

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Microbiologie**  
**Filière : Sciences biologiques**  
**Spécialité : Biotechnologie microbienne**



Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

## **MASTER**

### *Thème*

**Optimisation de la production de xylanases**  
**Chez *Bacillus oceanisediminis* SJ3 par la**  
**méthode des plans d'expériences**

Présenté par :

**Achiou lila & Hidja lamia**

Soutenu le : **16 Juin 2016**

Devant le jury composé de :

Mr. KECHA Mouloud	Pr	Président
Mme. BOUCHERBA Nawel	MCA	Promotrice
Melle. DJINNI Ibtissem	MCB	Examinatrice
Mr. MESSIS Abdelaziz	MCA	Invité

**Année universitaire : 2015 / 2016**

## *Remerciements*

*En premier lieu nous remercions Allah le tout puissant pour toute la volonté et le courage qu'il nous a donné pour l'achèvement de ce travail.*

*Nos vifs remerciements s'adressent à notre très cher enseignant le président de jury Mr KECHA Mouloud qui nous a fait l'honneur de présider le jury.*

*Nous tenons à exprimer notre très gratitude et nos profonds respects à notre généreuse promotrice M<sup>me</sup> BOUCHERBA NAWEL d'avoir accepté de nous encadrer et pour sa présence, son aide et sa patience et à Mr MESSIS Abdelaziz pour leur enthousiasme, gentillesse et leur simplicité.*

*Nous tenons à remercier M<sup>lle</sup> DJMM ibtissem d'avoir bien voulu examiner notre travail.*

*Nous tenons à remercier également tout les gens qui nous ont aidés de près ou de loin à réaliser ce travail.*

*Sans oublier notre enseignante Mme IDRES ainsi que l'ingénieur du laboratoire de génie biologique Badria pour leur aide et conseils.*

*Un remerciement chaleureux aux équipes du laboratoire de microbiologie appliqué.*

**MERCI**

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A la mémoire de mon Papa , que son âme repose en paix et que Dieu l'accueille dans son vaste paradis.*

*Ma chère Maman qui a toujours été là pour moi que Dieu me la garde.*

*A mes deux frères (Samir et Hakim) et leurs conjointes respectifs (Djiga et Nora).*

*A mes grandes sœurs (Wassila, Hakima et Wahiba) et leurs conjoints respectifs.*

*A mes chers nièces et neveux (Sylia, Sophie, Yasmine, Louise, Malak, Adel, Oualid, Mouhamed, Anis, Blaid).*

*A mes cousins et cousines.*

*Je dédie également ce travail à tous mes amis, collègues et tous ce qui m'ont aidé de près ou de loin et plus particulièrement ma respectueuse camarade de mémoire de fin de cycle Lila.*

*Lamia. #*

## Dédicaces

*Tout au début, je tiens à remercier Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage et la patience afin de réaliser ce modeste travail que je dédie à :*

*Mes très chers et aimables parents (Boukhalifa et Wardia) qui ont été toujours à mes cotés et qui ont veillé à ma réussite en déployant tout les efforts nécessaires.*

*Mon cher frère unique (Fateh) que j'aime énormément et qui n'a cessé de me soutenir.*

*Mes chères et mignonnes sœurs (Sihem, Thiziri, Thilelli et Kenza) que le bon Dieu les protège pour moi.*

*Une personne que je respecte le plus et qui ne m'a jamais abandonné durant cette interminable année (Zoubir).*

*Mes chers grands parents et plus particulièrement (Yaya Baya).*

*Mes cousins ,mes cousines, mes amis(e) .*

*Celle qui m'a toujours tenu compagnie durant cette durée que je juge importante et à celle que je dois un remerciement particulier (Sabrina).*

*Mes copines de chambre (Nassima, Yasmína, Drifa, Nassima) avec les quels j'ai partagé mes douleurs et mes joies.*

*Ma chère camarade et compagne de mémoire de fin de cycle (Lamia) et sa famille.*

*Toute la promotion de M2 en biotechnologie microbienne.*

*Toute personne qui a contribué à la réussite de ce travail de près ou de loin.*

*LILA. A*

Liste des tableaux	
Listes des figures	
Introduction.....	01

## **PARTIE I : Synthèse bibliographique**

I- Xylanes .....	02
II-Enzymes xylanolytiques.....	02
II-1-Endo-1,4- $\beta$ – xylanase .....	02
II-2- $\beta$ - D-Xylosidases.....	03
III-Bactéries productrices de xylanases .....	03
III-2- <i>Bacillus oceanisediminis</i> H <sub>2</sub> <sup>T</sup> isolé a partir des sédiments marins .....	03
III-3- <i>Bacillus oceanisediminis</i> SJ3 isolé a partir d'un sol de jardin Algerien .....	04
IV-Paramètres influençant la production des xylanases :.....	07
IV-1- Taux d'inoculation.....	07
IV-2- Température et Temps d'incubation .....	07
IV-3- pH .....	07
V- plans d'expériences .....	08
V-1-Définition et intérêt des plans d'expérience.....	08
VI-Détermination des paramètres influençant la production des xylanases par utilisation du plan de Plackette Burman .....	08
VII- Response Surface Methodology (RSM) .....	09
VIII- Optimisation de la production de xylanases par utilisation du modèle « Box- Behnken ».	
IX-Domains principaux d'application des enzymes xylanolytiques.....	09

## **PARTIE II : Matériel et méthodes**

I-Matériel .....	11
I-1-Matériel analytique.....	11
I- 2-Matériel biologique.....	11
II-Méthodes .....	11

II-1- Revivification de la souche <i>Bacillus oceanisediminis</i> SJ3 .....	11
II-2-Préparation du milieu MM7.....	11
II-3-Détermination des paramètres influençant la production de xylanases (plan de Plackett-Burman).....	11
II-4-Mesure de l'activité xylanolytique.....	12
II-5-Optimisation des paramètres déterminants la production des xylanases.....	14

### **PARTIE III : Résultats et discussion**

I- Choix du milieu de culture .....	16
II- Détermination des paramètres influençant la production de xylanases par le plan de Plackett-Burman .....	16
III-Optimisation de la production de xylanases par utilisation du modèle (Box- Behnken).....	18
III-1- Détermination des interactions entre les variables .....	20
III-1-1-Interaction entre pH( $X_6$ ) et temps d'incubation( $X_7$ ).....	20
III-1-2-Interaction entre temps d'incubation ( $X_7$ ) et concentration de Xylane ( $X_8$ ).....	21
III-1-3-Interaction entre concentration de Xylane ( $X_8$ ) et temps d'incubation ( $X_7$ ).....	22
IV-validation du model .....	23
V-Détermination des valeurs optimales.....	24
V-1-Détermination de la valeur optimale de pH ( $X_6$ ) .....	24
V-2-Détermination de temps d'incubation ( $X_7$ ) .....	24
V-3-Détermination de la concentration de Xylane ( $X_8$ ) .....	24
Conclusion.....	25

#### Références bibliographique

Annexes
Annexe I
Annexe II
Annexe III
Annexe IV
Annexe V

<b>Tableaux</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau I</b>	Propriétés morphologiques, physiologiques et biochimiques de la souche SJ3	05
<b>Tableau II</b>	Matrice des expériences par unité codante plan de "Plackett-Burman"	12
<b>Tableau III</b>	Gamme d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs	13
<b>Tableau IV</b>	Résultat de l'optimisation de l'activité xylanolytique selon le plan « Box-Behnken »	15
<b>Tableau V</b>	Matrice des expériences par unité codante	17
<b>Tableau VI</b>	Résultat de l'optimisation de l'activité xylanolytique selon le plan Box-Behnken par unité codant	19
<b>Tableau VII</b>	Matrice des expériences par unité non codante	Annexe V
<b>Tableau VIII</b>	Résultat de l'optimisation de l'activité xylanolytique selon le plan « Box-Behnken » unité non codante	Annexe V

Figure	Titre	Page
Figure 01	Structure générale du xylane	02
Figure 02	Arbre phylogénétique de <i>Bacillus oceanisediminis</i> isolé a partir des sédiment marine	04
Figure 03	arbre phylogénique de <i>Bacillus oceanosidiminis</i> isolé a partir d'un Sol du jardin.	06
Figure 04	Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS	13
Figure 05	Charte pareto des effets standardisés	17
Figure 06	Contour plot définissant l'interaction entre pH ( $X_6$ ) le temps d'incubation ( $X_7$ )	20
Figure 07	Surface de réponse définissant l'interaction entre temps d'incubation ( $X_7$ ) et la concentration de Xylane ( $X_8$ )	21
Figure 08	Surface de réponse définissant l'interaction entre la concentration de Xylane( $X_8$ ) et le pH( $X_6$ )	22
Figure 09	Valeur optimales de variation et de la réponse déterminées par RSM pour une meilleur activité xylanolytique.	23
Figure 10	Droite d'étalonnage pour le dosage du xylose	Annexe IV



Les Xylanes sont des hémicelluloses considérées comme deuxièmes polysaccharides abondants dans la nature après la cellulose ( **Shanthi et al., 2015**). L'hémicellulose le plus retrouvé dans les parois cellulaires végétales est le xylane ; ce dernier est également abondant dans les co-produits agro-alimentaires ( **Collins et al., 2005**).

Les xylanases peuvent être utilisées dans divers applications industrielles telle que l'industrie papetière, la panification, l'industrie du jus et la fabrication des bio-carburants verts ( **Abo-state et al., 2013**).

L'Endo-1, 4- $\beta$ -xylanase (Endo- $\beta$ -1, 4-xylane, xylanohydrolase, EC.3.2.1.8, généralement appelé xylanase), est une enzyme qui dégrade le xylane aléatoirement et produit des xylooligosaccharides, xylobiose et xylose. Elle est principalement produite par les microorganismes ( **Ingale et al., 2014**).

Les microorganismes les plus étudiées sont des bactéries car elles sont très facile à cultives par rapport aux mycètes ( **Shanthi et Roymon., 2015**), la plus part de xylanases bactériennes sont thermostables et alcalines ( **Subramaniyan et Prema, 2002**), utilise dans les applications industrielles qui exige des enzymes thermostables et alcalines comme l'industrie papetière.

La méthode traditionnelle d'optimisation utilisée est celle variant un seul facteur à la fois, elle nécessite beaucoup de temps et nombre élevé d'expériences. L'une des méthodes les plus efficaces pour optimiser la production des xylanases est la surface de réponse méthodologie. Ces dernières années la MRS a été utilisé dans divers domaines biotechnologiques et biochimiques ( **Bas et Boyaci., 2007 ; Kanagasabai et al., 2013**).

Afin que les processus biotechnologiques soit rentables, il est intéressant d'optimiser les composants des milieux de production et les conditions de fermentation à savoir les paramètres physico-chimiques et nutritionnels pour obtenir les rendements les plus élevés en enzyme. Cette technique permet un criblage rapide d'un nombre élevé de facteurs, il est possible d'étudier les interaction entre les variables, elle donne le rôle de chaque facteur et les résultats prédictifs donnent des réponses et les niveaux possibles des variables ( **Cui et al., 2012**).

