



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
Filière : sciences biologique

Référence / 2018

MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté et soutenu par :
GOUANED Fatima et BERRICH Aicha

Le : dimanche 18 juin 2023

Production de xylanases à partir d'une souche xylanolytique

Jury :

Mme. BOUKHROUBA Khadidja	Pr	Université de Biskra	Président
M. HEBAL Hakim	MCA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme. DENDOUGA Wassila	MCA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2022-2023

Remerciements

Tout d'abord, nous rendons grâce à Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage, la Volonté, et la force nécessaire pour réaliser ce Travail.

Nous tenons à remercier notre encadreur M **Hebal Hakim** ses conseils, sa disponibilité, et ses orientations qui nous ont permis de mener à bien l'ensemble de nos recherches.

Nous tenons à remercier les membres de jury, **Boukharouba khedidja** , **Dendouga wassila** d'avoir accepté de juger Nôtre travail

Nous tenons à remercier tous les enseignants du Département des sciences de la nature et de la Vie qui nous ont suivis durant notre formation notamment habel abdelhakim

Dédicace

Je dédie ce modeste travail:

A ma mère, Pour son affection, sa patience, sa compréhension, sa
disponibilité, son écoute

permanente et son soutien sans égal dans les moments les plus
difficiles de ma vie.

A mes sœurs : Hayet et Aya

A ma chère binôme : Faty en particulier

A ma grande famille, mes amis et collègues : Bouchra, Yousra , Abir
Sabrine

Aicha

Dédicace

Je dédie ce modeste travail:

A ma mère, Pour son affection, sa patience, sa compréhension, sa
disponibilité, son écoute

permanente et son soutien sans égal dans les moments les plus
difficiles de ma vie.

A mes sœurs : Almaza , Samah .

A ma chère binôme : Aicha

A ma grande famille, mes amis et collègues : Bouchra, Yousra , Abir
Sabrine ,

Fatima

Table des matières

Liste des Tableaux.....	I
Liste des Figures.....	II
Liste des abréviations.....	III
Introduction.....	1

Partie 1 : Partie Bibliographique

Chapitre 1 : Partie bibliographique

1.1. Biomasse lignocellulosique :	3
1.1.1. Compositions de matière lignocellulosique	3
1.1.1.1. Cellulose	3
1.1.1.2. Lignine	4
1.1.1.3. Hémicellulose	5
1.1.1.4. Xylane	6
1.2. Xylanases.....	7
1.2.1. Mécanisme d'action	7
1.2.2. Productions des xylanases.....	8
1.2.3. Applications des xylanases	9

Partie 2 : Partie Expérimentale

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

2.1. Matériel biologique.....	11
2.2. Revivification de la souche.....	11
2.2.1. Sur milieu solide	11
2.2.2. Sur milieu liquide.....	11
2.3. Effet de quelques paramètres environnementaux et nutritionnels.....	12
2.3.1. Effet de température sur l'activité enzymatique :	12
2.3.2. Détermination cinétique.....	13

Chapitre 3 : Résultats et discussions

3.1. Effet de température sur la production des enzymes xylanolitiques	15
3.2. Cinétique enzymatique	17
Conclusion.....	18
Références bibliographiques	19

Liste des Tableaux

Tableau 1. Composition de quelques biomasse-lignocellulosique	3
Tableau 2. Applications actuelles des xylanases dans les industries alimentaires et non-alimentaires.	9

Liste des Figures

Figure 1. Représentation de la chaîne de cellulose (Mazza, 2009)	4
Figure 2. Structure de la lignine (selon Morot-Gaudry, 2010).....	5
Figure 3. Principaux monomères de l'hémicellulose	6
Figure 4. Structures chimiques d'une chaîne de xylane (Harris et Ramalungam, 2010).....	7
Figure 5. Aspect des colonies sur milieu solide	11
Figure 6. Milieu de xylane.	Error! Bookmark not defined.
Figure 7. Effet de température sur l'activité enzymatique.	15
Figure 8. Effet de température sur le taux de protéine sur la production des enzymes xylanolytiques par streptomonospora alba.	16
Figure 9. Effet de température sur la production des enzymes xylanolytiques par streptomonospora alba. En bleu : activité enzymatique ; en rouge : le taux des protéines.	16
Figure 10. Effet de température et protéine et l'absorbance de bactérie en fonction de temps.	17

Liste des abréviations

BL	Biomasse lignocellulosique.
DNS	Acide dinitro-salicylique.
K₂HPO₄	Hydrogénophosphate de potassium.
KCl	Chlorure de potassium.
KNO₃	Nitrate de potassium.
MgSO₄	Sulfate de magnésium.
NaCl	Chlorure de sodium.
NaH₂PO₄	Di-hydrogénophosphate de sodium.
pH	Potentiel hydrogène.
XOS	Xylooligosaccharides.

Introduction générale

Introduction

La biomasse lignocellulosique est la source naturelle la plus abondante de polysaccharides et de polymères aromatique disponible dans le monde. Les plantes sont composées de cellulose, d'hémicellulose et de lignine comme principaux composants de leur paroi cellulaire.

La biomasse lignocellulosique de différentes compositions a été largement étudiée depuis quelques décennies pour produire de bioéthanol, des produits chimiques de plateforme et d'autres produits chimiques de valeur (Gundipalli et *al.*, 2022).

Xylan est le deuxième polysaccharide le plus abondant dans la nature représentant environ un tiers du carbone organique renouvelable sur terre, et il constitue le composant majeur de l'hémicellulose, le xylane est principalement présent dans la paroi cellulaire secondaire avec la cellulose et la lignine constituants interagissent via des liaisons covalentes et non covalentes, le xylane se trouvant à l'interface entre la lignine et la cellulose, ou il est considéré comme important pour la cohésion des fibres et l'intégrité de la paroi cellulaire végétale (Motta et *al.*, 2013).

Les xylanases sont des enzymes hydrolases qui clivent de manière aléatoire le squelette β 1,4 des complexes polysaccharides xylane de la paroi cellulaire végétale.

Ces enzymes ont différentes formes et différentes par leur repliement, leur mécanisme d'action, leur spécificité de substrat, leur activité hydrolytique (rendement, taux, produits) et leurs propriétés physicochimiques (Tony et *al.*, 2005).

Les bactéries, telle que *Bacillus* et *Streptomyces*, sont parmi les sources les plus courantes de xylanases présentent un intérêt particulier en raison de leur spécificité pour l'arabinoxylane.

