

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 des
xylanases chez *Jonesia denitrificans* BN13
par la méthode des plans d'expériences.**

Présenté par :

Mr HAMMA Samir & Melle SAOUDI Samia

Soutenu le : 18 Juin 2016

Devant le jury composé de :

Mme. IDRES Nacira	MAA	Présidente
Melle. DJINNI Ibtissem	MCB	Examinatrice
Mme. BOUCHERBA Nawel	MCA	Promotrice
Mr . MESSIS Abdelaziz	MCA	Invité

Année universitaire : 2015 / 2016

Remerciements

Tout d'abord, on remercie Dieu, le Généraux qui nous a donné la force d'accomplir ce modeste travail.

On tient à remercier en premier lieu notre promotrice

Mme BOUCHERBA

Pour avoir accepté de nous encadrer

Pour sa présence, son aide et sa patience.

On exprime aussi nos remerciements à Mr MESSIS, ainsi à tous les membres de jury d'avoir accepté d'examiner ce travail.

On tient à remercier également tous les gens qui nous ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail sans oublier l'attaché de laboratoire de génie biologique Badria, et Mme IDRES notre enseignant pour leurs conseils constructifs.

MERCI

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail aux êtres les plus chers

au monde :

A ceux qui sont mon exemple de réussite, que j'ai tant aimer et respecter, qui m'ont donné de l'amour ; de la tendresse, du soutien et de la force, à mes très chers parents, que Dieu vous protège et vous prête longue et heureuse vie, que ce travail soit le témoignage profond de mon amour.

A mes très chers frères Yacine, Massinissa et Hocine qui m'ont soutenu avec leurs encouragements qui m'ont mené à cet aboutissement, auxquels je souhaite beaucoup de réussite et tout le bonheur du monde.

A mes très chères cousines, Siham, lamai, , Nora, Linda, Noria, aida, Sabrina, Amel .

Ames très chères amies, Nawal, Nabila, Fatima, Siham ensemble nous avons partagés d'agréables moments tout au long de la réalisation de ce travail et durant notre cursus universitaire.

Toute la promotion de M2 en biotechnologie microbienne.

Samia

Dédicaces

*Je dédie ce travail à la mémoire de ma mère, à mon père et
à mes frères, ma sœur ainsi qu'à leurs familles
je le dédit à ma femme et à mes enfants pour leur patience,
leur encouragements et leur soutien inconditionnel
A tout mes amis et collègues.*

Samir

Liste des tableaux

Tableau	Titres des tableaux	Page
I	Quelques souches d'actinobactéries productrices de xylanases.	2
II	Matrice d'expériences donnée par le plan Plackett-Burman en unités codées.	12
III	Tableau d'expérimentation du plan de Plackett-Burman en unités courantes.	Annexe IV
IV	Niveaux des différents paramètres opératoires étudiés pour la production de xylanases par la souche <i>Jonesia denitrificans</i> BN13.	13
V	Gamme d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs.	15
VI	Modèle donné par le plan « Box Behnken » pour l'optimisation de la production de xylanases par la souche <i>Jonesia denitrificans</i> BN13 en unités codées.	16
VII	Tableau d'expérimentation du plan de « Box Behnken » en unités courantes	Annexe IV
VIII	Niveaux des différents paramètres pour l'optimisation de la production de xylanases par <i>Jonesia denitrificans</i> BN13.	17
IX	Résultats de la détermination des paramètres opératoires influençant l'activité xylanolytique de la souche <i>Jonesia denitrificans</i> BN13.	20
X	Résultats de l'optimisation de l'activité xylanolytique de la souche <i>Jonesia denitrificans</i> BN13.	26
XI	Valeurs optimales des variables étudiées et des réponses prédite et observée pour la production de xylanases par la souche <i>Jonesia denitrificans</i> BN13.	32

Liste des figures

Figure N°	Titres des figures	Page
1	Dendrogramme phylogénétique de la souche <i>Jonesia denitrificans</i> BN13 (Bac-13-6) et les différentes souches apparentées	4
2	Organisation des polysaccharides structuraux et de la lignine dans les parois cellulaires végétales	4
3	Structure du xylane	5
4	Domaine de variation du facteur	9
5	Domaine d'étude pour deux facteurs	9
6	Représentation géométrique du plan d'expériences et de la réponse	10
7	Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS	15
8	Droite d'étalonnage pour le dosage du xylose.	19
9	a : Charte Pareto des effets standardisés des paramètres opératoires sur l'activité xylanolytique de la souche <i>Jonesia denitrificans</i> BN13.	22
	b : Valeurs des effets standardisés des paramètres opératoires sur l'activité xylanolytique de la souche <i>Jonesia denitrificans</i> BN13.	23
	c: Valeurs des effets absolus standardisés des paramètres opératoires sur l'activité xylanolytique de la souche <i>Jonesia denitrificans</i> BN13	24
10	Surface de réponse définissant l'interaction entre le pH (X9) et les concentrations en xylane (X10) pour une valeur de la concentration en NaCl (X11) fixée à 2,5 g/l.	28
11	Surface de réponse définissant l'interaction entre les concentrations en xylane (X10) et en NaCl (X11) pour une valeur du pH (X9) fixée à 7.	29
12	Surface de réponse définissant l'interaction entre le pH (X9) et les concentrations en NaCl (X11) pour une concentration en xylane (X10) fixée à 10 g/l.	30

Liste des figures

13	Valeurs optimales des variables et de la réponse déterminées pour une meilleure activité xylanolytique de la souche <i>Jonesia denitrificans</i> BN13.	31
-----------	--	----

Liste des abréviations

- **DNS**.....Dinitrosalicylic acid.
- **MM7**Milieu minimum à pH 7.
- **GC %** Pourcentage en Guanine – Cytosine.
- **m/v**.....Masse par volume.
- **V/V**.....Volume par volume.
- **rpm**Rotations par minute.
- **mM**.....Millimolaire.
- **µl**.....Microlitre.
- **nm**.....Nanomètre.
- **NaCl**.....Chlorure de sodium.
- **NH₄Cl**.....Chlorure d'ammonium.
- **KH₂PO₄**.....Monophosphate potasique.
- **Na₂HPO₄**.....Monophosphate disodique.
- **MgSO₄7H₂O**.....Sulfate de Magnésium.
- **EC**Enzyme Commission.
- **RSM**.....Response Surface Methodology.

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction1

PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Microorganismes producteurs de xylanases	2
II. Généralités sur les actinobactéries	3
II.1. Genre <i>Jonesia</i>	3
II.1.1. Position phylogénétique de la souche <i>Jonesia denitrificans</i> BN13.....	3
III. Paroi végétale	4
IV. Enzymes xylanolytiques	5
V. Quelques paramètres influençant la production de xylanases	6
V.1. Influence des paramètres environnementaux	6
V.1.1. Influence du pH.....	6
V.1.2. Influence de la température	6
V.1.3. Influence du temps d'incubation et du taux d'inoculation.....	7
V.2. Influence des paramètres nutritionnels	7
V.2.1. Influence de la source de carbone	7
V.2.2. Influence de la salinité	8
VI. Quelques applications industrielles des xylanases	8
VII : Plans d'expériences	9
VII.1. Définition et notion d'espace expérimental.....	9
VII.1.1. Définition	9
VII.1.2. Notion d'espace expérimental.....	9

VII.2. Plans de Plackett et Burman	10
VII.3. Méthodologie de surface réponse	10

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

I. Matériel	11
I .1.Matériel analytique	11
I .2 .Matériel biologique	11
II. Méthodes	11
II.1. Préparation du matériel biologique et du milieu de culture	11
II.1.1. Revivification de la souche <i>Jonesia denitrificans</i> BN13	11
II.1.2 Préparation du milieu de culture MM7liquide.....	11
II.2. Détermination des paramètres influençant la production de xylanases (Plan de Plackett-Burman)	11
II.2.1. Culture sur milieu liquide et suivi de l'activité xylanolytique	13
II.2.2. Mesure de l'activité xylanolytique.....	14
II.3. Optimisation des paramètres influençant la production de xylanases	15
II.3.1. Validation du modèle	17

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

I. Droite d'étalonnage de l'activité xylanolytique	19
II. Détermination des paramètres influençant la production de xylanases par <i>Jonesia denitrificans</i> BN13 sur milieu MM7 liquide	20
III. Optimisation de la production de xylanases sur le milieu MM7 par la souche <i>Jonesia denitrificans</i> BN13	25
III.1. Détermination des interactions entre les variables	27
III.1.1. Interactions entre X9 (pH) et X10(concentrations en xylane)	27
III.1.2. Interactions entre X10 (concentrations en xylane) et X11 (concentrations en NaCl)	29

III.1.3. Interactions entre X9 (pH) et X11 (concentrations en NaCl)	30
III.2. Détermination des concentrations optimales du xylane , du NaCl et la valeur optimum du pH	31
III.2.1. Validation du modèle	32
Conclusion	35

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Abstract

Introduction

Introduction

L'intérêt croissant de l'Homme pour la préservation de l'environnement et le développement économique a suscité la nécessité de la mise en place de nouveaux procédés de production notamment biologiques, bénéfiques tant sur le plan de la qualité et de la quantité des produits que sur le plan impact sur l'environnement (**Stanescu, 2006**).

Dans cette perspective s'alignent les xylanases qui sont des enzymes utilisées dans divers domaines industriels tels que la papeterie, le textile, l'alimentation animale, la boulangerie et l'industrie du jus (**Polizeli et al., 2005**).

Les xylanases hydrolysent le xylane, qui est un hémicellulose des résidus agro-industriels. L'activité xylanolytique est avantageuse pour la réutilisation des sucres : hexoses et pentoses en tant que matières premières dans de nombreux processus biotechnologiques (**Breccia et al., 1995**).

Par ailleurs la production microbienne des xylanases est influencée par divers facteurs environnementaux et nutritionnels. La maîtrise de ces derniers pour une meilleure production de ces molécules est d'une très grande importance (**Muthezhilan et al., 2007**). Cependant les procédés classiques fréquemment utilisés pour la détermination et l'optimisation de ces paramètres sont lents, coûteux et s'avèrent souvent insuffisants car les interactions entre les différents facteurs sont négligées. Pour cela des méthodes statistiques utilisant des plans d'expériences sont préconisées (**Goupy, 2006**).

Notre étude s'inscrit dans cette optique en fixant comme objectifs la détermination et l'optimisation de quelques paramètres influençant la production de xylanases par une souche d'actinobactérie en l'occurrence *Jonesia denitrificans* BN13 en utilisant des plans d'expériences.

Notre travail s'organise autour de trois parties :

La première partie fait état des connaissances existantes sur les actinobactéries et de leurs capacités à produire des xylanases ainsi que des notions fondamentales relatives aux plans d'expériences.

La deuxième partie expose l'ensemble des méthodes expérimentales mises en œuvre pour la détermination et l'optimisation des paramètres influençant cette production ainsi que la modélisation de l'activité xylanolytique par le biais de la méthode des plans d'expériences.

La troisième partie retrace et discute les résultats obtenus au cours de cette étude.

Partie I

Synthèse

bibliographique

I. Microorganismes producteurs de xylanases

Une grande variété de microorganismes produisent des xylanases citons : les bactéries, les levures et les moisissures (Garai et Kumar, 2013 ; Walia et al., 2015).

Les actinobactéries sont des producteurs potentiels de xylanases, notamment le genre *Streptomyces*. Le genre *Jonesia* a récemment été décrit comme producteur de xylanases (Boucherba et al., 2011). Le tableau I présente quelques souches d'actinobactéries productrices de xylanases ainsi leurs propriétés.

Tableau I : Quelques souches d'actinobactéries productrices de xylanases.

Actinobactéries	MM (Kda)	pH Optimum	T (°C) optimale	Stabilité		pI	Références
				pH	T (°C)		
<i>Jonesia denitrificans</i> BN13	250,150,72	7	50	-	50-60	-	Boucherba et al., 2014
	40,42,26						
<i>Streptomyces matensis</i>	21,2	7	65	4,5-8	30-55	-	Yan et al., 2009
<i>Streptomyces</i> sp. CD3	-	8	50	9-10	70-90	-	Sharma et Bajaj, 2005
<i>Thermomonospora curvata</i>	15-36	6,8-7,8	75	-	-	4,2-8,4	Stutzenberger et Bodine, 1992 .
<i>Microtetraspora flexuosa</i> SIIX	26,3-16,8	6,0	80		25mn à 80	8,4-9,45	Berens et al., 1996
<i>Chainia</i> sp.	21	-	-	-	-	9,4-9,5	Hegde et al., 1998

MM : Masse Moléculaire (Kda), pI : Point isoélectrique, T : Température (°C).

II. Généralités sur les actinobactéries

Les actinobactéries anciennement appelées actinomycètes sont des bactéries dont la croissance centrifuge donne lieu à des colonies circulaires constituées d'hyphes (**Kitouni, 2007**). Elles sont à Gram positif et présentent un GC% supérieur à 55% (**Goodfellow et Williams, 1983**).

Ces microorganismes sont ubiquitaires grâce à leur grande capacité d'adaptation aux différentes conditions environnementales ainsi qu'à leur variabilité métabolique (**Lechevalier, 1981**). Ils forment généralement des hyphes ramifiés, des spores asexuées, pouvant survivre longtemps sous des conditions hostiles (**Panchanathan et al., 2013**). La plupart sont saprophytes et aérobies (**Andariambololona, 2010**). Ils sont hétérotrophes, mésophiles et préfèrent un pH neutre ou peu alcalin, d'autres sont thermophiles tolérant des températures élevées allant de 50 à 60 °C (**Omura, 1992**).

Les actinobactéries produisent une multitude de molécules bioactives notamment les antibactériens, antifongiques, anti tumoraux, enzymes ... etc (**Lacey, 1997**).

Parmi les genres d'actinobactéries producteurs de xylanases, citons le genre *Jonesia* décrit par Boucherba et collaborateurs en 2011.

II.1. Genre *Jonesia*

La famille des Jonesiaceae comprend un seul genre nommé *Jonesia* comprenant deux espèces *Jonesia denitrificans* (**Rocourt et al., 1987**) et *Jonesia quinghaiensis* (**Schumann et al., 2004**).

La souche *Jonesia denitrificans* BN13 est à Gram positif, positif pour le rouge de méthyl, la catalase et l'oxydase, négatif pour le Voges-proskauer et l'indole. Les cellules se présentent sous forme de bâtonnets courts irréguliers et parfois incurvés. Elles peuvent être aérobies ou anaérobies facultatives et sont douées de la capacité de réaliser la dénitrification. (**Boucherba, 2011**).

II.1.1. Position phylogénétique de la souche *Jonesia denitrificans* BN13

La position phylogénétique de la souche *Jonesia denitrificans* BN13 par rapport aux autres souches est montrée dans la figure 1.

