (2002) *Handbook of Food Enzymology*. 1st ed., pp. 890-900. CRC, NY, USA.
- Woiciechowski, A.L. et al. (2013). The Pretreatment Step in Lignocellulosic Biomass Conversion: Current Systems and New Biological Systems. In: Faraco, V. (eds) *Lignocellulose Conversion*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Zha. Y., Slomp. R., Groenestijn. J.v., Punt. P.J. 2012. Preparation and Evaluation of Lignocellulosic Biomass Hydrolysates for Growth by Ethanologenic Yeasts. chapter 16. In: Cheng. Q. *Microbial Metabolic Engineering. Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* 834:245-259.

الملخص

في هذه الدراسة وجدنا أن هناك عدة سلالات تنتج الزيلائز مثل *A. niger* LBP3 و *A. niger* LBP326 و *Bacillus halodurans*

أولاً نقوم بعزل واختيار هذه السلالات بطرق مختلفة (كمية ونوعية). تم إجراء الاختبار النوعي بطريقة الكشف على لوح زيلائز أجار. تم فحص السلالات التي أظهرت نشاط الزيلائز ضد الزيلائز أجار كمياً بواسطة طريقة SSF. أو نختار السلالات عن طريق الزراعة على لوحة أجار (وزن / حجم) شوفان مكتوب بالزيلائز و 0.5% (وزن / حجم) في وسط ملح مينير. 0.2% أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن الحد الأقصى لنشاط الزيلائز عند الأس الهيدروجيني=11 درجة مع نمو مثالي من 70% إلى 80% عند 14% كلوريد الصوديوم

Résumé

Dans cette étude, nous trouvons qu'il ya plusieurs souches produisent la xylanase comme *A. niger* LBP3, *A. niger* LBP326 et *Bacillus halodurans*. D'abord nous isolons et sélectionnons ces souches par différentes méthodes (quantitatif et qualitatif). Le test qualitatif a été réalisé par la méthode de dépistage sur plaque de xylane-agar. Les souches qui a montré activité xylane vis-a-vis de xylane-agar ont été criblés quantitativement par la méthode SSF.

Ou bien nous sélectionnons les souches par cultivation sur plaque de gélose composé de 0,2 % (p/v) xylane d'avoine et de 0,5 % (p/v) dans un milieu de sel minéral.

Les résultats obtenus montrent que l'activité maximal de xylane à pH=11 et T=70° avec une croissance optimale de 70 % à 80 % à 14 % de NaCl

Abstract

In this study, we find that there are several strains produce xylanase like *A. niger* LBP3, *A. niger* LBP326 and *Bacillus halodurans*. First we isolate and select these strains by different methods (quantitative and qualitative). The qualitative test was carried out by the detection method on a xylan-agar plate. Strains that showed xylan activity against xylan-agar were quantitatively screened by the SSF method.

Or we select the strains by cultivation on an agar plate composed 0.2% (w/v) oat spelled xylan and 0.5% (w/v) in mineral salt medium

The results obtained show that the maximum activity of xylan at pH=11 and T=70° with an optimal growth of 70% to 80% at 14% NaCl.