Les xylanases de *Streptomyces* sont également largement utilisées dans diverses applications industrielles, telles que la production de biocarburants et la transformation des pâtes et papiers. Les souches de *Streptomyces* produisent à la fois des endo- et exo-xylanases, qui peuvent dégrader le xylane en xylose, xylobiose et XOS.

Les réactions ont également une température optimale où l'enzyme fonctionnera toujours à des températures plus efficacement. Il fonctionnera toujours à des températures plus élevées et plus basses, mais le taux sera moindre. Pour de nombreuses réactions biologiques, la température optimale se situe dans des conditions physiologiques qui se situent autour de 37°C qui est la température corporelle normale. De nombreuses enzymes perdent leur

fonction à des températures plus basses et plus élevées, une enzyme la forme de se détériore, Ce n'est que lorsque la température revient à la normale que l'enzyme retrouver sa forme et son activité normale à moins que la température ne soit si élevées qu'elle cause des dommages irréversibles.

L'objectif principal de notre travail vise à étudier l'influence de certains paramètres sur la production de xylanase (hémicellulose) par une souche xylanolytique isolée à partir du sol de Biskra, et ce, dans le but de fournir à l'industrie les enzymes performantes nécessaires à la valorisation de la biomasse lignocellulosique. Ces paramètres inclus la température et le temps d'incubation qui sont parmi les plus important en industrie.

Partie 1 :
Partie Bibliographique

Chapitre 1 :

Partie bibliographique

1.1. Biomasse lignocellulosique :

La biomasse lignocellulosique (BL) est l'une des ressources renouvelables les plus abondantes et les moins chères et se compose de trois groupes de constituants principaux (Fan *et al.*, 1982) : la cellulose et l'hémicellulose, les monomères macromolécules tridimensionnels dérivés des sucres, la lignine et le phénylpropane justifier la parole corporelle (Malherbe et Cloete, 2002) le rapport des ces trois composants varie en fonction du type de biomasse et de la partie de la plante qui est récoltée, mais en plus de ces composants majeurs, la biomasse contient de petites quantités de pectine, de composés inorganiques, des protéines et d'extraits. Sa complexité structurale et chimique (résistance) le rend difficile à dégrader.

Tableau. 1. Composition de quelques biomasse-lignocellulosique (Coubert, 2007).

Composition moyenne (%massique)	C	H	O	N	MM
Feuillus	51,4	6,1	42,5	0,4	2.5
Résineux	50,8	6,1	42,7	0,4	2.3
Paille	48,9	6	43,9	0,8	7,3
Balle de riz	48,2	6,5	45,1	1,2	15,8
Bagasse	53,1	6	38,7	1,25	9,3
Tiges de coton	49,5	5,8	43,8	1,2	8,5

1.1.1. Compositions de matière lignocellulosique

1.1.1.1. Cellulose

La cellulose est un composant de la membrane squelettique des cellules végétales. C'est un sucre, polymère du glucose, de formule $(C_6H_{10}O_5)_n$, ou n est compris entre 200 et 3000. Sa structure chimique est bien connue, mais ses structures cristalline et fibreuse n'ont pas été totalement élucidées. A l'état naturel, la cellulose est fibreuse et partiellement cristalline. Il est

lié à l'hémicellulose et le complexe cellulose-hémicellulose est appelé holocellulose (Couhert, 2007).

La cellulose est composée de plus de 95% de glucose, bien que de petites quantités de certains sucres tels que la galactose, le mannose et le xylose puissent être incorporées dans la chaîne. Le nombre de liaisons glucose (ou degré de polymérisation) varie selon l'origine de la cellulose.

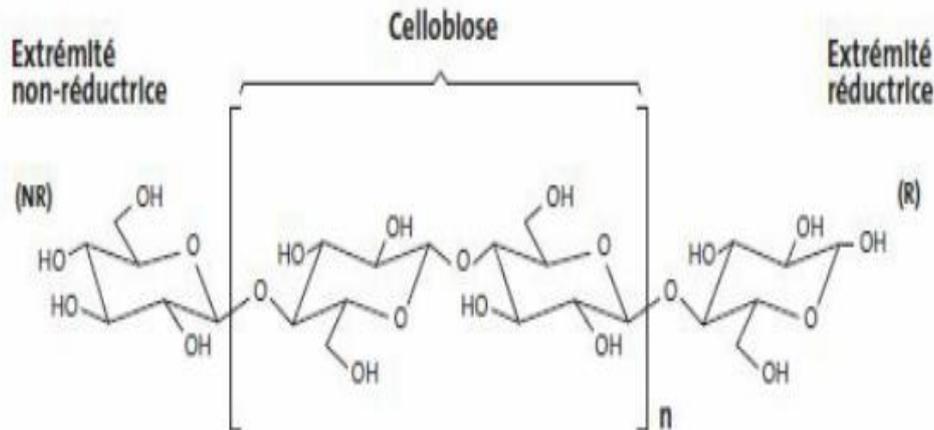


Figure.1. Représentation de la chaîne de cellulose (Mazza, 2009)

1.1.1.2. Lignine

La lignine est l'un des principaux constituants des biomasses lignocellulosiques. Elle représente 20 à 30% du carbone de la biomasse végétale. Après la cellulose, c'est le second composé organique le plus abondant de la biosphère. La lignine est un nom générique pour désigner un ensemble de polymères phénoliques tridimensionnels, de masses moléculaires élevées, ramifiés, de compositions et de structure variables et complexes. Localisée dans la paroi primaire des cellules végétales, elle leur confère imperméabilité, rigidité et inextensibilité. La lignine se présente comme un réseau structural tridimensionnel insoluble dans l'eau et très résistant aux attaques chimiques et enzymatiques. Plusieurs millions de tonnes de lignine provenant de l'industrie papetière et des usines de bioéthanol pourraient être obtenues et exploitées chaque année (10 à 20% de la lignine générée), seule une infime partie est actuellement valorisée (Rakotoveloa *et al.*, 2019).