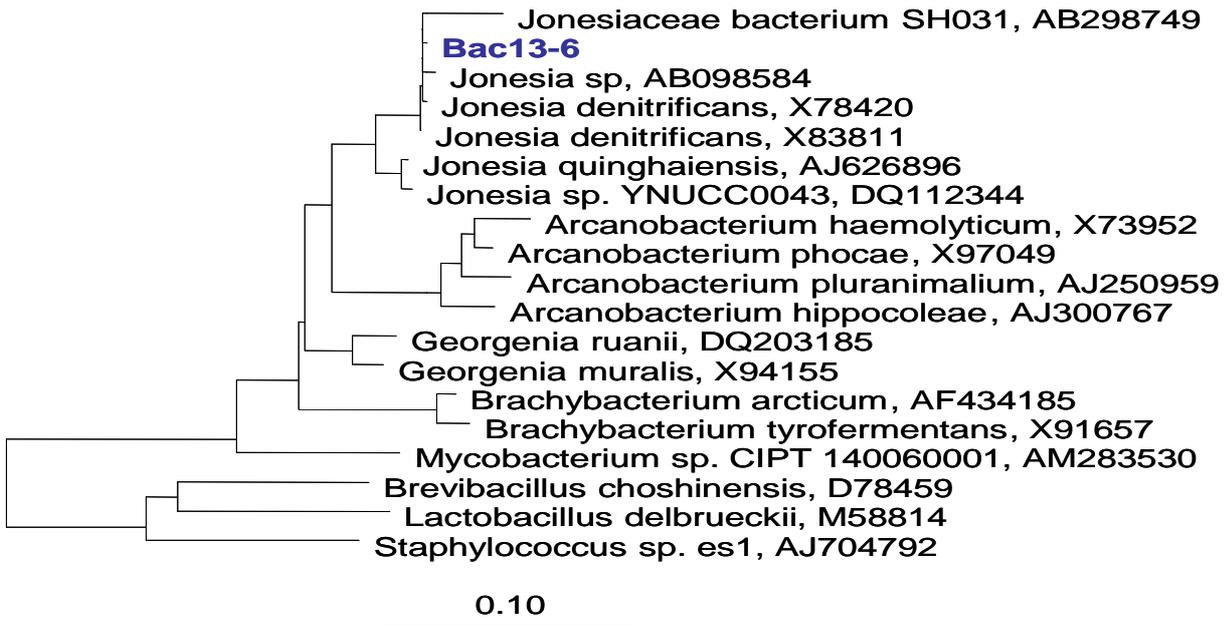


Figure 1 : Dendrogramme phylogénétique de la souche *Jonesia denitrificans* BN13 (Bac-13-6) et les différentes souches apparentées (Boucherba et al., 2011) .

III. Paroi végétale

La paroi cellulaire végétale est une matrice extracellulaire entourant chaque cellule végétale. Elle assure la rigidité cellulaire, le soutien contre le stress physique de la plante et constitue une barrière efficace contre les pathogènes et les insectes. Elle est essentiellement composée, de protéines, de lignine et de glucides (cellulose, hémicellulose et pectine) (**figure 2**) qui représentent 90% de la matière sèche pariétale (Mc Cann et Roberts, 1991). La lignocellulose est composée de : 20 à 30% d'hémicellulose, 40 % de cellulose et de 20 à 30% de lignine (Chang et al., 2011).

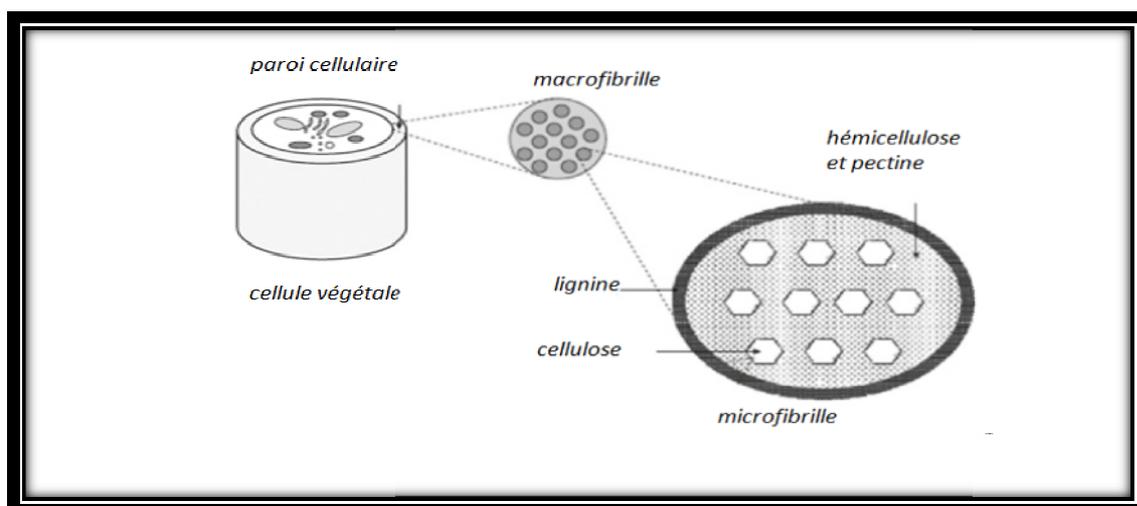


Figure 2: Organisation des polysaccharides structuraux et de la lignine dans les parois cellulaires végétales (Godin et al., 2011)

L'hémicellulose est le second polymère le plus abondant dans la nature après la cellulose (Sharma *et al.*, 2016). Elle représente 20 à 40% de la matière sèche végétale (Chang *et al.*, 2011). C'est un polysaccharide se trouvant en association avec la cellulose et lignine dans la paroi cellulaire végétale (Milagres *et al.*, 2005). L'hémicellulose est un hétéropolymère composé de différents sucres, on y trouve des pentoses (D-xylose et D-arabinose), des hexoses (D-mannose, D-glucose et D-galactose) (Bhagat *et al.*, 2014) et ou des acides uroniques (α -D-glucuronique, et α -D-galacturonique) (Sun *et al.*, 2009). Ce sont des polymères branchés à faible poids moléculaire avec un degré de polymérisation qui varie de 80 à 200 (Peng *et al.*, 2012).

Parmi les groupes d'hémicelluloses, les xylanes forment un groupe très important, Ce sont les hémicelluloses majoritaires des céréales et des monocotylédones. Ils peuvent représenter de 15 à 40% de la matière sèche des céréales (Fry, 1988). Les xylanes sont composés d'une chaîne principale de résidus β -D-xylopyranose reliés par des liaisons β (1-4) (Cacais *et al.*, 2001). Sur ce squelette de base sont greffées des ramifications dont la proportion et la distribution 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) (figure 3).

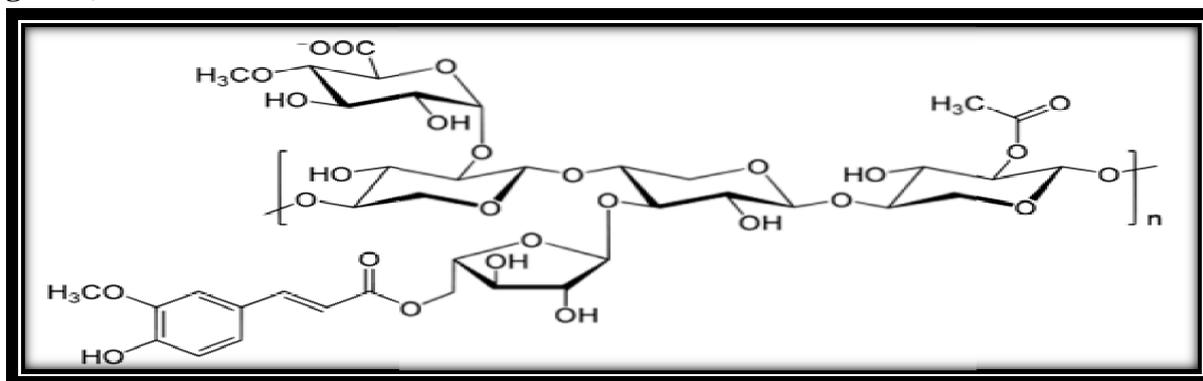


Figure 3 : Structure du xylane (Harris et Ramalingam, 2010).

IV. Enzymes xylanolytiques

Les xylanases sont des hydrolases définies comme étant le groupe d'enzymes responsables de l'hydrolyse du xylane ((Li *et al.*, 2000).

La biodégradation du xylane est un processus complexe qui exige l'intervention de plusieurs enzymes (Padilha *et al.*, 2014) assurant des activités plus ou moins spécifiques pour attaquer le squelette du substrat hémicellulosique. Il s'agit d'endoxylanases (EC.3.2.1.8) et de β -xylosidases (EC.3.2.1.37) et celles qui sont dites débranchantes dont le rôle est d'hydrolyser les ramifications

présentes sur la chaîne principale, il s'agit des α -L- arabinofuranosidases (EC .3.2.1.55) et des xylane estérases (EC .3.1.1.72)...etc (**Ryabova et al., 2009**).

Les endoxylanases catalysent la rupture de la liaison glycosidique reliant deux résidus xyloses de la chaîne principale des xylanes, engendrant une réduction du degré de polymérisation du substrat. Les liaisons sélectionnées pour l'hydrolyse dépendent de la nature du substrat tel que la longueur de la chaîne, le degré de ramification et la présence de substituants (**Li et al., 2000**).

Les principaux produits d'hydrolyse sont des oligomères de β -D-xylopyranosyl et des petites molécules comme les mono-, di- et trisaccharides de β -D-xylopyranosyl (**Polizeli et al., 2005**).

V. Quelques paramètres influençant la production de xylanases

La production microbienne de xylanases est généralement influencée et est fortement liée au métabolisme de la souche productrice. La régulation de ce dernier est influencée par de nombreux paramètres entre autres nutritionnelles et physico-chimiques.

V.1. Influence des paramètres environnementaux

V.1.1. Influence du pH

Le pH est un facteur environnemental très important qui affecte la production des xylanases durant la fermentation. Il a été montré pour plusieurs moisissures que la culture de ces dernières à un pH défavorable, limite l'accessibilité au substrat hémicellulosique, baisse le taux de croissance et la production de xylanases. Ainsi, l'activité xylanolytique de *Penicillium canescens* se caractérise par une gamme de pH proche de la neutralité (**Assamoi et al., 2009**).

En général, Pour les actinobactéries, un pH initial neutre ou proche de l'alcalinité est nécessaire pour une production xylanolytique élevée (**Bajaj et Singh, 2010**), ainsi il a été montré que pour *Streptomyces* sp. CA24, La xylanase CA24 présente une activité à un pH allant de 5 à 10 avec un maximum à 7 (**Porsuk et al., 2013**). Cependant pour d'autres actinobactéries le pH d'activité est plutôt acide c'est le cas de la xylanase de *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 qui montre une activité accrue à pH 5,0 et 5,5 et une très faible activité à pH 6,5 et 7,0 (**Ding et al., 2004**). L'action de ce facteurs touche essentiellement au transport membranaire des nutriments et aux systèmes enzymatiques (**Gaur et al., 2015**).

V.1.2. Influence de la température

La température est l'un des plus importants paramètres physiques influençant les activités métaboliques des microorganismes. Généralement les actinobactéries mésophiles se développent à

des températures allant de 28 à 37 °C, cependant elles produisent des xylanases actives à des températures comprises entre 50 et 65°C. Il en est de même pour les actinobactéries thermophiles, tel que *Thermoactinomyces thalophilus* qui produisent des xylanases ayant une température optimale de 65°C mais qui poussent à 50°C et à pH 8,5 (Kohli et al., 2001). Lorsque l'espèce *Streptomyces* sp. Ab106 se développe sur un milieu à base de xylane à 55°C et à pH 7,5 pendant 5 jours, elle produit une xylanase active à 60°C (Techapun et al., 2002). La température affecte la vitesse des réactions enzymatiques en touchant surtout à l'intégrité et la stabilité de l'enzyme ainsi qu'à son affinité pour le substrat (Coman et al., 2013).

V.1.3. Influence du temps d'incubation et du taux d'inoculation

Le temps d'incubation influence généralement la production microbienne de xylanases. Ainsi des moisissures telles que *Aspergillus nidulans* (Reis et al., 2003) et *Fusarium solani* F7 (Gupta et al., 2009) et des bactéries telles que *Streptomyces* sp (Thomas et al., 2013) et *Bacillus pumilus* VLK-1 (Kumar et al., 2014) présentent des optimums de production respectivement à 144h, 144h, 48h et 56h. Les travaux de Kumar en 2014 ont révélé que l'influence du temps d'incubation dépend du métabolisme de la souche microbienne et de plusieurs facteurs notamment cultureux.

En général le taux d'inoculation n'affecte pas l'activité xylanolytique de la plupart des microorganismes. Ainsi des études réalisées sur *Bacillus pumilus* VLK-1 (Kumar et al., 2014) et *Bacillus mojavensis* AG137 (Sepahy et al., 2011) ont montré que ce facteur ne présente des effets que dans le maintien de la balance entre la croissance microbienne et la composition en éléments nutritifs disponibles (Kumar et al., 2014).

V.2. Influence des paramètres nutritionnels

V.2.1. Influence de la source de carbone

Les substrats carbonés servent à la fois comme source de croissance et d'énergie aux microorganismes. Plusieurs travaux rapportent que le xylane est un excellent inducteur de la synthèse de xylanases chez les micro-organismes. Les sucres solubles (cellulose, saccharose, arabinose...etc) n'induisent que très faiblement la synthèse de xylanases, alors que les résidus agricoles insolubles (paille et son de blé, écorce d'orange ...etc) induisent fortement la synthèse de ces enzymes (Assamoi et al., 2009). Dans ce contexte, Maheswari et Chandra en 2000 rapportent que *Streptomyces cuspidosporus* montre une activité xylanolytique élevée sur son de blé comparée à celle obtenue sur xylane pur. Des travaux réalisés sur *Streptomyces* sp. (strain Ib 24D) utilisant le glucose et le xylane ensembles comme source de carbone ont montré que le potentiel de production

de xylanases est réduit de 67% par rapport au cas où le xylane est utilisé seul, cela suggère la répression catabolique du glucose exercée sur le xylane (**Rawashdeh et al., 2005**).

V.2.2. Influence de la salinité

La salinité joue un rôle important chez les micro-organismes producteurs de xylanases. Le besoin en NaCl est variable allant de 0 à 200 g/l (**Enache et Kamekura, 2010**). Des travaux réalisés par Krishnaveni en 2011 sur *Bacillus cereus* ont montré que la concentration en NaCl pour une meilleure activité xylanolytique est de 10 g/l. Les effets de la salinité se manifestent par la modification de la conformation structurelle de l'enzyme (**Gaur et al., 2015**), par l'augmentation de la perméabilité membranaire et par le maintien de l'équilibre osmotique cellulaire (**Strub, 2008**).

VI. Quelques applications industrielles des xylanases

Les xylanases trouvent des applications dans divers domaines industriels tels que la papeterie, l'alimentation animale, la boulangerie, l'industrie du jus ...etc (**Polizeli et al., 2005**).

Dans le domaine de la boulangerie, les xylanases sont utilisées comme additifs pour améliorer la qualité et le volume du pain en provoquant une meilleure rétention de l'eau (**Harris et Ramalingam, 2010**).

En papeterie les xylanases rendent les fibres de papier plus accessibles pour le blanchissement chimique réduisant ainsi la consommation du chlore et le besoin en d'autres agents chimiques. Par conséquent, la pollution de l'environnement par les effluents de l'industrie papetière est considérablement réduite (**Ryu et Kim, 1997**).

Dans l'industrie du textile, le dégraissage est réalisé en utilisant des xylanases qui éliminent spécifiquement les impuretés hémicellulosiques, inhibant la finition, le mouillage et la teinture, rendant la fibre textile lisse et souple. Ce procédé est meilleur que le traitement chimique traditionnel non spécifique qui s'opère à des concentrations élevées d'hydroxyde de sodium (**Bettan et al., 2012**).

