الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية العلوم والطبيعة و الحياة

Université Ferhat Abbes, Sétif 1
Faculté des Sciences
de la Nature et de la Vie

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°……./SNV/2024

THÈSE

Présentée par

SAHNOUN Sara

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT 3ÈME CYCLE

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : MICROBIOLOGIE GENERALE

THÈME

Production de biomolécules actives par des microorganismes isolés de milieux extrêmes

Soutenue publiquement le 06/02/2025

DEVANT LE JURY

Président	**MEZAACHE Samia**	**Pr. UFA Sétif 1**
Directeur	**YAHIAOUI Bilal**	**Pr. UFA Sétif 1**
Co-Directeur	**BENLOUNISSI Aicha**	**Pr. ENSB Constantine**
Examinateurs	**ROUAG Noureddine**	**Pr. UFA Sétif 1**
	HAMIDECHI Md Abdelhafid	**Pr. UAL Khenchela**

Laboratoire de Microbiologie Appliquée

Remerciement

J'exprime mes gratitude dans un premier temps, à l'Eternel notre « **Dieu** » pour la santé, la volonté, le courage, la patience, et la force qu'il ne cesse de nous combler pour réussir à réaliser ce travail.

Mes sincères remerciements vont aux **membres du jury** pour avoir accepté de faire partie de notre jury malgré vos multiples occupations, J'adresse mes remerciements particulièrement à Mme. **MEZAACHE Samia** 'Professeurs de Microbiologie à l'Université Ferhat Abbas – Sétif 1' de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de soutenance, veuillez accepter mes hautes considérations.

Je remercie également, Mr **ROUAG Noureddine** 'Professeurs de Microbiologie à l'Université Ferhat Abbas – Sétif 1', et Mr **HAMIDECHI Mohamed Abdelhafid** 'Professeur de Microbiolologie à l'Université de Mentouri – Constantine 1', qui m'ont fait l'honneur d'examiner mon travail.

Tout travail est perfectible et n'est jamais le fruit d'une seule personne, ce mémoire est le résultat des efforts fournis par plusieurs personnes, grâce à eux, j'ai pu avoir une base de travail solide sur laquelle j'ai pu m'appuyer pour réaliser ma démarche de recherche et que je ne pourrai pas oublier de remercier.

En guise de reconnaissance, je tiens à remercier, très sincèrement Mr, **YAHIAOUI Bilal** 'professeur à l'université de Sétif 1', je témoigne ma vive reconnaissance pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, de m'encadrer, et de guider cette étude avec son ouverture d'esprit, et son enthousiasme, j'ai eu l'honneur et la chance de bénéficier de ses connaissances et compétences. Je lui remercie pour sa gentillesse et spontanéité avec lesquelles il a dirigé ce travail, ainsi que pour le dévouement manifesté malgré toutes ses occupations, le fait d'être toujours montré à l'écoute ainsi que sa rigueur scientifique impose l'estime et le respect, et pour qu'il a accepté de m'accompagner, dans des circonstances difficiles, afin que je puisse enfin relever ce défi stimulant.

Mes remerciements s'adressent particulièrement au Mme **BENLOUNISSI Aicha** 'Docteur à l'école nationale supérieur de biotechnologie (ENSB)', pour son encadrement de qualité, sa motivation professionnelle, ses conseils et critiques constructives, ses corrections, sa gentillesse et sa patience ainsi pour le temps qu'il a consacré à la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier Mme **LARIBI-HABCHI Hassiba** 'Professeur à l'université de Blida', qui n'a pas hésité à m'encourager, me motiver sur ce sujet, pour son soutien inconditionnel, son exigence, et pour m'avoir communiqué sa passion pour la recherche.

Mes remerciements s'adressent également à Mr **MOUFFEK Abdenacer** 'Docteur à l'université de Sétif 1', qui n'a jamais hésité à fournir son aide, ses précieux conseils, son expertise dans le domaine des statistiques.

Enfin, à tous ceux qui, de loin ou de près, ont participé à la réalisation de ce travail trouvent ici l'expression de ma sincère gratitude.

Dédicace

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, et leur soutien

A mes chers frères et ma sœur

A mon très cher époux : Youcef

A mes chères filles : Soundous et Maria

A tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer …..

Production scientifique

Sahnoun, S., Yahiaoui, B., Benlounissi, A., Mouffok, A., Ernst, B., Alam, M., Houali, K., & Benguerba, Y. (2024). Enhancing the efficiency and functionality of xylanase from *Bacillus sp.* RTS11: Optimization, purification, characterization, and prospects in kraft pulp bleaching. *Cellular and molecular biology*, *70*(1), 67–79. DOI: 10.14715/cmb/2024.70.1.10

Table des matières

ملخص ……. **I**

Résumé…… **II**

Abstract…… **III**

Abréviations……. **IV**

Liste des figures……... **V**

Liste des tableaux…… **VI**

Introduction…….. **1**

Synthèse bibliographique

1. Milieu extrême ……... **5**
2. Les extrêmophiles ……. **5**
3. Désert ……. **6**
4. Les conditions physicochimiques limitant la vie microbienne dans les déserts…….. **7**

4.1. Nutriments…… **7**

4.2. Végétation……. **8**

4.3. Précipitations …… **8**

4.4. Température ……. **9**

4.5. Vent……..... **9**

4.6. Salinité et pH…….. **9**

4.7. Irradiation…….. **10**

5. Microorganismes de désert…… **11**

6. Enzymes et leurs applications……. **12**

6. 1. Xylanases…….. **15**

6. 1. 1. Le substrat: xylane…….. **15**

6.1.2. Différents types de xylane…… **17**

6.1.2.1. Homoxylane……. **17**

6.1.2.2. Arabinoxylane ……. **17**

6.1.2.3. Glucuronoxylane……. **17**

6.1.2.4. Glucuronoarabinoxylane……. **17**

6.1.2.5. Galactoglucuronoarabinoxylane……. **18**

6.1.2.6. Hétéroxylanes……. **18**

6.1.3. Le complexe xylanolytique…… **18**

6.1.3.1. Endo-b-1,4-xylanases…….. **19**

6.1.3.2. Les β-xylosidases……. **19**
6.1.3.3. Les α-arabinofuranosidase……... **19**
6.1.3.4. Les α-glucuronidases……... **19**
6.1.3.5. Les estérases……. **20**
6.1.4. Action synergique entre les différentes xylanases……. **20**
6.1.4.1. Homéosynergie……... **21**
6.1.4.2. Hétérosynergie…….. **21**
6.1.5. Microorganismes xylanolytique…….. **21**
6.1.5.1. La xylanase bactérienne…… **22**
6.1.5.2. La xylanase fongique…… **23**
6.1.6. Régulation de la synthèse de la xylanase……. **25**
6.1.7. Classification des xylanases……... **26**
6.1.7.1. En fonction des propriétés catalytiques et physico-chimiques……. **26**
6.1.7.2. En fonction des produits d'hydrolyse……. **26**
6.1.7.3. En fonction de spécifité enzymatique…….. **27**
6.1.7.4. En fonction de l'homologie de séquence en acides aminés…… **27**
6.1.8. Application……. **28**
6.1.8.1. Industrie du papier……... **28**
6.1.8.2. Transformation des aliments pour animaux……. **28**
6.1.8.3. L'industrie alimentaire, la boulangerie et la brasserie…… **29**
6.1.8.4. Les industries pharmaceutiques…….. **29**
6.1.8.5. Production de biocarburants…… **29**
6.1.8.6. Traitement des textiles……. **29**
6. 2. Chitinases ……. **31**
6. 2. 1. La chitine……. **31**
6. 2. 2. Enzymes chitinolytiques……..…… **32**
6. 2. 2. 1 . Endochitinase……..…… **33**
6. 2. 2. 2 . Exochitinases……..……. **33**
6. 2. 3. Source de chitinase…….. **34**
6. 2. 3.1. La chitinase végétale……. **34**
6. 2. 3.2. La chitinase chez les insectes…….. **34**
6.2.3.3. La chitinase microbienne……. **34**
6.2.4. Classification des chitinases……... **39**

6.2.4.1. Classification basée sur l'action de l'enzyme…….. **39**
6.2.4.2. Classification basée sur la séquence d'acides aminés…….. **39**
6.2.5. Application…….. **40**
6.2.5.1. Production de protéine unicellulaire…… **40**
6.2.5.2. Isolement des protoplastes……... **40**
6.2.5.3. Gestion des déchets……. **40**
6. 2. 5. 4. Lutte contre les champignons phytopathogènes et les moustiques……... **41**
6.2.5.5. Fonctions médicinales…….. **41**

Matériels et méthodes

1. Echantillonnage……... **43**
1.1. Description des sites étudiés…… **43**
1.2. Origine des échantillons prélevés……. **43**
2. Isolement des souches…… **45**
2.1. Milieux d'isolement…….. **45**
2.2. Prétraitements des échantillons…….. **45**
2.2.1. Traitement par le phénol……. **45**
2.2.2. Chauffage à sec…… **45**
2.2.3. Méthode du filtre à membrane……. **45**
2.3. Technique d'isolement et conditions d'incubation…… **46**
3. Dénombrement, purification, conservation, et caractérisation morphologique…. des isolats **46**
3.1. Dénombrement…….. **46**
3.2. Purification…… **46**
3.3. Conservation des isolats…….. **46**
3.4. Caractérisation morphologique des isolats……... **47**
4. Criblage pour les producteurs d'enzymes dégradant les glucides…….. **47**
5. Conditions de croissance optimales…… **48**
6. Extraction d'ADN et identification des isolats SRIT8 et RTS11……... **48**
6.1. Extraction de l'ADN génomique…….. **48**
6.2. Amplification du gène ARNr 16S par PCR……. **49**
6.3. Séquençage du gène ARNr 16S…… **49**
6.4. Analyse des séquences……. **49**
7. Etude des activités enzymatiques……... **50**

7.1. L'activité chitinolytique…… **50**
7.1.1. Screening quantitatif…….. **50**
7.1.2. Dosage de l'activité chitinase…… **50**
7.1.3. Estimation des protéines…… **51**
7.1.4. Dosage des sucres totaux…….. **51**
7.1.5. Effet des sources de carbone sur la production de chitinase……. **52**
7.1.5.1. Préparation de la chitine colloïdale…… **52**
7.1.5.2. Préparation de la chitine gonflée…….. **52**
7.1.6. Optimisation statistique de la production de chitinase…….. **52**
7.1.6.1. Plackett-Burman…… **53**
7.1.6.2. Box-Behnken…….. **54**
7.1.7. Production de chitinase en fermentation immergée…….. **55**
7.1.7.1. Préparation d'inoculum…… **55**
7.1.7.2. Effet de temps d'incubation sur la production de la chitinase…… **55**
7.1.7.3. Production de la chitinase…… **55**
7.1.8. Purification enzymatique…….. **56**
7.1.8.1. Précipitation des protéines…….. **56**
7.1.8.2. Chromatographie par filtration sur gel (Sephadex G-50)…… **57**
7.1.8.3. Chromatographie d'échange d'anions…… **57**
7.1.8.4. Détermination de la masse moléculaire……. **57**
7.1.9. Analyse biochimique de la chitinase purifiée…… **58**
7.1.9.1. Effets du pH sur l'activité et la stabilité de la chitinase…… **58**
7.1.9.2. Effets de la température sur l'activité de la chitinase…… **58**
7.1.9.3. Effet de certains activateurs et inhibiteurs sur l'activité de la chitinase…… **58**
7.1.10. Détermination de la spécifité du substrat……. **59**
7.1.11. Application enzymatique……. **59**
7.1.11.1. Évaluation de l'activité antagoniste de *Bacillus* sp. SRIT8…….. **59**
7.1.11.2. Effet de l'extrait brut sur la croissance des champignons…… **60**
7.1.11.3. Inhibition de la croissance fongique par la chitinase purifiée……... **60**
7.1.11.4. Protection de grains de blé par la chitinase purifiée……. **60**
7.1.11.5. Traitement de la fusariose sur la pomme de terre par la chitinase purifiée……... **61**
7.1.11.6. L'activité insecticide de la chitinase contre le charançon de blé *Sitophilus granarius* Linnaeus….. **61**

7.2. Xylanase……... **62**
7.2.1. Estimation de l'activité xylanasique dans différents bouillon de culture…….. **62**
7.2.2. Dosage de la xylanase……... **62**
7.2.3. Estimation de l'activité xylanase sans cellulase…… **63**
7.2.4. Estimation de la biomasse……. **63**
7.2.5. Effet de certains mono et polysaccharides sur la production de xylanase……. **63**
7.2.6. Effet des sources d'azote sur l'activité de la xylanase…….. **63**
7.2.7. Effet de différents additifs sur l'activité de la xylanase…… **63**
7.2.8. Optimisation statistique de la production de la xylanase……. **64**
7.2.8.1. Plan expérimental de Plackett-Burman……. **64**
7.2.8.2. Conception expérimentale de Box-Behnken……. **64**
7.2.9. Evolution temporelle et cinétique de croissance et de production de xylanase…… **65**
7.2.10. Purification enzymatique…… **65**
7.2.10.1. TPP…….. **65**
7.2.10.2. Méthode chromatographique…….. **66**
7.2.10.3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante SDS-PAGE.. **67**
7.2.11. Analyse biochimique de la xylanase purifiée…….. **67**
7.2.11.1. Effets du pH sur l'activité et la stabilité de la xylanase……. **67**
7.2.11.2. Effets de Température sur l'activité et la stabilité de la xylanase…… **67**
7.2.11.3. Effet de certains activateurs et inhibiteurs sur l'activité de la xylanase…… **67**
7.2.12. Détermination de la spécifité du substrat…… **68**
7.2.13. Application de xylanase……... **68**
7.2.13.1. Blanchiment de pate a papier…… **68**
7.2.13.2. Hydrolyse des résidus agro-industriels……. **69**
7.2.14. Analyse statistique…… **69**

Résultats et discussion

1. Isolement, purification et sélection des souches ……...…… **70**
1.1. Dénombrement…….. **70**
1. 2. Isolements des actinomycètes……... **71**
1. 3. Effet des prétraitements…… **73**
2. Criblage d'isolats producteurs des enzymes hydrolytiques…….. **73**
3. La chitinase……... **78**
3.1. Identification moléculaire de la souche SRIT8…….. **80**

3.2. Tolérance de SRTI8 à différentes conditions physiologiques (NaCl, pH, température)... **80**
3.3. Sélection de la source de carbone pour la production de chitinase…….. **81**
3.4. Optimisation statistiques des conditions de culture pour la production de chitinase…... **82**
par *Bacillus* sp. SRTI8
3.4.1. Criblage de variables significatives à l'aide du plan de Plackett-Burman……. **82**
3.4.2. Box - Behnken design …….. **85**
3.4.2.1. Modèle 1……. **86**
3.4.2.2. Modèle 2…… **90**
3.4.2. 3. Modèle 3…… **94**
3.4.2.4. Modèle 4 ……. **97**
3.5. Etude de la cinétique de croissance et de production de chitinase par la souche SRIT8... **101**
cultivée sur milieu optimisé
3.6. Purification enzymatique…….. **104**
3.6.1. Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium et l'acétone…….. **104**
3.6.2. Purification par chromatographie d'exclusion moléculaire…….. **105**
3.6.3. Purification par chromatographie échangeuse d'anions…….. **106**
3.6.4. Rendement de purification…… **108**
3.6.5. Contrôle de la pureté de l'enzyme purifiée par SDS-PAGE……. **108**
3.7. Caractérisation biochimique de la chitinase purifiée…… **109**
3.7.1. Influence du pH sur l'activité et la stabilité de la chitinase……... **109**
3.7.2. Effets de la température sur l'activité et la stabilité de la chitinase…….. **111**
3.7.3. Effets des ions métalliques sur l'activité de la chitinase……. **112**
3.7.4. Effets des solvants organiques et des détergents sur l'activité de la chitinase…….. **113**
3.8. La spécifité du substrats…… **114**
3.9. Potentiel de l'activité fongicide de *Bacillus sp.* SRTI8…… **115**
3.10. Effet du filtrat brut sur la croissance mycélienne en milieu liquide……... **116**
3.11. Le rôle antifongique de la chitinase purifiée dans le biocontrôle de *F. graminearum*... **117**
3.12. Application de la chitinase pour prévenir les infections fongiques chez les grains….. **119**
de blé
3.13. Traitement de la fusariose sur les tubercules de pomme de terre……... **121**
3.14. Le potentiel bioinsecticide de la chitinase purifiée…….. **123**
4. Xylanase…….. **125**
4.1. Criblage qualitatif des bactéries productrices de xylanase…… **125**

4.2. Estimation de l'activité xylanase dans les différents milieux de fermentation…… **125**
4.3. Identification moléculaire……. **126**
4.4. Capacité de tolérance de l'isolat RTS11 à différents conditions physiologiques (NaCl, pH, température) …… **127**
4.5. L'effet de certains sucres comme inducteurs / répresseurs……. **127**
4.6. Effet des sources d'azote sur l'activité de la xylanase…….. **128**
4.7. Effet de différents additifs……. **129**
4.8. Optimisation statistique …… **130**
4.8.1. Criblage de variables significatives à l'aide du plan de Plackett-Burman…….. **130**
4.8.2. Optimisation statistiques des facteurs affectant la production de la xylanase par le plan de Box Behnken…… **132** **132**
4.9. Cinétique de croissance et de production de xylanase par *Bacillus sp.* RTS11…… **138**
4.10. Estimation de l'activité xylanase sans cellulase…….. **139**
4.11.3. Purification enzymatique…….. **140**
4.11.1. Purification par la méthode de TPP……. **140**
4.11.1.1. Optimisation de la concentration de sulfate d'ammonium…… **141**
4.11.1.2. Optimisation de *t*-butanol…….. **141**
4.11.1.3. Optimisation de pH…… **142**
4.11.2. Purification par le protocole chromatographique ……... **143**
4.12. Caractérisation biochimique de la xylanase purifiée…….. **146**
4.12.1. Effet de pH sur l'activité et la stabilité de xylanase……. **146**
4.12.2. Effet de la température sur l'activité et la stabilité de la xylanase……. **147**
4.12.3. Effet des ions métalliques sur l'activité de la xylanase……... **148**
4.13. Spécificité de substrat……. **149**
4.14. Application de la xylanase purifiée……. **149**
4.14.1. Bioblanchiment de la pâte à papier…… **149**
4.14.2. Capacités hydrolytiques de la xylanase purifiée……. **152**
Conclusion……..... **154**
Références bibliographiques…….. **155**

الملخص

من خلال بحثنا هذا تمت معالجة عينات من الرمال و الصخور ما خوذة من الصحراء الجزائرية فقد تم الحصول على 120 سلالة بكتيرية. بعد ذلك تم تحليل هذه السلالات لتقييم أنشطتها الإنزيمية من الكيتيناز والكزيلاناز. ثم تم فرزها وفقًا لقدرتها الإنزيمية من أجل اختيار من هي أكثر كفاءة. تم إختيار سلالتين و تحديد هويتهما من خلال تحليل التسلسل الجزئي للحمض النووي الريبي. السلالة الأولى، المسماة SRIT8 مشابهة بنسبة 98% ل *Bacillus amylolequifaciens* واستخدمت لإنتاج إنزيم الكيتيناز ولتعزيز نشاطها، تم تنفيذ الفحص الإحصائي وخطط التحسين Plackett-Burman و Box-Behnken لتحسين إنتاج الإنزيم. وقد مكّن ذلك من زيادة تخليق الإنزيم إلى الحد الأقصى، مما أدى إلى زيادة ملحوظة في النشاط من 2.36 إلى 112 وحدة. تم عزل الكيتيناز الذي تم إنتاجه باستعمال الكروماتوغرافيا الأيونية، و تم الكشف عن شريط بروتين واحد يبلغ حوالي 31 كيلو دالتون عن طريق الرحلان الكهربائي الهلامي متعدد الأكريلاميد المحتوي على دوديسولفات الصوديوم. تم تسجيل النشاط الأمثل عند درجة حموضة 5 و 40 درجة مئوية. اختُبر النشاط المضاد للفطريات لأنزيم الكيتيناز ضد *Fusarium graminearum*, فقلل الانزيم من نمو الفطريات على وسط وعلى درنات البطاطس. بالإضافة إلى ذلك، كان الإنزيم قادرًا على تقليل الإصابات الفطرية على حبوب القمح خلال عملية الإنبات. كما أثبت الإنزيم أيضًا فعاليته كمبيد حشري حيوي، مما أدى إلى نفوق 52% من حشرة *Sitophilus granarius* Linnaeus ، وهي نوع من الآفات الحشرية للحبوب المخزنة. السلالة الثانية التي تحمل اسم ، وهي سلالة محللة للإكزيلاناز بنسبة 98.69% مشابهة ل *Bacillus pumilus* . استغللنا أيضًا تقنيات التحسين الإحصائي التي أدت إلى إنشاء وسط مثالي أدى إلى زيادة إنتاج إكزيلاناز من 146 وحدة إلى 448.89 وحدة. أثبتت تقنية التقسيم ثلاثي الأطوار أنها غير كافية لتنقية الإنزيم، في حين تم تحقيق تنقية فعالة عن طريق كروماتوغرافيا تبادل الأنيون التي أدت إلى نقاء الإنزيم بكتلة جزيئية تبلغ 60 كيلو دالتون. يبلغ الحد الأقصى لمستوى نشاط إنزيم ال إكزيلاناز عند درجة حرارة 60 درجة مئوية و9 درجة حموضة. وقد تم استخدام إنزيما الإكزيلاناز المنقى كعامل غسيل حيوي لللب، حيث تؤدي جرعة 20 وحدة من الإنزيم لكل جرام من اللب إلى إطلاق المركبات الفينولية والكروموفورات، مع انخفاض محتوى اللب من السكر. كما أثبت الزيلاناز أيضًا أنه عامل معالجة حيوية، حيث يعمل على تحلل مجموعة متنوعة من المخلفات الزراعية الصناعية بشكل فعال، بما في ذلك نخالة القمح والذرة ومخلفات الذرة والعنب وقش القمح وتفل قصب السكر

الكلمات المفتاحية:

الكيتيناز، الإكزيلاناز *Bacillus sp.* ، التحسين الإحصائي، عامل المكافحة الحيوية، الغسل الحيوي للباب الورق، إعادة تدوير المخلفات الزراعية

Résumé

Des échantillons de sables et de pierres prélevés dans le désert algérien ont été exploités pour isoler 120 souches bactériennes, qui ont ensuite été soumises à un criblage enzymatique afin d'évaluer leurs activités chitinolytiques et xylanolytiques. Les souches ont été triées en fonction de leur potentiel enzymatique afin de sélectionner les plus performantes. Deux souches ont été retenues, et leur identité a été établie par l'analyse de la séquence partielle de l'ARNr 16S. La première souche, désignée SRIT8, présentait une similitude de 98% avec *Bacillus amylolequifaciens*, elle a été utilisée pour produire la chitinase. Afin de renforcer son activité, des plans statistiques de criblage et d'optimisation de Plackett-Burman et Box-Behnken ont été mis en œuvre, ils ont permis de maximiser le rendement enzymatique, aboutissant à une augmentation remarquable de l'activité allant de 2,36 U à 112 U. La chitinase ainsi produite a été purifiée par chromatographie échangeuse d'anions, révélant une bande protéique unique de masse moléculaire estimée à 31 kDa, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. L'activité optimale de la chitinase purifiée a été enregistrée à pH 5 et 40°C. L'activité antifongique de la chitinase a été testée, *in vitro* contre l'agent phytopathogène *Fusarium graminearum* sur le milieu PDA et sur les tubercules de pomme de terre, l'enzyme a réduit la croissance mycélienne du champignon sur le milieu PDA ainsi que le développement de la pourriture sèche fusarienne sur les tubercules de pomme de terre. En outre, l'enzyme permettrait de minimiser les infections fongiques sur les grains de blé tout au long du processus de germination. L'enzyme s'est également révélée efficace en tant que bioinsecticide, en entraînant une mortalité de 52% de *Sitophilus granarius* Linnaeus, une espèce d'insecte ravageur des céréales stockées. La seconde souche, nommée RTS11, une souche xylanolytique similaire à 98,69% à *Bacillus pumilus*. Les plans d'optimisation statistique ont permis de créer un milieu optimal faisant passer la production xylanasique de 146 U à 448,89 U. La technique de partitionnement en trois phases s'est avérée insuffisante pour purifier l'enzyme, contrairement à la chromatographie d'échange d'anions, qui a permis de purifier efficacement l'enzyme et de faire apparaître une seule bande d'une masse moléculaire de 60 kDa sur le gel de polyacrylamide. La xylanase est plus active à un pH 9 et à 60°C. La xylanase purifiée a été testée en tant qu'agent de bioblanchiment de la pâte, une dose de 20 U de xylanase par gramme de pâte entraînant la libération de composés phénoliques et de chromophores, ainsi qu'une réduction de la teneur en sucre de la pâte. Notre xylanase s'est également révélée être un agent de bioremédiation, dégradant efficacement une variété de résidus agro-industriels, y compris le son de blé, les déchets de maïs et de raisin, la paille de blé et la bagasse de canne à sucre.

Mots clés : Chitinase, Xylanase, *Bacillus sp*, Optimisation statistique, Agent de lutte biologique, Bioblanchiment de la pâte à papier, Recyclage des résidus d'agricoles.

Summary

Samples of sand and stones taken from the Algerian desert were processed to obtain 120 bacterial strains. These strains were then analysed to assess their chitinase and xylanase enzymatic activities. They were then sorted according to their enzymatic potential in order to select the most efficient. Two strains were selected, and their identity was established by analysis of the partial 16S rRNA sequence. The first strain, designated SRIT8, was 98 % similar to *Bacillus amylolequifaciens* and was used to produce chitinase. In order to enhance its activity, statistical screening and Plackett-Burman and Box-Behnken optimization schemes were implemented to optimize enzyme production. This enabled the synthesis of the enzyme to be maximized, resulting in a remarkable increase in activity from 2.36 U to 112 U. The chitinase thus produced was purified by anion exchange chromatography, revealing a single protein band of around 31 kDa, by sodium dodecysulphate-containing polyacrylamide gel electrophoresis. Optimal activity was recorded at pH 5 and 40°C. The antifungal activity of purified chitinase was tested in vitro against *Fusarium graminearum*, reducing its growth on PDA medium and delaying the development of Fusarium dry rot on potato tubers. In addition, the enzyme was able to minimize fungal infections on wheat grains throughout the germination process. The enzyme also proved effective as a bioinsecticide, resulting in 52% mortality of *Sitophilus granarius* Linnaeus, a species of insect pest of stored cereals. The second strain, named RTS11, a xylanolytic strain 98.69 % similar to *Bacillus pumilus*. We also exploited statistical optimization techniques, which led to the creation of an optimal medium that increased xylanase production from 146 U to 448.89 U. The three-phase partitioning technique proved insufficient to purify the enzyme, whereas efficient purification was achieved by anion exchange chromatography, which led to the purity of the enzyme with a molecular mass of 60 kDa. Xylanase has a maximum level of activity at a temperature of 60°C and a pH of 9. Xylanase has a maximum level of activity at a temperature of 60°C and a pH of 9. Purified xylanase has been used as a biobleaching agent for pulp, with a dose of 20 U of xylanase per gram of pulp resulting in a release of phenolic compounds and chromophores, with a reduction in the sugar content of the pulp. Our xylanase also proved to be a bioremediation agent, effectively degrading a variety of agro-industrial residues, including wheat bran, maize and grape waste, wheat straw and sugar cane bagasse.

Key words: Chitinase, Xylanase, *Bacillus sp.*, Statistical optimization, Biocontrol agent, Biobleaching of paper pulp, Recycling of agricultural residues.

Liste des abréviations

RTS11: Bacteria number **11** isolated from **T**amanrasset **R**ock on **S**tarch casein agar

SRIT8 : Bacteria number **8** isolated from the **R**hizosphere Soil, Illizi region, **T**SA agar

MPa : Le mégapascal (unité de pression)

ANOVA: Analysis of Variance

F : test de Fisher

P : probabilité

R^2: coefficient de détermination

CV : coefficient de variation

M : Masse molaire

rpm : rotation par minute

DNS : 3,5-dinitrosalicylic acid

PEG : polyéthylène glycol

PBD : Plackett-Burman Design

CTAB : Le bromure de cétyltriméthylammonium

Tw : Tween

CMC : Carboxyméthylcellulose

SH : Le groupe sulfhydryle

DEAE : Diéthylaminoéthyle

GH : Glycoside hydrolase

KDa : Kilodalton

NCBI : National Center for Biotechnology

PCR : Polymerase Chain Reaction

TPP : Three Phase Partitioning

kDa : kilodalton

UI : Unité Internationale

DO : Densité optique

Tris-HCl : Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane chlorhydrate

UFC: Unité Formant Colonie

PDA : potato dextrose agar

BLAST : Basi Local Alignement Search Tool

SCP : Single Cell Protein

Liste des tableaux

Page

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Tableau 1. Exemples d'enzymes d'intérêt industriel, et leurs applications dans les différentes industries. **14**

Tableau 2. Micro-organismes producteurs de xylanases. **24**

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

Tableau 3. Répartition géographique des sites de prélèvement. **43**

Tableau 4. Les différents types d'échantillons prélevés sur les différents sites **45**

Tableau 5. Les valeurs des variables expérimentales utilisées dans le plan de Plackett-Burman pour la production de chitinase par *Bacillus sp.* SRIT8. **54**

Tableau 6. Les valeurs codées pour les quatre modèles testés pour la production de chitinase par *Bacillus sp.* SRIT8, en utilisant le plan de Box-Behnken. **54**

Tableau 7. Composition des bouillons de culture utilisés pour tester l'activité de la xylanase. **62**

Tableau 8. Modèle de Plackett-Burman concernant la production de xylanase par la souche RTS11. **64**

Tableau 9. Niveaux des variables sélectionnées dans l'expérience de Box-Behnken pour optimiser la production de xylanase **65**

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Tableau 10. Quantification des souches bactériennes récupérées à partir de différents échantillons. **70**

Tableau 11. Croissance de l'isolat SRIT8 à différentes températures, pH, et NaCl. **81**

Tableau 12. Matrice de conception de Plackett-Burman et les résultats correspondants à la production de chitinase. **83**

Tableau 13. ANOVA pour le plan de Plackett-Burman destiné à la production de chitinase. **84**

Tableau 14. Matrice de conception expérimentale et résultats de Box-Behnken (modèle 1). **86**

Tableau 15. ANOVA pour le plan de Box-Behnken afin d'optimiser la production de chitinase (modèle 1). **87**

Tableau 16. Matrice du plan Box-Behnken avec les valeurs expérimentales et prédites pour la production de chitinase (modèle 2). **91**

Tableau 17. Analyse de variance (ANOVA) concernant la production de chitinase (modèle 2). **91**

Tableau 18. Plan d'expérience de Box behnken avec réponse de l'activité chitinase (modèle 3). **94**

Tableau 19. Analyse statistique du plan de Box-Behnken et signification des facteurs et de leurs interactions (modèle 3). **95**

Tableau 20. Matrice du plan expérimental de Box-Behnken avec les valeurs expérimentales et prédites (Modèle 4). **98**

Tableau 21. Analyse de variance pour la production de chitinase par *Bacillus sp.* SRIT8 (Modèle 4). **98**

Tableau 22. Activité chitinase récupérée après les différents niveaux d'optimisation statistique **101**

Tableau 23. Rendement de purification de la chitinase produite par *Bacillus sp.* SRIT8. **108**

Tableau 24. Spécificité relative de la chitinase vis-à-vis de différents substrats. **115**

Tableau 25. Effet du filtrat brut de la souche de *Bacillus sp.* SRIT8 sur la croissance mycélienne de *F. graminearum* et *A. alternata* en milieu liquide. **117**

Tableau 26. Effet de différents niveaux de pH, T°, NaCl sur la croissance de *Bacillus sp*. RTS11. **127**

Tableau 27. Matrice de conception expérimentale de Plackett-Burman pour le criblage des facteurs affectant la production de xylanase par *Bacillus sp*. RTS11. **131**

Tableau 28 . ANOVA pour la conception de Plackett-Burman pour l'activité xylanase. **132**

Tableau 29. Matrice de conception de Box-Behnken avec les valeurs expérimentales et prédites de l'activité xylanase. **133**

Tableau 30. Analyse de la variance pour le plan de Box-Behnken relatif à l'activité de la xylanase. **134**

Tableau 31. Optimisation de la concentration de sulfate d'ammonium pour la purification de la xylanase par la méthode de TPP. **141**

Tableau 32. Optimisation du rapport extrait brut:t-butanol utilisé dans la méthode TPP. **141**

Tableau 33. Optimisation de pH pour la purification de la xylanase par la méthode de TPP. **142**

Tableau 34. Rendement de purification de la xylanase de *Bacillus sp.* RTS11. **145**

Tableau 35. Spécificité relative de la xylanase vis-à-vis de différents substrats. **149**

Tableau 36. Effet de traitement enzymatique sur les propriétés physicochimiques de la pulpe à 60°C, pH 9,0 après 4 h. **151**

Liste des figures

Page

Chapitre 1 : synthèse bibliographique

Figure 1. Répartition des zones désertiques en fonction de leur indice d'aridité sur l'ensemble de la surface terrestre. **7**

Figure 2. Les facteurs affectant la vie dans les déserts **10**

Figure 3. Diagramme schématique des parois cellulaires végétales **15**

Figure 4. Structure de xylane **16**

Figure 5. Structure de différents types de xylane **18**

Figure 6. Schéma représentative de différentes enzymes responsables à la dégradation de xylane **20**

Figure 7. Régulation de la biosynthèse de la xylanase **26**

Figure 8. Structures représentatives d'enzymes de la famille 10 et 11 **28**

Figure 9. Les application de la xylanase dans différentes industries **30**

Figure 10 : Illustration schématique de différentes structures contenant de la chitine **31**

Figure 11 : Structure de la chitine avec ces différentes conformations (α, β et γ-chitine) **32**

Figure 12. Mode d'action des chitinases **33**

Figure 13. Dégradation des parois cellulaires des champignons phytopathogènes par les chitinases **38**

Figure 14. Applications industrielles des enzymes chitinolytiques **42**

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

Figure 15. Le système de classification climatique de Köppen-Geiger **44**

Figure 16 : Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS **51**

Figure 17: Représentation schématique du dosage des protéines par la méthode de Lowry **51**

Figure 18: Principe du dosage colorimétrique des sucres totaux **51**

Figure 19. Méthode de double culture illustrant la mesure de la croissance radiale des mycéliums fongiques **59**

Figure 20. Diagramme schématique du partitionnement en trois phases **66**

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Figure 21. Répartition des cultures étudiées en fonction de point de prélèvement (A), milieu d'isolement (B). **71**

Figure 22. Nombre d'actinomycètes isolés en fonction du milieu d'isolement (A), des échantillons (B), de prétraitements (C), et le pourcentage des actinomycètes (D). **73**

Figure 23. Les activités enzymatiques, A- chitinase, B- lipase, C- amylase, D- cellulase, E- pectinase, F- tannase, G- xylanase, H- protéase. **75**

Figure 24. Possession de différentes enzymes chez les souches isolées. **76**

Figure 25 : Répartition des activités enzymatiques. **77**

Figure 26. Regroupement des isolats en fonction de l'index enzymatique. **77**

Figure 27. L'index enzymatique chez les isolats sélectionnés pour l'activité chitinase. **79**

Figure 28. Activité chitinolytique des huit isolats en culture submergée **78**

Figure 29. Arbre phylogénétique montrant la relation phylogénétique du *Bacillus sp*. SRIT8 avec les espèces apparentées **80**

Figure 30. Production de chitinase en fonction de différentes formes de chitines dans deux milieux de culture; A- Milieu 1, B- Milieu 2 **81**

Figure 31. Graphique de Pareto présentant l'effet de différents facteurs sur la production de chitinase. **85**

Figure 32. Les tracés de contour et de surface montrant les interactions entre l'agitation et l'âge d'inoculum (AC), et entre l'âge d'inoculum et le taux d'inoculum (AB) **88**

Figure 33. Les tracés de contour et de surface montrant les interactions entre la peptone et l'extrait de levure (AB), et entre la chitine et l'extrait de levure (AC) **93**

Figure 34. Les tracés de contour et de surface montrant les interactions entre la température et le pH (BC), et entre le pH et K_2HPO_4(AC). **97**

Figure 35. Les tracés de contour et de surface montrant les interactions entre $(NH_4)_2SO_4$ et NaCl (BC) et entre le $(NH_4)_2SO_4$ et $CaCl_2$(AC). **100**

Figure 36. Cinétique de croissance et de production de chitinase par *Bacillus sp.* SRIT8. **102**

Figure 37. Cinétique des protéines, des glucides et de pH pendant la production de chitinase par *Bacillus sp.* SRIT8. **103**

Figure 38. Précipitation de la chitinase par le sulfate d'ammonium (a) et l'acétone (b). **105**

Figure 39 : Purification de l'enzyme chitinase par chromatographie d'exclusions moléculaire. **106**

Figure 40 : Purification de l'enzyme chitinase par chromatographie échangeuse d'anions. **107**

Figure 41. Analyse SDS-PAGE de la chitinase purifiée à partir de *Bacillus sp* SRIT8. **109**

Figure 42. Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la chitinase purifiée de la souche SRIT8. **110**

F**igure 43.** Effet de la variation de température sur l'activité et la stabilité de la chitinase **112**

purifiée.

Figure 44: Effet des ions métalliques sur l'activité de la chitinase purifiée. **113**

Figure 45. Effets des solvants organiques et des détergents sur l'activité de la chitinase purifiée **115**

Figure 46. L'activité antifongique de la souche SRIT8 vis-à-vis (a) *A. alternata*, (b) *F. graminearum.* **116**

Figure 47. L'effet d'inhibition de l'activité de l'enzyme chitinase purifiée de *Bacillus sp* SRIT8 sur *F. graminearum* **118**

Figure 48. Diamètre d'inhibition de la croissance fongique par la chitinase purifiée sur le milieu PDA **118**

Figure 49. Germination et longueur des racines des grains de blé pulvérisés et non pulvérisés avec la chitinase. **119**

Figure 50. Effet de la chitinase sur les infections fongiques et la germination de grains de blé **120**

Figure 51. Taille des lésions induites par le *F. graminearum* sur des pommes de terre traitées et non traitées avec la chitinase **121**

Figure 52. Traitement de la fusariose sur la pomme de terre **122**

Figure 53. Taux de mortalité de l'insecte ravageur *Sitophilus granarius* L sous l'effet de différentes concentrations de chitinase purifiée **124**

Figure 54. Activité xylanasique de la souche RTS11. **125**

Figure 55. Activité xylanase en bouillons de culture. **126**

Figure 56. Arbre phylogénétique de la souche RTS11 montrant la similitude avec *Bacillus sp.* **126**

Figure 57. Effet de différentes sources de carbone sur la production de la xylanase par *Bacillus sp.* RTS11. **128**

Figure 58. Influence de différentes sources d'azote sur l'activité xylanolytique de la souche RTS11. **129**

Figure 59. Influence de différents additifs sur l'activité xylanolytique de la souche de *Bacillus* sp. RTS11. **130**

Figure 60. Les tracés de contour et de surface montrant les interactions entre le pH et l'âge d'inoculum. **135**

Figure 61. Les tracés de contour et de surface montrant les interactions entre le pH et le taux d'inoculum. **136**

Figure 62. Les tracés de contour et de surface montrant les interactions entre le xylane et l'agitation. **137**

Figure 63. Cinétique de la croissance et la production de xylanase par *Bacillus sp.* RTS11. **138**

Figure 64. Cinétique des protéines, des glucides, et de pH au cours de la production de chitinase par *Bacillus sp.* RTS11. **139**

Figure 65. Purification de la xylanase par chromatographie de filtration sur gel. **143**

Figure 66: Purification de la xylanase par chromatographie échangeuse d'anions. **144**

Figure 67. Analyse SDS-PAGE de la xylanase purifiée de *Bacillus sp.* RTS11. **145**

Figure 68. Effet du pH sur la xylanase, (a): effet sur l'activité; (b): Effet sur la stabilité **146**

Figure 69. Effet du T° sur la xylanase, (a): effet sur l'activité; (b): Effet sur la stabilité **147**

Figure 70 : Effet des ions métalliques sur l'activité de la xylanase purifiée. **148**

Figure 71. Optimisation de la dose de xylanase (a), la consistance de la pâte (b), et le temps de traitement (c) pour le blanchiment enzymatique de la pâte à papier **150**

Figure 72. Les feuilles manuelles préparés à partir de papiers traités à : A. Eau distillé, B. Extrait brut, C. La xylanase **152**

Figure 73. L'hydrolyse des résidus d'agricultures par la xylanase purifiée. **153**

INTRODUCTION

Introduction

Les enzymes sont des catalyseurs biomoléculaires de haute spécificité produits par les organismes vivants, qui transforment le substrat en un produit, elles peuvent en outre catalyser des réactions difficilement réalisables par des méthodes chimiques, et peuvent entraîner une augmentation des taux de réaction de 100 millions à 10 milliards de fois plus rapidement que toute autre réaction chimique (Otten et Quax, 2005). Jusqu'aux années 1970, les applications enzymatiques commerciales faisaient appel à des sources animales et végétales, censées être exemptes des problèmes de toxicité et de contamination liées aux enzymes microbiennes (Robinson, 2015). En règle générale, les enzymes d'origine animale et végétale, présentent un rendement optimal à une température d'environ 37°C, à un pH neutre et en absence d'inhibiteurs. Pour résoudre ce problème et pour satisfaire la demande de plus en plus pressante d'enzymes dans de nombreux secteurs industriels, les sources microbiennes sont préférablement exploitées que les plantes et les animaux pour la production d'enzymes (Okpara, 2022). Actuellement, les enzymes microbiennes reçoivent une attention toute particulière, notamment grâce au développement de la technologie de l'ADN recombinant et de l'ingénierie des protéines, en raison de leur économicité de production à grande échelle; la disponibilité régulière des microorganismes et leur croissance rapide sur des substrats peu coûteux avec un rendement élevé en enzyme qui présentent une grande stabilité et une activité catalytique plus importante (Gurung *et al.*, 2013). En outre, les microorganismes sont capables de produire une série d'enzymes dans différentes conditions environnementales, dans un espace et un temps restreints, et peuvent subir des manipulations génétiques afin d'obtenir une quantité accrue d'enzymes, ainsi que la purification des enzymes provenant de microbes est plus simple que celle des sources végétales et animales (Al-Maqtari *et al.*, 2019). Les enzymes microbiennes jouent un rôle crucial dans la création de procédés biologiques performants dans divers secteurs tels que la chimie, la papeterie, le textile, la pharmaceutique, le cuir, les détergents, l'alimentation et les boissons, les biocarburants, l'alimentation animale et les soins personnels, elles sont exploités sur la base de leurs caractéristiques particulières, notamment leur spécificité élevée, ainsi que leur capacité à atteindre des rendements plus élevés en minimisant le gaspillage des ressources parallèlement à la réduction de la génération de déchets polluants (Patel *et al.*, 2016). Un des problèmes majeurs rencontrés lors de l'utilisation d'enzymes comme agents de biotransformation dans l'industrie est leur stabilité sous les conditions imposées, les enzymes sont fréquemment exposées à un pH, une pression, une température et des inhibiteurs qui peuvent fortement perturber leur activité (Littlechild,

2015; Dwivedi *et al.*, 2021). La sélection de la souche destinée à la production d'enzymes est cruciale, il est préférable de choisir une souche qui produit une enzyme extracellulaire, car il est beaucoup plus facile de purifier l'enzyme que si elle est produite de façon intracellulaire (Patel *et al.*, 2017). La majorité des micro-organismes se révèlent inaptes à se développer et à produire des enzymes dans des environnements hostiles, mais certains d'entre eux ont adopté diverses adaptations qui leur permettent de croître, comme de produire des enzymes dans de telles conditions, De nombreuses études ont été mises en place afin d'isoler de nouvelles souches bactériennes et fongiques dans des milieux difficiles caractérisés par des conditions extrêmes de pH, de température, de salinité, de métaux lourds et de solvants organiques, dans le but de produire différentes enzymes présentant des propriétés exceptionnelles (Anbu *et al.*, 2017). Sur le plan industriel, pour que l'enzyme soit efficace, elle doit être active et stable au cours de réaction, la majorité des enzymes disponibles sont dérivées d'organismes mésophiles, possédant une stabilité limitée, ce qui restreint leur usage dans de multiples domaines (Sysoev *et al.*, 2021). Ces contraintes sont surmontées par les enzymes extrêmophiles, les chercheurs identifient actuellement des organismes extrêmophiles se trouvant dans des zones diverses du monde, à savoir des lacs hypersalins, des sources hydrothermales, des déserts arides, et des océans profonds, dans le but de produire des enzymes potentiellement intéressantes (Mesbah, 2022). Concrètement, ces enzymes microbiennes proviennent d'un nombre très restreint de genres, dont principalement *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Bacillus* et *Streptomyces*, les souches sont issues de ses genres, à la suite de mutations et de sélections (Santos, 2012).

Les hydrolases sont la classe d'enzymes la plus diversifiée, regroupant plus de 200 enzymes agissant sur plusieurs sortes de substrats (Shukla *et al.*, 2022). Ce sont des enzymes qui par réaction avec l'eau rompent les liaisons et décomposent les glucides en unités plus petites afin de les digérer, de nombreuses hydrolases ont été identifiées : lipases, amylases, protéases, estérases, glucanases, chitinases, pectinases, xylanases, etc…(Aktuganov *et al.*, 2007; Alcántara *et al.*, 2011; Victorino da Silva Amatto *et al.*, 2022). Les xylanases et les chitinases sont deux enzymes qui ont été largement étudiées et qui ont une grande importance dans différentes domaines. Les xylanases sont des enzymes qui décomposent le xylane en xylooligosaccharides et en xylose, elles jouent un rôle prépondérant au sein des industries du papier, des produits alimentaires et pharmaceutiques ainsi que de l'alimentation animale (Sipriyadi *et al.*, 2020). Plusieurs processus industriels ont été intéressés par les extrémozymes xylanolytiques, il est supposé que les extrémozymes peuvent faire face aux conditions extrêmes lors du traitement des matériaux lignocellulosiques, par exemple, les

xylanases thermoalcalines sont parfaitement compatibles avec l'industrie du papier, où elles sont utilisées pour le bioblanchiment de la pâte à papier (Verma et Satyanarayana, 2020). Les coûts des enzymes commerciaux ont augmenté de 4,2 milliards de dollars en 2014, de 6 milliards de dollars en 2016 et de 6,2 milliards de dollars en 2020, où les hydrolases occupent une place prépondérante sur le marché mondial, représentant entre 77% et 85% du total. Les xylanases commercialisées sont issues de divers isolats bactéries, principalement *Bacillus sp.* (Chaudhary *et al.*, 2023). Il est préférable d'utiliser les xylanases bactériennes plutôt que les xylanases fongiques du fait de leurs larges tolérances de pH et de température, cependant, les rendements de production par les bactéries soient plus faibles que ceux des champignons (Kumar *et al.*, 2016)

Les bactéries chitinolytiques peuvent jouer un rôle clé dans la décomposition de la chitine, elles minéralisent la chitine des insectes et des champignons existants dans le sol en tant que source de carbone, contribuant de manière importante au recyclage des minéraux et des nutriments (Veliz *et al.*, 2017). Les chitinases ont un impact considérable, elles permettent de transformer la biomasse chargée en chitine en chitooligomères et en monomères bioactifs, l'enzyme et ses produits dérivés peuvent avoir un vaste champ d'application dans l'agriculture, la médecine et la bioremédiation (Singh *et al.*, 2021). Les chitooligosaccharides remplissent des fonctions biologiques importantes, notamment la réduction du taux de cholestérol, l'immunostimulation, les effets antitumoraux et anticancéreux, l'accélération de l'absorption du calcium et du fer, ainsi que des fonctions anti-inflammatoires et antioxydantes (Bosquez-Molina et Zavaleta-Avejar, 2016). Les déchets chitineux étant produits en abondance, leur recyclage permanent est une nécessité pour lutter contre la pollution de l'environnement, à ce propos, les chitinases sont des agents de base pour gérer les déchets de chitine, tout en générant des produits à valeur ajoutée (Poria *et al.*, 2021). Les chitinases proposent une substitution respectueuse de l'environnement aux pesticides de synthèse par leur capacité incomparable à inhiber les pathogènes fongiques et les insectes sans nuire aux plantes, aux vertébrés et à d'autres composants de l'écosystème (Dhole *et al.*, 2021).

Ce manuscrit a été fait sur la base d’une étude bibliographique présentant des données capitales citées dans la littérature concernant la xylanase et la chitinase ainsi que les organismes producteurs. L'étude expérimentale et les résultats sont répartis en plusieurs axes de recherche:

1. Isolement de bactéries à partir d'échantillons de sable, de sédiments et de pierres provenant de trois régions désertiques algériennes, et mise en évidence de leur capacité à produire des chitinases et des xylanases extracellulaires.
2. Sélection et identification de souches bactériennes destinées à la production des deux enzymes.
3. Optimisation à l'aide des plans statistique de Plackett-Burman et de Box-Behnken de la production des deux enzymes.
4. Production, purification, et caractérisation des enzymes produites.
5. Des essais d'application de la chitinase comme agent de biocontrôle et de la xylanases comme agent de bioblanchiment des papiers ont été effectués.
6. Une conclusion récapitulant les principaux résultats.

