



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 : ZEBALDI Mei

Le : Mercredi 22 juin 2022

Thème

**Cinétique et optimisation de production de
xylanase sur milieu solide et milieu liquide**

Jury :

Mme. BOUGANOUN Widad	MCB	Université de Biskra	Président
M. HEBAL Hakim	MCB	Université de Biskra	Rapporteur
Mme. DENDOUGA Wassila	MCA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2021-2022

Remerciements

Après que Dieu nous a donné l'accomplissement de cette œuvre, nous nous tournons vers lui Dieu Tout-Puissant d'abord et avant tout dans toutes les couleurs de louange et de remerciement pour sa générosité dans lesquelles nous avons été immergés, de sorte que nous avons réussi là où nous sommes, en attendant la permanence de sa grâce et de sa générosité.

Nous remercions M. Dr. HEBAL Hakim. Pour sa supervision de cette note, pour le grand effort qu'il a fait avec nous et pour ses précieux conseils qui nous ont ouvert la voie pour terminer cette étude, il a la plus grande appréciation et le plus grand respect.

Nous remercions également chaleureusement les membres du jury.

Nous remercions également le personnel administratif de l'Université de Biskra.

Enfin, nous remercions tous ceux qui nous ont aidés et contribué à ce travail, que ce soit de près ou de loin, même avec un bon mot ou un sourire parfumé.

MERCI

Dédicace

Je dédie ce modeste travail : à

A mon Père Mohamed

A ma Chère Mère Cheikha

Pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.

A mon Frère Aimen et ma sœur Nada

Ma belle-famille : la famille de Cheikha

A tous ceux qui me sont chers : Mon oncle Ahmed

Qu'ils trouvent en moi la source de leur fierté

A qui je souhaite un avenir radieux plein de réussite

A tous mes amis et mes collègues : Rachida, Ouassila, Fatima, Fatiha.....

Ils vont trouver ici le témoignage d'une fidélité et d'une amitié infinie.

A tous ceux qui m'aiment.

Mei

Sommaire

Remerciement	
Dédicace	
Liste des figures	I
Liste des tableaux	III
Liste des abréviations.....	IV
Introduction.....	01

PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Matière lignocellulosique.....	04
1.1 Cellulose.....	05
1.2 Lignine.....	06
1.3 Hémicellulose.....	06
2. Xylanase	08
2.1 Caractéristiques de xylanase	08
2.2 Xylan et xylanases	08
2.3 Classification des xylanases	09
2.4 Structure Xylane	09
2.5 Source de xylanase	10
3. La production de xylanases	11
3.1 Xylanases bactériennes.....	11
3.2 Xylanases fongiques.....	11

3.3 Mode d'action.....	12
3.4 Facteurs influençant l'activité de la xylanase.....	12
3.4.1 Facteurs nutritionnels.....	13
3.4.2 Paramètres du bioprocédé	13
3.5 Application des xylanases	13

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1. Matériel biologique	16
2. Enrichissement et isolement de souches productrices de xylanases	16
3. Production de xylanases	17
3.1. Fermentation en milieu liquide (FML)	17
3.2. Fermentation en milieu solide (FMS)	17
4. Effet de certains paramètres sur la production de xylanases.....	18
4.1. Effet de l'âge et de la taille de l'inoculum	18
4.2. Effet du niveau d'humidité du milieu SSF sur la production de xylanase....	18
4.3. Effet de la période d'incubation	18
4.4. Effet du pH et de la température du milieu	19
4.5. Effet de la source de carbone	19
4.6. Effet de l'agitation	19
4.7. Effet de la source d'azote	20
4.8. Effet de différents additifs	20
5. Extraction de l'enzyme	20
6. Détermination de l'activité enzymatique.....	21

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

I. Résultats	23
1. Micro-organisme xylanolytique et fermentation submergée initial	23
2. Production de xylanase sous SSF.....	24
2.1. Effet de l'âge et de la taille de l'inoculum	24
2.2 Effet du niveau d'humidité du milieu SSF	26
2.3 Effet de la période d'incubation.....	26
2.4 Effet du pH et de la température sur la production du milieu	27
2.5 Effet de la source de carbone.....	28
2.6 Effet de la source d'azote sur la production de xylanase	30
2.7 Effet de l'agitation	31
2.8 Effet de différents additifs sur la production de xylanase.....	32
II. Discussions	34
Conclusion.....	39
Référence bibliographique	
Annexes	
Résumés	

Liste des figures

Figure 1. Structure de la biomasse lignocellulosique (Rubin, 2008). 04

Figure 2. Composition de la biomasse lignocellulosique(Amin et al., 2017)..... 05

Figure 3. Représentation de la molécule de cellulose (Mazza, 2009) 05

Figure 4. Structure de la lignine (Mussatto et al., 2012)..... 06

Figure 5. Structure de la hémicellulose (Eibner, 2015). 07

Figure 6. La structure tridimensionnelle de la biomasse lignocellulosique(Lens et al., 2005). 07

Figure 7. Structure de xylane (Soumaya, 2014) 08

Figure 8.Structure du xylane et des enzymes xylanolytique impliquées dans sa dégradation. (Sunna et Antranikian ,1997) 10

Figure 9. Structure chimique de Rouge Congo..... 16

Figure 10. Production de xylanase par *Streptomyces* sp. *7b* en utilisant différents substrats sous fermentation à l'état solide. 24

Figure 11. Effet de la taille de l'inoculum sur la production de xylanase 25

Figure 12. Effet de la taille de l'inoculum (a) et de l'âge de l'inoculum (b) sur production par *Bacillus pumilus* SV-85S 25

Figure 13. Effet du niveau d'humidité du milieu de production de xylanase 26

Figure 14. Effet de la période d'incubation sur la production de xylanase par *Bacillus pumilus* SV-85S 26

Figure 15. Effet du pH initial du milieu sur la production de xylanase 27

Figure 16. Effet du pH (a) et de la température (b) sur la production de xylanase par *Bacillus pumilus* SV-85S 28

Figure 17. Effet de diverses sources de carbone sur la production de xylanase dans fermentation submergée par *Bacillus pumilus* SV-85S 29

Figure 18. Effet du son de blé (%) sur la production de xylanase en fermentation submergée par *Bacillus pumilus* SV-85S 30

Figure 19. Effet de différentes sources d'azote sur la production de xylanase 30

Figure 20. Effet de la source d'azote sur la production de xylanase dans fermentation submergée par *Bacillus pumilus* SV-85S 31

Liste des figures

Figure 21. Effet du taux d'agitation sur la production de xylanase par <i>Bacillus pumilus</i> SV-85S	32
Figure 22. Effet de la supplémentation du milieu avec différents additifs sur la production de xylanase	33
Figure 23. Effet de divers additifs sur la production de xylanase par <i>Bacillus pumilus</i> SV-85S.....	33
Figure 24. a. Effet de l'huile d'olive (losange noir) et du tween 80 (carré noir) sur la production de xylanase. b Production de xylanase après addition de 0,1 % d'huile d'olive et de 0,2 % de tween 80 individuellement et en combinaison.	34

Liste des tableaux

Tableau I. Quelques microorganismes producteurs de xylanases ainsi leurs propriétés (Kousar, 2013 ; Walia, 2017)..... 12

Tableau II. Liste des xylanases bactériennes et des facteurs affectant leur activité. (Chakdar et al., 2016) 13

Tableau III. produits commerciaux de xylanases bactérie. (Chakdar et al., 2016)14

Liste des abréviations

Aw : Activité de l'eau.

CM-sephadex : carboxyméthyl sephadex.

DNS : Acide dinitrosalicylique.

EDTA : Ethylènediaminetétraacétate.

FML : Fermentation en milieu liquide (en anglais SmF : Submerged fermentation).

FMS : Fermentation en milieu solide (en anglais SSF : Solid state fermentation).

MSS : Solution de sel minéral.

m/v : Masse par volume.

pI : Point Isoélectrique.

p/v : poids/ volume.

rpm : Rotations par minute.

SDS : Dodécylsulfate de sodium.

UFC : Unité Formant Colonie.

V/V : Volume par volume.

XPM : Xylan Production Medium (Milieu de production de xylanase).

Introduction

Introduction

La biomasse lignocellulosique est l'une des ressources renouvelables les plus importantes de la terre (Boussarsar, 2008; O'donohue, 2008 ; Saratale et al., 2012). Il est essentiellement composé de trois polymères : la cellulose, l'hémicellulose et la lignine.

Le xylane est un polysaccharide hétérogène, composé d'unités β -D-xylopyranosyl, liés par des liaisons $\beta(1,4)$ glycosidiques (Collins et al., 2005). Il est produit par une variété de micro-organismes : bactéries, levures et moisissures (Garai et Kumar, 2013 ; Walia et al., 2015).

Les enzymes capables de décomposer le xylane sont des hydrolases xylanases. En raison de la complexité de la structure du xylane, leur dégradation complète implique l'ensemble du système de dégradation du xylane impliquant diverses 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 (Sanghi et al., 2008).

La xylanase est utilisée dans divers domaines industriels tels que la papeterie, le textile, l'alimentation animale, la boulangerie, l'industrie du jus, etc. (Polizeli et al., 2005). Elle est également utilisée en synergie avec de nombreuses autres enzymes, telles que la mannanase, la ligninase, la xylosidase, le glucose et la glycosidase, qui peuvent être exploitées pour générer des biocarburants tels que l'éthanol et le xylitol à partir de la biomasse lignocellulosique (Sun et Cheng , 2002).

Actuellement, la plupart des xylanases disponibles dans le commerce ont été produites par des champignons et sont actives à des pH neutres ou acides et leurs températures optimales pour l'activité sont en dessous de 45°C. La production de xylanases dépend essentiellement du choix de substrat inducteur, du microorganisme et des conditions de fermentation. L'activité xylanolytique des moisissures est beaucoup plus élevée que celle des bactéries et des levures, notamment celles des xylanases extracellulaires produites par *Aspergillus niger*, qui produit 15 isoenzymes, alors que *Trichoderma viride* en produit 13. (Vries et al., 2001).

Introduction

La fermentation est une technique qui convertit biologiquement des substrats complexes en composés simples par divers micro-organismes comme des bactéries et des champignons. (Robinson et al., 2001 ; Machado et al., 2004). La technologie de la fermentation a pris une importance considérable en raison de son coût économique et de ses avantages environnementaux. Il existe plusieurs types de fermentation : la fermentation en milieu solide (FMS) et la fermentation en milieu liquide (FML).

Le contrôle ainsi que la régulation d'une fermentation sont effectués grâce aux paramètres environnementaux suivants : la température, l'aération (oxygène), le pH, l'agitation et la stérilité (Sargantanis et al., 1993), et des facteurs nutritionnels et physiologiques tels que la source de carbone, la source d'azote, les additifs, la taille de l'inoculum, le pH du milieu, la température d'incubation, ...etc.

Le coût élevé du substrat est l'un des obstacles les plus importants à la production industrielle d'enzymes (Gupta et al., 2000). Et comme le prix du substrat joue un rôle crucial dans le coût global de traitement, des substrats bon marché tels que les sous-produits agricoles (tels que la semoule de maïs, la rafle de maïs, son de blé, balle de riz, paille de riz, bagasse et autres matériaux tels que le paillis) sont utilisés comme substrats peu coûteux, disponibles en abondance et pouvant être utilisés avec succès pour produire des produits industriels à haute valeur ajoutée

L'objectif principal du présent travail vise à étudier la cinétique de production de xylanase (hémicellulases) sur le milieu solide et le milieu liquide. Et ce, dans le but de valoriser la biomasse lignocellulosique

Ce travail est divisé en trois parties. La première partie est consacrée à la recherche bibliographique sur la biomasse lignocellulosique, les Hémicellulose et les enzymes dégradant l'hémicellulose (xylanase), La deuxième partie porte sur le matériel et méthodes et la troisième sur les résultats et discussion.

Partie I
Synthèse
Bibliographique

1. Matière lignocellulosique

La lignocellulosique fait référence à la matière sèche végétale (biomasse), dite biomasse lignocellulosique (toutes les plantes et les matériaux d'origine végétale) est la matière organique la plus abondante et renouvelable sur la terre. Elle représente une source très importante de carbone renouvelable disponible en large quantité (Rubin, 2008). Est une matière composite, qui présente au moins deux niveaux de complexité : Le premier niveau est chimique, car en effet la biomasse lignocellulosique est une matière hétérogène, composée de différentes macromolécules telles que la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Tandis que, le deuxième niveau de complexité de la biomasse est structural, car les différentes macromolécules décrites ci-dessus s'associent de façon intime dans une maille tridimensionnelle qui constitue les parois de cellules végétales. (O'Donohue , 2013). (Figure1).

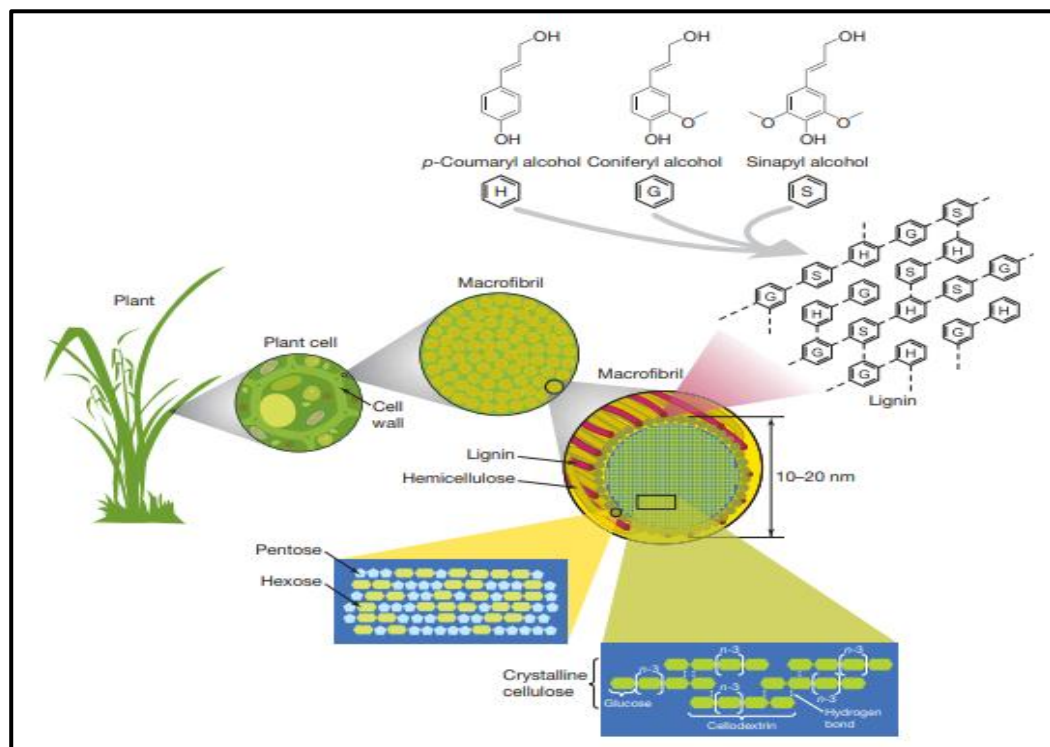


Figure1. Structure de la biomasse lignocellulosique (Rubin, 2008)

La matière lignocellulosique est le constituant principal de la paroi cellulaire des plantes. Elle est constituée essentiellement de trois composants majeurs : la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. (O'Donohue et Debeire, 2006). Les teneurs de différents constituants sont variables d'une espèce végétale à l'autre (Eloutassi et al., 2014).