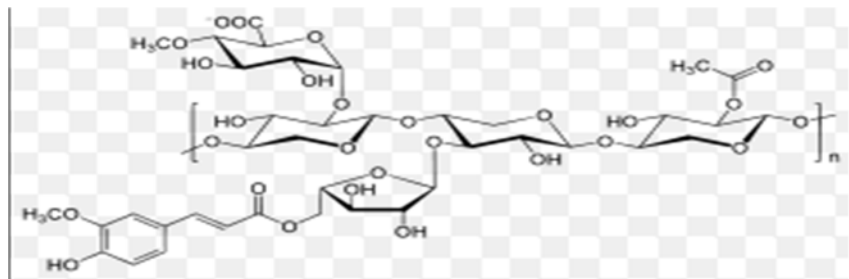
L'objectif de la présente étude est d'optimiser la production des xylanases de *Bacillus oceanisediminis* en utilisant le plan de Plackett-Burman et le plan d'expérience (Box-Behnken).



## I- Xylanes

Les xylanes sont des polysaccharides que l'on retrouve dans les parois cellulaires végétales. Ce sont les hémicelluloses majoritaires des céréales et des monocotylédones et du bois tendre et dur, ils peuvent représenter 15 à 40% de la matière sèche de céréales (**fry, 1988**). Ils sont composés d'une chaîne principale de résidus  $\beta$ -D-xylopyranose reliés par des liaisons B (1-4). Sur cette chaîne sont greffées des ramifications qui sont variables selon l'espèce végétale. Certains de ces résidus xylose, portent des groupements acétyles, Méthyles, méthylglucuronyles ou arabinofuranosyles qui forment alors des chaînes latérales (**Mirande, 2009**)

La figure si dessous illustre la structure générale du xylane



**Fig 01:** Structure générale du xylane (**Wong et al., 1988**)

## II-Enzymes xylanolytiques

Les enzymes xylanolytiques commerciales sont toutes d'origine microbienne, elles peuvent être produites par les bactéries, les levures et les moisissures. Les xylanases bactériennes ont été isolées en particulier à partir du genre *Bacillus* (**Lama et al., 2004**), mais les plus étudiées et les mieux caractérisées sont les xylanases d'origine fongique, parmi lesquelles celles d'*Aspergillus* (**Esteban et al., 1982 ; Khanum et al., 2011**).

La fonction principale de ces enzymes est d'hydrolyser l'hémicellulose, un type de fibre contenue dans la paroi des cellules végétales. Au cours de ces réactions d'hydrolyse, un des composants des hémicelluloses, le  $\beta$ -1,4-xylane, s'hydrolyse en xylose qui est un ose simple (**Wong et al., 1988**).

### II-1-Endo-1,4- $\beta$ - xylanase

L'endo-1,4- $\beta$ -xylanase ( $\beta$ -1,4- xylanohydrolase de D-xylane (EC 3.2.1.8)) coupe les liaisons glycosidiques dans la chaîne principale du xylane, provoquent ainsi une réduction du degré de polymérisation du substrat (**Wong et al., 1988**).

Les endoxylanases ont été classées de plusieurs manières. Wong et collaborateur en 1988 ont classé les xylanases en deux types, selon les produits finaux de la réaction: les enzymes non-débranchantes, ce qui n'hydrolysent pas les 1,3- L-arabinofuranosyl, et ne libèrent pas l'arabinose, et les enzymes de débranchement, qui libèrent l'arabinose. Chez certaines espèces les deux types de xylanases existent ce qui permet une hydrolyse efficace du xylane; Wong et collaborateur en 1988 ont également classés les endoxylanases en fonction de leurs propriétés physico-chimiques et poids moléculaire (PM) et point isoélectrique (PI). Ils ont été divisés en deux groupes: celles avec un point isoélectrique basique, et un PM <30 kDa, et celles avec un point isoélectrique acide avec un PM > 30 kDa.

Les endoxylanases possèdent des activités maximales entre 40 et 80°C, et entre un pH de 4 à 6,5 (Wong *et al.*, 1988).

### II-2-β - D-Xylosidases

Les - β -1,4 -xylohydrolases de D-xylane EC (3.2.1.37) peuvent être classifiées selon leurs affinités. Celles qui hydrolysent le xylobiose sont appelées xylobiases et celles qui hydrolysent les xylooligosaccharides sont appelées exo β-1-4-xylosidases, mais en général, on appelle xylosidases les enzymes qui hydrolysent les petits xylooligosaccharides et le xylobiose, libérant les résidus β-D-xylopyranosyl à partir de l'extrémité non-réductrice. (Biely, 1985).

### III-Bactéries productrices de xylanases

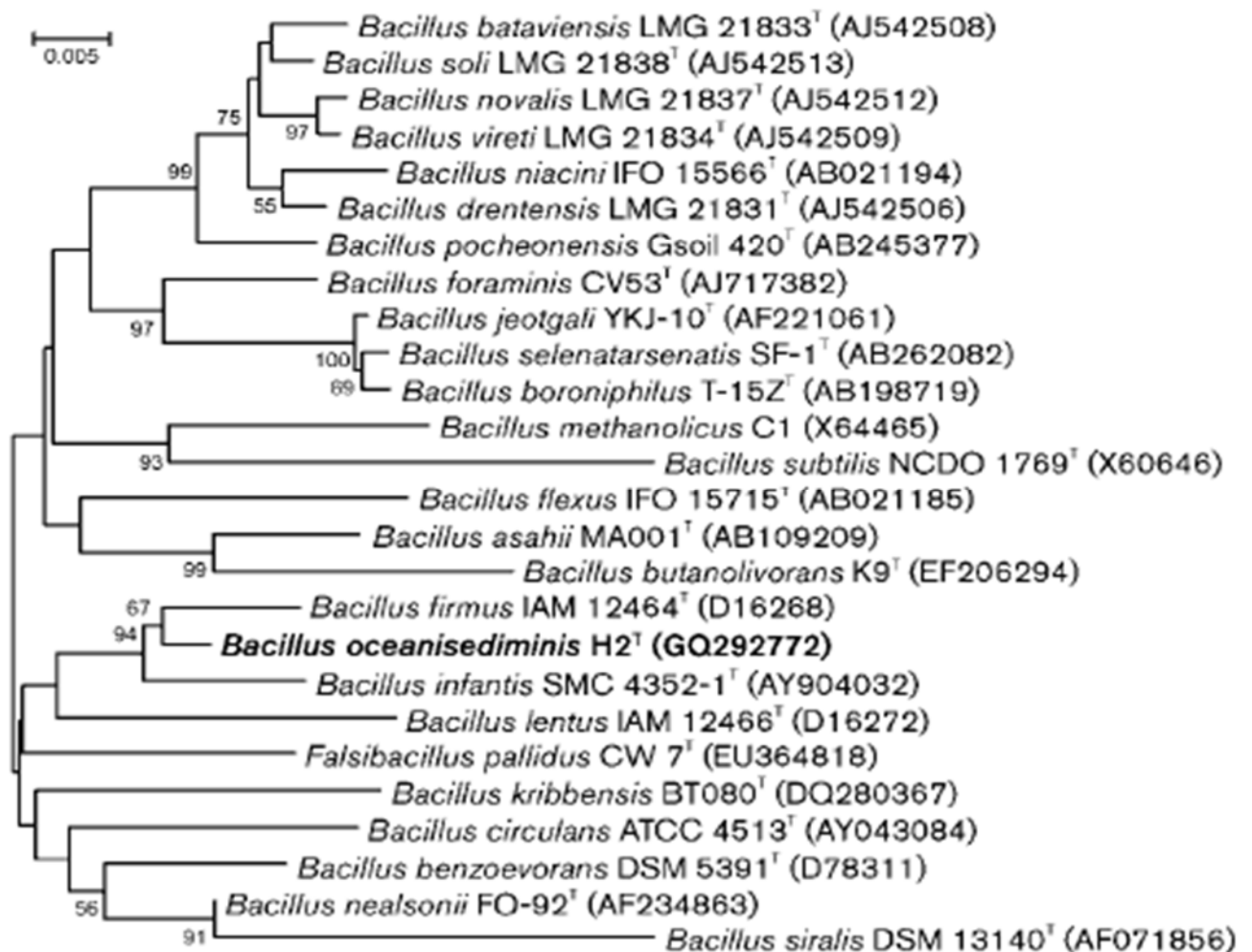
Une grande variété de microorganismes (bactéries, levures, moisissures et protozoaires) produisent des enzymes xylanolytiques (Collins *et al.*, 2005). Parmi les bactéries productrices de xylanases, citons le genre *Bacillus*.

#### III-2-*Bacillus oceanisediminis* H<sub>2</sub><sup>T</sup> isolé à partir des sédiments marins

Les cellules sont de 0,6 à 0,8 millimètre de largeur et de 2 ou 3 millimètres de longueur, Gram positif, aérobies, bacilles arrondies à la partie terminale, ils peuvent se retrouver en formes isolés, en paires et des fois formants des chaînes courtes, les cellules contiennent des endospores subterminales, paracentrales ou centrales. Après 24 h d'incubation à 37 °C sur gélose, les colonies sont de couleur crèmes, légèrement convexes au centre, lisses, rondes et ont un diamètre de 1 à 3 millimètres; les bords sont habituellement irréguliers avec des projections aiguës qui peuvent devenir rhizoïdes. *Bacillus oceanisediminis* se développe de 4 à 45 °C (avec un optimum de 37 °C) et un pH de 6 à 10 (optimum pH 7,0) et en présence de 0 à 13% de NaCl. Les tests sont positifs pour la catalase, l'oxydase, la β- dihydrolase de galactosidase et d'arginine, mais négatif pour la lipase, la désaminase de phénylalanine et

l'uréase, le nitrate est réduit. L'indole et le test au rouge méthyle et au Voges-Proskauer est positif, le sulfure d'hydrogène n'est pas produit (Zhang et al., 2010).