VII. Plans d'expériences

VII.1. Définition et notion d'espace expérimental

VII.1.1. Définition

Un plan d'expériences est une série d'essais sélectionnés qui offre une stratégie optimale permettant de prédire avec le maximum de précision une réponse à partir d'un nombre minimal d'essais (Ozil, 1997). De manière générale, la méthode des plans d'expériences cherche à déterminer et à établir les liens entre deux types de variables :

- **la réponse** : grandeur étudiée ou grandeur d'intérêt.
- **les facteurs** : grandeurs physiques modifiables par l'expérimentateur, sensées influencer sur les variations de la réponse (Goupy, 2005).

VII.1.2. Notion d'espace expérimental

La réponse dépend de un ou de plusieurs facteurs. Le premier facteur peut être représenté par un axe gradué et orienté (Figure 4). La valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai est appelée *niveau*. Lorsqu'on étudie l'influence d'un facteur, en général, on limite ses variations entre deux bornes. La borne inférieure est le niveau bas. La borne supérieure est le niveau haut.

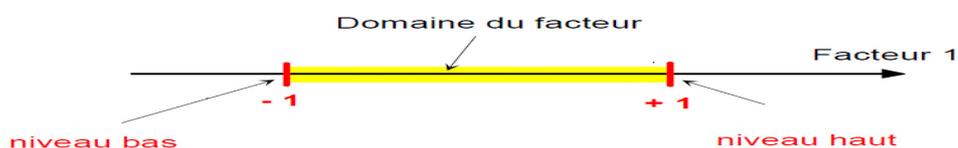


Figure 4: Domaine de variation du facteur.

Lorsqu'un second facteur est mis en jeu, il est représenté lui aussi par un axe gradué et orienté. On définit, comme pour le premier facteur, son niveau haut, son niveau bas et son domaine de variation. Ce second axe est disposé orthogonalement au premier. On obtient ainsi un repère cartésien qui définit un espace euclidien à deux dimensions. Cet espace est appelé *l'espace expérimental* (Figure 5) (Goupy, 2006).

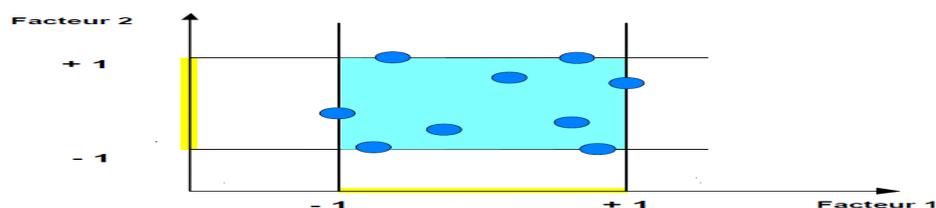


Figure 5: Domaine d'étude pour deux facteurs.

VII.2. Plans de Plackett et Burman

Les plans de Plackett et Burman sont des plans de criblage permettant la caractérisation des facteurs influençant les variations de la réponse.

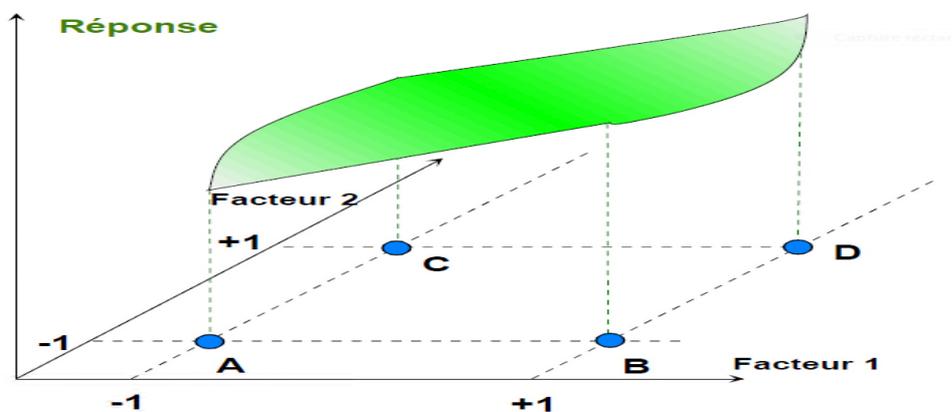
Ces plans utilisent le logiciel statistique Minitab 16.0 basé sur des matrices d'expériences dont les facteurs ne prennent que deux niveaux soit -1 ou +1 (Vimalashanmugam et Viruthagiri, 2013).

VII.3. Méthodologie de surface réponse (Response Surface Methodology) (RSM)

La méthodologie de « surface réponse » est une collection de techniques mathématiques statistiques utilisée afin de construire des modèles statistiques dans le but d'optimiser la production de composés importants à l'échelle industrielle comme les enzymes, les antibiotiques, les antifongiques ... etc. Le modèle de « Box – Behnken, 1960 » est une approche très efficace pour l'optimisation statistique des facteurs influençant la réponse (Xianoyong *et al.*, 2010).

Les niveaux x représentent les coordonnées d'un point expérimental et y est la valeur de la réponse en ce point. On définit un axe orthogonal à l'espace expérimental et on l'attribue à la réponse. La représentation géométrique du plan d'expériences et de la réponse nécessite un espace ayant une dimension de plus que l'espace expérimental. Un plan à deux facteurs utilise un espace à trois dimensions pour être représenté : une dimension pour la réponse, deux dimensions pour les facteurs.

A chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. A l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localisent sur une surface appelée la surface de réponse (Figure 6) (Goupy, 2006).



A, B, C et D : points du domaine d'étude.

Figure 6 : Représentation géométrique du plan d'expériences et de la réponse (Goupy, 2006).

Partie II
Matériel et Méthodes

I. Matériel

I.1. Matériel analytique

Le matériel analytique est décrit en annexe I.

I.2. Matériel biologique

La souche utilisée dans ce travail est un actinobactérie nommée *Jonesia denitrificans* BN13 (Boucherba et al., 2011) appartenant à la collection du laboratoire de microbiologie appliquée « LMA » de l'université A/Mira de Bejaia. Le prélèvement de l'échantillon a été réalisé au niveau d'un jardin volontairement amendé avec de la bouse de vache, dans le but d'engendrer une activité microbienne accrue, en l'occurrence une activité xylanolytique.

II. Méthodes

II.1. Préparation du matériel biologique et du milieu de culture

II.1.1. Revivification de la souche *Jonesia denitrificans* BN13

Afin de s'assurer de la viabilité de la souche *Jonesia denitrificans* BN13, des observations à l'état frais et des repiquages sur bouillon nutritif sont réalisés. L'inoculation de la souche est effectuée en surface sur des boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24h. Les cultures pures obtenues sont conservées à 4°C.

II.1.2. Préparation du milieu de culture MM7 liquide

Le milieu de culture préconisé pour l'isolement de la souche *Jonesia denitrificans* BN13 productrice de xylanases est le milieu MM7 (milieu minimum à pH 7) contenant le xylane d'épeautre et d'avoine comme seule source de carbone.

La préparation de ce milieu consiste à mélanger les composants sous-cités en (g/l) dans de l'eau distillée suivie d'une agitation, d'un ajustement du pH et d'un autoclavage.

Le xylane d'épeautre et d'avoine 10 g /l, l'extrait de levure 2 g/l, NaCl 2,5 g/l, NH₄Cl 5 g/l, KH₂PO₄ 15 g/l, Na₂HPO₄ 30 g/l, MgSO₄·7H₂O 0,25 g/l (Viet et al., 1990) .

II.2. Détermination des paramètres influençant la production de xylanases

(Plan de Plackett- Burman)

Dans le but de déterminer les paramètres qui influencent la production de xylanases par la souche *Jonesia denitrificans* BN13 : le taux d'inoculation, le temps d'incubation, le pH et la température d'incubation. Une matrice d'expériences du plan de Plackett- Burman est élaborée à

l'aide du logiciel Minitab 16.0. Le choix des facteurs et leurs niveaux de variations sont effectués en tenant compte des limites expérimentales de la croissance et de la production de xylanases de la souche étudiée.

La matrice d'expériences en unités codées est mentionnée dans le Tableau II :

Tableau II : Matrice d'expériences donnée par le plan de Plackett-Burman en unités codées.

Expériences	Variables en unités codées			
	X1	X2	X3	X4
Expérience 1	0	0	0	0
Expérience 2	-1	+1	-1	-1
Expérience 3	+1	+1	+1	-1
Expérience 4	+1	+1	+1	+1
Expérience 5	-1	+1	-1	-1
Expérience 6	-1	-1	+1	+1
Expérience 7	-1	-1	-1	-1
Expérience 8	-1	-1	+1	+1
Expérience 9	+1	+1	+1	+1
Expérience 10	-1	+1	+1	+1
Expérience 11	+1	-1	+1	+1
Expérience 12	+1	-1	-1	-1
Expérience 13	+1	-1	+1	-1

X1 : taux d'inoculation % (v/v), **X2** : temps d'incubation (h), **X3** : pH et **X4** : température d'incubation (°C).

-1 : Niveau bas, **0** : Centre, **+1** : Niveau haut.

Treize expériences différentes sont préparées selon la matrice obtenue. L'évaluation de l'activité xylanolytique est effectuée par la méthode au DNS (acide dinitrosalicylique) (Miller, 1959). La matrice des expériences donnée par le plan de Plackett- Burman en unités courantes est présentée dans le Tableau III (**Annexe IV**).

Les niveaux des différents paramètres opératoires étudiés pour la production de xylanases par la souche *Jonesia denitrificans* BN13 sont donnés dans le Tableau IV.

Tableau IV: Niveaux des différents paramètres opératoires étudiés pour la production de xylanases par la souche *Jonesia denitrificans* BN13.

Les niveaux	Variables en unités courantes			
	X1	X2	X3	X4
Niveau bas (-1)	1	18	4	30
Centre (0)	4	57	7,5	35
Niveau haut (+1)	7	96	11	40

X1 : taux d'inoculation % (v/v), **X2** : temps d'incubation (h), **X3** : pH et **X4** : température d'incubation (°C).

II.2.1. Culture sur milieu liquide et suivi de l'activité xylanolytique

Après établissement des plans d'expériences, il est procédé à la préparation des milieux de culture MM7 liquides qui sont répartis à raison de 10 ml dans des Erlenmeyers d'une contenance de 100ml etensemencés à partir d'une pré-culture de *Jonesia denitrificans* BN13 avec des taux d'inoculations différents :1%, 4% et 7% (v/v) , ajustés à des pH variables (4, 7,5 et 11) et incubés à des températures différentes (30°C, 35°C et 40°C) pendant des temps variables (18h , 57h et 96h) .

Les surnageants des cultures sont récupérés après centrifugation à 10000 rpm pendant 10min et ont fait l'objet d'un test d'activité xylanolytique mesurée selon le test à l'acide dinitrosalicylique (voir ci-dessous).

II.2.2. Mesure de l'activité xylanolytique

L'activité xylanolytique est déterminée en présence du xylane d'épeautre et d'avoine, qui 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 surnageant de culture (100 µl) auquel sont ajoutés 900µl de substrat. Ce mélange est incubé à 50°C pendant 10 min (**Wang et al., 2003**).

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), puis le mélange est porté à ébullition pendant 5 min.

Le témoin correspond à la solution de xylane incubée sans surnageant de culture à 50°C pendant 10 min, puis 1,5 ml de DNS sont ajoutés et portés à ébullition pendant 5 min, par la suite 100µl de surnageant sont additionnés. Après refroidissement, la lecture des absorbances est effectuée à une longueur d'onde de 540 nm.

Une unité d'activité xylanolytique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui produit une micromole de sucres réducteurs (équivalent en xylose) par minute dans un millilitre de surnageant dans les conditions expérimentales mentionnées ci-dessus.

L'activité xylanolytique est calculée selon Bailey et collaborateurs (1992) comme suit :

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

C_x : Concentration des sucres réducteurs du mélange réactionnel (µmole/ml).

C_t : Concentration des sucres réducteurs du mélange témoin (µmole/ml).

D : facteur de dilution.

t : temps d'incubation (minutes).

En milieu alcalin et à chaud, l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNS) jaune est réduit par les sucres réducteurs en acide 3-amino 5-nitrosalicylique rouge orangé (**Figure 7**).

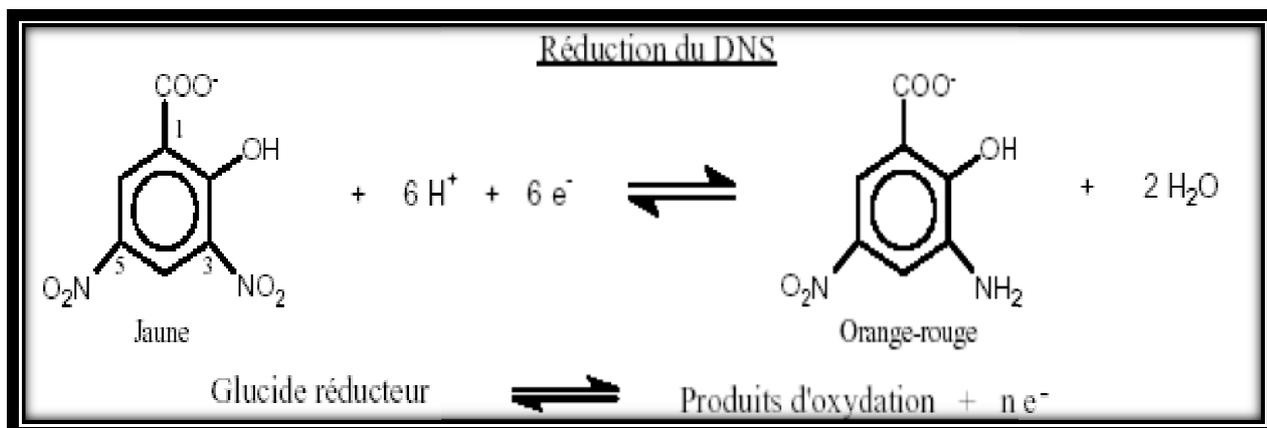


Figure 7: Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS (Bailey et al. 1992).

Le tableau suivant donne la gamme d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs.

Tableau V : Gamme d'étalonnage 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 tube, on prélève 100 µl de chaque dilution, auquel on rajoute 900 µl 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.

II.3. Optimisation des paramètres influençant la production de xylanases

Dans le but de déterminer les valeurs optimales des paramètres permettant une meilleure production de xylanases par la souche *Jonesia dnitificans* BN13, un plan factoriel avec interaction est appliqué dans cette étude afin d'évaluer l'influence de chaque paramètre sur l'activité xylanolytique étudiée d'une part et les effets d'interactions de ces derniers d'autre part.

Quinze expériences différentes sont préparées selon le plan factoriel donné par le logiciel : Minitab 16.0 du plan de box –Behnken choisis pour optimisation des facteurs influençant l'activité xylanolytique de la souche *Jonesia denitrificans* BN13 (**Tableau VI**).

Tableau VI: Model donné par le plan « Box Behnken » pour l'optimisation de la production de xylanases de la souche *Jonesia denitrificans* BN13 en unités codées.