CHAPITRE 01:

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Milieu extrême

Généralement, les conditions extrêmes sont étroitement liés à des propriétés hors de l'ordinaire, d'un point de vue anthropocentrique, les conditions physico-chimiques qui favorisent la vie des mammifères sont considérés comme normales, et les conditions qui s'écartent de ce principe apparaissent comme extrêmes (Selbmann *et al.*, 2013). Donc, les environnements extrêmes peuvent être définis comme les habitats exposés à un ou plusieurs facteurs environnementaux défavorables d'une façon permanente ou périodique conduisant à un déséquilibre dans les fonctions des organismes existantes (Li *et al.*, 2014). Les milieux sont envisagés comme extrêmes en termes de facteurs chimiques ou physiques, ou les deux; le manque d'eau, un pH très acide ou très alcalin, une concentration élevée de sel, une température très élevée ou très basse, une haute pression, des rayons intensifs, et une carence en nutriments (Yin *et al.*, 2019). Parmi les milieux extrêmes les plus courant, on distingue les vastes étendues des pôles, les sources chaudes et hydrothermales profondes, les profondeurs obscures et insondables des abysses, les lacs salés, les déserts chauds et froids, les environnements lithiques ou rocheux, ainsi que les environnements fortement contaminés avec l'activité humaine par les déchets nucléaires ou les métaux lourds (Raddadi *et al.*, 2015).

2. Les extrêmophiles

Par définition, un extrêmophile est un organisme qui non seulement survit, mais prospère et peut nécessiter des conditions physicochimique fortement hostiles pour sa croissance et son activité (Gupta *et al.*, 2014). La présence et la répartition des germes microbiens n'ont jamais été limitées par des frontières géographiques, ils ont été découverts dans les profondeurs océaniques, à l'intérieur de la croûte terrestre, sous des pressions allant jusqu'à 110 MPa, dans les sources hydrothermales à 122°C, dans l'eau de mer gelée à -20°C ; dans des déserts secs et froids, et dans les volcans (Torsvik et Øvreås, 2008 ; Geyer *et al.*, 2013 ; Rampelotto, 2013). Les environnements extrêmes peuvent abriter des psychrophiles, des thermophiles, des acidophiles, des alcalinophiles, des piézophiles, des xérophiles et des halophiles (Oarga, 2009). La biodiversité au sein de ces milieux est faible et certains grands groupes taxonomiques sont inexistants (Maltman et Yurkov, 2019). Des recherches récentes confirment que les microorganismes extrêmophiles sont cosmopolites et peuvent peupler différents habitats (Noguez *et al.*, 2005). Alors qu'il n'y a pas si longtemps, on pensait qu'il n'y avait pas de vie dans de les environnements extrêmes, dans les années 1960, le premier microorganisme du parc national de Yellowstone, aux États-Unis a été isolé; *Thermus aquaticus*, une bactérie vivante à des températures supérieures à 70°C, et son ADN

polymérase a été largement exploitée en biologie moléculaire en raison de ces propriétés thermophiles (Gómez-Silva, 2018).

Dans un environnement caractérisé par un seul facteur extrême, on trouve des micro-organismes extrêmophiles, tandis que dans un environnement où plusieurs facteurs hostiles sont présents, on trouve des polyextrêmophiles, les sources chaudes acides, les lacs alcalins hypersalés et les déserts sablonneux secs sont composés respectivement de polyextrêmophiles acidothermophiles, d'alcaliphiles halophiles et d'oligotrophes résistants aux rayons ultraviolets (Mesbah et Wiegel, 2012; Rothschild et Mancinelli, 2001).

3. Désert

Les habitats extrêmes les plus fréquemment étudiés sont les habitats hyperthermiques et les mers profondes. Les environnements exposés à une aridité permanente sévère, tels que les déserts, ont récemment fait l'objet d'une grande attention (Bull *et al.*, 2018). Le mot désert dérive du latin Déserta, qui signifie "lieu inhabité", du fait que les déserts étaient considérés comme des régions dépourvues de toute forme de vie (Berkal, 2006). Sur la base de la température et de l'aridité, les écosystèmes désertiques sont classés en trois catégories : subtropical (Sahara), côtiers frais (Namibie) et hiver froids (Gobie) (Horikoshi, 2011; Lacap-Bugler *et al.*, 2017). Suite à la période humide de l'Holocène moyen (il y a 6 000 ans), des conditions arides se sont développées en Afrique du Nord, conduisant à la formation du Sahara, plus grand désert de climat chaud de la planète (9 000 000 km²) (Schuster *et al.*, 2006). Les déserts représentent environ 41% de la masse terrestre (Ustin *et al.*, 2009). En Algérie, la zone aride couvre près de 95% du territoire national, dont 80 % sont des zones hyper aride (Berkal, 2006). Le Sahara algérien est l'un des habitats moins exploités, le sol de cette région est considéré comme un microbiome extrême, soumis à des conditions climatiques difficiles qui limitent la plupart des formes de vie (Bouznada *et al.*, 2017; Mohamed *et al.*, 2017).

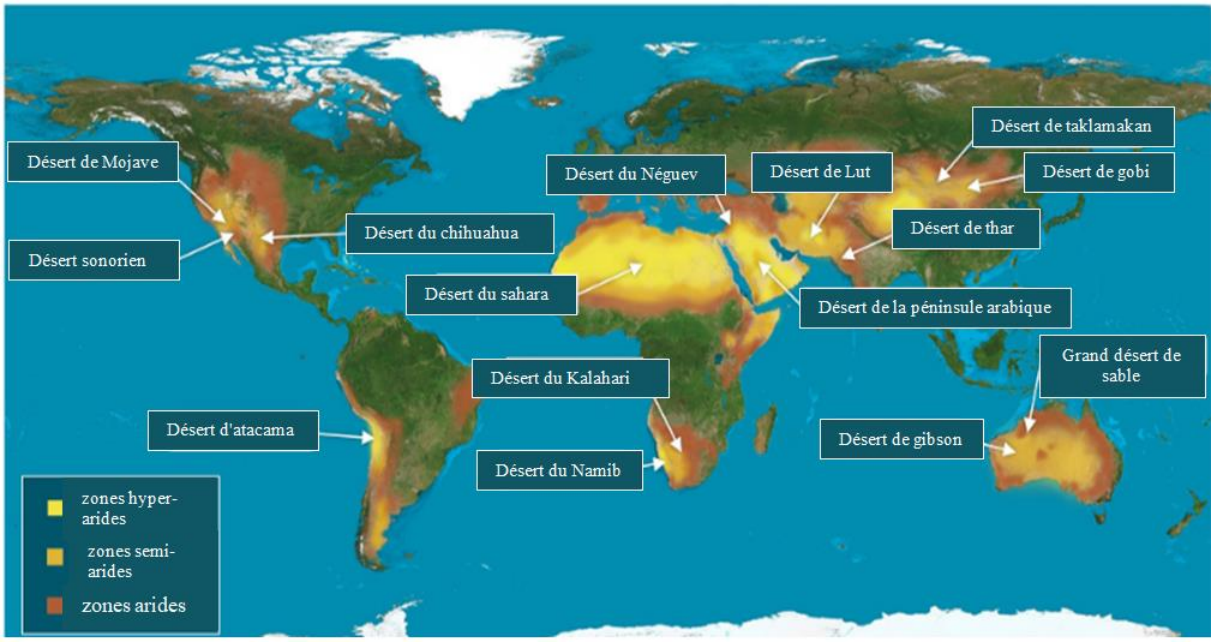


Figure 1. Répartition des zones désertiques en fonction de leur indice d'aridité sur l'ensemble de la surface terrestre (Alsharif *et al*., 2020).

4. Les conditions physicochimiques limitant la vie microbienne dans les déserts

Deux types de sols extrêmes dominent la Terre, à savoir les sols désertiques et les sols de toundra (Torsvik et Øvreås, 2008). Cooke, (1973) a présenté les déserts comme des zones stériles, à peine capables de supporter des formes de vie, au cours des dernières décennies, les connaissances sur la microbiologie du désert ont augmenté de façon considérable permettant un changement radical dans la conception du désert, qui passe d'une région stérile inhabitable à une région hyperaride abritée un microbiote diversifié comprenant des microorganismes extrêmophiles et extrêmotolérants (Gómez-Silva, 2018). En milieu désertique, la diversité microbienne est influencée à la fois par des facteurs environnementaux abiotiques, tels que la rareté des précipitations, les fortes variations de température, l'augmentation du rayonnement ultraviolet, le manque de nutriments et les vents accentuant l'évaporation, ainsi que par des facteurs biotiques, notamment la rareté de la végétation (Berkal, 2006; Köberl *et al.*, 2011; Andrew *et al.*, 2012; Mohammadipanah et Wink, 2016).

4.1. Nutriments

Les hypothèses de productivité-diversité indiquent que la variation de la disponibilité des éléments nutritif tels que l'azote et la matière organique influence fortement la diversité des communautés microbiennes (Geyer *et al.*, 2013). Les sols arides, contrairement aux sols des régions humides qui sont riches en matière organique, ont une faible teneur en matière

organique et sont souvent salins et alcalins (Williams et Balling, 1995). La pauvreté des sols désertiques en ressources s'explique par le fait que les faibles précipitations réduisent la disponibilité des éléments nutritifs dans le sol en limitant la production et la minéralisation de la matière organique (Wang *et al.*, 2020). La densité de la population microbienne présente dans les sols désertiques est plus faible que celle présente dans les sols des zones humides, en particulier en été qui a provoqué une stérilisation partielle du sol, la population autochtone existante est oligotrophe et bien adaptée à la déficience en nutriments de ces sols, dont les principaux composés organiques sont des matières organiques récalcitrantes et difficilement dégradables (Rao et Venkateswarlu, 1983).

4.2. Végétation

Le désert se caractérise par une rareté de végétations, il y existe principalement de petits végétaux (Torsvik et Øvreås, 2008). En raison de la faible couverture végétale, la surface du sol est directement exposée au soleil et au vent (Cooke, 1973). Dans ces sols, les végétaux constituent un excellent biotope pour le microbiote, si bien que la diversité microbienne est plus importante dans la rhizosphère que dans le sol environnant, compte tenu de la présence d'éléments nutritifs à l'interface entre la racine et le sol (Andrew *et al.*, 2012)

4.3. Précipitations

Différents concepts sont liés à la notion de désert, mais le plus précis est celui de l'aridité, la sécheresse extrême résultant de l'absence de précipitations régulières constitue le facteur environnemental le plus important pour la présence de micro-organismes (Gómez-Silva, 2018). Les déserts sont des environnements inégaux en termes de dispersion des nutriments dans l'espace et dans le temps, une période courte de précipitations s'accompagne de périodes courtes d'abondance de nutriments, cette période est suivie de longues périodes de sécheresse, et certaines tempêtes peuvent être hivernales et d'autres estivales (Ezcurra *et al.*, 2006). Les précipitations saisonnières constituent un facteur restrictif clé de la productivité primaire, de l'activité microbienne du sol, et de la biodiversité dans les régions arides (Bell *et al.*, 2008). Dans ce cas, la vie microbienne du sol dépend de la disponibilité d'eau dans les pores et à la surface du sol, cette disponibilité détermine la diffusion des éléments nutritifs et la dispersion microbienne (Šťovíček *et al.*, 2017). Une définition quantitative précise de la dessiccation est la déshydratation à moins de 0,1 g d'eau par gramme de matière sèche (équivalent à une teneur en eau inférieure à 10%), ce qui correspond au moment où l'eau est insuffisante pour former une monocouche autour des macromolécules à l'intérieur de la cellule, empêchant toute activité enzymatique adéquate et un métabolisme actif (Azua *et al.*,

2013). Dans les déserts chauds, la majeure partie de l'eau de la surface s'évapore durant la journée, les micro-organismes se reproduisant à travers l'absorption de l'eau de la rosée durant les nuits (Torsvik et Øvreås, 2008). En effet, le taux d'évaporation dans les déserts chauds peut être 20 fois supérieur au taux de précipitations annuelles, du fait que la plupart des pluies s'évaporent avant d'atteindre le sol (Wiesman, 2009). Sur certaines dunes riches en nutriments, une faible humidité réduit la mobilité de ces nutriments, en particulier du phosphore, rend ces dunes moins favorables à la croissance des micro-organismes (Hatimi et Tahrouch, 2007).

4.4. Température

Les déserts chauds sont les lieux où on trouve les plus grands contrastes de température avec des jours très chauds et des nuits fraiches, les journées sont généralement ensoleillées et sans nuages, le sol et les roches sont fortement exposés à la lumière du soleil notamment avec l'absence de couverture végétale (Wiesman, 2009). Au Sahara, le sol pendant la journée est plus chaud que l'air, sa température de surface atteignant 60°C par rapport à 10°C durant la nuit, avec une variation thermique diurne supérieure à 35°C, ces conditions de sécheresse tout au long de l'année limitent les progrès de l'agriculture (Chennafi, 2013). Cette chaleur contribue à l'évaporation et la fissuration des sols, rendant la surface du sol vulnérables à l'érosion éolienne, éliminant ainsi l'humidité nécessaire à la croissance des végétaux (Sivakumar et Stefanski, 2007).

4.5. Vent

Le désert du Sahara est le plus grand désert de la planète et le plus grand fournisseur de poussière atmosphérique au monde en raison de sa forte activité éolienne, elle se caractérise par des vents intenses qui constituent le principal facteur responsable du transport et de l'intensité des poussières (Dahbi *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2022). Le vent intervient avec des intensités variables mais sans interruption tout au long de l'année, il contribue à la formation et l'apparition de dunes et de nappes de sable, il emporte de grandes quantités de sédiments qui ont été détachés par l'érosion du sol et les redépose à différents endroits (Goossens et Offer, 1997).

4.6. Salinité et pH

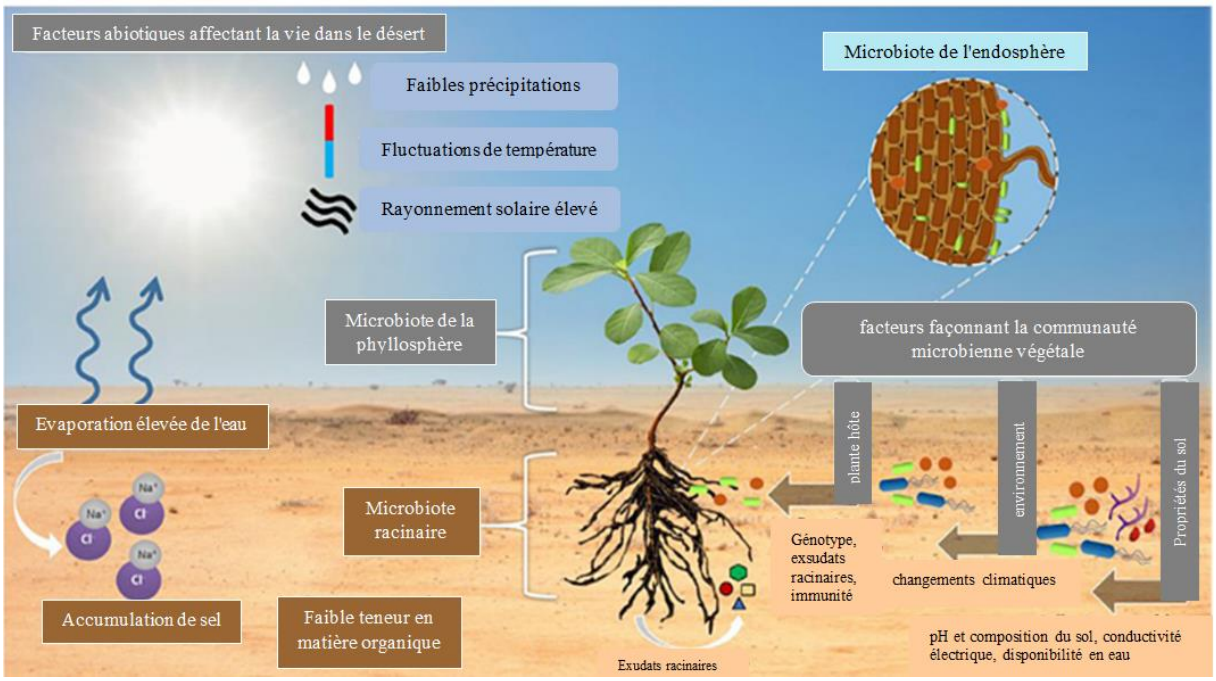
La salinité fait partie des menaces majeures dans les zones désertiques (Debbagh-Nour *et al.*, 2022). La salinisation des sols a été identifiée comme un processus significatif en termes de dégradation des terres, en raison de la rareté des précipitations (Bakr et Ali, 2019).

La présence de sels caractérise les sols arides d'Algérie, plus de 95 % des sols sont de nature calcaires, gypseux, et salsodiques (Chennafi, 2013). Les courtes périodes de pluviosité accompagnées d'une rapide évapotranspiration peuvent aggraver le stress salin, limitant ainsi la croissance des plantes, tandis qu'ils existent des espèces halophytes qui réussissent à survivre dans ces environnements (Luo *et al.*, 2021).

La plupart des aridisols ont un pH alcalin, qui semble être un facteur important dans la répartition de la communauté bactérienne (Vanisree *et al.*, 2022). La diversité des bactéries du sol varie considérablement d'une région à l'autre et d'un type d'écosystème à l'autre, en fonction du pH dans les écosystèmes (McHugh *et al.*, 2017).

4.7. Irradiation

Le désert du Sahara est considéré comme l'une des zones les plus exposées au rayonnement solaire, cette exposition est fortement corrélée à la couverture nuageuse, dans ces régions arides, les nuages sont rares ou inexistants ce qui permet à une forte intensité de rayonnement solaire d'atteindre le sol (Sivakumar et Stefanski, 2007). L'irradiation solaire intense dans cette région contribue de manière synergique à la dessiccation, ce qui limite la propagation des germes microbienne (Gómez-Silva, 2018). Par conséquent, les sols désertiques sont des cibles potentielles pour la recherche de nouvelles souches résistantes aux radiations (Musilova *et al.*, 2015).



Figures 2. Les facteurs affectant la vie dans les déserts (Alsharif *et al.*, 2020).

5. Les microorganismes de désert

Diverses études ont révélé la présence des micro-organismes dans les sols désertiques, les déserts hyperarides peuvent être privés de précipitations sur des périodes décennales et sont exposés à une sécheresse sévère et prolongée, en combinaison fréquente avec d'autres contraintes physico-chimiques (Jordaan *et al.*, 2020). La majorité des études décrivant les communautés microbiennes dans les sols désertiques étaient basées sur le séquençage de l'ARNr, cette communauté comprend outre les cellules actives, des cellules dormantes et des cellules sporulées qui adoptent des stratégies de survie essentielles dans les conditions climatiques rigoureuses de ces régions arides (Baubin *et al.*, 2019). Dans les déserts, les dunes de sable sont recouvertes d'affleurements rocheux (Bhatnagar et Bhatnagar, 2005). Un des habitats les plus étudiés est l'environnement lithique, où les communautés microbiennes ont colonisé la face inférieure (hypolithique) ou l'intérieur (endolithique) des roches (Stomeo *et al.*, 2013). Les biomes désertiques diffèrent nettement des autres biomes en termes de composition et de fonction des communautés microbiennes du sol, une comparaison récente de ces communautés dans différents biomes au moyen du séquençage métagénomique, a montré que les déserts chauds présentaient les niveaux les plus bas de diversité phylogénétique et fonctionnelle (Fierer *et al.*, 2012). L'analyse des banques de gènes ARNr 16S a révélé la présence d'espèces apparentées aux bactéries et aux archées, les séquences relatives aux Archaea étaient toutes apparentées au groupe non thermophile des Crenarchaeotasae, et celles des bactéries étaient dominées par les Proteobactéries, les Actinobactéries et les Acidobactéries (Chanal *et al.*, 2006; Makhalanyane *et al.*, 2015). Il a été démontré que les bêta-protéobactéries, les bactéroïdes, les actinobactéries, les cyanobactéries et les firmicutes dominent les " les sols jeunes ", c'est-à-dire les sols récents ou souvent perturbés (Jangid *et al.*, 2013). Par ailleurs, la densité des acidobactéries, des alphaprotéobactéries et des planctomycètes était plus importante dans les "sols vieillis", c'est-à-dire dans des environnements plus cohérents et plus stables (Ronca *et al.*, 2015). Certaines Firmicutes, telles que *Bacillus* et *Paenibacillus*, se caractérisent par la formation d'endospores, des besoins en croissance non fastidieuse, et un court temps de génération, ce qui leur permet de résister aux zones arides et place les Firmicutes parmi les espèces bactériennes les plus identifier dans ce type de sol (Makhalanyane *et al*., 2015). Les souches appartenant à *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Proteus* et *Pseudomonas* sont les plus représentées (Bhatnagar et Bhatnagar, 2005). Les Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes dans le désert du Sahara, où plusieurs études ont identifié des souches potentielles de

PGPB provenant de différentes sources telles que le sol, la rhizosphère, et l'endosphère qui peuvent aider différentes espèces végétales contre les stress abiotiques et biotiques imposés par ces conditions extrêmes (Alsharif *et al.*, 2020). Les cyanobactéries ont été parmi les mieux caractérisées en ce qui concerne les contraintes physiques extrêmes telles que les températures élevées et le rayonnement ultraviolet (Cockell *et al.*, 2017). Se sont les premiers colonisateurs de sables, elles produisent de grandes quantités de substances polymériques extracellulaires qui servent de matrice aux particules de sable et contribuent à stabiliser le sable et à prévenir l'érosion, aident à retenir l'humidité et fournissent au sol du carbone organique, de l'azote et d'autres composés, ce qui permet le développement des plantes (Bar-Eyal *et al.*, 2015).

6. Les enzymes et leurs applications

Les enzymes sont des protéines capables de catalyser les réactions biochimique, elles sont impliqués à la fois dans les réactions de synthèse et de dégradation des produits par les organismes vivants (Wilson, 2010). Les enzymes assurent les besoins métaboliques des cellules, elles contribuent à un large éventail de réactions biochimiques, la pluparts des enzymes naturelles sont très efficaces et peuvent augmenter le taux de biotransformation jusqu'à 10^{17} fois (Osbon *et al.*, 2019). Les enzymes se caractérisent par deux propriétés distinctes, elles interviennent dans les réactions chimiques et permettent d'accélérer la vitesse des réactions sans être consommées ou altérées pendant la réaction et sans altérer l'équilibre chimique entre les réactifs et les produits (Cooper, 2000).

Les enzymes existent chez tous les organismes vivants, celles retrouvées sur le marché sont essentiellement dérivées des plantes, des animaux, et des micro-organismes (Kuddus, 2019). Parmi ces trois sources, les microorganismes sont les mieux adaptés à la production industrielle d'enzymes en raison de la facilités de leurs manipulation, ils peuvent être cultivés facilement, ils croissent rapidement et produit des quantités adéquates d'enzymes tout en consommant des substrats moins chers, ils peuvent être manipulés génétiquement pour améliorer le rendement de production (Patel *et al.*, 2017 ; Singh et Kumar, 2019). Il existe également, des microorganismes bien adaptés aux environnements extrêmes capables de sécréter des enzymes plus stables que celles provenant de plantes et de mammifères (Chia *et al.*, 2024). Le développement de la technologie de l'ADN recombinant a permis de produire à grande échelle des enzymes sous forme de préparations purifiées et bien caractérisées, permettant une large application d'enzymes dans divers procédés industriels (Zhu *et al.*, 2011).

La production de produits industriel tels que le papier et le textile, génère de grandes quantités de déchets avec un impact négatif sur l'environnement, les industries recherchent donc des technologies alternatives qui peuvent fournir à la fois un nombre croissant de produits demandés tout en ayant un impact moindre sur l'environnement, en biotechnologies, le traitement enzymatique est considéré comme l'une des alternatives les plus efficaces et les plus respectueuses de l'environnement par rapport au traitement chimique (Jegannathan et Nielsen, 2013). Par exemple, Dans l'industrie des détergents, des enzymes telles que les protéases, les amylases et les lipases peuvent être mélangées aux détergents pour renforcer les propriétés de lavage, et réduire la consommation de savon, ainsi que les lipases et les protéases sont fréquemment employées pour le nettoyage des produits en laine dans l'industrie textile et pour retirer les composants indésirables présents dans la matière première dans l'industrie du cuir (Abedi *et al.*, 2021). Selon Nevalainen et Te'o, 2003, le marché des enzymes industrielles comprend :

- Enzymes pour applications industrielles comme la pâte à papier, le textile et la blanchisserie constituent les enzymes les plus importantes, notamment les enzymes détergentes.
- Enzymes alimentaires comme ceux utilisés en brasserie et en fromagerie.
- Enzymes pour l'alimentation animale

Tableau 1. Exemples d'enzymes d'intérêt industriel, et leurs applications dans les différentes industries.

Enzymes	Applications	Références
Cellulase	Production de biocarburants ; Biotechnologie alimentaire (brasserie, vinification) ; Papeteries ; Détergents ; Bio-désencrage ; Le textile ; Alimentation animale	(Menendez *et al.*, 2015 ; Kuhad *et al.*, 2011)
Protéase	Détergent ; Préparation des aliments (Boulangerie, développement d'arômes dans le fromage et les biscuits, compléments alimentaires) ; Fabrication des médicaments ; Traitement de cuir ; Gestion des déchets ; Récupération de l'argent	(Gupta *et al.*, 2002) (Ramos *et al.*, 2021)
Amylase	Production de carburants, et d'éthanol industriel ; Produits de nettoyage ; Boulangerie ; Traitement textile ; Transformation des pâtes et papiers ; Alimentation animale ; Application pharmaceutique	(Castro *et al.*, 2010)
Pectinase	Extraction des jus de fruits ; Traitement des textiles ; Traitement des eaux usées pectiques ; Fabrication du papier ; Fermentations de café et de thé ; Alimentation animale	(Pasha *et al.*, 2013; Javed *et al.*, 2018)
Lipase	production de biodiesel ; Détergent ; Traitement du cuir ; Applications pharmaceutique ; Industrie du papier ; Industrie alimentaire (transformation des aliments, fabrication d'huile, production d'esters de saveur, la maturation du fromage); Traitement des déchets	(Houde *et al.*, 2004; Choudhury NIT Agartala, 2015; Chandra *et al.*, 2020)
Laccase	Clarification des jus ; Industrie des papiers ; Industrie de textile; Pharmacies et cosmétiques ; Bioremédiation ; Biocapteurs pour les substrats phénoliques ; Microfuel	(Dana *et al.*, 2017)
Pullulanase	Industries du sirop de sucre; Boulangerie	(Malakar, 2010)
Phytase	Additif dans l'alimentation humaine et animale ; Boulangerie	(Suhairin *et al.*, 2010)
Tannase	Fabrication de boissons (jus, bière et vin) ; Traitement enzymatique de la feuille de thé noir ; La production d'acide gallique ; Additif dans l'alimentation animale	(Kumar *et al.*, 2019 ; Sena *et al.*, 2014)

6.1. Xylanases

6.1.1. Substrat: xylane

La paroi cellulaire des plantes est constituée de trois polymères principaux en proportions variables : la cellulose (30-45%), l'hémicellulose (30%) et la lignine (15-30%), l'ensemble formant la lignocellulose (Tuncer,2000). Elle constitue une barrière de protection et de défense pour les plantes contre toute invasion par les agents pathogènes (Alves-Prado *et al.*, 2010). L'hémicellulose se compose de cinq monomères glucidiques à composition variés avec des chaînes courtes linéaires et ramifiés, le L-arabinose et le D-xylose sont des pentoses, tandis que le D-galactose, le D-glucose, le D-mannose sont des hexoses (Khelil, 2017). Le xylane est le principal glucide entrant dans la composition des hémicelluloses, dont sa concentration peut atteindre 30% dans la paroi cellulaire des plantes annuelles, 15 à 30% dans les bois durs et 7 à 10% dans les bois tendres (Singh *et al.*, 2003). Après la cellulose, le xylane est considéré comme le deuxième polymère le plus abondant dans la nature et représente un tiers de l'ensemble du carbone organique renouvelable de la planète (Prade, 1996). Dans la paroi cellulaire, le xylane est présent à l'interface entre la lignine et la cellulose, il contribue dans la cohésion des fibres et le maintien de la paroi cellulaire de la plante (Motta *et al.*, 2013).

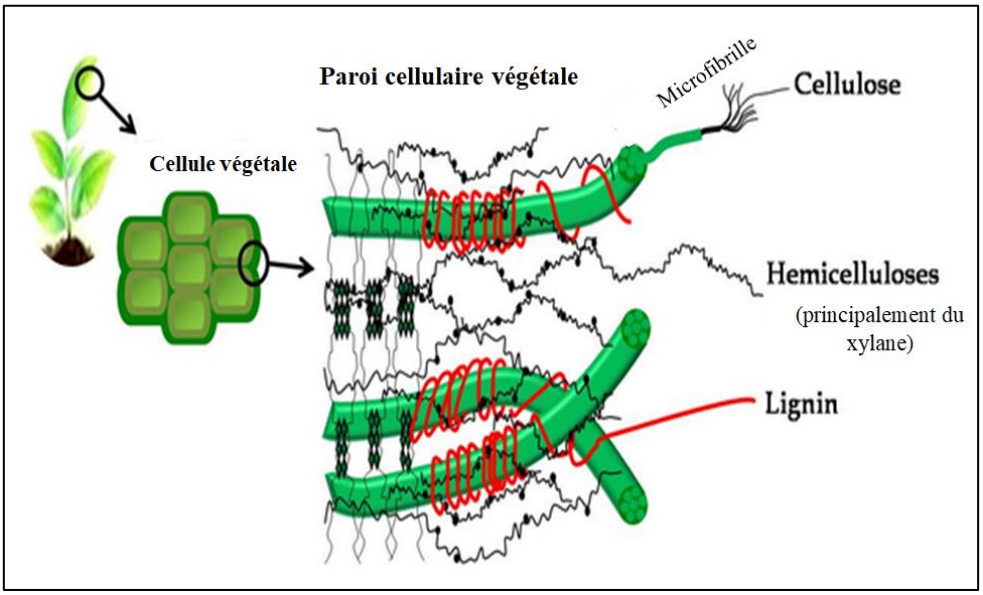


Figure 3. Diagramme schématique des parois cellulaires végétales (Ratanakhanokchai *et al.*, 2013).

La structure du xylane varie d'une espèce végétale à l'autre, il s'agit généralement d'un polysaccharide hautement ramifié, dont la structure de base consiste en un squelette linéaire d'unités D-xylopyranose liées au β-1,4, avec un degré de polymérisation compris entre 100 et 200 unités de xylose (Assamoi *et al.*, 2009). Sur ce squelette de base se greffent des branches latérales dont la proportion et la répartition varient selon les espèces végétales (Chemin, 2014). La chaîne principale du xylane est analogue à celle de la cellulose, bien qu'elle soit composée de D-xylose au lieu de D-glucose, elle est substituée par des résidus de l'α-L-arabinose, l'acide α-D-glucuronique, l'acide 4-O-méthyl-glucuronique (MeGlcA), acide acétique (Li *et al.*, 2016). Les substituants peuvent également être estérifiés avec les acides férulique, sinapique et p-coumarique, qui sont des composants des parois cellulaires des plantes et sont considérés comme des ornementations latérales des xylanes (Dimarogona et Topakas, 2016). Dans lequel l'acide férulique joue un rôle important, en se liant à d'autres polysaccharides de la paroi cellulaire par des liaisons ester et à la lignine par des liaisons éther, en contribuant à l'extension de la paroi cellulaire (de Oliveira *et al.*, 2015).

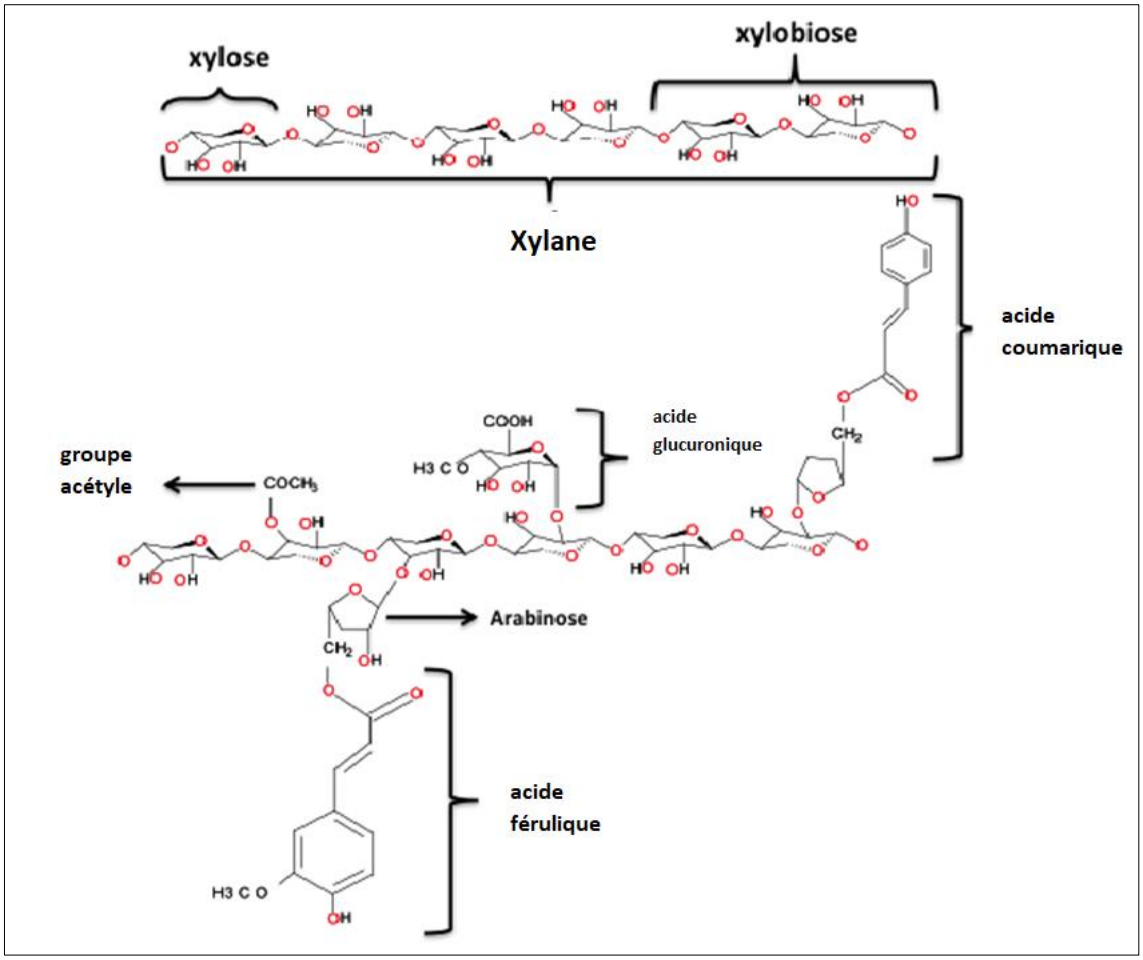


Figure 4. Structure de xylane (Alvarez Cervantes, 2016)

6.1.2. Les différents types de xylane

Sur la base de différentes substituants existantes sur le squelette de xylane, il est classé dans les catégories suivantes :

6.1.2.1. Homoxylane : Ce type de xylane est constitué uniquement par les monomères de xylose, il est rarement présent dans la nature, il a été isolé à partir de l'alfa, les tiges de tabac et les cosses de graines de guar (Hsieh and Harris, 2019).

6.1.2.2. Arabinoxylane : La chaine linéaire de xylane peuvent être substituées par de l'α-L-arabinofuranose en position O-2 ou O-3, ou les deux (Li et Du, 2019).

6.1.2.3. Glucuronoxylane : L'acide α-D-glucuronique (ou de son dérivé 4-O-méthyle) est le seul substituant en position O-2 des résidus xylosyle (Mirande, 2009).

6.1.2.4. Glucuronoarabinoxylane : Dans lequel l'acide α-D-glucuronique (et 4-O-méthyl-α-D-glucuronique) et l'α-L-arabinose sont tous deux présents, les xylanes sont appelés glucuronoarabinoxylanes (GAX) ou arabinoglucuronoxylanes (AGX) , selon la proportion majoritaire de ces deux substituants (Motta *et al.*, 2013).

6.1.2.5. Galactoglucuronoarabinoxylane : Des résidus de β-D-galactopyranose déposés sur les chaînes latérales de xylane, les plantes vivaces sont caractérisées par ce type de xylane (Motta *et al.*, 2013).

6.1.2.6. Hétéroxylanes : Les chaînes latérales sont constitués par des monosaccharides ou de courtes chaînes latérales d'oligosaccharides en position O-2 ou O-3, tels que α-L-arabinofuranose ou α-D-glucuronique, des groupes acétyle, des esters d'acide phénolique, tels que les esters de férulate ou de p-coumarate (Mazumder *et al.*, 2012).

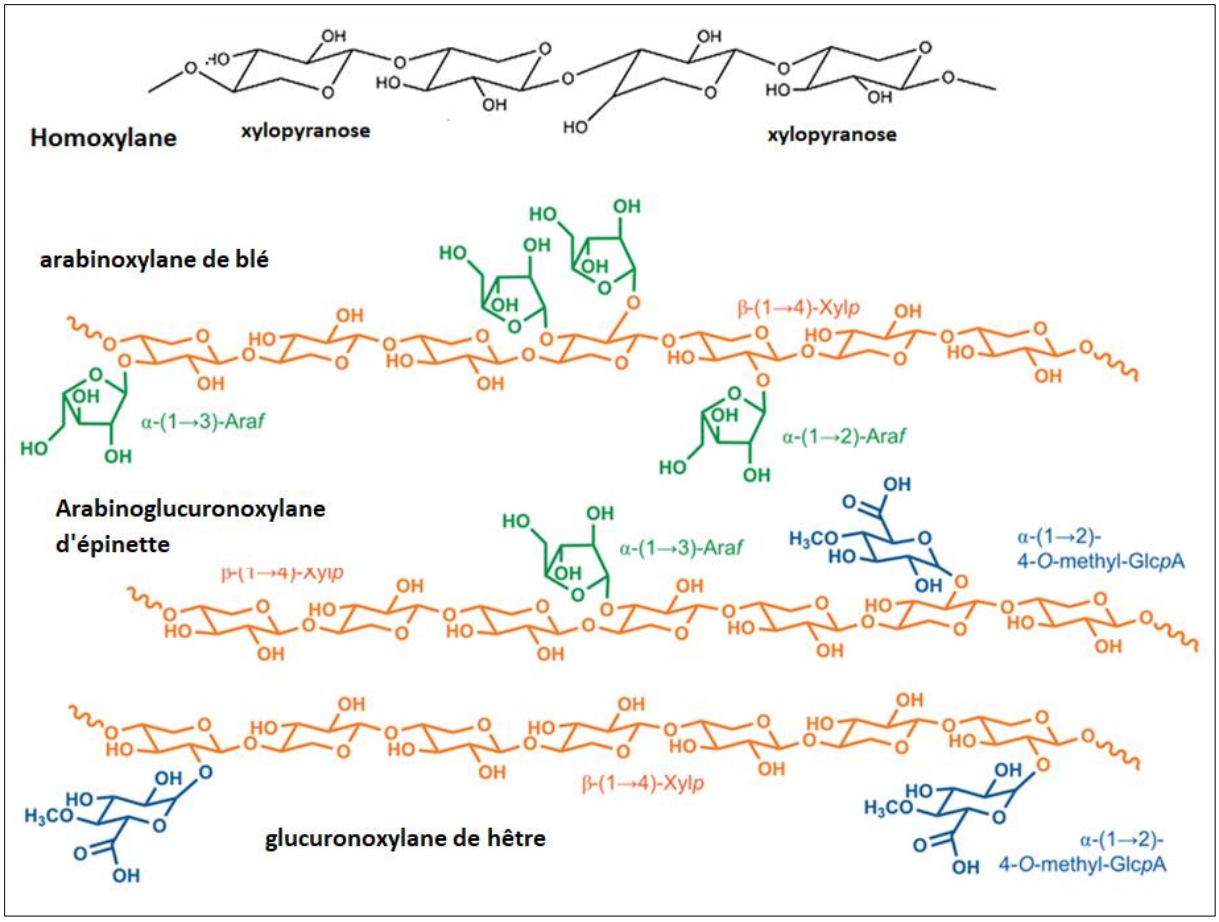


Figure 5. Structure de différents types de xylane (Dey et Roy, 2018; Tõlgo *et al.*, 2023)

6.1.3. Le complexe xylanolytique

Le xylane, du fait de sa complexité, sa décomposition totale requiert la participation de plusieurs enzymes aux fonctions distinctes et complémentaires (Walia *et al.*, 2017), compte tenu du fait que toutes les liaisons xylosides ne sont pas accessibles pour une même enzyme et que l'accessibilité diffère selon les étapes de l'hydrolyse (Juturu et Wu, 2012). La présence de substituants dans le xylane génère des difficultés au moment de la dégradation, si bien que l'interaction entre les enzymes xylanolytiques capables de scinder les chaînes principales et les chaînes latérales est essentielle, telles que la xylanase (EC 3.2.1.8), la β-xylosidase (EC 3.2.1.37), la α-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), la α-D-glucuronidase (EC 3.2.1.139) et de l'acétyl xylan estérase (EC 3.1.1.72) (Rahman *et al.*, 2011; Liao *et al.*, 2015). Les enzymes tels que l'α-L-arabinofuranosidase, l'α-glucuronidase et l'acétyl xylan estérase, en fonction de la chaîne latérale attachée au xylane, assurent la fragmentation totale du xylane en un monomère, le xylose (Khelil, 2017). Dans ce contexte, plus de 13 xylanases différentes ont été isolées à partir de filtrats de culture *d'Aspergillus niger*, de *Trichoderma viride* et de

Talaromyces emersonii, qui montrent des spécificités variables vis-a-vis les séquences non substituées et les résidus substitués, par exemple la xylanase de *Talaromyces emersonii* nécessite au moins 24 résidus xylose non substitués pour être active, tandis que l'activité de xylanase de *Bacillus subtilis* exige la présence d'acide 4-O-méthyl glucuronique à proximité des sites de clivage du xylan (Teplitsky *et al.*, 2000).

6.1.3.1. Les endo-1,4-β-xylanases

Les endo-1,4-β-xylanases (EC 3.2.1.8) sont produites essentiellement par les microorganismes du sol en dégradant les résidus de plantes (Gorbacheva et Rodionova, 1977). C'est la principale enzyme impliquée dans la dégradation du xylane, elle a la particularité de rompt le squelette principal du xylane de manière aléatoire ce qui le rend plus accessible par d'autres enzymes, en produisant des xylooligosaccharides linéaires et ramifiés (Kormelink, 1992). Au début de l'hydrolyse, les produits principaux sont des oligomères de β-D-xylopyranosyle, ultérieurement, des mono-, di- et trisaccharides de β-D-xylopyranosyle peuvent être générés (Polizeli *et al.*, 2005). En général, la présence de groupes latéraux entrave le progrès des endoxylanases (Gielkens, 1999). L'hydrolyse du xylane par une endoxylanase peut être écrite de la manière suivante:

$$H(C_5H_80_4)n\ OH + H_2O \rightarrow H(C_5H_80_4)\ np\ OH + H(C_5H_80_4)\ p\ OH$$

6.1.3.2. Les β-xylosidases

La 1,4-β-D-xylosidase (EC 3.2.1.37) agit sur les résidus de xylose d'extrémités non réducteurs provenant des xylooligosaccharides produites par les endoxylanases (Jordan et Wagschal, 2010). En général, la β-xylosidase est associée aux cellules des bactéries et des levures, et elle est librement excrétée dans le milieu extérieur pour les champignons (Saha, 2003).

6.1.3.3. Les α-arabinofuranosidase

La α-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) élimine les résidus de L-arabinose substitués aux positions 2 et 3 du β-D-xylopyranosyl (Sharma et Sharma, 2021).

6.1.3.4. Les α-glucuronidases

Les α-glucuronidases (EC 3.2.1.139) hydrolysent la liaison α-1,2-glycosidique entre l'acide 4-O-méthyl-α-glucuronique et la chaine de xylose de petits xylooligosaccharides (Yeoman *et al.*, 2010).

6.1.3.5. Les estérases

- **Acétyl xylan estérases** (EC 3.1.1.72) : éliminent les groupes O-acétyl des positions C-2 et C-3 des résidus de xylose dans le xylane et les xylooligomères (Shallom et Shoham, 2003).

- **Acide férulique estérases** (EC 3.1.1.73), et **acide *p*-coumarique estérases** (EC 3.1.1.1) : L'acide coumarique et l'acide férulique sont des acides qui forment une liaison ester avec les unités a-L arabinofuranose attachées au squelette du xylane, ils forment également des liaisons transversales avec la matrice de lignine, donnant un soutien structurel à la paroi cellulaire et protégeant la chaîne de xylane de la dégradation en empêchant l'accès de la xylanase au polymère. Les acide férulique estérases et les acide *p*-coumarique estérases éliminent ces liaisons, ouvrant ainsi la structure de la paroi cellulaire et permettant à la xylanase d'accéder plus facilement au polymère de xylane (Schyns, 1997).

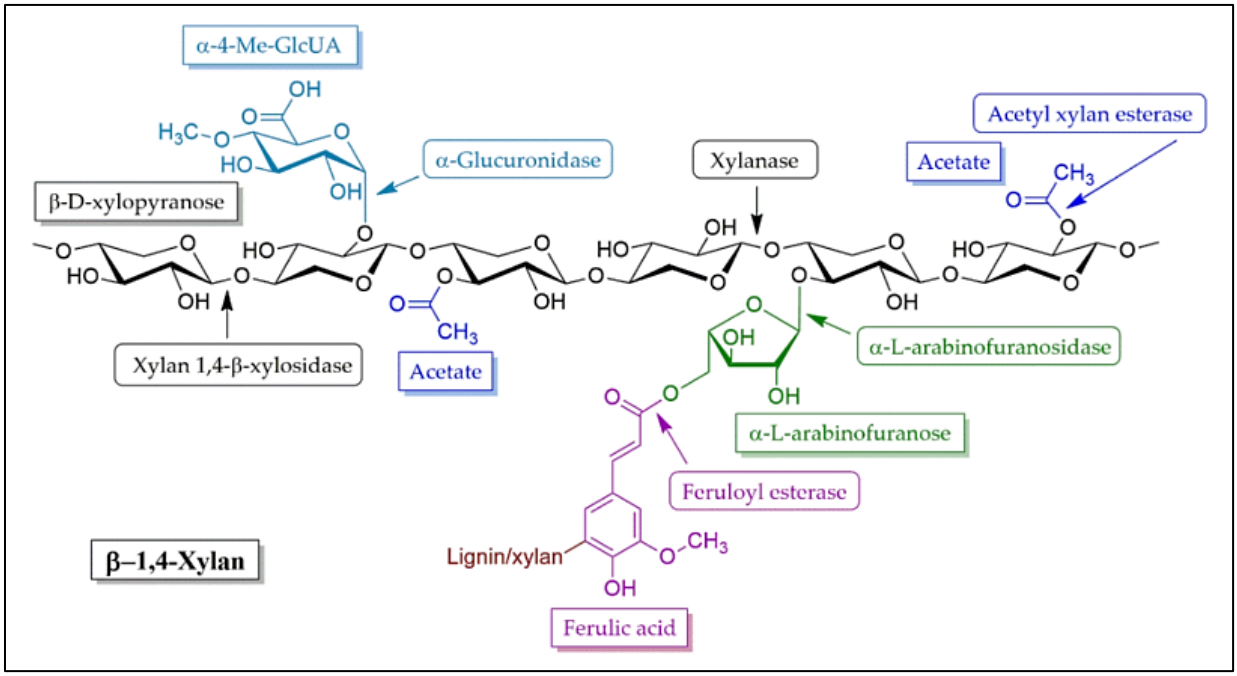


Figure 6. Schéma représentative de différentes enzymes responsables à la dégradation de xylane (Kumla *et al.*, 2020).

6.1.4. Action synergique entre les différentes xylanases

Le polymère de xylane ne pouvait pénétrer dans les cellules, sa dégradation doit d'abord commencer à l'extérieur de la cellule, les champignons tels qu'*Aspergillus* et *Trichoderma* sécrètent une multitude de xylanases extracellulaires, dégradant complètement le xylane en dimères et monomères à l'extérieur de la cellule, tandis que certaines souches de

Bacillus sécrètent une xylanase extracellulaire qui dégrade partiellement le xylane en oligosaccharides qui sont ensuite introduits dans la cellule par des perméas spécialisés puis dégradés sous l'action de xylanases intracellulaires (Teplitsky *et al.*, 2000; Malgas *et al.*, 2019). L'un des principaux aspects de la dégradation du xylane est la synergie créée entre les différentes enzymes, les enzymes accessoires ne peuvent éliminer que les chaînes latérales des xylooligosaccharides, de sorte que ces enzymes ont besoin des xylanases pour hydrolyser partiellement le polysaccharide structurel, avant que les chaînes latérales puissent être clivées (Yin *et al.*, 2010). Deux types de synergie entre de telles enzymes ont été décrits :

6.1.4.1. Homéosynergie

Une synergie est établie entre les enzymes xylanolytiques telles que les endoxylanases, les exo-xylanases et les xylosidases, à savoir que les xylosidases dégradent en xylose les xylooligosaccharides obtenus suite à l'action des exo- et des endoxylanases (Malgas *et al.*, 2019).