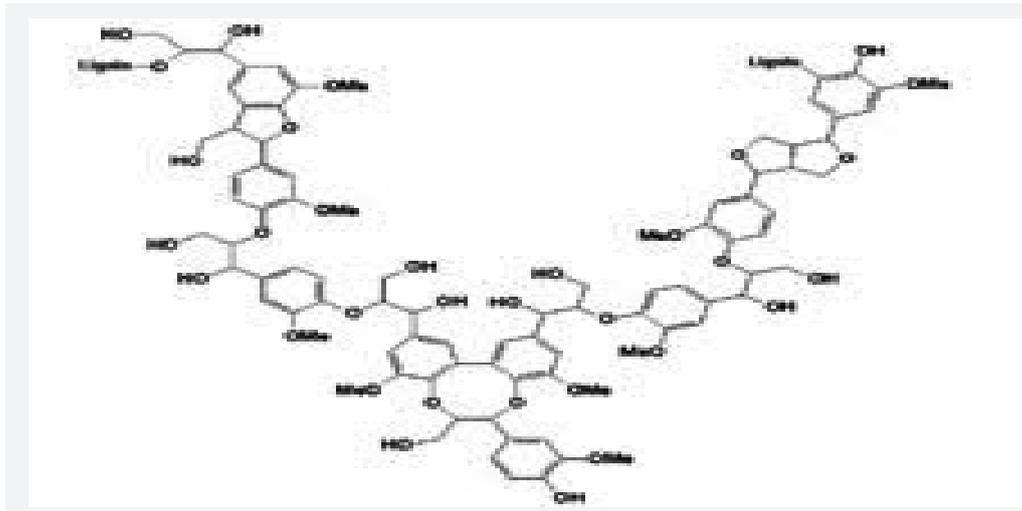


Figure. 2. Structure de la lignine (selon Morot-Gaudry, 2010).

1.1.1.3. Hémicellulose

Peut être définie comme un polysaccharide de paroi cellulaire qui est fortement lié aux microfibrilles de cellulose par liaison hydrogène et forces de van der Waals (Carvalho *et al.*, 2008 ; Liu *et al.*, 2020 ; Liu *et al.*, 2021). En général l'hémicellulose est un groupe hétérogène de polysaccharides d'origine végétale qui comprend le D-xylose, le D-mannose, la D-galactose, le L-arabinose, le D-galactose et l'acide 4-O-méthyle-D-glucuronique. Le xylose est toujours l'ose le plus représenté. Consistait en l'hémicellulose est utilisée pour produire de l'alcool par fermentation et du sorbitol par réduction (Girio *et al.*, 2010), et a d'importantes applications dans l'alimentation, les cosmétiques, la fabrication d'explosifs et la fabrication de papier (Falco *et al.*, 2010..2013 ; Zhao *et al.*, 2014). Les pentoses d'hémicellulose sont également utilisés dans furonique, de xylose et de xylitol (Yoon *et al.*, 2006 ; Du *et al.*, 2019 ; Liu X. *et al.*, 2019). Plus important encore, les xylooligosaccharides, en tant que l'un des produits de dégradation de l'hémicellulose, sont largement utilisés dans les domaines des aliments fonctionnels et pharmaceutiques en raison de leurs propriétés physiques et chimiques uniques et de leurs fonctions physiologiques (Bian *et al.*, 2014).

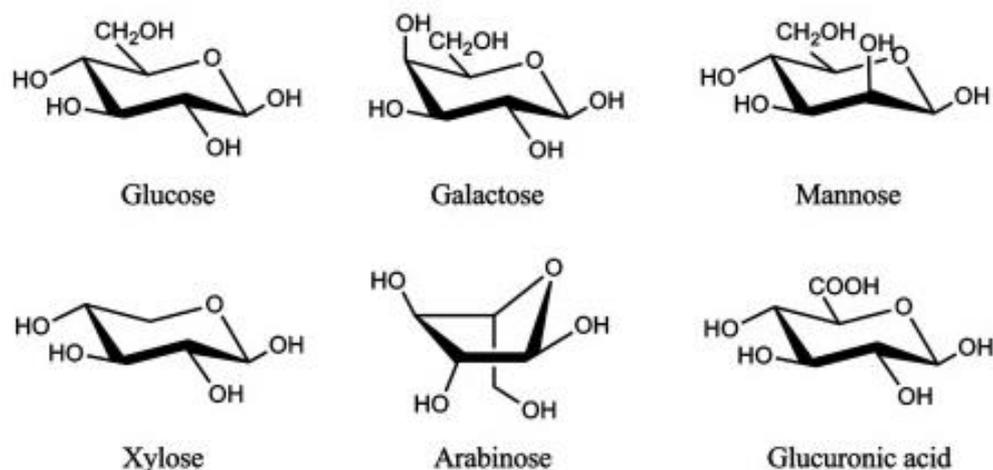


Figure. 3. Principaux monomères de l'hémicellulose

1.1.1.4. Xylane

Le xylane représente le principal composant de l'hémicellulose dans les parois cellulaires végétales secondaires des plantes à fleurs. Le xylane est un polymère du xylose, un polysaccharide linéaire, ce polysaccharide est constitué d'une chaîne linéaire de résidus xylose et de diverses ramifications et substitutions. Les xylanes soutiennent ou stockent des substances dans les plantes.

Le xylane est un hétéropolysaccharide végétal, appartenant à l'hémicellulose, l'unité répétitive la plus importante (unité monomère) est le D-xylose. Le xylane est le plus répandu dans la nature. Le xylane se dégrade plus rapidement que la cellulose. Le β -1,4-endoxylanase et la β -xylosidase sont les enzymes responsables de l'hydrolyse du squelette. Ils représentent les principaux composants du système de dégradation du xylane et produisent du xylose, du xylobiose et des oligomères de 2 à 6 unités. De nombreux organismes produisent des enzymes extracellulaires qui peuvent le décomposer. Les bacilles, les sporocytophages, les clostridium et d'autres bactéries prédominent dans les sols neutres ou alcalins, tandis que les champignons filamenteux prédominent dans les sols acides.

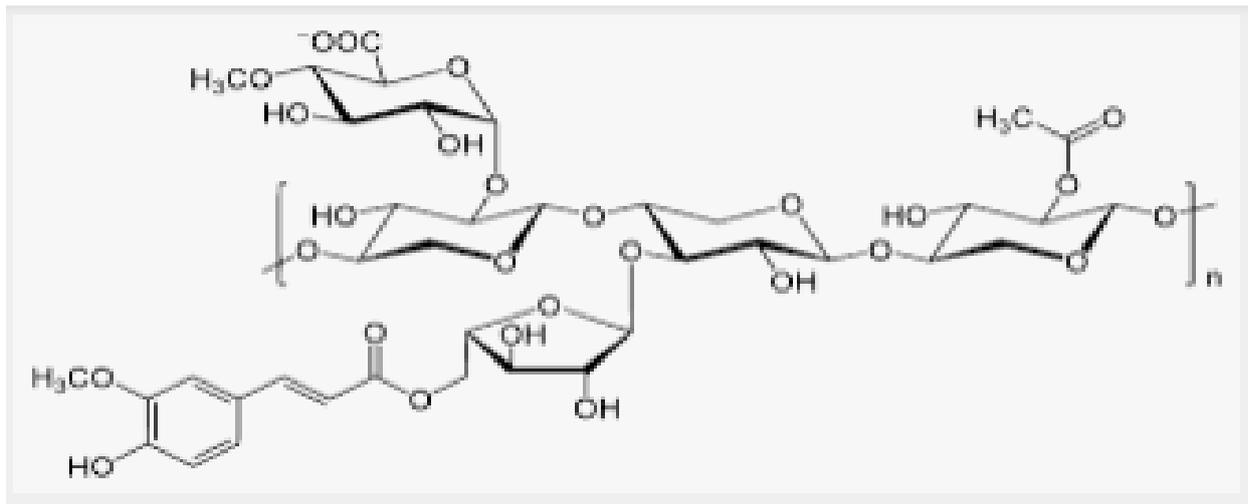


Figure. 4. Structures chimiques d'une chaîne de xylane (Harris et Ramalungam, 2010).