Expériences	Variables en unités codées		
	X9	X10	X11
Expérience 1	-1	-1	0
Expérience 2	0	0	0
Expérience 3	-1	+1	0
Expérience 4	0	0	0
Expérience 5	0	+1	+1
Expérience 6	-1	0	+1
Expérience 7	0	0	0
Expérience 8	-1	0	-1
Expérience 9	+1	0	+1
Expérience 10	+1	-1	0
Expérience 11	0	-1	-1
Expérience 12	0	-1	+1
Expérience 13	+1	+1	0
Expérience 14	+1	0	-1
Expérience 15	0	+1	-1

X9 : pH, X10 : concentration en xylane (g/l), X11 : concentration en NaCl (g/l).

-1 : Niveau bas, 0 : Centre, +1 : Niveau haut.

Dans le but de déterminer les valeurs optimales des concentrations en xylane d'épeautre et d'avoine et en NaCl et de la valeur du pH permettant une bonne production de xylanases par la souche *Jonesia denitrificans* BN13, une étude statistique expérimentale est réalisée, en utilisant un logiciel de plan d'expériences du modèle « Box Behnken ».

Des milieux de cultures MM7 liquides ayant différentes concentrations en xylane et en NaCl sont préparés et ajustés à des pH variables puis répartis à raison de 10 ml dans des Erlenmeyers d'une contenance de 100 ml. Ces milieux sontensemencés à partir d'une pré-culture de *Jonesia denitrificans* BN13 avec un taux d'inoculation de 2 % (v/v) puis incubés à 37°C pendant 48h. La matrice des expériences donnée par le plan « Box Behnken » en variables réelles est présentée dans le tableau VII (Annexe IV). L'activité xylanolytique de la souche *Jonesia denitrificans* BN13, cultivée dans les conditions expérimentales déterminées par ce plan est évaluée par la méthode au DNS (acide dinitrosalicylique).

Les niveaux des différents paramètres pour optimisation de la production de xylanases par *Jonesia denitrificans* BN13 sont donnés dans le Tableau VIII :

Tableau VIII : Niveaux des différents paramètres pour l'optimisation de la production de xylanases par *Jonesia denitrificans* BN13.

Les niveaux	Variables en unités courantes		
	X9	X10	X11
Niveau bas (-1)	5	6	1,5
Centre (0)	7	10	2,5
Niveau haut (+1)	9	14	3,5

X9 : pH, X10 : concentration en xylane (g/l), X11 : concentration en NaCl (g/l).

II.3.1. Validation du modèle

Une validation pratique du modèle obtenu après optimisation est nécessaire. Ainsi les valeurs optimales des facteurs étudiés sont utilisées pour la préparation du milieu de culture optimum permettant d'obtenir la meilleure activité xylanolytique de la souche *Jonesia denitrificans* BN13.

Un volume de 10ml de ce milieu est mis en Erlenmeyers etensemencé à 2% (v/v) d'une pré-culture de la souche *Jonesia denitrificans* BN13 puis incubé à 37°C pendant 48h. Le surnageant de culture est récupéré après centrifugation à 10000 rpm pendant 10min. L'activité xylanolytique dans le surnageant de culture est ensuite mesurée.

Partie III
Résultats et discussion

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de génie biologique de l'université A. Mira de Bejaia.

Dans ce chapitre, seront présentés les résultats et les discussion des deux parties de cette étude relative à la modélisation de la production de xylanases par la souche *Jonesia denitrificans* BN13, en utilisant en premier lieu un plan d'expériences de Plackett- Burman afin de déterminer les paramètres opératoires influençant l'activité xylanolytique , et en deuxième lieu en optimisant les paramètres significatifs par utilisation d'un modèle donné par le plan d'expériences de « Box- Behnken » .

I. Droite d'étalonnage pour la mesure de l'activité xylanolytique

La mesure de l'activité xylanolytique par le dosage des sucres réducteurs effectuée selon la méthode de Miller (1959) a nécessité la préparation d'une gamme d'étalonnage et par la suite une droite d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration du xylose est tracée.

La droite d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs est représentée dans la figure 8.

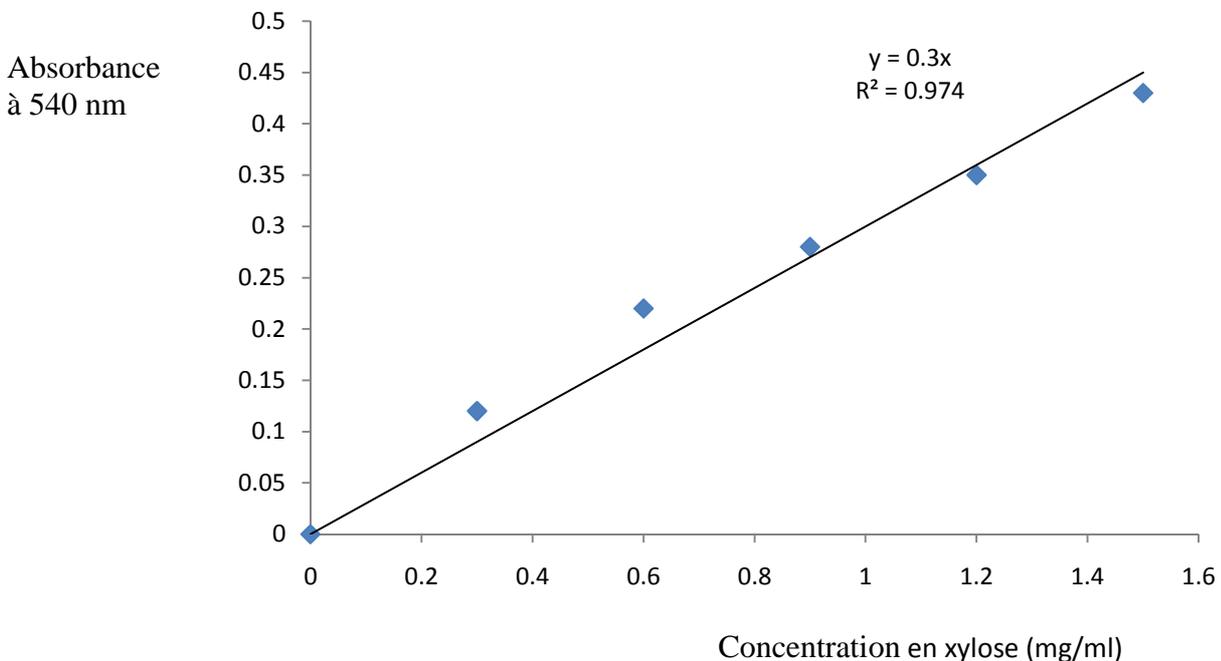


Figure 8: Droite d'étalonnage pour le dosage du xylose .

II. Détermination des paramètres influençant la production de xylanases par *Jonesia denitrificans* BN13 sur milieu MM7 liquide

L'effet des facteurs étudiés dans le cadre du plan de Plackett- Burman (le taux d'inoculation, le temps d'incubation, le pH et la température d'incubation) a permis de mesurer la réponse Y qui est l'activité xylanolytique estimée en unités par millilitre (U/ml). La modélisation des résultats par le logiciel Minitab 16.0 a permis de sélectionner parmi les quatre paramètres opératoires , le facteur le plus significatif pour la production de xylanases .

Les résultats de l'activité xylanolytique obtenus pour chaque expérience ainsi que les différents niveaux des paramètres opératoires étudiés sont regroupés dans le tableau IX représentant la matrice des expériences.

Tableau IX: Résultats de la détermination des paramètres opératoires influençant l'activité xylanolytique de la souche *Jonesia denitrificans* BN13 .

Expériences	Variables en unités codées				Réponse
	X1	X2	X3	X4	Y (U/ml)
Expérience 1	0	0	0	0	1,20
Expérience 2	-1	+1	-1	-1	0,75
Expérience 3	+1	+1	+1	-1	0,40
Expérience 4	+1	+1	-1	+1	1,76
Expérience 5	-1	+1	+1	-1	0,55
Expérience 6	-1	-1	+1	+1	0
Expérience 7	-1	-1	-1	-1	0,66
Expérience 8	-1	-1	-1	+1	1,76
Expérience 9	+1	+1	-1	+1	0,30
Expérience 10	-1	+1	-1	+1	0,11
Expérience 11	+1	-1	+1	+1	0

Résultats et discussion

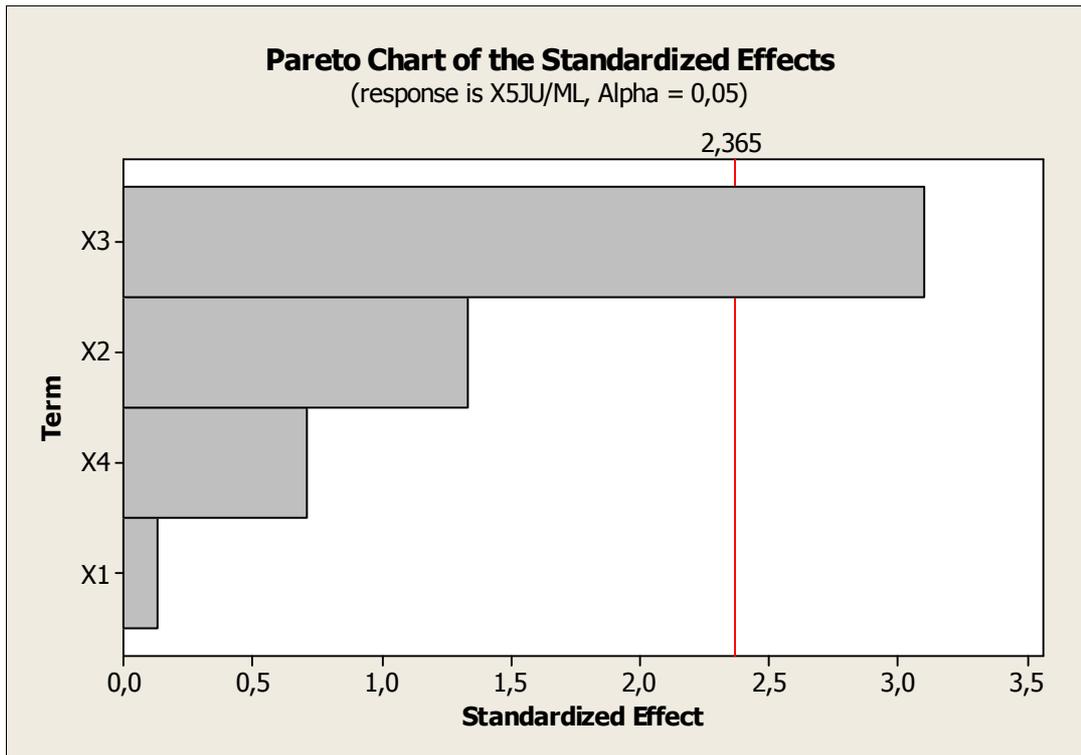
Expérience 12	+1	-1	-1	-1	0,75
Expérience 13	+1	-1	+1	-1	0

X1 : Taux d'inoculation (%) (v/v), **X2** : Temps d'incubation (h), **X3** : pH, **X4** : Température d'incubation (°C).

et **Y** : Activité xylanolytique (U/ml).

D'après les activités xylanolytiques obtenues (tableau IX) on remarque que la production de xylanases de la souche *Jonesia denitrificans* BN13 est nulle (0 U/ml) pour les expériences (6, 11 et 13) et ce pour des niveaux respectifs en taux d'inoculation de l'ordre de 1% (v/v), 7% (v/v) et 7% (v/v), un temps d'incubation de 18 h, des valeurs du pH de 11 et des températures d'incubation respectives de 40°C, 40°C et 30 °C. D'autre part la production de xylanases de la souche étudiée est plus élevée ($Y = 1,76$ U/ml) pour les expériences 4 et 8 pour un taux d'inoculation de 7%, des temps d'incubation respectifs de 96 h et de 18 h, un pH de l'ordre de 4 et une température d'incubation de 40°C. Par conséquent, l'analyse de ces résultats montre clairement que le facteur le plus influençant sur la production de xylanases de la souche *Jonesia denitrificans* BN13 est le pH initial du milieu de culture avec une tendance plutôt acide.

Les résultats obtenus par le logiciel Minitab 16.0 pour la détermination des paramètres influençant la production de xylanases par la souche *Jonesia denitrificans* BN13 sont illustrés dans les figures 9 (a, b et c).



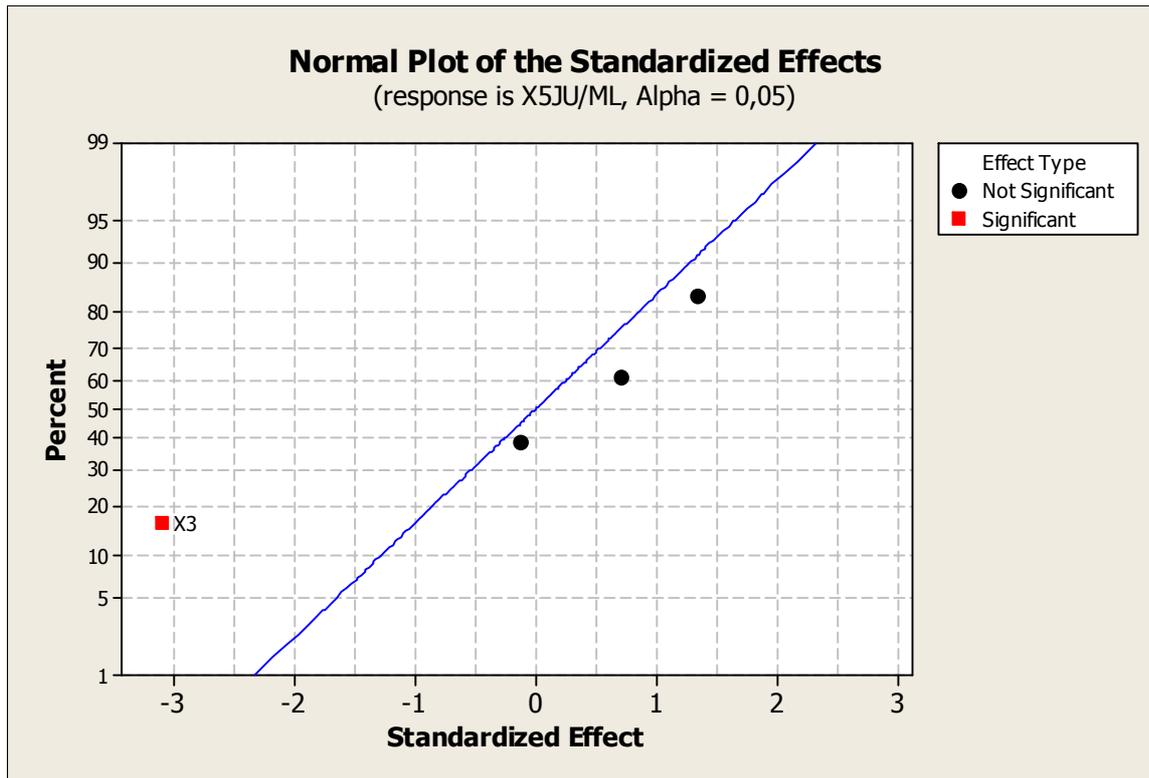
Term : variables codées, **Standardized Effect** : Effet standardisé, **X1** : taux d'inoculation, **X2** : temps d'incubation, **X3** : pH, **X4** : température d'incubation et **X5** : Activité xylanolytique Y (U/ml).