L'arbre phylogénétique montrant la position de *Bacillus oceanisediminis* H2<sup>T</sup> est donné ci-dessous



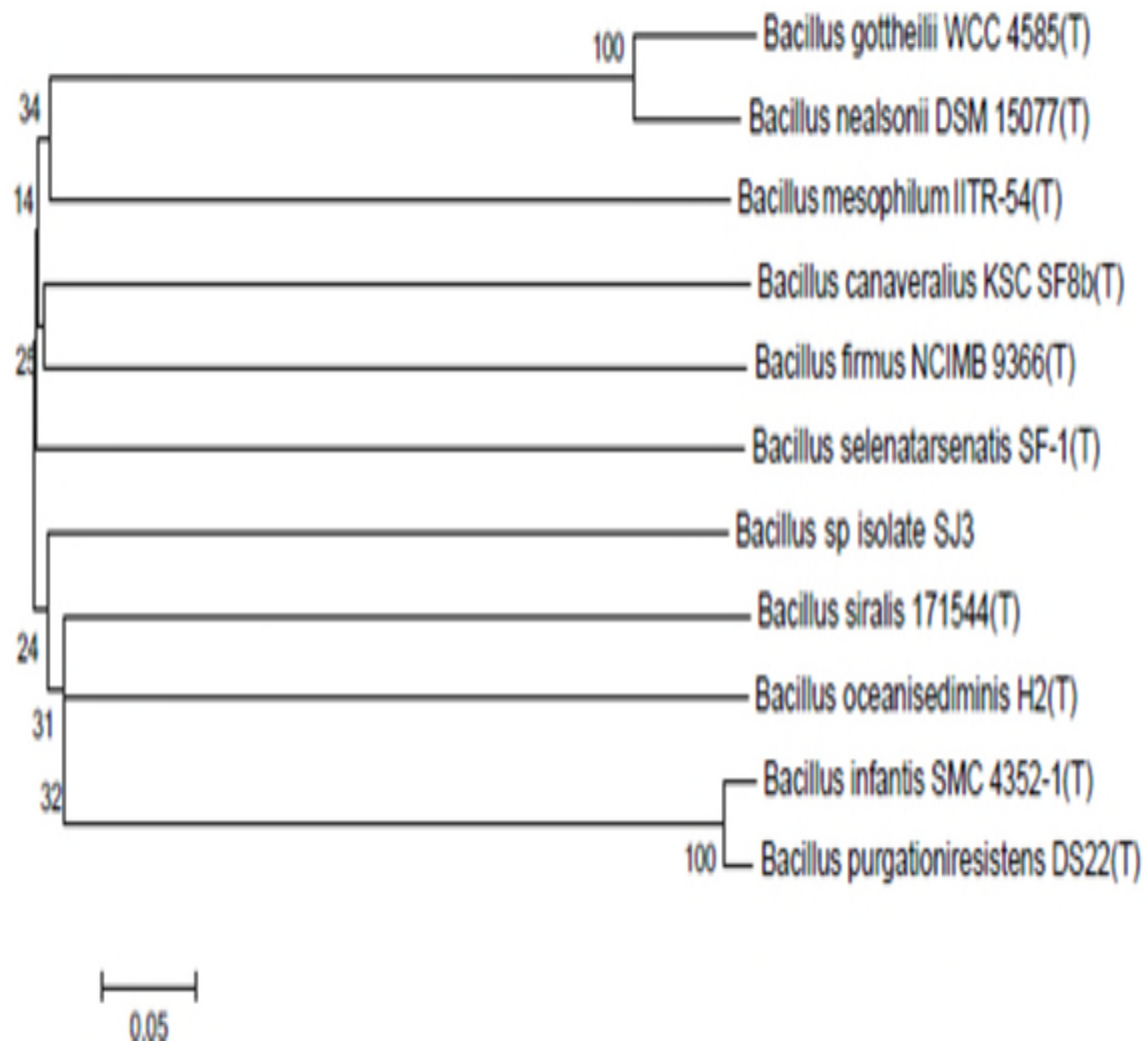
**Fig 02 :** Arbre " Neighbour-joining " basé sur la séquence du 16S RNAr montrant la relation entre la souche H2<sup>T</sup> et les souches apparentés du genre *Bacillus* la valeur du Bootstrap > 50% avec 0,0005 substitution par nucléotide (Zang et al., 2010).

### III-3-*Bacillus oceanisediminis* SJ3 isolé a partir d'un sol de jardin algerien

*Bacillus oceanisediminis* SJ3 est une bacterie Gram positif, sporulée, et aérobie (voir tableau I), la souche a été isolée à partir d'un sol de jardin par Boucherba et collaborateurs en 2015. L'arbre phylogénétique de celle-ci est donné dans la figure 03.

**Tableau I:** Propriétés morphologiques, physiologiques et biochimiques de la souche SJ3 (Boucherba et al., 2016).

Caracteristiques	<i>Bacillus oceanisediminis</i> SJ3
Source d'isolent	Sol
Mobilité	+
Morphologie	Bacillus formant des Spore
Gram	+
Temperature de croissance	
Optimum	37
Intervalle	25-45
pH de croissance	
Optimum	7
Intervalle	6-9
NaCl (%)	0-12
Indole	-
Rouge de Methyle	+
Voges-proskauer	-
Catalase	-
Glycerol	+
Erythritol	-
D-arabinose	-
L-arabinose	-
Ribose	+
D-xylose	+
Galactose	+
glucose	+
Fructose	-
D-mannose	-
Mannitol	-
Sorbitol	-
Cellobiose	-
Maltose	-
Lactose	-
Saccharose	-
Inuline	-



**Fig 03 :** Arbre Neighbour-joining basé sur la séquence du ARNr16S montrant la relation entre la souche SJ3 et les souches apparentées du genre *Bacillus* communication personnelle.

## IV-Paramètres influençant la production des xylanases

### IV-1- Taux d'inoculation

Un certain taux d'inoculation est nécessaire pour maintenir l'équilibre entre la biomasse cellulaire et les nutriments disponibles afin d'obtenir la meilleure production enzymatique.

Une faible activité enzymatique obtenue avec un taux d'inoculum élevé pourrait résulter d'une consommation nutritive rapide. D'ailleurs, un taux élevé d'inoculum n'est pas préconisé dans une application industrielle. La plupart des chercheurs ont rapporté l'utilisation de 1,0-2,0 % (v/v) d'inoculum pour une bonne production de xylanases. (Nagar *et al.*, 2012; Sanghi *et al.*, 2009).

### IV-2- Température et temps d'incubation

La température optimale pour la production d'enzymes par une bactérie peut changer puisqu'elle est susceptible d'affecter sa croissance. Le temps optimum d'incubation peut dépendre de plusieurs facteurs comprenant la souche. L'étude des différentes températures de culture a montré que la production d'enzymes la plus élevée est à 30 °C et le temps optimum d'incubation pour une production maximale de xylanases est obtenue après 56 h d'incubation. Ratto et collaborateur en 1992 ont rapporté que la production de xylanases de *Bacillus circulans* la plus élevée est obtenue à 30 °C en utilisant le xylane. Subramaniyan et Prema en 2000 ont rapporté une activité xylanolytique maximale à une température plus élevée, 50 °C après 96 h d'incubation chez *Bacillus* sp-34 et en 2009 Sanghi et collaborateur ont observé une production maximale de xylanases chez *Bacillus subtilis* ASH après 48 h d'incubation alors que Nagar et collaborateur en 2010 ont rapporté un maximum de production de xylanase après 36 h d'incubation.

### IV-3- pH

Chaque micro-organisme exige un pH optimum pour sa croissance et son activité. Le pH initial du milieu peut influencer beaucoup les systèmes enzymatiques et le transport des enzymes à travers la membrane des cellules. Ainsi, le pH optimum pour la production d'enzymes change d'une bactérie à une autre. C'est un facteur très important qui affecte d'une manière significative la production des xylanases (Haltrich *et al.*, 1997). Purkarthofer et collaborateur en 1993 ont observé une production maximale des xylanases par *Thermomyces lanuginosus* à un pH de 7,5. Alors que, Bailey et Viikari en 1993 ont rapporté qu'un pH en-dessous de 3,0 pendant la phase stationnaire était essentiel pour la production maximale de xylanases par *Aspergillus fumigatus*.



## VI- plans d'expériences

### VI-1 définition et intérêt du plan d'expérience

Un plan d'expérience adapté est celui qui fournit l'information désirée avec peu d'expérimentation. Plus précisément un plan d'expérience n'est pas une série d'essais au hasard ni sélectionnés par la seule intuition, mais une stratégie optimale permettant de prédire avec le maximum de précision une réponse à partir d'un nombre minimal d'essais et en utilisant un modèle postulé (Ozil, 1997).

De manière générale ce modèle cherche à déterminer et à établir les liens existants entre deux types de variable : la réponse et le facteur (Goupy, 1999 ; Goupy, 2005). Si elle est appliquée correctement, cette méthode a comme avantage :

- La diminution du nombre d'essais ;
- La connaissance des effets des paramètres ;
- La possibilité d'évaluer les effets de l'interaction entre les paramètres ;
- La meilleure précision des résultats ;
- La modélisation mathématique de l'expérience ;
- La prédiction et l'optimisation (Goupy, 1999 ; Antony, 2003) .

### V-Détermination des paramètres influençant la production des xylanases par utilisation du plan de Plackett-Burman

Le plan de Plackett-Burman est une technique très puissante pour examiner le nombre de variables en vue de découvrir les variables significatives qui affectent la production d'enzymes, il a été employé dans divers travaux avec succès (Sharma et Satyanarayana, 2006 ; kumar, 2006) .C'est une approche largement répandue et peu coûteuse qui fournit des informations seulement sur les effets des facteurs, mais pas sur leurs interactions. Le plan de Plackett-Burman utilise deux niveaux pour chaque facteur, le niveau le plus élevé noté par "+1" et niveau bas noté par "-1" et entre ces deux niveaux le "0" représente le niveau moyen, l'effet des variables sur la production d'enzymes sera par la suite calculé (Miller, 2013).

## VII- Response Surface Methodology (RSM)

La méthodologie de « surface réponse » est une méthode mathématique et statistique, elle est reconnue comme une approche très intéressante (Khurama et al., 2007) dans le but d'optimiser la production des métabolites intéressantes à l'échelle industrielle comme le cas des enzymes. Récemment, cette méthode a été adaptée pour l'optimisation des paramètres physico-chimiques à savoir la température, le pH, le taux d'inoculation, le temps

d'incubation etc... (Feng et al., 2011), ou encore l'optimisation de la production de xylanases. (Kumar et al., 2012).

### **VIII- Optimisation de la production de xylanases par utilisation du modèle « Box- Behnken »**

La méthode traditionnelle d'optimisation est celle variant un seul facteur à la fois (One Factor At Time OFAT) (Xianoyong et al., 2010). Malheureusement, cette méthode a certains Inconvénients : le nombre d'expériences est très élevé, cela consomme beaucoup de temps surtout lors de la réalisation d'un criblage à partir de variables multiples (Feng et al., 2011) mais aussi cette méthode ne considère pas les interactions existantes entre les variable (Kumar et al., 2012). Une alternative stratégique est utilisée : l'optimisation statistique en utilisant le modèle de « Box – Behnken, 1960 » (Niladevi et al., 2009) qui s'est avéré être une approche plus efficace (Juntao et al., 2011). En effet la méthodologie de surface réponse (Response Surface Methodology) permet un criblage rapide à partir d'un domaine expérimental large, permettant d'évaluer les principales interactions existantes entre les variables, ainsi que leur effet quadratique, en plus d'optimiser les facteurs dans le but d'augmenter la production (Niladevi et al., 2009). Plus encore, elle permet de réduire le nombre d'expérience réalisable ce qui est un gain de temps et de moyens considérables, donne des résultats plus précis que ceux obtenus par la méthode traditionnelle et le résultat permet une réelle augmentation de la production (Kumar et al., 2012).

### **IX-Domains principaux d'application des enzymes xylanolytiques**

Ces dernières années, le secteur industriel a montré un vif intérêt pour les xylanases, notamment dans le cadre du bio-blanchissement de la pâte de bois, en traitant des pâtes cellulosiques avec des xylanases, les résidus xylanes sont éliminés sélectivement lors de la dissolution des pâtes, de la fabrication du papier, de la fabrication d'aliments et des boissons, dans l'alimentation animale et dans la production du bioéthanol, sont utilisées aussi pour la biotransformation des textiles.

Ainsi, les xylanases sont capables de digérer l'hémicellulose dans la pâte sans modifier la cellulose. Le traitement enzymatique du papier permet d'améliorer plusieurs de ses caractéristiques physiques, dont la viscosité, la tenacité, la résistance à la déchirure et l'étanchéité. Une autre application industrielle des xylanases est la bioconversion des xylanes en produits à plus forte valeur ajoutée. Pendant que l'hydrolyse enzymatique des xylanes conduit au xylose, différentes fermentations peuvent se produire, créant divers composés. L'un des plus importants est le xylitol, qui est utilisé comme édulcorant dans différentes

denrées alimentaires, dont la gomme à mâcher, les bonbons, les boissons gazeuses et la crème glacée. On peut également utiliser le xylitol comme édulcorant naturel dans le dentifrice et divers produits pharmaceutiques. ( **Polizeli et al., 2005 ; Collins et al., 2005**).