6.1.4.2. Hétérosynergie

Interaction synergique entre les enzymes d'hydrolyse de la chaîne latérale et de la chaîne principale: l'action de l'enzyme qui libère la chaîne principale facilite la libération d'un substituant, qui est à son tour clivé par les enzymes qui libèrent la chaîne latérale, tels que hétérosynergies qui ont été distingués entre les estérases de l'acide férulique et les endoxylanases, les α-L-arabinofuranosidases et les endoxylanases, les acétyle-xylane estérases et les endoxylanases, ainsi qu'entre les α-glucuronidases et les endoxylanases (Bedford et Partridge, 2010). L'hydrolyse de l'arabinoxylane est limitée par l'estérification de l'hémicellulose en composés phénoliques tels que l'acide férulique, qui est estérifié avec les résidus d'arabinose dans les xylanes (5-O), une estérase de l'acide férulique doit intervenir pour assurer l'hydrolyse de la liaison ester entre l'acide férulique et l'hémicellulose, en agissant en synergie avec d'autres xylanases (Kheder, 2007 ; Garcia *et al.*, 1998). Le son de blé est riche en arabinoxylane, qui ne peut être dégradé directement par les endoxylanases, Il faudrait d'abord que les α-arabinofuranosidases agissent pour permettre l'entrée des endoxylanases (Álvarez-Cervantes *et al.*, 2016). L'action coopérative de système de dégradation du xylane de l'actinomycète thermophile *Thermomonospora fusca*, a été étudié après avoir incubé des préparations enzymatiques avec de l'acétyl xylane, la libération d'acide acétique de l'acétyl xylane par l'acétylestérase était nettement améliorée par l'ajout d'endoxylanase (Bachmann et McCarthy, 1991).

6.1.5. Microorganismes xylanolytiques

Les xylanases sont produites par un large éventail de bactéries, d'actinomycètes et de champignons provenant de divers environnements, notamment le sol, les milieux marins, le tube digestif des ruminants, et les intestins des insectes xylophages (Tran *et al.*, 2021; Uffen, 1997; Sharma et Sharma, 2021).

6.1.5.1. Les xylanases bactériennes

Les xylanases bactériennes sont préférées aux xylanases fongiques car les bactéries peuvent être cultivées rapidement et sont faciles à manipuler génétiquement, tandis que les champignons nécessitent un temps de génération lent, souvent accompagné de la coproduction de polymères très visqueux avec une faible pénétration de l'oxygène (Gaur *et al.*, 2015). Le pH optimal pour les xylanases bactériennes est neutre ou alcalin, tandis que pour les xylanases fongiques, il est acide (Chakdar *et al.*, 2016). En général, les xylanases bactériennes sont plus thermostables que les xylanases fongiques, la bactérie thermophile *Bacillus stearothermophilus* produit une xylanase thermostable à 80°C (Haberra, 2014). Les bactéries ruminantes du groupe des bactéroïdes produisent de la xylanase, qui contribue à l'hydrolyse des polysaccharides, augmentant ainsi l'absorption des nutriments et améliorant la digestibilité chez l'animal (Kapilan et Arasaratnam, 2017). Les actinomycètes contiennent des espèces importantes capables d'hydrolyser le xylane, *Streptomyces sp*. est connue pour être l'espèce xylanolytique puissante des actinomycètes, *Streptomyces roseiscleroticus* sécrète une xylanase thermostable avec une activité élevée et sans activité cellulasique (Rifaat *et al.*, 2006 ; Sathya, 2012; Rahmani *et al.*, 2019).

Les *Bacillus* sont des bactéries à Gram positif, en forme de bâtonnets, aérobies ou anaérobies facultatives, formant des spores appartenant à l'embranchement des Firmicutes, elles sont répandues dans divers environnements, y compris le sol, l'air, l'eau, les légumes, les aliments, l'intestin humain, et les animaux (Elshaghabee *et al.*, 2017). Parmi les bactéries, les espèces de *Bacillus* sont des organismes attrayants pour les usages industriels en raison de leur taux de croissance rapide, qui permet des temps de fermentation courts, et de leur aptitude à produire de nombreuses enzymes hydrolytiques (Lee *et al.*, 2016), telles que l'amylase de *Bacillus licheniformis* (Ikram-ul-Haq *et al.*, 2003), la protéase de *Bacillus cereus* (Ghorbel-Bellaaj *et al.*, 2012), la lipase de *Bacillus subtilis* (Suci *et al.*, 2018), la cellulase de *Bacillus albus* (Abada *et al.*, 2021), la levansucrase de *Bacillus circulans* (Perez Oseguera *et al.*, 1996), la chitinase de *Bacillus thuringiensis* (Martínez-Zavala *et al.*, 2020), la tannase de *Bacillus licheniformis* (Das Mohapatra *et al.*, 2009). Le marché mondial des enzymes

industrielles est estimé à 1,6 milliard de dollars, répartis entre 20% pour l'alimentation humaine, 15 % pour l'alimentation animale et 56% pour les enzymes à usage industriel général, où *Bacillus sp.* occupant environ 50% du marché (Rashid et Sohail, 2021).

Les espèces de *Bacillus* sont des producteurs notables de niveaux élevés d'activité xylanase à un pH alcalin et à haute température (Subramaniyan et Prema, 2002). *B. circulans*, *B. Stearothermophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, et *B. halodurans* auraient une activité xylanolytique considérable, produisant des xylanases présentant une stabilité alcaline et thermique (Chakdar *et al*., 2016). Une xylanase de *Bacillus halodurans* C-12 a montré une activité optimale à 70°C et pH 9 (Lin *et al.*, 2013). Une endoxylanase de *Bacillus brevis* ATCC 8246 était stable à des températures entre 45°C et 90°C (Goswami *et al.*, 2013). Une forte activité de xylanase (36633 UI/mg), a été produite par la souche de *Bacillus subtilis* CXJZ, avec une température optimale à 60°C (Guo *et al.*, 2012).

6.1.5.2. Les xylanases fongiques

Les champignons sont des producteurs de xylanase de grand intérêt, car ils sécrètent des enzymes extracellulaires en quantité plus importante que les levures et les bactéries (Kulkarni *et al.*, 1999). Il est apparu que les genres fongiques *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* et *Pichia* étaient les principaux producteurs de xylanase (Adsul *et al.*, 2005). Malgré le haut niveau de production, l'inconvénient des xylanases fongique est la présence d'une activité cellulasique importante, les xylanases fongiques sont généralement associées à des cellulases (Gilbert et Hazlewood, 1993). *Trichoderma reesei* a produit des niveaux élevés de xylanase, mais a été associé à une activité cellulasique considérable **(**Subramaniyan et Prema, 2002). Les xylanases fongiques sont principalement acidophiles, ce qui présente de nombreuses valeurs industrielles, car les conditions de réaction acides permettent à la fois aux enzymes de travailler efficacement et au substrat d'être plus sensible à la transformation (Dey et Roy, 2018).

Tableau 2. Micro-organismes producteurs de xylanases.

Microorganismes	Xylanase (U/mL)	Incubation	Substrat	Références
Bactéries				
Streptomyces sp.	27.77	pH =5.0, T° =35°C	Son de blé	(Coman et Bahrim, 2011)
***B. pumilus* 5015**	372	pH =6.0, T°=33°C	Son de blé	(Thomas *et al.*, 2014)
Streptomyces thermovulgaris	274.49	pH=7.11, T° =50°C	Paille de riz	(Chaiyaso *et al.*, 2011)
***B. pumilus* VLK-1**	7,295	pH =7, T° =30°C	Xylane de bouleau	(Kumar *et al.*, 2013)
B. tequilensis	86.62	pH =7, T° =40°C	Xylane de bouleau	(Khusro *et al.*, 2016)
***B. tequilensis* SH0**	41.3	pH =5.5, T° =45°C	Son de blé	(Kumar *et al.*, 2014)
Bacillus sp.	49.0	pH =9, T° =37°C	Son de blé	(Yang *et al.*, 1995)
B. subtilis	12.0	pH =6, T° =50°C	Xylane d'épeautre d'avoine	(Sá-Pereira *et al.*, 2002)
B. subtilis	128.0	pH =9, T° =55°C	Xylane d'épeautre d'avoine	(Annamalai *et al.*, 2013)
***B. pumilus* B20**	313.0	pH =7.5, T° =37°C	Son de blé	(Geetha et Gunasekaran, 2010)
Bacillus pumilus	120	pH =5.5, T° =40°C	Bagasse de la canne à sucre	(Kumar *et al.*, 2010)
B. amyloliquefaciens	10.5	T° =37°C	Xylane de bouleau	(Amore *et al.*, 2015)
B. pumilus	2.5	pH =7, T° =65°C	Feuille de maïs	(Begam *et al.*, 2015)
B. weihenstephanesis	426.0	pH =6, T° =37°C	Écorce de pastèque	(Harris et Chidambaram, 2015)
B. subtilis	18.87	pH =6.5, T° =37°C	Zeste d'ananas	(Heng, 2014)
***B. circulans* D1**	22.45	pH =9, T° =45°C	Xylane de bouleau	(Bocchini *et al.*, 2002)
***B. pumilus* ASH**	5407	pH =8, T° =37°C	Son de blé	(Battan *et al.*, 2012)
Champignons				
Penicillium oxalicum	14.50	pH=7.38,T° =31°C	Son de blé	(Li *et al.*, 2007)
***Aspergillus flavus* DFR-6**	31.4	pH =5.0, T° =35°C	Son de blé	(Pal et Khanum, 2011)
Thermomyces lanuginosus	2.70	pH =6.5, T° =50°C	Epi de maïs	(Purkarthofer *et al.*, 1993)
***Penicillium* sp.WX-Z1**	46.50	pH =5, T° =30°C	Son de blé	(Cui et Zhao, 2012)

6.1.6. Régulation de la synthèse de la xylanase

La production de xylanase par diverses bactéries et champignons est inductible (Hrmová *et al.*, 1989). L'induction de la xylanase est un mécanisme complexe, et le niveau de réponse à un inducteur varie d'un organisme à l'autre, un inducteur induisant une activité maximale de la xylanase chez une espèce peut être l'inhibiteur de l'activité chez une autre (Srivastava et Srivastava, 1993).

L'effet inducteur des substrats de xylane dépend de leur composition chimique (Guerreiro *et al.*, 2001). Naturellement, les enzymes xylanolytiques sont induites par les différents produits intermédiaires générés par leur propre action, le xylane étant un polymère de poids moléculaire élevé, il ne peut pas stimuler la xylanase car il ne peut pas pénétrer dans les cellules microbiennes, la xylanase était induite par certains fragments de xylane qui sont générés par l'action de petites quantités d'enzyme extracellulaire qui libèrent des xylo-oligomères de faible poids moléculaire, c'est-à-dire xylobiose, xylotriose, xylotétraose, qui peuvent être transportés dans la cellule où ils sont ensuite dégradés par les β-xylosidases et les xylanases intracellulaires qui induisent davantage la synthèse de xylanase (Thomson, 1993; Kyu *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 2005; Bhardwaj *et al.*, 2019).

Le xylobiose, un inducteur de faible masse moléculaire, a stimulé la synthèse de xylanase par *Trichoderma reesei* PC-3-7 (Xu *et al.*, 1998). Un certain nombre de champignons produisent des niveaux d'activité xylanase plus élevés lorsqu'ils poussent sur la cellulose que lorsqu'ils poussent sur le xylane, tandis que *Penicillium kloeckeri* produit spécifiquement des xylanases lorsqu'il pousse sur le xylane (Sachslehner *et al.*, 1998). Les substrats complexes contenant du xylane, tels que le son de blé et les rafles de maïs, sont de bons inducteurs de xylanases, dans les milieux composés de substrats lignocellulosiques, l'ajout de sucres facilement métabolisés à des concentrations supérieures 3% (*p/p*) réprime les gènes des xylanases, par example, le glucose, le xylose, le sucrose et le fructose ajoutés à *Trichoderma asperellum* cultivé sur des fruits de palmier à huile a considérablement réduit la production de xylanase par la répression catabolique des gènes de la xylanase (Najjarzadeh *et al.*, 2020). La production de xylanase est réprimée chez *Cryptococcus albidus* par l'ajout de xylose (Biely et Vršanská, 1988). La répression des catabolites par le glucose est un phénomène fréquent rencontré dans la production des xylanase (Morosoli *et al.*, 1989). Cependant, le xylose est bien connu pour être un inducteur puissant chez *Aspergillus fischeri* (Chandra, 1995). La xylanase et xylosidase dans *Butyrivibrio fibrisolvens* GS 113 sont induites par le xylane et inhibées par le glucose (Utt *et al.*, 1991).

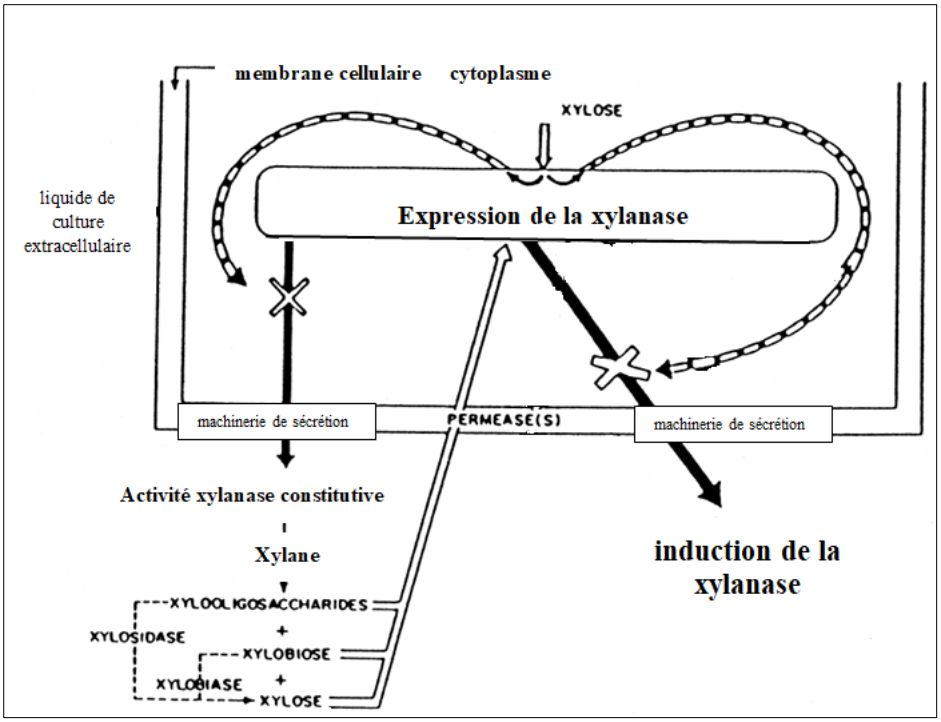


Figure 7. Régulation de la biosynthèse de la xylanase (Kulkarni *et al.*, 1999).

6.1.7. Classification des xylanases

6.1.7.1. En fonction des propriétés catalytiques et physico-chimiques

Wong *et al.*, (1988) ont classé les xylanases en deux groupes sur la base de leurs propriétés physicochimiques : celles de faible poids moléculaire (<30 kDa) et de pI basique, et l'autres de grand poids moléculaire (>30 kDa) et de pI acide. Cependant, Collins *et al.*, (2005) signalent que cette classification était imprécise, et ne permet pas de classer 30 % des endoxylanases fongique.

6.1.7.2. En fonction des produits d'hydrolyse

Les produits de l'hydrolyse du xylane sous l'action des endoxylanases sont des xylooligosaccharides et dans des cas exceptionnels, du xylose, une autre classification des endoxylanases en productrices et non productrices de xylose a été créée lorsque la présence de xylose n'était pas due à une contamination par des β-xylosidases, mais cette classification reste difficile à réaliser sans une connaissance précise du mode d'action des xylanases (Gosselin-Debeire, 1991).

Certaines endoxylanases ayant des spécificités différentes et donnant des produits différents, les unes sont capables de couper les branches initiées par les L-arabinosyl et de produire du L-arabinose, les autres sont incapables de débrancher le xylane et de produire du

L-arabinose, par conséquent, il est possible de classer les endoxylanases en fonction de leur action sur le xylane substitué comme dégradatrice et non dégradatrices des xylanes substitués (Frederick *et al.*, 1985).

6.1.7.3. En fonction de spécificité enzymatique

a. **Les endoglucanases possédant une activité endoxylanase :** Parfois, la CMC et le xylane peuvent être digérés par la même cellulase, des préparations pures de cellulase peuvent dégrader simultanément la cellulose et le xylane (Wong *et a1*., 1988).

b. **Les endoxylanases possédant une activité cellulase :** Certaines espèces de *Bacillus* et de champignons sécrètent des xylanases extracellulaires, qui sont parfois accompagnées d'une activité cellulasique (Kamble et Jadhav, 2012).

c. **Les endoxylanases vraies totalement exempte d'activité cellulase :** Certaines espèces de *Bacillus* ayant la capacité de produire des taux élevés de xylanases dépourvue de toute trace d'activité cellulase tels que, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus aerophilus* (Khelil, 2017).

6.1.7.4. En fonction de l'homologie de séquence en acides aminés

Les xylanases appartiennent au groupe des glycosides hydrolases, elles sont réparties en deux familles GH10 et GH11, la famille GH10 regroupe les xylanases bactériennes, fongiques et végétales, tandis que la famille GH11 ne comprend que des enzymes fongiques et bactériennes, mais ils existent également d'autres xylanases classés dans d'autres familles, comprennent GH5, 7, 8 et 43 (Chakdar *et al.*, 2016). Les xylanases de la famille 10 présentent une structure typique de tonneaux α / β de huit plis, les xylanases de la famille 11 possèdent une architecture en rouleau β avec deux feuilles β parallèles et une hélice α (Linares-Pastén *et al.*, 2018). Généralement, La famille 10 inclue les enzymes acides avec une masse moléculaire élevée, tandis que la famille 11 regroupe les enzymes basiques de petite masse moléculaire et dépourvues de cellulase (Collins *et al.*, 2002;Verma et Satyanarayana, 2012). En outre, les xylanases de la famille 11 ont une grande sélectivité de substrat et une grande efficacité catalytique, ce qui leur permet d'être considérées comme de "vraies xylanases" (Walia *et al*., 2017).

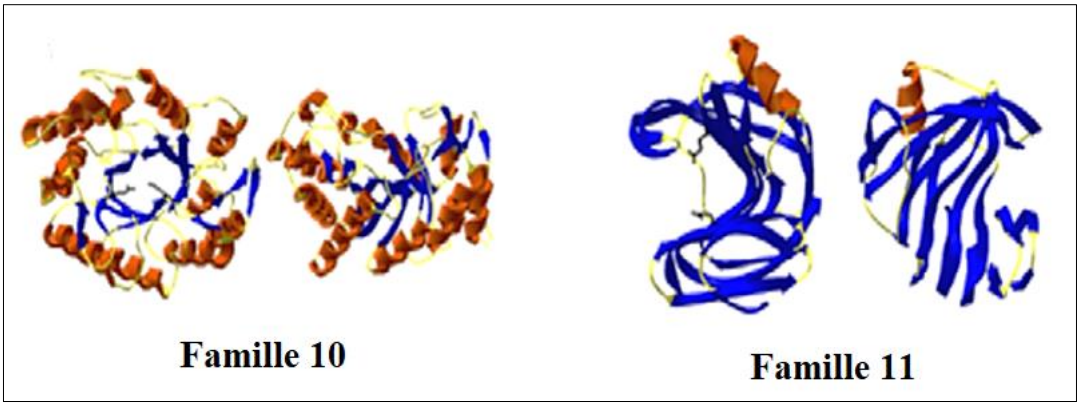


Figure 8. Structures représentatives d'enzymes de la famille 10 et 11 (Collins *et al.*, 2005).

6.1.8. Application

6.1.8.1. Industrie du papier

Le processus kraft est un procédé de transformation du bois en pâte à papier, ce qui permet d'obtenir une pâte contenant de la lignine, associée à du xylane et de la cellulose, la présence de lignine est à l'origine de la couleur brune de la pâte, un traitement de blanchiment consiste à extraire la lignine résiduelle par utilisation de chlore et de dioxyde de chlore, est nécessaire pour éliminer cette couleur, les dérivés chlorés résultant de ce processus d'extraction sont extrêmement toxiques (Clarke *et al.*, 1997). Des rapports ont révélé que les enzymes peuvent être employées dans le blanchiment de la pâte afin de retirer la lignine de la pâte (Ozer *et al.*, 2018), réduisant la quantité de chlore et de dioxyde de chlore employée dans le blanchiment, permettant ainsi le passage à un processus industriel écologique (Sharma *et al.*, 2007).

6.1.8.2. Transformation des aliments pour animaux

Les régimes céréaliers (seigle, orge, avoine, blé) sont une source majeure de polysaccharides, tels que les arabinoxylanes, qui ont une nature visqueuse ce qui augmente la viscosité intestinale chez les animaux de ferme, conduit à une mauvaise digestibilité des nutriments et peut potentiellement causer des maladies chez les animaux, pour cela il est nécessaire d'introduire des enzymes alimentaires commerciales dans ces régimes afin d'améliorer de manière significative la digestibilité des nutriments et de réduire les risques de maladies (Topakas *et al.*, 2013). Depuis 1980, diverses enzymes ont été introduites dans l'alimentation animale, notamment la xylanase, la glucanase, la pectinase, la galactosidase et la lipase (Dutta *et al.*, 2018).

6.1.8.3. Industrie alimentaire

L'hémicellulose contenue dans la farine pourrait être décomposée sous l'action d'hémicellulases, dont la xylanase, qui agissent sur la structure de la pâte en la rendant plus facile à pétrir, elles retardent la formation de la mie et facilitent l'augmentation du volume du pain lors de la cuisson, ainsi que les teneurs plus importantes en arabinoxylooligosaccharides dans le pain ont des conséquences positives sur la santé (Harris et Ramalingam, 2010). Les industries du jus utilisent les xylanes combinés à la pectinase et à la cellulase, qui clarifient le jus en le rendant moins trouble et moins visqueux, ce qui permet de mieux stabiliser la pulpe du fruit (Tyagi et Sharma, 2021). La xylanase pourrait être utilisée dans l'extraction du café et des huiles végétales, en aidant à découper la couche épaisse des graines (Wong et Saddler, 1992).

6.1.8.4. Industries pharmaceutiques

Les xyloligosaccharides sont des mélanges d'oligosaccharides dérivés de la dégradation du xylane, on parle de xylobiose, de xylotriose ou de xylotétrose, en fonction du nombre de résidus de xylose, le xylobiose est utilisé dans l'industrie alimentaire comme prébiotique pour ses propriétés bénéfiques en termes de santé (Chakdar *et al*., 2016). Le xylose peut également être converti en xylitol, ce dernier est utilisé comme édulcorant précieux dans le domaine pharmaceutique et alimentaires (Motta *et al*., 2013).

6.1.8.5. Production de biocarburants

La production d'éthanol à partir de lignocellulose sous l'action de microorganismes ou leurs enzymes est connue sous le nom de production de biocarburants, les lignocelluloses sont constitués par la cohésion de divers polymères comprenant la cellulose, la pectine, la lignine, et le xylane, et plusieurs enzymes telles que la xylanase, la xylosidase, la ligninase, la mannanase, la glucanase et la glucosidase peuvent être utilisées pour la production de divers biocarburants tels que l'éthanol à partir de lignocelluloses (Bala et Singh, 2019). Initialement, les lignocelluloses sont délignifiées pour libérer de la cellulose et des hémicelluloses, ensuite, la dépolymérisation de polymères pour la libération des sucres. Finalement, la fermentation pour produire de l'éthanol à partir du mélange de sucres (Kumar *et al.*, 2017).

6.1.8.6. Traitement des textiles

Le tissu de coton doit être soigneusement préparé pour la teinture et le finissage, les processus de prétraitement comprennent le désencollage des fils pour éliminer les substances adhésives, le décreusage pour donner au tissu une mouillabilité élevée et régulière pour le

blanchiment, et le blanchiment pour atteindre un niveau standard de clarté (Battan et al., 2012) . Les impuretés les plus résistantes du coton qui ne sont pas complètement éliminées même après l'utilisation de solutions plus concentrées des agents chimiques ont subi un traitement à la xylanase, qui pourrait conduire à l'hydrolyse des minuscules fibres qui s'attachent au tissu, le rendant plus accessible aux produits chimiques, réduisant ainsi la consommation de peroxyde d'hydrogène dans l'étape de blanchiment chimique qui suit. (Csiszár *et al.*, 2001).

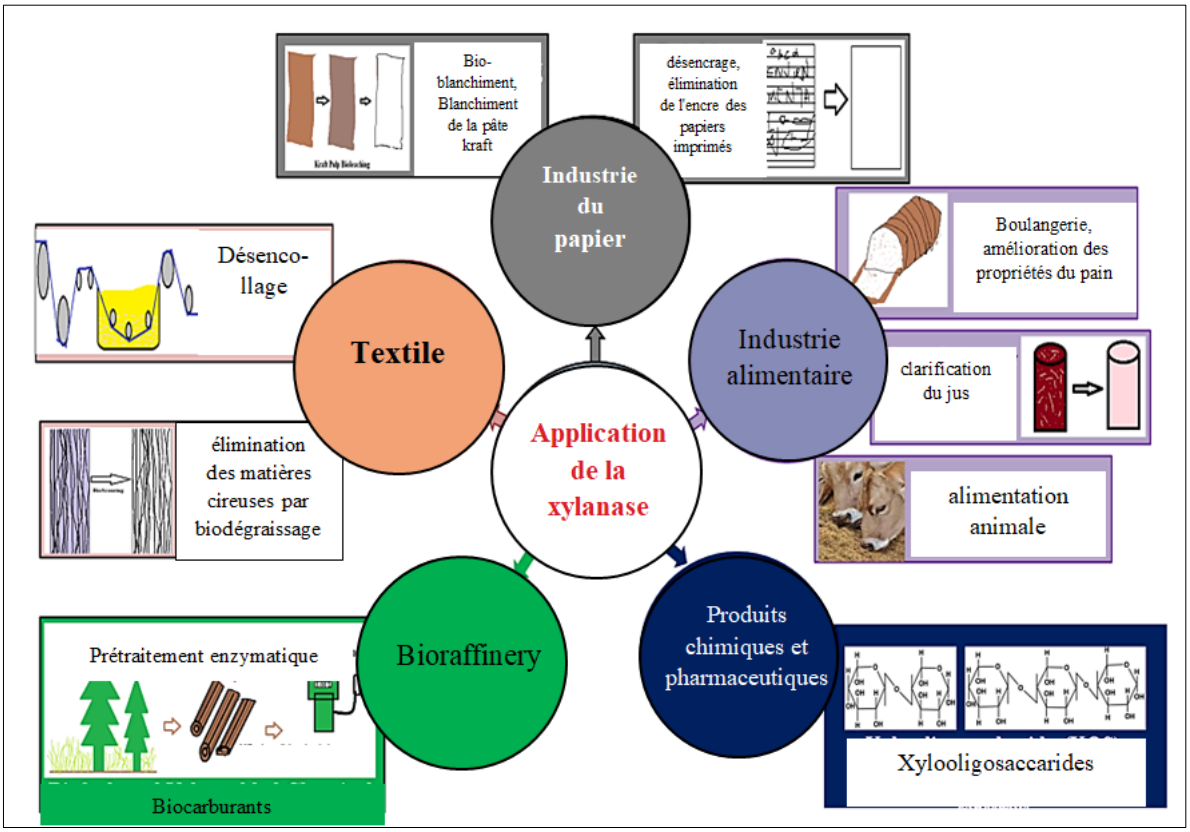


Figure 9. Les application de la xylanase dans différentes industries (Bhardwaj *et al.*, 2019)

6.2. Chitinases

6.2.1. Chitine

La chitine, un homopolymère hydrophobe constitué de N-acétyl-D-glucosamine lié par des liaisons β (1-4), qui a été synthétisé sous l'action d'une enzyme glycosyltransférase liée à la membrane nommé : la chitine synthase (Cohen, 2010). Après la cellulose, la chitine représente le polysaccharide le plus abondant dans la nature, ainsi, il constitue le polymère le plus distribué dans les milieux aquatiques (Chakrabortty *et al.*, 2012). Une grande variétés des organismes vivants ont la capacité de produire la chitine, car ce polysaccharide entre dans la structure des exosquelettes d'insectes, les coquilles de crustacés, les parois cellulaires fongiques et les coquilles d'œufs de nématodes (Chang *et al.*, 2003; Parvathy Eswari *et al.*, 2020; Merzendorfer et Zimoch, 2003).

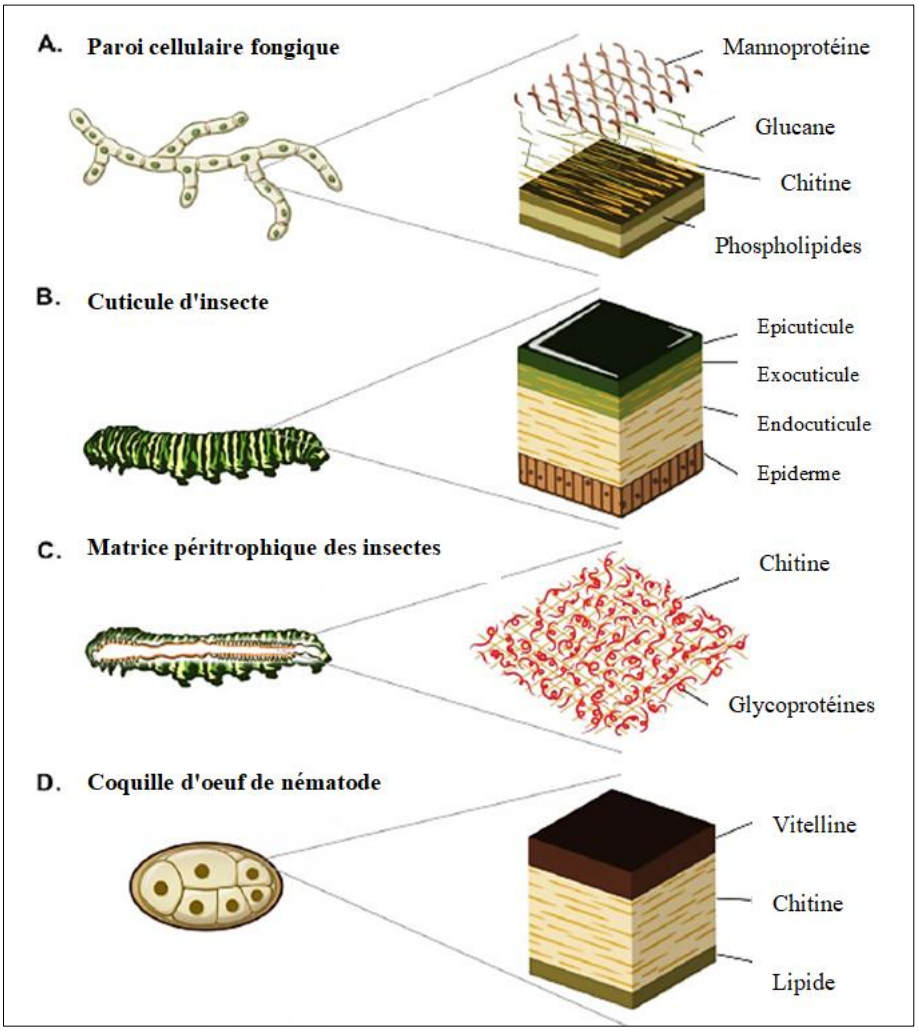


Figure 10 : Illustration schématique de différentes structures contenant de la chitine (Berini *et al.*, 2018)

La chitine se présente sous la forme de trois allomorphes qui se diffèrent par l'orientation des micro-fibrilles : la α-chitine (antiparallèle chaînes, la forme la plus existante), la *β*-chitine (chaînes parallèles) et la γ-chitine (la combinaison de chaînes parallèles et antiparallèles) (Elieh-Ali-Komi et Hamblin, 2016; Mohamed, 2015). L'α-chitine est principalement rencontré dans les carapaces de crustacés, les carapaces de coléoptères, et les parois cellulaires fongiques (Hou *et al.*, 2021), tandis que dans les becs de mollusques, la *β*-chitine domine, les cocons d'insectes sont constitués uniquement par la γ-chitine (Moussian, 2019). Les déchets des mollusques et crustacés présente 75% du leurs poids total, dont la chitine représente 20 à 58% du poids sec, et environ 1011 tonnes de chitine sont générés chaque année dans le milieu marin (Saima *et al.*, 2013). Les bactéries chitinolytiques empêche l'accumulation de la chitine dans l'environnement, car ces bactéries interviennent efficacement dans la dégradation et le recyclage de la chitine dans la nature (Lee *et al.*, 2011).

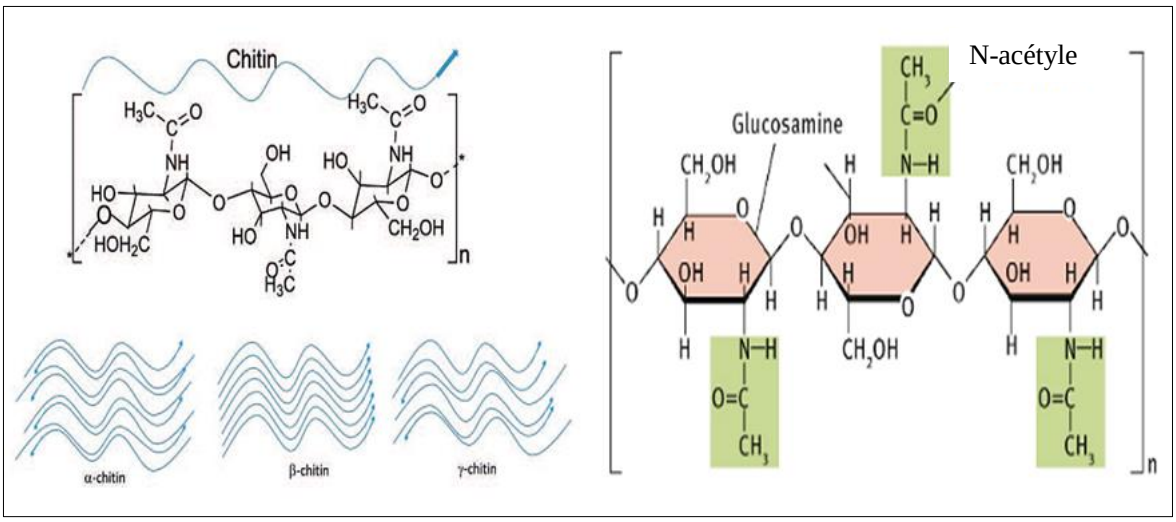


Figure 11 : Structure de la chitine et ces différentes conformations (α, β et γ-chitine) (Roy *et al.*, 2017 ; Berezina, 2016)

6.2.2. La chitinase

La présence des liaisons covalentes β(1,4) offre à la chitine une structure fortement robuste vers les agressions chimiques et biologiques, contrairement à l'amidon qui présente une liaison covalente α(1,4), qui le rend plus accessible aux enzymes hydrolytiques, le groupe N-acétyle attaché à l'unité de glucosamine rendant la chitine insoluble dans l'eau, et donc difficile à traiter ce qui limite ses applications (Berezina, 2016). Malgré ces propriétés, il existe des micro-organismes qui ont la capacité de clivé efficacement ce polymère en monomères assimilables en produisant des enzymes chitinolytiques (Maillard *et al.*, 2018).

Les chitinases (E.C. 3.2.2.14) sont les glycosyl hydrolases responsable à la dégradation des liaisons β-1,4-N-acétyl-D-glucosamine reliant les monomères de la chitine (Dravid *et al.*, 2015). Les chitinases varient considérablement dans leur taille, allant de 20 kDa à 90 kDa, les chitinases bactériennes ont une gamme de taille entre 20–60 kDa (Bhattacharya *et al.*, 2007). La chitine en tant que substrat complexe exige l'intervention de plusieurs chitinases qui le dégrade de manière synergique (Metcalfe *et al.*, 2002). Un système à deux enzymes consiste en une endochitinase et une exochitinase a été abouti à une dégradation complète de la chitine (Ren *et al.*, 2000; Galante *et al.*, 2012). En raison de la similarité entre la structure de la chitine et de la cellulose, les voies de dégradation chitinolytiques et cellulolytiques suivent des étapes similaires (Wörner et Pester, 2019).

6.2.2.1. Endochitinase (EC 3.2.1.14)

Ces enzymes fonctionne sur les sites internes de la chitine, elles clivent les liaisons de façon aléatoire, générant des oligomères de différentes tailles, tels que la chitotétraose, la chitotriose et le chitobiose qui sont composés respectivement de quatre, trois et deux unités de N-acétylglucosamine, elle était incapable de diviser la chitobiose (Dahiya *et al.*, 2006).

6.2.2.2. Exochitinases : peuvent être divisées en deux sous-catégories

a. Les chitobiosidases (EC 3.2.1.29) : ces enzymes entrainent la libération de diacétylchitobiose à partir de l'extrémité non réductrice de la chitine (Subbanna *et al.*, 2018).

b. Les N-acetylglucosaminidase (EC 3.2.1.30) : interviennent pour dégrader les produits d'hydrolyse résultent sous l'action des endochitinases et des chitobiosidases, générant des monomères de GlcNAc (Subbanna *et al.*, 2018).

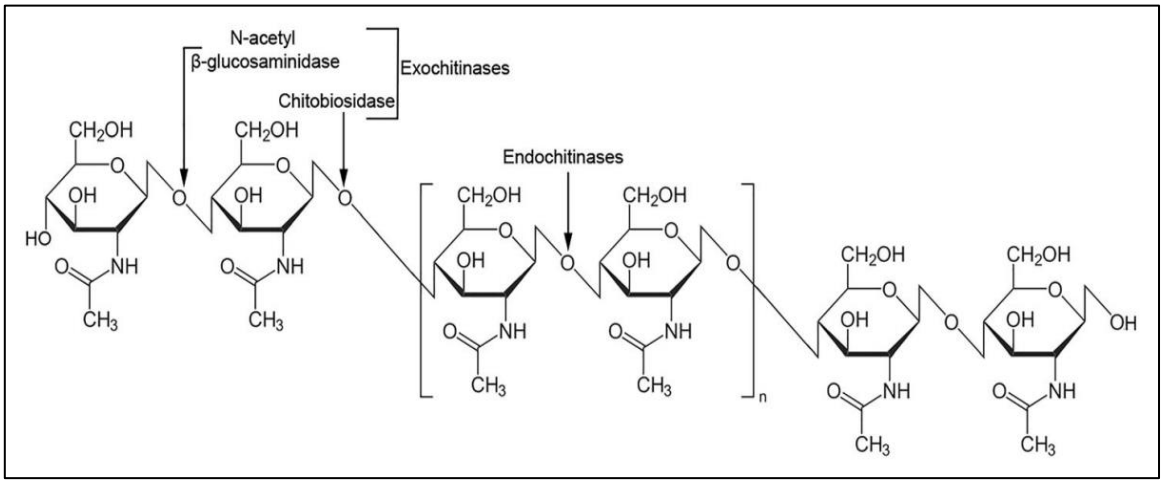


Figure 12. Mode d'action des chitinases (Mathew *et al.*, 2021).

6.2.3. Source de chitinase

Les organismes dont la structure contient de la chitine sécrètent des chitinases qui sont nécessaires à la morphogenèse des exosquelettes et des parois cellulaires. Cependant, ceux qui ne contiennent pas de chitine dans leur structure peuvent également produire des chitinases (Roberts et Selitrennikoff, 1988).

6.2.3.1. Les chitinases végétales

L'exposition des plantes à divers agents pathogènes stimule la libération de protéines de défense liées à la pathogenèse (PR) (Ali *et al.*, 2018). Le contact direct avec les phytopathogènes entraîne la sécrétion de ces protéines, et les chitinases végétales sont classées parmi cette catégorie de protéines (Kasprzewska, 2003).

La première structure fongique qui entre en contact avec les plantes est la paroi cellulaire, dont la chitine est le principal composant (Toufiq *et al.*, 2018). Les plantes, dans leurs tiges, graines, fleurs et tubercules, possèdent des endochitinases responsables de la dégradation des liaisons internes de la chitine (Kumar *et al.*, 2018). La première chitinase végétale a été découverte dans les bulbes d'orchidées en 1911 par Bernard, et leur rôle de défense contre les phytopathogènes a été bien démontré (Gálusová *et al.*, 2015).

6.2.3.2. Les chitinases d'insectes

L'ancien exosquelette de l'insecte est périodiquement renouvelé, ce processus est assuré par la sécrétion de chitinases dans le liquide de fusion situé dans l'espace entre l'ancienne cuticule et l'épiderme, les monomères de N-acétylglucosamine libérés sont alors utilisés pour synthétiser une nouvelle cuticule, ainsi que les chitinases sont également sécrétés dans l'intestin où elles interviennent en hydrolysant la chitine de la muqueuse intestinale et de la membrane péritrophique (Kramer et Muthukrishnan, 1997).

6.2.3.3. Les chitinases microbiennes

a) Les chitinases bactériennes

Une faible quantité de la chitine a été accumulé dans l'environnement, car les micro-organismes qui se développent au profil de ce polymère ont une grande efficacité d'hydrolyse, la dégradation biologique de la chitine présente des avantages parraport à la dégradation chimique qui a été apparue toxique, inefficaces et gaspillante des quantité énormes des produits chimiques et des acides (Monge *et al.*, 2018).

Dans le sol, les bactéries et les champignons coexistent, avec une compétition considérable pour les nutriments, les chitinases peuvent être impliquées dans ces interactions compétitives pour les exudats racinaires. La pointe hypophile est la zone la plus sensible de la structure fongique, car la chitine dans cette partie n'est pas associée ni aux glucanes ni aux glycoprotéines, ce qui la rend facilement attaquable par les chitinases bactériennes (Bai *et al.*, 2016).

Les bactéries chitinolytiques sont largement distribué parmi les groupes des Actinobacteries, Firmicutes, Acidobactéries et les Proteobactéries (Bai *et al*., 2016). les genres d'*Aeromonas*, *Serratia*, *Vibrio*, *Streptomyces* et *Bacillus* sont les plus représentants (Saima *et al*, 2013). *Serratia marcescens* fait partie des bactéries les plus performantes en termes de dégradation de la chitine, elle est utilisée comme système modèle pour étudier la chitinase (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2013). *Serratia proteamaculans* 3095 produit une chitinase active contre *Fusarium oxysporum*, qui infecte les concombres, la transformation de son gène d'endochitinase (chiA) dans *Escherichia coli* confère à la bactérie recombinante des propriétés inhibitrices contre le *Fusarium* similaires à celles de la souche *Serratia proteamaculan* (Chung et Kim, 2007). La capacité de biocontrôle de la chitinase produite par la bactérie endophyte *Serratia proteamaculans* 336x contre *Gaeumannomyces graminis* (le pathogène responsable de l'échaudure du blé) à été testée dans une expérience en pot sur des semis de blé, dans laquelle le gène chi1 de la chitinase de la bactérie *Serratia proteamaculans* 336x a été exprimé dans *E. coli*, la protéine recombinante a montré une activité antifongique contre *G. graminis*. Une délétion du gène chi1 par recombinaison homologue a rendu le mutant dépourvu d'activité chitinase, et son activité antifongique a été réduite de 42,5 %, le fait de réactiver le gène chi1 dans la souche mutante a rétabli l'activité de la chitinase et l'activité antifongique (Wang *et al.*, 2014). *Vibrio*, une bactérie marine, dispose tout particulièrement d'un mécanisme de dégradation de la chitine très efficace. Elle se développe à la surface des crustacés et ne se nourrit que de chitine (Rathore et Gupta, 2015; Berini *et al*., 2018). La chitoporine (VhChiP), un canal spécifique aux sucres responsable du transport des chitooligosaccharides à travers la membrane externe de la bactérie marine *Vibrio harveyi*, s'avère être le canal spécifique aux sucres le plus puissant rapporté, avec sa grande efficacité permettant à la bactérie d'absorber la chitine de l'environnement aquatique (Suginta *et al.*, 2013). Des souches du genre *Enterobacter* ont également inhibé la croissance de certains pathogènes grâce à leur production de chitinase, trois souches d'*Enterobacter agglomerans* sécrétant des chitinases différentes, ces souches ont été testées en serre contre *Rhizoctonia*

solani (l'agent responsable de la pourriture des racines du coton), et une réduction de 64 à 86% de la maladie dans le coton a été obtenue, alors que le mutant Tn5 déficient en activité chitinase ne pouvait plus protéger les plantes contre la même maladie (Chernin *et al.*, 1995). Les résultats obtenus par Sindhu et Dadarwal, (2001), suggèrent que les enzymes hydrolytiques produites par *Pseudomonas sp*., y compris la chitinase, contribuent à la suppression des maladies des plantes à travers l'inhibition de la croissance des champignons phytopathogènes et la promotion de la nodulation des légumineuses par les rhizobiums.

Les actinobactéries sont considérées comme l'une des principales bactéries de lutte biologique, grâce à leur capacité à produire divers composés bioactifs, dont des chitinases, leur activité apparaissant semblable à celle des Firmicutes et de certaines protéobactéries (Veliz *et al.*, 2017). Buxton et ses collègues (Buxton *et al.*, 1965) ont constaté que les amendements de chitine sur le sol réduisaient la sévérité de la maladie causée par *Fusarium oxysporum* sur un champ de pois, sa population a diminué après l'amendement, parallèlement à l'augmentation du nombre d'actinobactéries. Cretoiu *et al.*, (2013), ont montré que les champs de pommes de terre et de blé amendés avec de la chitine supprimaient la croissance de *Verticillium dahliae* et de *Pratylenchus sp.* et que leur abondance diminuait de 10 fois par rapport à un sol non amendé, ce qui pourrait être lié à la multiplication du nombre de microbes dans le sol, en particulier celui des bactéries chitinolytiques. La chitine pulvérisée sur le sol favorise le bon développement des actinobactéries ; cette stratégie a été mise en œuvre dans le cadre de la lutte biologique (Metcalfe *et al*., 2002). Le genre *Streptomyces* est l'un des plus étudiés en tant qu'activité chitinase, même si d'autres actinobactéries présentent des activités similaires, elles ne sont pas encore bien étudiées, *Streptomyces viridificans* a la capacité de se développer sur la chitine des parois cellulaires fongiques et produit des niveaux élevés de chitinase, cet enzyme possède une activité fongicide *in vitro* envers *Rhizoctonia*, *Colletotrichum*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Curvularia* et *Pythium* (Gupta *et al.*, 1995). *Streptomyces hygroscopicus*, sécrète une chitinase et une glucanase durant les phases exponentielle et tardive de sa croissance, respectivement, ces enzymes a pour effet d'inhiber la croissance de *Colletotrichum gloeosporioides* et *Sclerotium rolfsii* (Prapagdee *et al.*, 2008). Des isolats d'actinomycètes provenant d'échantillons de sol en Jordanie ont montré une activité fongicide in vitro envers la croissance du mycélium et la formation de sclérotes de *Sclerotinia sclerotiorum* quand ils ont synthétisé de la chitinase, cependant les isolats qui n'ont pas produit de chitinase n'ont montré qu'un effet fongistatique (Tahtamouni *et al.*, 2006). Ainsi que la chitinase produite par *Streptomyces hygroscopicus* en phase exponentielle de

croissance permet d'inhiber la croissance de *Colletotrichum gloeosporioides* et *Sclerotium rolfsii* (Prapagdee *et al*., 2008). Le mélange de deux souches, *Paenibacillus sp*. 300 et *Streptomyces sp*. 385, a été capable de réprimer la fusariose causée par *F. oxysporum sp.* cucumerinum sur les concombres, ces deux souches antagonistes présentent une forte activité chitinase qui, lorsqu'elle est partiellement purifiée et incubée avec la paroi cellulaire de *F. oxysporum* conduit à la dégradation de la paroi cellulaire et à la libération de N-acétyl-D-glucosamine (Singh *et al.*, 1999). Dans le sol, les rhizobactéries sécrètent des enzymes extracellulaires, des toxines et d'autres métabolites attaquant les nématodes et protégeant les racines (Castaneda-Alvarez et Aballay, 2016). Diverses études ont démontré le rôle des chitinases dans l'activité nématicide des bactéries, soit en exposant les nématodes à des filtrats de culture contenant des chitinases (Rashad *et al.*, 2015), soit en les exposant directement à des chitinases purifiées telles que celles de *Pseudomonas fluorescens* (Lee et Kim, 2015).