Figure 9 (a) : Charte Pareto des effets standardisés des paramètres opératoires sur l'activité xylanolytique de la souche *Jonesia denitrificans* BN13.

La charte Pareto montre les effets des paramètres étudiés sur la réponse Y à savoir l'activité xylanolytique de la souche *Jonesia denitrificans* BN13 où il apparaît clairement que le seul paramètre significatif influençant, est le pH initial du milieu de culture.

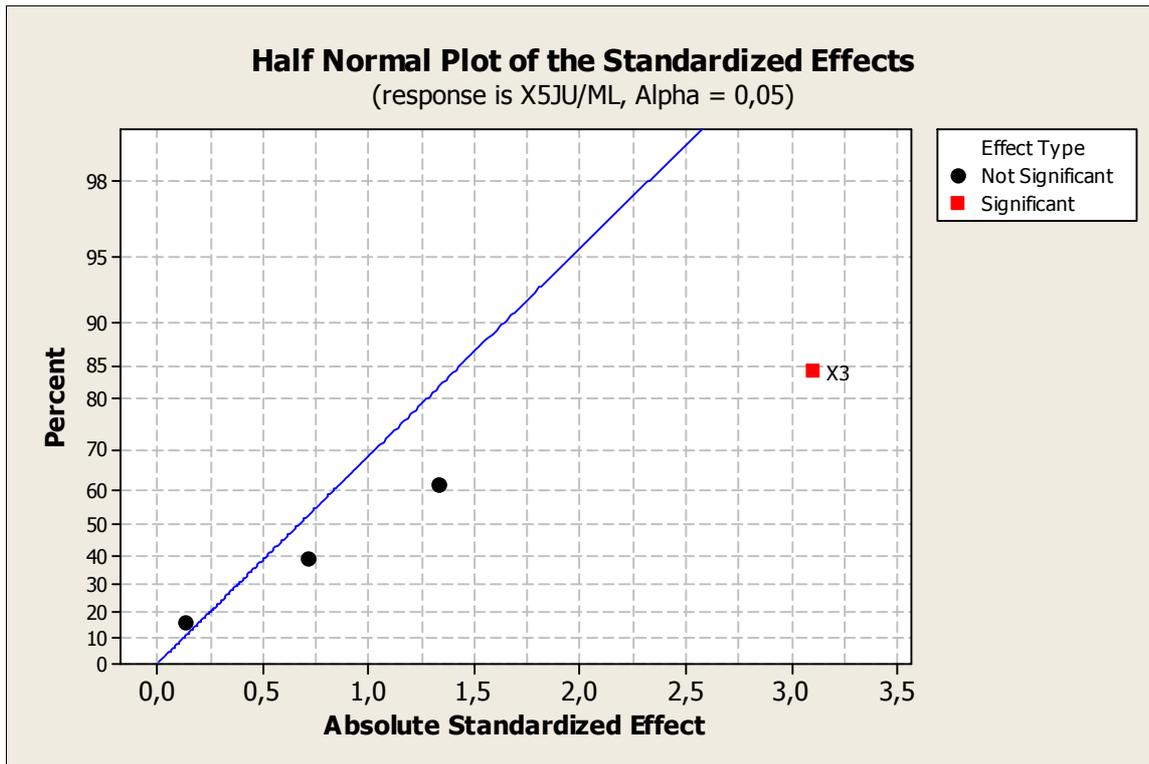
La P-valeur (t_{α}) déterminée par le logiciel Minitab 16.0 qui correspond au niveau de signification ($\alpha = 0,05$) est de l'ordre de 2,365.

D'après la charte Pareto obtenue, on remarque que les effets des paramètres opératoires : X1, X2 et X4 sont inférieures à la P-valeur déduisant ainsi que les facteurs : taux d'inoculation, temps d'incubation, et température d'incubation ne sont pas significatifs sur la production de xylanases chez *Jonesia denitrificans* BN13.



Percent : pourcentage, **Standardized Effect** : effet standardisé. **X3** : pH et **X5** : Activité xylanolytique Y (U/ml).

Figure 9 (b) : Valeurs des effets standardisés des paramètres opératoires de culture sur l'activité xylanolytique de la souche *Jonesia denitrificans* BN13.



Percent : Pourcentage, Standardized Effect : Effet standardisé, X3 : pH et X5 : Activité xylanolytique Y (U/ml).

Figure 9 (c): Valeurs absolues des effets standardisés des paramètres opératoires sur l'activité xylanolytique de la souche *Jonesia denitrificans* BN13.

Tout comme la charte Pareto, les tracés obtenus illustrés dans les figures 9 (b et c) indiquent que le seul paramètre significatif influençant l'activité xylanolytique est le pH du milieu de culture.

D'après les résultats obtenus, le taux d'inoculation n'influe pas sur l'activité xylanolytique de la souche *Jonesia denitrificans* BN13, ceux-ci sont en accord avec les résultats obtenus avec la souche de *Penicillium* sp.WX-Z1 (Cui et Zhao, 2012). Par contre ce facteur présente des effets sur la production de xylanases chez *Streptomyces* sp. ESRAA-301097 (El-Gendy et El-Bondkly, 2014) et *Streptomyces viridosporus* T7 (Alberton et al., 2009). El-Gendy et El-Bondkly en 2014 rapportent qu'un taux d'inoculum faible par rapport à l'optimum peut ne pas être suffisant pour produire la biomasse requise et par conséquent la production de xylanases, alors que des taux d'inoculation élevés peuvent causer une compétition accrue pour les éléments nutritifs.

Le facteur temps d'incubation ne montre pas d'effet sur l'activité xylanolytique de la souche *Jonesia denitrificans* BN13. Les mêmes résultats sont observés chez *Aspergillus flavus* (Kim, 2005). Cependant ce facteur influe sur les activités xylanolytiques de *Streptomyces cyaneus* SN32

(Ninawe et Kuhad, 2005) et *Streptomyces* sp. K37 (Nour El-dein et al., 2014). L'influence du temps d'incubation dépend du métabolisme de la souche microbienne et de plusieurs facteurs notamment culturels (Kumar, 2014).

Notre étude a montré que seul le pH est significatif pour l'activité xylanolytique de la souche *Jonesia denitrificans* BN13. Ce résultat est comparable à ceux de *Lichtheimia blakesleeana* (Neves et al., 2011), *Phanerochaete chrysosporium* (Dowarah et al., 2015), *Bacillus pumilus* MTCC 5015 (Thomas et al., 2015). Le pH du milieu de culture influence un grand nombre de processus enzymatiques, notamment le transport membranaire des enzymes et des nutriments nécessaires pour leur synthèse (Guha et al., 2013 ; Gaur et al., 2015).

La température d'incubation ne présente pas d'effet sur l'activité xylanolytique de la souche *Jonesia denitrificans* BN13. Ce résultat est similaire à celui de *Lichtheimia blakesleeana* (Neves et al., 2011) mais ne concorde pas avec celui de *Streptomyces* P12-137 (Coman et al., 2013) et *Streptomyces* sp. K37 (Nour El-dein et al., 2014). La température est un des plus importants paramètres physiques influençant les activités métaboliques des microorganismes et par conséquent les rendements en différents métabolites (Suneetha et al., 2011). Elle affecte la vitesse des réactions enzymatiques en touchant à la structure de l'enzyme, à son affinité pour le substrat ainsi qu'à la stabilité du complexe enzyme – substrat (Coman et al., 2013). D'autre part, des travaux décrivent un effet de protection du substrat pour son enzyme (Shah et Madamwar, 2005).

A la lumière des résultats obtenus avec le plan de Plackett- Burman, le paramètre de culture significatif (pH) influençant l'activité xylanolytique a été sélectionné et retenu pour l'optimisation des paramètres de production de xylanases par la souche *Jonesia denitrificans* BN13.

III. Optimisation de la production de xylanases sur milieu MM7 par la souche *Jonesia denitrificans* BN13

Afin d'optimiser l'activité xylanolytique de la souche étudiée, le paramètre de culture significatif influençant à savoir le pH, ainsi que d'autres facteurs en l'occurrence les concentrations en xylane et en NaCl sont retenus.

Dans le but d'évaluer l'influence de chaque paramètre sur la réponse étudiée d'une part et les effets des interactions d'autre part, un modèle donné par le plan « Box Behnken » est utilisé.

Les résultats de méthodologie de surface de réponse « RSM » sur l'étude des trois variables :

Résultats et discussion

pH (X9), les concentrations en xylane (X10) et en NaCl (X11), sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau X: Résultats de l'optimisation de l'activité xylanolytique de la souche *Jonesia denitrificans* BN13.

Expériences	Variables en unités Codées			Réponse
	X9	X10	X11	Y (U/ml)
Expérience 1	-1	-1	0	0
Expérience 2	0	0	0	20,77
Expérience 3	-1	+1	0	20,22
Expérience 4	0	0	0	21,55
Expérience 5	0	+1	+1	21,55
Expérience 6	-1	0	+1	20,00
Expérience 7	0	0	0	20,77
Expérience 8	-1	0	-1	20,44
Expérience 9	+1	0	+1	0
Expérience 10	+1	-1	0	18,11
Expérience 11	0	-1	-1	20,00
Expérience 12	0	-1	+1	1,70
Expérience 13	+1	+1	0	19,66
Expérience 14	+1	0	-1	15,44
Expérience 15	0	+1	-1	14,11

X9 : pH, **X10**: concentration en xylane (g/l) , **X11**: concentration en NaCl (g/l) et **Y** : Activité xylanolytique (U/ml).

D'après les activités xylanolytiques obtenues (tableau X) on remarque que la production de xylanases de la souche *Jonesia denitrificans* BN13 est nulle (0 U/ml) pour les expériences (1 et 9) et ce pour des valeurs du pH de l'ordre de 5 et 9 , des concentrations en xylane de 6 g/l et de 10

g/l et en NaCl de 2,5 g/l et de 3,5 g/l respectivement . Les points centraux (pH 7 , concentration en xylane 10 g/l et concentration en NaCl 2,5 g/l) correspondant aux expériences (2, 4 et 7) donnent des activités xylanolytiques élevées (Y) allant de 20,77 à 21,55 U/ml . D'autre part les expériences (5, 8 ,3 et 6) montrent des rendements relativement élevés allant de 20 à 21,55 U/ml. A la lumière de ces résultats il apparaît que les optimums de production de xylanases de la souche *Jonesia denitrificans* BN13 pour les facteurs étudiés en l'occurrence le pH, les concentrations en xylane et en NaCl se situent respectivement dans les intervalles suivants : 5 à 7, 10 à 14 g/l et 2,5 à 3,5 g/l.

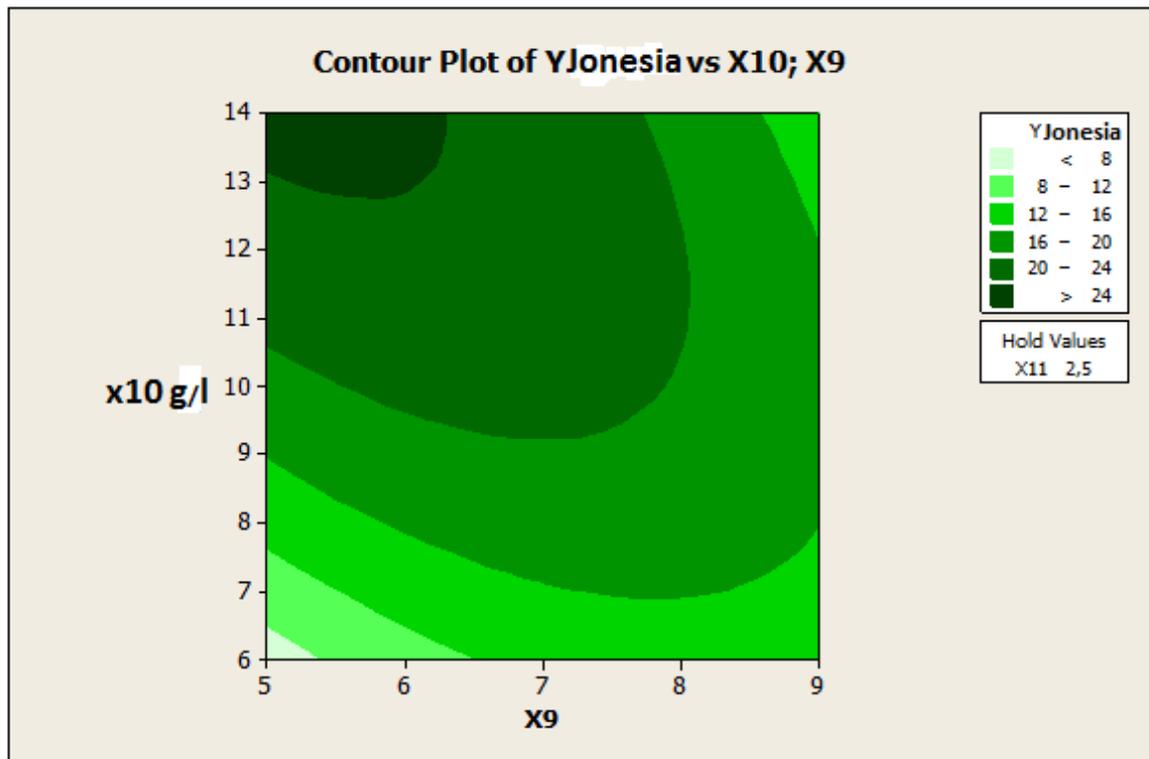
Dans le but d'évaluer les effets des variables étudiées sur la production de xylanases par la souche *Jonesia denitrificans* BN13, la méthodologie de surface de réponse est utilisée. Cette dernière fournie par le biais de surface de réponse les moyens de visualiser les interactions entre les variables et estimer le niveau optimum de chaque facteur pour une meilleure réponse.

III.1. Détermination des interactions entre les variables

Les surfaces de réponse obtenues par le logiciel Minitab 16.0 montrant les interactions entre paire de facteurs permettant de déterminer la zone des meilleurs résultats entre deux variables , sont illustrés dans les figures 10, 11 et 12.

III.1.1. Interactions entre X9 (pH) et X10 (concentrations en xylane)

Les interactions entre les deux variables : pH (X9) et source de carbone (X10) sont représentées par la surface de réponse définissant l'interaction entre les deux facteurs (figure 10).



Contour plot : surface de réponse, **Hold values** : valeurs fixées.

Figure 10 : Surface de réponse définissant l'interaction entre le pH (X9) et la concentration en xylane (X10) pour une concentration en NaCl (X11) fixée à 2,5g/l.