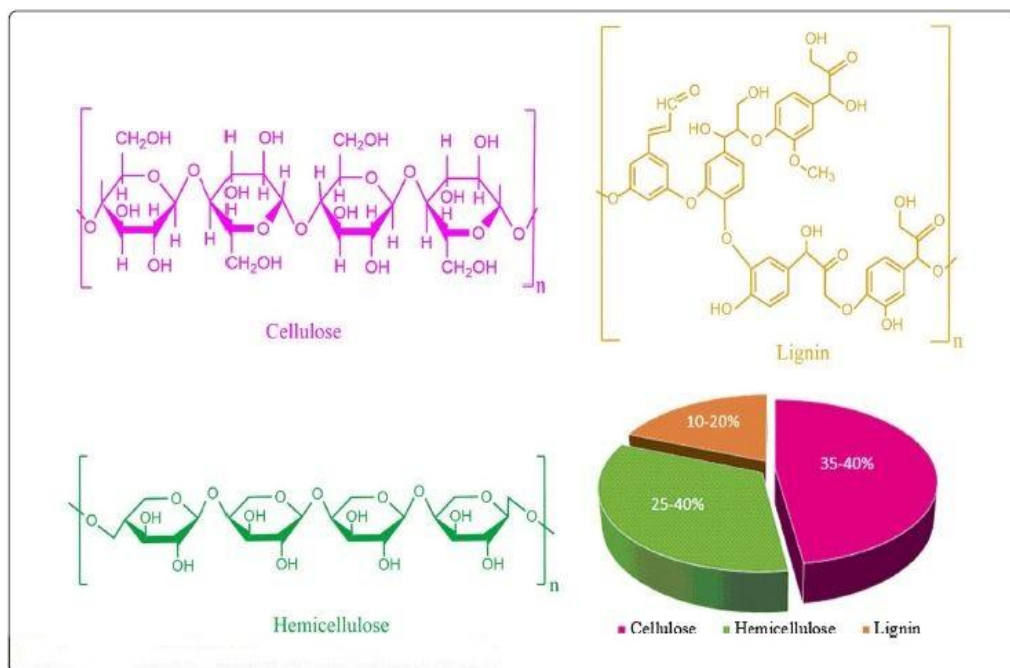


Figure 2. Composition de la biomasse lignocellulosique (Amin et al., 2017).

1.1. Cellulose

La cellulose est le polysaccharide le plus présent dans la nature, constituant 38 à 50% des espèces végétales (bois et plantes). C'est un polymère semi-cristalline composé d'une chaîne linéaire de D-glucose peuvent varier de 200 à 14000 entités reliées entre elles par des liaisons β -1,4 glycosidiques (Figure 3). Le degré de polymérisation de la cellulose dépend de la source végétale dont est issu ce composé (Maki-Arvela et al., 2011).

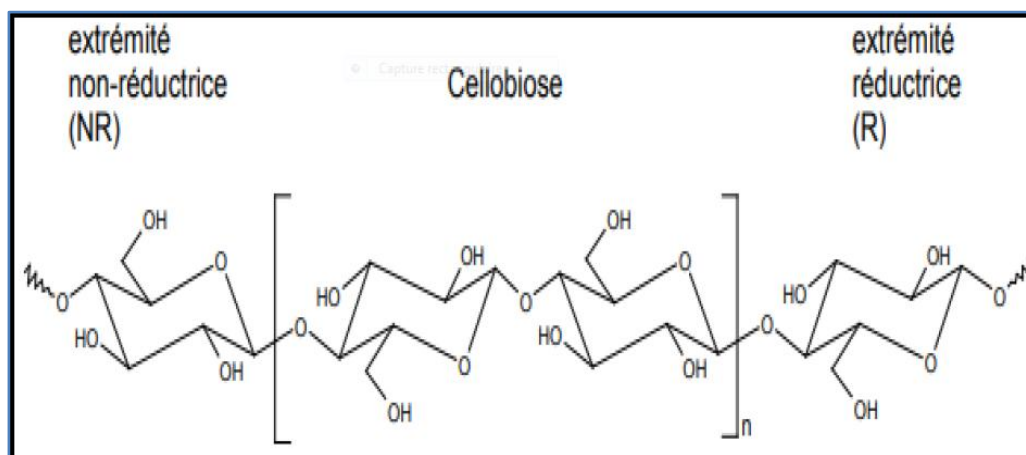


Figure 3. Représentation de la molécule de cellulose (Mazza, 2009).

1.2. Lignine

Sont des polymères phénoliques aromatique le plus abondant dans la nature. Elle est présente dans les parois cellulaires ayant une structure amorphe qui provient de la polymérisation. Constitué de composés phénylpropanoïdes, qui se divise en trois sous unités caractéristiques toutes dérivées de la phénylalanine.

- L'alcool paracoumarylique ou sous unité H (hydroxyphényle)
- L'alcool coniférylique ou sous unité G (guaiacyle)
- L'alcool sinapylique ou sous unité S (syringyle) (Strassberger et al., 2014).

Leur proportion dans la biomasse lignocellulosique varie selon l'espèce, l'âge des tissus et selon l'environnement.

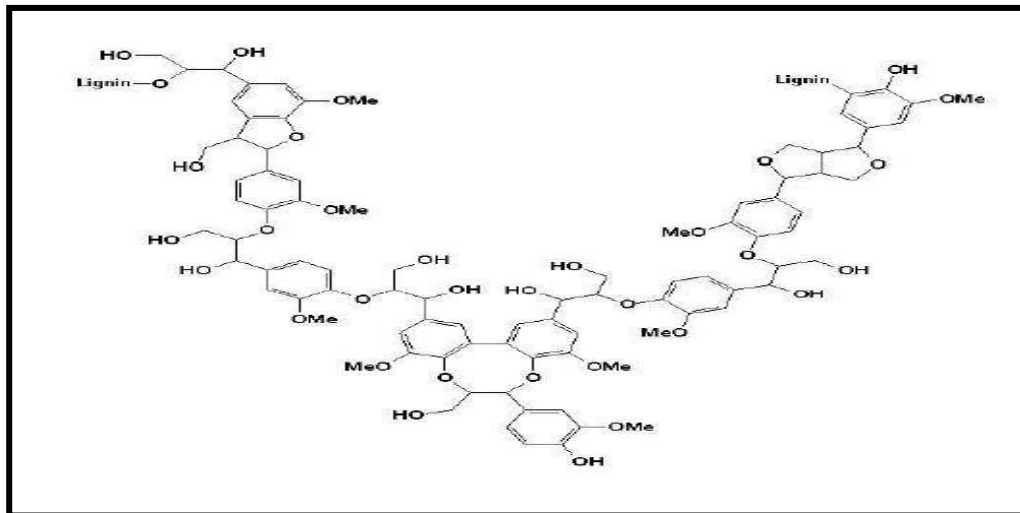


Figure 4. Structure de la lignine. (Mussatto et al., 2012).

1.3. Hémicellulose

Les hémicelluloses représentent entre 23 et 32% de la biomasse lignocellulosique. Contrairement à la cellulose, il s'agit de polysides amorphes et hétérogènes, constitués de pentoses (xylose, arabinose), d'hexoses (mannose, glucose, galactose) et d'acides uroniques. La structure des hémicelluloses varie selon l'origine végétale, le type cellulaire et le stade de maturité des tissus. Selon leur composition, on distingue essentiellement les hétéroxylanes, les xyloglucanes et les mannanes.

A l'intérieur de la cellule végétale, les hémicelluloses permettent de relier les fibres de cellulose avec la paroi cellulaire. Ce sont des liaisons hydrogène qui les relient à la cellulose et des liaisons covalentes à la lignine (Doiseau, 2014).

Le rôle biologique le plus important de l'hémicellulose est de contribuer au renforcement de la paroi cellulaire par son interaction avec la cellulose et, dans certaines parois, avec la lignine.

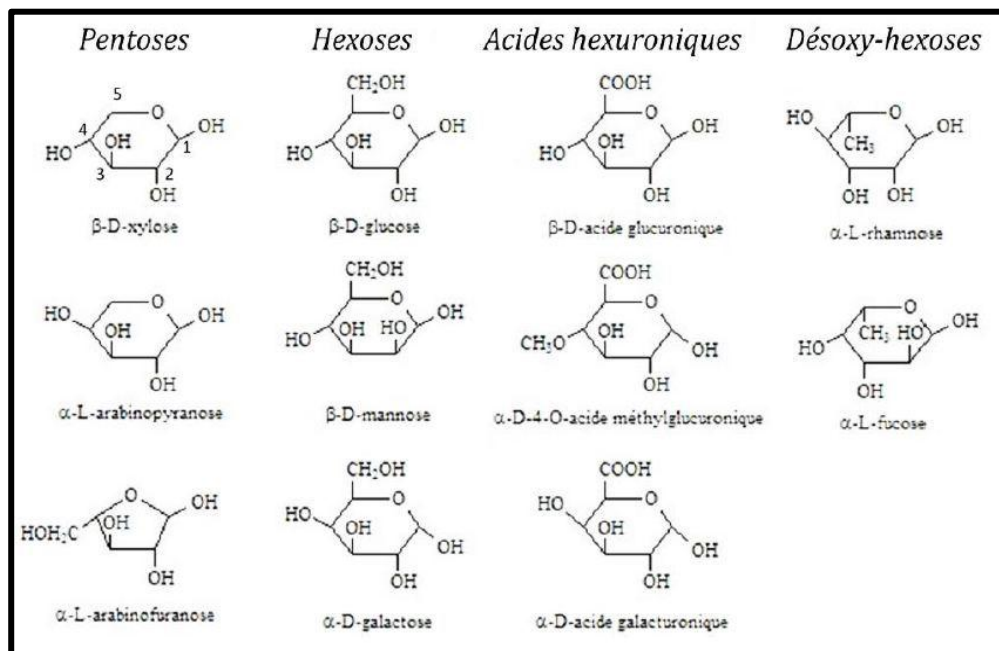


Figure 5. Structure de l'hémicellulose. (Eibner, 2015).

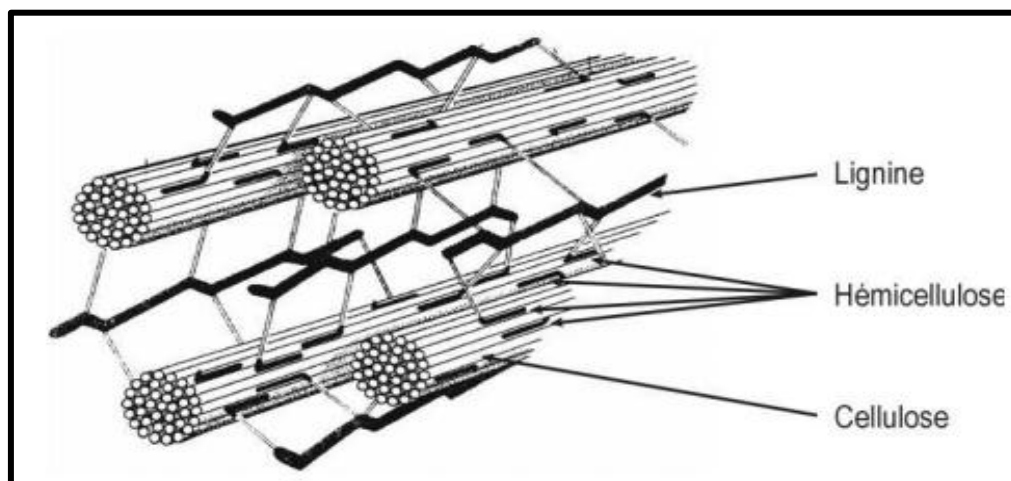


Figure 6. Structure tridimensionnelle de la biomasse lignocellulosique. (Lens et al., 2005).

2. Xylanases

Les xylanases sont des glycosidases (O-glycoside hydrolases, EC 3.2.1.x) qui catalysent l'endohydrolyse des 1,4- β -D-xylosidiques liaisons dans le xylane. Il s'agit d'un groupe répandu d'enzymes impliquées dans la production de xylose. Xylan, le substrat des xylanases, est un polysaccharide structurel majeur dans les cellules végétales, et est le deuxième polysaccharide le plus abondant dans la nature, représentant environ un tiers de tout le carbone organique renouvelable sur terre (Singh et al., 2010).

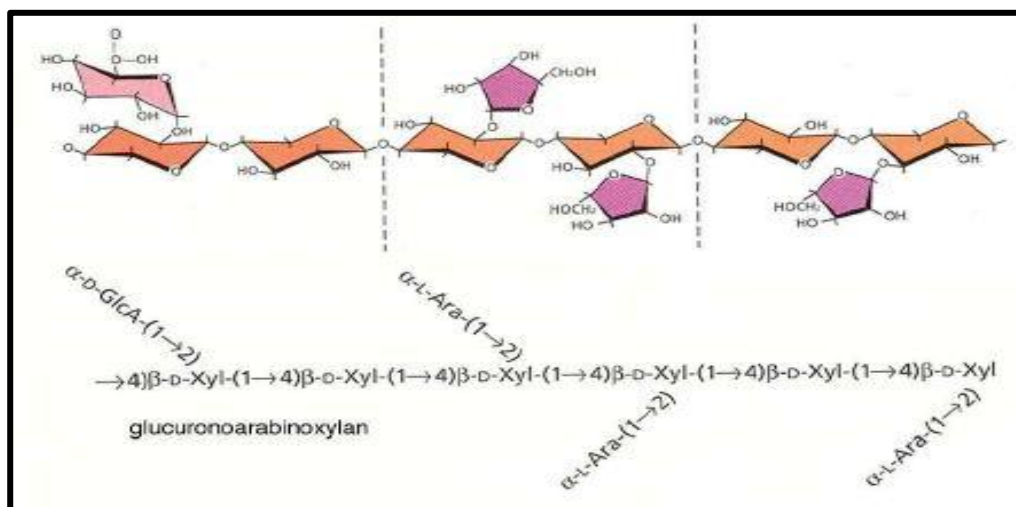


Figure 7. Structure du xylane. (Soumaya, 2014).

2.1. Caractéristiques des xylanases

Selon Bakri, la température optimale des endoxylanases varie entre 40 et 60 °C. Kulkarni et al. (Kulkarni et al., 1999) observent que les xylanases de bactéries sont plus thermostables que les xylanases de moisissures. En général, les xylanases de différents microorganismes sont souvent stables sur une gamme de pH 3-10 et montrent un optimum de pH dans la gamme 4-7. Les points isoélectriques varient entre 3 et 10. Elles constituent une unité protéique de poids en acides aminés est dominée par les acides aspartique, glutamique, glycine, sérine et thréonine (Bakri et al., 2003).

2.2. Xylan et xylanases

Basé sur sa structure complexe, le xylane a besoin de différentes enzymes appelées collectivement xylanases pour son hydrolyse complète. Les xylanases appartiennent essentiellement au groupe d'enzymes hydrolases, précisément aux

glycosides hydrolases. La classification des glycosides hydrolases basée sur la séquence a placé la xylanase dans deux familles GH10 (les enzymes végétales, fongiques et bactériennes comprennent) et GH11 (qui est structurellement indépendante comprend uniquement des enzymes fongiques et bactériennes) (Lafond et al., 2014), mais les xylanases se trouvent également dans d'autres familles de glycosides hydrolases, telles que GH5, 7, 8 et 43.

2.3. Classification des xylanases

Wong et al, classaient les xylanases sur la base de leurs propriétés physicochimiques en deux groupes : celles de faible poids moléculaire (< 30 kDa) et de pI basique et celles de grand poids moléculaire (> 30 kDa) et de pI acide. (Wong et al., 1998).

Cependant, Collins et al, notent que cette classification était incomplète, de nombreuses exceptions avaient été découvertes et approximativement 30 % des endoxylanases (particulièrement issues des moisissures) ne pouvaient pas être classées suivant ce système. Plus tard, un système de classification plus complet a été admis et permettait la classification des xylanases et des glycosidases en général par la comparaison des structures primaires de leurs domaines catalytiques. Ce système regroupait les xylanases en six familles (de A à F). Actuellement, 96 familles de glycosidase ont été identifiées (Collins et al., 2005).

De ce système de classification, les xylanases font partie des familles 10 (autrefois F) et 11 (autrefois G). Des enzymes ayant des activités xylanases ont été aussi trouvées dans les familles 5, 7, 8, 16, 26, 43, 52 et 62. Mais seules les séquences appartenant aux familles 5, 7, 8, 10, 11 et 43 possèdent des domaines catalytiques avec une activité endo-1,4- β -xylanase.