1.2. Xylanases

Les xylanases sont des glycosidases (O-glycoside hydrolases, EC 3.2.1.x) qui catalysent les liaisons 1,4-D-xylosidiques dans les régions non substituées des chaînes de xylandes pour aboutir au xylose (une source de carbone primaire nécessaire au métabolisme cellulaire) (C holtz et Leeuwenhoek, 1991) elles constituent un complexe multi-enzymatique qui se trouve en particulier dans les bois (Kalogeris et *al.*, 1998), comme ils sont aussi secrétées par de nombreux champignons (pathogènes et saprophytes) par des bactéries marines et telluriques ainsi que par les micro-organismes du rumen (protozoaires et bactéries) et les levures. En distinguer les endo et les exoxyanases.

Les endo-D-xylanases, β -D-(1-4) xylane xylanohydrolase (EC 3.2.1.8), dégradent leurs substrats par une attaque intramoléculaire.

Les exo-D-xylanases, xylane xylanohydrolase, (EC 3.2.1.37) hydrolysent les polymères de xylose par récurrence à partir de leur extrémité non-réductrice.

1.2.1. Mécanisme d'action

En raison de l'hétérogénéité et de la complexité du xylane, hydrolyse complète du xylane nécessite d'action combinée d'endo- et d'exo-enzymes qui non seulement hydrolysent les liaisons au sein de la chaîne principale, mais libèrent également des composants de la chaîne latérale.

En effet, les enzymes qui attaquent les liaisons intérieures de type B1, 4-xylosidique appelées endo-B-1,4-xylanase (EC3.2.1.8) libèrent des oligomères de petite taille.

Les exo-xylanase et les B-xylosidase (EC3.2.1.37) hydrolysent les petites oligomères libérées par endoxylanase, en xylose.

Les enzymes accessoires ou enzymes de débranchement éliminant les chaînes latérales sont aussi nécessaires. Ce sont les α -L-arabinofuranosidases ou xylanes-1,4-B- xylonidases (EC3.2.1.55), les α -glucuronidase, les acétyl-xylan estérases et coumarique et férulique estérases.

Les glycoside-hydrolase fonctionnent selon deux mécanismes de type acide/base, entraînant une rétention ou une inversion de la configuration du carbone anomérique du site d'hydrolyse (Haberra, 2013).

1.2.2. Productions des xylanases

Les enzymes xylanolytiques sont le choix d'un substrat inducteur approprié et d'une composition de milieu optimale. L'importance des systèmes de xylanase sans cellulase dans l'industrie du papier et de pâte à papier a initié recherche sur la corrélation entre la production des xylanase et des cellulase par les micro-organismes. Les champignons filamenteux sont des producteurs particulièrement intéressants des xylanase puisqu'elles excrètent les enzymes dans le milieu et leurs niveaux d'enzymes sont beaucoup élevés que celles des levures et des bactéries. Cependant, les champignons les xylanases sont généralement associées aux cellulases.

La production sélective de xylanase est possible dans le cas des espèces *Trichoderma* et *Aspergillus* utilisant uniquement le xylane comme source de carbone. Sur cellulose ces souches produisent à la fois de la cellulase et de la xylanase qui peut être due à des traces d'hémicellulose présentes dans les substrats cellulosiques.

Les mécanismes qui régissent la formation d'enzymes extracellulaires avec référence aux sources de carbone présentes dans le milieu sont influencés par la disponibilité de précurseurs pour synthèse des protéines. Par conséquent chez certains champignons, la croissance des cellules sur xylane non contaminées par cellulose sous un rapport azote /carbone plus faible dans le milieu peut être une stratégie pour produire des systèmes xylanolytiques exempt de cellulase. Cependant, les substrats cellulosiques se sont également

avérés essentiels dans le milieu pour une production maximale de xylanase par *Clostridium Stercorarium*, *Thermomonospora curvata* et *Neurospora crassa*. Substrats hémi cellulosiques moins chers comme l'épi de maïs, le son de blé, le son de riz, la paille de riz, la tige de maïs et la bagasse ont également été s'est avéré le plus approprié pour la production de xylanases dans le cas de certains micro-organismes tels que *Aspergillus awamori*, *Penicillium purpurogenum* et alcaliphile thermophile *Bacillus* sp.

1.2.3. Applications des xylanases

En raison de leurs caractéristiques biotechnologiques, les xylanases sont le plus souvent produites à partir de microorganismes pour des applications commerciales (tableau2).

Tableau. 2. Applications actuelles des xylanases dans les industries alimentaires et non-alimentaires (Haberra, 2013).

Marché	Applications	Fonctions
Alimentation humaine	<ul style="list-style-type: none"> - Nectars, purées, huiles - Panification - Jus de fruits - Amidon - La bière 	<ul style="list-style-type: none"> - Amélioration de la macération et de la clarification des jus, réduction de la viscosité - Les xylanases sont utilisées comme additifs pour améliorer la qualité boulangère (l'élasticité et la résistance des farine) et grâce a leur effet antiraccissants, elles permettent une meilleure rétention de l'eau, - Surtout dans le secteur de la clarification des jus, leur hydrolyse facilite la filtration et engendre de meilleurs rendements - Séparation facilitée de l'amidon et du gluten par réduction de la viscosité - C'est une technologie ancestrale reposant sur la fermentation alcoolique des sucres, essentiellement le maltose. Ces enzymes assurent donc une filtration et une bonne clarification des bières.
Alimentation animale	Nourriture pour animaux monogastriques et ruminants	- Diminution du contenu en monosaccharides non amidon d'ou une baisse de la viscosité et une meilleure disponibilité des protéines et de l'amidon qui accroît la digestibilité et la valeur nutritionnelles des aliments.