## I-Matériel

**1-Matériel analytique :** le matériel analytique est donné en annexe I.

## 2-Matériel biologique

La souche bactérienne utilisée dans cette étude appartient à la collection du laboratoire de Microbiologie Appliquée « LMA » de l'université A/Mira de Bejaia, elle a été isolée à partir d'un sol de jardin par Boucherba et collaborateur en 2015. Selon le Séquençage de L'ARNr 16s, l'isolat SJ3 a été identifié comme étant l'espèce *Bacillus Oceanisediminis SJ3*.

## II-Méthodes

### II-1- Revivification de la souche *Bacillus oceanisediminis SJ3*

La souche a été inoculée sur le bouillon nutritif et incubé pendant 24 h à 37 °C, puis des repiquages successifs ont été réalisés sur gélose nutritive l'incubation est réalisée à 37 °C pendant 24 h.

Après incubation les boîtes de Pétri sont conservé à 4 °C.

### II-2-Préparation du milieu MM7

Le milieu MM7 est un milieu minimum, contenant comme seule source de carbone le xylane d'épeautre et d'avoine, il est ajusté à une valeur de pH selon les conditions préparatoires de travail.

Le milieu MM7 est composé de :

xylane d'épeautre et d'avoine 10 g/l, extrait de levure 2 g/l, NaCl 2,5 g/l, NH<sub>4</sub>Cl 5 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 30 g/l, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,25 g/l. (Viet *et al.*, 1991).

Ce milieu est préparé sous agitation à chaud afin de mieux dissoudre le xylane, le milieu est ensuite réparti dans des Erlenmeyer d'une capacité de 100 ml, contenant 10 ml du milieu de culture liquide ajusté à différents pH, puis le milieu est autoclavé.

### II-3-Détermination des paramètres influençant la production de xylanases (plan de Plackett-Burman)

Dans le but de déterminer les paramètres qui influencent le plus sur la production des Xylanases de la souche *Bacillus oceanisediminis SJ3*, nous avons étudié les facteurs suivants : le taux d'inoculation (1%, 4% et 7% (v/v)), le temps d'incubation (18 h, 57 h et 96 h), la température (30 °C, 35 °C et 40 °C) et le pH (4 - 7 et 11), une étude statistique expérimentale est réalisée en utilisant le plan d'expérience de « Plackett-Burman » à l'aide du logiciel (Minitab 16.0). Les valeurs extrêmes des différents paramètres opératoires qui étudient les meilleures conditions de production des xylanases, sont résumées dans le tableau II.

**Tableau II** : Matrice des expériences par unité codante "plan de Plackett-Burman"

Expériences	Variables			
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>
Expérience 01	-1	+1	-1	-1
Expérience 02	-1	+1	+1	+1
Expérience 03	+1	+1	0	+1
Expérience 04	-1	+1	-1	-1
Expérience 05	+1	-1	+1	-1
Expérience 06	-1	-1	-1	-1
Expérience 07	+1	-1	-1	-1
Expérience 08	+1	+1	-1	+1
Expérience 09	+1	+1	+1	-1
Expérience 10	+1	-1	+1	+1
Expérience 11	-1	-1	-1	+1
Expérience 12	-1	-1	+1	+1

X<sub>1</sub>= Température, X<sub>2</sub>= Temps d'incubation, X<sub>3</sub>=pH et X<sub>4</sub>= Taux d'inoculation

Niveau Haut	Niveau moyen	Niveau Bas
(+1)	(0)	(-1)

Les douze expériences ont été réalisées dans des Erlen de 100 ml, contenant 10 ml du milieu de culture MM7 liquide, le pH du milieu de culture de chaque Erlen par la suite sera ajusté, autoclavé, inoculé et incubé, selon les différentes conditions de culture de chaque expérience.

Afin de récupérer les xylanases qui sont extracellulaires, le milieu de culture est centrifugé à 10000 rpm pendant 10 min, le surnageant fera l'objet d'un test d'activité xylanolytique (voir ci dessous).

#### II-4-Mesure de l'activité xylanolytique

L'activité xylanolytique est déterminée en présence du xylane d'épeautre et d'avoine préparé dans une solution tampon. Le xylane est mis en suspension à raison de 0,5 % (m/v) dans du tampon phosphate de sodium (50 mM) à pH 7. Le mélange réactionnel est composé de 100 µL de surnageant de culture auxquels sont ajoutés 900µL de substrat. Ce mélange est chauffé à 55°C pendant 10 min (Boucherba et al., 2016).

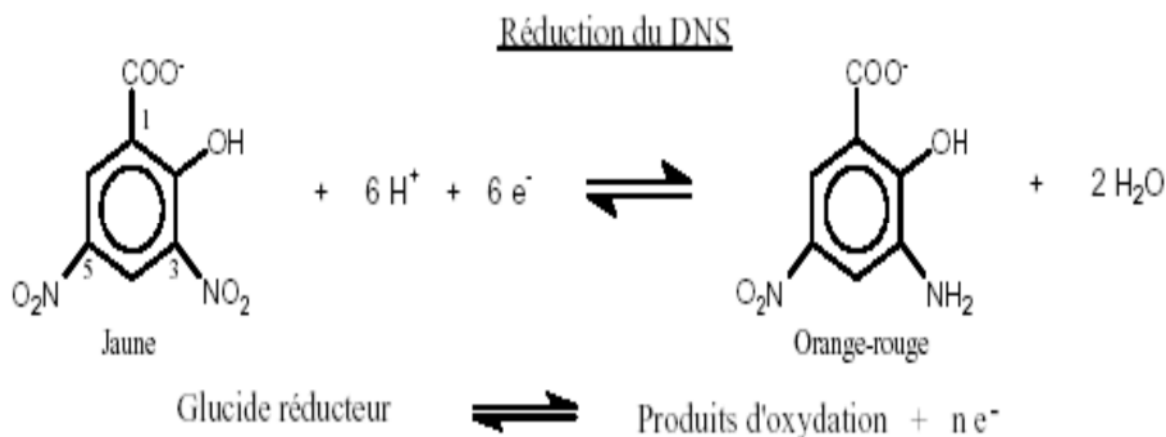
Le dosage des sucres réducteurs est effectué selon la méthode de Miller (1959).

La réaction enzymatique est arrêtée par addition de 1,5 ml d'une solution à base d'acide.

Le dosage des sucres réducteurs est effectué selon la méthode de Miller (1959).

La réaction enzymatique est arrêtée par addition de 1,5 ml d'une solution à base d'acide Dinitrosalicylique (DNS) (Annexe III), puis le mélange est porté à ébullition pendant 5 min.

En milieu alcalin et à chaud, l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNS) jaune est réduit par les oses réducteurs en acide 3-amino 5-nitrosalicylique rouge orangé (Figure 04).



**Figure 04** : Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS (Bailey et al., 1992).

La courbe d'étalonnage est réalisée avec une solution de xylose à des concentrations respectives de 0, 0,3, 0,6, 0,9, 1,2 et 1,5 mg/ml (tableau III).

**Tableau III** : Gamme Etalonnage pour le dosage des sucres réducteurs (Bailey et al., 1992).

Tube	1	2	3	4	5	6
Xylose à 1,5 mg/ml (µl)	0	200	400	600	800	1000
Tampon phosphate sodique (µl)	1000	800	600	400	200	0
Concentration (mg/ml)	0	0,3	0,6	0,9	1,2	1,5

A partir de chaque concentration, on prélève 100 µl, auquel on rajoute 0,9 ml de solution de xylane à 0,5 % et 1,5 ml de la solution de DNS, le chauffage est réalisé à 100°C pendant 5 minutes puis les tubes sont refroidis pour effectuer les lectures d'absorbances à 540 nm. La droite d'étalonnage est donnée en annexe IV.

Le témoin correspond à la solution de xylane d'épeautre et d'avoine incubée sans le surnageant à 55 °C pendant 10 min, puis on ajoute 1,5 ml de DNS et 0,1 ml de surnageant. Après refroidissement, la lecture des absorbances est effectuée à 540 nm (Shimadzu UVmin-1240V). Une unité d'activité xylanolytique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui Produit une  $\mu$ mole de sucres réducteurs (équivalent en xylose), par minute, dans un ml de surnageant et dans les conditions expérimentales mentionnées ci-dessus.

L'activité xylanolytique est calculée selon (Bailey et al., 1992) :

$$\text{Activité xylanase (U/ml)} = \frac{(C_x - C_t)D}{t}$$

**C<sub>x</sub>** : Concentration des sucres réducteurs du mélange réactionnel ( $\mu$ mole/ml).

**C<sub>t</sub>** : Concentration des sucres réducteurs du mélange témoin ( $\mu$ mole/ml).

**D** : facteur de dilution.

**t** : temps d'incubation (minutes).

## II-5-Optimisation des paramètres déterminants la production des xylanases

Dans le but de déterminer les conditions optimales de production de xylanases par la souche *Bacillus oceanisediminis* SJ3, les facteurs les plus significatifs qui ressortent à partir de plan de Plackett-Burman qui sont le pH et le temps d'incubation, sont réutilisés avec un troisième facteur qui est la concentration de xylane d'épeautre et d'avoine afin d'effectuer un plan d'expérience de type (Box –Behnken).

Les valeurs extrêmes choisies dans le but d'optimiser la production de xylanases sont représentées dans le tableau IV

**Tableau IV :** Résultat de l'optimisation de l'activité xylanolytique selon le plan« Box-Behnken »

Nombre d'Expériences	Variables		
	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>
Expérience 01	9	72	10
Expérience 02	9	48	14
Expérience 03	7	24	14
Expérience 04	9	24	10
Expérience 05	7	48	10
Expérience 06	5	72	10
Expérience 07	7	72	14
Expérience 08	7	24	6
Expérience 09	5	24	10
Expérience 10	7	72	6
Expérience 11	5	48	6
Expérience 12	7	48	10
Expérience 13	7	48	10
Expérience 14	5	48	14
Expérience 15	9	48	6

X<sub>6</sub>=pH, X<sub>7</sub>=Temps d'incubation(h) et X<sub>8</sub>= concentration en xylane (g/l).



## I- Choix du milieu de culture

Le xylane est un substrat inducteur de xylanase , il contient dans sa composition de l'extrait de levure qui est riche en acides aminés, des activateurs et des cofacteurs requis pour la croissance de micro-organisme et la production d'enzymes, (Safaa *et al.*, 2013).