Certaines séquences reportées dans les familles 16, 52 et 62 apparaissent être en fait des enzymes bifonctionnelles contenant deux domaines catalytiques : le domaine des familles 10 ou 11 aussi bien qu'un deuxième domaine de glycosidases.

2.4. Structure du xylane

En fonction de la nature de ses substituants, quatre grandes catégories de xylanes (Motta et al., 2013) peuvent être considérées :

- les **arabinoxylanes**, comprenant uniquement des chaînes latérales d'unités terminales uniques d' α -L-arabinofuranosyl ;
- **Glucuronoxylanes**, basés uniquement l'acide α -D- glucuronique et son dérivé 4-Ométhyl éther ;
- les **glucuronoarabinoxylanes**, dans lesquels l'acide α -D-glucuronique (et 4-O-méthyl- α -D-glucuronique) et l' α -L-arabinose sont tous deux présents ;
- **Les Galactoglucuronoarabinoxylanes**, qui sont caractérisés par la présence de résidus β -D-galactopyranosyl terminaux sur les chaînes latérales oligosaccharidiques complexes des xylanes et se trouvent généralement dans les plantes vivaces.

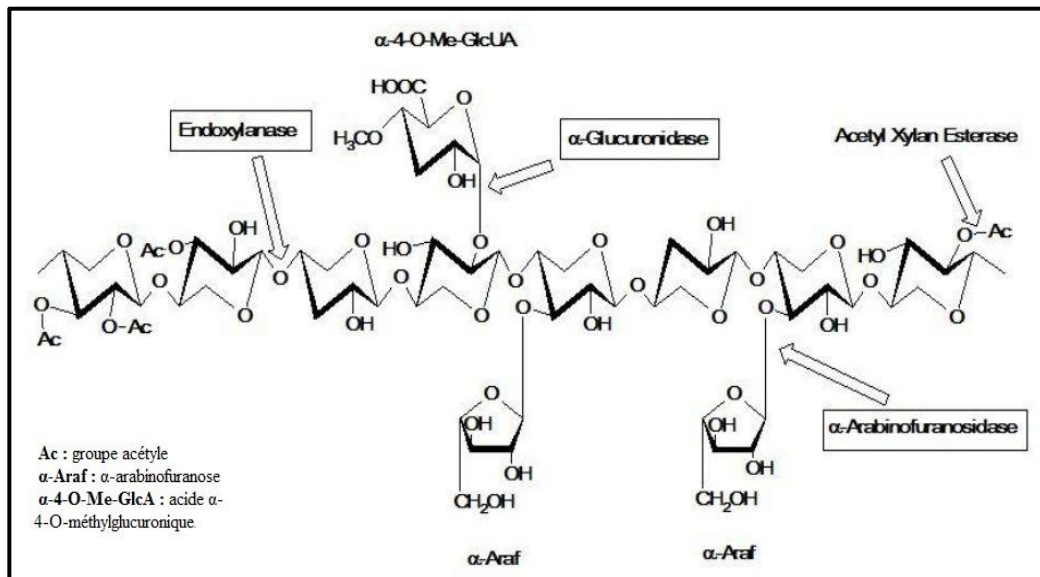


Figure 8. Structure du xylane et des enzymes xylanolytique impliquées dans sa dégradation. (Sunna et Antranikian, 1997).

2.5. Source de xylanase

Un large éventail de micro-organismes comme les champignons, les bactéries, les levures, les algues marines, etc. sont capables de produire de la xylanase. La principale source de xylanase est le champignon, mais la production industrielle de xylanase bactérienne est peu coûteuse, le processus en aval est facile et le taux de production est élevé.

Les champignons filamenteux sont la principale source de synthèse de la xylanase. Les souches fongiques mésophiles comme *Aspergillus*, *Trichoderma* ont la capacité de produire une xylanase thermostable. La xylanase est également signalée par

des champignons thermophiles, notamment *Chaetomium thermophile*, *Humicola lanuginosa* et *Thermomyces lanuginosus*.

Cependant, les bactéries ont un avantage sur les champignons pour la production de xylanase, car les bactéries produisent de la xylanase à un pH neutre ou alcalin, alors que les champignons travaillent dans la gamme acide. Des xylanases dérivées d'algues marines, de protozoaires, de crustacés, d'insectes et d'escargots ont également été signalées (Dutta et al., 2018).

De nombreuses espèces de champignons, y compris les champignons thermophiles ont été décrites également pour la production de xylanase, *thermophila J18*, un thermophile nouvellement isolé de la province de Sinkiang, s'est avéré être un bon producteur de xylanase (Yang et al., 2006).

3. Production de xylanases

3.1. Xylanases bactériennes

Xylanases produites par bactéries (*Bacillus sp*, *Pseudomonas sp*, *Streptomyces sp.*) sont efficaces dans une plage de pH plus large de 5 à 9, avec une température optimale pour l'activité de la xylanase entre 35 °C et 60 °C (Beg et al., 2001 ; Mandal, 2015 ; Motta et al., 2013).

3.2. Xylanases fongiques

Champignons (*Aspergillus spp*, *Fusarium spp*, *Penicillium spp*) Sont d'importants producteurs de xylanase en raison des rendements élevés et de la libération extracellulaire des enzymes (Suprabha et al., 2008). De plus, Dépend la production de xylanases essentiellement du choix de substrat inducteur, du microorganisme et des conditions de fermentation les xylanases fongiques ont une activité plus élevée que les bactéries ou les levures. Cependant, les xylanases dérivées de sources fongiques présentent certaines caractéristiques qui les rendent indisponibles pour certaines applications industrielles (Mandal, 2015) . La plupart de ces xylanases sont efficaces à des températures inférieures à 50 °C et à un pH compris entre 4 et 6(Beg et al., 2000). Par exemple, les xylanases fongiques ne peuvent pas être utilisées dans l'industrie des pâtes et papiers, qui nécessitent un pH alcalin et une température supérieure à 60 °C (Mandal, 2015). Un autre problème avec les xylanases fongiques est la présence d'une cellulase, peu d'études rapportant une xylanase fongique sans activité cellulase

(Subramaniyan et Prema, 2002). Le tableau I présente quelques microorganismes producteurs de xylanases ainsi leurs propriétés.

Tableau1. Quelques microorganismes producteurs de xylanases ainsi leurs propriétés. (Kousar, 2013 ; Walia, 2017)

Micro-organisme	MM (KDa)	Optimum		Point Isoélectrique (pI)
		pH	T (°C)	
<i>Bacillus pumilus SSP 34</i>	20	6.00	50	–
<i>Bacillus sp. GRE7</i>	–	7.0	70	–
<i>Streptomyces cyaneus SN32</i>	20.5	6	60–65	8.5
<i>Penicillium sp. CGMCC 1669</i>	21	4.5	40	–
<i>Penicilium janczewskii</i>	67-94	4	75	–
<i>Sporotricum thermophile</i>	45	7	50	4.2
<i>Aspergillus japonicas</i>	113.2	4	70	–
<i>Acrophialophora Nainiana</i>	22	7.00	55	–

3.3. Mode d'action

Les xylanases sont typiquement de type endo et attaquent la chaîne de xylane de manière aléatoire, ce qui entraîne une diminution du degré de polymérisation du substrat. La xylanase démontre une activité glycotransférase. À partir de xylane de l'hémicellulose, cette enzyme synthétise des oligosaccharides plus longs et l'unité la plus courte du substrat transglycosylé était le xylotriose (Rahmane et al., 2006).

3.4. Facteurs influençant l'activité de la xylanase

Bien que la production de xylanase efficace pour les micro-organismes soit une condition préalable à la fermentation industrielle de la xylanase, le rendement au cours du processus de fermentation est fonction de facteurs :

3.4.1 Facteurs nutritionnels

Les sources de carbone présentes dans les milieux sont les facteurs les plus importants pour la production de xylanase (substrat tel que le son de blé, le son de riz, la farine de soja...etc.) (Kumar et al., 2009 ; Raj et al., 2013). Il a été démontré que le son de blé est le meilleur substrat pour maximiser la production de xylanase (Kapoor et al.,

2008 ; Kumar et al., 2014 ; Nagar et al., 2010 ; Sanghi et al., 2008) et de vitamines et donc la production de xylanase.

3.4.2 Paramètres du bioprocédé

Tels que le pH du milieu, la température d'incubation, l'agitation, etc., influencent également la production de xylanase pendant le processus de fermentation.

La xylanase présente une activité optimale dans une large gamme de conditions d'incubation, telles qu'une température de 30 à 60 °C et un pH de 5,0 à 9,0. Dans de nombreux cas, les conditions optimales de production diffèrent de son activité. Par exemple, la température de production des xylanes était de 30 et 37 °C, mais il a montré son activité optimale à 60 et 55 °C, respectivement (Murugan et al., 2011 ; Sepahy et al., 2011). Le tableau II montre les facteurs, tels que le substrat, le pH et la température, qui influencent l'activité de certaines xylanases bactériennes sélectionnées.

Tableau II. Liste des xylanases bactériennes et des facteurs affectant leur activité (Chakdar et al., 2016).

Bactéries	Activité	Substrat	Conditions de réaction	
			T (°C)	pH
<i>Bacillus brevis</i>	4380 U/mg	Agro-déchets comme la paille de blé	55	7.0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	26.4 IU/ml	Son de blé	80	9.0
<i>Bacillus subtilis BS05</i>	439 IU ⁻¹	Bagasse de canne à sucre	150	5,0
<i>Bacillus halodurans</i>	69 U/ml	Mélasses de canne	80	-

3.5. Application des xylanases

Les enzymes xylanolytique issues de micro-organismes ont attiré une grande attention au cours de la dernière décennie, notamment en raison de leur potentiel biotechnologique dans divers processus industriels (Kuhad et Singh, 1993 ; Niehaus et al., 1999 ; Bajpai, 1999 ; Wang et Saddler, 1992), tels que les industries de l'alimentation humaine, de l'alimentation animale et de la pâte à papier.

1) L'application d'enzymes améliore la fibrillation de la pulpe et la rétention d'eau, la réduction des temps de battage dans les pulpes vierges, la restauration de la liaison et l'augmentation de la liberté dans les fibres recyclées et l'élimination sélective des xylanes des pâtes à dissoudre.

2) La diminution du gain de poids et de l'efficacité de la conversion alimentaire chez les poulets de chair nourris au seigle a été associée à la viscosité intestinale.

3) Le xylane est présent en grande quantité dans les déchets des industries agricoles et alimentaires. Par conséquent, les xylanases sont utilisées pour la conversion du xylane en xylose dans les eaux usées.

4) Certaines xylanases peuvent être utilisées pour améliorer la macération de la paroi cellulaire pour la production de protoplastes végétaux (Wong et al., 1988).

Tableau III. Produits commerciaux de xylanases bactérie (Chakdar et al., 2016).

Produit	Entreprise	Source	Application
Xylanase bactérienne XBK BX9	Leveking, Chine	Bactéries	Pâtisserie
Enzyme Nutri Xylanase	Ultra Biologics Inc., États-Unis	<i>Bacillus subtilis</i>	Additif alimentaire
Xylanase (bactérienne)	Biovet JSC, Bulgarie	<i>Bacillus subtilis</i>	Boulangerie, pâtes et papiers, additif alimentaire
VAI Xylanase	Voest Alpine, Autriche	-	Blanchiment de la pâte

Partie II :
Matériel et Méthodes

1. Matériel biologique

Les souches bactériennes utilisées dans ce travail sont *Bacillus pumilus* SV-85S (Nagar et al., 2010), et *Streptomyces sp. 7b* isolée à partir de fumier de vache (Bajaj et Singh, 2010).

1. Enrichissement et isolement de souches productrices de xylanases

Des échantillons de fumier de vache sont introduits dans du bouillon nutritif enrichi par l'une des sources de carbone brut, à savoir le son de blé, le son de riz, la canne à sucre ou la sciure de bois. Après les avoir été soumises à un traitement à la vapeur à l'autoclave 2 fois pendant 20 minutes chacune à 121 ° C, Ces matières agricoles ont été inoculés dans un bouillon nutritif de pH 8-11 (1,0 g/100 ml) et incubés à 50 °C sous agitation (200 rpm). Les échantillons enrichis ont été prélevés après différents intervalles de temps (24-72 h) et étalés sur des plaques de xylan agar et les plaques ont été incubés à 50 °C pendant 48 h. le milieu xylane agar est composé de xylan d'épeautre d'avoine (0,5 %, p/v), de MSS (1,0 %, v/v) et de gélose (2 %, p/v) ajusté aux pH 8-11 (Bajaj et Singh, 2010).

Les colonies apparues sur les plaques de xylan agar ont été soumises à une coloration au rouge Congo. Les colonies présentant un halo clair autour d'elles ont été prélevées, puis purifiées en les étalant sur de la gélose au xylan (Bajaj et Singh, 2010).

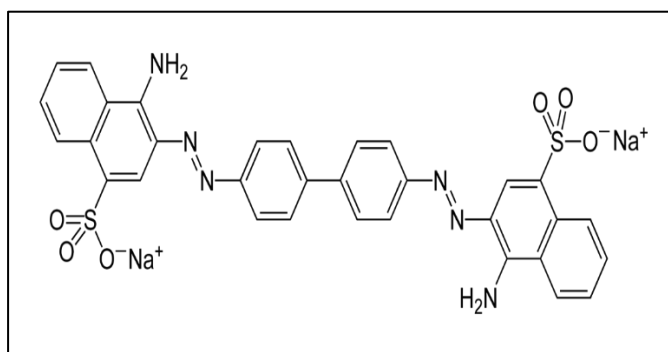


Figure : 9. Structure chimique du Rouge Congo.

Les semences de *Bacillus* sont cultivées dans un tube contenant 5 ml de bouillon nutritif provenant de la culture sur plaque. Ensuite, une boucle pleine (≈ 0.01 ml, Himedia SS-4) de la culture du tube est transférée dans 50 ml de bouillon nutritif (autoclave à 1.05 kg/cm² pendant 20 min) et incubée à 37C pendant 18 h sous agitation à 200 rpm (Nagar et al., 2010).

2. Production de xylanases

2.1. Fermentation en milieu liquide (FML)

La fermentation en état liquide (fermentation submergée) est réalisée dans le milieu de production de xylanase (XPM) composé de : son de blé (10 g) ; source d'azote, solution à 2 % dans un tampon tris 50 mM, pH 8.0 (10 ml) ; solution de sel minéral (MSS 100×) (1 ml) sans NH_4NO_3 (1%), et tampon tris, 50 mM, pH 8 (9 ml). La MSS 100× est utilisée comme source de minéraux dans le milieu de culture de l'organisme, elle est composée de (p/v) NH_4NO_3 (1%), KH_2PO_4 (0,5%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1%), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,01%), NaCl (0,01%), et $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,01%).

Les performances du processus de la fermentation submergée peuvent être influencées par divers facteurs à savoir : L'humidité du milieu, pH et les paramètres nutritionnels tels que : les sources azotées et carbonées, les différents additifs, à savoir glucose, maltose, lactose, xylose, xylane, fructose, Tween-80 ou le dodécylsulfate de sodium (SDS) ont été inclus dans le XPM (Xylan Production Medium) (9 ml de solution à 2% dans le tampon tris, 50 mM, pH 8) pour étudier leur effet sur la production de xylanase.

Les échantillons seront prélevés à intervalles réguliers dans les cultures pour mesurer la croissance cellulaire, la production de spores et les activités enzymatiques des xylanases

2.2. Fermentation en milieu solide (FMS)

La FMS a été réalisée à partir de milieu de base contenant (g/l) son de blé 20,0 ; peptone 5,0 ; extrait de levure 5,0 ; nitrate de potassium (KNO_3) 5,0; dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) 1,0 ; sulfate de magnésium ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,1, pH 7,0.