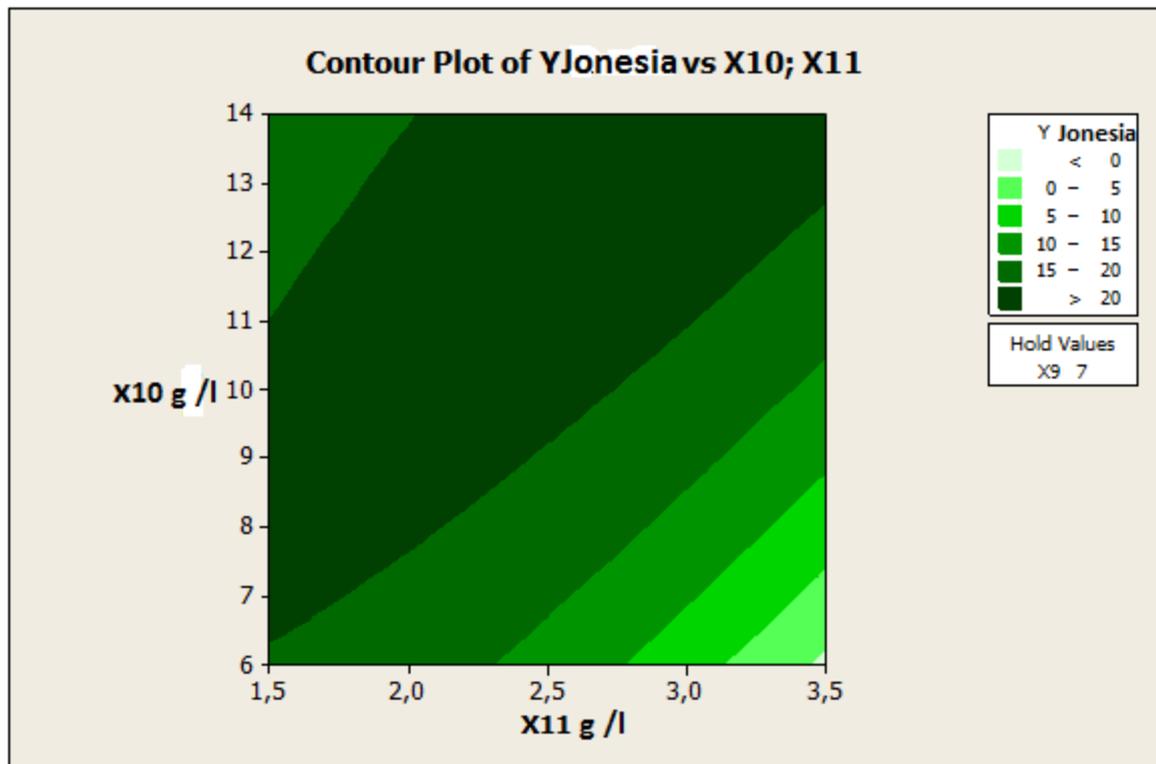
Cette figure montre les différentes zones traduisant l'activité xylanolytique de la souche étudiée.

La zone en vert clair représente l'intervalle des valeurs entre le pH et la concentration en xylane où l'on retrouve la zone d'activité la plus petite (<8 U/ml) et donc une production de xylanases moins importante. Cet intervalle se situe à des niveaux bas, pour le pH (5 – 5,4) et la concentration en xylane (6-6,5) g/l.

La zone en vert foncé représente l'intervalle des valeurs entre le pH et les concentrations en xylane où l'on retrouve la zone d'activité la plus importante (>24 U/ml) ce qui signifie une production élevée de xylanases. Cet intervalle se situe à des niveaux bas pour le pH (5–6.5) et à des niveaux hauts pour la source de carbone (13,2- 14) g/l.

III.1.2. Interactions entre X10 (concentrations en xylane) et X11 (concentrations en NaCl)

Les interactions entre les deux variables : concentrations en xylane (X10) et en NaCl (X11) sont représentées par la surface de réponse définissant l'interaction entre les deux facteurs (figure 11).



Contour plot : surface de réponse, Hold values : valeurs fixées.

Figure 11 : Surface de réponse définissant l'interaction entre les concentrations en xylane (X10) et en NaCl (X11) pour une valeur de pH (X9) fixée à 7.

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

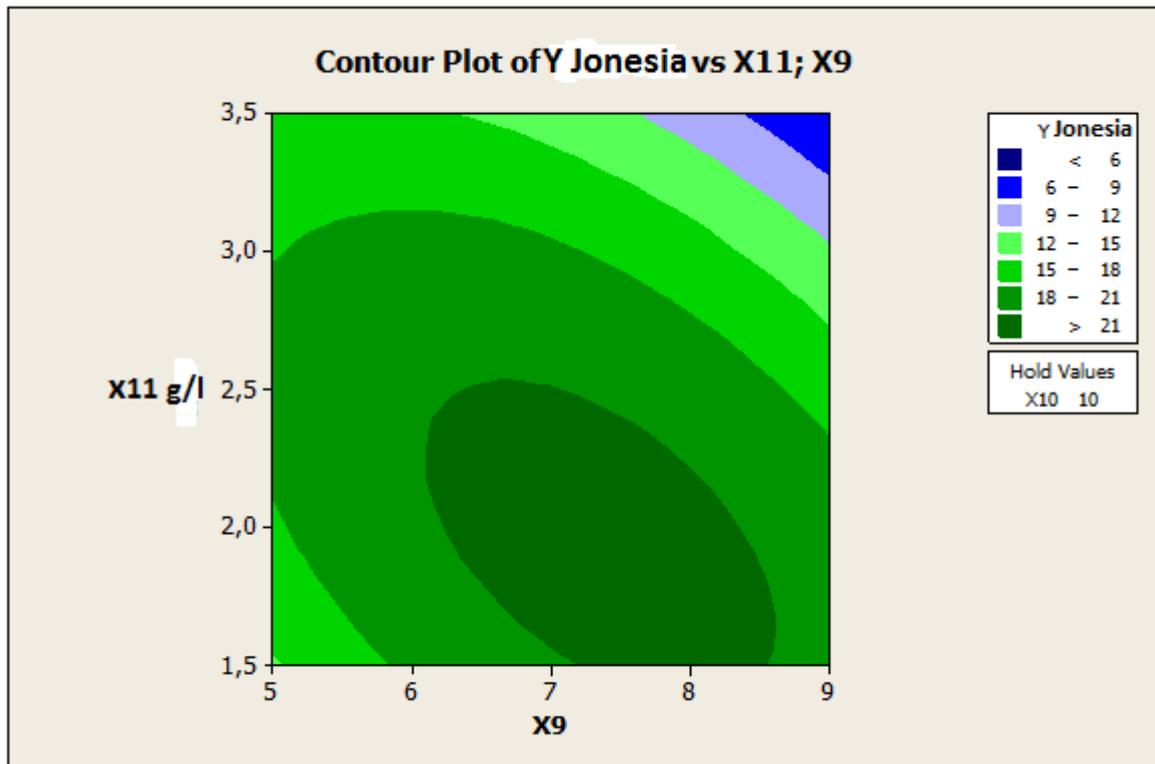
La zone en vert clair représente l'intervalle existant entre les concentrations en xylane et en NaCl où l'on retrouve une très petite zone d'activité (0- 5) U/ml et donc une production de xylanases très faible. Cet intervalle se situe à des niveaux bas pour la source de carbone (6 -7,5) g/l et à des niveaux hauts pour la concentration en NaCl (3,1-3,4) g/l.

La zone en vert foncé représente l'intervalle entre les concentrations en xylane et en NaCl où l'on retrouve la zone d'activité la plus importante (>20 U/ml), ce qui signifie une production élevée

en xylanases. Cet intervalle se situe entre (6,4–11) g/l pour la source de carbone et entre (1,5- 3,5) g/l pour la concentration en NaCl.

III.1.3. Interactions entre X9 (pH) et X11 (concentrations en NaCl)

Les interactions entre les deux variables : pH (X9) et concentrations en NaCl (X11) sont représentées par la surface de réponse définissant l'interaction entre les deux facteurs (figure 12).



Contour plot : surface de réponse, **Hold values :** valeurs fixées.

Figure 12 : surface de réponse définissant l'interaction entre le pH (X9) et les concentrations en NaCl (X11) pour une concentration en xylane (X10) fixée à 10 g/l.

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

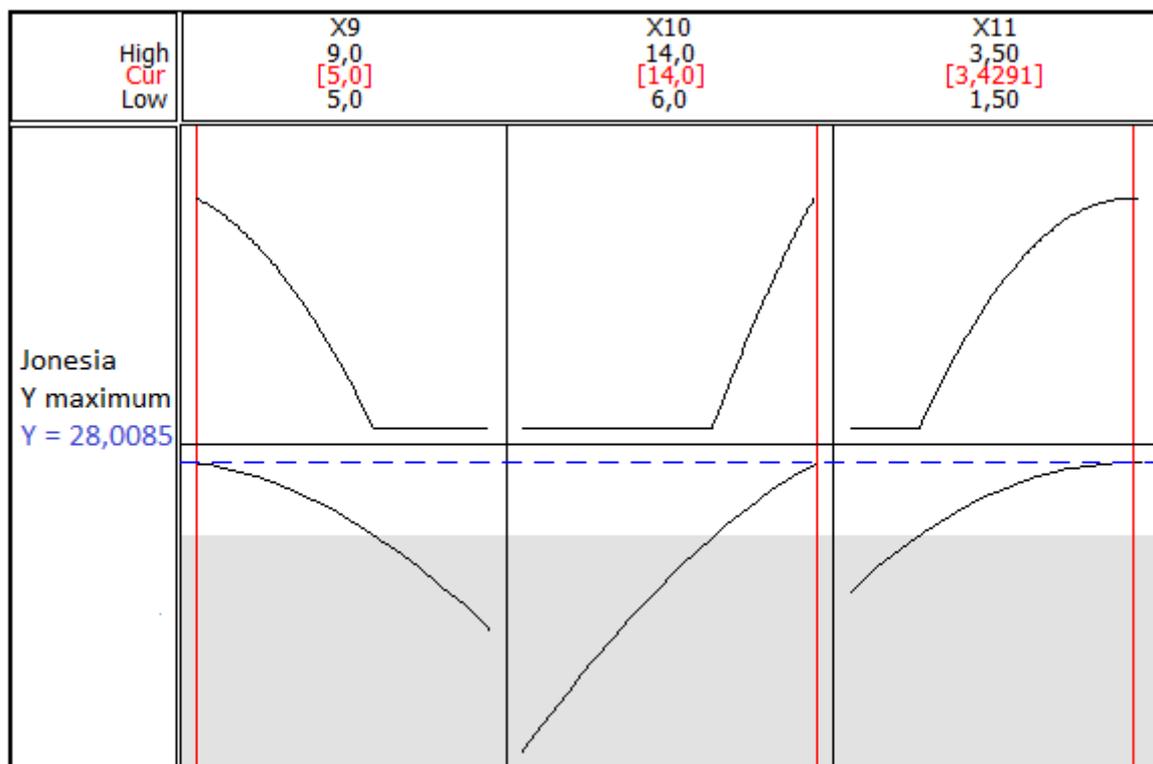
La zone en bleu représente l'intervalle des valeurs entre le pH et les concentrations en NaCl où l'on retrouve une petite zone d'activité (6- 9) U/ml et donc une faible production de xylanases. Cet intervalle se situe à des niveaux hauts pour le pH (8,5–9) et pour des concentrations en NaCl allant de 3,25 à 3,5 g/l.

La zone en vert foncé représente l'intervalle des valeurs entre le pH et les concentrations en NaCl où l'on retrouve la zone d'activité la plus importante (>21 U/ml) traduisant une production

en xylanases élevée. Cet intervalle se situe à des niveaux intermédiaires pour le pH (6,1–8,6) et à des niveaux bas pour des concentrations en NaCl allant de 1,5 à 2,5 g/l.

III.2. Détermination des concentrations optimales du xylane, du NaCl et la valeur optimum du pH

La méthodologie de surface de réponse « **RSM** », a permis de déterminer les valeurs optimales des trois variables retenues pour une meilleure activité xylanolytique de souche *Jonesia denitrificans* BN13 (**figure 13**).



X9 : pH, **X10**: concentration en xylane (g/l) , **X11**: concentration en NaCl (g/l) et **Y** : Activité xylanolytique (U/ml).

High : niveau haut, **Low** : niveau bas et **cur** : valeur optimale.

Figure 13 : Valeurs optimales des variables et de la réponse déterminées par « **RSM** » pour une meilleure activité xylanolytique de la souche *Jonesia denitrificans* BN13.

L'optimisation de la production de xylanases évaluant l'influence de chaque paramètre sur l'activité étudiée d'une part et les effets des interactions par paire de facteurs d'autre part réalisée par la

méthodologie de surface de réponse a permis d'obtenir des concentrations optimales en xylane et en NaCl de 14 g/l et 3,43 g/l respectivement et une valeur optimale de 5 pour le pH .

III.2.1. Confirmation du modèle obtenu

Afin de vérifier la validité du modèle, les conditions optimales obtenues du milieu MM7 à savoir des concentrations en xylane et en NaCl respectives de 14 g /l et de 3,43 g /l et une valeur du pH de l'ordre de 5 ont été appliquées. Une activité xylanolytique de 25 U/ml a été obtenue. Cette valeur expérimentale est proche de la valeur théorique calculée ($Y = 28$ U/ml), confirmant ainsi le modèle réalisé au cours de cette optimisation (**Tableau XI**).

Tableau XI : Valeurs optimales des variables étudiées et des réponses prédites et observées pour la production de xylanases par la souche *Jonesia denitrificans* BN13.

Variables en unités courantes			Réponse prédite	Réponse observée
X9	X10	X11	Y (U/ml)	Y (U/ml)
5	14	3,43	28	25

X9 : pH initial du milieu de culture MM7, **X10** : concentration en xylane (g/l), **X11** : concentration en NaCl (g/l) et **Y** : Activité xylanolytique (U/ml).

Les résultats obtenus montrent que les paramètres de culture sélectionnés en l'occurrence les concentrations en xylane et en NaCl et la valeur du pH jouent un rôle important dans la production des xylanases par la souche *Jonesia denitrificans* BN13.

La source de carbone joue un rôle vital dans l'induction de la production de xylanases. Notre travail montre que pour améliorer la production de xylanases par la souche étudiée, la concentration en source de carbone doit être supérieure à la concentration moyenne (14 g/l au lieu de 10 g/l) dans l'intervalle étudié. En effet la souche *penicillium thiersii* ZH-19 présente une activité xylanolytique élevée lorsque la concentration en xylane est de 13,2 g/l (**Cui et al., 2009**). D'autre part des études réalisées par Kumar et collaborateurs en 2013 montrent que la production de xylanases par *Bacillus halodurans* est maximale dans un gradient de concentration en xylane allant de 10 à 15 g/l. Des travaux réalisés sur des cultures d'*Aspergillus fumigatus* (**Vimalashanmugam et Viruthagiri, 2012**) et de *Moellerella wisconsensis* (**Bhagat et al., 2014**) rapportent que

l'optimum de concentration xylane présente des valeurs respectives de 10,7 g/l et 10 g/l . Alors que pour *Penicillium citrinum* (Ghoshal et al., 2011) et *Streptomyces sp.* F 2621 (Tuncer et al., 2004) , les activités xylanolytiques les plus élevées correspondent à des valeurs respectives en concentrations de xylane de 7,5 g/l et de 4 g/l . Les combinaisons entre concentrations en source de carbone et dimensions des particules du substrat, ainsi que l'épaisseur du mycélium pourraient être parmi les facteurs influençant la production de xylanases des actinobactéries. Ainsi *Streptomyces sp.* ESRAA-301097 présente une activité xylanolytique élevée pour une dimension des particules du substrat carboné de 800 µm, alors que l'activité est faible avec des particules de taille plus grande ou plus petite. Dans la même perspective une étude effectuée sur une culture de *Thermomyces lanuginosus* a montré que la faible activité obtenue avec des particules de taille inférieure à 800 µm pourrait être due à l'envahissement du mycélium autour des particules du substrat carboné avec une porosité décroissante de la surface de ce dernier, gênant ainsi la pénétration du mycélium au fond des particules. D'autre part avec de plus grandes dimensions des particules, la saturation de la surface de croissance est réduite et par conséquent la production de xylanases est réduite (El-Gendy et El-Bondkly, 2014).