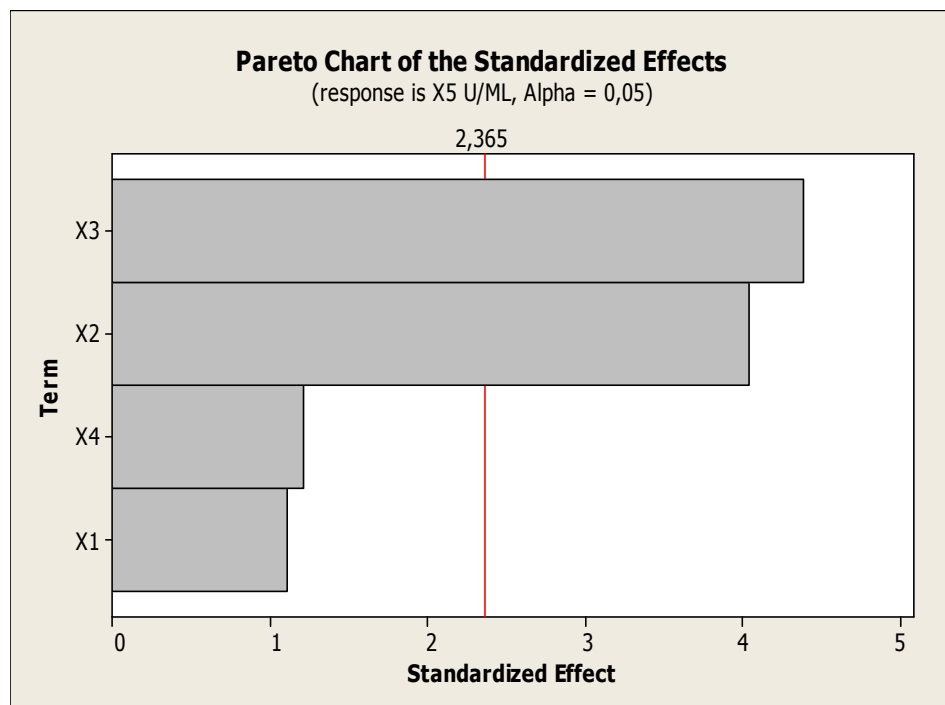
## II- Détermination des paramètres influençant la production de xylanases par le plan de Plackett-Burman

Les paramètres opératoires pris en considération pour optimiser la production de xylanases par la souche *Bacillus oceanisediminis* SJ3 sont respectivement la température ( $X_1$ ), le temps d'incubation ( $X_2$ ), le pH ( $X_3$ ) et le taux d'inoculation ( $X_4$ ), une matrice d'expériences du plan de Plackett- Burman a été élaborée à l'aide du logiciel Minitab 16.0. Le choix des paramètres et leurs niveaux de variations a été effectué en tenant compte des limites expérimentales de la croissance de la souche étudiée.

L'effet des facteurs étudiés dans le cadre du plan de Plackett-Burman (taux d'inoculation, temps d'incubation, température et pH) a permis de mesurer la réponse Y qui est l'activité xylanolytique estimée en U/ml . Les résultats obtenus par le logiciel Minitab 16.0 , ont permis de sélectionner parmi les quatre paramètres opératoires cités, les facteurs les plus significatifs influençant sur la production des xylanases. L'ensemble des résultats est regroupé dans le Tableau ci dessous, Les effets obtenus sont illustrés dans la figure (5)

**Tableau V** : Matrice des expériences par unité codant

Expériences	Température(X <sub>1</sub> )	temps d'incubation(X <sub>2</sub> )	pH (X <sub>3</sub> )	Taux d'inoculation(X <sub>4</sub> )	Y U/ml
Expérience 01	-1	+1	-1	-1	0,9
Expérience 02	-1	+1	+1	+1	0,075
Expérience 03	+1	+1	0	+1	0,56
Expérience 04	-1	+1	-1	-1	0,035
Expérience 05	+1	-1	+1	-1	0,9
Expérience 06	-1	-1	-1	-1	3,5
Expérience 07	+1	-1	-1	-1	3,5
Expérience 08	+1	+1	-1	+1	0,56
Expérience 09	+1	+1	+1	-1	0,45
Expérience 10	+1	-1	+1	+1	0,11
Expérience 11	-1	-1	-1	+1	3,5
Expérience 12	-1	-1	+1	+1	1



Term : variable, standardized effet : effet standardisé

**Figure 05** : Charte pareto des effets standardisés.

La charte de Pareto offre une manière commode de regarder les résultats obtenus de la conception de Plackett-Burman. Elle explique l'ordre d'importance des variables qui influence la production des xylanases. Cet ordre d'importance comme indiquée sont le pH ( $X_3$ ) et le temps d'incubation ( $X_2$ ). Ces facteurs significatifs identifiés par le plan de Plackett-Burman ont été choisis pour l'optimisation de la production de Xylanases par le modèle «Box-Behnken». Les deux autres paramètres taux d'inoculation et température n'ont pas d'effet sur la production des xylanases.

Les résultats obtenus sont en accord avec les résultats de Thomas et collaborateurs (2015) pour la production des xylanases chez *Bacillus pumilus*, concernant la signification du pH, et la non signification du taux d'inoculation, les résultats sont en désaccord avec ceux de Safaa et coll., (2013) pour la production des xylanases par *Bacillus subtilis*, concernant la température, le pH et le temps d'incubation.

Ali et coll., (2013) ont rapporté que les paramètres température, pH et temps d'inoculation n'ont pas d'effet sur la production de xylanases chez *Bacillus subtilis*.

### **III-Optimisation de la production de xylanases par utilisation du modèle « Box-Behnken »**

A la lumière des résultats obtenus par le plan de Plackett-Burman, les paramètres de Culture significatifs qui sont le pH et le temps d'incubation influençant la production des xylanases auxquelles on a ajouté un nouveau paramètre qui est la concentration du xylane, ils ont été sélectionnés et retenus pour la suite de l'optimisation.

Les résultats de «RSM » pour l'étude de trois variables: temps d'incubation, pH, concentration de xylane sont regroupés dans le Tableau ci dessous avec l'activité xylanolytique Y, les effets obtenus sont illustrés dans les figures (06, 07 et 08).

**Tableau VI :** Résultat de l'optimisation de l'activité xylanolytique selon le plan « Box-Behnken » avec unités codantes.

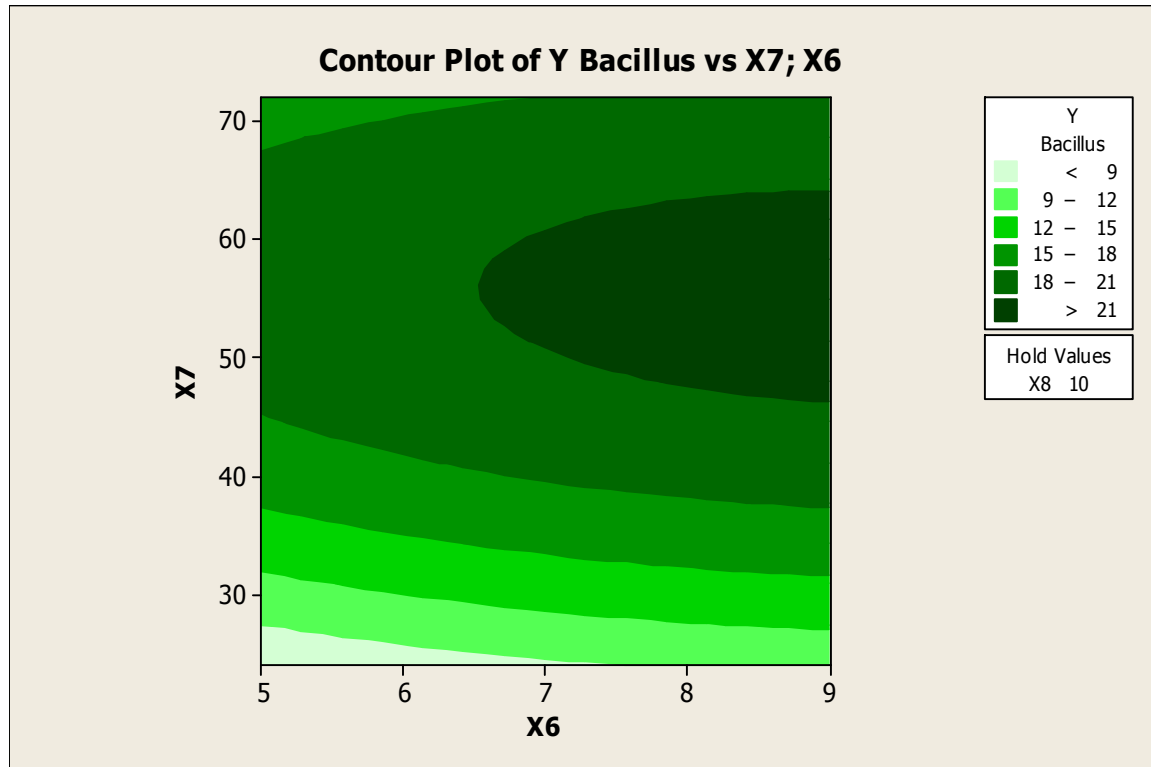
Expériences	Variables			La réponse activité xylanolytique
	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub> (h)	X <sub>8</sub> (g)	Y (U/ml)
<b>Expérience 01</b>	+1	+1	0	20,11
<b>Expérience 02</b>	+1	0	+1	21,77
<b>Expérience 03</b>	0	-1	+1	19,22
<b>Expérience 04</b>	+1	-1	0	7,44
<b>Expérience 05</b>	0	0	0	20,88
<b>Expérience 06</b>	-1	+1	0	18,77
<b>Expérience 07</b>	0	+1	+1	18,22
<b>Expérience 08</b>	0	-1	-1	5,88
<b>Expérience 09</b>	-1	-1	0	4,66
<b>Expérience 10</b>	0	+1	-1	17,77
<b>Expérience 11</b>	-1	0	-1	20,88
<b>Expérience 12</b>	0	0	0	20,77
<b>Expérience 13</b>	0	0	0	20,00
<b>Expérience 14</b>	-1	0	+1	19,88
<b>Expérience 15</b>	+1	0	-1	19,55

X<sub>6</sub>=pH, X<sub>7</sub>=Temps d'incubation et X<sub>8</sub>= concentration en xylane.

### III-1- Détermination des interactions entre les variables

#### III-1-1-Interaction entre pH ( $X_6$ ) et temps d'incubation ( $X_7$ )

Les interactions entre les deux variables pH ( $X_6$ ) et temps d'incubation ( $X_7$ ) sont représentées par la surface de réponse définissant l'interaction entre  $X_6$  et  $X_7$ .



**Fig 06:** Surface de réponse définissant l'interaction entre le pH ( $X_6$ ) et le temps d'incubation ( $X_7$ ) pour une valeur de concentration de xylane de 10 g/l.