Les flacons ont été autoclavés à 1,05 kg/cm² pendant 20 minutes et refroidis. Ils ont ensuite étéensemencés avec 0,5 % (p/v) de la culture d'une nuit et ont été incubés à 37°C pendant 20 minutes et incubés à 37°C pendant 48 h sous agitation à 200 rpm. Les contenus ont été centrifugés à 10,000 g pendant 20 min à 4°C, et le surnageant clair exempt de cellules a été utilisé pour le dosage de la xylanase. (Nagar et al., 2010).

3. Effet de certains paramètres sur la production de xylanases

3.1. Effet de l'âge et de la taille de l'inoculum

Différents volumes de suspension de spores de *Streptomyces sp. 7b* (0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 et 3,0 ml) ayant 2×10^7 spores/ml, ont été inoculé dans le milieu XPM, pour analyser l'effet de la taille de l'inoculum sur la production de xylanase. (Bajaj et Singh, 2010).

Contrairement, chez la *Bacillus*, l'inoculum a été préparé ils ont inoculé 50 ml de bouillon nutritif avec *B. pumilus SV-85S* et incubé à 37°C à 200 rpm pendant les 6 heures. Ensuite, 1,0 ml d'inoculum a été transféré à chaque fois dans 50 ml de flacon de milieu de production, qui ont été incubés à 37°C pendant 48 heures sous agitation à 200 rpm. Le filtrat de la culture a été centrifugé et utilisé pour l'analyse de l'activité xylanase, et pour étudier l'effet de la taille de l'inoculum 50 ml de milieu de production a été inoculés à des niveaux de 1.0, 2.0, 3.0 et 4.0. 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 et 5,0 % (v/v) d'un bouillon de culture bactérien de 18 heures. Après une incubation à 37C pendant 48 h, le filtrat de la culture a été centrifugé à 10 000g pendant 20 min. et l'activité xylanase a été déterminée (Nagar et al., 2010).

3.2. Effet du niveau d'humidité du milieu SSF sur la production de xylanase

L'effet du niveau d'humidité du milieu sur la production de xylanase chez *Streptomyces* a été étudié ils ont fait varier le rapport du son de blé et de la solution liquide (1: 1, 1: 1, 5, 1: 2, 1: 2, 5, 1: 3, 1: 3, 5) dans XPM pendant SSF. Le niveau d'humidité du milieu de production a été modifié ils ont utilisé de l'eau distillée stérilisée. (Bajaj et Singh, 2010).

3.3. Effet de la période d'incubation

Des flacons contenant 50 ml de milieu de production ont été inoculés avec une culture d'ensemencement à 1,0 % et incubés à 37°C sous agitation constante à 200 tr/min. Après incubation à différents intervalles de temps (12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 et 96 h), le filtrat de la culture a été centrifugé et l'activité de la xylanase a été déterminée. (Nagar et al., 2010).

3.4. Effet du pH et de la température du milieu

Le pH initial du XPM contenant du tryptone comme source d'azote a été ajusté à pH 5, 6, 7, 8, 9 et 10 ils ont utilisé différents tampons (50 mM), à savoir acétate, phosphate ou tris, et a été inoculé avec des spores, et la SSF a été réalisée à 50 °C avec une agitation intermittente pendant 72 heures (Bajaj et Singh, 2010).

Pour étudier l'effet de la variation du pH du milieu sur la production de xylanase de *Bacillus*, chaque flacon contenant 50 ml de milieu de production de différents pH dans la gamme de 3,0 à 11,0 inoculé avec 1.0 ml d'inoculum de 18 heures et incubé à 37°C pendant 48 heures dans un incubateur à agitation rotative à 200 rpm. L'enzyme a été dosée dans le filtrat de la culture après centrifugation. Ainsi, la production de xylanase a été étudiée à des températures allant de 30 à 55°C. Chaque flacon contenant 50 ml de production a été inoculé avec 1,0 ml d'inoculum de 18 h et incubé à différentes températures (30, 37,40, 45, 50, et 55°C) pendant 48 h avec une agitation constante à 200 rpm. L'enzyme a été dosée dans le filtrat de la culture. (Nagar et al., 2010).

3.5. Effet de la source de carbone

La production d'enzyme a été réalisée ils ont utilisé les sources de carbone suivantes : lactose, stéatite, amidon, glucose, maltose, mannitol, saccharose, fructose, galène, galactose, cellulose, xylose, CM-cellulose, son de blé, paille de blé, balle de riz, paille de paddy, xylane de bouleau, xylane d'avoine et d'épeautre, et sciure de bois, chacun à 1,0 % (p/v). 1,0 % (p/v). Un contrôle dépourvu de source de carbone a également été conservé. De plus, l'effet de la source de carbone sélectionnée sur production d'enzymes a été étudié à ses différentes concentrations (Nagar et al., 2010).

3.6. Effet de l'agitation

Chaque flacon contenant 50 ml de milieu de production de xylanase de *Bacillus* a été inoculés avec 1 ml d'inoculum de 18 heures et incubés à 37°C pendant 48 heures sous agitation à différents taux d'agitation (50, 100, 150, 200, et 250 rpm) dans un incubateur à agitation rotatif. Un flacon a également été maintenu en conditions stationnaires. L'activité xylanase a été déterminée dans les filtrats de la culture (Nagar et al., 2010).

3.7. Effet de la source d'azote

La production d'enzymes de *Bacillus* a été contrôlée à l'aide de diverses sources inorganiques d'azote {[KNO_3], phosphate diammonique [$(NH_4)_2H_2PO_4$], sodium [$NaNO_3$], chlorure d'ammonium [NH_4Cl] et sulfate d'ammonium [$(NH_4)_2SO_4$] et organique (peptone, extrait de levure, extrait de bœuf, tryptone et hydrolysate de caséine) à 0,5 %, individuellement ou en combinaison. Un contrôle dépourvu de source d'azote a également été conservé. En outre, l'effet de la source d'azote sélectionnée sur production d'enzymes a été étudié à ses différentes concentrations (Nagar et al., 2010).

Pour étudier l'effet de différentes sources d'azote sur la production de xylanase de *Streptomyces*, ils ont utilisé le milieu XPM (sans NH_4NON_3), qui est composé de différentes sources d'azote : urée, farine de soja, gélatine, extrait de bœuf, albumine, extrait de levure ou tryptone. Le milieu a été inoculé avec le milieu a été inoculé avec la suspension de spores, la SSF a été réalisée et l'enzyme a été extraite et analysée comme décrit précédemment. (Bajaj et Singh, 2010).

3.8. Effet de différents additifs

L'effet de divers additifs tels que le tween 20, le tween 80, l'huile d'olive, le glycérol, le dodécylsulfate de sodium (SDS), l'éthylènediaminetétraacétate (EDTA), le Triton-X 100 et l'acide oléique a été étudié sur la production de xylanase de *Bacillus*. Les additifs ont été mélangés dans le milieu de production à une concentration de 0,2% v/v (avant l'autoclave), inoculés avec 1,0 ml d'inoculum de 18 h, et incubés à 37°C pendant 48 h dans un incubateur à agitation rotative à 200 rpm (Nagar et al., 2010).

Les différents additifs, à savoir le glucose, le maltose, le lactose, le xylose, le xylane, le fructose, le Tween-80, ou le dodécylsulfate de sodium (SDS) ont été inclus dans le XPM chez *Streptomyces* (9 ml de solution à 2% dans un tampon tris, 50 mM, pH 8) pour étudier leur effet sur la production de xylanase. (Bajaj et Singh, 2010).

4. Extraction de l'enzyme

Les spores ont été récoltées à partir d'une culture de 5 jours de *Streptomyces sp. 7b* cultivée sur de la gélose au xylan, dans 5 ml de tampon tris (50 mM, pH 8) contenant

quelques gouttes de Tween-80. Un millilitre de suspension de spores (2×10^7 spores) a été inoculé dans XPM, bien mélangé et incubé à 50 °C avec agitation intermittente pendant 72 h.

Pour l'extraction de la xylanase après 72 h, 50 ml de tampon tris ont été ajoutés au milieu fermenté et mis sous agitation pendant 1 h, et le contenu a été filtré à travers des filtres à mousseline double couche. Le contenu a été filtré à travers un tissu de mousseline à double couche. Aux résidus, 50 ml de tampon tris ont été ajoutés et de nouveau l'enzyme a été extraite et filtrée de la même manière. Le filtrat des deux extractions a été mélangé et centrifugé ($10\ 000 \times g$ pendant 15 min) pour éliminer les débris en suspension, Le surnageant a été utilisé comme source d'enzyme (Bajaj et Singh, 2010).

5. Détermination de l'activité enzymatique

L'activité xylanase de *Streptomyces* a été évaluée ils ont mesuré la libération de sucres réducteurs à partir d'une solution de xylane à 0,5 % préparée dans un tampon tris (50 mM, pH 8) par la méthode de l'acide 3,5-dinitro-salicylique à 50 °C, ils ont utilisé une courbe standard pour la xylose. Une unité d'activité xylanase a été définie comme suit la quantité d'enzyme produisant 1 μmol d'équivalente xylose par minute dans les conditions de l'essai (Bajaj et Singh, 2010)

L'activité de la xylanase de *Bacillus* ils ont utilisé le même protocole précédent (Nagar et al., 2010).

Partie III :
Résultats et discussion

I. Résultats

1. Micro-organisme xylanolytique et fermentation submergée initiale

Conformément, Bajaj et al., Parmi les 41 isolats bactériens examinés pour la production de xylanase sur milieu gélosé et en fermentation immergée, l'isolat *7b* a montré le rendement le plus élevé.

Pour déterminer l'identité de l'organisme, il a été étudié morphologiquement, physiologiquement et chimiquement. Sur gélose au xylane, l'organisme a formé des colonies discrètes, lisses, légèrement dressées, coriaces, d'abord blanc cassé devenant ensuite grises d'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 une plage de pH de 5 à 11 et à une température de 25 à 55 °C. L'organisme hydrolysait fortement l'amidon et les 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 systémique de Bergey (Holt et al., 1993), l'organisme *7b* était lié au genre *Streptomyces sp* et désigné comme *Streptomyces sp. 7b* (Bajaj et Singh, 2010).

Selon, Nagar et al., dans des conditions optimales de fermentation immergée, *Bacillus pumilus SV-85S*, la production de xylanase ($2995,20 \pm 200,00$ UI/ml) était 9,91 fois plus élevée que l'activité sous milieu de base non amélioré (302,2 UI/ml). De plus, l'activité cellulase était indétectable dans le surnageant acellulaire, indiquant que la xylanase était exempte de cellulase. Le titre enzymatique de l'étude était beaucoup plus élevé que celui rapporté précédemment par Kiddinamoorthy et al. Chez *Bacillus sp. GRE7* sous fermentation submergée utilisant du xylane d'épeautre d'avoine disponible dans le commerce et coûteux comme substrat (Kiddinamoorthy et al., 2008). Poorna et Prema ont rapporté la production de 580 et 430 UI/ml de xylanase par *Bacillus pumilus* ils ont utilisé respectivement du xylane d'épeautre d'avoine et du son de blé (Poorna et Prema, 2006). *Bacillus circulans AB 16* (Dhillon et Khanna, 2000) et *Bacillus subtilis ASH* (Sanghi et al., 2009) ont pu produire respectivement 50 et 410 UI/ml avec le son de blé. (Nagar et al., 2010).

2. Production de xylanase sous SSF

Des substrats bruts d'origine agricole tels que le son de blé, la bagasse, le son de riz et la sciure de bois ont été exposés au SSF par *Streptomyces sp. 7b* après leur prétraitement à la vapeur. La production maximale de xylanase a été obtenue dans le milieu contenant du son de blé (1230 unités/g) après 48 h de fermentation (Figure. 10).

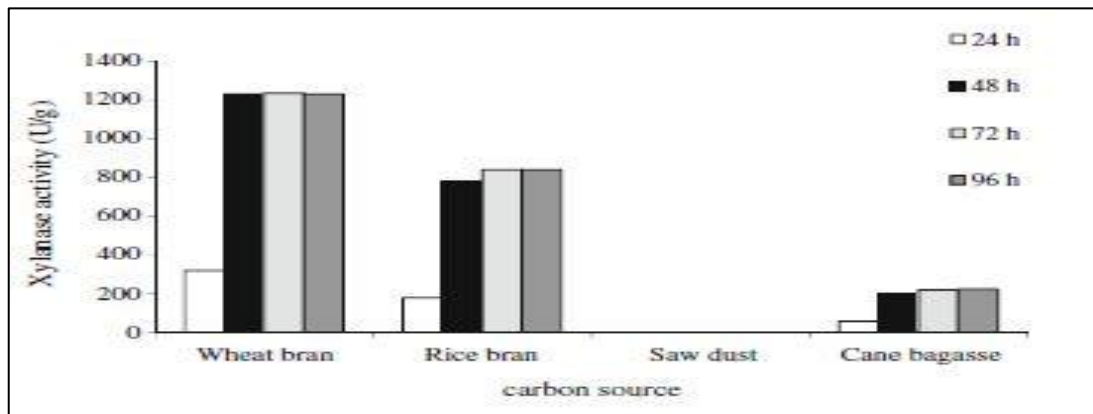


Figure : 10. Production de xylanase par *Streptomyces sp. 7b* en utilisant différents substrats sous fermentation à l'état solide (Bajaj et Singh, 2010).

Et pour le milieu contenant du son de riz, la production de xylanase était la suivante : 740 et 840 unités/g après 24 et 48 h, respectivement. En revanche, la sciure de bois n'a pas du tout stimulé la production de xylanase, tandis que la bagasse a provoqué une diminution du niveau de xylanase (200-225 unités/g).

2.1. Effet de l'âge et de la taille de l'inoculum

Différents volumes de suspension de spores ayant 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. Notez que la production d'enzymes augmente de manière linéaire avec l'augmentation du volume d'inoculum jusqu'au niveau d'inoculation de 2,0 ml (Figure .11). Après 2,0 ml du niveau d'inoculation, la production d'enzymes était stable à une valeur de (2660 unités/g) même si le niveau d'inoculation était augmenté. Ainsi, le niveau d'inoculum de 2,5 ml de suspension de spores a été considéré comme étant l'optimum pour obtenir des titres de xylanase maximaux (2 660 U/g). (Bajaj et Singh, 2010).

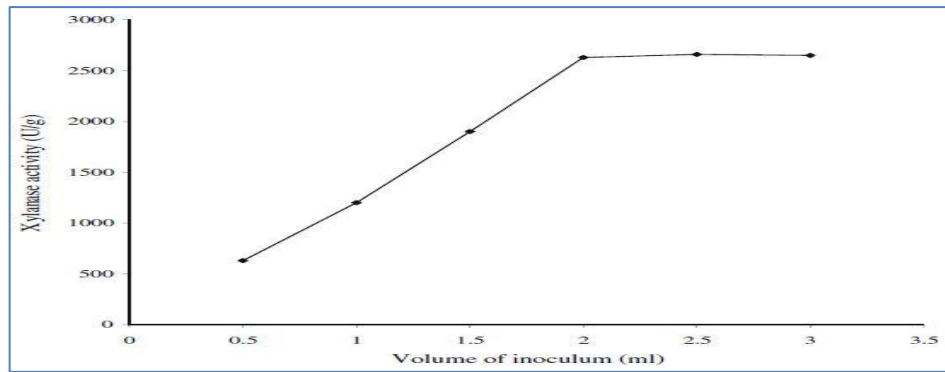


Figure: 11. Effet de la taille de l'inoculum sur la production de xylanase. (Bajaj et Singh, 2010).

Conformément, Nagar (Nagar et al., 2010). La production de xylanase a culminé à 456, 3 UI / ml après l'ajout d'un inoculum à 1, 0% (v / v) provenant d'une culture âgée de 18 h au milieu de production (Figure. 12a). Bien que la taille d'inoculum ait augmenté au-delà de 1,0 %, une diminution du titre enzymatique a été signalée. Plusieurs chercheurs ont rapporté l'utilisation de 1,0 à 5,0% (v / v) d'inoculum pour l'hyperproduction de xylanase (Battan et al., 2007 ; Kar et al., 2006 ; Subramaniyan et al., 2001).