Bacillus sp. colonise le système racinaire des plantes, entre en compétition avec les phytopathogènes, en sécrétant des enzymes hydrolytiques telles que la chitinase, la β-1,3 glucanase entraînant la lyse des parois cellulaires du pathogène, ainsi que des molécules à activité antimicrobienne telles que des antibiotiques, des composés volatils, de l'HCN et des sidérophores, ce qui lui confère une capacité de lutte contre plusieurs phytopathogènes, principalement le *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium*, et *Rhizoctonia* (Kumar *et al.*, 2012). L'analyse génomique des 20 souches de *Bacillus* isolées des racines de tomates a révélé que les souches présentant une activité antifongique contre *Verticillium sp.* disposaient de gènes communs associés à la production de chitinase (Hollensteiner *et al.*, 2017). *Bacillus thuringiensisis*, une bactérie du sol largement exploitée dans le biocontrôle des ravageurs et de divers insectes vecteurs de maladies (Liu *et al.*, 2010). Elle est capable de produire une multitude de métabolites actifs tels que les bactériocines, les protéines insecticides et les enzymes hydrolytiques, elle est également connue pour son aptitude à décomposer la chitine en monomères pour les utiliser comme sources de carbone, grâce à la production de chitinases (Driss *et al.*, 2005). La chitinase ChiCW de *Bacillus cereus* a une activité inhibitrice de la germination des conidies de *Botrytis elliptica*, le pathogène végétal responsable de la brûlure des feuilles de lys (Huang *et al.*, 2005). Li *et al.*, (2007) ont isolé *Bacillus cereus* de la rhizosphère de l'aubergine, ils ont testé la suspension bactérienne, le surnageant et la chitinase produite par la souche, et ont confirmé que les trois préparations étaient efficaces pour inhiber la germination des spores de *Verticillium dahliae*, ainsi qu'ils ont révélé que la chitinase de *B. cereus* CRS7 provoquait la lyse des conidies et des tubes germinatifs de *Botrytis cinerea*, et

entrainé jusqu'à 94% d'inhibition (Kishore et Pande, 2007). *In vitro,* les chitinases de *B. thuringiensis* et de *B. licheniformis* lysent les parois cellulaires de divers champignons affectant la germination des graines de soja*: Aspergillus sp*., *Fusarium sp*., *Pythium sp*., *Rhizoctonia sp*., *Verticillium sp*. (Gomaa, 2012). La chitinase purifiée à partir de *Bacillus subtilis* a été testée contre le ver gris du tabac *Spodoptera litura*, une fois les feuilles de la plante hôte traitées avec la chitinase, la croissance et le poids des larves peuvent être réduits et la mortalité augmentée, ce qui en fait un biocide efficace et une alternative aux insecticides (Chandrasekaran *et al.*, 2012). Le gène de chitinase de *B. circulans* no. 4.1 a été cloné dans *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*, la souche recombinante était plus toxique envers les larves de la spongieuse *Lymantria dispar* que la souche parentale (Lertcanawanichakul *et al.*, 2004). L'administration orale d'une combinaison de protéine cristalline δ-endotoxine de *Bacillus thuringiensis* et d'endochitinase de *Serratia marcescens* provoque la perforation de la membrane péritrophique de l'intestin moyen des larves de *Spodoptera littoralis* ; le ver du cottonier (Regev *et al.*, 1996).

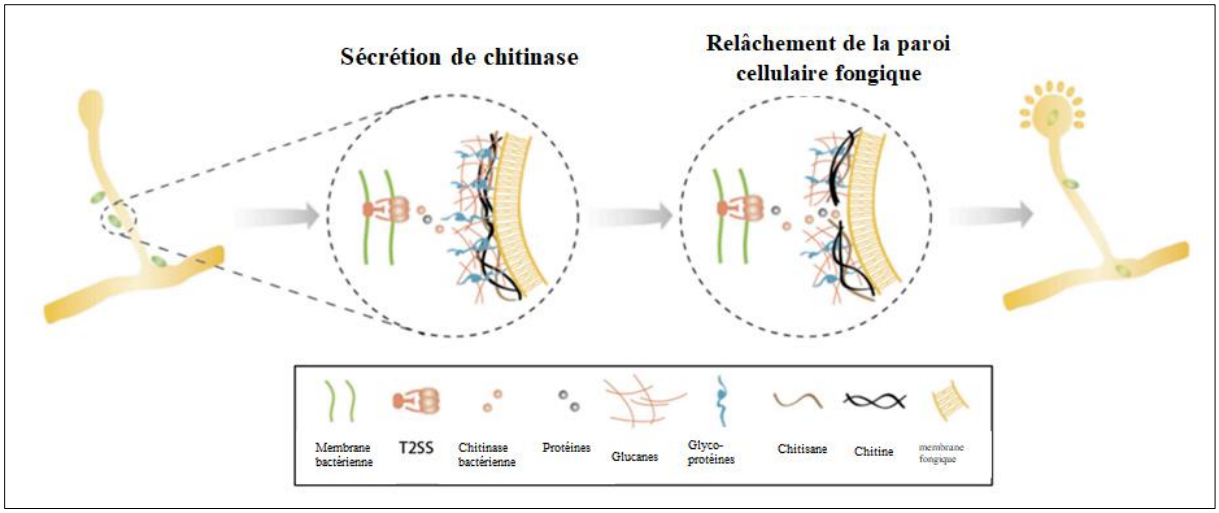


Figure 13. Dégradation des parois cellulaires des champignons phytopathogènes par les enzymes chitinases (Moebius *et al.*, 2014)

b) Les chitinases fongiques

La paroi cellulaire externe recouvre les cellules fongiques entre en contact direct avec le milieu extérieur, dont le glucane et la chitine représentent environ 90 % du poids sec (Latgé, 2007). Les chitinases fongiques ont différentes fonctions dans la nutrition, la morphogenèse et la croissance des champignons, ainsi que dans la défense contre les attaques des mycoparasites (Sahai et Manocha, 1993; Gruber *et al.*, 2011). Dans le génome de certains

champignons filamenteux, plusieurs gènes codent pour des chitinases, par exemple *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus* et *Trichoderma virens* ont respectivement 19, 20 et 36 gènes de chitinases, alors que les levures ont un nombre plus réduit de gènes, *Schizosaccharomyces pombe* et *Saccharomyce cerevisiae* ne possèdent respectivement qu'un et deux gènes de chitinase (Langner et Göhre, 2016). Les chitinases, comme les glucanases, sont étroitement associées aux parois cellulaires des espèces d'*Aspergillus* et *Coccidioides* (Adams, 2004). Chez les levures telles que *Saccharomyces cerevisiae*, la chitinase intervient dans la morphologie en favorisant la séparation cellulaire (Liu *et al*., 2010). Les chitinases fongiques ont été moins étudiées que les chitinases bactériennes, la souche de *Trichoderma* a produit la majorité des chitinases identifiées, parmi lesquelles *T. harzianum* Chi33, Chi36, Chi42, qui se sont avérées efficaces contre *Ralstonia solani*, *Marchophominia phaseolina*, et *Fusarium sp.* (Birini *et al*., 2018). Lorsque le gène ech42 codant pour l'endochitinase de *Trichoderma harzianum* P1 a été interrompu, *In vitro*, l'activité antifongique des mutants contre *Botrytis cinerea* et *Rhizoctonia solani* a été réduite d'environ 40% par rapport au type sauvage, *In vivo*, l'activité antifongique des mutants contre *B. cinerea* sur les feuilles de haricot a été réduite de 33% (Woo *et al.*, 1999). Le gène codant pour une endochitinase de *Trichoderma harzianum* a été exprimé dans le tabac et la pomme de terre, et les plantes transgéniques ont développé une résistance accrue aux pathogènes foliaires *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* et au pathogène tellurique *Rhizoctonia solani* (Lorito *et al.*, 1998).

6.2.4. Classification des chitinases

6.2.4.1. Classification basée sur l'action de l'enzyme

En fonction du site d'action de l'enzyme sur la chitine, les enzymes chitinolytiques sont divisées en enzymes à action endo et exo, les endochitinases (E.C 3.2.1.14) sont des enzymes qui dégradent la chitine en interne, générant des oligomères de N-acétylglucosamine (Poria *et al.*, 2021). Les exochitinases sont soient des chitobiosidases soit des glucosaminidases décomposant les oligomères obtenus, générant des dimères ou monomères de N-acétylglucosamine (Oyeleye et Normi, 2018).

6.2.4.2. Classification basée sur la séquence d'acides aminés

Les chitinases ont été regroupés, sur la base de leur séquence d'acides aminés, en différentes familles de glycosides hydrolases, les chitinases bactériennes sont classées dans les familles 3, 5, 18, 19, 20, 23, 48, 84 et 116 de glycoside hydrolase (GH), ce sont les

chitinases de la famille GH 18 les plus étudiées en raison de leur efficacité à dégrader la chitine (Wang *et al.*, 2019). Elle comprend les chitinases des bactéries, des champignons, des virus et certaines chitinases végétales, alors que la famille 19 comprend les chitinases de plantes (classes I, II et IV), de nématodes et de certaines bactéries, et la famille 20 comprend les N-acétylglucosaminidases de bactéries et de streptomycètes (Funkhouser et Aronson, 2007; Neeraja *et al.*, 2010).

6.2.5. Application

6.2.5.1. Production de protéine unicellulaire

Les déchets de coquillages sont essentiellement composés de chitine, Revah-Moiseev et Carroad, (1981) ont utilisé ces déchets pour la bioconversion de la chitine en protéine unicellulaire de levure (SCP), en combinant une chitinase de *S. marcescens* pour dégrader la chitine et *Pichia kudriavazevii* pour produire la SCP; un rendement de 45% de protéines et de 8 à 11% d'acide nucléique a été obtenu. Ainsi que Vyas et Deshpande, (1991) ont dégradé les déchets chitineux par le système chitinolytique de *Myrothecium verrucaria* NCIM 903, l'hydrolysat de chitine a ensuite été utilisé comme substrat pour la production de protéines unicellulaires par *Saccharomyces cerevisiae* NCIM 3052, dont la teneur en protéines totales et en acides nucléiques était respectivement de 61% et de 3,1%.

6.2.5.2. Isolement des protoplastes

Un ensemble des enzymes variés y compris la chitinase sont impliqué dans la dégradation de la paroi cellulaire fongique entrainant la formation de protoplastes à partir de champignons (Dahiya *et al*., 2006). La chitinase d'*Enterobacter sp*. NRG4 joue un rôle important dans la génération de protoplastes de *Trichoderma reesei*, *Pleurotus florida*, *Agaricus bisporus* et *Aspergillus niger* (Dahiya *et al.*, 2005a). La forte activité chitinase de *Bacillus circulans* WL-12 semble être efficace pour générer des protoplastes à partir de *Phaffia rhodozyme* (Johnson *et al.*, 1978).

6.2.5.3. Gestion des déchets

Au début de 1953, les invertébrés marins produisaient environ 38 000 tonnes de déchets chitineux par an, soit 80 000 tonnes par an en 2000, ces déchets de crustacés sont éliminés par enfouissement, brûlage, et immersion en mer (Om, 2020). Les chitinases contribuent à la bioconversion des déchets chitineux en biofertilisants, en réduisant ainsi la pollution de l'environnement, elles peuvent être impliquées également dans la conversion de

ces déchets chitineux en composants plus simples, les chitooligomères qui en résultent ayant diverses applications dans les industries biochimique et alimentaire (Rathore et Gupta, 2015).

6.2.5.4. La lutte contre les champignons phytopathogènes et les moustiques

La lutte biologique, consiste à utiliser les micro-organismes ou leurs métabolites pour protéger les plantes contre les attaques de ravageurs, et constitue une alternative aux méthodes chimiques (Lahlali *et al.*, 2022). Les chitinases agissent sur les parois cellulaires de nombreux agents pathogènes en exerçant une activité antifongique, insecticide et nématicide (Veliz *et al.*, 2017). Les résultats des expériences menées par Mathivanan *et al.*, (1998) indiquent que la chitinase de *Fusarium chlamydosporum* joue un rôle important dans la lutte biologique contre la rouille de l'arachide engendrée par *Puccinia arachidis*. Les champignons jouent un rôle fondamental dans la lutte biologique contre les insectes nuisibles, car ils peuvent percer la cuticule de l'insecte grâce à la chitinase qu'ils produisent (Herrera-Estrella et Chet, 1999).

6.2.5.5. Fonctions médicinales

Les chitinases ont été utilisées dans le domaine de la santé humaine, elles peuvent être utilisées dans les crèmes et lotions antifongiques pour renforcer l'activité des médicaments antifongiques (Hamid *et al.*, 2013). Les chitooligosaccharides résultant de l'hydrolyse de la chitine ont également été utilisés pour leurs diverses activités biologiques telles que l'activité antitumorale, le piégeage des radicaux, l'antihypertenseur, l'opioïde, la fixation des minéraux, l'antimicrobien et la cicatrisation des plaies (El-Sayed *et al.*, 2017). La N-acétylglucosamine est également utilisée pour réduire l'inflammation chronique associée à l'arthrose (Shikhman *et al.*, 2001). La chitinase peuvent également être utilisées pour détecter les infections fongiques invasives chez les patients immunodéprimés (Lupetti *et al.*, 2011).

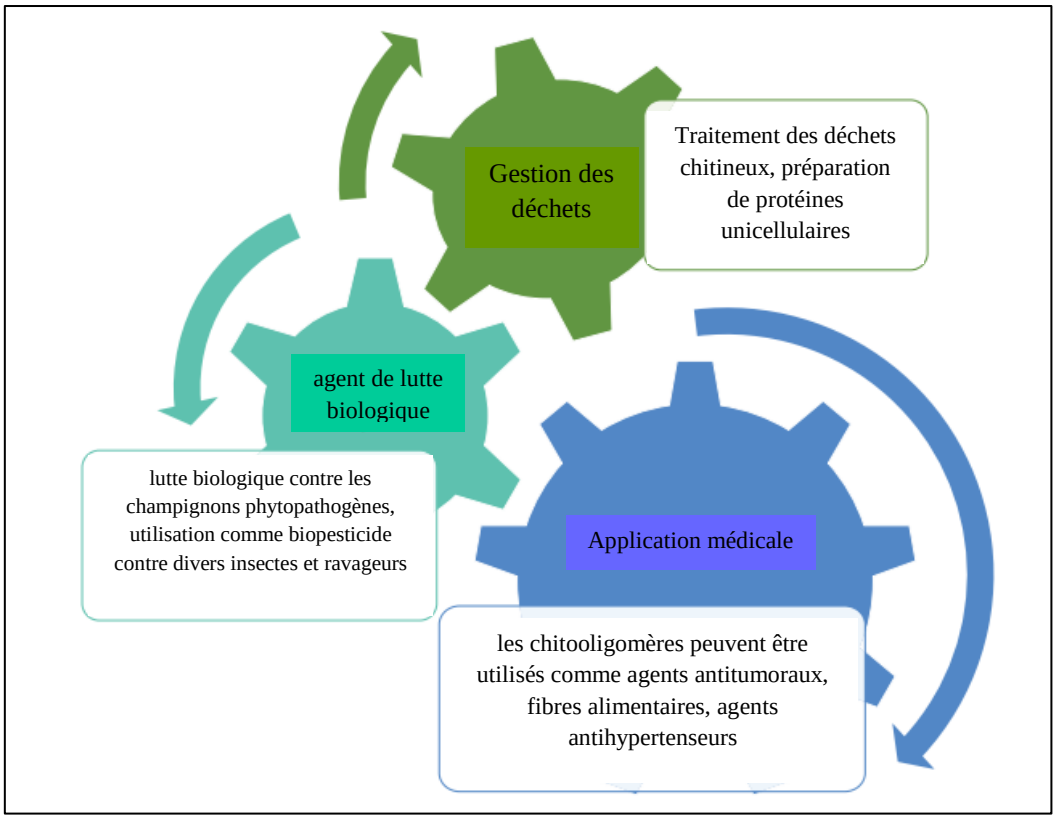


Figure 14. Applications industrielles des enzymes chitinolytiques (Rathore et Gupta, 2015).

CHAPITRE 02 :

MATÉRIELS

ET

MÉTHODES

1. Echantillonnage

1.1. Description des sites étudiés

Afin de construire une collection des souches microbiennes, nous avons ciblé les zones hyperarides rarement exploité dans le Sahara algérien, trois régions faire face à des conditions extrêmes ont été choisi ; Illizi, Bechar, et Tamanrasset. Selon la classification de Köppen-Geiger; une classification des climats basée sur les précipitations et les températures, les 3 régions choisies présentent un climat de type BWh (B : aride, W : désert, h : chaud aride). Les trois régions absolument sèches, sont exposées à un ensemble de conditions hostiles menaçant la vie animale et végétale: une aridité permanente, une pénurie d'eau liquide au sol et dans l'air, une humidité relative extrêmement faible, une irradiation solaire intense, et des vents violents qui durent toute l'année.

Tableau 3. Répartition géographique des sites de prélèvement

Régions	Coordonnées	
	N	E
Bechar	32°02'36	1°14'33
Illizi	26°27'38	8°31'09
Tamanrasset	22°47'37.8	5°34'32.4

1.2. Origine des échantillons prélevés

Différents types des échantillons ont été prélevés à partir de différents sites, les points et le nombre de prélèvements sont représentés dans le tableau 4.

a. **Le sable dunaire :** 50 g de sable de la couche situé entre 5 et 15 cm de profondeur ont été prélevés.
b. **Les sédiments :** Les prélèvements sont effectués à des profondeurs de 10-20 cm en dessous de la surface de l'oued.
c. **Le sable rhizosphérique :** Des échantillons de sable ont été prélevés sur la rhizosphère de la plante *Calotropis procera*, un arbuste très commun dans les régions arides, choisi en raison de son abondance et de sa résistance aux conditions climatiques arides du Sahara algérien.
d. **Les pierres :** au niveau des roches, des échantillons de pierres ont été prélevés, en recueillant des pierres attachées à la surface et dans les fontes rocheuses.

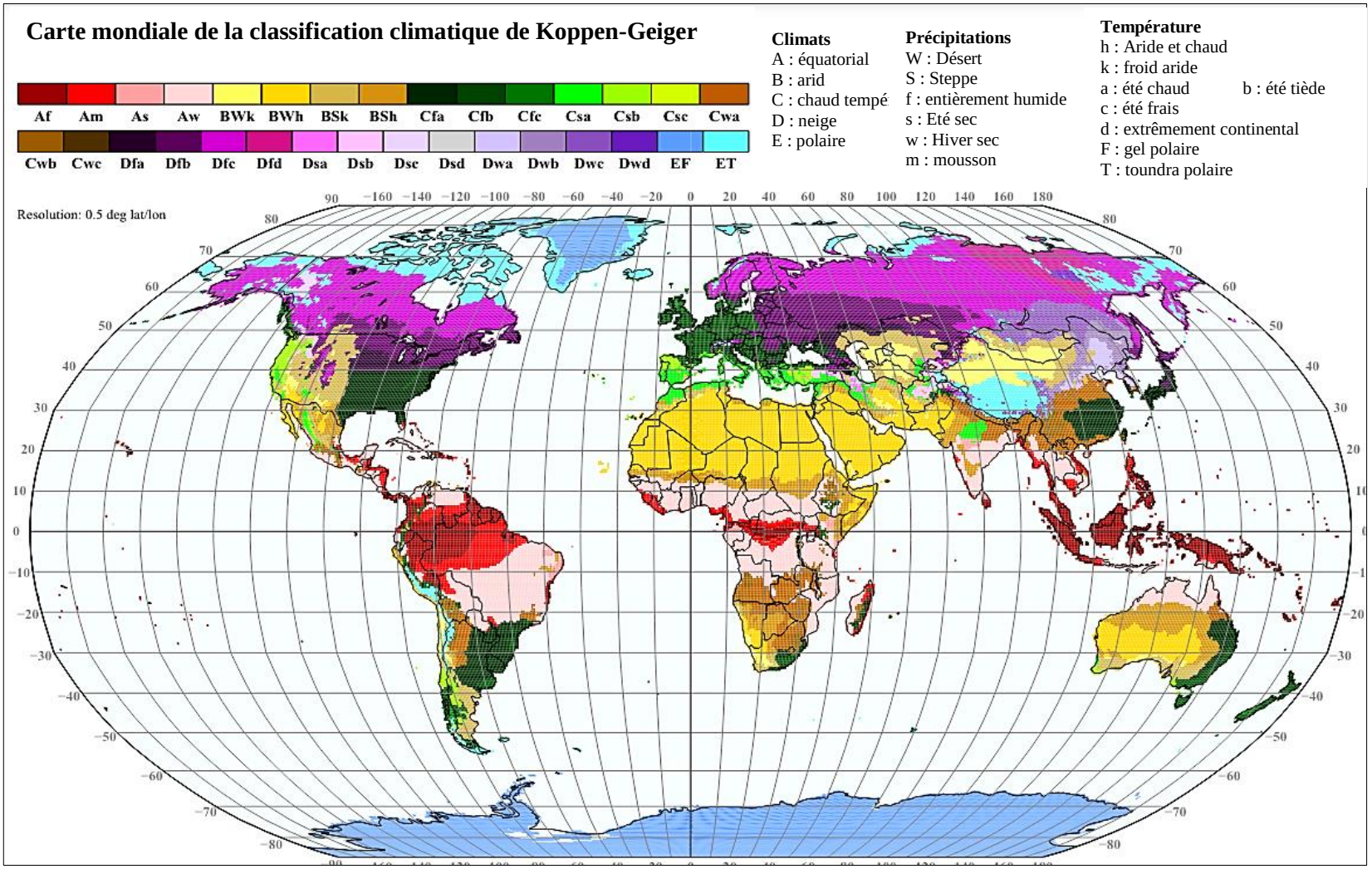


Figure 15. Le système de classification climatique de Köppen-Geiger (Kottek *et al.*, 2006)

Tableau 4. Les différents types d'échantillons prélevés sur les différents sites.

Site	Echantillon	Type d'échantillon	Description
Bechar	Ech 1	Sable de dunes	Sable fin de couleur jaune
	Ech 2	Sable de dunes	Sable marron-jaune, granulé
Illizi	Ech 3	Sable de rhizosphère	Sol fin de couleur marron clair
	Ech 4	Sédiments	Sol humide de couleur marron
Tamanrasset	Ech 5	Pierres	Petites pierres de taille entre 0.2-2 cm

2. Isolement des souches bactériennes

2.1. Milieux d'isolement

Afin d'isoler différentes espèces bactériennes à partir des échantillons prélevés, deux milieux de culture ont été utilisés, le milieu TSA (Sigma), non sélectif, est conçu pour l'isolement d'une large gamme de bactéries, et le milieu Amidon-caséine (g/L): Amidon: 10, K_2HPO_4: 2, KNO_3: 2, caséine: 0.3, $MgSO_4.7H_2O$: 0.05, $CaCO_3$: 0.02, $FeSO_4$.7H2O: 0 .01, agar: 15, pH: 7.0) est destiné à l'isolement des actinomycètes.

2.2. Prétraitements des échantillons

Les déserts, écosystèmes extrêmes qui n'ont pas encore été entièrement explorés, sont considérés comme abritant une variété d'actinobactéries ayant un potentiel biotechnologique (Xie et Pathom-aree, 2021). Afin d'isoler les actinomycètes, le prétraitement du sable est une étape préliminaire qui favorise le développement des actinomycètes, en empêchant les bactéries et les champignons d'envahir et de contaminer les boîtes de culture (Jiang *et al.*, 2016). Avant l'isolement, trois prétraitements ont été appliqués afin d'augmenter le nombre d'actinomycètes.

2.2.1. Traitement par le phénol

Il s'agit d'un traitement d'isolement sélectif des actinomycètes qui se base sur l'utilisation de phénol. Pour ce faire 1,5% (*p/v*) de phénol a été ajouté à la solution mère, le mélange a été maintenu à 30°C sous agitation (Hayakawa *et al.*, 1991), des dilutions appropriés ont été effectué suivi par étalement sur un milieu amidon-caséine.

2.2.2. Chauffage à sec

Cette technique est fondée sur la résistance des spores des actinomycètes à la sécheresse, les spores ont un taux de respiration très bas et peuvent survivre pour une longue

durée, un séchage à sec de l'échantillon de sol à 110°C pendant 1 heure favorise la croissance de *Streptomyces sp.* (Fang *et al.*, 2017).

2.2.3. Méthode du filtre à membrane

Cette méthode repose sur la capacité des mycéliums d'actinomycètes à pénétrer dans les pores des membranes filtrantes pour atteindre le milieu de culture, tandis que les autres bactéries restent à la surface du filtre (Kumar et Jadeja, 2016). Les dilutions de l'échantillon ont été passées à travers les filtres, qui ont déjà été maintenus dans un appareil de filtration couplé à une pompe à vide. Chaque membrane a été récupérée et déposée sur le milieu amidon-caséine. Après 24 heures d'incubation à 28°C, une croissance bactérienne est apparue à la surface du filtre, ce dernier a été retiré et les boîtes ont été réincubées à nouveau jusqu'à l'apparition de colonies d'actinomycètes.

2.3. Technique d'isolement et conditions d'incubation

Pour isoler les souches bactériennes des échantillons de sable et de sédiments, les milieux de culture ont été ensemencés par la méthode de suspension-dilution, suivie par incubation des boites à 30°C jusqu'à l'apparition de colonies. L'isolement de souches bactériennes à partir de pierres rocheuses comprenait trois méthodes :

- **a.** La méthode de suspension-dilutions.
- **b.** Le dépôt direct des pierres sur la surface de la gélose.
- **c.** La méthode d'enrichissement de culture : 5 g des échantillons ont été mis dans 50 mL de bouillon nutritif et incubés sous agitation (100 rpm) à 30°C jusqu'à l'apparition des troubles, des dilutions ont été préparées et étalées sur les milieux gélosés.

3. Dénombrement, purification, conservation, et caractérisation morphologique des isolats

3.1. Dénombrement

Après incubation, le nombre de bactéries présentes dans les différents échantillons a été déterminé, en comptant les colonies apparues à la surface de la gélose ensemencée. La moyenne du nombre de colonies a été calculée pour obtenir le nombre d'UFC par gramme de sol sec.

3.2. Purification

Les colonies qui présentent des caractéristiques morphologiques différentes (appartenant probablement à différents genres) sont sélectionnées. La purification de ces isolats a été établie par repiquage successive sur milieu gélosé jusqu'à l'obtention des colonies bien distincte et homogène.

3.3. Conservation des isolats

Les souches pures sont conservées sur le même milieu d'isolement, la conservation à courte durée est effectuée sur un milieu incliné à 4°C, à longue durée elle est effectué dans des tubes eppendorfs conservés à -20°C en utilisant un bouillon nutritif contenant 30% de glycérol.

3.4. Caractérisation morphologique des isolats

L'aspect macroscopique des colonies (forme, couleur, pigmentation, taille, etc.), ainsi que le Gram, la forme des cellules et leur mode de groupement sont observés après coloration différentielle de Gram.

4. Criblage pour les producteurs d'enzymes dégradant les glucides

Les activités hydrolytiques des cultures pures ont été testées qualitativement par la technique des spots, le criblage a été réalisé par inoculation ponctuelle des isolats en croissance active sur les différents milieux gélosés minimal additionnés de différents substrats, les boites ont été incubées à 30°C pendant 4 jours (pour les bactéries) et à 7 jours (pour les actinomycètes), le diamètre de la colonie et de la zone d'hydrolyse a été enregistré.

a) Cellulase et Xylanase

Le milieu contenant 0.1% $NaNO_3$, 0.1% K_2HPO_4, 0.05% $MgSO_4$, 0.1% KCl, 0.05% d'extrait de levure complété par de la carboxyméthycellulose (CMC) ou du xylane a été utilisé pour détecter l'activité cellulasique et xylanasique, respectivement (Meddeb-Mouelhi *et al.*, 2014). Une fois l'incubation terminée, les boîtes de pétri sont inondées d'une solution de rouge congo à 0,1% (*p/v*) et sont laissées à réagir pendant 30 minutes, puis elles sont rincées avec une solution de NaCl (1M), l'apparition de zones claires autour des colonies témoignant de la production de cellulase et de xylanase (Bragger *et al.*, 1989).

b) Protéase

L'activité protéolytique a été détectée sur gélose au lait g/L : (peptone: 5, extrait de bœuf: 3, lait écrémé: 5 et gélose: 15). L'hydrolyse de la caséine a entraîné l'apparition d'une zone claire autour des colonies (Bhowmik *et al.*, 2015).

c) Chitinase, Pectinase, et Amylase

La mise en évidence des activités chitinolytiques, pectinolytiques, et amylolytiques a été effectué en utilisant un milieu de base supplémenté en chitine (Kamil *et al.*, 2007), en pectine (Reddy et Saritha, 2016), et en amidon (Abd-Elhalim *et al.*, 2015). La lecture est effectuée en inondant les boîtes avec une solution de Lugol, l'eau iodée contenant de l'iode se complexe avec l'amidon présent dans le milieu, donnant un précipité bleu foncé. Des zones claires entourant les colonies indiquent la production de chitinase, pectinase, et amylase (Loc *et al.*, 2011; Merín *et al.*, 2015).

d) Lipase

La gélose à l'huile d'olive et au rouge de phénol a été utilisée pour détecter l'enzyme lipase. Une légère diminution du pH fait passer la couleur du rouge de phénol au jaune, ce qui indique la présence d'une lipase. Les bactéries productrices de lipase apparaissent entourées d'un colorant jaune (Lee *et al.*, 2015).

e) Tannase

L'activité tannique a été testée sur un milieu gélosé supplémenté en acide tannique. L'ajout d'acide tannique à la gélose nutritive forme un complexe de protéines tanniques, dont le clivage par les tannase provoque un noircissement autour des colonies (Kumar *et al.*, 2010).

f) Indice enzymatique (EI)

L'activité enzymatique est présentée sous la forme d'une valeur d'indice enzymatique (EI), Les halos d'hydrolyses (DH) et les diamètres de colonies (DC) ont été mesurés, et les rapports entre eux ont été utilisés pour estimer l'indice enzymatique (Sibero *et al.*, 2022).

$$EI = DH / DC$$

5. Conditions de croissance optimales

Les intervalles de pH, de température, et de concentration de NaCl permettant la croissance de *Bacillus sp.* RST11 et de *Bacillus sp.* SRIT8 ont été vérifiés. Des bouillons nutritifs ont été utilisés pour cultiver les isolats à différentes températures (10 à 70°C avec un

intervalle de 10°C, pH 7 et 0,5% de NaCl) et à différents pH (5 à 11, 30°C et 0,5% de NaCl), et à différentes concentrations de NaCl (0, 0,5, 1, 3, 5, 7, 10, 12 et 15%, pH 7, 30°C).

6. Extraction d'ADN et identification de l'isolat SRIT8 et RTS11

6.1. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique des deux souches bactériennes a été extrait et purifié à l'aide du kit de purification de l'ADN génomique Wizard® (Promega, USA), après mise en culture des souches dans un bouillon de culture (LB) à 30°C pendant 18 heures. Les bactéries sont d'abord lysées pour libérer l'ADN, à l'aide d'une solution de lysozyme et de protéinase K. Une solution d'ARNase (20 mg/mL) est ensuite utilisée pour éliminer l'ARN. L'ADN est ensuite purifié sur une matrice de silice. Les contaminants sont éliminés par une solution de lavage. L'élution est réalisée à l'aide d'un tampon d'élution de 100 µL.

6.2. Amplification du gène ARNr 16S par PCR

L'identification taxonomique a été réalisée par l'amplification PCR du locus de l'ARNr 16S à l'aide des amorces 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT-3') en utilisant l'ADN polymérase « HOT FIREPol®, Solis Biodyne, Estonie » selon les recommandations du fabriquant. Activation de HOT FIREPol® pendant 10 min à 95°C pour un cycle, suivi de 35 cycles (30 s de dénaturation à 95 °C, 30 s d'hybridation à 58°C, 1 min d'extension à 72°C), se terminant par une extension finale de 7 min à 72°C. Les amplicons ont été analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5% dans un tampon TAE et colorés avec l'intercalant "MIDORIGreen, NIPPON Genetics Europe". Un marqueur de taille "100 bp DNA Ladder, Solis Biodyne, Estonia" a été déposé en même temps que les produits amplifiés.

6.3. Séquençage du gène ARNr 16S

Les réactions de séquence ont été effectuées par « Eurofins Genomics, Germany ». La méthode utilisée est basée sur les méthodes de SANGER ou interrupteurs de chaîne, adaptée à la fluorescence. Les fragments sont séparés par électrophorèse capillaire sur l'analyseur génétique ABI 3730xl (Applied Biosystem, ThermoFisher, USA).

6.4. Analyse des séquences

Les fichiers de séquence *.ab1 ont été importés et ouverts à l'aide de SnapGene Viewer 4.2.11. La qualité des séquences a été analysée en visualisant les chromatogrammes avant de les enregistrer au format FASTA. Les séquences ont été alignées dans EzBioCloud

(Yoon *et al.*, 2017) à l'aide de l'outil 16S Based-ID. Les séquences utilisées dans l'analyse phylogénétique proviennent de RDP et de GeneBank. Un arbre phylogénétique a été construit à l'aide de la méthode d'assemblage des voisins avec le logiciel MEGAX.

7. Etude des activités enzymatiques

7.1. Activité chitinolytique

L'indice enzymatique a été utilisé pour sélectionner les souches à haute capacité de production de chitinase. Huit isolats ont été signalés comme ayant un rapport supérieur à 7 et ont donc été retenus pour un criblage quantitatif.

7.1.1. Screening quantitatif

L'activité chitinolytique a été dosée quantitativement en utilisant un bouillon de sel minéral contenant 1% (*p/v*) de chitine, inoculé avec 1% de préculture (0,5 OD) de chaque isolat, les flacons ont été incubés à 30°C sous agitation (100 rpm) pendant 4 jours (pour les bactéries) et 7 jours (pour les actinomycètes). Le dosage de l'activité de la chitinase a été effectué après récupération de l'extrait brut par centrifugation à 12 000 rpm pendant 20 min à 4°C (Das *et al.*, 2012).

7.1.2. Dosage de la chitinase

Le dosage de l'activité de la chitinase a été effectué selon la méthode de Miller, (1959), 1 mL de la solution enzymatique a réagi avec 1 mL de chitine à 0,2% dans un tampon d'acide citrique (0,05 M, pH 5), puis le mélange réactionnel a été incubé à 40°C pendant 30 min. Après incubation, la réaction a été interrompue par l'ajout de 3 mL de réactif DNS suivi d'un chauffage à 100°C. L'absorbance a été mesurée à 585 nm contre le blanc de substrat et d'enzyme. L'acide 3,5-dinitorosalicylique (DNS) de couleur jaune réagit avec le sucre réducteur pour former l'acide 3-amino-5-nitrosalicylique de couleur brune. Une unité (U) d'activité chitinase a été définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 µmole de N-acétylglucosamine par min (Fadhil *et al.*, 2014), une gamme d'étalonnage de N-acétylglucosamine a été préparé en utilisant une série des dilutions de N-acétylglucosamine (Annexe 3).

7.1.3. Estimation des protéines

La concentration en protéines a été déterminée selon la méthode décrite par Lowry *et al.*, (1951). Dans des conditions alcalines, l'ion cuivre divalent (Cu^{+2}) forme un complexe avec les liaisons peptidiques, où il est réduit à un ion monovalent (Cu). Ensuite, L'ion cuivre

monovalent et les groupes radicaux de tyrosine, tryptophane et cystéine réagissent avec le réactif de Folin-Cioccalteu en formant un complexe bleu foncé. L'albumine de sérum bovin (BSA) a été utilisée comme protéine standard.

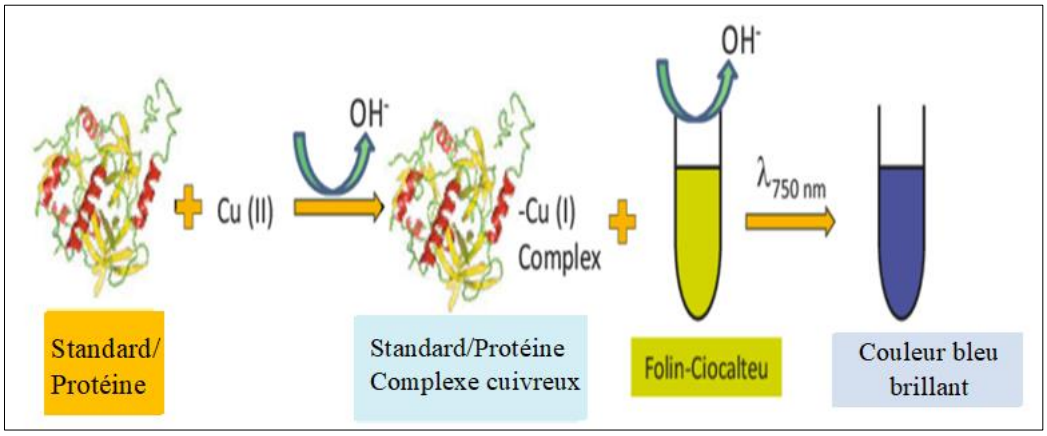


Figure 17: Représentation schématique du dosage des protéines par la méthode de Lowry (Kummari *et al.*, 2022).

7.1.4. Dosage des sucres totaux

La méthode phénol-acide sulfurique est une méthode colorimétrique simple et rapide qui permet de déterminer les glucides totaux d'un échantillon (Dubois *et al.*, 1956). L'acide sulfurique concentré décompose tous les polysaccharides, les oligosaccharides et les disaccharides en monosaccharides, les pentoses (composés à 5 carbones) sont ensuite déshydratés en furfural et les hexoses (composés à 6 carbones) en hydroxyméthylfurfural, qui réagissent ensuite avec le phénol pour produire une couleur jaune-or (Nielsen, 2010). Le xylose a été utilisé pour construire la courbe standard de l'essai, et l'absorbance a été mesurée à 480 nm.

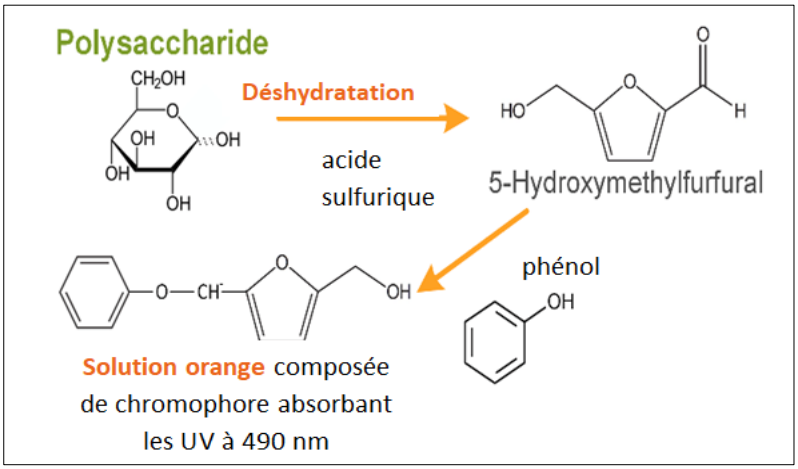


Figure 18. Principe du dosage colorimétrique des sucres totaux (Viel *et al.*, 2018).

7.1.5. Sélection de la source de carbone pour la production de chitinase

Trois formes de chitines ont été utilisées, à savoir la chitine en poudre (Sigma), la chitine colloïdale, et la chitine gonflée.

7.1.5.1. Préparation de la chitine colloïdale

La chitine colloïdale a été préparée selon la méthode de Roberts et Selitrennikoff, (1988). 5 g de chitine de carapace de crevette (Sigma) sont mélangés avec 70 mL d'acide chlorhydrique concentré, le mélange est maintenu sous agitation à 4°C pendant 24 h. Ensuite, 400 mL d'éthanol froid (-20°C) sont ajoutés sous forte agitation, le mélange est maintenu à nouveau à 4°C pendant 24 h, avant d'être centrifugé à 12 000 rpm. Le culot obtenu est récupéré, puis rincé plusieurs fois avec de l'eau distillée jusqu'à ce que le pH atteigne 7, enfin, la chitine colloïdale obtenue est séchée à 60°C, broyée en une poudre fine et conservée à -20°C.

7.1.5.2. Préparation de la chitine gonflée

La chitine gonflée a été préparée selon la méthode de Monreal et Reese, (1969). 10 g de chitine de carapace de crevette (Sigma) ont été incorporés dans 100 mL d'acide phosphorique et le mélange a été placé à 4°C pendant 48 h. La chitine gonflée a ensuite été précipitée en trempant le mélange dans de l'eau froide, puis lavée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un pH neutre.

Afin de déterminer l'effet de ces différentes formes de chitine (chitine colloïdale, chitine en poudre, chitine gonflée) sur la production de chitinase, on utilise deux bouillons différents, à savoir M1 g/L : $(NH_4)_2SO_4$, 1; $MgSO_4$, .$7H_2O$, 0.2; KH_2PO_4, 0.2 ; K_2HPO_4, 1.6 ; extrait de levure, 1; chitine, 3 ; $FeSO_4$, 0.1 ; $CaCl_2$, 0.02). M2 g/L (chitine, 3 ; $MgSO_4.7H_2O$, 0.5 ; K_2HPO_4, 1 ; extrait de levure, 1). Ces milieux ont été supplémentés avec diverses formes de chitine, inoculés avec *Bacillus sp.* SRIT8 et incubés à 30°C dans un incubateur (100 rpm) pendant 3 jours. L'activité de chitinase a été suivie toutes les 12 heures.

7.1.6. Optimisation statistique de la production de chitinase

L'optimisation du milieu de culture pour la production de chitinase par *Bacillus sp.* SRIT8 a été réalisée en utilisant deux approches statistiques, la première étant le plan de Plackett-Burman, qui a permis d'identifier les variables ayant un effet significatif sur la production de chitinase à partir d'un nombre N de variables. La deuxième étape, les valeurs

optimales de ces variables ont été fixées à l'aide du plan d'optimisation de Box-Behnken. En général, la procédure d'optimisation est structurée en quatre étapes :

b. Identification des composantes médiatiques les plus importants (screening) ;
c. Identification des plages optimales des variables (réduction) ;
d. Identification de l'optimum ;
e. Vérification expérimentale de l'optimum identifié (Das et Dewanjee, 2018).

7.1.6.1. Plackett-Burman

Des méthodes de criblages telles que la modification d'un facteur à la fois ont été utilisées pour optimiser le milieu, elles ne prennent pas en compte les interactions entre les composants du milieu et ne sont pas adaptées à un grand nombre de variables, cependant, les méthodes statistiques comprennent des techniques statistiques permettant de planifier les expériences, d'évaluer les effets des facteurs, et de détecter les conditions optimales de ces derniers (Link et Weuster-Botz, 2011).

L'étape initiale de la planification expérimentale consiste à sélectionner et à identifier les variables qui ont une influence sur la production de chitinase. Au total, dix composantes ont été sélectionnées pour cette étude, chacune représentée à deux niveaux, supérieur (+1) et inférieur (-1). La matrice du plan expérimental est présentée dans le tableau 5, les réponses expérimentales ont été analysées par le modèle à l'aide de l'équation suivante :

$$Y = \beta_0 + \Sigma\, \beta i x i \qquad \textbf{(Éq.1)}$$

Où, Y est la réponse (chitinase) et, β_0 est le terme d'interception, βi ; coefficients linéaires, et xi est le niveau de la variable indépendante. Les variables dont le niveau de confiance était supérieur à 95% ont été considérées comme significatives.

7.1.6.2. Box-Behnken

Box-Behnken est une approche très efficace visant à optimiser une série de variables avec un très petit nombre d'exécutions, tout en analysant avec précision la relation entre les variables (Li *et al.*, 2019). L'étude d'optimisation prenait en compte des paramètres physico-chimiques, nutritionnels et culturaux, en utilisant quatre plans factoriels de Box-Behnken avec trois facteurs et trois niveaux pour chaque facteur (-1,0,+1), et trois points de répétition au point central. Le tableau 6 présente les facteurs et les valeurs des quatre plans expérimentaux. L'équation polynomiale prend la forme suivante :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 C + \beta_{11} A^2 + \beta_{22} B^2 + \beta_{33} C^2 + \beta_{12} AB + \beta_{13} AC + \beta_{23} BC$$

Où Y est la réponse (chitinase), β_0 est le terme constant ; β_1, β_2 et β_3 sont les coefficients des termes linéaires ; β_{11}, β_{22} et β_{33} sont les coefficients des termes quadratiques ; β_{12}, β_{13} et β_{23} sont les coefficients d'interactions.

Tableau 5. Les valeurs des variables expérimentales utilisées dans le plan de Plackett-Burman pour la production de chitinase par *Bacillus sp.* SRIT8.

Variables	Unité	Composition	Niveaux	
			-1	+1
A	(g/L)	Chitine	3	15
B		$MgSO_4$	0.1	0.5
C		$CaCl_2$	0.05	0.2
D		$MnCl_2$	0.05	0.2
E		K_2HPO_4	1	3
F		NaCl	0.5	3
G		Peptone	0.5	8
H		Extrait de levure	0.5	5
J		$(NH_4)_2SO_4$	1	7
K	°C	Température	30	37

Tableau 6. Les valeurs codées pour les quatre modèles testés pour la production de chitinase par *Bacillus sp.* SRIT8, en utilisant le plan de Box-Behnken.

Modèles	Les variables	Niveaux		
		-1	0	**+1**
Modèle 1	Chitine (g/L)	1	2	3
	Extrait de levure (g/L)	5	7.5	10
	Peptone (g/L)	8	10	12
Modèle 2	Taux de l'inoculum (%)	1	3	5
	Age de l'inoculum (h)	3	6.5	10
	Agitation (rpm)	100	150	200
Modèle 3	pH	5	7.5	10
	K_2HPO_4 (g/L)	3	4.5	6
	Température (°C)	20	25	30
Modèle 4	$(NH_4)_2SO_4$ (g/L)	7	9.5	12
	$CaCl_2$ (g/L)	0.2	0.6	1
	NaCl (g/L)	0	0.25	0.5

L'analyse de la variance (ANOVA) a été utilisée pour évaluer l'effet des variables indépendantes sur la réponse, les effets significatifs des variables a été déterminé par une valeur $p<0,05$. L'équation de régression a été représentée sous forme des courbes de surface tridimensionnelle et des tracés de contour afin d'étudier l'interaction entre les variables, et de préciser la concentration optimale de chaque variable à partir du pic dans la courbe tridimensionnel ou du point central du tracé de contour. L'analyse statistique et la représentation graphique ont été réalisées à l'aide du logiciel Design-Expert 11 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, Minnesota, USA). Les valeurs prédites optimales des variables pour une production maximale de chitinase ont été déterminées par la fonction de prédiction ponctuelle du logiciel. Ensuite, un essai de confirmation a été effectué sur la base des valeurs prédites, et le résultat expérimental obtenu a été comparé au résultat prédit par le modèle.

7.1.7. Production de chitinase en fermentation immergée

7.1.7.1. Préparation d'inoculum

Afin de préparer l'inoculum destiné à ensemencé le milieu de production, une boucle chargée d'inoculum de la souche de *Bacillus sp.* SRIT8 a été transférée dans un bouillon nutritif, et incubée à 30°C pendant une nuit sous agitation (100 rpm). Ensuite, 0,5 mL de cette culture a été utilisé pour inoculer 100 mL de bouillon de sel minéral contenant 0.1% de chitine, la culture a été incubée à 30°C pendant 3 h et utilisée comme inoculum.

7.1.7.2. Effet du temps d'incubation sur la production de chitinase

La courbe de production de chitinase a été tracée pour mettre en évidence l'effet du temps d'incubation sur la production de chitinase, le milieu de production a été inoculé et incubé à 30°C. Des prélèvements ont été effectués toutes les 2 h pendant 48h afin d'analyser l'activité de la chitinase. La courbe de production a été tracée et le temps d'incubation correspondant à l'activité chitinase la plus élevée a été pris en compte dans la production de l'enzyme.

7.1.7.3. Production de chitinase

L'inoculum a été transféré dans le milieu de production (g/L) : chitine, 2 ; extrait de levure, 10 ; peptone, 12 ; $(NH_4)_2SO_4$, 12 ; K_2HPO_4, 3. 49 ; $CaCl_2$, 0,2 ; NaCl, 0,21 ; $MnCl_2$, 0,2 ; pH 5. La culture a été incubée à 25°C pendant 20 h. L'extrait brut a été utilisé pour doser l'activité de la chitinase, la teneur en protéines et en sucres totaux. La croissance bactérienne a été estimée en mesurant la densité optique à 600 nm.

7.1.8. Purification enzymatique

La purification des enzymes est un processus complexe, un certain nombre de méthodes sont généralement appliquées séquentiellement pour atteindre des niveaux de pureté suffisamment élevés. Pour être efficace, un système de purification enzymatique doit répondre aux exigences fondamentales suivantes : un degré élevé de pureté finale ; une récupération globale élevée de l'activité enzymatique; et la reproductibilité (Ramos, 2010). La purification des chitinases implique les étapes suivantes :

7.1.8.1. Précipitation des protéines

La précipitation des protéines est une méthode couramment utilisée dans la purification, elle a été effectuée pour la première fois par l'application de fortes concentrations de sel, et plus tard par l'emploi de solvants organiques (Crowell *et al.*, 2013).

a) Précipitation au sulfate d'ammonium

La précipitation au sulfate d'ammonium est le plus souvent utilisée, le sulfate d'ammonium est le sel le plus convenable au fractionnement enzymatique en raison de sa grande solubilité, et sa faible toxicité enzymatique (Muley *et al.*, 2020 ; Vijayaraghavan *et al.*, 2016).