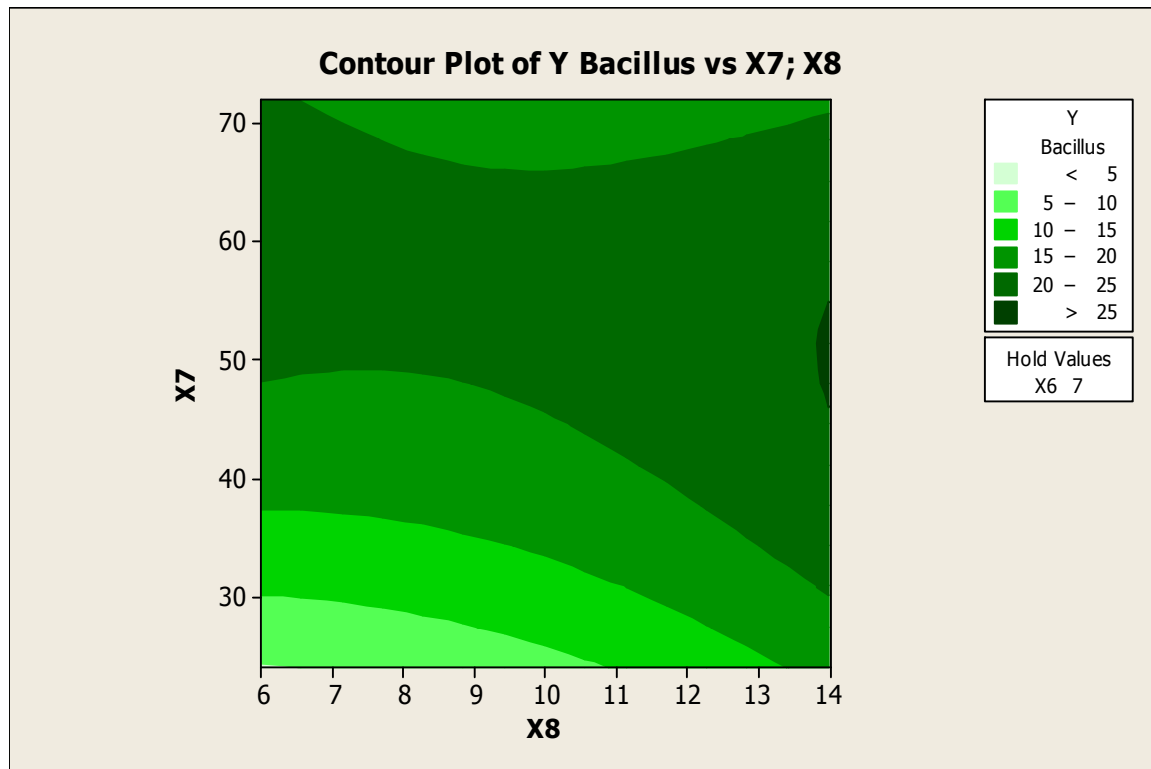
Cette figure montre les différentes zones traduisant l'activité xylanolytique de la souche étudiée.

La zone en vert clair représente l'intervalle des valeurs  $X_6$  et  $X_7$  où on retrouve la zone d'activité la plus petite (<9U/ml) et donc une production de xylanases moins importante. Cet intervalle se situe à des niveaux bas pour un temps d'incubation (5 h - 40 h) et un pH (5-7).

La zone en vert foncé représente l'intervalle des valeurs entre  $X_6$  et  $X_7$  où on retrouve l'activité xylanolytique la plus importante (> 21 U/ml). Cet intervalle se situe à des niveaux intermédiaires pour le pH (6,5 - 9) et un temps d'incubation (45 h - 65 h). Les résultats obtenus par Thomas et collaborateurs (2015) pour la production des xylanases par *Bacillus pumilus*, concernant la valeur de pH optimum à 9 est en désaccord avec le temps d'incubation qui est de 30 h, et aussi en désaccord avec les résultats de Walia et collaborateur (2013) pour la production des xylanases par *Cellulosimicrobium* sp.

### III-1-2-Interaction entre temps d'incubation ( $X_7$ ) et concentration de xylane ( $X_8$ )

Les interactions entre les deux variables temps d'incubation ( $X_7$ ) et concentration de xylane ( $X_8$ ) sont représentées par la surface de réponse définissant l'interaction entre  $X_7$  et  $X_8$



**Fig 07** : Surface de réponse définissant l'interaction entre le temps d'incubation ( $X_7$ ) et la concentration en xylane ( $X_8$ ) pour une valeur de pH=7.

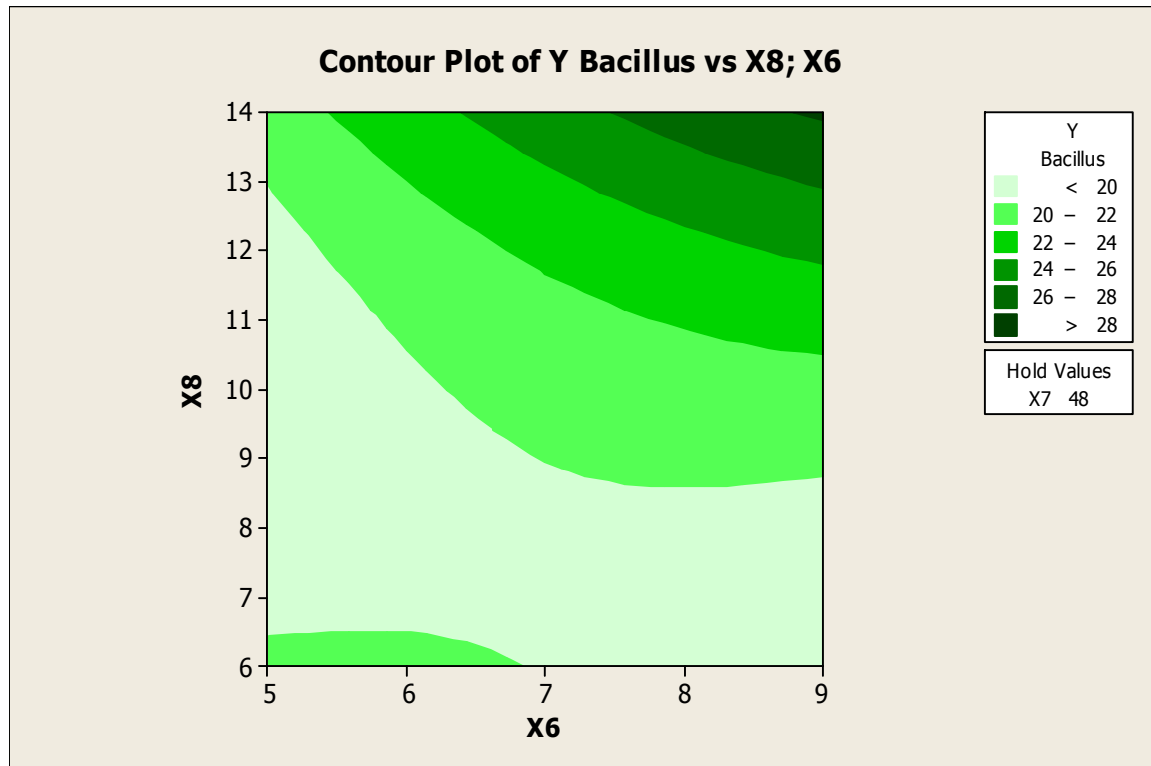
Cette figure montre les différentes zones traduisant l'activité xylanolytique de la souche étudiée.

La zone en vert clair représente l'intervalle des valeurs  $X_7$  et  $X_8$  la où on retrouve la zone d'activité la plus faible (<5 U/ml) et donc une production de xylanases moins importante. Cet intervalle se situe à des niveaux bas pour un temps d'incubation (6 h – 30 h) et la concentration en xylane (6 - 10,8 g/l).

La zone en vert foncé représente l'intervalle des valeurs entre  $X_7$  et  $X_8$  où on retrouve la zone d'activité la plus importante (> 25 U/ml) et donc une production de xylanases plus importante. Cet intervalle se situe à des niveaux intermédiaires pour un temps d'incubation entre (45 h – 55 h) et la concentration en source de carbone (13,8 g/l – 14 g/l). Les résultats obtenus sont en désaccord avec les résultats de Safaa et collaborateurs (2013) pour la production des xylanases par *Bacillus subtilis*.

### III-1-3-Interaction entre concentration de Xylane ( $X_8$ ) et le pH ( $X_6$ )

Les interactions entre les deux variables concentration du Xylane ( $X_8$ ) et pH ( $X_6$ ) sont représentées par la surface de réponse définissant l'interaction entre  $X_8$  et  $X_6$



**Fig 08 :** Surface de réponse définissant l'interaction entre la concentration du xylane ( $X_8$ ) et le pH ( $X_6$ ) pour un temps d'incubation de 48 h.

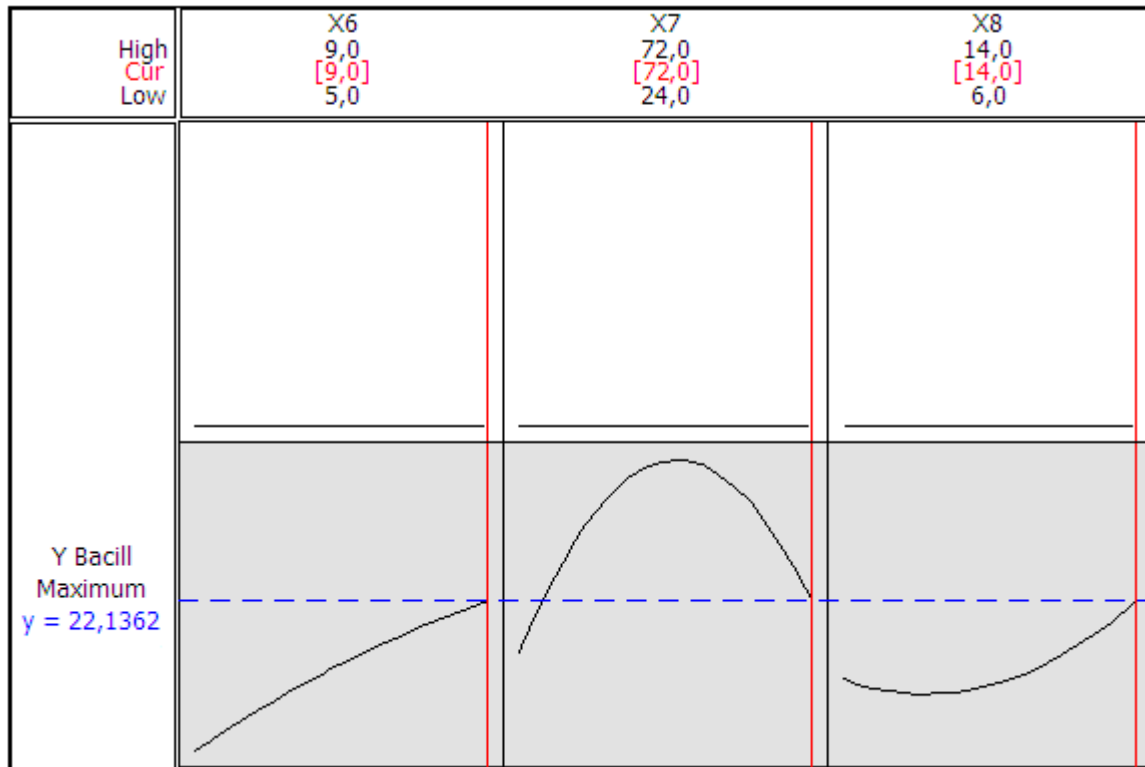
Cette figure montre les différentes zones traduisant l'activité xylanolytique de la souche étudiée.

La zone en vert clair représente l'intervalle des valeurs  $X_6$  et  $X_8$  où on retrouve la zone d'activité la plus petite (< 20 U/ml) et donc une production de xylanases moins importante. Cet intervalle se situe à des niveaux bas pour un pH (5 - 8,8) et une concentration de xylane (6 - 13,9 g/l).

La zone en vert foncé représente l'intervalle des valeurs entre  $X_6$  et  $X_8$  où on retrouve la zone d'activité la plus importante (> 28 U/ml) et donc une production de xylanases plus importante. Cet intervalle est observé pour un pH (8,8 - 9) et la concentration en xylane de (13,8 - 14 g/l).