Quant à l'effet de l'âge sur l'inoculum, elle a été étudiée ils ont inoculé 50 ml de milieu de production avec 1 % d'inoculum d'une culture de *B. pumilus SV-85S* âgée de 6 à 42 h (Figure. 12b). La production était la plus élevée pendant la phase logarithmique, avec un maximum de 629,6 UI/ml à 18 h [22×10^7 unités formant colonies (UFC)/ml], mais a diminué par la suite. L'activité enzymatique avec un inoculum de 12 h (9×10^6 UFC/ml) était de 223,3 UI/ml. Ces observations sont en accord avec celles de (Sanghi et al., 2009).

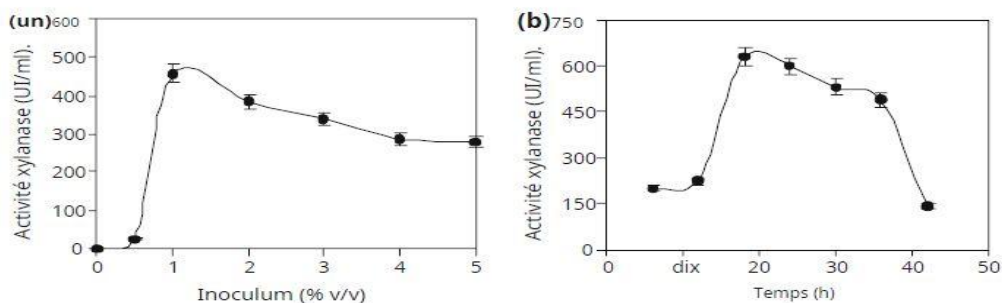


Figure: 12. Effet de la taille de l'inoculum (a) et de l'âge de l'inoculum (b) sur la production par *Bacillus pumilus SV-85S* (Nagar et al., 2010).

2.2.Effet du niveau d'humidité du milieu SSF

Différents rapports de substrat solide à agent mouillant ont été testés, pour étudier l'effet du niveau d'humidité moyen sur la production de xylanase. Le titre le plus élevé de xylanase a été obtenu dans le milieu contenant un rapport son de blé sur solution liquide de 1: 2, 5 (Figure. 13). (Bajaj et Singh, 2010).

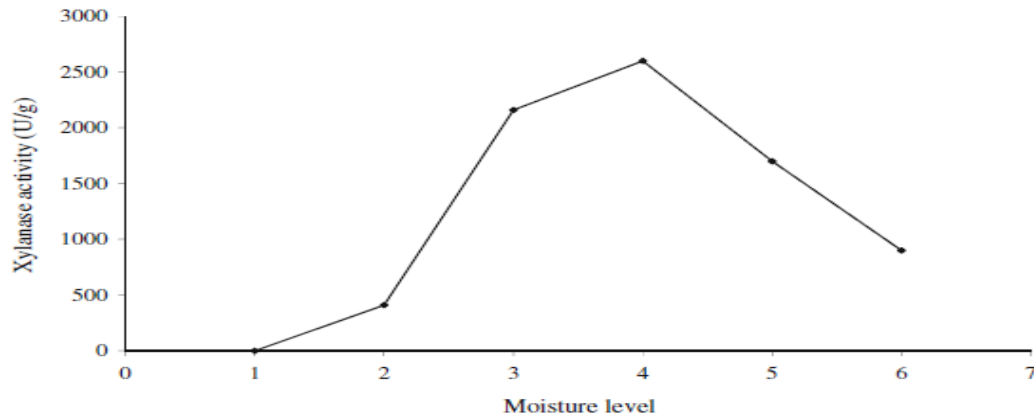


Figure 13. Effet du niveau d'humidité du milieu de production de xylanase. Les chiffres 1 à 6 sur l'axe des x indiquent un rapport solide/liquide de 1:1, 1:1,5, 1:2, 1:2,5, 1:3 et 1:3,5, respectivement. (Bajaj et Singh, 2010).

2.3.Effet de la période d'incubation

Après 36 h d'incubation, l'activité xylanase était plus élevée à 594,07 UI/ml et diminuait malgré une augmentation du temps d'incubation (Figure. 14).

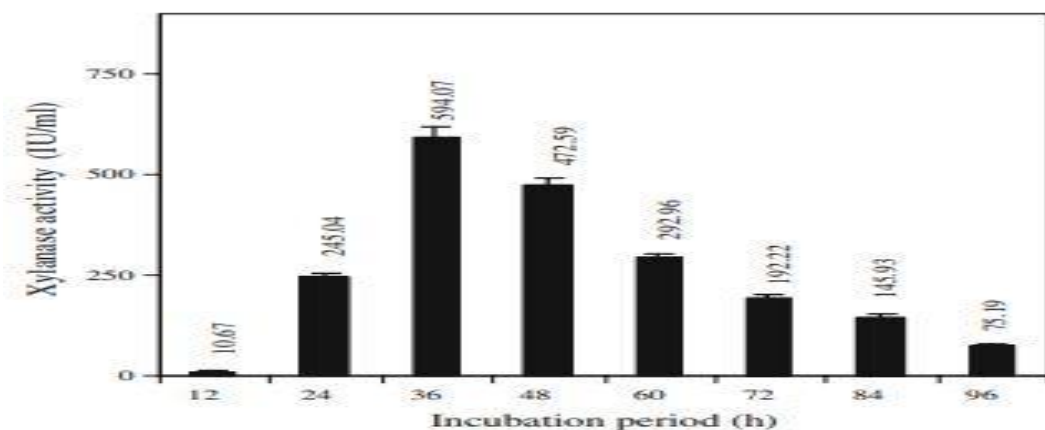


Figure 14. Effet de la période d'incubation sur la production de xylanase par *Bacillus pumilus* SV-85S. (Nagar et al., 2010)

Xylanases produites par *Bacillus sp.* Elle était associée à la croissance, atteignant son maximum après 24 h, et la production d'enzymes restait pratiquement inchangée jusqu'à 48 h. (Anuradha et al., 2007) En revanche, *Bacillus amyloliquefaciens* a sécrété l'activité xylanase la plus élevée dans les surnageant de culture après 48 h de croissance (Breccia et al.,1998). *Bacillus SSP-34* a produit une activité xylanase maximale (380 UI/ml) lorsqu'il a été cultivé pendant 96 h (Subramaniyan et al., 2001).

2.4.Effet du pH et de la température du milieu

Bajaj et al élevé l'organisme dans XPM en utilisant du son de blé comme source de carbone et du tryptone comme source d'azote, ajustés pour différents niveaux de pH (5, 6, 7, 8, 9 et 10) ils ont utilisé une solution d'acétate, de phosphate ou de Tris.

Vous obtenez le plus haut calibre de xylanase dans le milieu de production ; 2620 unités/g à pH 7 et 2680 unités/g à pH 8, comme le montre la figure 15. Une activité enzymatique significative a également été trouvée dans le milieu de production à pH 9 (1900 unités/g).

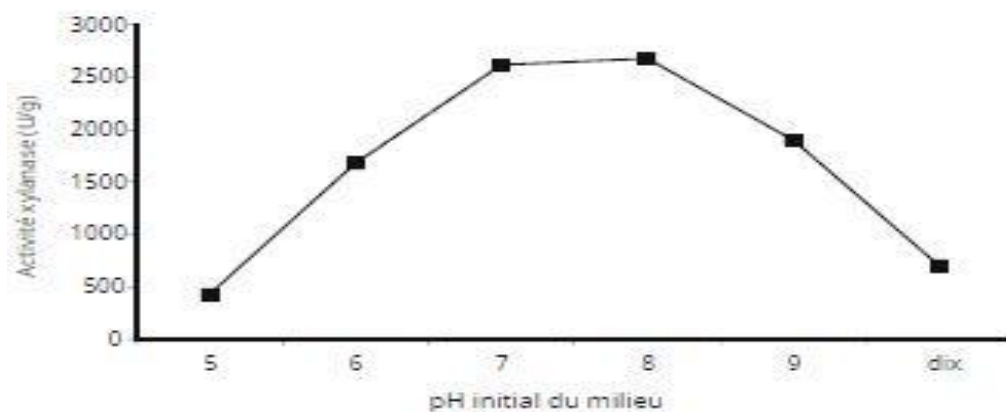


Figure 15. Effet du pH initial du milieu sur la production de xylanase (Bajaj et Singh, 2010).

Le pH du milieu est un des paramètres régulateurs lors de la fermentation (Gupta et al., 2000). Nagar et al ont étudié l'effet du changement du pH du milieu de production de 3 à 11 a été étudié sur la production de xylanase. Une production substantielle de xylanase a été observée entre pH 5 et 8, avec un maximum à pH 6. L'activité enzymatique était de 486, 13 ; 604, 99 ; 458, 68 et 336, 77 UI / ml à pH 5, 6, 7 et 8, respectivement (Figure. 16a). Un pH optimal similaire pour la production de xylanase a été rapporté par Kohli et al. (Kohli et al., 2001). Cependant, la production d'enzymes par *B. subtilis* ASH (Sanghi et al., 2009) , *B. circulans* AB 16 (Dhillon et Khanna, 2000),

B. pumilus ASH (Battan et al., 2007). et *Bacillus licheniformis* (Archana et Satyanarayana, 1998), était le plus élevé à pH 7,0. Généralement, les champignons produisent de la xylanase à pH acide tandis que les bactéries produisent de la xylanase à des valeurs de pH plus élevées (Dhiman et al., 2009). Cependant, certains champignons tels que *Aspergillus fischeri* Fxn 1 et *A. nidulans* KK-99 se sont avérés produire des xylanases alcalines (Taneja et al., 2002).

Les microbes sont connus pour produire des titres enzymatiques élevés à leur température de croissance optimale. La température optimale pour la production de xylanase par *B. pumilus* SV-85S s'est avérée être de 37 ° C. L'activité enzymatique était à 30°C (438,81 UI/ml) : 37°C (665,03 UI/ml) et 40°C (380,12 UI/ml), tandis qu'à 45°C l'activité était minimale (Figure. 16b). Une température optimale similaire pour la production d'enzymes a été rapportée pour certains *Bacillus* sp. (Battan et al., 2007 ; Gessesse et Mamo, 1999 ; Sanghi et al., 2009).

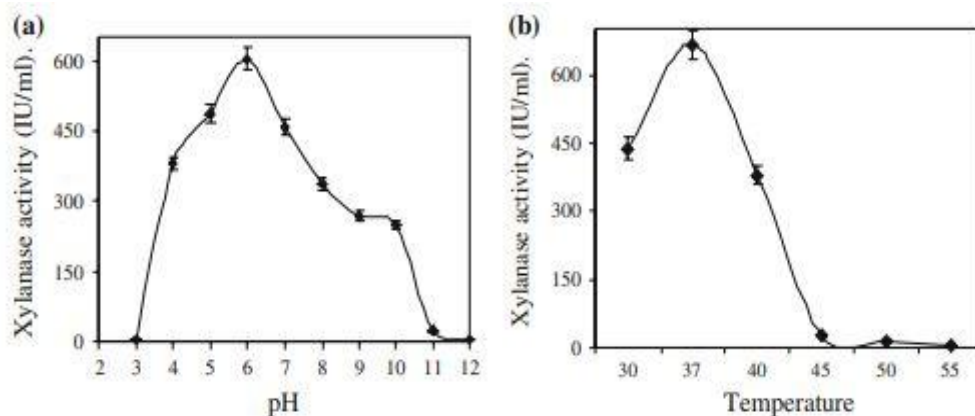


Figure : 16. Effet du pH (a) et de la température (b) sur la production de xylanase par *Bacillus pumilus* SV-85S (Nagar et al., 2010).

2.5.Effet de la source de carbone

La source de carbone est l'un des constituants essentiels du milieu de fermentation microbien qui affecte la croissance et le métabolisme cellulaires globaux. Ils ont essayé différents glucides et agrorésidus pour observer leur effet sur la production d'enzymes.

Chez les témoins, la production d'enzymes était négligeable. Parmi les différentes sources de carbone, le son de blé a soutenu la production de xylanase la plus élevée

(715,64 UI/ml) suivi de xylane d'épeautre d'avoine (690,45 UI/ml). Le xylane de bois de bouleau a entraîné la production de 650,32 UI/ml de xylanase (Figure. 17).

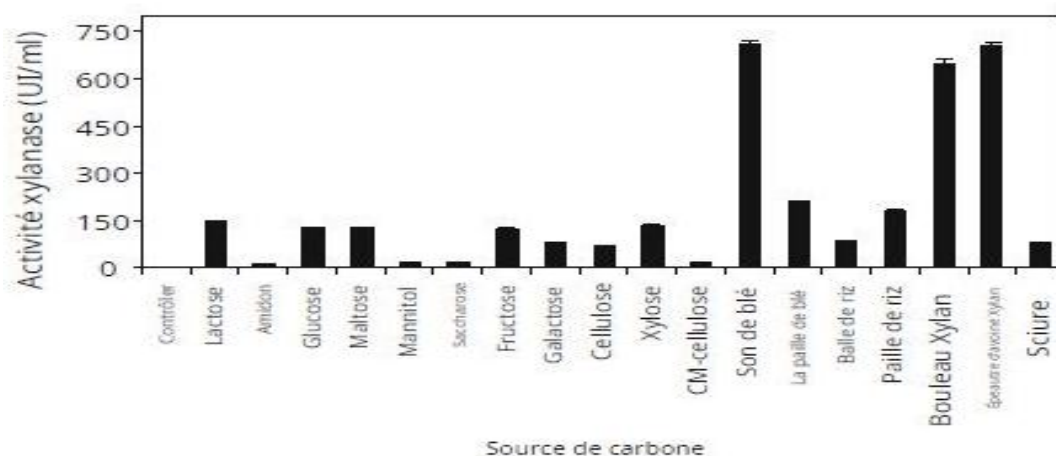


Figure 17. Effet de diverses sources de carbone sur la production de xylanase dans fermentation submergée par *Bacillus pumilus* SV-85S (Nagar et al., 2010).

Le titre enzymatique en présence de sucres était beaucoup plus faible par rapport au son de blé ou au xylane. Bien que les substrats hémicellulosiques tels que le son de blé, la paille de riz, la paille de blé, les flocons de soja, le son de riz, la bagasse de canne à sucre, la sciure de bois, les coques d'arachide et autres se soient avérés soutenir la production de xylanase, le titre enzymatique le plus élevé a été obtenu avec le son de blé (Battan et al., 2007 ; Gawande et Kamat, 1999 ; Gupta et al., 2000 ; Kuhad et al., 1998 ; Poorna et Prema, 2006 ; Sanghi et al., 2009 ; Savitha et al., 2007 ; Sharma et al., 2007 ; Taneja et al., 2002). Le niveau de production plus élevé en présence de son de blé pourrait être dû à sa forte teneur en xylane.

La production de xylanase s'est avérée varier avec le changement de la concentration de son de blé. L'activité enzymatique a été mesurée en présence de 0,25 à 4,0 % de son de blé. Il s'est avéré qu'elle était la plus élevée avec 2,0 % (p/v) de son de blé, et il y avait une baisse de la production de xylanase ils ont augmenté la concentration de son de blé au-delà de 2,0 % (Figure.18). Cela pourrait être dû à la formation d'une suspension épaisse et à un mauvais mélange des substrats dans les flacons agités (Nagar et al., 2010).