<p>Industrie non alimentaire</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Pates et papiers -Textiles -Bioconversions -synthèses des alkyl-xylosides 	<ul style="list-style-type: none"> - Blanchiment des pats krafts, séparation des encres, donc réduction de l'utilisation chlores et alcalins. -Amélioration des procédés mécaniques de pulping qui aboutit a une baisse de consommation en énergie - Préparation des fibres par trempage et macération remplaçants les procédés chimiques. - Traitement des déchets, Production des composes fermentescibles, carburants renouvelables (bioéthanol), chimie fine (tensio-actifs). - Les alkyl-xylosides sont des dérivés du xylose, ils sont les candidats les plus promoteurs de nouveaux agents tensioactifs parce qu'ils sont faits a partir de ressources renouvelables naturelles (hémicelluloses) d'hydrates de carbone et d'alcool gras.
---	--	--

Partie 2 :

Partie Expérimentale

Chapitre 2 :

Matériel et méthodes

2.1. Matériel biologique

La souche bactérienne utilisée dans ce travail de recherche est la souche xylanolytiques *Streptomonospora alba*, isolée par l'étudiante CHENIA Meriem à partir du lac salin de L'outaya Biskra en 2015. Elle est identifiée sur la base de leur caractéristique morpho physiologique, et biochimiques.

Ce travail se propose d'optimiser la production de xylanase halophile par cette souche en suivant une méthode classique. Elle consiste à déterminer les meilleures conditions de culture pour la production de ces enzymes. L'amélioration a porté sur l'effet de la température sur la croissance et la production de xylanases, ainsi que la cinétique de production des enzymes xylanolytique.

2.2. Revivification de la souche

2.2.1. Sur milieu solide

Elle est réalisée par prélèvement de quelques colonies à partir d'un tube incliné, quelle a été ensemencée sur un milieu solide synthétique à base de xylane (Figure 5) (voir annexe 1). L'ensemencement est réalisé suivant la technique de strie, les boites sont incubées à 37°C pendant 5 jours.



Figure. 5. Aspect des colonies sur milieu solide

2.2.2. Sur milieu liquide

Les colonies obtenues sont ensemencées dans un milieu liquide à base de xylane (Figure 6) (10ml dans chaque tube) (voir annexe 1). Cette pré culture est incubé à 37°C pendant 24h à 48h.

2.3. Effet de quelques paramètres environnementaux et nutritionnels

2.3.1. Effet de température sur l'activité enzymatique :

Pour étudier l'effet de la température sur l'activité enzymatique, le mélange de dosage enzymatique ou de milieu de culture contenant chacun 9ml , à pH 7, sontensemencés avec 1 ml de la préculture puis incubé à différents températures à savoir 20, 25, 30, 35, 37 et 45 C° prés 48h, et l'activité enzymatique a été déterminé en mesurant la quantité de sucres réducteurs libérés par l'enzyme à l'aide de 3,5 méthode de l'acide dinitro-salicylique, les surnageant sont centrifugés 8000 rpm pendant 20 minutes pour les mesures d'activités et le dosage des protéinés.

2.3.1.1.Préparation de la solution du tampon phosphate:

La solution de tampon est préparée en mélangeant 19.5ml de solution NaH_2PO_4 à (0.2M) avec 30.5ml de solution Na_2HPO_4 (0.2M) dans 150ml de l'eau distillé à pH 7.

2.3.1.2. Préparation de la solution de substrat :

La solution de substrat est préparée en ajoutant 1.1g xylan avec 90ml de Tampon phosphate et ajuster jusqu'à 100ml de tampon phosphate.

2.3.1.3. Mesure de l'activité enzymatique :

L'activité enzymatique a été déterminée en mesurant la quantité de sucre réducteur libéré à partir de solutions 1% (p/v) de xylan birchwood suivant la méthode au DNS.

La solution 1% de xylane est préparée en dissolvant 1g de ce substrat dans 100ml de tampon phosphate de sodium.

Le mélange réactionnel contient 0,1 ml de surnageant (extrait enzymatique) et 0,9ml de la solution xylane (1%). Il est incubé à 50°C pendant 30 minutes. La réaction enzymatique est arrêtée par ajout de 1,5 ml de DNS et le mélange est porté à ébullition à100°C pendant 5minutes. Le mélange est par la suite refroidi dans une eau glacée.

Le mélange témoin correspond à la solution de xylane incubée sans le surnageant, celui-ci étant ajouté après le DNS.

La lecture des absorbances est effectuée à 540nm, au spectrophotomètre.

2.3.1.4. Dosage de protéines

Le dosage des protéines sont mesurées à l'aide de la méthode de Bradford (1976), cette méthode est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance (la mesure se fait à 595 nm), se manifestant par le changement de la couleur du bleu de coomassie après liaison (complexation) avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présent dans la ou les protéines.

La forme anionique (liée) du colorant est bleue, et possède un spectre d'absorption maximal estimé historiquement à 595nm. Les formes cationiques (libres) du colorant sont rouges et vertes, absorbant à 465-470 nm. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant donc la concentration en protéines dans l'échantillon.

Nous avons utilisé deux méthodes :

- **Macrométhode :**

On mélange 100µl de la surnageant avec 5ml de réactif Bradford et nous le mettons dans l'obscurité pendant 10 minutes et à la fin on spectrophotomètre 595nm.

- **Microméthode :**

On mélange 800µl de la surnageant avec 200ml de réactif Bradford et nous le mettons dans l'obscurité pendant 10 minutes et à la fin on spectrophomètre 595 nm.

2.3.2. Détermination cinétique

Nous avons préparé un milieu contenant 3g de xylane, 1g KNO₃, 0.5g NaCl, 6g KCl, 1g K₂HPO₄, 0.04g MgSO₄, dans 200ml de l'eau distillé à pH 9.5 .

Nous avons divisée le milieu en 180ml dans un flacon et 20ml dans un autre flacon, nous avons cultivés la souche bactérienne dans ce dernier. Ensuite, il a été incubé à 30°C pendant 24h.

Dans un erlenmeyer nous avons mélangé le contenu des deux flacons. Puis on a prélevé 5ml du milieu, après quoi on a mesure l'absorbance de bactérie (600nm) et l'activité enzymatique (540 nm) et le mesure la protéine (595nm).

Chapitre 3 :

Résultats et discussions

3.1. Effet de température sur la production des enzymes xylanolitiques

Parmi les facteurs importants qui affectent considérablement la production de xylanases ont trouvé la température de la culture. Plusieurs travaux de recherche ont montré que la culture de plusieurs microorganismes (bactérie et champignons) à une température défavorable, limite leur l'accessibilité au substrat hémicellulosique, baisse le taux de leur croissance et la production de xylanases (Gasper et *al.*, 1997).