#### IV- Validation du model

Afin de vérifier la validité du modèle, les conditions optimales de production ( $X_6 = 9$ ,  $X_7 = 72$  h et  $X_8 = 14$  g/l) ont été appliquées. Une production de 24,33U/ml a été obtenue. Cette valeur est supérieure à celle prédite par le logiciel qui est 22,13. De ce fait le modèle réalisé au cours de cette optimisation est confirmé dans la figure ci-dessous.



High : élevé, Cur : optimum, Low : bas.

**Fig 09** : Valeur optimales de variation et de la réponse déterminées par RSM pour une meilleure activité xylanolytique.

Dans cette étude, les paramètres sélectionnés jouent un rôle important dans la production des xylanases. Les conditions optimales montrent que, pour améliorer la production des xylanases, la concentration en source de carbone qui est le xylane doit être supérieure à la concentration moyenne (14g/l au lieu de 10g/l), la valeur de pH doit être supérieure à la valeur moyenne (9 au lieu de 7) et la durée d'incubation doit être égale à 72 h. Le xylane a une influence positive sur la production des xylanases soit une augmentation qui est de 109,91% ceci est en accord avec les résultats trouvés par (Safaa *et al.*, 2013).



## **V-Détermination des valeurs optimales**

### **V-1-Détermination de la valeur optimale de pH (X<sub>6</sub>)**

Le pH est un facteur plus important pour la production des xylanases. Après une incubation aux différentes valeurs de pH qui s'étendent à partir de 6,0 à 9,0. L'optimum de pH et le maximum de la production a été observé à pH 9.

### **V-2-Détermination du temps d'incubation (X<sub>7</sub>)**

Le temps d'incubation optimum pour une production maximale de xylanase est déterminé après une incubation à un temps optimum de 48 h, le maximum de la production a été observé à de temps d'incubation allant de 37 h à 57 h.

### **V-3-Détermination de la concentration de Xylane(X<sub>8</sub>)**

La concentration du xylane optimale pour une production maximale est déterminée après une incubation à différentes concentrations de xylane allant de (6 g/l à 14 g/l). L'optimum de concentration de xylane et le maximum de la production est observé à une concentration de (14 g/l).

Dans cette présente étude, on s'intéresse à l'optimisation de la production de xylanases chez *Bacillus oceanisediminis* SJ3 en utilisant le plan de Plackett-Burman et le plan Box-Behnken (RSM).

Le milieu utilisé pour la production de xylanases de la souche est le milieu MM7 (milieu minimum a pH 7) contenant le xylane d'épeautre et d'avoine comme seul source de carbone.

Afin d'optimiser la production des xylanases, quatre facteurs ont été choisis comme variables : taux d'inoculation, temps d'incubation, température et pH . Cette optimisation effectuée influençant sur le milieu MM7 préalablement sélectionné est réalisée en utilisant un plan d'expériences : le plan de Plackett et Burman, utilisé dans un but de sélection des facteurs significatifs sur l'activité xylanolytique. Les résultats du test de Plackett et Burman ont permis la sélection de trois facteurs comme variables qui sont : le pH, le temps d'incubation et la concentration de xylane. Les concentrations optimales de ces dernières ont pu être déterminées par le plan d'expérience (Box –behnken).

La modélisation par le biais du plan factoriel complet a montré que les facteurs Influençant positivement sur l'activité xylanolytique de la souche *Bacillus oceanisediminis* SJ3 sont le pH : 9, le temps d'incubation : 72h et la concentration de xylane : 14g/l. avec lesquels on a pu avoir une activité de 24,33 U/ml. Cette activité est meilleur que celle prédite par le test de confirmation qui de 22,13U/ml.

Il est intéressant de poursuivre les investigations suivantes :

- ✓ Déterminer les interactions existantes entre tous les facteurs du milieu MM7 afin de comprendre leur effet sur la production.
- ✓ Déterminer et optimiser d'autres facteurs nutritionnels et culturaux tels que : les sources de carbones, source d'azote, sources d'ions métalliques, agitation et aération en utilisant les plans d'expériences.
- ✓ Utiliser un substrat bon marché tels que la paille de blé, les déchets de dattes, les écorces d'agrumes vu que le xylane commercial est très couteux.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

---

### A

- Abo-State MAM, Ghaly MF, Abdellah EM. (2013). Production of cellulases and xylanase thermophilic by alkalophilic bacterial strains isolated from agricultural wastes. *World Appl Sci J.* **22** (11), 1603-1612.
- Annamalai N, Thavasi R, Jayalakshmi S, Balasubramanian T. (2003). Thermostable and alkaline tolerant xylanase production by *Bacillus subtilis* isolated from marine environment. *Ind J Biotechnol.* **8**, 291–297.
- Antony J. (2003). Design of Experiments for Engineers and scientists. Edition: Butterworth-Heinemann. Grande brutan. 149 p.

### B

- Bailey MJ, Biely P, Poutanen K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J Biotechnol.* **23**, 257-270.
- Bas D, Boyaci IH. (2007). Modeling and Optimization I: Usability of response surface methodology. *J Food Eng.* **78**, 836-845.
- Biely P. (1985). Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* **3**, 286–290.
- Bailey M J, Viikari L. (1993). Production of xylanases by *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus oryzae* on xylan- based media. *World J Microbiol Biotechnol.* **9**, 80-84.

### C

- Collins T, Gerday C, Feller G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev.* **29**, 3-23.
- Coughlan M P, Touhy M G, Filho E X F, Puls J, Claeysens M, Vrsanska M, and Hughes M. (1993). Enzymological aspects of microbial hemicellulases with emphasis on fungal systems in Hemicellulose and Hemicellulases. London, pp. 53-84.
- Cui F, Zhao L. (2012). *Int J Mol Sci.* **13**, 10630-10646.

### E

- Esteban R, Villanueva JR, Villa TG. (1982).  $\beta$ -D-xylanases of *Bacillus circulans* WL-12. *Can J Microbiol.* **28**, 733-739.

### F

- Feng J, Zhang W, Han L, Zhang X. (2011). Statistical optimization of medium components to improve the antibiotic activity of *Streptomyces*. *Af J Agric Res.* **6** (19), 4424-4431.
- Fry S. (1988). Introduction to the growing cell wall. In: The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. Long Sci Tech. PP .1-4.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

---

### H

- Haltrich D, Nidetzka B, Klaus D, Kulbe, Steiner W and Zupan S. (1996). Production of fungal xylanases. *Bio Tech.* **58**, 137-161.

### I

- Ingale S, Kalyani S and Chhaya U. (2014). Application of Statistical Design to Optimize Culture Medium for Xylanase Production by *Bacillus pumilus* AB-1. *J Pure App Biosci.* **2** (2), 234-243.

### G

- Goupy J. (2005). *Pratiquer les plans d'expériences*. Edition : DUNOD. Paris. 501-295 p.
- Goupy J. (1999). *Plans d'expériences pour surfaces de réponses*. Edition: DUNOD. Paris. 409 p.

### J

- Juntao F, Wugang Z, Lirong H. and Xing Z. (2011). Statistical optimization of medium components to improve the antibiotic activity of *Streptomyces sp.* *Af J Agric Res.* **6** (19), 4424–4431.

### K

- Kumar Lalit , Davender Kumar, Sushil Nagar, Rishi Gupta, Neelam Garg, Ramesh Chander Kuhad, and Vijay Kumar. (2014). Modulation of xylanase production from alkaliphilic *Bacillus pumilus* VLK-1 through process optimization and temperature shift operation. *3 Biotech.* **4** (4), 345.
- Kanagasabai V, Tangavelu V. (2013). Response surface Methodological Optimization of the medium components for production of xylanase under SSF by *Aspergillus fumigatus*. *J Adv Sci Res.* **4** (2), 13-20.
- Kaneko S, Shimasaki T, Kusakabe I. (1993). Purification and some properties of intracellular  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger* 5–16. *Biosci Biotech Biochem.* **57**, 1161-1165.
- Khanum F, Pal A. (2011). Purification of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 , individual and interactive effect of temperature and pH on stability. *Proc Bioch.* **46**, 879-887.
- Kumar A, Gupta R, Shrivastava B, Pal Khasa Y, Chander Kuhad. (2012). Xylanase production from alkaliphilic actinomycete isolate *Streptomyces sp* RCK-2010, its characterization and application in saccharification of second generation biomass. *J Mol Cat B: Enzy.* **74**, 170-177.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

---

### L

- Lama L, Calandrelli V, Gambacorta A, Nicolaus B. (2004). Purification and characterization of thermostable xylanase and B-xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarctius*. Res microbiol. **155**, 283-289.
- Leya Thomas, Raveendran Sindhu, Parameswaran Binod and Ashok Pandey. (2015 ). 363Production of a cellulase-free alkaline xylanase from *Bacillus pumilus* MTCC 5015by submerged fermentation and its application in biobleaching. Ind J Exp Biology. **53**, 356-363.

### M

- Mirande C. (2009). Dégradation des fibres parietales et système xylanolytique de *Bacteroides xylanisolvens* XB1AT et *Roseburia intestinalis* XB6B4, espèces bactériennes du microbiote intestinal humain. Thèse de Doctorat d'Ecologie. Université blaise pascal clermont-ferrand, Faculté des sciences de la vie et de la Santé, 516p.

### N

- Nagar S, Mittal A, Kumar D, Gupta VK. (2012). Production of alkali tolerant cellulase free xylanase in high levels by *Bacillus pumilus* SV-205. Int J Biol Macromol. **50**, 414–420.
- Niladevi K N, Rajeev K, Sukumaran, Nicemol J, Anisha G S, Prema P. (2009). Optimization of laccase production from a novel strain-*Streptomyces psammoticus* using response surface methodology. Microbiol Res. **164**, 105-113.

### O

- Ozil P. (1997). Plans d'expériences: Méthode de TAGUCHI. E.N.S d'électrochimie.

### P

- Polizeli ML, Rizzatti AC, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS. 2005 Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Appl Microbiol Biotech. **67**(5), 577-91.

### R

- Ratto M, Poutanen K, Viikari L. (1992). Production of xylanolytic enzymes by an alkalitolerant *Bacillus circulans* strain. Appl Microbiol Biotech. **37**, 470–473.
- Ravi kumar K, Ramalingam S, Krishnan S, Balu K. (2006). Application of response surface methodology to optimize the process variables for reactive red and acid brown dye removal using a novel adsorbent. Dyes Pigm. **70**,18–26.

### S

- Safaa M. Ali Sana H. Omar and Nadia A. Soliman. (2013). Co-Production of Cellulase and Xylanase Enzymes By Thermophilic *Bacillus subtilis* 276NS. Int J Biotech Well Ind. **2**, 65-74.
- Salihu A, Alam M Z, AbdulKarim M I, Salleh H M. (2011). Catal Enzy J Mol. **69**, 66–73.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

---

- Sanghi A, Garg N, Kuhar K, Kuhad RC, Gupta VK. (2009). Enhanced production of cellulase-free xylanase by alkalophilic *Bacillus subtilis* ASH and its application in biobleaching of kraft pulp. *Bio-Res.* **4**, 1109–1129.
- Sharma DC, Satyanarayana T. (2006). A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods. *Bior Technol.* **97**,727–733.
- Sharma A, Satyanarayana T. (2011). Optimization of medium components and cultural variables for enhanced production of acidic high maltose-forming and Ca<sup>2+</sup>-independent  $\alpha$ -amylase by *Bacillus acidicola*. *J Biosci Bioeng.* **111**(5), 550–553.
- Subramaniyan S, Prema P. (2000). Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. *FEMS Microbiol Lett.* **183**, 1–7.
- Subramaniyan S, Prema P. (2002). Biotechnology of microbial xylanases: Enzymology, molecular biology and application. *Crit Rev Biotech.* **22**, 33-46.