L'extrait brut a été fractionné avec des concentrations croissantes de sulfate d'ammonium (30-80% de saturation), et maintenu à 4°C sous agitation pendant une nuit, ensuite, il a été centrifugé (12 000 rpm, 20 min, 4°C), le précipité protéique qui en résulte a été dissout dans un tampon tris-HCl (50 mM, pH 7) et dialysé dans le même tampon pendant 12 h à 4°C.

b) Précipitation à l'acétone

L'ajout de solvants miscibles à l'eau, tels que l'éthanol ou l'acétone, à une solution de protéines entraîne la précipitation des protéines, dont l'efficacité dépend de la température, du pH, et de la concentration en protéines dans la solution (Tangtua *et al.*, 2017).

L'acétone refroidie (-20°C) a été ajoutée à l'extrait brut, le mélange a été maintenu sous agitation à 4°C pendant la nuit. Différents rapports acétone/extrait brut ont été utilisés (0.25:1 ; 0.5:1 ; 0.75:1; 1:1 ; 1.25:1 ; 1.5:1 ; 1.75:1 ; 2:1). Le précipité, recueilli après centrifugation à 12 000 rpm, 20 min, 4°C, a été séché à l'air pour évaporer toute trace d'acétone, et dialysé dans un tampon tris-HCl (50 mM, pH 7) pendant 12 h à 4°C.

7.1.8.2. Chromatographie par filtration sur gel (Sephadex G-50)

La filtration sur gel est aussi connue sous le nom de chromatographie d'exclusion stérique ou de chromatographie sur tamis moléculaire. Dans cette technique, la séparation est basée sur la capacité (due à la différence de taille des molécules) des molécules de l'échantillon à pénétrer dans les pores du gel et à éluer par ordre décroissant de taille moléculaire (Prapulla et Karanth, 2014).

Le dialysat obtenu a été chargé sur une colonne de filtration sur gel Sephadex G-50 prééquilibrée avec un tampon tris-HCl (50 mM, pH 7), l'enzyme a été éluée avec le même tampon et des fractions de 4 ml ont été collectées. L'activité enzymatique et le taux de protéines dans chaque fraction ont été évalués.

7.1.8.3. Chromatographie échangeuse d'anions

La chromatographie d'échange d'ions permet de séparer les molécules sur la base de leur charge positive ou négative par leur interaction avec une résine d'échange d'ions en tant que milieu stationnaire, les protéines se lient aux résines et peuvent être progressivement éluées en augmentant la concentration de sel (Chakraborty *et al.*, 2022).

Les fractions positives issues de la chromatographie d'exclusion moléculaire ont été appliquées sur une colonne d'échange d'anions DEAE-Sepharose préalablement équilibrée avec un tampon tris-HCl (50 mM, pH 7). Deux volumes du même tampon ont été ajoutés pour récupérer les protéines non liées, tandis que les protéines liées ont été éluées en appliquant un gradient croissant de 0,1 à 0,5 M de NaCl. Des fractions de 2 mL ont été collectées et sont analysées pour estimer l'activité de la chitinase et la teneur en protéines. Les fractions à activité chitinase ont été regroupées et concentrées par ultrafiltration avec une membrane Amicon (Millipore).

7.1.8.4. Détermination de la masse moléculaire

La pureté de l'enzyme chitinase et sa masse moléculaire ont été déterminées par migration électrophorétique dans un gel de polyacrylamide selon la méthode de Laemmli, (1970), La masse moléculaire a été déterminée en comparant la mobilité de l'échantillon avec celle de marqueurs standards de masse moléculaire de 20-120 kDa (Prestained Protein MW Marker).

7.1.9. Analyse biochimique de la chitinase purifiée

7.1.9.1. Effets du pH sur l'activité et la stabilité de la chitinase

L'effet du pH sur l'activité enzymatique a été déterminé en testant l'activité à différent pH (3-9). L'enzyme purifiée a été incubé dans différents tampons contenant 0.1% de chitine à 30°C pendant 15 min, en utilisant le tampon de citrate de sodium (pH 3-6), le tampon Tris-HCl (pH 7- 8), et le tampon de glycine-NaOH (pH 9). Le dosage de l'activité enzymatique a été effectué, l'activité maximale obtenue a été considérée comme 100% puis utilisée comme référence pour déterminer les activités relatives à d'autres valeurs de pH.

En surveillant la stabilité de l'enzyme à différents pH, en pré-incubant l'enzyme purifiée dans les tampons précédents pendant 24 h à 30°C, puis en effectuant un dosage enzymatique après l'ajout du substrat. L'activité résiduelle selon la formule suivante :

Activité résiduelle = activité de l'enzyme après incubation/activité de l'enzyme avant incubation × 100 (Anbesaw, 2021)

7.1.9.2. Effets de température sur l'activité de la chitinase

La température optimale pour l'activité de la chitinase a été déterminée en incubant l'enzyme avec une suspension de chitine (0,1% de chitine dans un tampon de citrate de sodium, pH 5) à différentes températures (20-70ºC) pendant 15 minutes. La température à laquelle l'activité la plus élevée a été considérée comme optimale (100%).

Pour déterminer la thermostabilité de la chitinase, des aliquotes d'enzyme purifiée ont été incubées pendant 24 heures à différentes températures (20 à 70°C). Après l'incubation, les tubes ont été retirés et refroidis dans un bain de glace, et la chitine a ensuite été ajoutée et le dosage enzymatique standard a été effectué pour déterminer l'activité enzymatique résiduelle.

7.1.9.3. Effet de certains activateurs et inhibiteurs sur l'activité de la chitinase

La solution enzymatique (250 µL) et la solution de substrat (250 µL ; chitine dissout dans le tampon citrate de sodium 50 mM, pH 5) ont été incubés pendant 30 min à 40°C en absence et en présence de 250 µL de solutions contenant :

- Ions métalliques : Mg^{+2}, Cu^{+2}, Fe^{+2}, Ca^{+2}, Zn^{+2}, Mn^{+2}, Hg^{+2} et Na^{+2} (5 mM)
- Les tensioactifs : Tw 20, Tw 80, Triton X-100 (0,5%)
- Le méthanol, et le butanol (10% dans de l'eau distillée)

Les activités enzymatiques ont été exprimées en activité résiduelle (%) par rapport à l'activité enzymatique en absence de différents éléments testés précédemment.

7.1.10. Détermination de la spécifité du substrat

L'affinité de la chitinase purifiée pour divers polysaccharides a été étudiée, le mélange réactionnel comporte 0.5 mL de la solution enzymatique et 0.5 mL de différents substrat ; la chitine, la chitine colloïdale, l'amidon, le CMC, le xylane, et la pectine (0.1 g/L dans un tampon citrate de sodium 50 mM, pH 5), a été incubé pendant 30 min à 40°C. Le dosage de l'activité chitinase a été effectué.

7.1.11. Application enzymatique

7.1.11.1. Évaluation de l'activité antagoniste de *Bacillus sp.* SRIT8

L'activité antagoniste de la souche SRTI8 contre *Alternaria alternata et Fusarium graminearum* a été expérimentée par la méthode de double culture (Figure 19). La croissance radiale du mycélium vers l'isolat bactérien a été mesurée après incubation à 28°C pendant 5 jours. Le pourcentage d'inhibition de la croissance radiale des champignons a été calculé selon la formule suivante:

$$R_1 - R_2 / R_1 \times 100$$

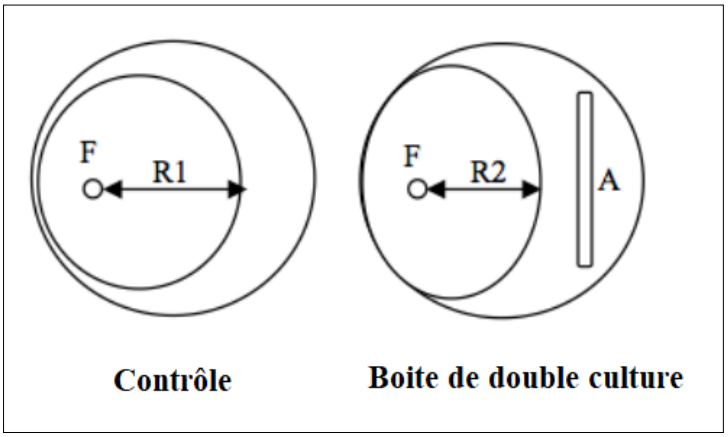


Figure 19. Méthode de double culture illustrant la mesure de la croissance radiale des mycéliums fongiques : A, Isolat antagoniste. F, Bouchon fongique. R1, le rayon de la croissance de champignon témoin. R2, Rayon de la croissance de champignon testé (Khleekorn et Wongrueng, 2014).

7.1.11.2. Effet de l'extrait brut sur la croissance des champignons

Le test d'inhibition de la croissance mycélienne a également été réalisé dans un bouillon de dextrose de pomme de terre (PDB) en suivant le protocole de Saeed *et al.*, (2017). Le milieu de production à été inoculé avec la souche SRTI8 et incubé pendant 20 h, l'extrait brut obtenu (10%) après centrifugation a été utilisé pour inoculer 200 mL de PDB contenant un bouchon de chaque souche fongique. Ce bouillon de fermentation a été incubé sous agitation (100 rpm) à 28°C. De 48 h à 96 h d'incubation, les mycéliums fongiques ont été collectés et séchés à 90°C jusqu'à un poids constant. Le poids sec des mycéliums a été exprimé en mg.

7.1.11.3. Inhibition de la croissance fongique par la chitinase purifiée

Un test de diffusion en gélose de la chitinase purifiée a été réalisé pour évaluer son activité antifongique sur *F. graminearum*. Des bouchons de mycéliums fongiques ont été déposés sur du milieux PDA, des trous de 6 mm de diamètre ont été percés et remplis avec 200 U/mL de chitinase purifiée. L'enzyme bouillie à 100°C pendant 5 min, a été utilisée comme contrôle. La diffusion complète de l'enzyme dans la gélose doit être assurée avant d'incuber les boites à 25°C pendant 5 jours (la même dose de chitinase a été ajoutée toutes les 24 h). L'activité antifongique a été évaluée en mesurant (en mm) le halo d'inhibition de la croissance fongique.

7.1.11.4. Protection de grains de blé par la chitinase purifiée

La chitinase purifiée a été appliquée aux grains de blé afin de les protéger pendant la germination. 10 grains de blé ont été lavés avec de l'eau distillée, séchés, puis immergés dans 200 U/mL de la solution enzymatique (La même dose a été appliquée aux grains toutes les 24 heures). Les grains de contrôle ont été traités avec de l'eau distillée uniquement. Dans des boîtes de pétri, trois papiers buvards ont été déposés, puis sur lequels les graines de blé ont été placées (10 graines pour chaque traitement). Les boîtes ont été maintenues exposées à l'environnement extérieur, l'humidité a été assurée en ajoutant régulièrement 2 mL d'eau distillée aux papiers buvards. Après 5 jours d'incubation, les grains ont été observées visuellement pour vérifier la présence d'une infection, et le pourcentage de germination des grains a été calculé (Gurav *et al.*, 2017).

7.1.11.5. Traitement de la fusariose sur la pomme de terre par la chitinase purifiée

La capacité de la chitinase à lutter contre la fusariose de la pomme de terre a été testée selon le protocole de Loc *et al.*, (2019). Les tubercules sains ont été collectés et rincés à l'eau, puis passés dans de l'éthanol à 70 % et rincés à nouveau avec de l'eau distillée stérile. Les tubercules ont été placés dans des boîtes et inoculés avec 10^7 de spores de *F. graminearum* (1 lésion/tubercule), et incubés à température ambiante (25°C). Après l'apparition de la maladie sur les tubercules (8 jours), ils ont été traités avec la chitinase purifiée (60 U/mL, la même dose a été pulvérisée sur les lésions après chaque 24 h), et maintenus à température ambiante (25°C) pendant 5 jours. La taille des lésions résultant de la fusariose (mm) a été mesurée quotidiennement pour évaluer le niveau de progression de la maladie.

7.1.11.6. Activité insecticide de la chitinase contre le charançon de blé *Sitophilus granarius* Linnaeus

La technique d'élevage en masse de l'insecte *Sitophilus granarius* Linnaeus a été réalisé selon la méthode de Laribi-Habchi *et al.*, (2015), en mettant l'insecte dans des bocaux en verre remplis de grains de blé (100 g/bocal) et fermés avec un filet pour garantir l'aération des insectes à température ambiante, ce qui a permis d'obtenir plusieurs générations d'insectes d'âge et de sexe indéterminés. Après un mois d'infestation, les insectes ont été éliminés par tamisage des grains, et les grains infestés ont été réincubés dans les bocaux dans les mêmes conditions pendant 24 h supplémentaires pour obtenir de jeunes insectes.

L'activité bioinsecticide de la chitinase envers l'insecte *Sitophilus granarius* a été étudiée suivant le protocole de Laribi-Habchi *et al.*, (2020), en utilisant différentes doses de chitinase purifiée (1, 3, 5, 7 et 10 U/mL). Dans des boîtes de Pétri, 5g de blé ont été déposés et pulvérisés avec les différentes doses enzymatiques, ces grains traités ont été ensuite mis en contact avec 10 insectes âgés de 24 h. Le nombre d'insectes morts dans chaque boîte a été compté après 12, 24 et 48 h de contact, le pourcentage de mortalité a été calculé en appliquant successivement les deux formules suivantes :

Mortalité % = les insectes morts/le nombre total des insectes traités × 100 **(Eq.3)**

Mortalité corrigée = test M – contrôle M (%) / 100 – control M × 100 **(Eq.4)**

7.2. Xylanase

La souche RTS11 a été sélectionnée pour l'étude de la production de xylanase en raison de son index enzymatique supérieur à celui des autres souches.

7.2.1. Estimation de l'activité xylanase en milieu liquide

L'activité xylanase de la souche RTS11 a été évaluée, en utilisant deux milieux de culture différents (Tableau 7), 50 mL de chaque milieu ont été inoculés par la souche de *Bacillus sp.* RTS11 puis incubés à 30°C pendant 48 h dans un incubateur (100 rpm), le bouillon a été centrifugé et l'activité xylanase a été déterminée selon la méthode décrite ci-dessous.

7.2.2. Dosage de la xylanase

L'activité de la xylanase a été déterminée selon la méthode de Bailey *et al.*, (1992) en mesurant la quantité de sucres réducteurs (équivalent xylose) libérés en utilisant l'acide 3,5-dinitrosalicylique. Le mélange réactionnel contenant 1 mL de solution de xylane de bouleau (1% de xylane dans un tampon de phosphate de sodium 0,05M, pH 7,5) et 1 mL d'extrait enzymatique, a été incubé à 60°C pendant 15 minutes, la réaction a été arrêtée par l'ajout de 3 mL de réactif d'acide 3,5-dinitrosalicylique. L'absorbance de la couleur obtenue a été mesurée par rapport au contrôle à 540 nm, la quantité de xylose produite a été mesurée à partir d'une courbe standard de xylose (Annexe 3). Une unité internationale (UI) d'activité xylanase a été définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 µmole de xylose par minute.

Tableau 7. Composition des bouillons de culture utilisés pour tester l'activité xylanase.

Composition	M1	M2
Xylane (g/L)	5	5
Extrait de levure (g/L)	5	1
Peptone (g/L)	5	-
KH_2PO_4 (g/L)	1	-
K_2HPO_4 (g/L)	-	0.5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L)	0.1	0.2
$CaCl_2.2H_2O$ (g/L)	-	0.02
NaNO3 (g/L)	-	3
$FeSO_4$ (g/L)	-	0.02
$MnSO_4$ (g/L)	-	0.02

7.2.3. Estimation de l'activité xylanase sans cellulase

L'activité cellulase a été déterminée par la méthode de Bailey et Nevalainen, (1981) en utilisant 1% (*p/v*) de carboxyméthylcellulose (CMC) comme substrat et le glucose comme étalon.

7.2.4. Estimation de la biomasse

Les cellules bactériennes présentes dans le bouillon ont été récoltées par centrifugation, et séchées dans une étuve à 80°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. La biomasse a été exprimée en masse de cellules sèches (mg/L) (Gaur *et al.*, 2015).

7.2.5. L'effet de certains mono et polysaccharides sur la production de xylanase

Différentes sources de carbone ont été testées pour déterminer leur effet stimulateur ou inhibiteur sur la production de xylanase par *Bacillus* sp. RTS11, le bouillon de fermentation contenait déjà 0.3% de xylane de bouleau a été complété par 0,2% (*p/v*) de l'une des sources de carbone suivantes : xylane de bouleau, xylane d'épeautre d'avoine, xylane d'épi de maïs, xylose, glucose, arabinose, sucrose, amidon et carboxyméthylcellulose, soit un total de 0,5% de source de carbone, puis l'activité xylanase a été dosée (Rawashdeh *et al.*, 2005).

7.2.6. Effet des sources d'azote sur l'activité de la xylanase

Pour étudier l'effet des sources d'azote sur la production de xylanase, un premier criblage a été effectuée pour choisir les sources d'azote les plus influentes sur l'activité de la xylanase, qui ont ensuite été soumises à un second criblage par la méthode de Plackett-Burman. Le milieu de base dépourvu de toute source d'azote a été supplémenté avec différentes sources d'azote inorganiques et organiques à 0,5%. La peptone, l'extrait de levure, l'extrait de malt, l'urée, la caséine, la gélatine ont été utilisés comme sources organiques, et $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$, NH_4Cl, KNO_3 comme sources inorganiques, les milieux sans aucune source d'azote ont été utilisés comme contrôle.

7.2.7. Effet de différents additifs sur l'activité de la xylanase

L'effet de différents additifs a été étudié, Tw 80, Tw 20, Tw 40, glycérol, acide oléique, CTAB, et PEG 8000 ont été ajoutés individuellement au milieu à une concentration de 0,2%.

7.2.8. Optimisation statistique de la production de la xylanase

7.2.8.1. Le plan expérimental de Plackett-Burman

Quinze variables ont été sélectionnées pour étudier leur impact potentiel sur la production de xylanase, à savoir la concentration de xylane, la température d'incubation, les sources d'azote (extrait de levure, peptone, $(NH_4)_2SO_4$, urée, KNO_3), le tw 80, et les sels d'ions métalliques ($MgSO_4$, $CaCl_2$, NaCl, $FeSO_4$, $MnSO_4$, $CoCl_2$, $ZnSO_4$). Ces variables ont été testées à deux niveaux, faible (-) et élevé (+). 20 essais expérimentaux ont été réalisés pour déterminer les facteurs significatifs.

Tableau 8. Le modèle de Plackett-Burman pour la production de xylanase par la souche RTS11.

Variables	Composition (g/L)	Valeur	
		(+)	(-)
A	Xylane	3	10
B	Extrait de levure	1	10
C	Peptone	1	5
D	KNO_3	1	5
E	Urée	0.05	1
F	$MgSO_4$	0.1	0.5
G	NaCl	0.1	1
H	$CaCl_2$	0.02	0.3
J	Tween 80	0.1	0.3
K	$MnSO_4$	0.005	0.02
L	$FeSO_4$	0.005	0.02
M	$CoCl_2$	0.001	0.02
N	$ZnSO_4$	0.001	0.02
O	Température	30	37
P	$(NH_4)_2SO_4$	1	3

7.2.8.2. Conception expérimentale de Box-Behnken

Cinq variables A (âge d'inoculum), B (taux d'inoculum), C (pH), D (agitation) et E (xylane) ont été choisies pour être optimisées dans cette étude. Chaque variable a été représentée à trois niveaux. Au total, 46 expériences ont été réalisées, les données obtenues sur la production de xylanase ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA).

Tableau 9. Niveaux des variables sélectionnées dans l'expérience de Box-Behnken pour optimiser la production de xylanase.

Variables	Composition	Valeur (+)	Valeur (-)
A	Age de l'inoculum (h)	3	10
B	Taux de l'inoculum (%)	1	5
C	pH	5	10
D	Agitation (rpm)	0	200
E	Xylane (g/L)	10	12.5

7.2.9. Evolution temporelle et cinétique de croissance et de production de xylanase

7.2.9.1. Préparation de la préculture

Une boucle chargée de *Bacillus sp.* RTS11 a été placée dans un bouillon nutritif et incubée à 30°C pendant une nuit sous agitation (100 rpm). Ensuite, 0,5 mL de cette culture a été utilisé pour inoculer 100 mL de bouillon de sel minéral supplémenté avec 0,1% de xylane, le bouillon a été incubé dans un incubateur à 30°C pendant 5 h et 36 min, c'est la culture qui sert d'inoculum pour la production de xylanase.

7.2.9.2. La production de xylanase

Le milieu de production optimal était composé de (g/L) : xylane, 10 ; extrait de levure, 10 ; KNO_3, 5 ; $MgSO_4.7H_2O$, 0.5, tween 80, 0.1% ; $MnSO_4$, 0.02 ; $FeSO_4$, 0.02, pH 7.5, a été inoculé avec 2.28% d'inoculum âgé de 5.60 h (densité cellulaire environ $2,53\times10^7$ UFC/mL), et incubés pendant 36 h. Des échantillons ont été prélevés toutes les 2 h pour déterminer l'activité enzymatique, la teneur en protéines et en glucides, et pour contrôler la croissance bactérienne.

7.2.10. Purification enzymatique

Après la production de xylanase par la souche RTS11, les protéines du filtrat ont été précipitées par deux méthodes :

7.2.10.1. La méthode de partitionnement en trois phase (TPP)

Le partitionnement en trois phases précipite les biomolécules des solutions aqueuses en mélangeant l'extrait brut avec un sel solide principalement du sulfate d'ammonium $(NH_4)_2SO_4$) et un solvant organique, généralement du tert-butanol (Gagaoua et Hafid, 2016).

Les expériences TPP ont été réalisées comme décrit par Gagaoua *et al.*, (2014), l'extrait brut a été saturé avec du sulfate d'ammonium à 70%, suivi par l'ajout de *t*-butanol (la proportion extrait brut:*t*-butanol est de 1:1,75). Le mélange a été vortexé pendant 1 heure à 4°C, puis il été centrifugé à 5000 rpm pendant 10 min à 4°C pour faciliter la séparation des trois phases. La phase supérieure de *t*-butanol a été prélevée à l'aide d'une micropipette. La phase aqueuse inférieure et la phase interfaciale ont été soigneusement séparées et leur activité enzymatique et leur teneur en protéines ont été analysées. Le précipité interfacial a été dissous dans du Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) et dialysé pendant une nuit contre le même tampon. Différentes paramètres ont été optimisés pour aboutir à une bonne séparation des phases :

a) Sulfate d'ammonium : L'effet de saturation en sulfate d'ammonium (30, 40, 50, 60, 70, et 80 %) a été étudié.

b) *t*-butanol : Différents ratios extrait brut:*t*-butanol (1:0.5, 1:0.75, 1:1, 1:1.25, 1:1.5, 1:1.75, 1:2) ont été testés.

c) pH : Différentes valeurs de pH du tampon (5, 6, 7, 8, 9, 10) ont été testés.

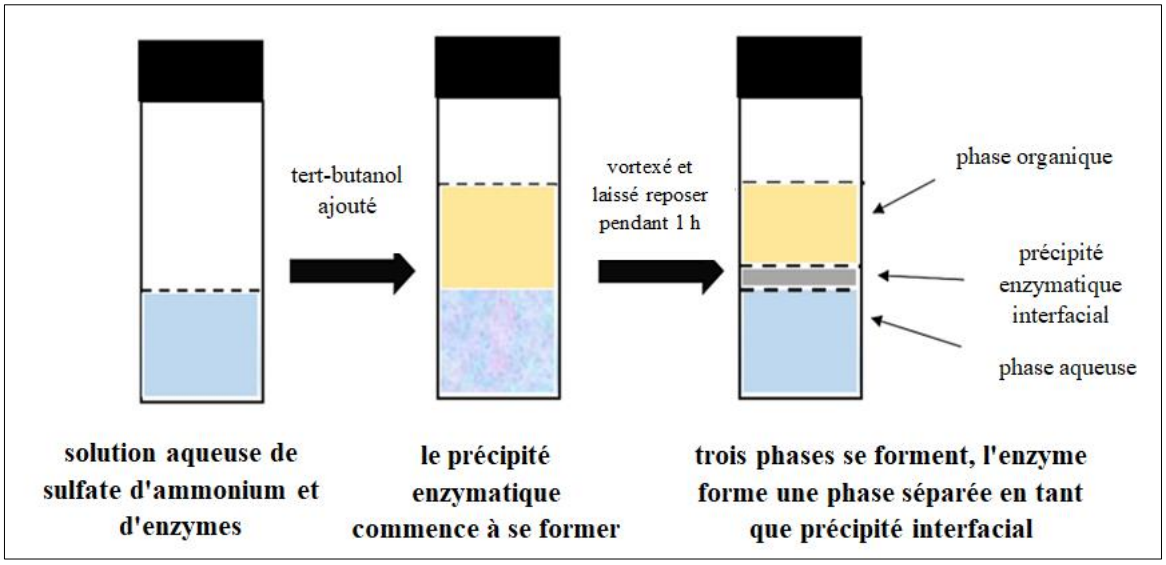


Figure 20. Diagramme schématique du partitionnement en trois phases (Kumar *et al.*, 2015).

7.2.10.2. Méthode chromatographique

La précipitation des protéines a été effectuée avec 80% du sulfate d'ammonium pendant une nuit à 4°C suivi par une centrifugation, le culot a été récupéré dans un faible volume de tampon phosphate (50 mM, pH 7) puis dialysé contre le même tampon. Le dialysat a été appliquée sur une colonne de filtration sur gel (Sephadex-G50), équilibrée avec du

tampon phosphate (50 mM, pH 7), l'élution a été effectuée avec le même tampon. Des fractions de 4 mL d'éluât sont récupérées. L'activité enzymatique a été dosée dans chaque tube et les fractions positives présentant l'activité xylanasique ont été regroupées et passées sur une colonne échangeuse d'anions (DEAE-Sepharose), qui a été préalablement équilibrée avec du tampon phosphate, l'élution des protéines a été effectué en appliquant un gradient croissant de NaCl (0-0.5 M). Des fractions de 2 mL ont été collectées, celles qui présentaient une activité xylanase ont été concentrées par ultrafiltration avec une membrane Amicon (Millipore).

7.2.10.3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante SDS-PAGE

La pureté de l'enzyme et la masse moléculaire de ses sous-unités sont déterminées par migration électrophorétique en gel de polyacrylamide selon la méthode de Laemmli (1970).

7.2.11. Analyse biochimique de la xylanase purifiée

7.2.11.1. Effets du pH sur l'activité et la stabilité de la xylanase

Le pH optimal de l'enzyme a été déterminé en incubant l'enzyme avec le substrat (0.1 % de xylane) préparé dans des tampons appropriés : tampon phosphate (pH 6-8), tampon glycine-NaOH (pH 9-12), l'enzyme et le substrat ont été incubés pendant 30 min à 30°C. L'activité maximale obtenue a été considérée comme 100%.

La stabilité enzymatique au pH a été testée, l'enzyme a été maintenue dans des tampons à pH 9 et 10 pendant 4 h à 60°C, le dosage enzymatique standard a été effectué chaque 1 h, et l'activité résiduelle a été calculée.

7.2.11.2. Effets de Température sur l'activité et la stabilité de la xylanase

Le profil d'activité de la xylanase en fonction de la température a été déterminé dans un tampon glycine-NaOH (50 mM, pH 9) à des températures variant de 30 à 80°C. La thermostabilité de l'enzyme xylanase a été déterminé en incubant la solution enzymatique à 50 et à 60°C, sans substrat, pendant 1, 2, 3 et 4 h. L'activité résiduelle a ensuite été dosée dans des conditions standard après l'ajout du substrat.

7.2.11.3. Effet de certains activateurs et inhibiteurs sur l'activité de la xylanase

Les effets des ions métalliques (Mg^{+2}, Cu^{+2}, Fe^{+2}, Ca^{+2}, Zn^{+2}, Mn^{+2}, Hg^{+2} et Na^{+2} ; 5 mM), des surfactants (Tw 20, Tw 80, Triton X-100, à 0,5%), du méthanol et du butanol sur

l'activité enzymatique ont été étudiés, l'activité de l'enzyme en absence d'ions métalliques ou d'inhibiteurs a été prise comme contrôle.

7.2.12. Détermination de la spécifité du substrat

La spécificité de la xylanase purifiée a été vérifiée en testant l'activité sur différents substrats, en utilisant le xylane de bois de bouleau, le xylane d'épi de maïs, le CMC, l'amidon, et la pectine. Les substrats (1% *p/v*) ont été mis en suspension dans un tampon glycine (pH 9) et incubés avec l'enzyme purifiée à 60°C pendant 15 min. Les sucres réducteurs libérés ont été quantifiés par la méthode de DNS.

7.2.13. Application de xylanase

7.2.13.1. Blanchiment de pâte a papier

a) Préparation de la pulpe

Des boîtes en carton ont été coupés en petits morceaux et trempés dans de l'eau distillée pendant une nuit à température ambiante, puis pressées pour éliminer l'eau absorbée et séchées au four.

b) Influence de différentes doses de xylanase sur le blanchiment

Les échantillons de pulpe ont été inoculés avec différentes doses de xylanase (5U, 10U, 15U, et 20U) par gramme de pulpe. La quantité de sucres réducteurs libérés dans le milieu réactionnel a été mesurée après 1 heure d'incubation en utilisant la méthode de DNS.

c) Influence de la consistance de la pâte sur le blanchiment

L'optimisation de la consistance de la pulpe a été réalisée en utilisant différentes concentration de pâte séchée au four (3%, 5% et 10%), le milieu réactionnel a été maintenu à 60°C pendant 1h, suivi par la quantification des sucres réducteurs.

d) Influence du temps d'incubation sur le blanchiment

Le temps de réaction a été optimisé en traitant la pâte avec 20 U de xylanase pendant 4h. La libération de sucres réducteurs a été quantifiée toutes les heures.

e) Blanchiment de la pâte à papier avec la xylanase

Le traitement à la xylanase a été effectué dans des flacons contenant 2,5 g d'échantillon de pulpe dilué dans un tampon glycine (pH 9), et 50 U/mL de xylanase purifiée. Les flacons ont été incubés à 60°C dans un incubateur pendant 4 h sous agitation (100 rpm).

Pour la préparation d'une feuille manuelle, les papiers ont été récupérés par filtration, puis pressés entre deux papiers d'aluminium et séchés à 60°C jusqu'à un poids constant. La quantité de sucres réducteurs libérés par la pulpe a été mesurée par la méthode DNS. Le filtrat a été analysé pour la libération des composés phénoliques et des chromophores à partir de la pulpe, en mesurant l'absorbance à 280 nm et 465 nm, respectivement.

7.2.13.2. Hydrolyse des résidus agro-industriels

Les résidus agro-industriels (son de blé, paille de blé, noyaux d'abricot, déchets de raisin, et de tomate, bagasse de canne à sucre, épis de maïs et sciures de bois) sont coupés en petits morceaux, broyés à l'aide d'un broyeur et tamisés pour obtenir de fines particules. Pour évaluer la capacité de la xylanase à hydrolyser les résidus agro-industriels, des mélanges réactionnels contenant 5 U de solution enzymatique purifiée et 50 mg de poids sec de chaque résidu en suspension dans un tampon glycine (50 mM, pH 9) ont été incubés pendant 24 h à 60°C. La réaction a été arrêtée en plaçant le mélange dans de l'eau bouillante pendant 5 min, puis centrifugé à 7 000 rpm pendant 15 min. Les sucres réducteurs libérés par l'hydrolyse de ces substrats ont été quantifiés par la méthode de l'acide dinitrosalicylique.

7.2.14. Analyse statistique

Le programme GraphPad (version 9.2.0) a été utilisé pour les analyses statistiques au niveau de 5% ($p = 0,05$). Les données ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA), suivie par un test de Tukey ou de Dunett pour la détermination des différences de moyennes entre les traitements.

CHAPITRE 03 :

RÉSULTATS

ET

DISCUSSION

1. Isolement, purification et sélection des souches

1.1. Dénombrement

Cent vingt isolats bactériens ont été isolés à partir de divers échantillons de sable, de sédiments, et de pièrres prélevés. Des variations dans les espèces bactériennes obtenues ont été observées entre les trois sites géographiques. La sélection et la purification des isolats ont été basées sur la variabilité morphologique de leurs colonies et de leur aspect microscopique. Comme le montre le tableau 10, la densité bactérienne récupérée dans le sol de rhizosphère était faible, de l'ordre de 1.21×10^4 et 1.76×10^3 UFC/g sur le milieu amidon-caséine et sur le milieu TSA, respectivement. Elle était de l'ordre de 1.60×10^5 sur le milieu amidon caséine et de 1.33×10^3 sur le milieu TSA, par gramme de sédiment. La densité des bactéries enregistrée dans le sol des dunes était de l'ordre de 4.3×10^2 sur le milieu TSA et 2.9×10^3 sur le milieu Amidon-caséine. Une très faible densité bactérienne a été trouvée dans l'échantillon de pierre.

Tableau 10. Quantification des souches bactériennes récupérées à partir de différents échantillons.

	E1	E2	E3	E4
SCA	2.9×10^3	1.60×10^5	1.21×10^4	1.23×10^2
TSA	4.3×10^2	1.33×10^3	$1,76 \times 10^3$	$0,06 \times 10^2$

E1, Dune; E2, Rhizosphère ; E3, sédiments ; E4, pièrres

Dans l'ensemble, comme le montre la figure 21, les échantillons de sol rhizosphériques et de sédiments ont fourni pour chacun 44 isolats, tandis que 25 isolats provenaient du sol des dunes, et 7 isolats ont été isolés à partir de pierres rocheuses. Les milieux amidon-caséine et TSA ont permis de collecter respectivement 82 et 38 souches bactériennes.

Des analyses microbiologiques des sols de la région de Ghardaïa (Sahara algérien) montrent que ces sols sont peuplés d'une microflore de l'ordre de 10^3 UFC/g de sol (Bazzine et Hamdi-Aissa, 2014). Une autre étude portant sur la microbiologie du sol du Sahara égyptien permettait de compter environ 10^4 UFC/g, de bactéries aérobies cultivées (Köberl *et al.*, 2011). Le nombre de bactéries cultivées à partir d'échantillons du désert d'Atacama, variait de 10^2 à 10^3 UFC/g (Lester *et al.*, 2007), tandis que celui du désert de Thar (Inde) atteindrait 10^6 UFC/g de sol (Sharma *et al.*, 2013). Les études menées par Fierer *et al.*, (2012), concernant l'étude des populations microbiennes du sol de différents écosystèmes, sur

la base du séquençage métagénomique, ont permis de distinguer la pauvreté des déserts en termes de diversité phylogénétique, les sols sahariens ne constituent pas un environnement propice à la création d'une diversité de souches bactériennes, et cela est principalement dû à la faible activité de l'eau dans ces milieux (Fierer *et al.*, 2012). D'autres facteurs, tels que les variations contrastées de température, le pH, les fortes concentrations en sel, le rayonnement solaire intense et les vents permanents, peuvent également influencer la distribution de la population microbienne (Belov *et al.*, 2018). La nature sableuse du sol qui est pauvre en nutriments, ainsi que la rareté, voire l'absence totale de végétation dans certaines régions désertiques, tels que les mers de dunes, les zones rocheuses et les oasis fluviales sèches, contribuent a la sélection des communauté bactériennes du sol, car la rhizosphère exerce un effet positif sur la répartition de ces communautés (Gommeaux *et al.*, 2010; Preston et Dartnell, 2014). De même, la stratégie de dormance adoptée par certaine populations bactériennes lors de périodes de sécheresse prolongées, ne favorise pas la reproduction microbienne (Rocha *et al.*, 2002).

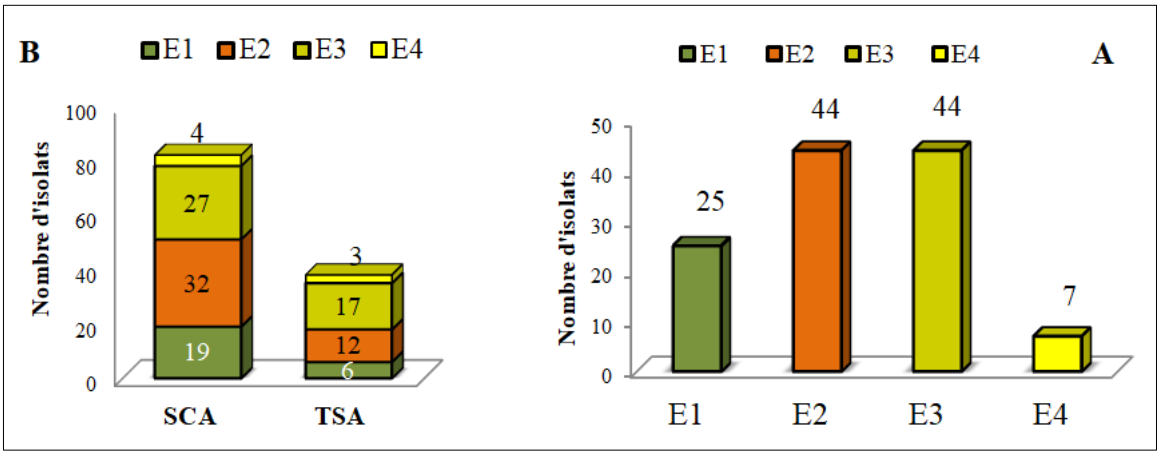


Figure 21. Répartition des cultures étudiées en fonction de point de prélèvement (A), milieux d'isolement (B).

1. 2. Isolements des actinomycètes

La résistance des souches d'actinomycètes à la dessiccation et à la salinité est plus importante que celle des autres bactéries, et elles ont déjà été ciblées et identifiées dans les déserts hyperarides (Mohammadipanah et Wink, 2016). Sur milieu amidon-caséine, des colonies d'actinomycètes se développent après 7 jours d'incubation, ces colonies peuvent être reconnues par leur aspect macroscopique (colonies poudreuses ou dures, incluses dans le milieu d'isolement), et microscopique (ramifications filamenteuses). Les résultats de l'isolement des colonies d'actinomycètes à partir de quatre échantillons, en fonction du milieu

de culture et du prétraitement utilisés, sont présentés dans la figure 22. D'après ces résultats, 82 colonies différentes d'actinomycètes ont été isolées à partir des deux milieux de culture, dont 29, 30, 20, et 3 provenaient respectivement de rhizosphère, de sédiments, des dunes, et de pierre (Figure 22B). La microflore de quatre échantillons est composée de bactéries et d'actinomycètes, ces derniers représentaient plus de 60% de la population bacterienne isolée (Figure 22D). Selon une étude de Bhatnagar et Bhatnagar, (2005), les actinomycètes peuvent représenter environ 50% de la population microbienne totale dans les sols désertiques. Dans cette étude, Le milieu caséine-amidon a été utilisé, car il est considéré comme l'un des milieux les plus sélectifs pour l'isolement des actinomycètes. Küster et Williams, (1964), ont testé plusieurs milieux de culture pour l'isolement de *Streptomyces* et ont conclu que l'amidon comme source de carbone et la caséine comme source d'azote constituaient le mélange le plus sélectif. Le milieu amidon-caséine a permis d'isoler 68 souches d'actinomycètes, alors que 14 souches ont été isolées par le milieu TSA (Figure 22A).

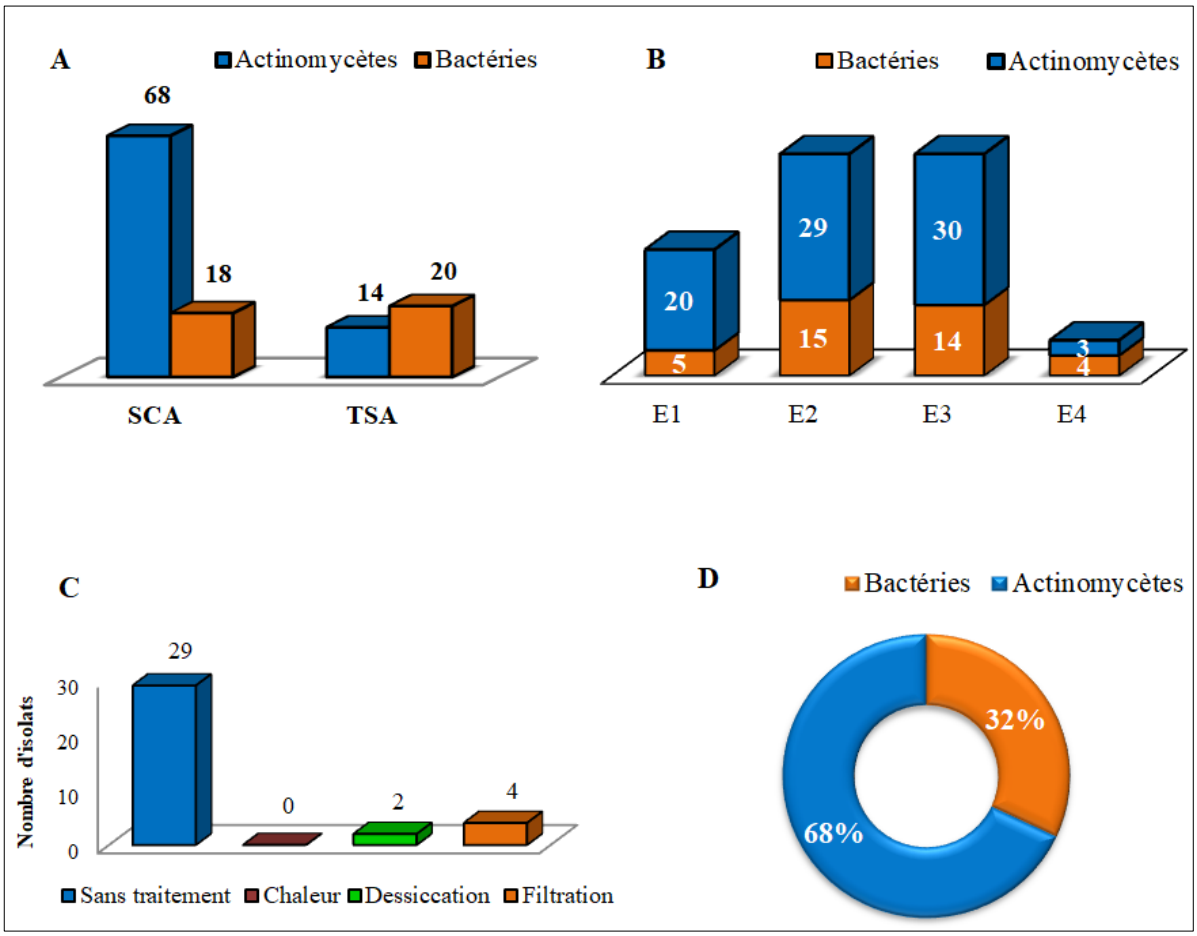


Figure 22. Nombre d'actinomycètes isolés en fonction du milieu d'isolement (A), des échantillons (B), de prétraitements (C), et le pourcentage des actinomycètes (D).

1. 3. Effet des prétraitements

Le prétraitement du sol peut stimuler l'isolement des actinomycètes en favorisant leur croissance par l'élimination de la plupart des bactéries à gram-négatives indésirables (Kumar et Jadeja, 2016). Dans notre étude, deux traitements physiques (chaleur sèche et filtration) et un traitement chimique (phénol) ont été appliqués, en utilisant le milieu sélectif amidon-caséine.

L'isolement des actinomycètes à partir des échantillons traités et non traités a permis d'obtenir les résultats présentés dans la figure 22C, nous avons observé une différence significative dans le nombre de colonies d'actinomycètes isolées, les différents prétraitements conduisant à une réduction remarquable du nombre d'actinomycètes par comparaison avec l'échantillon non traité. Aucune souche d'actinomycète n'a été isolée par la procédure de chauffage à sec. Ce résultat est en accord avec celui obtenu par (Boudemagh, 2007), qui a montré que le traitement thermique (110°C, 10 min) réduisait de plus de 50% le nombre d'actinomycètes isolés. Ainsi que, Abidin *et al.*, (2015), ont conclu que le traitement thermique (120°C, 60 min) entraînait une faible récupération des actinomycètes. En revanche, Kapur *et al.*, (2011), ont montré que le prétraitement du sol par séchage et chauffage stimule l'isolement des actinomycètes.

Les actinomycètes isolés sans prétraitement étaient plus nombreux que ceux obtenus par la méthode de filtration sur membrane, ce résultat est en accord avec une étude précédente de Njenga *et al.*, (2017) .

Le traitement du sol avec du phénol permettait la récupération d'un nombre d'actinomycètes inférieur à celui de l'échantillon non traité, le même résultat a été obtenue par Hayakawa *et al.*, (2004) ; Ruttanasutja et Pathom-aree, (2015), ils ont constaté que le prétraitement au phénol réduisait de manière significative l'abondance des populations d'actinomycètes, en raison de la toxicité du phénol en tant que biocide. Un autre résultat obtenu par Janaki *et al.*, (2014), montre l'efficacité du phénol (1,5%) pour isoler un grand nombre d'actinomycètes par rapport à d'autres méthodes d'isolement sélectif.

2. Criblage d'isolats producteurs des enzymes hydrolytiques

Les enzymes microbiennes présentent plus d'avantages que les enzymes végétales ou animales, car elles peuvent être cultivées en masse, elles sont facilement manipulées génétiquement, leur activité catalytique est plus importante, et leur coût de production est plus

faible (Beygmoradi et Homaei, 2017). La capacité enzymatique des 120 isolats a été testée, un dépistage rapide des bactéries productrices des enzymes hydrolytiques a été réalisé par l'étalement d'inoculum de chaque isolat sur des boites contenant un milieu minimal complété par divers substrats comme seule source de carbone, les bactéries productrices d'enzymes ont formé des colonies de 1 à 15 mm de diamètre, entourées d'une zone claire caractéristique de chaque enzyme, indiquant l'activité enzymatique (Figure 23). Les enzymes cellulase, xylanase, amylase, chitinase, protéase, lipase, pectinase, et tannase étaient présentées par 91, 53, 99, 89, 39, 55, 79, et 16 souches respectivement. Parmi les isolats sélectionnés, seulement 06 (4,76%) souches bactériennes (SRIA17, SRIA18, et SRIA22, SRISF4, SRISF8, SRISF9) étaient des productrices des huit enzymes (Figure 24). Plus de 60% d'isolats possédaient la cellulase, l'amylase, la chitinase, et la pectinase (Figure 25). Les méthodes de criblage en boîte par l'utilisation des colorants ne présentent pas des méthodes quantitatives en raison de la faible corrélation entre l'activité enzymatique et la taille de l'halo, ce problème a été résolu par la quantification des sucres réducteurs libérés dans le milieu de fermentation sous l'effet de l'activité enzymatique (Li *et al.*, 2007).

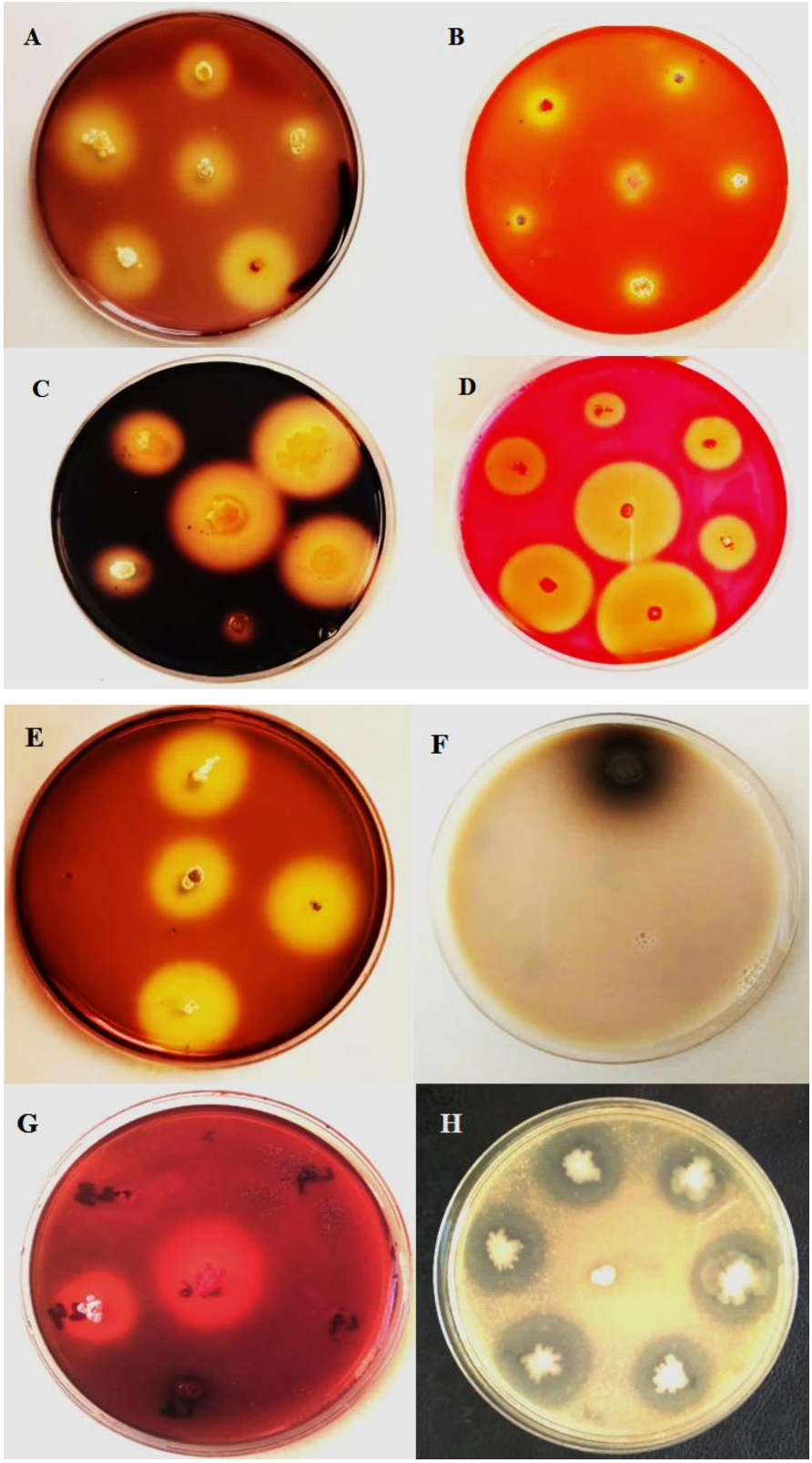


Figure 23. Les activités enzymatiques, A- chitinase, B- lipase, C- amylase, D- cellulase, E- pectinase, F- tannase, G- xylanase, H- protéase.