Les résultats de l'effet de température sur la production d'enzymes xylanolytique sont présentés sur les figures dessous :

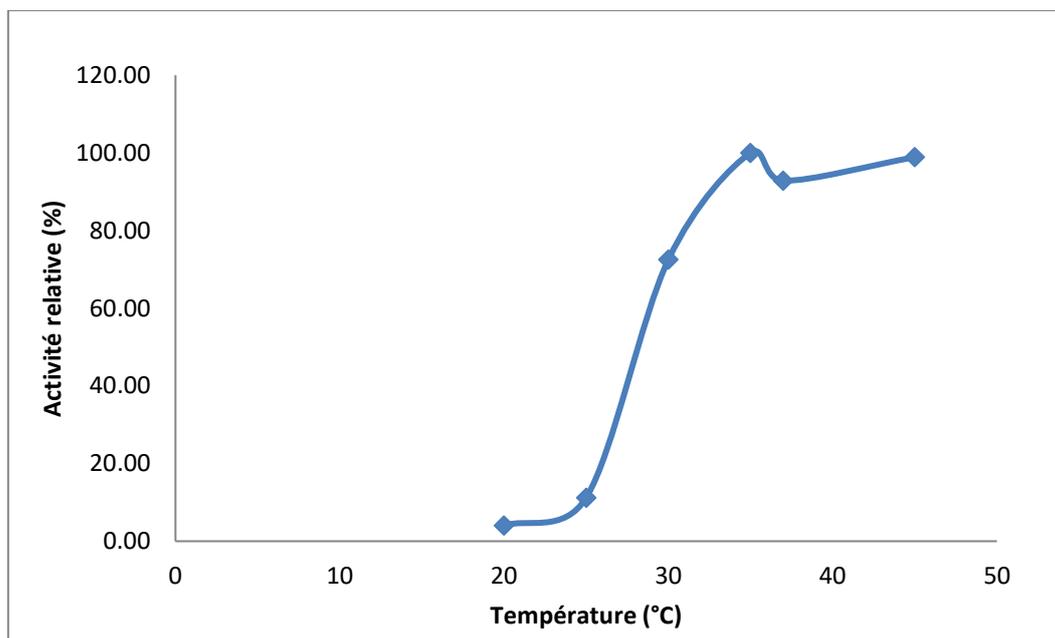


Figure. 6. Effet de température sur l'activité enzymatique.

La figure montre la température optimale pour la production de xylanase par *streptomonospora alba* est 35°C, alors que nous avons trouvé dans d'autres recherches sur les bactéries que la température optimale pour la production de cette enzyme, *streptomyces sp.RCK-2010* (Kumar et *al.*, 2011), *bacillus sp, B.halodurans* à 60-70°C (Bhardwaj et *al.*, 2019).

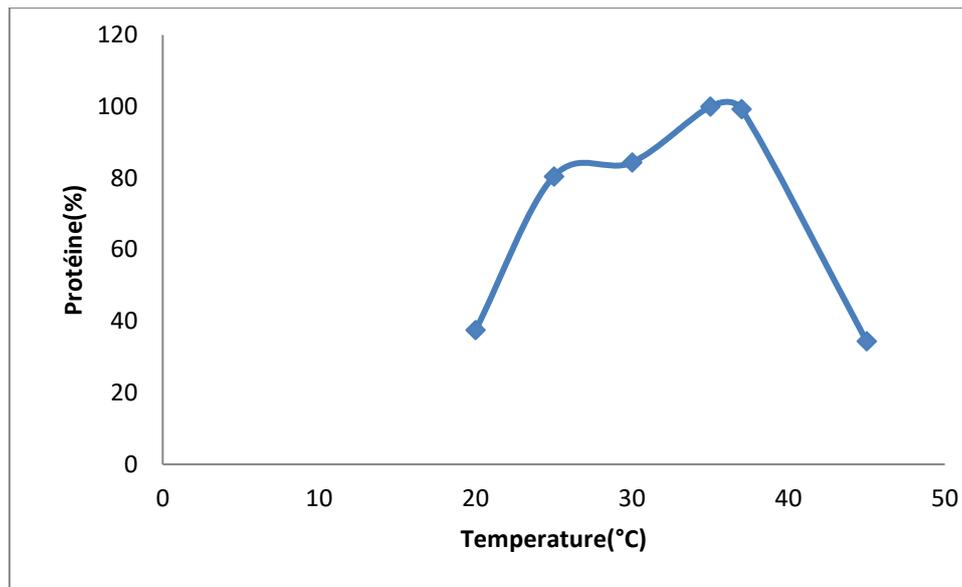


Figure. 7. Effet de la température sur la production des enzymes xylanolytiques par *streptomonospora alba*.

Les résultats obtenus ont montré que la meilleure température affectant la mesure protéine est 35°C à valeur (0.128 μ L/mg). D'autre part une température optimale similaire pour la production d'enzymes a été signalée pour certains *S.matensis* DW67 est 65°C (Leya et al., 2013).

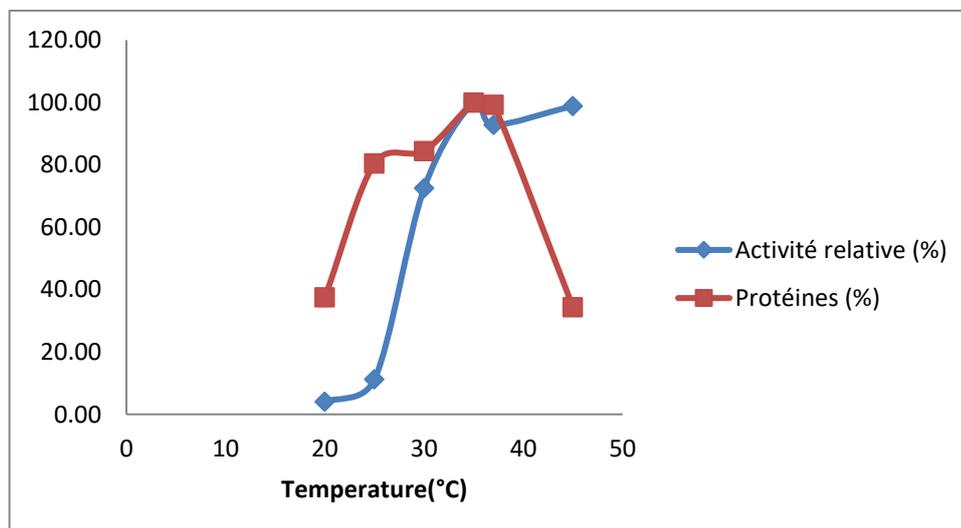


Figure. 8. Effet de température sur la production des enzymes xylanolytiques par *streptomonospora alba*.