### T

- Thomas L, Joseph A, Aurumugam M., and Pandey A. (2013). *Ind J Exp Biol.* **51**, 875-884.

### V

- Viet DN, Kamio Y, Abe N, Kaneko J, Izaki K. (1991). Purification and Properties of  $\beta$ -1,4-Xylanase from *Aeromonas caviae* W-61. *Appl Environ Microbiol.* **57**,445–9.
- Kumar v, Poonam Syal T, Satyanarayana. (2013). Highly thermo–halo–alkali–stable 1,4-endoxylanase from a novel polyextremophilic strain of *Bacillus halodurans*. *Biop Bios Eng.* **36**, 555–565.

### W

- Wali A, Mehta P, Chauhan A and Shirkot Ch K, (2013). Optimization of cellulase-free xylanase production by alkalophilic *Cellulosimicrobium* sp CKMX1 in solid-state fermentation of apple pomace using central composite design and response surface methodology. *Ann Microbiol.* **63**, 187–198.
- Winterhalter C, and Liebl W. (1995). *Appl Environ Microbiol.* **61**,1810-1815.
- Wong KKY, Tan LUL, Saddler JN. (1988). Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganisms, functions and applications. *Microbiol Rev.* **52** (3), 305–317.

### X

- Xiaoyong Z, Jinyan Z, Wen F, Zhidong L, Juan Z, Jie Y, Liang X and Hong T. (2010). Response surface methodology used for statistical optimization of jeans-peptide production by *Bacillus subtilis*. *Elect J Biotech.* **13** (4), 1-7.

### Z

- Zhang J, Jiewei Wang, Caiyuan Fang, Fei Song, Yuhua Xin, Lei Qu and Kai Ding. (2010). *Bacillus oceanisediminis* sp isolated from marine sediment. *Sch Life Sci and Technol Ins Microbiol Chin Acad Sci PR China Int J Syst Evol Microbiol.* **60**, 2924–2929.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

---

- Zambare VP. (2011). Optimization of amylase production from *Bacillus* sp using statistics based experimental design. Emir J Food Agric. **23** (1), 37-47.

## **Annexe I**

### **Matériel utilisé**

- ✓ Balance analytique CS 200 (OHAUTS)
- ✓ Bain Marie (RAYPA et Julabo Tw 12)
- ✓ Centrifugeuse (SIGMA 1-14).
- ✓ Etuve à 35 °C, à 37°C, à 40°C (memmert), (VENTRICELL)
- ✓ Four pasteur (RAYPA)
- ✓ Plaque agitatrice (RAYPA)
- ✓ Spectrophotomètre (SHIMADZU UVmin-1240V)



## Annexe II

Composition des milieux de culture en (g/l)

**Milieu de culture MM7** (Milieu Minimum à base de xylane, pH 7,0) (Viet et al., 1991).

- Milieu de culture MM7 liquide :

Xylane d'épeautre et d'avoine.....	10g
Extrait de levure.....	2 g
NaCl.....	2,5g
NH <sub>4</sub> Cl.....	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	15g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	30 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....	0,25g
Eau distillée.....	qsp.....1L

- **Gélose nutritive (GN)**

Extrait de levure .....	2g
Extrait de viande.....	1g
Peptone.....	5g
NaCl.....	5g
Agar.....	14g
Eau distillée.....	qsp.....1L

- **Bouillon nutritif**

Extrait de levure .....	2g
Extrait de viande.....	1g
Peptone.....	5g
NaCl.....	5g
Eau distillée.....	qsp.....1L

**Annexe III Solutions et tampons préparées****Solution à base d'acide dinitrosalicylique (DNS)**

Acide dinitrosalicylique.....	10g
Soude.....	16g
Tartrate de potassium sodique.....	300g
Eau distillée.....	qsp... 1l

La solution est préparée dans l'obscurité puis filtrée et conservée dans un flacon couvert d'aluminium.

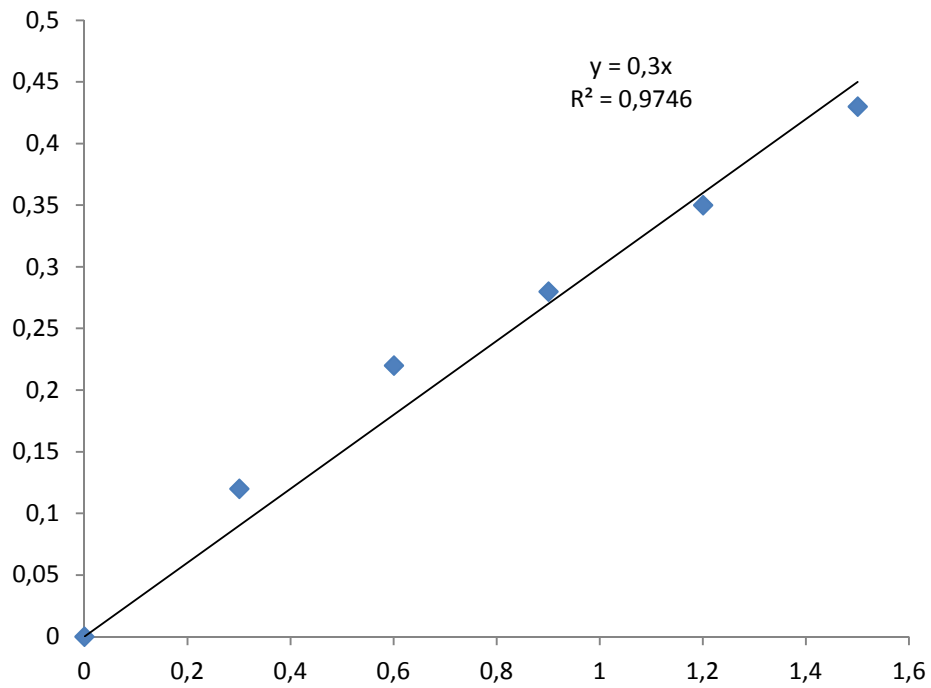
Tompon phosphate 50 mM, pH 7

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....50 mM.....250 ml

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....50 mM .....250 ml

On mélange les deux solutions jusqu'à l'obtention d'un pH de 7.

## Annexe IV



**Figure 10** : Droite d'étalonnage pour le dosage du xylose.

**Tableau VII :** Matrice des expériences par unité non codante

Expériences	X <sub>1</sub> (°C)	X <sub>2</sub> (h)	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub> (%)	Y (U/ml)
Expérience 01	35	57	7,5	4	2
Expérience 02	30	96	4	1	0,9
Expérience 03	30	96	11	7	0,075
Expérience 04	40	96	4	7	0,56
Expérience05	30	96	11	1	0,035
Expérience06	40	18	11	1	0,9
Expérience07	30	18	4	1	3,5
Expérience08	40	18	4	1	3,5
Expérience09	40	96	4	7	0,56
Expérience10	40	96	11	1	0,45
Expérience11	40	18	11	7	0,11
Expérience12	30	18	4	7	3,5
Expérience13	30	18	11	7	1

X<sub>1</sub>= Température, X<sub>2</sub>= Temps d'incubation, X<sub>3</sub>=pH et X<sub>4</sub>= Taux d'inoculation

**Tableau VIII :** Résultat de l'optimisation de l'activité xylanolytique selon le plan« Box-Behnken » unité non codante.

Expériences	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	Y (U/ml)
Expérience 01	9	72	10	20,11
Expérience 02	9	48	14	27,77
Expérience 03	7	24	14	19,22
Expérience 04	9	24	10	7,44
Expérience 05	7	48	10	20,88
Expérience 06	5	72	10	18,77
Expérience 07	7	72	14	18,22
Expérience 08	7	24	6	5,88
Expérience 09	5	24	10	4,66
Expérience 10	7	72	6	17,77
Expérience 11	5	48	6	20,88
Expérience 12	7	48	10	20,77
Expérience 13	7	48	10	20
Expérience 14	5	48	14	19,88
Expérience 15	9	48	6	19,55

X<sub>6</sub>=pH,

Model de plans d'expériences Box-Benken par unité codante.

Nombre des expériences	Variables		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
Expérience 01	+1	+1	0
Expérience 02	+1	0	+1
Expérience 03	0	-1	+1
Expérience 04	+1	-1	0
Expérience 05	0	0	0
Expérience 06	-1	+1	0
Expérience 07	0	+1	+1
Expérience 08	0	-1	-1
Expérience 09	-1	-1	0
Expérience 10	0	+1	-1
Expérience 11	-1	0	-1
Expérience 12	0	0	0
Expérience 13	0	0	0
Expérience 14	-1	0	+1
Expérience 15	+1	0	-1

## Résumé

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'optimisation des paramètres de culture d'une souche bactérienne isolée à partir d'un sol Algérien, nommé *Bacillus oceanisediminis* SJ3. La culture est effectuée dans le milieu MM7 ayant comme seule source de carbone le xylane d'épeautre et d'avoine.

Le plan de plaquette –Burman est appliqué pour déterminer les paramètres les plus influents. Quatre paramètres de culture qui sont la température, le taux d'incubation, le temps d'incubation et le pH sont sélectionnés pour leur effet sur la production de xylanases. La méthodologie de surface de réponse a été utilisée pour optimiser la production des xylanases, dans le but de sélectionner les paramètres influençant ainsi que les interactions, les résultats obtenus ont montré que les paramètres les plus influençant sur la production sont : le pH, le temps d'incubation et la concentration du xylane.

Le plan Box- Behnken, nous a permis de déterminer les valeurs optimales de production qui sont obtenus à pH de 9, à une concentration de xylane de 14 g/l et à un temps d'incubation de 72 h.

**Mots clés :** RSM, Plackett-Burman, Box-Behnken, xylane, xylanases, *Bacillus*.

## Abstract

The aim of this study is the optimization of culture parameters for xylanases production by a bacterial strain *Bacillus oceanisediminis*, isolated from an Algerian soil. The production was conducted in a MM7 medium with the oat spelt xylan as sole source of carbone.

Plackett-Burman design was applied to determine the most influential parameters. Four parameters: temperature, inoculation rate, incubation time and pH were selected for their significant effects on the xylanase production.

Response Surface Methodology was used to optimize the production of xylanase in the object to select the influencing parameters and their interactions. The results obtained saw that parameters influencing the xylanases production are: pH, incubation time and concentration of xylane. The Box-Behnken analysis gave the optimal parameter's value obtained at pH 9 to a xylan concentration of 14 g/l and a 72 h incubation time.

**Key words:** RSM, Plackett-Burman, Box-Behnken, xylane, xylanases, *Bacillus*.

# Sommaire



# Introduction

# Chapitre I

Synthèse

Bibliographique

Chapitre II

Matériel et

Méthodes

# Chapitre III

## Résultats et discussion

# Conclusion

# Références bibliographiques

# Annexes