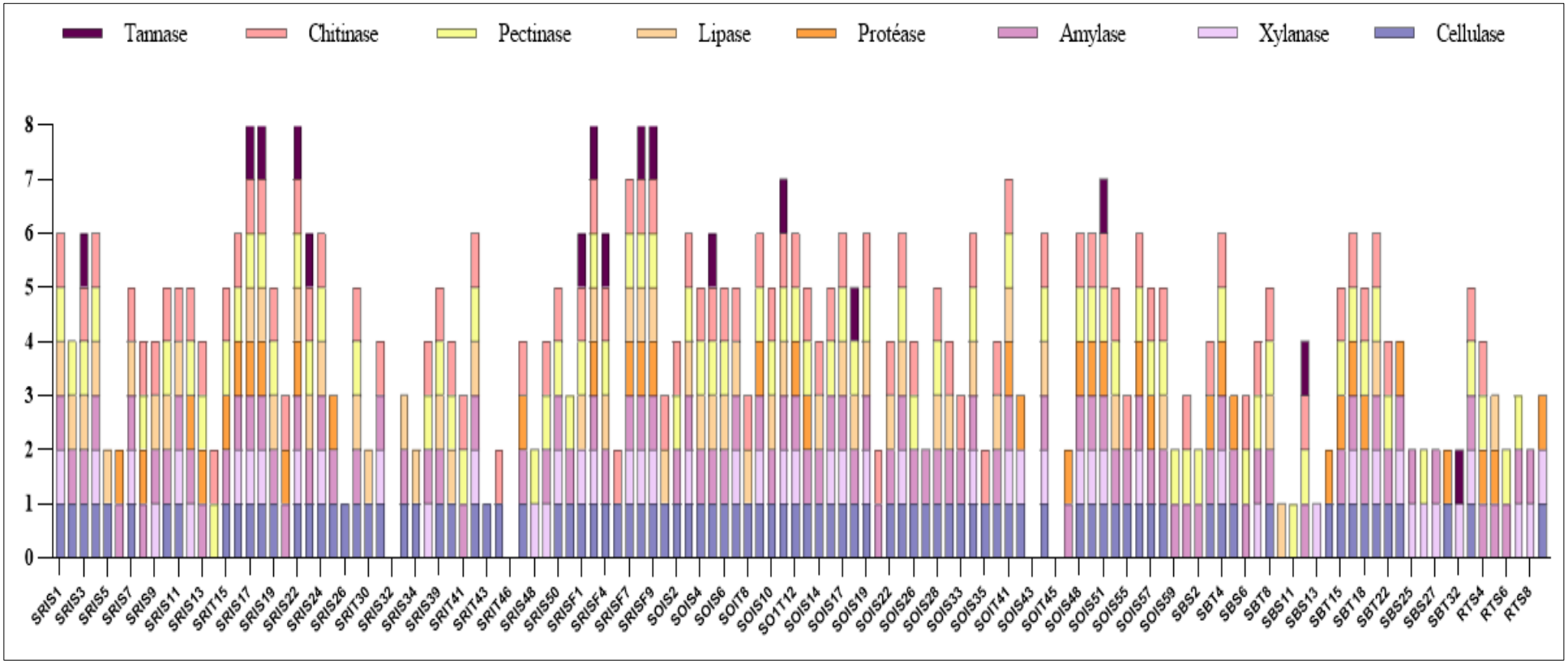


Figure 24. Possession de différentes enzymes chez les souches isolées

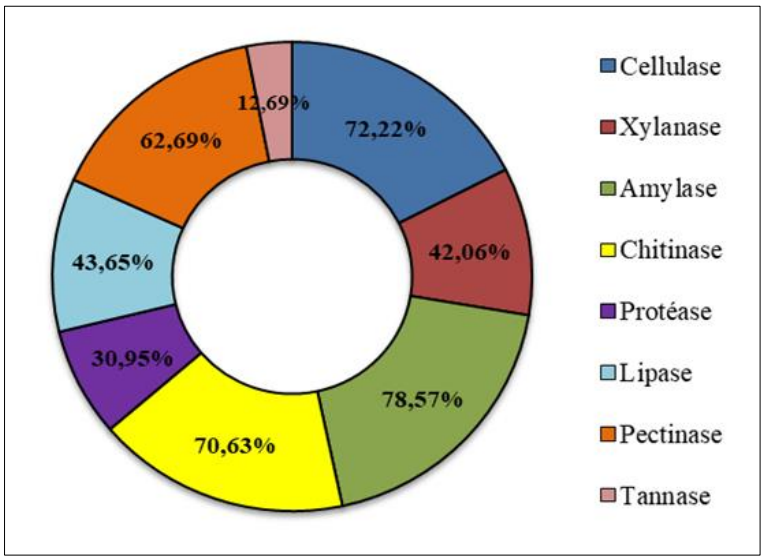


Figure 25 : Répartition des activités enzymatiques.

L'index enzymatique (>1,5) a été utilisé comme indicateur pour grouper les isolats dans les classes suivantes: 2-3, 3-4, 4-5, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11. La figure 26 montre la distribution du nombre d'isolats par rapport aux classes susmentionnées. La plupart des isolats avaient un rapport compris entre 1.5 et 3, et l'activité chitinase était la seule activité présentant des indices enzymatiques élevés (9-10, 10-11), et pour cela l'activité chitinase a été sélectionnée pour une étude plus approfondie.

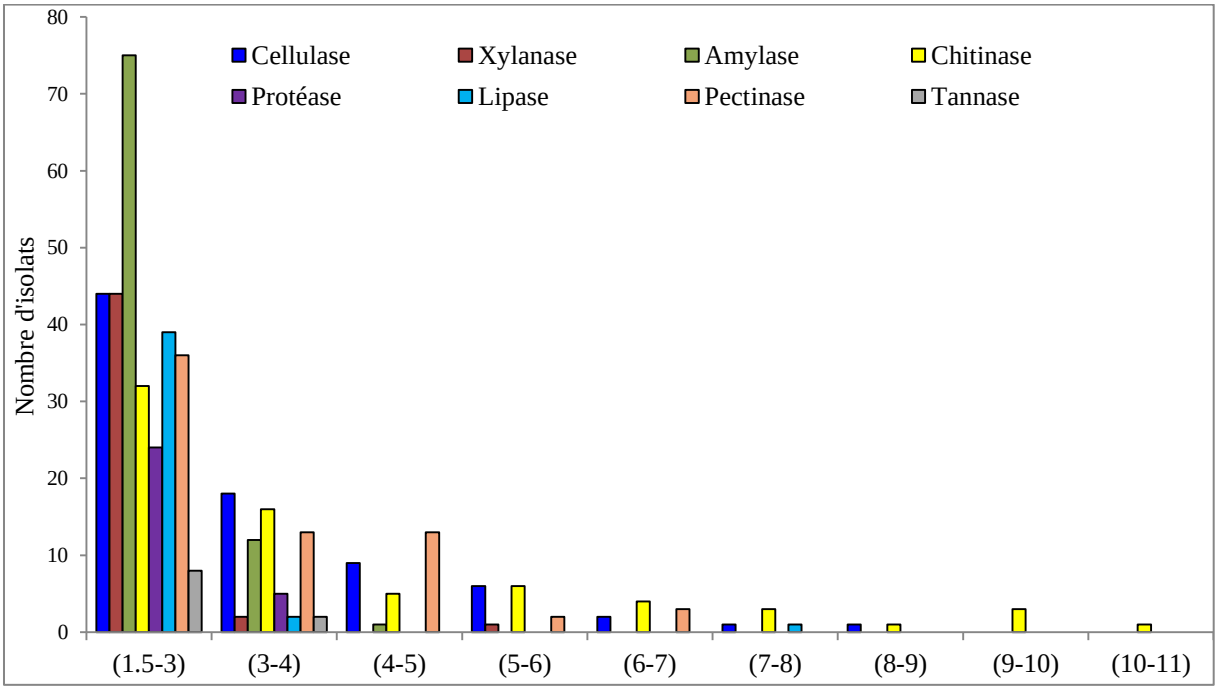


Figure 26. Regroupement des isolats en fonction de l'index enzymatique

3. La chitinase

Les meilleurs isolats ont été sélectionnés sur la base de leur indice enzymatique supérieur à 7,5 (Figure 27). Le criblage primaire des isolats bactériens sur gélose à la chitine a montré que huit isolats qui sont nommées SOIT7, SOIT9, SOIT12, SOIT13, SRIT8, SRIT12, SRIT15, SRIT16, possédaient une activité enzymatique élevée. Parmi ces isolats, un isolat bactérien provenant du sable de la rhizosphère, désigné SRIT8, a remarquablement bien hydrolysé la chitine, formant une zone claire plus importante que les autres isolats, ces résultats n'étaient que qualitatifs, car les zones claires nous permettaient seulement de distinguer les isolats producteurs des isolats non producteurs. Ensuite, un criblage quantitatif a été réalisé en milieu liquide, les isolats ont présenté des niveaux d'activité enzymatique variables (de 2,5 à 4,4 U), la plus forte activité (4,4 U) ayant été observée chez SRIT8 (4,4 U) après 36 h d'incubation (Figure 28). On peut constater que la souche SRIT8 a montré l'activité chitinase la plus élevée à la fois sur gélose et en culture submergée, et elle a donc été retenue pour des études ultérieures.

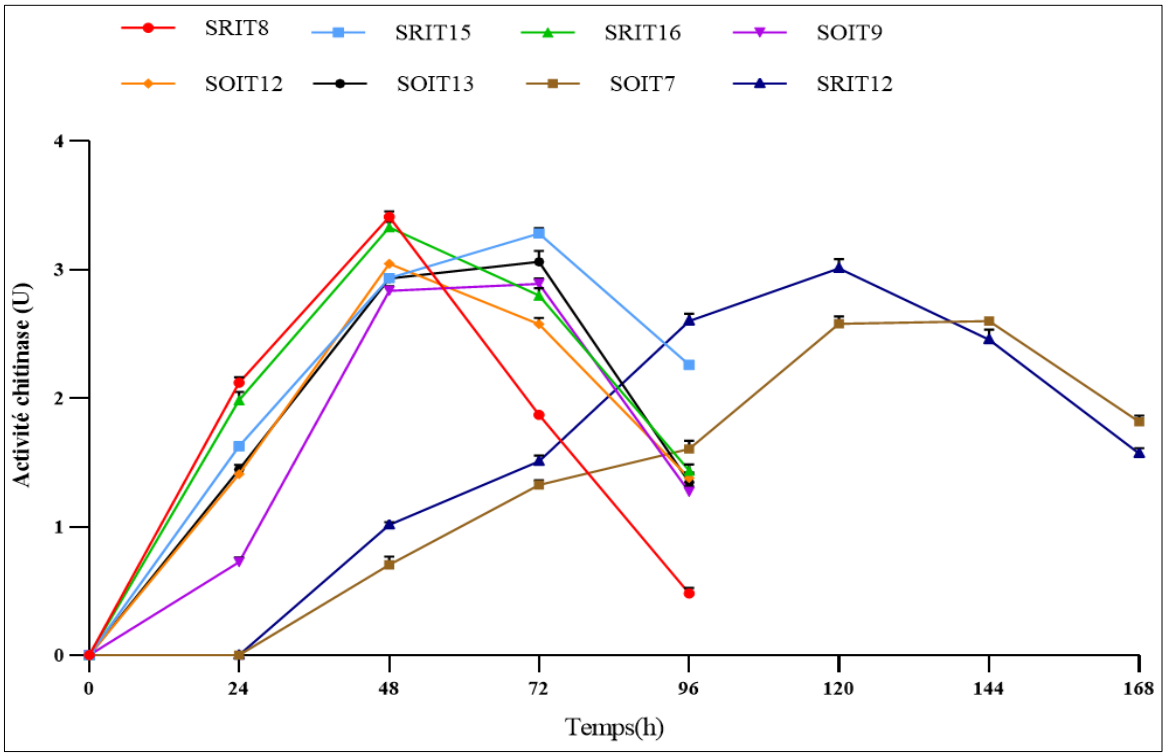


Figure 28. Activité de la chitinase des huit isolats en culture submergée

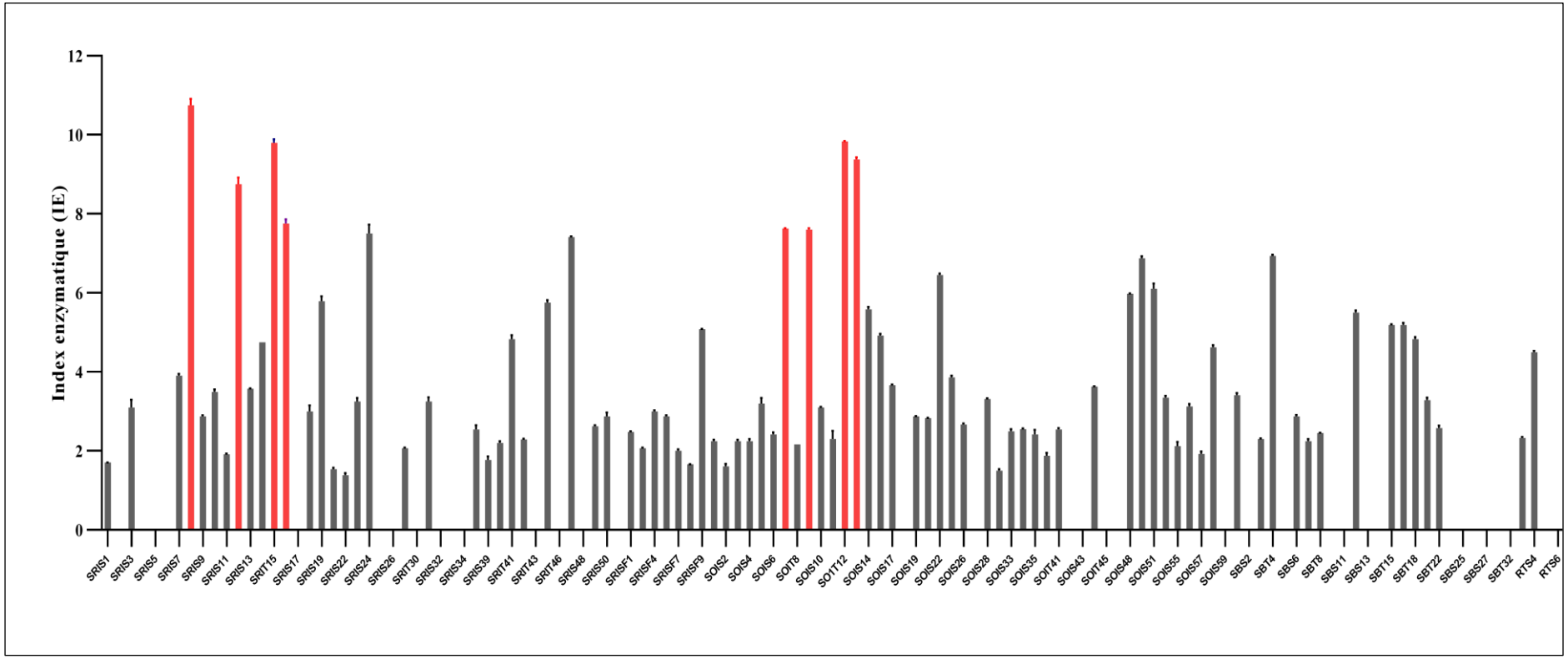


Figure 27. L'index enzymatique chez les isolats sélectionnés pour l'activité chitinase.

3.1. Identification moléculaire de la souche SRIT8

L'identité de la souche SRIT8 a été déterminée par séquençage du gène de l'ARNr 16S, suivi de l'identification du degré de similitude à l'aide de l'outil BLAST dans la base de données GenBank. L'arbre phylogénétique a établi la parenté de l'isolat SRTI8 et leur identité avec le genre *Bacillus*, comme le montre la figure 29. La séquence partielle du gène de l'ARNr 16S de l'isolat SRIT8 présente 98% de similitude avec *Bacillus amylolequifaciens*. Cette séquence a été déposée dans la base de données GenBank sous le numéro d'accession OL742456.

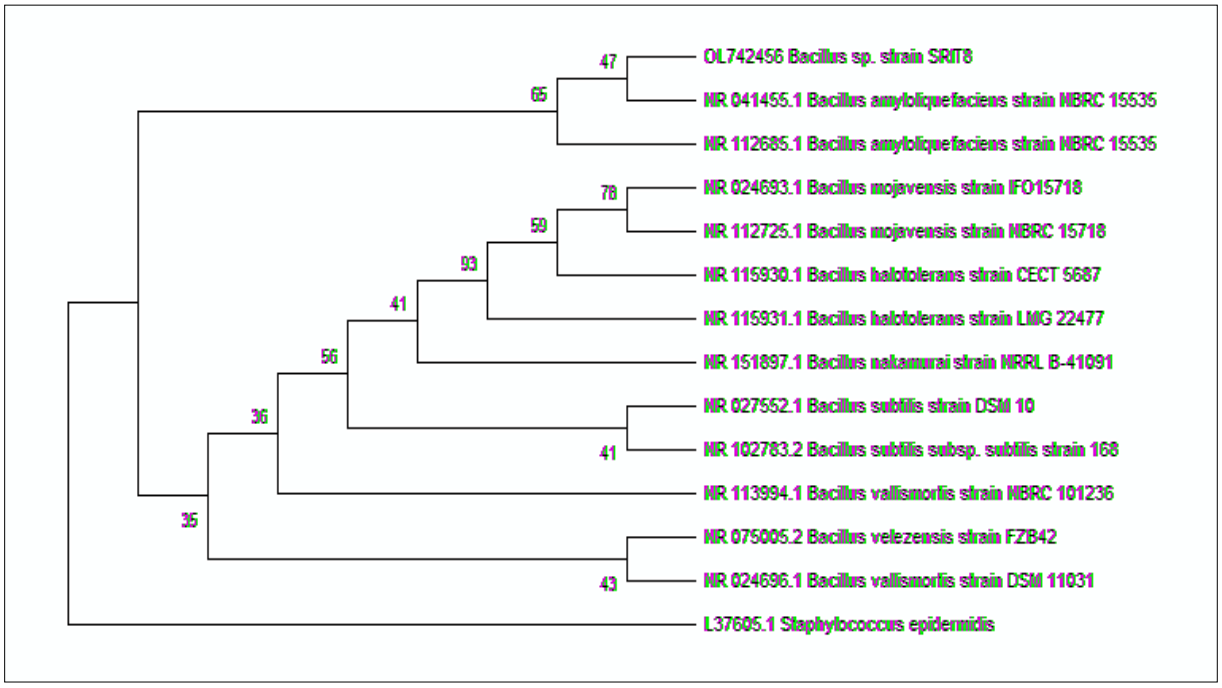


Figure 29. Arbre phylogénétique montrant la relation phylogénétique du *Bacillus sp*. SRIT8 avec les espèces apparentées.

3.2. Tolérance de SRTI8 à différentes conditions physiologiques (NaCl, pH, T°)

La croissance de la souche SRIT8 a été testée à différentes températures, différents pH, et différents niveaux de NaCl (Tableau 11). L'isolat s'est bien développé à un pH entre 5 et 11. Ainsi qu'une bonne croissance a été observée à des températures comprises entre 10 et 50°C, et a été inhibée à 60°C et 70°C. La souche a toléré jusqu'à 7% de NaCl.

Tableau 11 : Croissance de l'isolat SRIT8 à différentes températures, pH, et NaCl.

T°	10	20	30	40	50	60	70
	+	+	+	+	+	-	-
pH	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
	+	+	+	+	+	+	+
NaCl	**0**	**3%**	**5%**	**7%**	**10%**	**12%**	**15%**
	+	+	+	+	-	-	-

3.3. Effet de source de carbone sur la production de chitinase

Pour stimuler la production de la chitinase, il est essentiel de fournir une source de carbone adéquate, la production de chitinase par la souche de *Bacillus sp.* SRTI8 a été testée en présence de différentes sources de chitine : chitine en poudre, chitine colloïdale et chitine gonflée en utilisant deux milieux de culture différents, après 72 h d'incubation. Les résultats présentés dans la figure 30 montrent que des niveaux supérieurs de production de chitinase ont été observés lorsque de la chitine en poudre a été utilisée. Le rendement en chitinase était de 2,36, 4 UI dans le milieu 1 et 2, respectivement. La chitine en poudre a été utilisée dans les expériences suivantes comme source de carbone.

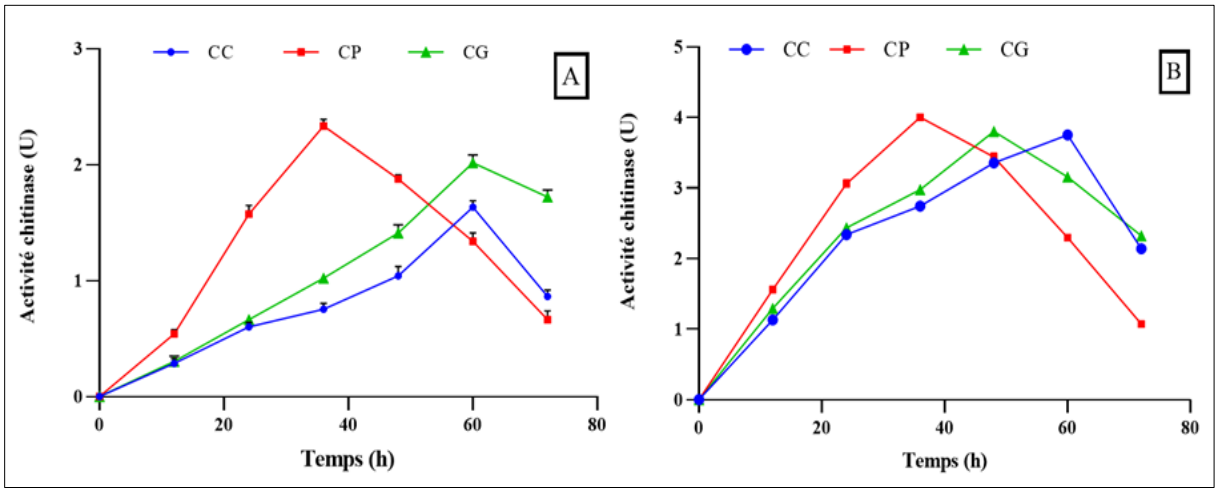


Figure 30. Production de chitinase en fonction de différentes formes de chitines dans deux milieux de culture; A- Milieu 1, B- Milieu 2.

Des résultats semblables ont été donnés par De-hui *et al.*, (2011) et Aida *et al.*, (2014), Ils ont montré que la poudre de chitine utilisée comme source de carbone permettait d'obtenir une activité maximale de la chitinase chez *Paenibacillus sp*. et *Aspergillus terrus*. En outre, la chitine colloïdale et la chitine gonflée sont difficiles à traiter et exigent des volumes d'acides énormes. Selon Stoykov *et al.*, (2015), la chitine préparée par hydrolyse de la chitine avec de l'acide chlorhydrique induit une activité chitinase élevée, mais pour des raisons environnementales, la chitine colloidale n'est pas adaptée à la production à grande échelle, et l'application directe de la chitine est préférable en production industrielle.

3.4. Optimisation statistiques des conditions de culture pour la production de chitinase par *Bacillus sp*. SRTI8

Les chitinases sont généralement influencées par la température, le pH, l'agitation, et la période d'incubation, ainsi que par les facteurs nutritionnels, y compris les sources d'azote et de carbone, les sels inorganiques et organiques (Gomaa, 2021).

3.4.1. Criblage de variables significatives à l'aide du plan de Plackett-Burman

Le plan de Plackett-Burman a été choisi dans la présente recherche pour définir les principaux facteurs susceptibles d'influencer la production de chitinase. Il a été utilisé pour analyser l'effet de 10 variables sur la production de chitinase. Le tableau 12 présente le plan expérimental de Plackett-Burman pour 12 essais et l'activité de la chitinase correspondante. Les données présentées dans ce tableau montrent une variation de 0,11 à 13,54 g/L dans la production de chitinase, ce qui reflète l'importance de l'optimisation du milieu pour obtenir une augmentation de la production. La réponse expérimentale (activité de la chitinase) s'écrit sous la forme suivante :

Activité =4.49 - 1.75 A-0.0683 B + 0.7467 C+ 0.0317 D+ 1.58 E -1.14 F + 1.79G + 0.43H + 0.3517 J-2.82K ;

Où A, chitine; B, $MgSO_4$; C, $MgSO_4$; D, $MnCl_2$; E, K_2HPO_4 ; F, NaCl; G, peptone; H, extrait de levure; J, $(NH_4)_2SO_4$; K, température.

Tableau 12: Matrice de conception de Plackett-Burman et les résultats correspondants pour la production de chitinase.

Exp	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	R	R´
1	15	0.1	0.2	0.2	3	0.5	0.5	0.5	7	30	**7.28**	**7.27**
2	3	0.5	0.05	0.2	3	3	0.5	0.5	1	37	**0.51**	**0.4967**
3	3	0.1	0.2	0.05	3	3	8	0.5	1	30	**11.29**	**11.30**
4	15	0.5	0.05	0.05	1	3	0.5	0.5	7	30	**0.11**	**0.1233**
5	3	0.1	0.2	0.05	1	3	0.5	5	7	37	**0.48**	**0.4667**
6	15	0.1	0.05	0.05	3	0.5	0.5	5	1	37	**0.2**	**0.2133**
7	3	0.1	0.05	0.2	1	0.5	8	0.5	7	37	**4.03**	**4.04**
8	3	0.5	0.2	0.2	1	0.5	0.5	5	1	30	**7.62**	**7.63**
9	15	0.1	0.05	0.2	1	3	8	5	1	30	**4.08**	**4.07**
10	15	0.5	0.2	0.05	1	0.5	8	0.5	1	37	**1.14**	**1.13**
11	15	0.5	0.2	0.2	3	3	8	5	7	37	**3.62**	**3.63**
12	3	0.5	0.05	0.05	3	0.5	8	5	7	30	**13.54**	**13.53**

A, chitine; *B*, $MgSO_4$; *C*, $MgSO_4$; D, $MnCl_2$; E, K_2HPO_4 ; F, NaCl; G, peptone; H, extrait de levure; J, $(NH_4)_2SO_4$; K, température; R, activité chitinase ; R´, activité prédite.

Le test ANOVA a été utilisé pour évaluer la signification du modèle, les résultats sont présentés dans le tableau 13. En général, une grande valeur *F* et une petite valeur *P* pour un modèle indiquent qu'il est significatif. Notre modèle s'est avéré significatif, comme le montrent la valeur *F* (10668,25) et la valeur p (0,0075). La qualité de l'ajustement du modèle peut être vérifiée également par le coefficient de détermination R^2, le coefficient de détermination (R^2) du modèle était de 1, ce qui indique que 100% de la variabilité de la réponse pouvait être expliquée par le modèle. Les effets significatifs des variables ont été déterminés par les valeurs p, les facteurs avec un intervalle de confiance supérieur à 95% ($p<0,05$) ont été considérés comme significatif, un coefficient positif représente un effet qui favorise l'augmentation du rendement de la chitinase, tandis qu'une valeur négative indique un effet antagoniste. Au total, huit variables se sont avérées avoir un impact significatif sur l'activité de la chitinase : la chitine, la température, K_2HPO_4, NaCl et la peptone étaient les facteurs les plus importants ($p<0.0075$), suivis par $CaCl_2$ et l'extrait de levure ($p= 0,01$), et enfin $(NH_4)_2SO_4$ ($p=0,02$), tandis que les deux autres composants ($MgSO_4$, $MnCl_2$) ont eu un effet négatif sur la production de chitinase**.** Pour un facteur significatif, si son effet est négatif, cela indique que le facteur est efficace pour la production de chitinase, mais que sa quantité requise doit être inférieure à la faible concentration indiquée dans l'expérience de Plackett-

Burman. En revanche, si l'effet est positif, une concentration plus élevée que celle indiquée dans l'expérience de Plackett-Burman est nécessaire pour augmenter la production de chitinase. Il est apparu que $MgSO_4$ et $MnCl_2$ avaient des effets négatifs insignifiants et ont été éliminés dans les expériences ultérieures, car ils n'amélioraient pas l'activité de la chitinase.

Tableau 13 : ANOVA pour le plan de Plackett-Burman concernant la production de chitinase.

	Somme de carrés	Moyenne carrée	F	p	Coefficient
Modèle	227.59	22.76	10668.25	**0.0075**	
A	36.89	36.89	17292.25	0.0048	- 1.75
B	0.0560	0.0560	26.27	0.1227	- 0.0683
C	6.69	6.69	3136.00	**0.0114**	0.7467
D	0.0120	0.0120	5.64	0.2537	0.0317
E	30.02	30.02	14071.89	**0.0054**	1.58
F	15.69	15.69	7353.06	**0.0074**	- 1.14
G	38.52	38.52	18056.64	**0.0047**	1.79
H	2.24	2.24	1048.14	**0.0197**	0.4317
J	1.48	1.48	695.64	**0.0241**	0.0317
K	95.99	95.99	44997.02	**0.0030**	- 2.83

Plusieurs rapports ont appliqué le plan statistique de Plackett-Burman pour optimiser la production de chitinase, y compris la chitinase de *Chitiolyticbacter meiyuanensis* SYBC-H1 (Hao *et al.*, 2012), de *Streptomyces rubiginosus* SP24 (Jha et Modi, 2018), de *Streptomyces sp*. Da11 (Han *et al.*, 2009), et de *Brevundimonus diminuta* KT277492 (Eid Sayed Ashour *et al.*, 2016). Les résultats de notre test de dépistage semblent similaires à ceux obtenus par d'autres recherches, incluant l'effet stimulant de la chitine et de l'extrait de levure sur la production de la chitinase par *Alcaligenes xylosoxydans* (Vaidya *et al.*, 2003), *Bacillus pumilus* (Tasharrofi *et al.*, 2011), *Stenotrophomonas maltophilia* (Khan *et al.*, 2010), *Humicola grisea* (Kumar *et al.*, 2017), et *Paenibacillus sabina* (Patel et Dudhagara, 2020)**,** de même que l'effet de la peptone et de K_2HPO_4 chez *Serratia marcescens* (Wang *et al.*, 2014), l'effet du sulfate d'ammonium chez *Bacillus licheniformis AT6* (Aounallah *et al.*, 2017), et *Lysinibacillus fusiformis* B-CM18 (Singh *et al.*, 2013). L'effet de $CaCl_2$ et NaCl chez *Sanguibacter antarcticus* (Han *et al.*, 2009), et *Pantoea dispersa* (Gohel *et al.*, 2006).

Le diagramme de Pareto (Figure 31) facilite la visualisation des résultats obtenus avec Plackett-Burman, en affichant l'ordre d'importance des variables qui affectent la production de chitinase. L'axe horizontal représente les variables et l'axe vertical indique la signification statistique (p=0,05). Les variables qui traversent la ligne verticale sont considérées comme significatifs.

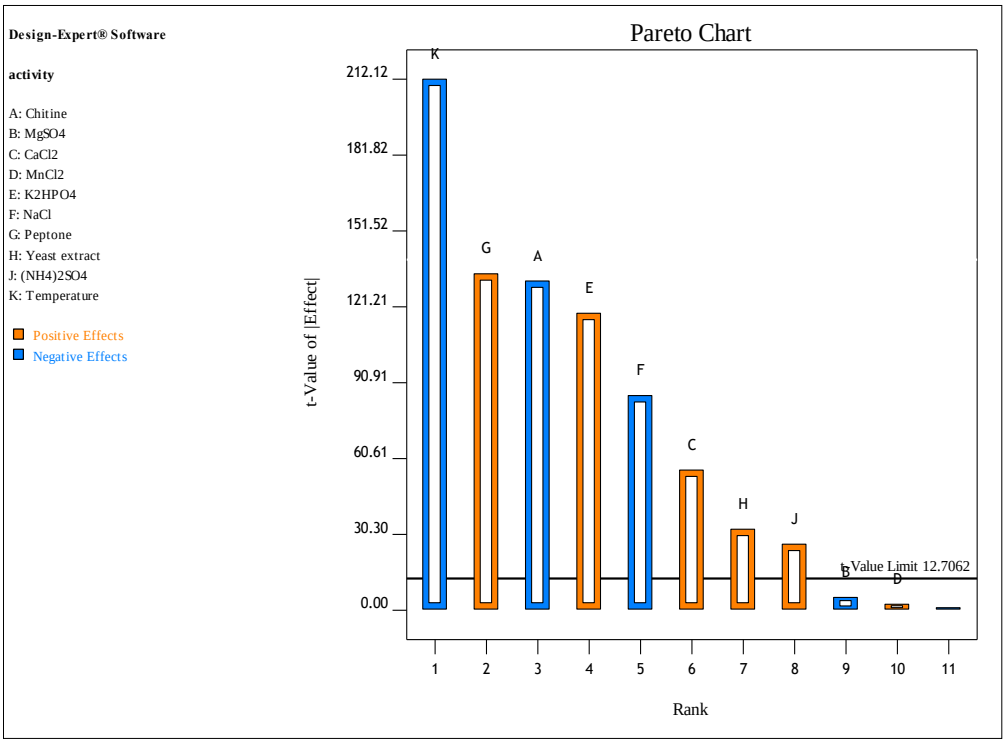


Figure 31. Graphique de Pareto présentant l'effet de différents facteurs sur la production de chitinase.

3.4.2. Optimisation La conception de Box - Behnken

Grâce au plan de Plackett-Burman, nous avons pu limiter à huit les facteurs de fermentation pour la production de chitinase. Ensuite, le plan de Box-Behnken a été utilisé pour déterminer le niveau optimal des deuxe variables sélectionnées regroupées en quatre modèles : modèle 1 (âge d'inoculum, taux d'inoculum, agitation), modèle 2 (chitine, extrait de levure, peptone), modèle 3 (K_2HPO_4, pH, température), modèle 4 ($CaCl_2$, NaCl, $(NH_4)_2SO_4$). Un total de 15 expériences a été effectué pour chaque modèle avec différentes combinaisons de trois variables.

3.4.2.1. Modèle 1

Initialement, l'âge de l'inoculum, le taux de l'inoculum et l'agitation, ont été optimisés à l'aide du modèle statistique de Box-Behnken. Le plan d'expérience et les résultats sont présentés dans le tableau 14. L'analyse de la variance (ANOVA) est détaillée dans le tableau 15. La signification du modèle a été vérifiée à l'aide des termes suivants :

- La valeur p pour le modèle était <0.0001, et pour le manque d'ajustement était 0,9989 (un manque d'ajustement non significatif est bon pour le modèle).
- Le coefficient de détermination R^2 (0,9930) et R^2 ajustée (0,9831).
- Le coefficient de variation (CV) était 5.14%.

Tableau 14 : Matrice de conception expérimentale et résultats de Box-Behnken (modèle 1).

Exp	Age d'inoculum (h)	Taux d'inoculum (%)	Agitation (rpm)	Activité (U)	Activité prédite (U)
1	6.5	3	150	**42.15**	**42.81**
2	10	3	200	**23.46**	**23.65**
3	10	3	100	**11.65**	**11.70**
4	3	5	150	**46.45**	**46.60**
5	6.5	1	100	**18.67**	**18.77**
6	6.5	3	150	**40.57**	**42.81**
7	3	3	200	**39.14**	**39.09**
8	6.5	5	200	**36.16**	**36.06**
9	3	1	150	**47.6**	**47.69**
10	6.5	3	150	**45.72**	**42.81**
11	6.5	1	200	**30.8**	**30.76**
12	6.5	5	100	**16.03**	**16.07**
13	10	5	150	**37.67**	**37.58**
14	10	1	150	**34.03**	**33.89**
15	3	3	100	**19.25**	**19.06**

En fonction des résultats présentés dans le tableau 15, les termes linéaire du modèle A (l'âge d'inoculum), et C (agitation), ainsi que le terme quadrique de l'agitation ($p<0.05$) influencent significativement la productivité enzymatique. Dans ce cas, A, C, C^2, représentent les termes significatifs du modèle. L'équation de régression est la suivante :

Activité = 42.81 - 5.70 A + 0.6512 B + 8.00 C + 1.20 AB - 2.02 AC + 2.00 BC - 1.71 A^2 + 0.3321 B^2 - 17.73 C^2; Où A, âge d'inoculum; B, taux d'inoculum; C, agitation.

Tableau 15 : ANOVA pour le plan de Box-Behnken afin d'optimiser la production de chitinase (modèle 1).

	Somme de carrés	Moyenne carrée	F	p
Model	1985.31	220.59	78.36	**<0.0001**
A	260.26	260.26	92.45	**0.0002**
B	3.39	3.39	1.21	0.3223
C	511.36	511.36	181.65	**<0.0001**
AB	5.74	5.74	2.04	0.2128
AC	16.32	16.32	5.80	0.0610
BC	16.00	16.00	5.68	0.0628
A^2	10.77	10.77	3.83	0.1078
B^2	0.4072	0.4072	0.1446	0.7193
C^2	1160.74	1160.74	412.34	**<0.0001**

La surface de réponse 3D, est la représentation graphique de l'équation de régression, qui permet de comprendre les interactions entre l'activité enzymatiques et les facteurs étudiées, ainsi que de déterminer le niveau optimal pour chaque facteur, chaque figure montrant l'effet de deux facteurs, tout en maintenant le troisième constant.

Les interactions entre l'âge, le taux d'inoculum, et l'agitation ont été illustrées par les tracés de contour et de surface (Figure 32). L'activité de la chitinase a augmenté en fonction de la vitesse d'agitation de 100 à 160 rpm, le rendement maximal de la chitinase a été obtenu à 160 rpm, au-delà de cette vitesse l'activité de la chitinase a été réduite. L'agitation est un paramètre important qui affecte la production d'enzymes, l'oxygène agit comme un accepteur final d'électrons pour les réactions d'oxydation afin de fournir l'énergie nécessaire aux activités cellulaires (Demirkan *et al.*, 2017). L'agitation joue un rôle essentiel dans la répartition des cellules au cours de la fermentation submergée, à des taux d'agitation stationnaires ou faibles les cellules bactériennes n'obtiendraient pas l'oxygène dissous dont elles ont besoin et s'agglutineraient les unes aux autres en raison d'un mélange inapproprié des composants du milieu, alors que plus l'agitation est élevée plus le taux de cisaillement est important (Abd-Aziz *et al.*, 2008). Il faut également tenir compte de la formation de métabolites au cours de la fermentation, par exemple, les enzymes sont sensibles au cisaillement et certaines vitesses d'agitation peuvent les rendre dysfonctionnelles en raison d'un changement de conformation (Verma et Garg, 2022). Une production optimale de chitinase a été observée à une vitesse d'agitation de 150 rpm pour *B. licheniformis* B307

(Akeed *et al.*, 2020), et *Verticillium lecanii* F091 (Liu *et al.*, 2003), à 160 rpm pour *Streptomyces pratensis* (Shivalee *et al.*, 2018), et à 200 rpm pour *Paenibacillus sp.* CHE-N1 (Kao *et al.*, 2007).

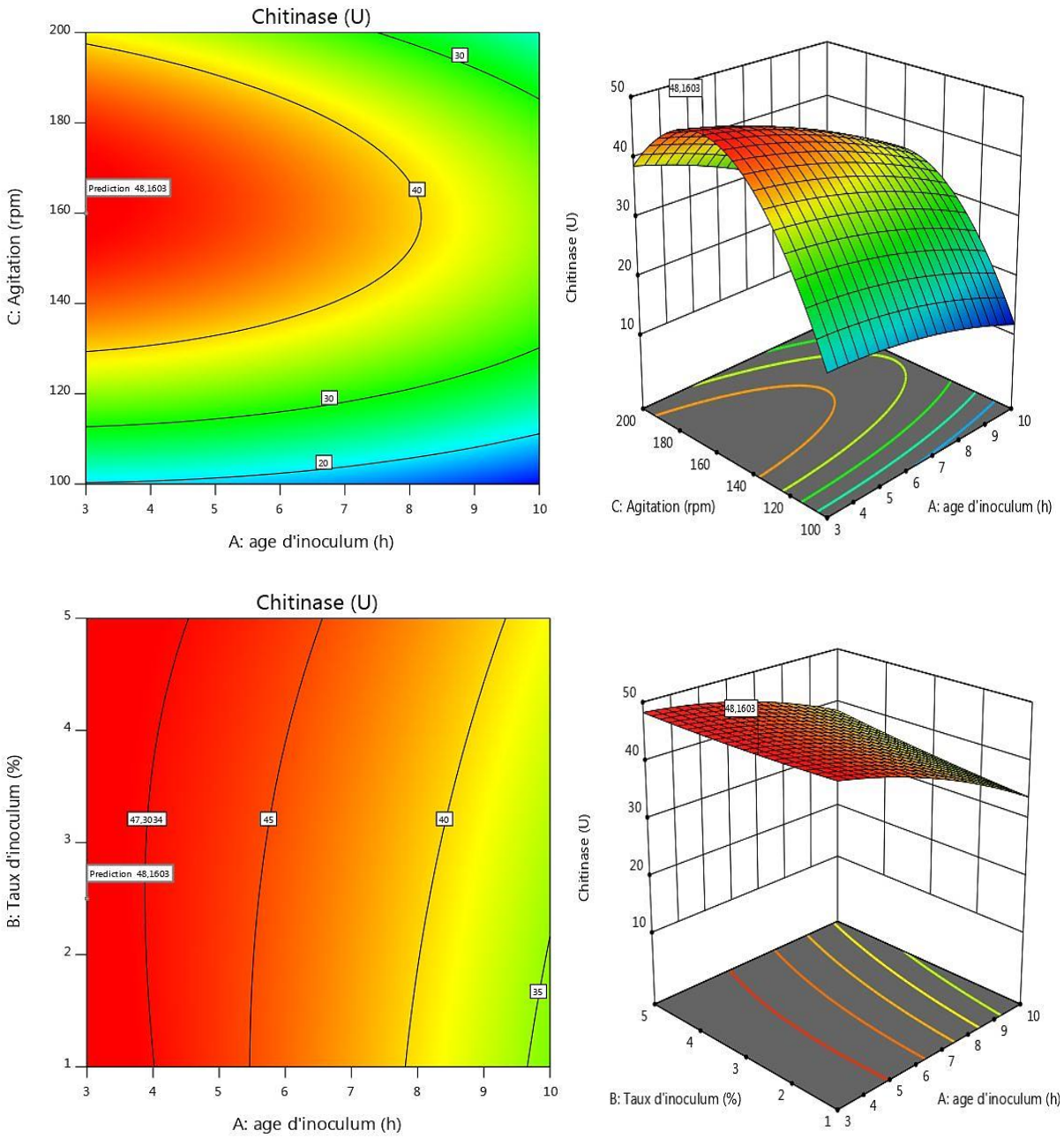


Figure 32. Les tracés de contour et de surface montrant les interactions entre l'agitation et l'âge d'inoculum (AC), et entre l'âge d'inoculum et le taux d'inoculum (AB).

Le taux et l'âge de l'inoculum sont des variables extrêmement importants, car certains composés sécrétés par les cellules dans le milieu stimulent leur croissance, et il faut une quantité minimale de cellules pour que la croissance reprenne dans une nouvelle culture (Martínez *et al.*, 2023). D'autre part, l'inoculum est utilisé à un taux élevé dans certains processus de fermentation afin de produire le produit désiré dans une période de temps plus courte (Krishna et Nokes, 2001). Dans notre étude, la fermentation a été réalisée en utilisant trois taux différents d'inoculum, une augmentation progressive de l'activité chitinasique a été observée lorsque le taux d'inoculum était passé de 1 à 2,5% (Figure 32), le rendement maximal a été atteint avec 2,5% d'inoculum ($1,18\times10^7$ CFU/mL). La production de chitinase a ensuite diminué à mesure que les niveaux d'inoculum augmentaient. Dans le processus de fermentation, l'équilibre entre la biomasse en croissance et les nutriments permettrait d'obtenir une production enzymatique optimale, donc il est très important de fournir un niveau optimal d'inoculum ; un inoculum approprié permet une meilleure distribution de l'oxygène dissous et, par conséquent, une production élevée d'enzymes (Gupta *et al.*, 2017). Une taille d'inoculum plus faible induisent des phases de latence plus longues pour que les cellules se multiplient jusqu'à atteindre un nombre suffisant pour utiliser le substrat et produire l'enzyme, tandis qu'un niveau élevé d'inoculum entraîne une augmentation rapide de la biomasse et par conséquent un stress nutritionnel qui affecte la formation du produit (Singh et Kaur, 2012).

L'âge de l'inoculum joue un rôle important dans la vitesse de fermentation, et son optimisation doit donc toujours être considérée comme un paramètre important de la fermentation (Özalpar *et al.*, 2024). L'activité métabolique du microbe diffère selon sa phase de croissance, l'inoculum doit toujours être en phase de croissance logarithmique, où les bactéries se divisent rapidement, ce qui entraîne un rendement plus élevé avec une période d'incubation plus courte (Khursade *et al.*, 2019). L'effet de l'âge de l'inoculum sur la production de chitinase a donc été étudié en inoculant les milieux de production avec des inoculums d'âges différents de 3 à 10 h. La production maximale de l'enzyme chitinase a été obtenue avec un milieu inoculé avec un inoculum âgé de 3 h, lorsque les cellules étaient fraîches et très actives. L'âge de l'inoculum le plus approprié pour la production de chitinase par *Bacillus sp.* R2 était de 18 h avec un taux de 2,5% ($8,9 \times 10^8$ CFU/mL) (Cheba et Zaghloul, 2020). 1% d'inoculum âgé de 24 h a permis de maximiser la production de chitinase par *Bacillus sp.* (Gupta *et al.*, 2017). L'utilisation d'un inoculum en phase stationnaire de croissance se traduit par un rendement enzymatique faible, étant donné qu'il n'est pas métaboliquement actif, alors que les cultures dans la phase exponentielle de croissance

peuvent être métaboliquement actives (Onilude *et al.*, 2012). Les cultures de *Bacillus sp.* les plus jeunes, qui n'ont pas produit de spores, sont entrées très rapidement dans la phase de croissance, tandis que les cultures plus anciennes ont produit des spores qui ont pris plus de temps pour germer et, par conséquent, une production d'enzymes faible et tardive (Sharma et Satyanarayana, 2012).

Les valeurs optimales des trois variables aboutissant à une production maximale d'enzymes ont été prédites par le logiciel Design Expert 11. Les conditions optimales proposées par l'équation du modèle étaient les suivantes : 2.5% d'inoculum agé de 3h, et 160 rpm d'agitation. La vérification de l'équation du modèle a été effectuée en utilisant le milieu de base complété par les valeurs de facteurs dérivées du modèle. Le rendement maximal en chitinase prédit par ce modèle était de 48,16 U. La valeur obtenue pour l'activité chitinase d'après notre expériences était de 52 U. La bonne concordance entre la réponse prédite et la réponse expérimentale obtenue indique l'adéquation des plans statistiques pour optimiser les milieux de fermentation.

3.4.2.2. Modèle 2

Trois variables significatives : la chitine, l'extrait de levure, et la peptone ont été également optimisées à l'aide de Box-Behnken, les résultats obtenus figurant dans le tableau 16. Les résultats de l'analyse de la variance (Tableau 17) montrent que la valeur *F* du modèle est de 11,44, la valeur p du modèle est de 0,0077 et celle du manque d'ajustement est de 0,2367, tandis que les valeurs du coefficient de détermination R^2 et du CV sont respectivement de 0,9537 et de 12,38%. Tous ces paramètres démontrent la fiabilité des expériences réalisées.