La souche croit et produit des enzymes xylanolytique à toutes les températures utilisées. La température optimale pour une production maximale des enzymes xylanolytiques est 35°C.

Une activité importante est enregistrée à température de 45°C (98.8%). il est possible que d'autre type d'enzymes xylanolytique différents de ceux à 35°C soient produits à cette température.

La profile d'activités coïncide avec le profil protéique. Suggèrent que la croissance est associée à la production d'enzymes xylanolytique. Un taux maximal de protéines est observé à 35°C, indiquant que la souche est mésophile. Une activité faible presque nulle est observée en 20°C (0.04%). Ceci suggère que les protéines produites par la souche à cette température ne sont pas des enzymes xylanolytique, et que la souche utilise l'extrait de levure comme source de carbone.

3.2. Cinétique enzymatique

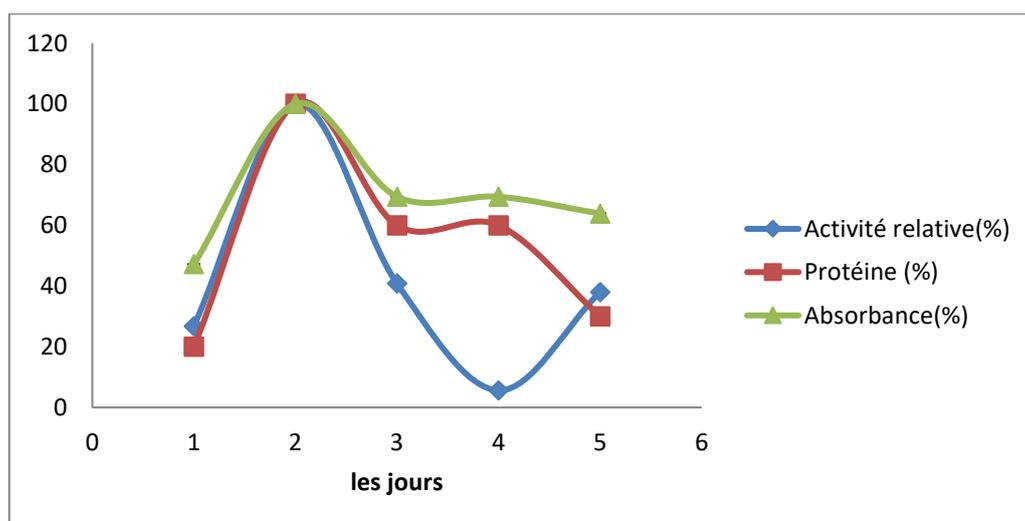


Figure. 9. Effet de température et protéine et l'absorbance de bactérie en fonction de temps.

Dans notre expérience, la production de xylanase par *streptomonospora alba* a été étudiée pendant 4 jours d'incubation, les résultats de la figure 10 indiquant que l'activité de xylanase on commencé le 1ère jour d'incubation, une diminution significative des activités de la xylanase a été observé à partir de 3jour, d'autre part une incubation optimum pour une production de xylanase plus élevée après 3jours de croissance à 42°C chez *Aspergillus phoenicis* (Rizzatti et al., 2004).

Conclusion

Les xylanases ont suscité un intérêt en raison de leurs applications potentielles dans divers domaines industriels, notamment les industries de la pâte et du papier, la production de bioéthanol et l'industrie des aliments pour animaux. Dans la production de composés lignocellulosiques, la xylanase peut améliorer l'hydrolyse de la cellulose en sucres fermentescibles, car le xylan empêche les cellules d'agir efficacement.

Le xylan est présent en grande quantité dans les déchets des industries agricole et alimentaire. Les xylanases revêtent ainsi une importance croissante pour la bioconversion des lignobiomasses cellulosiques, y compris les résidus solides urbains, en xylose et autres fermentescibles sucres pour la production de carburants biologiques (éthanol).

Dans notre étude, nous avons constaté que la meilleure production d'enzymes était à une température 35°C suivie de taux de protéine elle était élevée à une température 35°C. Une activité et une croissance à une telle température suggère que cette bactérie est l'un des microorganismes mésophiles les plus actifs dans la dégradation de la matière lignocellulosique dans le sol. Une activité très élevée à 45°C montre que les xylanases produites par cette souche seraient thermostables ce qui est très avantageux d'un point de vue industrielle.

Lorsque nous avons étudié la cinétique de l'enzyme en fonction du temps (l'activité enzymatique, le taux de protéine, l'absorbance de bactérie), nous avons obtenu des résultats montrant que ces paramètres étaient élevés le premier jour. Une production de xylanases pendant un court temps d'incubation serait très avantageuse pour l'industrie, car ceci permettrait de réduire le coût de production de cette enzyme.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Bhardwaj, N., Kumar, B., & Verma, P. (2019). A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. *Bioresources and Bioprocessing*, 6(1), 1-36.
2. Bian, Z., Tachikawa, T., Zhang, P., Fujitsuka, M., & Majima, T. (2014). Au/TiO₂ superstructure-based plasmonic photocatalysts exhibiting efficient charge separation and unprecedented activity. *Journal of the American Chemical Society*, 136(1), 458-465.
3. Carvalho, F., Duarte, L. C., & Gírio, F. (2008). Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of scientific & industrial research*, 849-864.
4. Couhert, C. (2007). Pyrolyse flash à haute température de la biomasse ligno-cellulosique et de ses composés: production de gaz de synthèse (Doctoral dissertation, École Nationale Supérieure des Mines de Paris).
5. Couhert, C. (2007). *Pyrolyse flash à haute température de la biomasse ligno-cellulosique et de ses composés: production de gaz de synthèse* (Doctoral dissertation, École Nationale Supérieure des Mines de Paris).
6. Di Falco, S., Penov, I., Aleksiev, A., & Van Rensburg, T. M. (2010). Agrobiodiversity, farm profits and land fragmentation: Evidence from Bulgaria. *Land use policy*, 27(3), 763-771.
7. Fan, L. S., Muroyama, K., & Chern, S. H. (1982). Hydrodynamic characteristics of inverse fluidization in liquid—solid and gas—liquid—solid systems. *The Chemical Engineering Journal*, 24(2), 143-150.
8. Gasper, D. (1997). Sen's capability approach and Nussbaum's capabilities ethic. *Journal of International Development*, 9(2), 281-302.
9. Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalho, F., Duarte, L. C., Marques, S., & Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource technology*, 101(13), 4775-4800.
10. Habbeche, A., Haberra, S., Saoudi, B., Kerouaz, B., & Ladjama, A. (2013). Keratinase production from a thermophilic actinomycete strain Cpt29 newly isolated from poultry compost. *Minerva Biotecnologica*, 25(3), 151-9.
11. Harris, A. D., & Ramalingam, C. (2010). Xylanases and its application in food industry: a review. *Journal of Experimental Sciences*, 1(7).