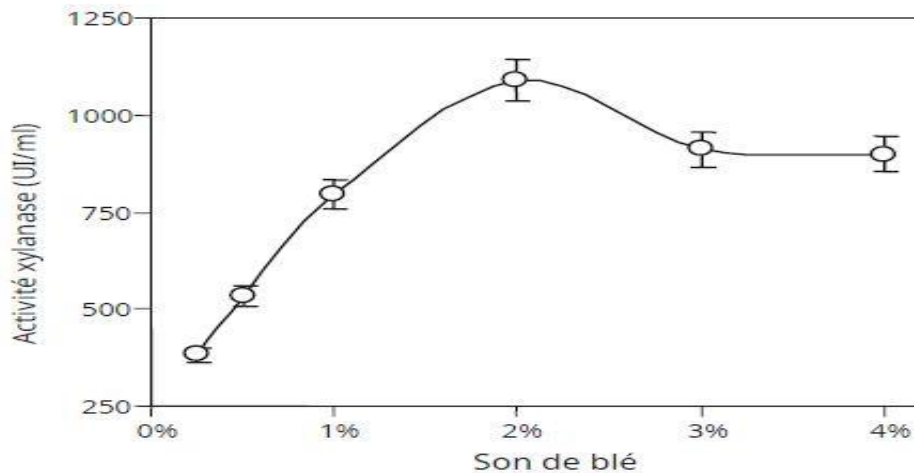


Figure 18. Effet du son de blé (%) sur la production de xylanase en fermentation submergée par *Bacillus pumilus* SV-85S (Nagar et al., 2010).

2.6. Effet de la source d'azote sur la production de xylanase

Le milieu de production de xylanase (XPM) a été complété avec différentes sources d'azote organique telles que l'urée, la farine de soja, la gélatine, l'extrait de bœuf, l'albumine, l'extrait de levure ou la tryptone, et le SSF a été réalisé.

Toutes les sources d'azote, à l'exception de l'urée et de l'albumine, ont augmenté la production de xylanase par rapport à celle du témoin. L'amélioration maximale du titre de xylanase a été soutenue par la tryptone (77 %) et l'extrait de bœuf (76 %), tandis que l'extrait de levure (46 %) et la farine de soja (36 %) l'ont fait modérément ; la gélatine ne pourrait augmenter que marginalement la production de xylanase (Figure.19).

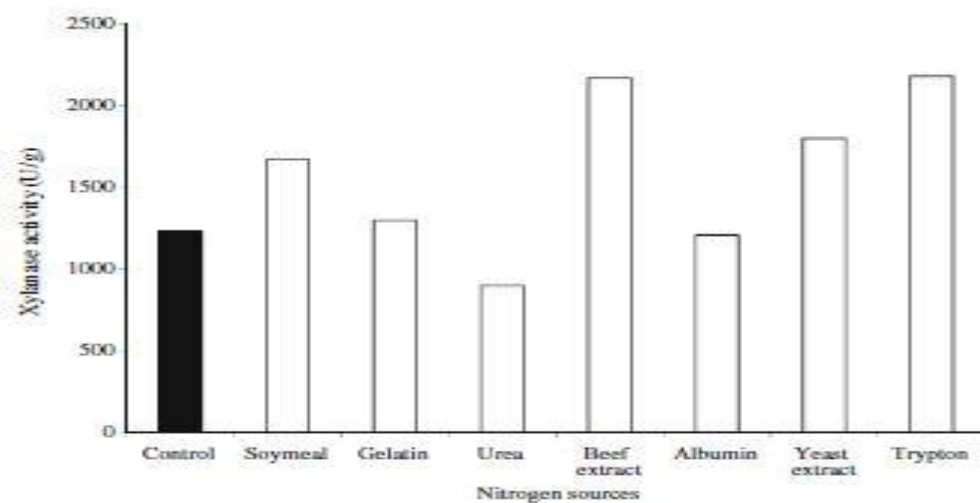


Figure 19. Effet de différentes sources d'azote sur la production de xylanase (Bajaj et Singh, 2010).

D'après Nagar et al, la production de xylanase a été mesurée en présence de plusieurs sources d'azote organiques et inorganiques ils ont utilisé 1,0 % de son de blé comme substrat (Figure.20). Sources d'azote organique : la peptone, l'extrait de levure et l'extrait de bœuf ont augmenté le titre enzymatique de 448,99, 348,47 et 650,83 UI/ml, respectivement, par rapport aux composés inorganiques comme KNO₃ (88,72 UI/ml), (NH₄)₂SO₄ (271,46 UI/ml), et NaNO₃ (272,41 UI/ml).

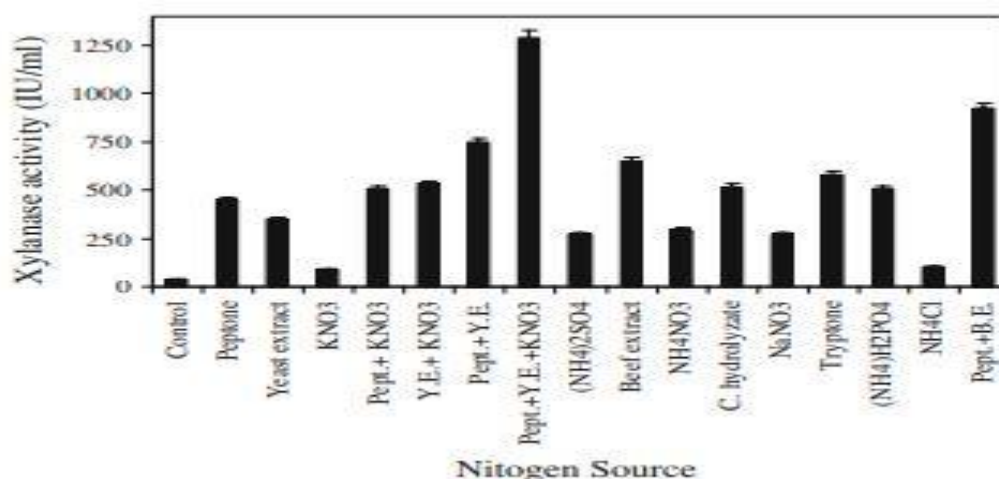


Figure 20. Effet de la source d'azote sur la production de xylanase dans fermentation submergée par *Bacillus pumilus* SV-85S.

À la suite de l'analyse de l'effet de différentes combinaisons de sources d'azote sur la production d'enzymes, il a été noté que le mélange de peptone, d'extrait de levure et de KNO₃ conduisait à la production la plus élevée de l'enzyme (1288,03 UI/ml).

La production la plus élevée de xylanase (251 UI/ml) par *Bacillus SSP-34* s'est produite dans un milieu contenant de l'extrait de levure et de la peptone chacun à 0,25 % (Subramaniyan et al., 2001). Cependant, la meilleure source d'azote pour la production de xylanase par *B. Circulans AB16* (Dhillon et Khanna, 2000) et *Geobacillus thermoleovorans* (Sharma et al., 2007) était le tryptone.

2.7. Effet de l'agitation

L'agitation et l'aération sont généralement utilisées pour répondre à la demande en oxygène et au mélange uniforme des nutriments pendant le processus de fermentation.

Le titre enzymatique le plus élevé (1779,12 UI/ml) a été observé à 150 tr/min d'agitation (Figure 21) De plus, la production d'enzymes était plus élevée sous vibration

que dans des conditions statiques, tandis que la souche bactérienne *B. pumilus SV205* enregistrait 38,8% seulement de l'activité enzymatique maximale (le titre enzymatique le plus élevé (2055,0 UI/ml) à une vitesse de vibration de 150 tr/min). La production réduite de l'enzyme dans des conditions stationnaires peut être due au faible niveau d'oxygène dans le milieu, qui à son tour affecte négativement le titre enzymatique. (Nagar et al., 2010).

Plusieurs chercheurs ont noté la production la plus élevée de xylanase à une vitesse d'agitation de 200 à 250 tr/min (Battan et al., 2007 ; Beg et al., 1999 ; Kar et al., 2000 ; Subramaniyan et al., 2001 ; Taneja et al., 2002).

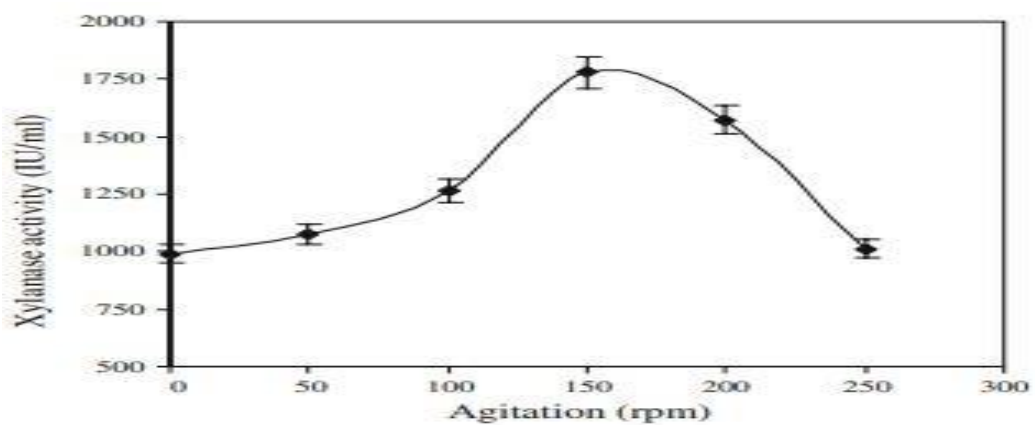


Figure 21. Effet du taux d'agitation sur la production de xylanase par *Bacillus pumilus SV-85S* (Nagar et al., 2010).

2.8.Effet de différents additifs sur la production de xylanase

Différents additifs à savoir : le glucose, le maltose, le lactose, la xylose, le xylane, le fructose, le SDS ou le Tween-80 ont été inclus dans le XPM pour analyser leur effet sur la production d'enzymes dans le SSF. Tous les additifs conduisent à une réduction du titre de xylanase par rapport à celui du témoin (Figure 22), à l'exception du xylane, dont l'ajout a entraîné une légère augmentation de la production de xylanase (7,33 %). (Bajaj et Singh, 2010).

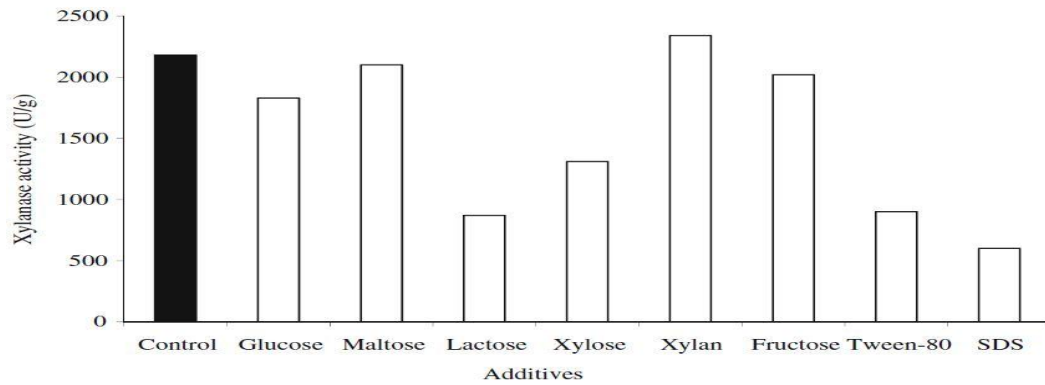


Figure 22. Effet de la supplémentation du milieu avec différents additifs sur la production de xylanase (Bajaj et Singh, 2010).

Selon Nagar et al., tous les additifs conduisent à une réduction du titre de xylanase par rapport à celui du témoin, sauf pour l'huile d'olive et le Tween 80 dont l'ajout entraîne une augmentation de la production de xylanase puisque l'activité xylanase est de 1710,10 et 1756,67 UI/ml après ajout de Tween 80 et d'huile d'olive, respectivement (figure 23).

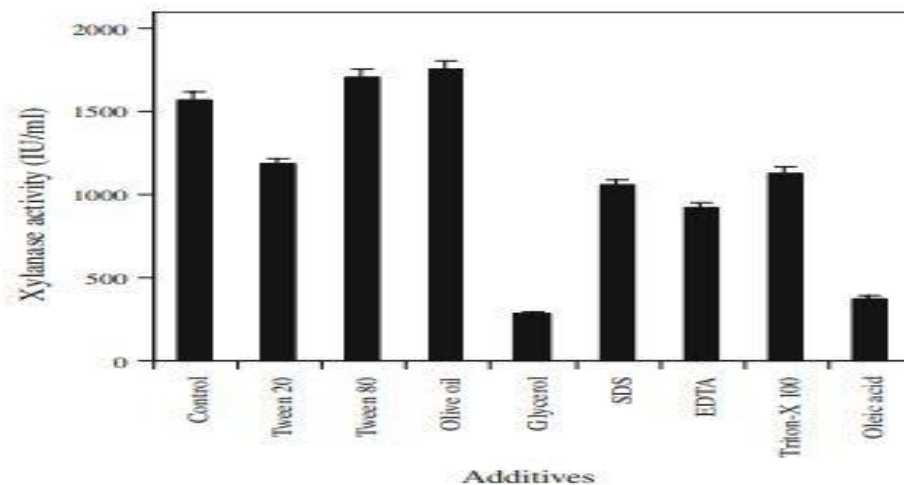


Figure 23. Effet de divers additifs sur la production de xylanase par *Bacillus pumilus* SV-85S (Nagar et al., 2010).

De plus, la production de l'enzyme a été contrôlée en modifiant la concentration de Tween 80 et d'huile d'olive de 0,1 % à 0,5 %. Les titres enzymatiques les plus élevés ont été obtenus à 0,1 % de Tween 80 et 0,2 % d'huile d'olive, lorsqu'ils ont été ajoutés séparément (Figure.24 a). L'ajout de 0,1 % de Tween 80 seul au milieu de production a conservé le titre enzymatique le plus élevé (2372,78 UI/ml) (Figure.24b).

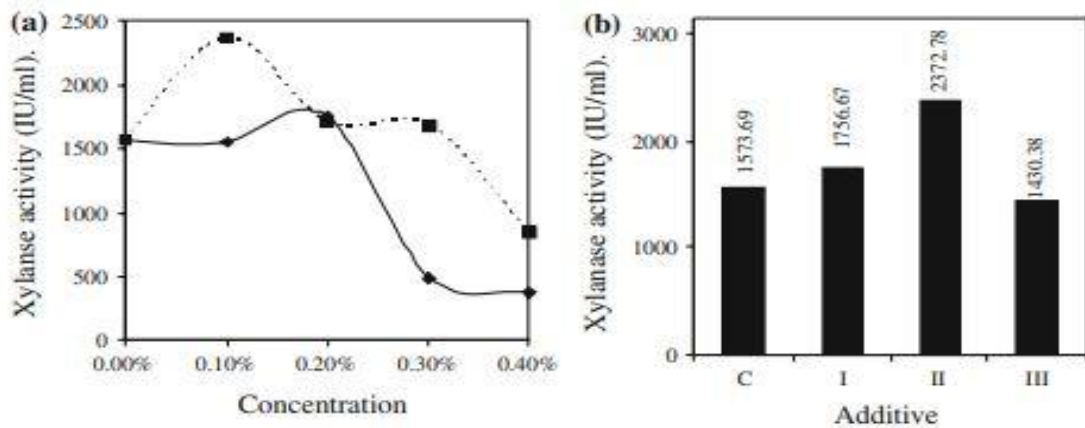


Figure 24a. Effet de l'huile d'olive (losange noir) et du tween 80 (carré noir) sur la production de xylanase. **b** Production de xylanase après addition de 0,1 % d'huile d'olive et de 0,2 % de tween 80 individuellement et en combinaison.

I. Discussions

A la température élevée et au pH alcalin souhaitable pour de nombreuses applications biotechnologiques telles que le blanchiment de la pâte kraft, les xylanases sont actives et stables (Pandey et al., 2001 ; Subramaniyan et Prema, 2002).

Pour la production de xylanases, les organismes peuvent subir une manipulation génétique pour les fabriquer, ou leur diversité naturelle peut être exploitée pour obtenir l'organisme qui les produit. Bien qu'un filtre à sable (SSF) présente de nombreux avantages (Pandey et al., 1999), notamment grâce à l'utilisation de sources brutes de carbone et d'azote provenant En termes de coût en tant que substrats, la fermentation submergée a été largement utilisée.