Comme le montre le tableau 6, les termes linéaire de l'extrait de levure (p=0,0056) et de peptone (p=0.0520) sont significatif, ce qui implique que ces composants peuvent agir comme des composants limitants et que même une faible variation de leur concentrations affectera la production de chitinase. En plus, le modèle a clairement révélé une interaction significative entre l'extrait de levure et la peptone (p=0,0094), les coefficients positifs de A et B indiquent que l'activité de la chitinase augmente avec les concentrations croissantes de peptone et d'extrait de levure. Le terme quadratique de chitine était également significatif (p=0,0007). La relation entre les variables correspondantes, leurs interactions, et les réponses obtenues peut s'écrire comme suit :

Activité = 33.29 + 5.34 A + 2.89875 B - 0.2138 C + 6.61 AB - 0.535 AC - 0.7775 BC - 2.71 A^2 + 1.85 B^2 - 12.38 C^2;

Où A, extrait de levure; B, peptone; C, chitine.

Tableau 16 : Matrice du plan Box-Behnken avec les valeurs expérimentales et prédites pour la production de chitinase (modèle 2).

Exp	A	B	C	R	R´
1	10	10	3	**47.38**	**51.22**
2	10	8	2	**70.8**	**63.39**
3	5	8	2	**68.49**	**69.29**
4	10	12	2	**107.16**	**106.36**
5	7.5	10	2	**78.75**	**74.89**
6	7.5	12	1	**63.54**	**59.97**
7	10	10	1	**50.22**	**54.59**
8	7.5	12	3	**58.54**	**55.51**
9	7.5	8	1	**40.34**	**43.37**
10	7.5	10	2	**69.68**	**74.89**
11	5	10	3	**34.04**	**29.67**
12	7.5	10	2	**76.25**	**74.89**
13	5	12	2	**45.13**	**52.54**
14	5	10	1	**32.06**	**28.22**
15	7.5	8	3	**42.34**	**45.91**

A, extrait de levure; B, peptone; C, chitine, R, activité; R´, activité prédite

Tableau 17: Analyse de variance (ANOVA) concernant la production de chitinase (modèle 2)

	Somme de carrés	Moyenne carrée	F	p
Model	5483.80	609.31	11.44	**0.0077**
A	1148.16	1148.16	21.55	**0.0056**
B	343.22	343.22	6.44	**0.0520**
C	1.86	1.86	0.0350	0.8590
AB	891.62	891.62	16.73	**0.0094**
AC	5.81	5.81	0.1090	0.7547
BC	12.25	12.25	0.2299	0.6518
A^2	138.82	138.82	2.61	0.1674
B^2	63.08	63.08	1.18	0.3262
C^2	2861.10	2861.10	53.70	**0.0007**

La production d'enzymes varie en fonction de la source d'azote, le dépistage et la sélection de la source d'azote la plus appropriée pour la culture sont donc des étapes fondamentales pour maximiser la production d'enzymes (Cardozo *et al.*, 2023). Dans le modèle 2, la chitine, la peptone, et l'extrait de levure sont maintenus à différentes concentrations pour déterminer leurs effets sur la production de chitinase, l'interaction entre ces composants est illustrée dans la figure 33. Un effet interactif significatif est observé entre l'extrait de levure et la peptone, l'augmentation de la concentration de deux variables s'accompagnant d'une augmentation de la production de chitinase (Figure 33. AB). Les sources d'azote organique telles que l'extrait de levure et la peptone se sont avérées efficaces pour améliorer la production de chitinase par divers micro-organismes (Woo *et al.*, 1996; Meena *et al.*, 2014; Jha et Modi, 2018). Elles jouent un rôle important dans le métabolisme et la production d'enzymes, ce qui s'explique par le fait que les sources organiques stimulent la croissance et la biosynthèse des protéines, des acides nucléiques, et de nombreux autres constituants cellulaires en fournissant aux cellules de l'azote, du carbone, et de l'énergie (Issa, 2016; Chalidah *et al.*, 2018). L'augmentation de l'activité de la chitinase a été corrélée avec la supplémentation en extrait de levure dans le milieu de culture de *Streptomyces griseorubens* C9 (Gasmi et Kitouni, 2016), et *Pseudomonas fluorescens* HN1205 (Lee et Kim, 2015). Une concentration élevée de peptone est requise pour assurer une production maximale de chitinase par *Serratia marcescens* (Wang *et al.*, 2014), et *Achromobacter xylosoxidans* (Subramanian *et al.*, 2020).

La concentration de chitine la plus faible (1 g/L) et la plus élevée (3 g/L) ont entraîné une baisse de la production d'enzymes, un rendement élevé d'activité a été obtenu à une concentration de 2 g/L (Figure 33. AC). Cette valeur est nettement inférieure à la valeur nécessaire indiquée par Sandhya *et al.*, (2004), pour l'induction de la chitinase (10 à 20 g/L). La production optimale de chitinase par *Streptomyces sp.* ANU 6277, *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130, et *Streptomyces viridlfcans* a nécessité des milieux de fermentation comprenant 1%, 1% et 1,5% de chitine (Narayana et Vijayalakshmi, 2009; Gupta *et al.*, 1995; Taechowisan *et al.*, 2003). Une utilisation minimale de substrat avec une production plus élevée d'enzymes est recommandée, et cela peut être un avantage supplémentaire pour la production industrielle qui vise à augmenter le rendement de la chitinase tout en utilisant une quantité minimale de chitine (Jha et Modi, 2018).

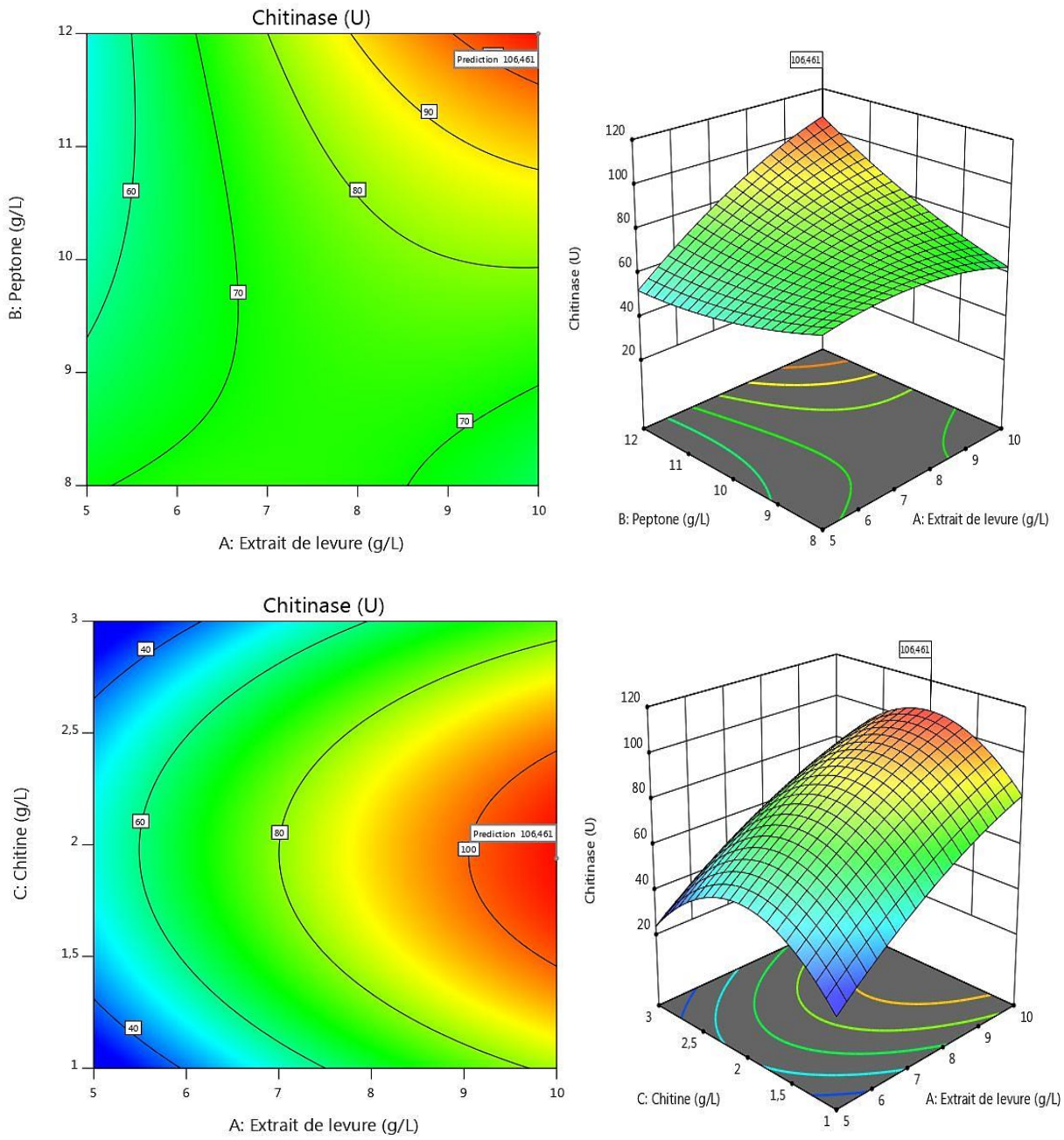


Figure 33. Les tracés de contour et de surface montrant les interactions entre la peptone et l'extrait de levure (AB), et entre la chitine et l'extrait de levure (AC).

Les valeurs des facteurs optimisés prédites par le modèle étaient : chitine 2 g/L, extrait de levure 10 g/L, et peptone 12 g/L. Des expériences de vérification ont été réalisées, la réponse pratique est de 112 U, comparée à la valeur prédite qui est de 106,46 U. La forte similarité entre les valeurs observées et prédites a montré que le Box-Behnken était un outil précis et applicable pour l'optimisation du milieu de culture.

3.4.2.3. Modèle 3

Le plan de Box-Behnken a également été utilisé pour déterminer le niveau optimal de : K_2HPO_4, pH, et Température. Le plan expérimental et les rendements en chitinase obtenus au cours des expériences sont présentés dans le tableau 18.

Tableau 18 : Plan d'expérience de Box behnken avec réponse de l'activité chitinase (modèle 3).

Exp	A	B	C	R	R´
1	4.5	25	7	**137.25**	**139.73**
2	4.5	25	7	**145.29**	**139.73**
3	4.5	20	5	**174.28**	**181.19**
4	3	30	7	**88.06**	**99.28**
5	6	30	7	**81.49**	**86.94**
6	3	25	9	**121.52**	**117.24**
7	4.5	30	9	**65.85**	**58.94**
8	3	25	5	**209.72**	**211.26**
9	3	20	7	**130.01**	**124.56**
10	4.5	30	5	**190.93**	**181.17**
11	6	25	5	**197.52**	**201.83**
12	4.5	20	9	**107.21**	**116.97**
13	6	25	9	**107.97**	**109.43**
14	6	20	7	**130.9**	**119.69**
15	4.5	25	7	**136.66**	**139.73**

A, K_2HPO_4,; *B*, température; *C*, pH, R, activité; R´, activité prédite

L'analyse de variance concernant l'activité de la chitinase est présentée dans le tableau 19. Les valeurs *F*, p, R^2 et CV du modèle étaient respectivement 24,77, 0,0013, 0,9781 et 7,98%, indiquant la fiabilité du modèle. La température et le pH ont eu un effet linéaire, quadratique et d'interaction significatif ($p<0,05$). L'équation polynomiale de second ordre est la suivante :

Activité = 63.68 - 1.47 A - 5.89 B - 20.27 C - 1.385 AB - 0.15 AC - 5.89 BC -3.01 A^2 -13.395 B^2 + 10.08 C^2;

Où A, B, C sont les concentrations de K_2HPO_4, température, et de pH, respectivement.

Tableau 19 : Analyse statistique du plan de Box-Behnken et signification des facteurs et de leurs interactions (modèle 3).

	Somme de carrés	Moyenne carrée	F	p
Model	25795.66	2866.18	24.77	**0.0013**
A	194.34	194.43	1.68	0.2516
B	1542.07	1542.07	13.32	**0.0147**
C	17381.80	17381.80	150.20	**<0.0001**
AB	1.51	1.51	0.0131	0.9143
AC	0.6806	0.6806	0.0059	0.9418
BC	841.29	841.29	7.27	**0.0430**
A^2	59.13	59.13	0.5109	0.5067
B^2	3184.25	3184.25	27.51	**0.0033**
C^2	2162.51	2162.51	18.69	**0.0076**

Les graphiques de réponse sont présentés dans la figure 34, ils permettent de visualiser les effets du K_2HPO_4, du pH, et de T° sur la production de chitinase, l'enzyme était active à un pH acide et l'activité diminuait lorsque le pH se rapprochait de la plage alcaline, l'abaissement du pH de 9 à 5 améliorant la production de la chitinase. En outre, une température de 25°C s'avérant optimale pour l'activité chitinase, et une production optimale de l'enzyme a été observée à un niveau inférieur de K_2HPO_4 (Figure 34, BC).

L'activité chitinase des micro-organismes diffère de l'un à l'autre et dépend de divers facteurs tels que le temps de réaction enzymatique, la concentration de enzyme et de substrat, le temps d'incubation, le pH du milieu, et la température (Malik *et al.*, 2023; Setia et Suharjono, 2015). La croissance bactérienne et la production d'enzymes sont sensibles aux variations de la température d'incubation (Akeed *et al.*, 2020). Les enzymes extracellulaires sécrétées par les micro-organismes pour digérer les éléments extérieurs jouent un rôle crucial dans leur croissance, les températures d'incubation affectent l'activité de ces enzymes extracellulaires, une température trop basse ralentirait le métabolisme cellulaire tandis qu'une température trop élevée endommagerait les enzymes de croissance cellulaire, tuant la cellule elle-même (Widowati *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2009). Le pH du milieu de culture joue un rôle majeur dans la production d'enzymes, tout changement de pH affecte la structure de la protéine, une baisse de l'activité enzymatique au-delà du pH optimal pourrait être due à l'inactivation de l'enzyme ou à son instabilité (Battestin and Macedo, 2007). Les enzymes

fonctionnent de manière optimale dans une plage limitée avec un pH optimal défini, l'effet du pH sur l'activité enzymatique est déterminé par la nature des acides aminés du site actif, qui subit une protonation et une déprotonation et par les changements de conformation induits par l'ionisation des autres acides aminés (Sabu *et al.*, 2005). La concentration des ions hydrogène affecte la structure dimensionnelle de l'enzyme et son activité, à un pH optimal l'enzyme possède la structure tridimensionnelle la plus propice à la fixation des substrats, l'activité de l'enzyme disparaît progressivement jusqu'à ce que l'enzyme devienne moins fonctionnelle, ce qui se produit lorsque la concentration d'ions hydrogène change par rapport à la concentration optimale en raison d'une modification du pH (Nirmala *et al.*, 2021). Un niveau élevé d'activité chitinase a été observé à pH 7,5 chez *Bacillus amyloliquefaciens* SM3 (Das *et al.*, 2012), à pH 8 chez *B. subtilis* ATCC 11774 (Saber *et al.*, 2015), à pH 7 et 8 chez *B. thuringiensis* et de *B. licheniformis*, respectivement (Gomaa, 2012).

Les conditions optimales prédites par le modèle étaient les suivantes : K_2HPO_4, 3.49 g/L ; température, 25 ; pH, 5. Des expériences de validation ont été réalisées en utilisant ces valeurs optimales avec les autres composants du milieu de culture (chitine 2 g /L, extrait de levure 10 g/L, peptone 12 g/L, K_2HPO_4 3.49 g/L, sulfate d'ammonium 7 g/L, $MnCl_2$ 0.2 g/L, $CaCl_2$ 0.2 g/L, et NaCl 0.5 g/L), le taux maximal de chitinase obtenu était de 220,35 U. Cette valeur s'est avérée proche de la valeur prédite (212,33 U), ce qui confirme la fiabilité du modèle appliqué.

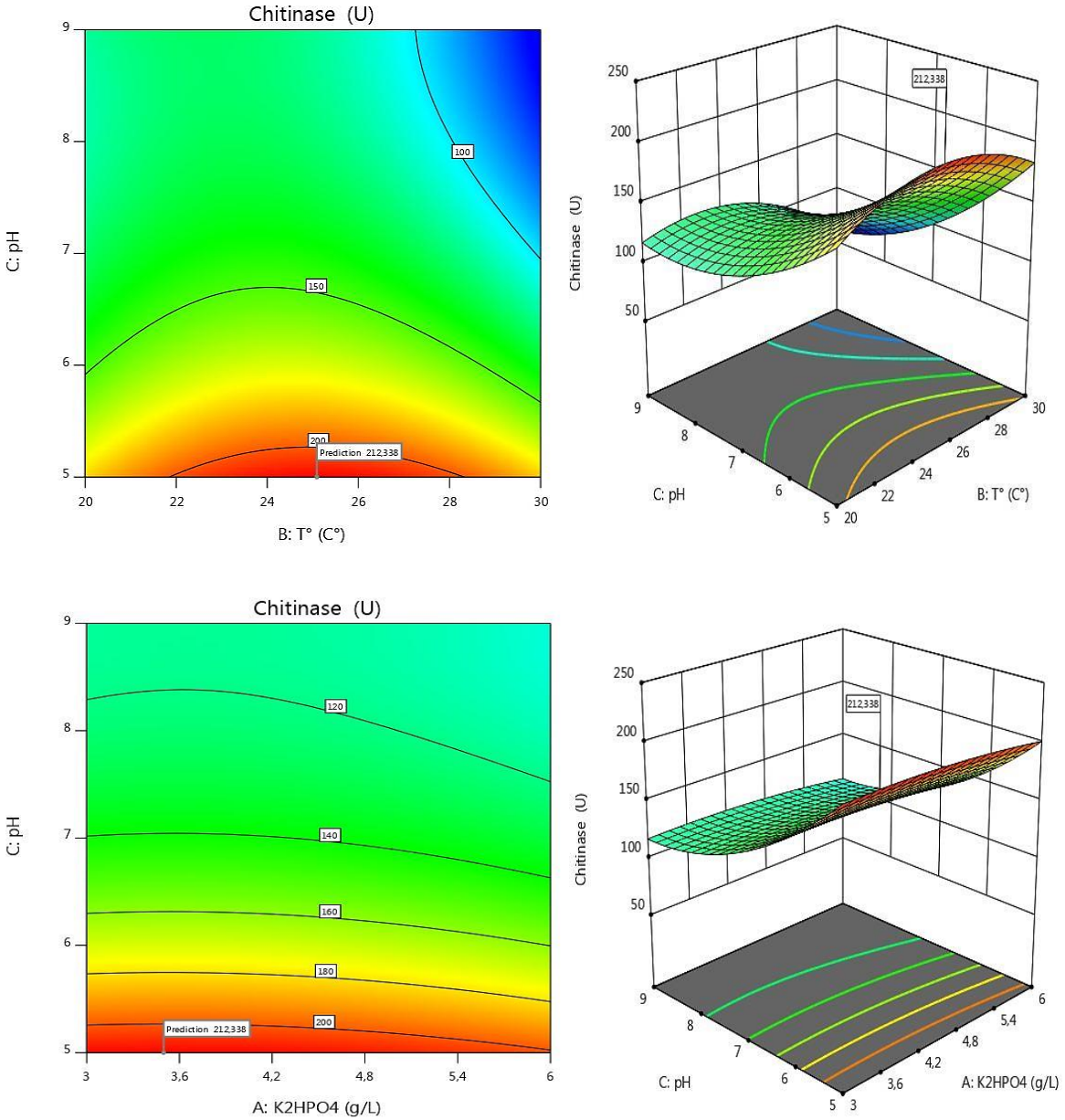


Figure 34 : Les tracés de contour et de surface montrant les interactions entre la température et le pH (BC), et entre le pH et K_2HPO_4(AC).

3.4.2.4. Modèle 4

Dans le modèle 4, $CaCl_2$, NaCl, $(NH_4)_2SO_4$ sont les facteurs optimisés par le plan statistique de Box-Behnken. Le schéma expérimental et les rendements obtenus dans les expériences sont donnés dans le tableau 20. L'analyse de la variance pour ce modèle quadratique est présentée dans le tableau 21, le modèle était hautement significatif avec des valeurs (F=121,75), (p=0,0001), (R^2 =0,9955), (CV=5,79%), les termes significatifs dans le modèle sont C, B^2, C^2. l'équation de régression donnée par le modèle est la suivante :

Activité (U) = 66.48 - 2.22 A - 3.52 B + 31.05 C + 0.0400 AB - 7.62 AC + 2.83 BC + 7.10 A^2 -29.12 B^2 + 21.72 C^2; Où A, B, C représentent respectivement $CaCl_2$, de NaCl, et de $(NH_4)_2SO_4$.

Tableau 20. Matrice du plan expérimental de Box-Behnken avec les valeurs expérimentales et prédites (Modèle 4).

Exp	A	B	C	R	R´
1	0.6	0.5	12	**236.08**	**233.57**
2	0.6	0	7	**77.58**	**80.09**
3	0.6	0.25	9.5	**173.77**	**168.58**
4	0.6	0.5	7	**69.18**	**59.50**
5	1	0.25	12	**315.34**	**311.92**
6	0.2	0.25	12	**330.25**	**326.50**
7	0.2	0.25	7	**129.24**	**132.67**
8	0.6	0	12	**258.98**	**268.66**
9	0.2	0	9.5	**126.03**	**120.10**
10	1	0.5	9.5	**84.26**	**90.19**
11	1	0	9.5	**118.1**	**111.85**
12	0.6	0.25	9.5	**163.3**	**168.58**
13	1	0.25	7	**139.36**	**143.11**
14	0.2	0.5	9.5	**79.83**	**86.08**
15	0.6	0.25	9.5	**168.68**	**168.58**

A, $CaCl_2$; *B*, NaCl; *C*, $(NH_4)_2SO_4$, R, activité; R´, activité prédite

Tableau 21. Analyse de variance pour la production de chitinase par *Bacillus sp.* SRIT8 (Modèle 4).

	Somme de carrés	Moyenne carrée	F	p
Model	99682.14	11075.79	121.75	**< 0.0001**
A-	8.59	8.59	0.0944	0.7710
B	1549.57	1549.57	17.03	**0.0091**
C	65755.70	65755.70	722.80	**< 0.0001**
AB	38.19	38.19	0.4198	0.5456
AC	156.63	156.63	1.72	0.2465
BC	52.56	52.56	0.5778	0.4815
A^2	2.26	2.26	0.0248	0.8810
B^2	16728.71	16728.71	183.88	**< 0.0001**
C^2	12932.38	12932.38	142.15	**< 0.0001**

La figure 45 montre que le $(NH_4)_2SO_4$ à sa plus forte concentration (12 g/L) exerce un effet significatif sur la production de chitinase. L'activité de la chitinase a diminué aux faibles (0 g/L) et fortes (0,5 g/L) concentrations de NaCl, tandis que l'activité enzymatique a été légèrement renforcée aux concentrations moyennes de $CaCl_2$ (0,5 g/L).

La composition de milieu de culture a une influence considérable sur la croissance cellulaire et la physiologie des micro-organismes, la production d'enzymes varie en fonction de la source d'azote, les micro-organismes peuvent extraire l'azote d'un large éventail de substrats organiques et inorganiques, les sources riches en azote sont plus rapidement assimilées que les sources pauvres en azote (Cardozo *et al.*, 2023). Le rendement en chitinase était plus élevé avec l'azote organique qu'avec l'azote inorganique, ce qui peut s'expliquer par la présence d'un plus grand nombre d'acides aminés et de facteurs de croissance pour la croissance bactérienne, qui peuvent être métabolisés directement par les cellules (Kim *et al.*, 2017). Le sulfate d'ammonium en tant que source d'azote inorganique peut être utilisé pour la production de chitinase à grande échelle comme alternative à la peptone (Bhattacharya *et al.*, 2016). Les sources d'azote inorganiques ont été facilement utilisées dans les phases initiales des processus de fermentation bactérienne, puis les sources d'azote organiques ont été utilisées pour la synthèse des enzymes métaboliques, par conséquent, il est préférable d'inclure à la fois une source d'azote organique et une source d'azote inorganique dans les milieux de culture (Wang *et al.*, 2014). Selon Gohel *et al.*, (2006), le $CaCl_2$ a eu un effet significatif sur la production de chitinase par *Pantoea dispersa*, à une concentration de 0,15 g/L. De même, le sulfate d'ammonium a été identifié comme la meilleure source d'azote pour la production de chitinase par *Paenibacillus sp.* (Meena *et al.*, 2014). Le NaCl a été identifié comme un facteur nutritionnel important (0,1%) pour la production de chitinase par *Serratia marcescens* B4A (Zarei *et al.*, 2011). Le rendement d'exochitinase produit par *Trichoderma asperellum* UTP-16 a été fortement affecté par la concentration de NaCl, et une amélioration significative a été observée avec une supplémentation en NaCl jusqu'à 3% (Kumar *et al.*, 2012).

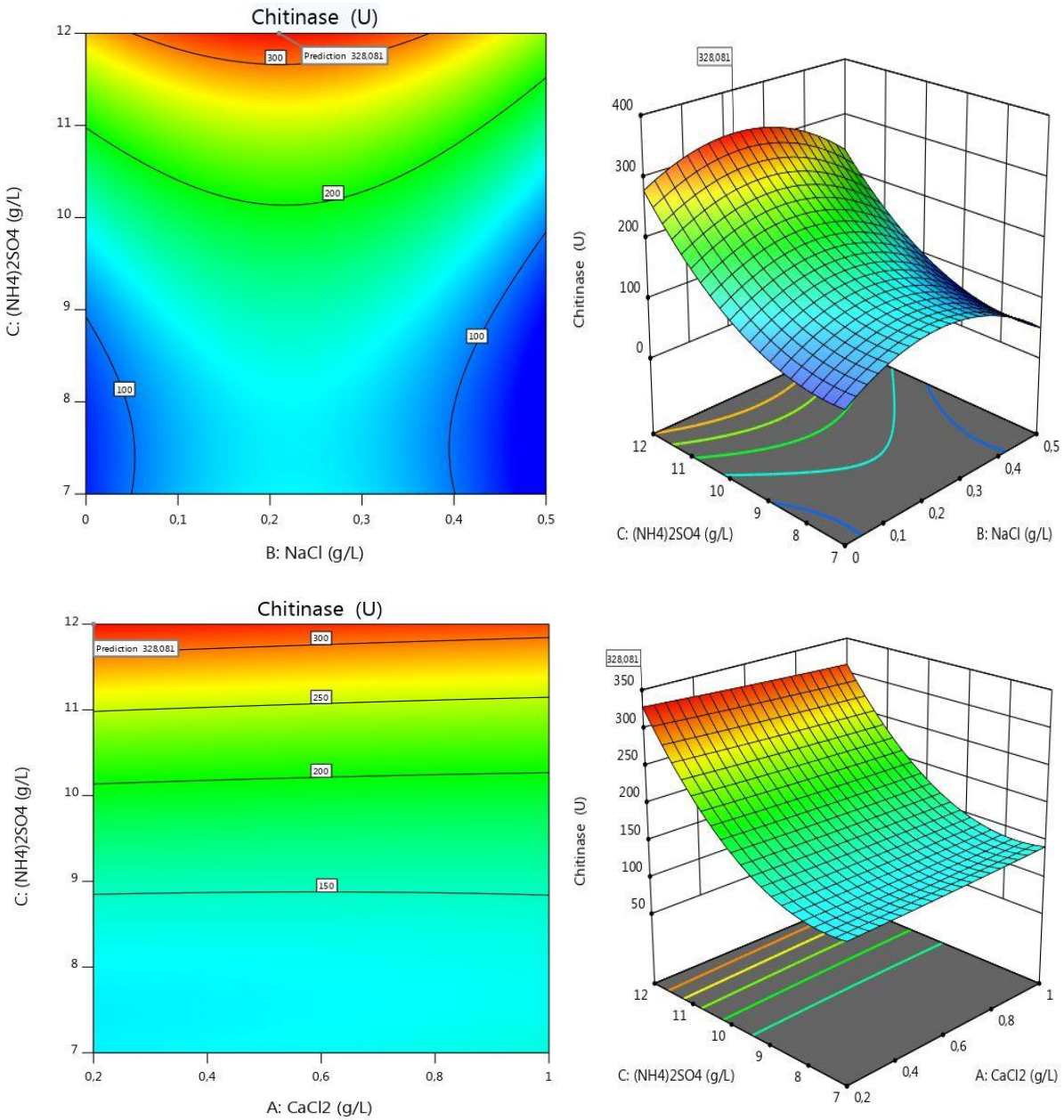


Figure 35 : Les tracés de contour et de surface montrant les interactions entre $(NH_4)_2SO_4$ et NaCl (BC), et entre le $(NH_4)_2SO_4$ et $CaCl_2$(AC).

Les valeurs optimales de $(NH_4)_2SO_4$, NaCl, et CaCl définies par l'équation du modèle étaient de 12, 0,21 et 0,2 g/L, respectivement. Un test de validation a été réalisé, l'optimisation a entraîné une légère augmentation de la production de chitinase (333,32 U) par rapport à la valeur prédite (328,08 U). Sur la base de ces quatre modèles d'optimisation, on peut conclure que les conditions de fermentation optimisées ont amélioré le processus de production de chitinase, avec une activité chitinase 148 fois plus élevée que dans la culture initiale.

L'évolution de l'activité de la chitinase au cours des processus d'optimisation est présentée dans le tableau 22.

Tableau 22 : L'activité chitinase récupérée après les différents niveaux d'optimisation statistique.

Etapes	Activité chitinase (U)
Milieu non optimisé	**2.37**
Plackett-Burman	**13.54**
Box-Behnken 1	**52**
Box-Behnken 2	**112**
Box-Behnken 3	**220.35**
Box-Behnken 4	**333.32**

3.5. Etude de la cinétique de croissance et de production de chitinase par la souche SRIT8 en milieu optimisé

Afin de déterminer le temps nécessaire pour obtenir le rendement enzymatique maximal, la progression de l'activité de la chitinase au cours de la fermentation a été suivie. La cinétique de croissance de *Bacillus sp.* SRTI8 dans le milieu optimisé est présentée dans la figure 36. La croissance est passée par quatre phases : une phase de latence, une phase exponentielle, une phase stationnaire, et une phase de déclin. La phase de latence commence immédiatement après l'inoculation de la souche SRTI8 et dure 4 h, pendant lesquelles les cellules bactériennes s'adaptent à leurs nouvelles conditions. La durée de la phase de latence peut varier considérablement en fonction de la taille et de l'âge de l'inoculum introduit dans le milieu de fermentation (El-Okki, 2017). Une fois que les cellules bactériennes se sont adaptées aux conditions d'incubation, elles commencent à croître rapidement, c'est la phase exponentielle, après les 6 premières heures d'incubation, la croissance de la culture a augmenté d'une façon exponentielle, elle atteint son maximum après 22 heures d'incubation où le nombre de cellules viables est passé de 0.57×10^{6} à 8.19×10^{7} UFC/mL. La croissance exponentielle ne peut durer lentement, car après un certain temps, les nutriments sont consommés dans ce milieu non renouvelé, aucune augmentation du nombre de cellules est observée après 22 h et jusqu'à 28 h d'incubation, tandis que le nombre de cellules viables ralentit de manière prévisible après 28 h. Les cultures en phase stationnaire se trouvent dans un environnement pauvre en nutriments, riche en déchets du métabolisme bactérien, les

conditions de culture se détériorent au point que les cellules sont irrémédiablement endommagées, ce qui conduit finalement à une phase de mort (Navarro Llorens *et al.*, 2010).

La production de chitinase extracellulaire par la souche SRIT8 a été étudiée à différents stades de croissance pendant 48 h (Figure 35). La souche est capable de sécréter la chitinase dans le milieu extérieur, l'activité enzymatique a été détectée dans le bouillon de fermentation après une période d'induction de 6 heures. L'activité chitinase augmente proportionnellement à la croissance cellulaire, l'activité la plus élevée a été atteinte après une culture de 20 heures correspondant à la fin de la phase logarithmique de croissance. Le rendement maximal en chitinase obtenu est de 333,32 U; il a diminué jusqu'à 30 h, et il est resté pratiquement inchangé jusqu'à 48 h. La diminution du rendement enzymatique après la période d'incubation optimale est probablement due à l'appauvrissement du milieu en nutriments, l'accumulations des produits de métabolisme, et à la présence d'enzymes protéolytiques (Gomaa, 2012 ; Gueye *et al.*, 2020).

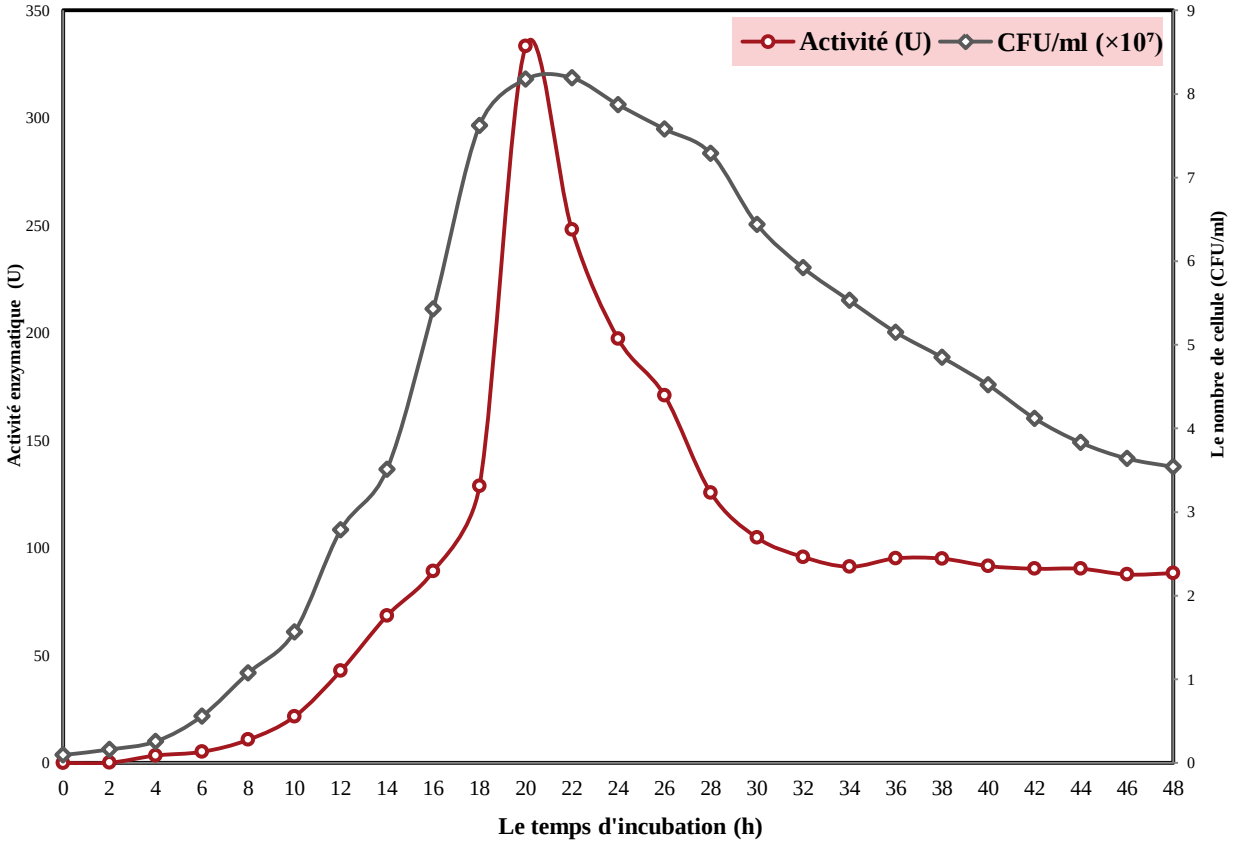


Figure 36. Cinétique de croissance et de production de chitinase par *Bacillus sp.* SRTI8.

La figure 36 permet de visualiser la libération de protéines tout au long du processus de fermentation, la teneur en protéines a augmenté et atteint son point le plus élevé (1.17 mg/mL) au début de la phase stationnaire après 22 h, la consommation des glucides commence dès la phase de latence et se poursuit tout au long de la période de croissance. Le pH du milieu est passé de 5 à 6,37, cette augmentation peut être due à l'augmentation du taux des protéines dans le milieu de fermentation (Ait Kaki, 2017).

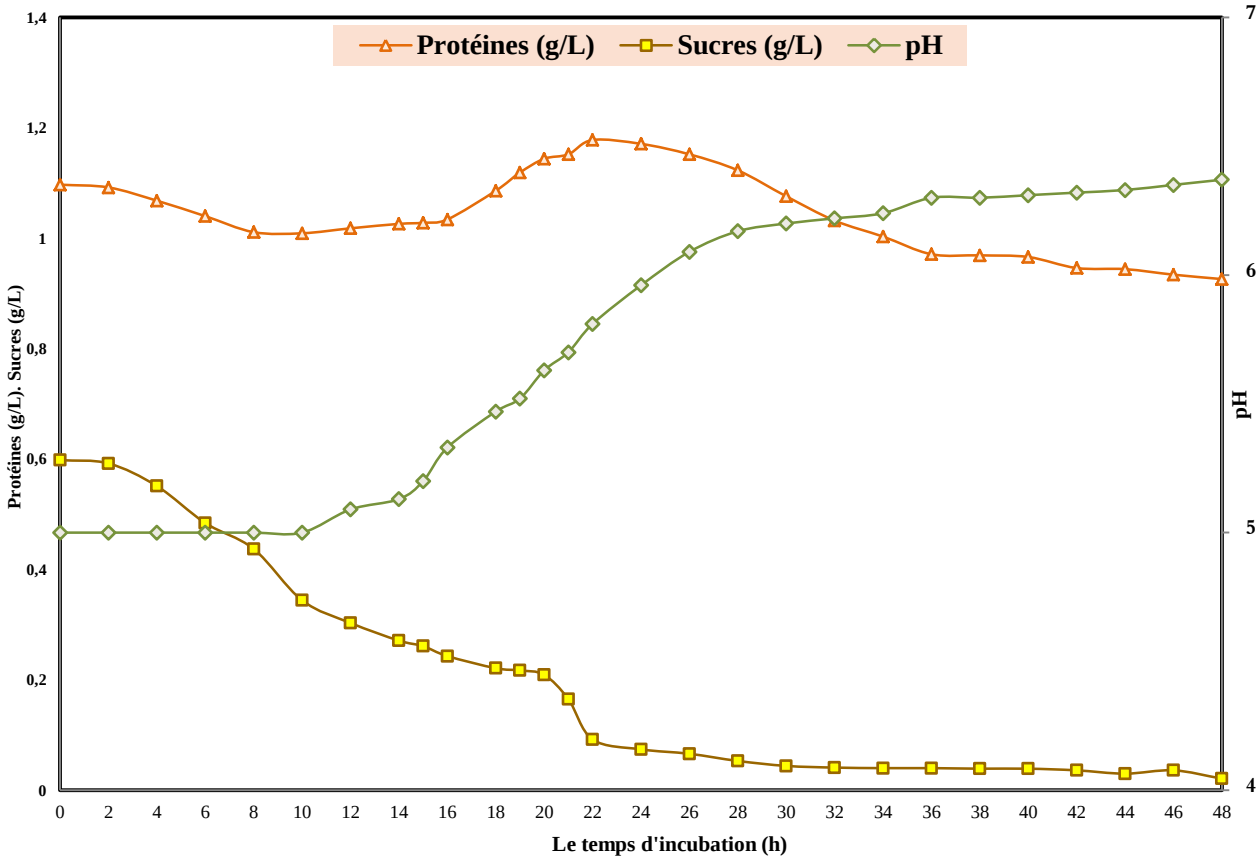


Figure 37. Cinétique des protéines, des glucides et de pH pendant la production de chitinase.

La période pendant laquelle une enzyme est obtenue est un facteur important dans la production d'enzymes, la formation de l'exoenzyme commence dans la phase exponentielle de la croissance par un excès de sources C et N, la sécrétion d'enzymes est maximale à la fin de la croissance exponentielle et dans la phase stationnaire grâce à la limitation des nutriments (Liebs *et al.*, 1988). L'activité maximale de la chitinase produite par *Bacillus amyloliquefaciens* V656 a été obtenu pendant la phase exponentielle de la croissance de la souche (Wang *et al.*, 2002). Les bactéries chitinolytiques *Bacillus amyloliquefaciens* SAHA 12.07 et *Serratia marcescens* KAHN 15.12 ont sécrété des chitinases extracellulaires pendant

leur phase de croissance stationnaire, avec une activité optimale après 48 et 56 h d'incubation, respectivement (Azizah *et al.*, 2015). L'activité des chitinases de *Bacillus sp.* SCH-1 et de *Paenibacillus sp.* SCH2 progresse avec la croissance cellulaire, atteignant un maximum pendant les phases de croissance stationnaire et déclin, respectivement (Han *et al.*, 2014). L'activité de la chitinase produite par *Bacillus thuringiensis sp.* kurstaki a augmenté au cours de la croissance exponentielle, atteignant des niveaux maximums après 48 h d'incubation (Wiwat *et al.*, 2000).

3.6. Purification enzymatique

3.4.1. Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium et l'acétone

La précipitation des protéines avec le sulfate d'ammonium est l'une des procédures de purification les plus utilisées. Dans un milieu aqueux, les protéines forment des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eaux, les ions de sulfate d'ammonium lorsqu'ils sont ajoutés entrent en compétition avec les protéines pour se lier aux molécules d'eau ce qui réduit la solubilité protéines et conduit à leur précipitation, d'autres solvants miscibles à l'eau tels que l'acétone peuvent également être utilisés pour précipiter les protéines (Grodzki et Berenstein, 2010).

La production de chitinase par *Bacillus sp.* SRTI8 a été suivie d'une étape de purification par précipitation des protéines avec le sulfate d'ammonium et l'acétone, les résultats sont présentés dans la figure 38. Les meilleurs résultats ont été obtenus lorsque le sulfate d'ammonium était utilisé, parmi toutes les fractions, la fraction précipitée avec 80 % de sulfate d'ammonium a offert le rendement enzymatique le plus important. Lors de la précipitation à l'acétone, un volume d'extrait brut avec deux volumes d'acétone ont fourni une activité maximale. Des résultats similaires ont été obtenue par Aida *et al.*, (2014) et Zhang *et al.*, (2010) dont la précipitation la plus efficace a été obtenus avec le sulfate d'ammonium. Dans la précipitation à l'acétone, les traces d'acétone non évaporées peuvent rester sur la protéine précipitée, ce qui entraîne des changements sélectifs dans la composition des peptides (Simpson et Beynon, 2010), et conduit à une perte considérable de protéines (Crowell *et al.*, 2013). D'autre part, nos résultats contredisent des rapports précédents où l'utilisation de l'acétone offre une meilleure précipitation des protéines que celle du sulfate d'ammonium, tels que la précipitation de la cellulase, la pectinase, et la xylanase de *Penicillium chrysogenum* (Ramalingam *et al.*, 2013), la polygalacturonase de *Aureobasidium pullulans* (Bennamoun *et al.*, 2016), la xylanase de *Paenibacillus sp*. XJ18 (Kurrataa'yun *et*

al., 2015), et la pyruvate Decarboxylase de *Candida tropicalis* TISTR 5350 (Tangtua *et al.*, 2017).

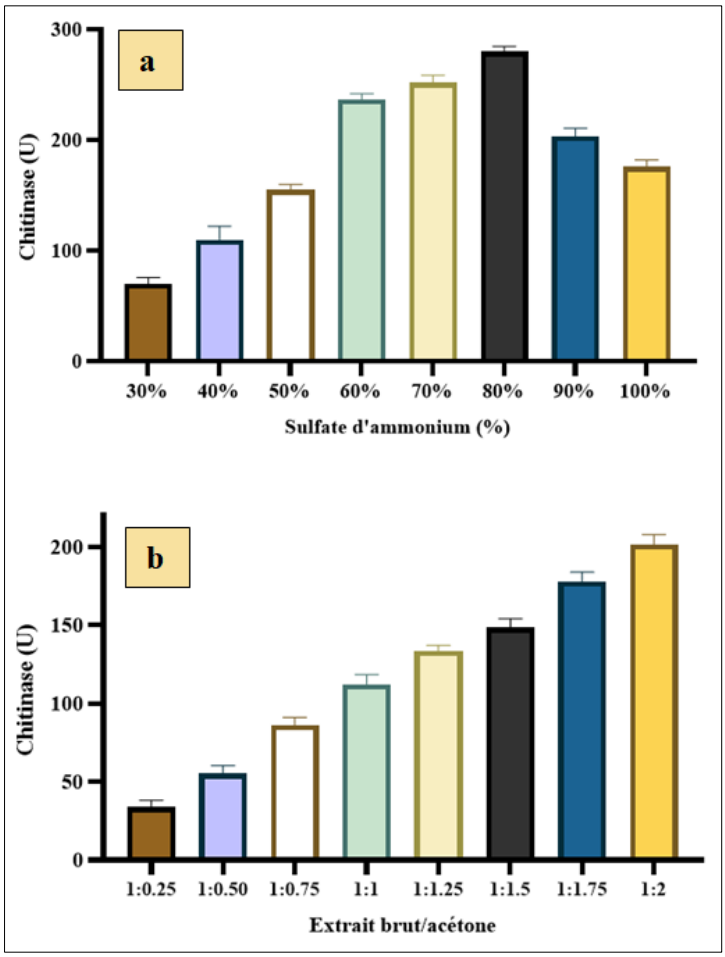


Figure 38. Précipitation de la chitinase par le sulfate d'ammonium (a) et l'acétone (b).

3.6.2. Purification par chromatographie d'exclusion moléculaire

La chromatographie par filtration sur gel consiste à utiliser des billes poreuses dont la taille des pores est bien définie, les petites molécules peuvent pénétrer dans les pores et sont donc éluées en dernier, tandis que les grosses molécules sont exclues de tous les pores et sont éluées en premier (Freitag, 2005; Ó'Fágáin *et al.*, 2017). Dans notre étude, le précipité au sulfate d'ammonium (80%) est redissous dans un tampon tris-HCl (50 mM, pH 7), puis dialysé contre le même tampon pendant une nuit. La protéine dialysée a ensuite été chargée sur une colonne de filtration sur gel Sephadex G-50. Le profil chromatographique de l'élution des protéines et le profil de l'activité de la chitinase sont présentés à la figure 39. Trois pics ont été obtenus, un majeur et deux mineurs, l'activité chitinase a été trouvée dans le pic

majeur. Les étapes de la purification de chitinase sont présentées dans le tableau 23. La chitinase a été purifiée 3,70 fois, avec une activité spécifique et un rendement de 1238,22 U/mg et 59%, respectivement.

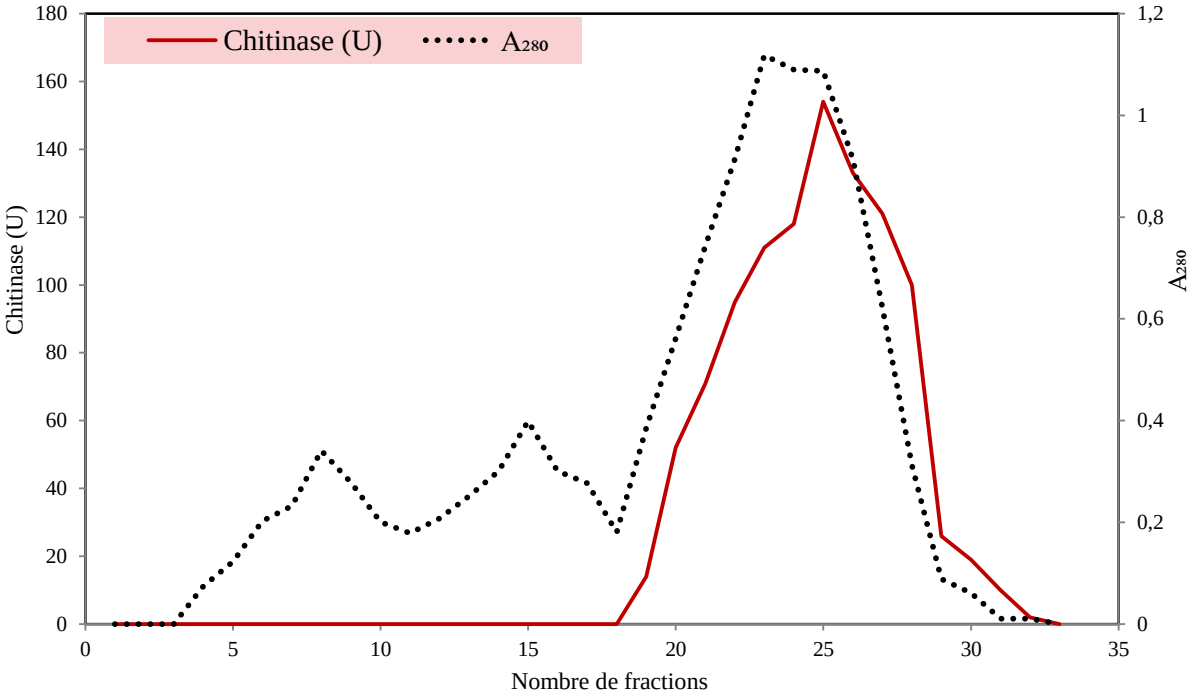


Figure 39 : Purification de l'enzyme chitinase par chromatographie d'exclusions moléculaire.