La concentration en source de NaCl permettant l'amélioration de l'activité xylanolytique de la souche *Jonesia denitrificans* BN13 doit être supérieure à la valeur moyenne (3,43 g/l au lieu de 2,5g/l) dans la gamme des valeurs étudiées. En effet, des travaux réalisés sur une entérobactérie isolée à partir de source thermale *Moellerella wisconsensis* ont montré que le meilleur rendement en xylanases est obtenu avec une concentration de 3 g/l en NaCl (Bhagat et al., 2014) . D'autres études effectuées sur une culture de *Bacillus halodurans* ont montré que l'optimum en source de NaCl pour la production de xylanases se situe dans un intervalle allant de 7 à 8 g/l (Kumar et al., 2013). D'autre part, Mandel et collaborateurs en 2015 rapportent que la production de xylanases par *Bacillus cereus* BSA1 est maximale avec 0,5 g/l de NaCl. Cependant, une souche d'actinobactérie marine *Streptomyces clavuligerus* présente une activité xylanolytique élevée lorsque la salinité est de l'ordre de 30 g/l (Stalin et al., 2012) . En 2015, Gaur et collaborateurs ont montré que l'activité xylanolytique est rehaussée en présence de NaCl, celle-ci peut être due à la modification de conformation structurale de l'enzyme. D'autre part la salinité augmenterait la perméabilité membranaire et de ce fait, renforce l'approvisionnement de la cellule en précurseurs pour la biosynthèse d'enzymes (Strub, 2008).

La production de xylanases dépend du pH du milieu de culture, ainsi dans notre étude , pour augmenter l'activité xylanolytique de la souche *Jonesia denitrificans* BN13 , la valeur optimale du pH doit être inférieure à la valeur moyenne (5 au lieu de 7) dans l'intervalle étudié . Des

résultats identiques ont été obtenus par Isil et Nilufer en 2005 lors de travaux réalisés sur une culture de *Trichoderma harzianum* 1073D3 où le pH optimum pour une meilleure production présente une valeur de 5. D'autres études réalisées sur des cultures de *Streptomyces* sp (Gigi et al., 2010) et de *Streptomyces* sp. FA1 (He et al., 2014) ont montré que l'optimum de pH pour une meilleure activité xylanolytique de ces souches est de l'ordre de 5,5. Dans le même rang s'aligne la moisissure *Aspergillus fumigatus* qui présente un pH optimum de l'ordre de 5,3 (Vimalashanmugam et Viruthagiri, 2012). Cependant, *Penicillium thiersii* ZH-19 (Cui et al., 2009) et *Streptomyces* sp. SU9 (Bajaj et al., 2010) présentent des pH optimaux de production de xylanases respectifs de 7,72 et de 9. Le pH initial du milieu influence grandement l'activité xylanolytique des micro-organismes notamment les actinobactéries en affectant aussi bien le transport membranaire des nutriments que les systèmes enzymatiques. Si le pH du milieu est défavorable, la production de xylanases peut être restreinte par l'inaccessibilité du substrat (Gaur et al., 2015).

Conclusion
&
perspectives

Conclusion et perspectives

Ce travail avait pour principaux objectifs la détermination et l'optimisation des facteurs influençant la production de xylanases par une souche nommée *Jonesia denitrificans* BN13, appartenant à la collection du laboratoire de microbiologie appliquée « LMA » de l'université A/Mira de Bejaia.

Dans cette présente étude, le milieu utilisé pour le suivi de l'activité xylanolytique de la souche est le milieu liquide MM 7 (milieu minimum à pH 7) contenant le xylane d'épeautre et d'avoine comme seule source de carbone.

Dans le but de déterminer les paramètres influençant la production de xylanases par la souche *Jonesia denitrificans* BN13 à savoir : taux d'inoculation, temps d'incubation, pH et température d'incubation, une matrice d'expériences donnée par le plan de Plackett et Burman est appliquée. La modélisation des résultats par le logiciel Minitab 16.0 a permis de sélectionner parmi les variables étudiées, le facteur le plus significatif en l'occurrence le pH.

Afin d'évaluer l'influence et les effets des interactions des facteurs sélectionnés sur l'optimisation de cette production à savoir le pH, les concentrations en xylane et en NaCl, un modèle donné par le plan « Box Behnken » est utilisé. La méthodologie de surface réponse a permis d'obtenir des concentrations optimales en xylane et en NaCl de 14 g/l et 3,43 g/l respectivement et un pH optimum de 5 pour une activité xylanolytique prédite de 28 U/ml.

Le modèle statistique a pu être confirmé en utilisant les conditions optimales obtenues du milieu MM7 et cela par obtention d'une activité xylanolytique expérimentale de l'ordre de 25U/ml proche de la valeur prédite (28 U/ml).

Les résultats obtenus à travers cette étude semblent prometteurs et incitent à poursuivre la recherche dans cette thématique en vue de définir une ligne de conduite pour une application à l'échelle pilote puis industrielle. Toutefois, il ressort de l'intérêt de poursuivre les investigations autour des axes suivants :

- Utiliser des déchets agricoles comme source de carbone, car le xylane d'épeautre et d'avoine et le xylane de bouleau, communément utilisés comme substrats pour la production des xylanases sont coûteux.
- Intégrer le facteur agitation, car selon Boucherba (2011) ce dernier augmente la production de xylanases.

- Déterminer les interactions existantes entre tous les facteurs du milieu de culture MM7 afin de comprendre leurs influences sur la production.
- Déterminer et optimiser d'autres facteurs nutritionnels et culturels tels que : d'autres sources de carbone, sources d'azote, sources d'ions métalliques, agitation, aération ...etc .
- Suivi de l'activité xylanolytique de la souche *Jonesia denitrificans* BN13 dans un fermenteur de 1,5 l et éventuellement dans un fermenteur pilote.

*Références
Bibliographiques*

A

- **Alberton LR, Vandenberghe LP, Assmann R, Fendrich RC et Rodríguez-León J. (2009).** Xylanase production by *Streptomyces viridosporus* T7A in submerged and solid-state fermentation using agro-industrial residues. *Braz arch Biol technol.* **52**, 171-180.
- **Andriambololona T. (2010).** Etudes biologiques et chimiques des métabolites secondaires des actinomycètes telluriques cas: de la forêt d'Ankafobe. Thèse Maître ès-Sciences. Université d'Antananarivo-Madagascar, Faculté des sciences, 6p.
- **Assamoi AA, Destain J et Thonart P. (2009).** Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnol Agron Soc Environ.* **13**(2), 281-294.

B

- **Bailey MJ, Biely P et Poutanen K. (1992).** Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J Biotechnol.* **23**, 257-270.
- **Bajaj B, Razdam K, et Sharma A. (2010).** Thermoactive alkali – stable xylanase production a newly isolated *streptomyces* sp. SU9. *Indian J chem technol.* **17**, 375 - 380.
- **Bajaj BK et Singh NP. (2010).** Production of xylanase from alkalitolerant *Streptomyces* sp.7b under solid-state fermentation, its Purification, and characterization. *Appl Biochem Biotechnol.* **162**, 1804-1818.
- **Battan B, Dhiman S, Ahlawat S, Mahajan R, Sharma J. (2012).** Application of Thermostable Xylanase of *Bacillus pumilus* in textile processing. *Indian J Microbiol.* **52**(2), 222–229.
- **Berens S, Kaspari H et Klemme JH. (1996).** Purification and characterization of two different xylanases from the thermophilic actinomycete *Microtetraspora flexuosa* SIIX. *Antonie van Leeuwenhoek.* **69**, 235-241.
- **Bhagat D, Dudhagara P et Desai P. (2014).** Production and characterization of thermo-alkalitable xylanase from geothermal -spring isolate. *CIBTech J Biotechnol.* **3** (4), 36-45.
- **Boucherba N, Benallaoua S, Copinet E et Duchiron F. (2011).** Production and partial characterization of xylanase produced by *Jonesia denitrificans* isolated in Algerian soil. *Process Biochem.* **46**, 519-525.

- **Boucherba N. (2014).** Characterization of the xylanase produced by *Jonesia denitrificans* BN13. Appl Biochem biotechnol. **172**, 2694- 2705.
- **Boucherba N. (2011).** Production, purification et caractérisation d'une endoxylanase produite par une souche de *Jonesia denitrificans* BN13. Thèse de doctorat. Université Abderrahmane Mira, Faculté des sciences de la nature et de la vie, 133p.
- **Breccia JD, Castro GR, et Baigori MD. (1995).** Screening of xylanolytic bacteria using a color plate method. J Appl Bacteriol. **78**, 469 – 472.

C

- **Cacais A, Silveira F et Filho E. (2001).** Production of xylan-degrading enzymes by a *Trichoderma harzianum* strain. Braz J Microbiol. **32**, 141-143.
- **Chang L, Ding M, Bao L, Chen Y, Zhou J et Lu H. (2011).** Characterization of a bifunctional xylanase/endoglucanase from yak rumen microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol. **90**, 1933–1942.
- **Coman G et Bahrim G. (2011).** Optimization of xylanase production by *Streptomyces* sp. P12-137 using response surface methodology and central composite design. Ann Microbiol. **61**, 773–779.
- **Coman G, Georgescu L et Gabriela B. (2013).** *Streptomyces*. P12-137 endoxylanases characteristics evaluation in order to obtain xylo-oligosaccharides. Rom Biotech Lett. **18**, (2).
- **Cui F et Zhao L. (2012).** Optimization of xylanase production from *Penicillium* sp. WX-Z1 by a two-step statistical strategy: plackett-burman and box-behnken experimental design. Int J Mol Sci. **13**, 10630-10646.
- **Cui F, Li Y, Liu Z, Zhao H, Ping L, Yang Y, Xue Y et Lijiao Y. (2009).** Optimization of fermentation conditions for production of xylanase by a newly isolated strain, *Penicillium thiersii* ZH-19. World J Microbiol Biotechnol. **25**, 721–725.

D

- **Ding CH, Jiang ZQ, Li XT, Li LT et Kusakabe I. (2004).** High activity xylanase production by *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. World J Microb Biotech. **20**, 7–10.

- **Dowarah P, Boruah P, Goswami T et Barkakati P. (2015).** Xylanase production from *Phanerochaete chrysosporium* using response surface methodology and its validation in a bioreactor. *Int J Eng Technol Res.* **3**, 2454-4698.

E

- **El-Gendy M M, El-Bondkly A M. (2014).** Optimization of Solid State Fermentation and Leaching Process Parameters for Improvement Xylanase Production by Endophytic *Streptomyces* sp. ESRAA-301097. *Microbial Biochem Technol.* **6**, 3.
- **Enache M et Kamekura M. (2010).** Hydrolytic enzymes of halophilic microorganisms and their economic values. *ROM J. BIOCHEM.* **47**, 47–59.

F

- **Fry (1988).** Introduction to the growing cell wall. In: *The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis.* Longman Scientific & Technical, Essex, pp. 1-14.

G

- **Garai D et Kumar V. (2013).** Response surface optimization for xylanase with high volumetric productivity by indigenous alkali tolerant *Aspergillus candidus* under submerged cultivation. *3 Biotech.* **3**, 127–136.
- **Gaur R, Tiwari S, Rai P et Srivastava V. (2015).** Isolation, Production, and Characterization of Thermotolerant Xylanase from Solvent Tolerant *Bacillus vallismortis* RSPP-15. *Int J Pol Sci.* **2**, 1-10.
- **Gerois J, Gianotta F, De Buyl E, Garnier B et Frere JM. (2000).** Purification and properties of three endo β -1-4 xylanases produced by *Streptomyces* sp. strain S38. *Enzyme Microb Technol.* **26**, 178-186.
- **Ghoshal G, Kamble A, Shivhare US et Banerjee UC. (2011).** Optimization of culture conditions for the production of xylanase in submerged fermentation by *penicillium citrinum* using response surface methodology. *IJRRAS.* **6**, 132-137.
- **Godin B, Agneessens R, Gofflot S, Lamaudière S, Sinnaeve G, Gerin PA et Delcarte J. (2011).** Revue bibliographique sur les méthodes d'analyse des polysaccharides structuraux des biomasses lignocellulosiques. *Biotechnol Agron Environ.* **15**, 165-182.

Références bibliographiques

- **Goodfellow M. et Williams ST. (1983).** Ecology of Actinomycetes. Ann R Microbiol. **37**, 139-216.
- **Goupy (2006).** Les plans d'expériences. MODULAD. N°34. p80.
- **Goupy J. (2005).** Pratiquer les plans d'expériences. Edition : DUNOD. Paris. p 501-295.
- **Guha S, Bhutty S, Khurana SMP et Kohli UK. (2013).** Optimization of cultural conditions for production of thermo-alkali tolerant xylanase from *Bacillus* sp. Int J Pure App Microbiol .**3**, 116-120.
- **Gupta VK, Gaur R, Gautam N, Yadav SR et Singh N. (2009).** Optimization of xylanase production from free cells of *Fusarium solani* F7. BioResources. **4**, 932-945.

H

- **Harris A et Ramalingam C. (2010).** Xylanases and its Application in Food Industry. J Exp Sci. **1**, 01-11.
- **He J, Su L, Sun X, Fu J, Chen J et Wu J. (2014).** Novel Xylanase from *Streptomyces* sp. FA1: Purification, Characterization, Identification, and Heterologous Expression . Biotechnol Biop Eng .**19**, 8-17.

I

- **Isil S et Nilufer A. (2005).** Investigation of factors affecting xylanase activity from *Trichoderma harzianum* 1073 D3. an. Braz arch biolo technolo. **48**, 187-193.

J

- **Gigi C, Adina C, Gabriela E, Luminita G et Gabriela B. (2010).** Optimization of biosynthesis conditions and catalytic behavior evaluation of cellulase-free xylanase produced by a new *Streptomyces* sp. Strain. Fascicle VI – Food Technol. **35**, 34-44.

K

- **Kim J D. (2005).** Production of xylanolytic enzyme complex from *Aspergillus flavus* using agricultural wastes. *Mycobiol.* **33**, 84-89.
- **Kitouni M. (2007).** Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat. Université Mentouri- Constantine, Faculté des sciences de la nature et de la vie, 6 p.
- **Kohli U, Nigam P, Singh D et Chaudhary K. (2001).** Thermostable, alkalophilic and cellulose free xylanase production by *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C. *Enzyme Microbial Technol.* **28**, 606-610.
- **Krishnaveni M. (2011).** Production and optimization of xylanase from estuarine *Bacillus cereus*. *Int J Pharma Bio Sci.* **2**, 0975- 6299.
- **Kumar L, Kumar D, Nagar S, Gupta R, Garg N, Kuhad RCet Gupta VK. (2014).** Modulation of xylanase production from alkaliphilic *Bacillus pumilus* Vlk-1 through process optimization and temperature shift operation. *3 Biotech.* **4**, 345–356.
- **Kumar V, Syal P et Satyanarayana T. (2013).** Highly thermo–halo–alkali-stable β -1,4-endoxyganase from a novel polyextremophilic strain of *Bacillus halodurans*. *Biopro Biosyst Eng.* **36**, 555–565.