12. Holtz, C., Kaspari, H., & Klemme, J. H. (1991). Production and properties of xylanases from thermophilic actinomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 59, 1-7.
13. Kalogeris, E., Christakopoulos, P., Kekos, D., & Macris, B. J. (1998). Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: characterization of two isozymes. *Journal of Biotechnology*, 60(3), 155-163.
14. Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., & Satya, S. (2011). Insecticidal properties of *Mentha* species: a review. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 802-817.
15. Leya, I., & Masarik, J. (2013). Thermal neutron capture effects in radioactive and stable nuclide systems. *Meteoritics & planetary science*, 48(4), 665-685.
16. Liu, H., Chen, S., Liu, M., Nie, H., & Lu, H. (2020). Comorbid chronic diseases are strongly correlated with disease severity among COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis. *Aging & Disease*, 11(3).
17. Liu, K., E., Gilbert, A. T., Feng, X., Lee, J., Mao, Y., Mardirossian, N., Su, Y. C. (2021). Software for the frontiers of quantum chemistry: An overview of developments in the Q-Chem 5 package. *The Journal of chemical physics*, 155(8).
18. Malherbe, S., & Cloete, T. E. (2002). Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1, 105-114.
19. Mazza, R. (2009). *Introduction to information visualization*. Springer Science & Business Media.
20. Morot-Gaudry, J. F. (2010). Les Lignines. *Introduction, Académie d'Agriculture de France*.
21. Motta, F. L., Andrade, C. C. P., & 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, 251-276.
22. Polaina, J., & MacCabe, A. P. (2007). *Industrial enzymes* (pp. 531-547). Netherlands: Springer.
23. Rakotovelo, A., Peruch, F., & Grelier, S. (2019). Lignine: structure, production et valorisation chimique. *Edition TI ref. article: in*, 235, 33.
24. Rizzatti, A. C., Sandrim, V. C., Jorge, J. A., Terenzi, H. F., & Polizeli, M. D. L. T. (2004). Influence of temperature on the properties of the xylanolytic enzymes of the thermotolerant fungus *Aspergillus phoenicis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31(2), 88-93.

25. Tony, T. D. A , Rouet, F., Ekouevi, D. K., Chaix, M. L., Burgard, M., Inwoley, A.,... , ... & Rouzioux, C. (2005). Transfer and evaluation of an automated, low-cost real-time reverse transcription-PCR test for diagnosis and monitoring of human immunodeficiency virus type 1 infection in a West African resource-limited setting. *Journal of clinical microbiology*, 43(6), 2709-2717.
26. Torres, A., Peetermans, W. E., Vieg, G., & Blasi, F. (2013). Risk factors for community-acquired pneumonia in adults in Europe: a literature review. *Thorax*, 68(11), 1057-1065.
27. Xiao-Zhoa, Z. Sajjad, A., Hui, M., Muhammad, W. A., Yi-Heng, P. Z., (2014). Directed Evolution of Clostridium phytofermentans Glycoside Hydrolase Family 9 Endonuclease for Enhanced Specific Activity on Cellulose Solid Substrate. *Bioenergy Res*, 7(1), 381-388.
28. Yoon, S. D., Chen, Y., Yang, A., Goodrich, T. L., Zuo, X., Arena, D. A., ... & Harris, V. G. (2006). Oxygen-defect-induced magnetism to 880 K in semiconducting anatase TiO₂- δ films. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18(27), L355.

Annexes

Annexe 1 : Composition du milieu synthétique solide à base de xylane pour la production de xylanase (g/l)

- Xylane.....1.05g
- Extrait de levure.....0.3g
- NH₄Cl.....0.75g
- NaCl.....0.38g
- MgSO₄ 7H₂O.....0.03g
- Agar.....4g

Annexe 2 : Composition du milieu synthétique liquide à bas de xylane pour la production des xylanase (g /l)

- Xylane1.05g
- Extrait de levure.....0.3g
- NH₄Cl0.75g
- Nacl.....0.38g
- MgSO₄.....0.03g

Annexe 3 : Préparation du réactif de Bradford

Dans une fiole jaugée de 500ml, on dissout :

- Bleu de Comassie.....50mg
- Ethanol95%.....25ml

Agitation pendant 2heures puis, on ajoute :

- Acide phosphorique50ml
- H₂O distillée q.s.....500ml

Annexe 4 : Préparation du DNS (Acide 3,5dinitrosalicylique).

- DNS.....2g
- NaOH.....3,2g
- Tartrate KNa.....60g

Annexe 5 : Tampon phosphate :

- Solution Na₂H₂PO₄ (0,2M).....39ml
- Solution Na₂HPO₄ (0,2).....61ml

Annexe 6 : Préparation de 100ml de substrat de xylane.

- 90ml de tampon
- 1.1g de xylane

Ajouter jusqu'à 100ml tampon

Résumés

Résumés

ملخص

كان الهدف من عملنا انتاج الزيلاينز و تجديد افضل تأثير لدرجة الحرارة على انتاج هذا الانزيم من سلالة *Streptomonospora alba* كانت الظروف المثلى التي تم العثور عليها لتحقيق اقصى انتاج من الزيلاينز هي 35 درجة حرارة مئوية . يتم الحصول على انتاج مرتفع من الزيلاينز خلال الايام الاولى من الحضانة (48 ساعة).
الكلمات المفتاحية : الإنتاج ، درجة الحرارة , الحضانة .

Résumé

L'objectif de notre travail étaient de produire de la xylanase à partir de la souche *streptomonospora alba*, et détermination la meilleure influence de température sur la production de cette enzyme.

Les conditions optimales trouvées pour production maximale de xylanase étaient de 35°C. La production élevée de xylanase est obtenus pendant les premiers jours d'incubation (48 heure).

Mots clés: production, température, incubation.

Abstract

The objective of our work was to produce xylanase from the *streptomonospora alba* strain, and determining the best temperature influence on the production of the enzyme.

The optimal condition found for maximum xylanase production was 35°C, high production of xylanase is obtained during the first day of incubation (48hour).

Key Words : Production, température, incubation.