Il existe de nombreux rapports sur la production de xylanase à partir de son de blé ou d'autres matériaux contenant de la lignocellulosique sous eau immergée et SSF (Kang et al., 2004 ; Maheswari et Chandra, 2000 ; Nascimento et al., 2002 ; Sharma et Bajaj , 2005 ; Thiagarajan et al., 2006). Le son de riz et les résidus de soja ont servi d'excellents substrats SSF pour la production de xylanase par *Bacillus. Spp* (Heck et al., 2005 ; Virupakshi et al., 2005). Le son de blé a servi d'excellents substrats FML pour la production de xylanase par *Bacillus*.

L'un des facteurs les plus importants pour déterminer la macroéconomie de l'opération est le coût du pilier (Gupta et al., 2001). Revoyez ceci car l'utilisation de xylane purifié comme substrat est coûteuse et non économique pour la production à

grande échelle de xylanase (Damaso et al., 2000). Par conséquent, les résidus agricoles (tels que le son de blé, le son de riz, le foin, la bagasse, la sciure de bois, la paille de blé ou de riz, etc.) fournissent des substrats alternatifs rentables pour la production de xylanase, et également aider au contrôle de la pollution environnementale (Heck et al., 2005).

Les préparations enzymatiques ont été utilisées avec succès dans les industries de transformation des fruits et légumes et dans le prétraitement des cultures fourragères pour améliorer la digestibilité des aliments des ruminants et faciliter le processus de compostage. Toutefois, si elles sont utilisées dans les industries des pâtes et papiers, elles doivent être totalement exemptes de contamination par la cellulose, sinon les fibres de cellulose peuvent être endommagées.

La production de xylanase complètement exempte de cellulase a été rapportée par plusieurs chercheurs pour différentes espèces bactériennes telles que *Bacillus* et *Streptomyces* (Kohli et al., 2001 ; Maheswari et Chandra, 2000 ; Tseng et al., 2002). Malgré cela, une contamination mineure de la xylanase par la cellulase a également été documentée (Avcioglu et al., 2005 ; Jiang et al., 2004 ; Sharma et Bajaj , 2005).

Ils ont signalé que la tryptone était la source d'azote la plus efficace. Il a été rapporté que l'extrait de levure, l'extrait de bœuf, la peptone ou la farine de soja constituent de bonnes sources d'azote pour obtenir des rendements élevés de xylanase par différentes bactéries (Bakri et al., 2003 ; Ding et al., 2004 ; Subramaniyan et al., 2001; Sá-Pereira et al., 2002 ; Sharma et Bajaj , 2005 ; Virupakshi et al., 2005). Sur la production d'enzymes, il a été observé que le mélange de peptone, d'extrait de levure et de KNO₃ entraînait la plus grande production. Riche en enzyme (1288,03 UI/ml). Cependant, une production maximale de xylanase a été rapportée par *Streptomyces cuspidosporus* lorsque le sulfate d'ammonium est utilisé comme source d'azote (Maheswari et Chandra, 2000).

Tous les différents additifs (glucose, maltose, lactose, xylose, fructose, SDS, Tween 20, glycérol, EDTA, Triton-X 100 et acide oléique) dans le milieu entraînent une diminution de la production de xylanase par *Streptomyces 7b* et *Bacillus* qui peut être due à la suppression du catabolisme (Virupakshi et al., 2005) , sauf pour l'huile d'olive et le tween 80, qui augmentent la production de xylanase par *Bacillus*, et le xylane, dont

l'ajout a provoqué une légère augmentation de la production de xylanase par *Streptomyces 7b*.

Ils ont signalé que l'ajout de détergents (SDS et Tween-80) dans le milieu provoquait une diminution du rendement de l'enzyme, car les détergents peuvent avoir affecté la croissance de l'organisme en provoquant une lyse cellulaire ou peuvent avoir provoqué des modifications de l'enzyme, structure et conformation entraînant la réduction de l'activité (Wang et al., 2003). Cependant, contrairement à nos observations, un doublement de la production de xylanase a été rapporté avec l'ajout de Tween-80 dans le milieu de culture (Ding et al., 2004). De plus, avec l'ajout de Tween-80 et d'huile d'olive dans le milieu de culture, comme suggéré par Sharma et al., dans certains cas, l'amélioration de l'activité de la xylanase peut être due à l'ajout de Tween 80 en raison de son effet positif sur la cellule. Perméabilité membranaire (Sharma et al., 2007). En outre, il existe des rapports indiquant que le SDS n'a aucun effet sur l'activité xylanase de *Streptomyces* et *Bacillus* (Sá-Pereira et al., 2002 ; Elegir et al., 1994).

L'excès d'humidité entraîne une diminution de la porosité du substrat, modifie la structure des particules du substrat, pose des limitations de diffusion et conduit à un mauvais transfert d'oxygène, tandis qu'une faible teneur en humidité entraîne une mauvaise solubilité des nutriments du substrat, moins de gonflement et une rétention d'eau plus élevée. (Pandey et al., 1999 ; Satyanarayana, 1994). *Streptomyces sp. 7b* a produit un maximum de xylanase à un rapport son de blé/solution liquide de 1:2,5. *Bacillus. sp JB-99* a affiché une production maximale de xylanase à des niveaux d'humidité de 1: 2 (wt / vol). (Virupakshi et al., 2005), tandis que *Aspergillus terreus* a produit un maximum de xylanase lorsque le niveau d'humidité de 1: 3 (wt / vol) a été utilisé. (Ghanem et al., 2000). Le niveau d'humidité optimal dans le SSF dépend de la nature du substrat, des exigences du micro-organisme et du type de produits finaux (Pandey et al., 1999).

Le pH du milieu peut affecter la croissance de l'organisme, par conséquent, la production de l'enzyme sera affectée ; L'enzyme produite peut également être inactivée ou dénaturée en raison de l'environnement ionique défavorable provoqué par le pH du milieu. Ils ont signalé un pH moyen de 7 à 8 comme maximum pour la production de xylanase. Semblable à nos découvertes, la production maximale de xylanase à pH 6 à 8 a été rapportée pour différentes espèces bactériennes, y compris *Bacillus* et

Streptomyces (Ding et al., 2004 ; Maheswari et Chandra, 2000 ; Nascimentoet et al., 2002 ; Sá-Pereira et al., 2002 ; Sharma et Bajaj ,2005 ; Subramaniyan et al., 2001), tandis que la souche bactérienne *B. pumilus* SV- 85S avait une production significative de xylanase entre pH 5 et 8. Un pH optimal similaire pour la production de xylanase a été rapporté par Kohli et al. (Kohli et al., 2001). Cependant, le sous-groupe C de *Thermoactinomyces thallophilous* et *Bacillus sp. JB-99* s'est avéré produire un maximum de xylanase à un pH alcalin élevé de 9 à 10 (Kohli et al., 2001 ; Virupakshi et al., 2005).

L'optimisation du volume d'inoculum est essentielle pour obtenir un rendement maximal du produit. Le volume d'inoculum optimal était de 2,0 ml (2×10^7 spores/ml) pour une production maximale de xylanase par. Cependant, un inoculum contenant 5,0 ml de spores en suspension (106 spores/ml) de *S. cuspidosporus* a été documenté comme étant le meilleur pour une production maximale de xylanase dans un milieu de son de blé (Maheswari et Chandra, 2000). Selon Nagar (Nagar et al., 20010), Production de xylanase atteint un sommet après l'ajout de 1,0 % de vaccin. L'utilisation d'un vaccin à 1,0–5,0 % (v/v) pour la surproduction de xylanase a été rapportée par plusieurs chercheurs (Battan et al., 2007 ; Kar et al., 2006 ; Subramaniyan et al., 2001), Lincoln (Lincoln, 1960). a suggéré qu'une concentration d'inoculum plus élevée n'est pas préférée dans la fermentation industrielle.

Conclusion

Conclusion

Bacillus pumilus SV-85S a produit des niveaux élevés de xylanase sans cellulase et des conditions de fermentation améliorées ont augmenté le titre enzymatique de 9,91 fois par rapport au milieu de base. *Streptomyces 7b* a également utilisé avec succès le son de blé comme substrat, la tryptone et l'extrait de bœuf ont amélioré la production de xylanase par ces bactéries de 76 % à 77 %, tandis que les sucres faciles à utiliser ont supprimé la production de xylanase.

Le niveau d'humidité optimal dans un filtre de filtration à sable dépend de la nature du substrat, des exigences des micro-organismes et du type de produits finaux. Un excès d'humidité entraîne une diminution de la porosité du substrat, une modification de sa structure particulière et un mauvais transport de l'oxygène, tandis que sa faible teneur entraîne une mauvaise teneur en nutriments solubles dans le substrat. *Streptomyces sp*, *Bacillus. sp* JB-99 et *Aspergillus terreus* ont produit une production maximale de xylanase à 1:2,5 de son de blé/solution liquide, 1:2 (p/v) et 1:3 (p/v), respectivement. L'utilisation d'un inoculum de 1,0 à 5,0 % (v/v) a été signalée comme surproduisant de la xylanase par plusieurs chercheurs et un inoculum plus élevé la concentration en fermentation industrielle n'est pas préférée.

*Références
Bibliographiques*

Bibliographies

- Abidin, Z.A.Z., Ahmad, A., Latip, J. and Usup, G., 2016.** MARINE Streptomyces SP. UKMCC_PT15 producing undecylprodigiosin with algicidal activity. *Jurnal Teknologi*, 78(11-2).
- Amin, F.R., Khalid, H., Zhang, H., Zhang, R., Liu, G. and Chen, C., 2017.** Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. *Amb Express*, 7(1), pp.1-12.
- Anuradha, P., Vijayalakshmi, K.N.D.P., Prasanna, N.D. and Sridevi, K., 2007.** Production and properties of alkaline xylanases from Bacillus sp. isolated from sugarcane fields. *Current Science*, pp.1283-1286.
- Archana, A. and Satyanarayana, T., 1998.** Cellulase-free xylanase production by thermophilic Bacillus licheniformis A99. *Indian Journal of Microbiology*, 38(3), pp.135-139.
- Avcioglu, B., Eyupoglu, B. and Bakir, U., 2005.** Production and characterization of xylanases of a Bacillus strain isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(1), pp.65-68.
- Bailey, M.J., Biely, P. and Poutanen, K., 1992.** Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of biotechnology*, 23(3), pp.257-270.
- Bajaj, B.K. and Singh, N.P., 2010.** Production of xylanase from an alkalitolerant Streptomyces sp. 7b under solid-state fermentation, its purification, and characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(6), pp.1804-1818.
- Bajpai, P., 1999.** Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnology progress*, 15(2), pp.147-157.
- Bakri, Y., Jacques, P. and Thonart, P., 2003.** Xylanase production by Penicillium canescens 10–10c in solid-state fermentation. In *Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 737-748). Humana Press, Totowa, NJ.

- Balakrishnan, H., Srinivasan, M.C. and Rele, M.V., 1997.** Extracellular protease activities in relation to xylanase secretion in an alkalophilic *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*, 19(7), pp.599-601.
- Bataillon, M., Nunes Cardinali, A.P. and Duchiron, F., 1998.** Production of xylanases from a newly isolated alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*, 20(11), pp.1067-1071.
- Battan, B., Sharma, J., Dhiman, S.S. and Kuhad, R.C., 2007.** Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(6-7), pp.733-739.
- Beg, Q.K., Bhushan, B., Kapoor, M. and Hoondal, G.S., 2000.** Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24(6), pp.396-402.
- Beg, Q., Kapoor, M., Mahajan, L. and Hoondal, G.S., 2001.** Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 56(3), pp.326-338.
- Blanco, A., Vidal, T., Colom, J.F. and Pastor, F., 1995.** Purification and properties of xylanase A from alkali-tolerant *Bacillus* sp. strain BP-23. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12), pp.4468-4470.
- Boussarsar, H., (2008).** Application de Traitements Thermique et Enzymatique de Solubilisation et Saccharification de la Fraction Hemicellulosique en Vue de la Valorisation de la Bagasse de Canne à Sucre (Doctoral dissertation, Université de Reims Champagne Ardenne).
- Breccia, J.D., Siñeriz, F., Baigori, M.D., Castro, G.R. and Hatti-Kaul, R., 1998.** Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(1), pp.42-49.
- Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P.L. and Srivastava, A.K., 2016.** Bacterial xylanases: biology to biotechnology. 3

Biotech, 6(2), pp.1-15.

Collins, T., Gerday, C. and Feller, G., 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS microbiology reviews*, 29(1), pp.3-23.

Durand, A., 2003. Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), pp.113-125.

Deb, A. and Vimala, R., 2018. Camptothecin loaded graphene oxide nanoparticle functionalized with polyethylene glycol and folic acid for anticancer drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 43, pp.333-342.

De Vries, R.P. and Visser, J.A.A.P., 2001. Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and molecular biology reviews*, 65(4), pp.497-522.

Dey D, H. J. (1992). Purification and properties of extracellular endo-xylanase from alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp. *Can J Microbiol* 38: , 436–442.

Dhillon A, K. S. 2000. Production of a thermostable alkalitolerant xylanase from *Bacillus circulans* AB 16 grown on wheat straw. *World J Microbiol Biotechnol* 16 , 325–327.

Dhiman, S.S., Sharma, J. and Battan, B., 2008. Pretreatment processing of fabrics by alkalothermophilic xylanase from *Bacillus stearothermophilus* SDX. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(3), pp.262-269.

Dhiman, S.S., Sharma, J. and Battan, B., 2008. Pretreatment processing of fabrics by alkalothermophilic xylanase from *Bacillus stearothermophilus* SDX. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(3), pp.262-269.

Ding, C.H., Jiang, Z.Q., Li, X.T., Li, L.T. and Kusakabe, I., 2004. High activity xylanase production by *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(1), pp.7-10.

Doiseau, A.C., 2014. *Déshydratation catalytique du xylose en furfural* (Doctoral dissertation, Lyon 1).

Eibner, S., 2015. *Pyrolyse flash de biomasse lignocellulosique: comment catalyser la*

désoxygénation au cours des mécanismes primaires et secondaires? (Doctoral dissertation, 2iE).

- Elegir, G., Szakács, G. and Jeffries, T.W., 1994.** Purification, characterization, and substrate specificities of multiple xylanases from *Streptomyces* sp. strain B-12-2. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(7), pp.2609-2615.
- Eloutassi, N., Louaste, B., Boudine, L. and Remmal, A., 2014.** Hydrolyse physico-chimique et biologique de la biomasse ligno-cellulosique pour la production de bio-éthanol de deuxième génération. *Nature & Technology*, (10), p.10.
- Gawande, P.V. and Kamat, M.Y., 1999.** Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application. *Journal of Applied Microbiology*, 87(4), pp.511-519.
- Gessesse, A. and Mamo, G., 1999.** High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus* sp. by using solid-state fermentation. *Enzyme and microbial technology*, 25(1-2), pp.68-72.
- Ghanem, N.B., Yusef, H.H. and Mahrouse, H.K., 2000.** Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett–Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. *Bioresource Technology*, 73(2), pp.113-121.
- Gupta, S., Bhushan, B. and Hoondal, G.S., 2000.** Isolation, purification and characterization of xylanase from *Staphylococcus* sp. SG-13 and its application in biobleaching of kraft pulp. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), pp.325-334.
- Gupta, S., Kuhad, R.C., Bhushan, B. and Hoondal, G.S., 2001.** Improved xylanase production from a haloalkalophilic *Staphylococcus* sp. SG-13 using inexpensive agricultural residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(1), pp.5-8.
- Heck, J.X., Flôres, S.H., Hertz, P.F. and Ayub, M.A.Z., 2005.** Optimization of cellulase-free xylanase activity produced by *Bacillus coagulans* BL69 in solid-state cultivation. *Process Biochemistry*, 40(1), pp.107-112.