L

- **Lacey J. (1997).** Actinomycete in composts .*Ann Agri Enviro Med*, **4** : 113-121p.
- **Lechevalier M P. (1981).** Ecological associations involving actinomycetes. In:Actinomycetes. Shaal and pulverer (Eds.). *ZbI Bakt Suppl.* **11**, 159-166.
- **Li KC, Azadi P, Collins R, Tolan J, Kim JS et Eriksson KEL (2000).** Relationships between activities of xylanases and xylan structures. *Enzyme Microb Technol.* **27**, 89–94.

M

- **Maheswari MU et Chandra TS. (2000).** Production and potential applications of a xylanase from a new strain of *Streptomyces cuspidosporus*. *World J Microbiol. Biotechnol.* **16**, 257-263.

- **Mandal A, Kar S, Dutta T, Pati BR, Mondal KC et Mohapatra PKD. (2015).** Parametric optimization of submerged fermentation conditions for xylanase production by *Bacillus cereus* BSA1 through Taguchi Methodology. **59**, 189-195.
- **Mc Cann MC et Roberts K. (1991).** Architecture of the primary cell wall in: C. W. Lloyd (ed.), the cytoskeletal basis of plant growth and form, Academic Press, New York, N. Y; pp.109-111.
- **Milagres AMF, Magalhaes PO et Ferraz A. (2005).** Purification and properties of a xylanase from *Ceriporiopsis subvermispora* cultivated on *Pinus taeda*. FEMS Microbiol Lett. **253**, 267–272.
- **Miller GL. (1959).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar Anal. Chem. **31**, 426 – 428.
- **Mirande C. (2009).** Dégradation des fibres pariétales 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 Science de la Vie et de la Santé. 516P.
- **Muthezhilan R, Ashok R et Jayalakshmi S. (2007).** Production and optimization of thermostable alkaline xylanase by *Penicillium oxalicum* in solid state fermentation. Afr J Microbiol Res. 020-028.

N

- **Neves MLC, Silva MF, Souza-Motta CM, Spier MR, Soccol CR, Porto TS, Moreira KA et Porto ALF. (2011).** *Lichtheimia blakesleeana* as a new potential producer of phytase and xylanases. Molécules. **16**, 4807-4817.
- **Ninawe S et Kuhad RC. (2005).** use of xylan-rich cost effective agro-residues in the production of xylanase by *streptomyces cyaneus* SN32. J App Microbiol. **99**, 1141–1148.
- **Nour El-Dein MM, Shereif AEA, Mansour FA, Abou-Dobara MI et Ball AS. (2014).** Optimization of xylanase and peroxidase production from *Streptomyces* sp. K37. J. BioSci Biotech. **3**, 29-42.

O

- **Omura S. (1992).** The search for bioactive compound from microorganisms Springer, Verlag, New York.
- **Ozil P. (1997).** Plans d'expériences : Méthode de taguchi. e.n.s d'électrochimie et d'Electrométallurgie INPG.

P

- **Padilha IQM, Valenzuela SV, Grisi CSL, Diaz P, Araújo DAM, Pastor FIJ. (2014).** A glucuronoxyylan-specific xylanase from a new *Paenibacillus favisporus* strain isolated from tropical soil of Brazil. *Int Microbiol.* **171**, 75-184.
- **Panchanathan M, Jayachandran V et Kim K. (2013).** Marine microbiology: Bioactive compound and Biotechnological Application., Introduction to Marine Actinobacteria. 2p.
- **Peng F, Peng P, Xu F et Sun RC. (2012).** Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnol advan.* **30**, 879 – 903.
- **Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA et Amorim DS (2005).** Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* **67**, 577–591
- **Porsuk İ, Özakin S, Bali B et Yilmaz Eİ. (2013).** A cellulase-free, thermoactive, and alkali xylanase production by terrestrial *Streptomyces* sp. CA24. *Turk J Biol.* **37**, 370 – 375.

R

- **Rawashdeh R, Saadoun I et Mahasneh A. (2005).** Effect of cultural conditions on xylanase production by *Streptomyces* sp. (strain Ib 24D) and its potential to utilize tomato pomace. *Afr J Biotechnol.* **4**, 251-255.
- **Reis S D, Costa MAF et Peralta RM. (2003).** Xylanase production by a wild strain of *Aspergillus nidulans*. *Acta Scientiarum: Biological Sciences.* Maringá. **25**, 221-225.
- **Rocourt J, Wehmeyer U et Stackebrandt E. (1987).** Transfer of *Listeria denitrificans* to a new genus, *Jonesia* gen. nov., as *Jonesia denitrificans* comb. nov. *Int J Syst .Bacteriol.* **37**, 266–270.

- **Ryabova O, Vršanská M, Kaneko S, van Zyl W H et Biely P. (2009).** A novel family of hemicellulolytic α -glucuronidase. *FEBS Lett.* **583**, 1457–1462.
- **Ryu K G et Kim Y G. (1997).** Effects of surfactants of the enzymatic bleaching of kraft pulp by xylanases. *Biotechnol Bioeng.* **2**, 94-96.

S

- **Schumann P, Cui X, Stackebrandt E, Kroppenstedt RM, Xu L et Jiang C . (2004).** *Jonesia quinghaiensis* sp. nov., a new member of the suborder micrococccineae. *Int J System Evol Microbiol.* **54**, 2181-2184.
- **Sepahy A A, Ghazi S et Sepahy MA. (2011).** Cost-Effective Production and Optimization of Alkaline Xylanase by Indigenous *Bacillus mojavensis* AG137 Fermented on Agricultural Waste. SAGE-Hindawi Access to Research Enzyme Research, Article ID 593624.1, 1- 9.
- **Shah AR et Madamwar D. (2005).** Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. *Proc Biochem.* **40**, 1763–71.
- **Sharma M, Mahajan C, Manpreet S. Bhatti et Chadha BS. (2016).** Profiling and production of hemicellulases by thermophilic fungus *Malbranchea flava* and the role of xylanases in improved bioconversion of pretreated lignocellulosics to ethanol. *3 Biotech.* **6**, 30.
- **Sharma P et Bajaj BK (2005).** Production and partial characterization of alkali-tolerant xylanase from an alkali-tolerant xylanase from an *alkalophilic Streptomyces* sp. CD3. *J Sci Indust Resear.* **64**, 688-97.
- **Stalin T, Priya BS et Selvam K. (2012).** Ecofriendly application of cellulase and xylanase producing marine *Streptomyces clavuligerus* as enhancer in biogas production from waste. *Afr J Environ Sci Technol.* **6**, 258-262.
- **Stanescu MD. (2006).** Les biotechnologies dans la protection de l'environnement. Applications dans le domaine textile. scientific study & research. **7**, 1-10.
- **Strub C. (2008).** Modélisation et Optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat. Université de Toulouse, Génie des Procédés et de l'Environnement, 144p.
- **Stutzenberger FJ et Bodine AB (1992).** Xylanase production by *Thermomonospora curvata*. *J Appl Biotechnol.* **72**, 509-511.

- **Sun N, Rahman M, Qin Y, Maxim ML, Rodriguez H et Rogers RD. (2009).** Complete dissolution and partial delignification of wood in the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. *Green Chem.* **11**, 646–655.
- **Suneetha V, Kishore R, Mishra B et Chaubey P. (2011).** An overview of Screening and tentative optimization of microbial xylanase from soil Samples Collected from Chittoor Paper Industry. *Indian J Fund Appl Sci.* **1**, 173-177.

T

- **Techapun C, Charoenrat T, Poosaran N, Watanabe M et Sasaki K. (2002).** Thermostable and alkaline-tolerant cellulase-free xylanase produced by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106. *J Biosci Bioeng.* **93**, 430– 433.
- **Thomas L, Joseph A, Arumugam M et Pandey A. (2013).** Production, purification, characterization and over – expression of xylanases from actinomycete. *India J exp. biol.* **51**, 875-884.
- **Thomas L, Sindhu R, Binod P et Pondy A. (2015).** Production of a cellulase-free alkaline xylanase from *Bacillus pumilus* MTCC 5015 by submerged fermentation and its application in biobleaching. *India J exp biol.* **53**, 356-363.
- **Tuncer M, Kuru A, Isikli M, Sahin N et Celenk FG. (2004).** Optimization of extracellular endoxylanase, endoglucanase and peroxidase production by *streptomyces* sp. F2621 isolated in turkey. *J App Microbiol.* **97**, 783–791.

V

- **Viet DN, Kamio Y, Kaneko J et Izaki K. (1991).** Purification and properties of β -1, 4-xylanase from *Aeromonas caviae* W -61. *Appl Environ Microbiol.* **57**, 445-9.
- **Vimalashanmugam K et Viruthagiri T. (2013).** Optimization of mineral nutrient supplements for the production of xylanase by *Aspergillus niger* under ssf using central composite design . *IJPCBS.* **3**, 615-626.
- **Vimalashanmugam K et Viruthagiri T. (2012).** Response Surface Methodology Optimization Of Process Parameters for Xylanase Production by *Aspergillus fumigatus* in SSF using Central Composite Design . *IJERA .* **2**, 277- 287.

W

- **Walia A, Mehta P, Guleria S et Shirkot CK. (2015).** Improvement for enhanced xylanase production by *Cellulosimicrobium cellulans* CKMX1 using central composite design of response surface methodology . *3 Biotech.* **5**, 1053–1066.

- **Wang SL, Yen YH, Shin IL, Chang AC, Chang WT et Wu WC. (2003).** Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. *Enz Microb Technol.* **33**, 917–25.

X

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

Y

- **Yan Q, Hao S, Jiang Z, Zhai Q et Chen W. (2009).** Properties of a xylanase from *Streptomyces matensis* being suitable for xylooligosaccharides production. *J Mol Catal Enzy.* **58**, 72–7.

Annexes

Annexe I : Matériel utilisé.

- **Bain Marie (Raypa) .**
- **Bain Marie (Julabo tw 12) .**
- **Balance analytique (Scouttmpron) (Ae ADAM AFA – 120LC)**
- **Centrifugeuse (Sigma 2-16K)**
- **Étuves à 30°C ,35°C ,37°Cet 40°C (Memmert) .**
- **Four Pasteur (Raypa) .**
- **PH-mètre (Boeco).**
- **Spectrophotomètre (UV mini 1240 SHIMADZU). .**
- **Vortex (Heidolph Vibramax 100).**

Annexe II : Composition des milieux de culture utilisés en g/l.

Bouillon nutritif (BN)

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

Gélose nutritive (GN)

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

**Milieu de culture liquide MM7 (Milieu minimum à base de xylane, pH 7)
(Viet et *al.*, 1990)**

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

Annexe III: Solutions et tampons préparés.

Solution à base d'acide dinitrosalicylique (DNS).

- ❖ Acide dinitrosalicylique.....10 g.
- ❖ soude16 g.
- ❖ Tartrate de potassium sodique.....300 g.
- ❖ Eau distillée.....qsp.....1L.

La solution est préparée dans l'obscurité puis conservée dans un flacon opaque à température ambiante.

Tampon phosphate sodique 50mM à pH 7 (500 ml) :

- ❖ Na_2HPO_4 à 50mM250 ml.
- ❖ KH_2PO_4 à 50mM.....250 ml.

Solution de xylane 0,5%

- ❖ xylane d'épeautre et d'avoine.....5g.
- ❖ Tampon phosphate sodique 50mM à PH 7..... 1L.

Annexe IV

Tableau III : Tableau d'expérimentation du plan de Plackett-Burman en unités courantes.

Expériences	Variables en unités courantes			
	X1	X2	X3	X4
Expérience 1	4	57	7,5	35
Expérience 2	1	96	4	30
Expérience 3	7	96	11	30
Expérience 4	7	96	4	40
Expérience 5	1	96	11	30
Expérience 6	1	18	11	40
Expérience 7	1	18	4	30
Expérience 8	1	18	4	40
Expérience 9	7	96	4	40
Expérience 10	1	96	11	40
Expérience 11	7	18	11	40
Expérience 12	7	18	4	30
Expérience 13	7	18	11	30

X1 : taux d'inoculation % (v/v), **X2** : temps d'incubation (h), **X3** : pH et **X4** : température d'incubation (°C).

Tableau VII: Tableau d'expérimentation du plan de « Box Behnken » en unités courantes.

Expériences	Variables en unités courantes		
	X9	X10	X11
Expérience 1	5	6	2,5
Expérience 2	7	10	2,5
Expérience 3	5	14	2,5
Expérience 4	7	10	2,5
Expérience 5	7	14	3,5
Expérience 6	5	10	3,5
Expérience 7	7	10	2,5
Expérience 8	5	10	1,5
Expérience 9	9	10	3,5
Expérience 10	9	6	2,5
Expérience 11	7	6	1,5
Expérience 12	7	6	3,5
Expérience 13	9	14	2,5
Expérience 14	9	10	1,5
Expérience 15	7	14	1,5

X9 : pH, X10 : concentration en xylane (g/l) et X11 : concentration en NaCl (g/l) .

Résumé

Les objectifs du présent travail sont la détermination et l'optimisation des paramètres influençant la production de xylanases par la souche *Jonesia denitrificans* BN13 à savoir : taux d'inoculation, temps d'incubation, pH et température d'incubation. Le milieu utilisé pour le suivi de l'activité xylanolytique de la souche est le milieu liquide MM7 contenant le xylane d'épeautre et d'avoine comme seule source de carbone.

Les plans de Plackett et Burman et de « Box -Behnken» sont respectivement utilisés pour la détermination et l'optimisation statistiques des facteurs de production. Les résultats obtenus montrent que le facteur significatif influençant l'activité xylanolytique de la souche étudiée est le pH. Les valeurs optimales des variables étudiées sont déterminées par les surfaces de réponse obtenue par la méthodologie de surface réponse. Ainsi les concentrations optimales en xylane et en NaCl sont respectivement de 14 g/l et de 3,43 g/l, alors que la valeur du pH est de l'ordre de 5.

L'activité xylanolytique expérimentale obtenue (25 U/ml) est proche de celle prédite (28 U/ml) confirmant la validité du modèle.

Mots clés : *Jonesia denitrificans* BN13, xylanases, xylane d'épeautre et d'avoine, optimisation, plan de Plackett et Burman, méthodologie de surface réponse (RSM).

Abstract

The aims of the present work are the determination and the optimization of the influencing factors production of *Jonesia denitrificans* BN13 xylanases to know: inoculation rate, incubation time, pH and incubation temperature. The xylanolytic activity of the strain is studied on MM7 culture medium containing the oat spelt xylan as the only source of carbon.

The Plackett - Burman and « Box -Behnken» designs are used respectively for the determination and optimization statistics of the production factors. The obtained results show that the meaningful factor influencing the xylanolytic activity of the studied strain is the pH. The optimal values of the studied variables are determined by the response surface gotten by the response surface methodology. So the optimal concentrations of xylan, NaCl are respectively 14 g/l and 3,43 g/l, whereas the value of pH is the order of 5.

The gotten experimental xylanolytic activity (25 U/ml) is close to the predicted one (28U/ml) confirming the validity of the model.

keys words : *Jonesia denitrificans* BN13, xylanases, oat spelt xylan, optimization, Plackett and Burman design, response surface methodology (RSM).