- Hölker, U. and Lenz, J., 2005.** Solid-state fermentation—are there any biotechnological advantages?. *Current opinion in microbiology*, 8(3), pp.301-306.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T., 1993.** Genus *Legionella*. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, USA, S, 86.
- Hu, L. F. 2020 .** Hemicellulose-Based Polymers Processing and Application. . *American Journal of Plant Sciences*, 11(12), 2066-2079.
- Jiang, Z.Q., Deng, W., Li, L.T., Ding, C.H., Kusakabe, I. and Tan, S.S., 2004.** A novel, ultra-large xylanolytic complex (xylanosome) secreted by *Streptomyces olivaceoviridis*. *Biotechnology letters*, 26(5), pp.431-436.
- Kang, S.W., Park, Y.S., Lee, J.S., Hong, S.I. and Kim, S.W., 2004.** Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 91(2), pp.153-156.
- Kar, S., Mandal, A., Mohapatra, P.K.D., Mondal, K.C. and Pati, B.R., 2006.** Production of cellulase-free xylanase by *Trichoderma reesei* SAF3. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, pp.462-464.
- Khasin, A., Alchanati, I. and Shoham, Y., 1993.** Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Applied and environmental microbiology*, 59(6), pp.1725-1730.
- Kiddinamoorthy, J., Anceno, A.J., Haki, G.D. and Rakshit, S.K., 2008.** Production, purification and characterization of *Bacillus* sp. GRE7 xylanase and its application in eucalyptus Kraft pulp biobleaching. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(5), pp.605-612.
- Kohli, U., Nigam, P., Singh, D. and Chaudhary, K., 2001.** Thermostable, alkalophilic and cellulase free xylanase production by *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(7-8), pp.606-610.
- Kuhad, R.C., Manchanda, M. and Singh, A., 1998.** Optimization of xylanase

- production by a hyperxylanolytic mutant strain of *Fusarium oxysporum*. *Process Biochemistry*, 33(6), pp.641-647.
- Kuhad, R.C. and Singh, A., 1993.** Lignocellulose biotechnology: current and future prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*, 13(2), pp.151-172.
- Kuhad, R.C., Manchanda, M. and Singh, A., 1998.** Optimization of xylanase production by a hyperxylanolytic mutant strain of *Fusarium oxysporum*. *Process Biochemistry*, 33(6), pp.641-647.
- Kulkarni, N., Shendye, A. and Rao, M., 1999.** Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS microbiology reviews*, 23(4), pp.411-456.
- Kumar, L., Kumar, D., Nagar, S., Gupta, R., Garg, N., Kuhad, R.C. and Gupta, V.K., 2014.** Modulation of xylanase production from alkaliphilic *Bacillus pumilus* VLK-1 through process optimization and temperature shift operation. *3 Biotech*, 4(4), pp.345-356.
- Kumar, S., Singh, S.P., Mishra, I.M. and Adhikari, D.K., 2009.** Recent advances in production of bioethanol from lignocellulosic biomass. *Chemical Engineering & Technology: Industrial Chemistry-Plant Equipment-Process Engineering-Biotechnology*, 32(4), pp.517-526.
- Lafond, M., Guais, O., Maestracci, M., Bonnin, E. and Giardina, T., 2014.** Four GH11 xylanases from the xylanolytic fungus *Talaromyces versatilis* act differently on (arabino) xylans. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(14), pp.6339-6352.
- Lens P., Westermann, P. 2005.** Biofuels for Fuel Cells: Renewable energy from biomass fermentation. Edition IWA Publishing , Alliance House, London, 5-50 / 169-220.
- Lincoln., R. 1960.** *Microbiol. Technol. Eng.* , , 481 - 500 .
- M.C.T. Damaso, C. A. 2000.** *Junior, Applied Biochemistry and Biotechnology* 84 , 821–834.
- Maheswari, M.U. and Chandra, T.S., 2000.** Production and potential applications of a xylanase from a new strain of *Streptomyces cuspidosporus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(3), pp.257-263.

- Maki-Arvela, P., Salmi, T., Holmbom, B., Willfor, S. and Murzin, D.Y., 2011.** Synthesis of sugars by hydrolysis of hemicelluloses-a review. *Chemical reviews*, 111(9), pp.5638-5666.
- Mandal, A., 2015.** Review on microbial xylanases and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 42, pp.45-42.
- Manpreet, S., Sawraj, S., Sachin, D., Pankaj, S. and Banerjee, U.C., 2005.** Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*, 2(1), pp.1-9.
- Miller, G.L., 1959.** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), pp.426-428.
- Motta, F.L., Andrade, C.C.P. and Santana, M.H.A., 2013.** A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. *Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-techniques, applications and commercialization*, 1, pp.251-276.
- Murugan, S., Arnold, D., Pongiya, U.D. and Narayanan, P.M., 2011.** Production of Xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC 6915 using saw dust as substrate under solid state fermentation. *Enzyme Research*.
- Mussatto, S.I., Ballesteros, L.F., Martins, S. and Teixeira, J.A., 2012.** Use of agro-industrial wastes in solid-state fermentation processes. *Industrial waste*, 274.
- Nagar, S., Gupta, V.K., Kumar, D., Kumar, L. and Kuhad, R.C., 2010.** Production and optimization of cellulase-free, alkali-stable xylanase by *Bacillus pumilus* SV-85S in submerged fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(1), pp.71-83.
- Nagar, S., Mittal, A., Kumar, D. and Gupta, V.K., 2012.** Production of alkali tolerant cellulase free xylanase in high levels by *Bacillus pumilus* SV-205. *International journal of biological macromolecules*, 50(2), pp.414-420.
- Nakamura, S.A.T.O.S.H.I., Wakabayashi, K.E.N.J.I., Nakai, R.Y.U.I.C.H.I.R.O., Aono, R.I.K.I.Z.O. and Horikoshi, K., 1993.** Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-

1. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(7), pp.2311-2316.

Nascimento, R.P., Coelho, R.R.R., Marques, S., Alves, L., Girio, F.M., Bon, E.P.S. and Amaral-Collaco, M.T., 2002. Production and partial characterisation of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(4), pp.549-555.

Nawel, B., Said, B., Estelle, C., Hakim, H. and Duchiron, F., 2011. Production and partial characterization of xylanase produced by *Jonesia denitrificans* isolated in Algerian soil. *Process Biochemistry*, 46(2), pp.519-525.

Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M. and Antranikian, G., 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied microbiology and biotechnology*, 51(6), pp.711-729.

O'Donohue, M. and Debeire, P., 2006. Fractionnement de la biomasse lignocellulosique: production de produits chimiques de bases.

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(3), pp.172-177.

O'Donohue, M., 2013. La biomasse, simple source d'énergie ou source de matières premières renouvelables?. *Innovations Agronomiques*, 26, pp.41-50.

Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R. and Nigam, P., 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current science*, pp.149-162.

Pandey, A. S.-1. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 56(3) , 326-338.

Poorna, C.A. and Prema, P., 2006. Production and partial characterization of endoxylanase by *Bacillus pumilus* using agro industrial residues. *Biochemical Engineering Journal*, 32(2), pp.106-112.

R.D. Lincoln. 1960 . *Microbiol. Technol. Eng.* , 481 - 500 .

Rahardjo, Y.S., Tramper, J. and Rinzema, A., 2006. Modeling conversion and

transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. *Biotechnology Advances*, 24(2), pp.161-179.

Raimbault, M., 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3), pp.26-27.

Raj, A., Kumar, S. and Singh, S.K., 2013. A highly thermostable xylanase from *Stenotrophomonas maltophilia*: purification and partial characterization. *Enzyme Research*, 2013.

Rubin, E.M., 2008. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 454(7206), pp.841-845.

Sá-Pereira, P., Mesquita, A., Duarte, J.C., Barros, M.R.A. and Costa-Ferreira, M., 2002. Rapid production of thermostable cellulase-free xylanase by a strain of *Bacillus subtilis* and its properties. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(7), pp.924-933.

Sanghi, A., Garg, N., Sharma, J., Kuhar, K., Kuhad, R.C. and Gupta, V.K., 2008. Optimization of xylanase production using inexpensive agro-residues by alkalophilic *Bacillus subtilis* ASH in solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(5), pp.633-640.

Sanghi, A., Garg, N., Kuhar, K., Kuhad, R.C. and Gupta, V.K., 2009. Enhanced production of cellulase-free xylanase by alkalophilic *Bacillus subtilis* ASH and its application in biobleaching of kraft pulp. *BioResources*, 4(3), pp.1109-1129.

Saratale, G.D. and Oh, S.E., 2012. Lignocellulosics to ethanol: The future of the chemical and energy industry. *African Journal of Biotechnology*, 11(5), pp.1002-1013.

Satyanarayana, T., 1994. Production of bacterial extracellular enzymes by solid state fermentation. *Solid state fermentation*.

Savitha, S., Sadhasivam, S. and Swaminathan, K., 2007. Application of *Aspergillus fumigatus* xylanase for quality improvement of waste paper pulp. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 78(3), pp.217-221.

Schuseil, Puls. J. 1993. Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required. *Portland Press, London*, 1 - 27.

- Sepahy AA, Ghazi. S and Akhavan Sepahy, M., 2011.** Cost-effective production and optimization of alkaline xylanase by indigenous *Bacillus mojavansis* AG137 fermented on agricultural waste. *Enzyme Res.*
- Shah, A.R. and Madamwar, D., 2005.** Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. *Process Biochemistry*, 40(5), pp.1763-1771.
- Sharma, P. and Bajaj, B.K., 2005.** Production and partial characterization of alkali-tolerant xylanase from an alkalophilic *Streptomyces* sp. CD3.
- Sharma, A., Adhikari, S. and Satyanarayana, T., 2007.** Alkali-thermostable and cellulase-free xylanase production by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(4), pp.483-490.
- Soccol, C.R., da Costa, E.S.F., Letti, L.A.J., Karp, S.G., Woiciechowski, A.L. and de Souza Vandenberghe, L.P., 2017.** Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, 1(1), pp.52-71.
- Soumaya, H., 2014.** *Production, optimisation et étude de xylanases chez une nouvelle souche d'Actinomycète thermophile isolée du compost de poulet* (Doctoral dissertation, Université Badji Mokhtar-Annaba).
- Subramaniyan, S., Sandhia, G.S. and Prema, P., 2001.** Control of xylanase production without protease activity in *Bacillus* sp. by selection of nitrogen source. *Biotechnology Letters*, 23(5), pp.369-371.
- Subramaniyan, S. and Prema, P., 2002.** Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Critical reviews in biotechnology*, 22(1), pp.33-64.
- Subramaniyam, R. and Vimala, R., 2012.** Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *Int J Sci Nat*, 3(3), pp.480-486.
- Strassberger, Z., Tanase, S. and Rothenberg, G., 2014.** The pros and cons of lignin valorisation in an integrated biorefinery. *Rsc Advances*, 4(48), pp.25310-25318.

- Suprabha, G.N., Sindhu, R. and Shankar, S., 2008.** Fungal xylanase production under solid state and submerged fermentation conditions. *African Journal of Microbiology Research*, 2(4), pp.82-86.
- Taneja, K., Gupta, S. and Kuhad, R.C., 2002.** Properties and application of a partially purified alkaline xylanase from an alkalophilic fungus *Aspergillus nidulans* KK-99. *Bioresource Technology*, 85(1), pp.39-42.
- Techapun, C., Charoenrat, T., Poosaran, N., Watanabe, M. and Sasak, K., 2002.** Thermostable and alkaline-tolerant cellulase-free xylanase produced by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(4), pp.431-433.
- Techapun, C., Poosaran, N., Watanabe, M. and Sasaki, K., 2003.** Optimization of aeration and agitation rates to improve cellulase-free xylanase production by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106 and repeated fed-batch cultivation using agricultural waste. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95(3), pp.298-301.
- Thiagarajan, S., Jeya, M. and Gunasekaran, P., 2006.** Purification and characterization of a high molecular weight endoxylanase from the solid-state culture of an alkali-tolerant *Aspergillus fumigatus* MKU1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(5), pp.487-492.
- Virupakshi, S., Babu, K.G., Gaikwad, S.R. and Naik, G.R., 2005.** Production of a xylanolytic enzyme by a thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 40(1), pp.431-435.
- Wang, S.L., Yen, Y.H., Shih, L., Chang, A.C., Chang, W.T., Wu, W.C. and Chai, Y.D., 2003.** Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(7), pp.917-925.
- Wong, K.K. and Saddler, J.N., 1992.** Trichoderma xylanases, their properties and application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 12(5-6), pp.413-435.
- Wong, K.K., Tan, L.U. and Saddler, J.N., 1988.** Multiplicity of beta-1, 4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiological reviews*, 52(3),

pp.305-317.

Wong, K.K. and Saddler, J.N., 1992. Trichoderma xylanases, their properties and application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 12(5-6), pp.413-435.

Yang, V.W., Zhuang, Z., Elegir, G. and Jeffries, T.W., 1995. Alkaline-active xylanase produced by an alkaliphilic Bacillus sp isolated from kraft pulp. *Journal of Industrial microbiology*, 15(5), pp.434-441.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة حركية وإنتاج الزيلاينز في الأوساط الصلبة والسائلة بواسطة *Bacillus* و *Streptomyces 7b* . وقد أعطى إنتاج هذه البكتريا الزيلاينز على نخالة القمح أقصى إنتاج قدره 1230 وحدة / جم بواسطة *Bacillus pumilus SV-85S* و 200.00 ± 2995.20 وحدة دولية / مل *Bacillus pumilus SV-85S* . تم تحسين إنتاج الزيلاينز بشكل كبير عن طريق تضمين التربتون أو مستخلص اللحم البقري وبشكل معتدل عن طريق مستخلص الخميرة أو دقيق فول الصويا ، أو باستخدام تركيبات مختلفة (خليط البيبتون و خلاصة الخميرة و KNO_3) في إنتاج الإنزيم . بالنسبة لـ *Streptomyces 7b* ، تم العثور على أنسب نسبة صلابة-سائلة لأقصى إنتاج الزيلاينز في حالة التخمير الصلب هي 1 : 2.5

الكلمات المفتاحية: الزيلاينز ، التخمير ، الزيلاين ، الإنتاج ، *Bacillus pumilus SV-85S* ، *Streptomyces 7b* ، نخالة القمح ، التحسين.

Résumé

L'objectif de ce travail est l'étude de la cinétique et de la production de xylanase en milieu solide et liquide par *Streptomyces 7b* et *Bacillus pumilus SV-85S*. La production de xylanase par ces bactéries sur le son de blé a donné une production maximale de 1230 U/g par *Streptomyces. 7b* et $2995,20 \pm 200,00$ UI/ml pour *Bacillus pumilus SV-85S*. La production de xylanase a été significativement améliorée, en incluant de la tryptone ou de l'extrait de bœuf et modérément par de l'extrait de levure ou de la farine de soja, ou utilisant de différentes combinaisons (le mélange de peptone, d'extrait de levure et de KNO_3) sur la production d'enzymes. Pour *Streptomyces 7b*, le rapport solide-liquide le plus approprié pour une production maximale de xylanase dans le cas d'une fermentation solide s'est avéré être de 1 : 2,5

Mots clés : Xylanases, Fermentation, Xylane, Production, *Bacillus pumilus SV-85S*, *Streptomyces 7b*, Son de blé, Optimisation.

Abstract

The objective of this work is to study the kinetics and production of xylanase in solid and liquid media by *Streptomyces 7b* and *Bacillus pumilus SV-85S*. The production of xylanase by these bacteria on wheat bran gave a maximum production of 1230 U/g by *Streptomyces.7b* and 2995.20 ± 200.00 IU/ml for *Bacillus pumilus SV-85S*. Xylanase production was significantly enhanced by including tryptone or beef extract and moderately by yeast extract or soybean flour, or using different combinations (mixture of peptone, yeast extract and KNO_3) on enzyme production. For *Streptomyces 7b*, the most suitable solid-liquid ratio for maximum xylanase production in the case of solid fermentation was found to be 1:2.5

Keywords: Xylanases, Fermentation, Xylane, Production, *Bacillus pumilus SV-85S*, *Streptomyces.7b*, Wheat bran, Optimization.