3.6.3. Purification par chromatographie échangeuse d'anions

Les protéines sont liées aux matrices d'échange d'ions en fonction des interactions ioniques, dans la chromatographie d'échange d'anions, une protéine chargée négativement est liée à une colonne chargée positivement (Bauer et Schnapp, 2007). Dans cette étape, les fractions positives, correspondant aux pic 3, issues de la chromatographie de filtration sur gel ont été regroupées, concentrées par ultrafiltration avec une membrane Amicon, puis chargées sur la colonne d'échange d'anions DEAE-sepharose. La figure 40 montre le profil d'élution des protéines et l'activité chitinase correspondante. Les protéines ont été éluées en appliquant un gradient croissant en NaCl de 0 à 0,5 M, un pic protéique majeur a été élué avec une concentration en NaCl de 0,1 M et a présenté une activité chitinase, le rendement en chitinase était de 22,44% avec un facteur de purification de 16,27 et une activité spécifique de 5437,14 U/mg.

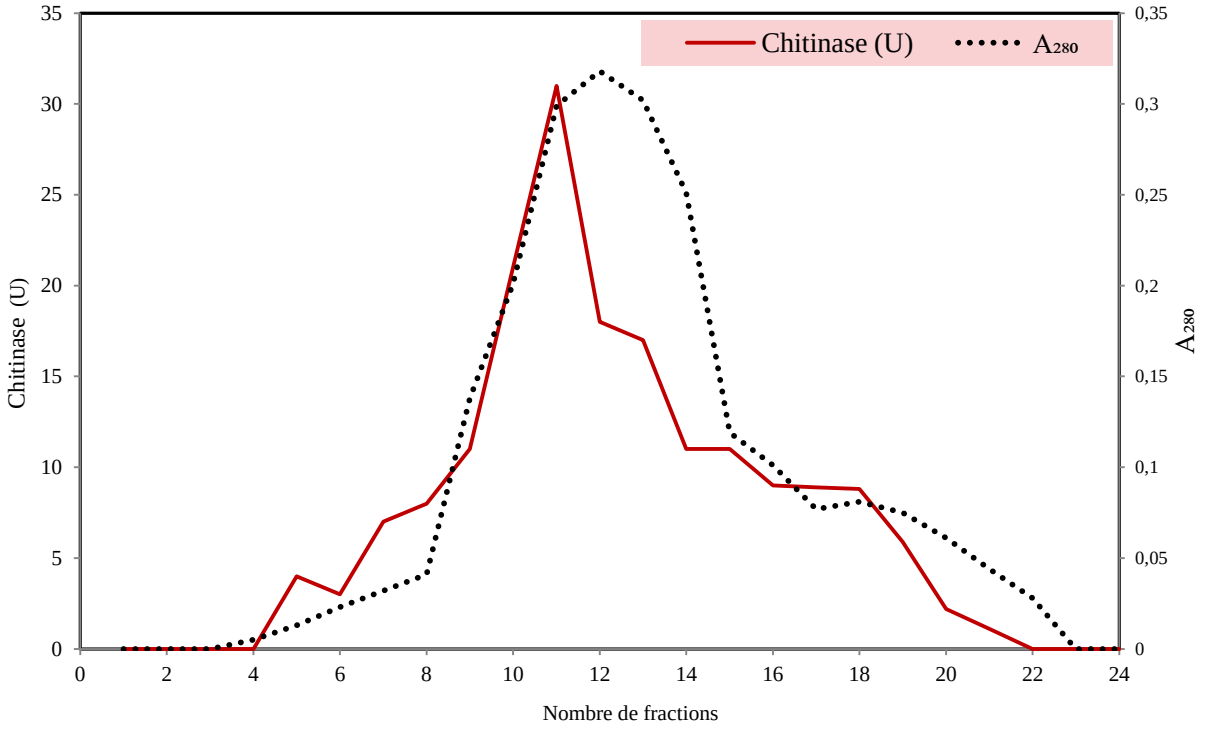


Figure 40 : Purification de l'enzyme chitinase par chromatographie échangeuse d'anions.

La purification chromatographique, qui comprend la chromatographie d'exclusion moléculaire et la chromatographie d'échange d'anions, a été utilisée pour purifier de nombreuses chitinases à partir de différentes souches bactériennes, tels que la chitinase de *Enterobacter sp.* G-l (Park *et al.*, 1997), *Enterobacter sp.* NRG4 (Dahiya *et al.*, 2005), *Streptomyces sp. M-20* (Kim *et al.*, 2017), *Bacillus licheniformis* BS-3 (Cui *et al.*, 2012), *Bacillus thuringiensis* R 176 (Chaiharn *et al.*, 2019), *Bacillus thuringiensis* HD-1 (Arora *et al.*, 2003), *Bacillus licheniformis* LHH100 (Laribi-Habchi *et al.*, 2015). Bien que des rapports antérieurs ont montré la purification de chitinases bactériennes par une seule étape de chromatographie par filtration sur gel, tels que la chitinase de *Serratia marcescens* NK1 (Nawani et Kapadnis, 2001), *de Microbispora sp.* V2 (Nawani *et al.*, 2002), et de *Stenotrophomonas maltophilia* (Shaikh *et al.*, 2018). Wiwat *et al.*, (1999), ont purifié une chitinase de *Bacillus circulans* No.4.1, avec un rendement de purification de 0.43%. Un facteur de purification de 15,33 et un rendement de 3,56% ont été obtenus après purification de la chitinase sécrétée par *Bacillus licheniformis* Mb-2 (Toharisman *et al.*, 2005). Les chitinases extracellulaires sécrétées par *Bacillus sp.* Hu1, et *Bacillus pumilus* MCB-7 ont été purifiés avec des rendement de 15%, et 26%, et un facteur de purification de 5.6, et 10.09, respectivement (Dai *et al.*, 2011; Rishad *et al.*, 2017). Deux chitinases de *Bacillus*

amyloliquefaciens V656 ont été purifiées avec des rendements de 13% et 25% (Wang *et al.*, 2002).

3.6.4. Rendement de purification

Les résultats obtenus lors des étapes de purification sont résumés dans le tableau 23, ce tableau sert à montrer l'efficacité de chaque étape du processus de purification. Le facteur de purification est le nombre de fois qu'on a pu concentrer l'activité spécifique (par rapport à la première étape), le rendement de purification est la proportion, en %, de la quantité de protéine purifiée restante par rapport à la quantité initiale. Le rendement diminue avec chaque étape, cela est dû aux pertes d'activité enzymatique. Dans le cas présent, la chitinase est purifiée 16.27 fois par rapport à l'extrait initial, avec un rendement de 22.44%.

Tableau 23. Rendement de purification de la chitinase de *Bacillus sp.* SRTI8.

Étapes	Activité (U)	Protéines (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Purification (facteur)	Rendement (%)
Extrait brut	339.13	1.015	334.11	1	100
$(NH_4)_2SO_4$	287	0.401	715.71	2.14	84
Sephadex-G50	201.83	0.163	1238.22	3.70	59
DEAE-sepharose	76.12	0.014	5437.14	16.27	22.44

3.6.5. Contrôle de la pureté de l'enzyme purifiée par SDS-PAGE

L'électrophorèse en conditions dénaturantes effectuée avec les différents échantillons obtenus au cours de la purification permet de vérifier la pureté des sous-unités à chaque étape et de calculer leur masse moléculaire. Comme le montre la figure 41, une seule bande est apparue sur le gel, au niveau de la sous unité purifiée par chromatographie d'échange d'anions, témoignant sa pureté, dont la masse moléculaire a été estimée de 31 kDa (Annexe 4a). Cette masse moléculaire est comparable à celles trouvées dans d'autres études, à savoir la chitinase de *Bacillus subtilis* NPU 001 (Chang *et al.*, 2010), *Bacillus sp.* NCTU2 (Wen *et al.*, 2002), *Alcaligenes faecalis* AU02 (Annamalai *et al.*, 2011). Narayana et Vijayalakshmi, (2009), ont rapporté que la plupart des chitinases bactériennes ont des masses moléculaires comprises entre 20 et 60 kDa.

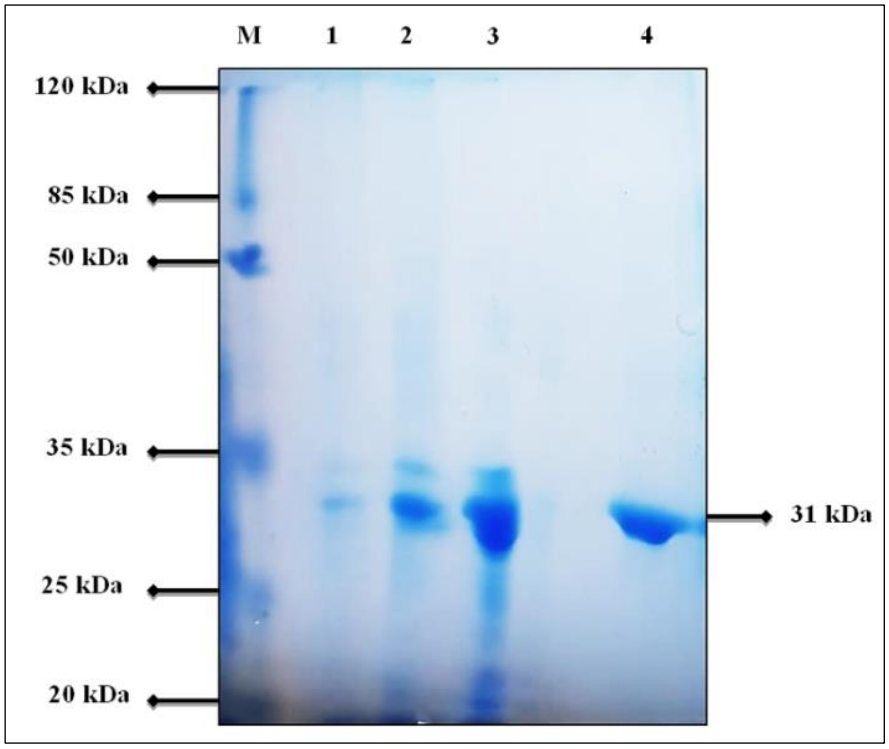


Figure 41. Analyse SDS-PAGE de la chitinase purifiée à partir de *Bacillus sp* SRTI8. M, marqueurs de poids moléculaire ; Ligne 1, protéines purifiés par Sephadex G-50 ; Ligne 2, protéines précipitées au sulfate d'ammonium; Ligne 3 : protéines de l'extrait brut ; Ligne 4, protéines purifiées par échange d'anions.

3.7. Caractérisation biochimique de la chitinase purifiée

3.4.1. Influence du pH sur l'activité et la stabilité de la chitinase

L'activité de la chitinase purifiée est testée sur un intervalle de pH de 3 à 9. Le test d'ANOVA révèle l'effet significatif du pH sur l'activité de la chitinase (F= 113,6, p<0,0001) (Tableau 1 en annexe 5). La figure 42 montre que l'activité de la chitinase est influencée par les variations du pH. L'activité chitinase la plus élevée a été observée dans les pH acides (4, 5 et 6), avec une activité optimale à pH 5, une augmentation supplémentaire du pH au-delà de 6 a entraîné une diminution progressive de l'activité. On peut donc conclure que la chitinase produite par la souche SRIT8 est de nature acide et qu'elle peut être utilisée dans les procédés qui nécessitent des conditions acides, tels que le contrôle des champignons phytopathogènes, car le pH optimal pour la croissance fongique est également acide. La même valeur optimale de pH a été rapportée pour les chitinases de *Brevibacillus formosus* BISR-1 (Meena *et al.*, 2014), *Aeromonas veronii* B565 (Zhang *et al.*, 2013), *Serratia marcescens* B4A (Zarei *et al.*, 2011), *Paenibacillus illinoisensis* KJK-424 (Yu *et al.*, 2019). Les chitinases fonctionnent

mieux à un pH acide ou presque neutre (Pandya et Saraf, 2015). Le pH élevé peut modifier la forme du site actif d'une enzyme, ce qui affecte la capacité de l'enzyme à se lier au substrat et empêche sa fonction (Espinoza-vergara *et al.*, 2021).

La stabilité de l'enzyme vis-à-vis des pH acides (3-6) a été testé (Figure 42). L'enzyme purifiée a conservé plus de 20% de son activité initiale après 24 h d'incubation à pH 5, 6, et 7, alors qu'elle a complètement perdu son activité à pH 3 et 9. En fonction des études de stabilité, la chitinase de *Bacillus thuringiensis* subsp. aizawai a conservé 100% de son activité initiale à un pH 6 après 24 h d'incubation (de la Vega *et al.*, 2006). La chitinase de *Paenibacillus xylanexedens* Z2-4 a conservé plus de 90% d'activité après 12 h d'incubation à pH 5 et 6 (Zhang *et al.*, 2021). Plus de 50% de l'activité initiale de la chitinase purifiée de *Bacillus altitudinis* KA15 a été retenue après 12 h d'incubation à pH 5 (Asmani *et al.*, 2020). La chitinase de *Fusarium chlamydosporum* est restée stable à des pH entre 4 et 6, son activité résiduelle était supérieure à 80% après 24 h (Mathivanan *et al.*, 1998). la chitinase de *Bacillus licheniformis* LHH100 est très stable dans une large gamme de pH, conservant 100% de son activité initiale à des pH compris entre 4 et 8 après 72 h d'incubation à 70°C (Laribi-Habchi *et al.*, 2015). Après 96 h d'incubation, 71% à 78% de l'activité chitinase initiale de *Bacillus cereus* SV1 a été conservée à des pH allant de 4 à 8 (Ghorbel-Bellaaj *et al.*, 2012).

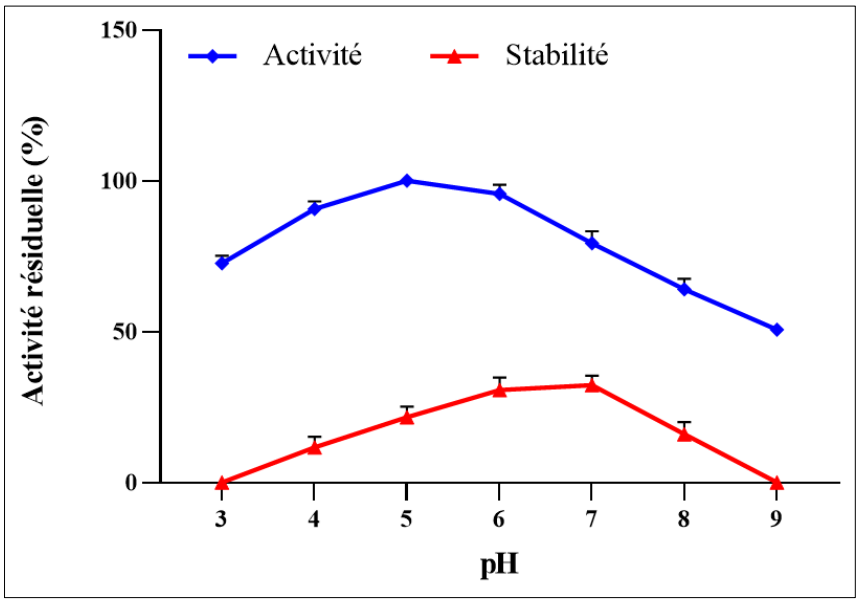


Figure 42. Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la chitinase purifiée de la souche SRTI8.

3.7.2. Effets de la température sur l'activité et la stabilité de la chitinase

La température a été identifiée comme un facteur important dans la réaction enzyme-substrat, chaque enzyme a une température optimale pour fonctionner correctement, les températures élevées entraînent l'inactivation de l'enzyme, principalement par dénaturation thermique (perte de la structure tertiaire, changements dans la composition des acides aminés du site actif), et par dégradation (perte de la structure primaire) (Rachmawaty et Saleh, 2016; Zeng *et al.*, 2014).

La réaction enzymatique a été réalisée à différentes températures (20-70°C) afin de déterminer la température optimale pour l'enzyme chitinase. L'étude statistique par analyse de la variance (ANOVA) des résultats, montre que la température exerce un effet significatif sur la chitinase (Tableau 2 en annexe 5). L'activité enzymatique était approximativement constante de 20 à 60°C, mais elle augmentait légèrement à 40°C (Figure 43). La température optimale était similaire à celle des autres chitinases de *Bacillus pumilus* MCB-7 (Rishad *et al.*, 2017), *Bacillus circulans* No.4.1 (Wiwat *et al.*, 1999), *Lecanicillium lecanii* (Nguyen *et al.*, 2015), *Alcaligenes faecalis* (Annamalai *et al.*, 2011).

La thermostabilité de l'enzyme purifiée a également été déterminée en l'incubant à différentes températures pendant 24 h (Figure 43). A des températures de 20°C, 30°C et 40°C, l'enzyme est éventuellement active, mais perd plus de 70% de son activité initiale. À 50, 60 et 70°C, l'enzyme est complètement inactivé. Certaines chitinases présentent une bonne stabilité thermique, y compris la chitinase de *Bacillus altitudinis*, qui a conservé plus de 70% de son activité initiale après 24 h d'incubation à 70°C (Asmani *et al.*, 2020). L'endochitinase de *Melghiribacillus thermohalophilus* est restée active à 70°C après 20 h d'incubation, en concervant environ 20% de l'activité initiale de l'enzyme (Mohamed *et al.*, 2019). La chitinase produite par *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* se révèle stable à 30-120°C après 3 heures d'incubation (Kuzu *et al.*, 2012). Aucune perte significative de l'activité de la chitinase de *Bacillus licheniformis* Mb-2 a été observée dans les 120 min (Toharisman *et al.*, 2005). Après incubation de la chitinase de *Bacillus sp.* K29-14 à 70°C, 80% de l'activité persiste après 5 heures (Rahayu *et al.*, 2004).

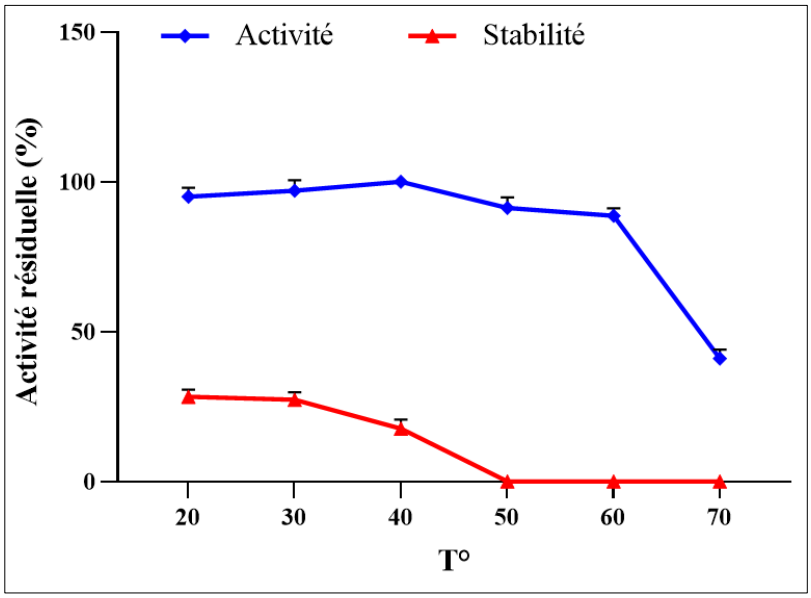


Figure 43. Effet de la variation de température sur l'activité et la stabilité de la chitinase purifiée.

3.7.3. Effets des ions métalliques sur l'activité de la chitinase

De nombreuses enzymes nécessitent certains ions métalliques pour leur activité catalytique, en tant que composant du site actif de l'enzyme pour maintenir sa stabilité (Lestari *et al.*, 2017). Les ions peuvent stimuler la réaction enzymatique jusqu'à certaines concentrations, des doses supplémentaires peuvent entrainer une compétition entre les ions libres et le complexe ions-substrat pour l'enzyme, ce qui provoque une inhibition de l'enzyme (Natsir *et al.*, 2010). Les substances qui réduisent l'activité catalytique sont appelées inhibiteurs et agissent sur les propriétés catalytiques du site actif, directement ou indirectement (Robinson, 2015). L'effet de divers ions métalliques sur l'activité de la chitinase est illustré dans la figure 43. La présence des ions Ca^{+2} et Mn^{+2} ont entraîné une augmentation de l'activité enzymatique, tandis que les ions Zn^{+2}, Mg^{+2}, Fe^{+2}, k^{+}, Na^{+} ont provoqué un léger ralentissement de l'activité, bien que l'activité soit fortement réduite avec l'ajout de Cu^{+2}, Co^{+2}. Les ions Hg^{+2} ont complètement inactivé l'enzyme. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés pour d'autres chitinases purifiées, pour le Hg^{+2} (Kim *et al.*, 2003), Ca^{+2}, k^{+}, Mn^{+2} (Dahiya *et al.*, 2005 ; Laribi-Habchi *et al.*, 2015), Mg^{+2}, Fe^{+2} (Liang *et al.*, 2014; Gangwar *et al.*, 2016), Cu^{+2}, Co^{+2} (Meena *et al.*, 2014), Zn^{+2} (Bansode et Bajekal, 2006). Les résultats obtenus par (Jahangiri *et al.*, 2019), ont montré l'efficacité de Cu^{+2}, Co^{+2} dans la stimulation de l'activité de la chitinase d'*Aeromonas sp.* PTCC 1691, et de Ca^{+2}, k^{+}, Na^{+}, Mn^{+2} dans son inhibition. L'augmentation de l'activité en présence de Ca^{+2} implique que ce cation joue un

rôle important dans la régulation de la conformation de l'enzyme. L'inhibition de l'enzyme par les ions Hg^{+2} peut être due à son interaction avec les groupes sulphydryles, ce qui suggère la présence d'un résidu cystéine important dans le site actif de l'enzyme ou à proximité (Yahiaoui *et al.*, 2019; Dahiya *et al.*, 2005).

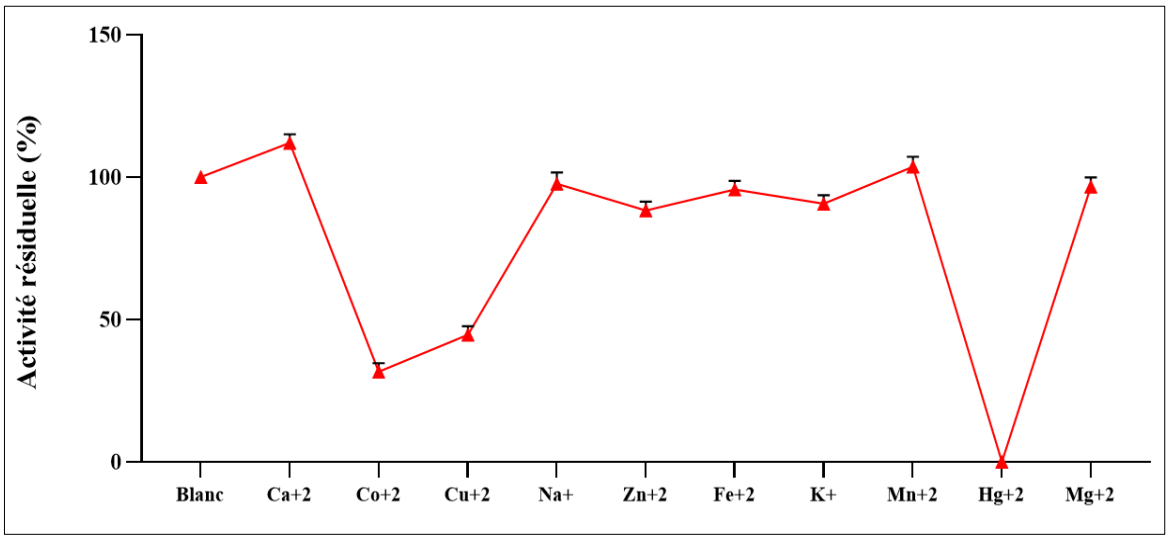


Figure 44: Effet des ions métalliques sur l'activité de la chitinase purifiée.

3.7.4. Effets de solvants organiques et de détergents sur l'activité de la chitinase

Dans les réactions enzymatiques, l'ajout de solvants organiques dans le milieu réactionnel rend les substrats hydrophobes plus solubles, ce qui facilite la formation de complexe substrat-enzyme (Liang *et al.*, 2014). L'influence de divers détergents non ioniques (Tween 20, Tween 80, Triton X-100) et de solvants organiques est présentée à la figure 45. L'ajout de Tween 20, Tw 80, et Triton X-100 a entraîné une légère augmentation de l'activité enzymatique. Ces résultats sont peut-être basés sur le fait que les réactifs tensioactifs peuvent augmenter la fréquence de contact entre le site actif de l'enzyme et le substrat, ce qui est réalisé en abaissant la tension superficielle du milieu aqueux (Zarei *et al.*, 2011). Ce résultat est similaire à celui obtenu avec la chitinase de *Lecanicillium lecanii* (Nguyen *et al.*, 2015), *Paenibacillus chitinolyticus* UMBR 0002 (Liu *et al.*, 2020), *Bacillus cereus* TKU027 (Wang *et al.*, 2012), et *Cohnella sp*. A01 (Aliabadi *et al.*, 2016).

Le méthanol à une concentration de 10% a entraîné une réduction de 50% de l'activité initiale de la chitinase, et cette activité a été fortement réduite en présence de butanol. De nombreux rapports mentionnent que le méthanol et le butanol réduisent significativement l'activité de la chitinase de diverses souches bactériennes (Toharisman *et al.*, 2005; Farag *et*

al., 2016; Cheba *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2018). Ces résultats suggèrent que les interactions hydrophobes dues aux solvants organiques peuvent réduire les interactions enzyme-substrat (Tayyaba *et al.*, 2019).

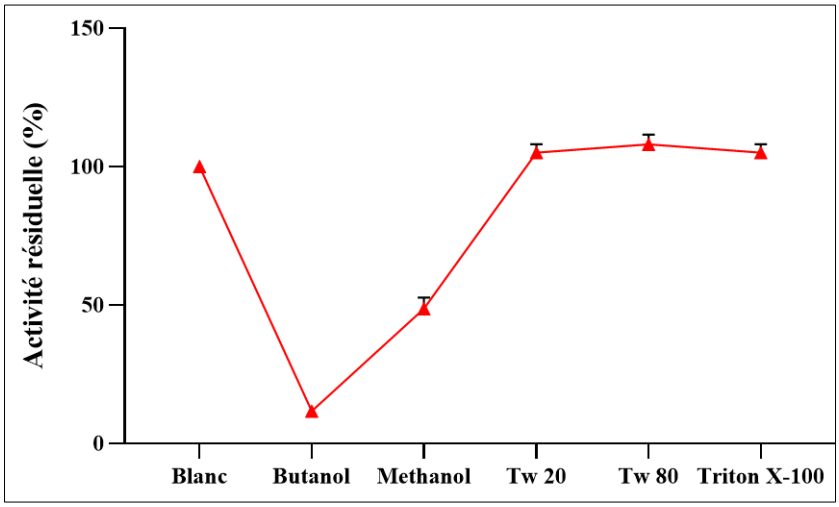


Figure 45. Effet de solvants organiques et de détergents sur l'activité de la chitinase purifiée.

3.8. La spécifité du substrats

Les activités spécifiques de la chitinase purifié vis-à-vis de différents substrats (40 mg/mL) sont indiquées dans le tableau 24. Parmi tous les polysaccharides testés, l'activité de la chitinase la plus élevée a été enregistré avec la chitine en poudre, suivie de la chitine colloïdale. Le même résultat a été obtenu pour la chitinase de *Paenibacillus elgii* HOA73, qui préfère la chitine en poudre à la chitine colloïdale (Kim *et al.*, 2017). La chitinase n'a montré aucune activité vis-à-vis de l'amidon et la pectine, et elle était faiblement active sur la CMC et le xylane, ce qui peut s'expliquer par la présence d'un mécanisme de reconnaissance du substrat dans l'enzyme (Cheba et Zaghloul, 2020). De nombreuses enzymes, telles que les cellulases, les xylanases et les chitinases, sont composées d'un domaine catalytique multiple lié à un ou plusieurs domaines de liaison au substrat (Tanaka *et al.*, 1999). Certaines chitinases contiennent un domaine catalytique qui présente une homologie avec les domaines de liaison à la cellulose des cellulases (Thompson *et al.*, 2001). Les chitinase de *Pseudomonas sp.* YHS-A2 (Lee *et al.*, 2000), de *Hydrogenophilus hirschii* KB-DZ44 (Bouacem *et al.*, 2018), et de *Paenibacillus timonensis* LK-DZ15 (Yahiaoui *et al.*, 2019) peuvent également dégrader les xylanes.

Tableau 24. Spécificité relative de la chitinase vis-à-vis de différents substrats.

Substrats	Activité résiduelle (%)
Chitine en poudre	100
Chitine colloïdale	81
Amidon	0
CMC	12
Pectine	0
Xylane	7

3.9. Potentiel de l'activité fongicide de *Bacillus sp.* SRIT8

L'activité antagoniste de la souche SRIT8 a été évaluée par son exposition directe aux champignons phytopathogènes, *A. alternata* et *F. graminearum*. Comme le montre la figure 46, les deux champignons testés ont été fortement inhibés par la souche SRIT8, avec des pourcentages d'inhibition atteignant 61,29% et 64,51% pour *A. alternata* et *F. graminearum*, respectivement.

Bacillus, un agent de biocontrôle largement utilisé en agriculture en raison de la diversité de son métabolisme secondaire et de sa capacité à produire une grande variété de substances antagonistes structurellement différentes, il peut produire de nombreuses substances antifongiques, des lipopeptides et des enzymes antifongiques, notamment la chitinase, la glucanase et la protéase qui jouent un rôle important dans la suppression de la croissance des champignons phytopathogènes (Fira *et al.*, 2018; Khan *et al.*, 2018 ; Kgosi *et al.*, 2022). Ces métabolites peuvent agir individuellement et/ou de manière interactive dans la lutte contre les phytopathogènes (Siahmoshteh *et al.*, 2018). Certaines espèces de *Bacillus*, en particulier *B. subtilis* et *B. amyloliquefaciens*, possèdent des composés antifongiques qui sont responsables de la suppression des agents pathogènes des plantes (Xu *et al.*, 2019). 8,5% du génome de *B. amyloliquefaciens* FZB42 ont été destinés à la production de métabolites secondaires, y compris des bactériocines, des peptides antimicrobiens et des lipopeptides (Chen *et al.*, 2009).

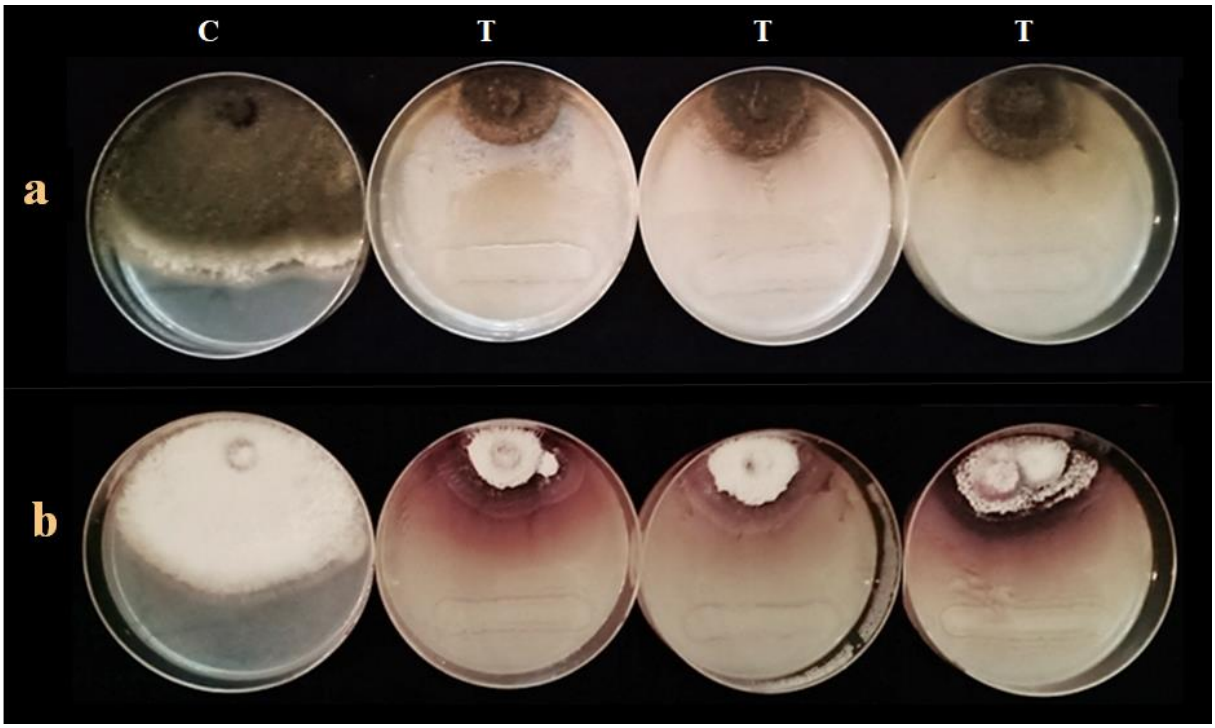


Figure 46. L'activité antifongique de la souche SRTI8 vis-à-vis (a) *A. alternata*, (b) *F. graminearum* ; C : contrôle, T : test

3.10. Effet du filtrat brut sur la croissance mycélienne en milieu liquide

Les métabolites bactériens extracellulaires présents dans l'extrait brut de *Bacillus sp.* SRTI8 ont été testés afin de déterminer leur capacité à inhiber la croissance d'*A. alternata* et de *F. graminearum* en culture liquide. Ce test a été réalisé dans un bouillon PDB contenant 10% de l'extrait brut (*v/v*), en comparant la biomasse sèche des souches fongiques avec des cultures de contrôle. Les résultats de l'inhibition de la croissance fongique sont présentés dans le tableau 25. Le poids sec de la biomasse fongique obtenue pendant les quatre jours d'incubation est inférieur au poids sec du témoin. Nous pouvons conclure que l'extrait brut de la souche SRTI8 renferme des métabolites à activité antifongique capables de ralentir la croissance des deux souches fongiques. Prapagdee *et al.*, (2008), ont décrit l'effet inhibiteur des filtrats de culture de *Streptomyces hygroscopicus* récupérés dans les phases de croissance exponentielle et stationnaire sur la croissance de *Colletotrichum gloeosporioides* et de *Sclerotium rolfsii*, en raison de la sécrétion de chitinase extracellulaire et de composés antifongiques au cours des deux phases de croissance, respectivement.

Tableau 25. Effet du filtrat brut de la souche de *Bacillus sp.* SRIT8 sur la croissance de *F. graminearum* et *A. alternata* en milieu liquide.

	48h		72h		96h	
Poids sec (g)	**T**	**C**	**T**	**C**	**T**	**C**
A. ***alternata***	0.03	0.075	0.109	0.184	0.187	0.263
F. graminearum	0.09	0.143	0.136	0.293	0.227	0.409

C : poids sec de la souche fongique témoin, T : poids sec de la souche fongique en culture avec le filtrat.

3.11. Activité antifongique de la chitinase purifiée sur *F. graminearum*

L'effet de la chitinase purifiée sur la croissance de *F. graminearum* a été étudié en utilisant la méthode de diffusion sur gélose (méthode de puits). Comme ils présentent les figures 47 et 48, une inhibition significative de la croissance mycélienne a été observée en présence de chitinase purifiée, le diamètre de la zone d'inhibition atteignant 21 mm. En revanche, le contrôle (enzyme bouillie) n'a montré aucune activité inhibitrice contre le même champignon.

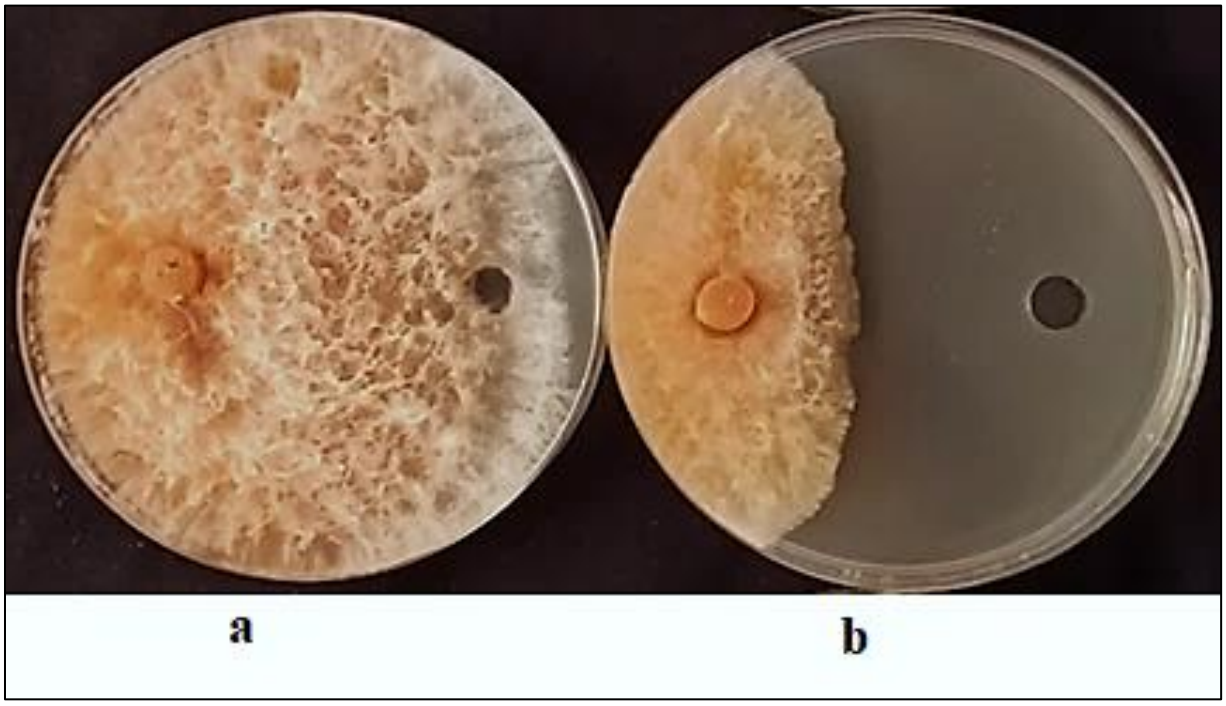


Figure 47. Effet inhibiteur de la chitinase purifiée de *Bacillus sp.* SRTI8 sur *F. graminearum* a. Contrôle (le puit contenant la chitinase bouillie à 100°C) , b. La chitinase purifiée

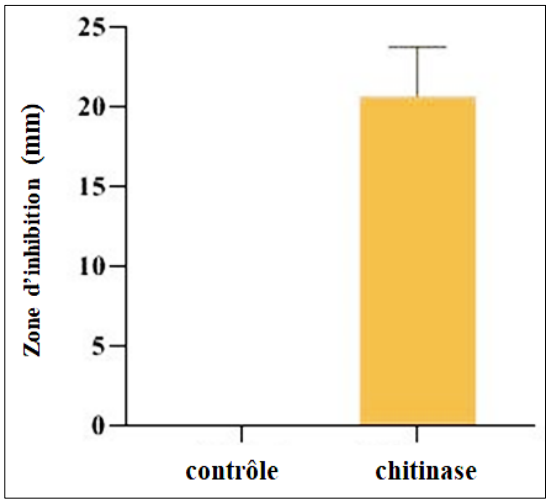


Figure 48. Diamètre d'inhibition de la croissance fongique par la chitinase purifiée sur milieu PDA

Les principaux polymères glucidiques de la paroi cellulaire de *Fusarium sp.* sont la chitine et le glucane, ces polymères contribuent efficacement à la rigidité de la paroi cellulaire grâce à un vaste réseau de liaisons glycosidiques, l'hydrolyse de ces liaisons peut endommager la paroi cellulaire des champignons phytopathogènes, entraînant la lyse et la mort des cellules (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018; Schoffelmeer *et al.*, 1999). Une fois que le champignon est exposé à la chitinase, il subit plusieurs modifications dans sa physiologie conduisent à l'inhibition, tels que le retard de germination et d'élongation des spores, la déformation des hyphes, et la fuite des constituants cytoplasmiques résultant de la digestion de la paroi cellulaire par l'enzyme (Mendrofa *et al.*, 2021; Zarei *et al.*, 2011). La chitinase de *Streptomyces tendae* TK-VL-333 présente une activité antifongique contre *F. oxysporum* dont le diamètre d'inhibition atteint 10 mm (Kavitha et Vijayalakshmi, 2011). Une inhibition de 45% de la croissance de *F. oxysporum* a été enregistrée après un contact avec la chitinase purifiée de *Trichoderma viride* (Abu-Tahon et Isaac, 2020). Une chitinase purifiée d'*Aspergillus niger* LOCK 62 inhibe 60% du développement des hyphes de *Fusarium culmorum* (Brzezinska et Jankiewicz, 2012). Ainsi, les chitinases de *Bacillus subtilis* TV-125A, *Serratia marcescens* et *Cellulosimicrobium cellulans* 191 se sont révélées efficaces pour inhiber la progression de *Fusarium culmorum*, *Alternaria alternata* et *Rhizopus oligosporus*, respectivement (Fleuri *et al.*, 2009; Senol *et al.*, 2014; Fadhil *et al.*, 2014). Deux enzymes (FI et FII) ont été purifiées à partir du bouillon de *Bacillus amyloliquefaciens* V656, et ont toutes deux montré une activité antifongique vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* (Wang *et al.*, 2002). Les enzymes mycolytiques (chitinases, glucanases), souvent d'origine

bactérienne, suscitent un grand intérêt du fait de leur capacité à dégrader les constituants de la paroi cellulaire des champignons (Cd *et al.*, 2021).

3.12. Application de la chitinase pour prévenir les infections fongiques chez les grains de blé

Pendant la germination, les graines sont susceptibles d'être infectées par les organismes pathogènes, divers traitements chimiques et biologiques sont appliqués aux semences afin de prévenir ces infections (Castañeda *et al.*, 2014). Dans notre étude, nous avons obtenu un taux de germination de 100 % pour les grains de blé traités avec la chitinase purifiée, ainsi qu'un développement important des racines (≥6 cm) a été observé, avec une légère infection fongique apparaissant après le 6ème jour d'exposition à l'environnement externe. Cependant, les graines non traitées étaient plus sensibles à l'infection fongique, des mycéliums fongiques se développent sur les graines après 2 jours, avec une réduction de 60% du taux de germination (Figure 49 et 50). On peut conclure que le traitement initial des semences avec la chitinase pourrait être un bon moyen pour les protéger contre diverses infections fongiques, ainsi que pour minimiser la quantité de fongicides chimiques utilisés. Des résultats similaires ont été obtenus pour la chitinase de *Bacillus pumilus* RST25 sur les grains de blé tendre (Gurav *et al.*, 2017), et la chitinase de *Bacillus thuringiensis* sur les grains de soja (Reyes-ramírez *et al.*, 2004).

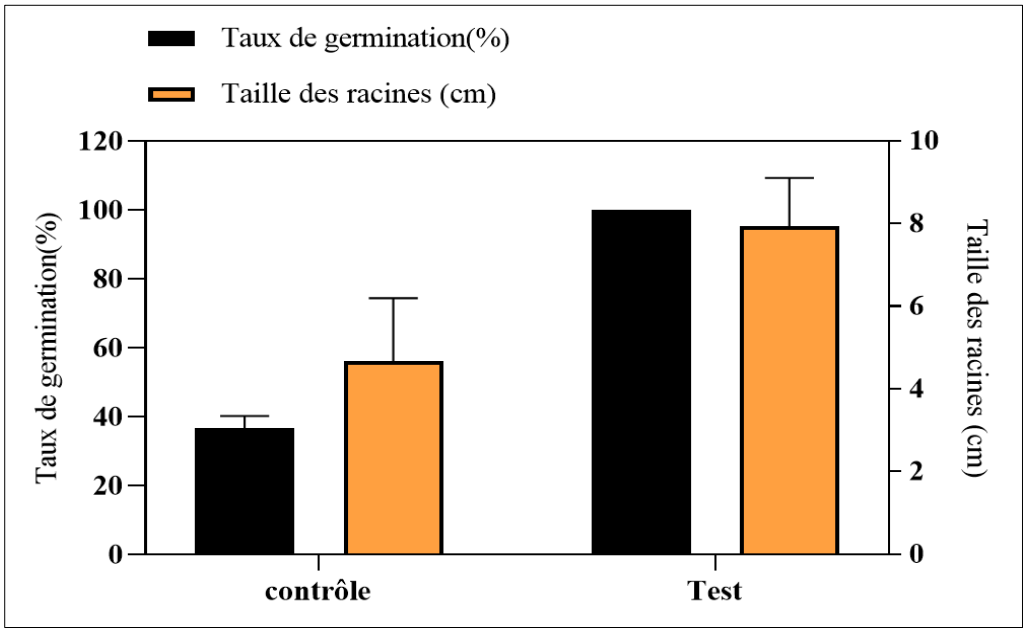


Figure 49. Germination et longueur des racines de grains de blé pulvérisés et non pulvérisés avec la chitinase.

Figure 50. Effet de la chitinase sur les infections fongiques et la germination de grains de blé: (a) contrôle, (b) grains traités avec la chitinase purifiée.

3.13. Traitement de la fusariose sur les tubercules de pomme de terre

La pourriture sèche de la pomme de terre est une maladie qui peut toucher les tubercules après la récolte et pendant le stockage (Falert et Akarapisan, 2019). Elle peut être causée par plusieurs espèces de *Fusarium* qui colonisent les tubercules (Stefańczyk *et al.*, 2016). Récemment, *F. graminearum* est apparu comme une espèce majeure impliquée dans la pourriture sèche de la pomme de terre (Tiwari *et al.*, 2020).

La chitinase purifiée de la souche SRTI8 a été testée pour déterminer sa capacité à ralentir la croissance de *F. graminearum* sur les tubercules de pomme de terre. Après l'apparition des filaments de *F. graminearum* sur la pomme de terre (8 jours après l'infection par les spores), des doses de 60 U de chitinase ont été pulvérisées sur les lésions toutes les 24 heures. Après 7 jours, le développement fongique a été partiellement ralenti, la taille des lésions varie de 1 à 3 mm par rapport au témoin traité à l'eau distillée qui mesurait 5 à 7 mm (Figures 51 et 52).

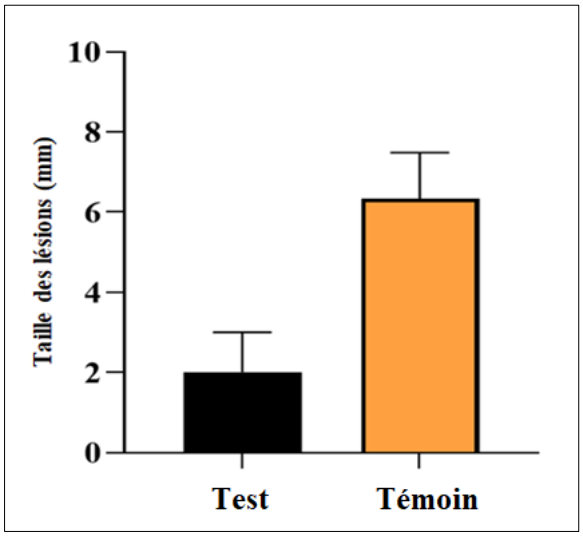


Figure 51. Taille des lésions induites par le *F. graminearum* sur des pommes de terre traitées et non traitées avec de la chitinase

De nombreuses expériences impliquant des chitinases purifiées à partir de souches bactériennes et fongiques ont été réalisées dans différents travaux. Loc *et al.*, (2019), ont utilisé la chitinase purifiée de *Trichoderma asperellum* PQ34 pour le traitement de l'anthracnose causée par *Colletotrichum sp* sur la mangue et le piment. Des expériences en serre menées par Li *et al.*, (2008) ont démontré l'efficacité de la chitinase CH2 de *Bacillus cereus* dans la lutte contre le flétrissement verticillien induit par *Verticillium dahliae* sur

l'aubergine, l'enzyme permis de réduire la sévérité du flétrissement verticillien de 53,13% en 14 jours. Shternshis *et al.*, (2002) ont testé trois produits à base de composés d'origine biologique ; *Bacillus thuringiensis* (BACTICIDE), les métabolites de *Streptomyces avermitilis* (PHYTOVERM), et la chitinase de *Streptomyces sp.* pour lutter contre la cécidomyie des framboises causée par *Thomasiniana theobaldi*, la pulvérisation de BACTICIDE (0.2%) et PHYTOVERM (0.2%) ont réduit deux fois la sévérité de la cécidomyie, et le même effet a été obtenu avec les insecticides chimiques, alors que la pulvérisation de chitinase (1%) a entrainé une diminution de quatre fois la gravité de la cécidomyie. Ainsi que des essais réalisés sur le terrain avec la chitinase de *Streptomyces sp.* ont montré une suppression significative de la brûlure des dards du framboisier infecté par le champignon *Didymella applanata* (Shternshis *et al.*, 2006). La pulvérisation d'une chitinase végétale (chitinase E, provenant d'une igname, *Dioscorea opposita*) directement sur la surface de l'oïdium infectant les baies et les feuilles de fraises, a entraîné la dégradation de l'oïdium et la disparition de la maladie pour plus de deux semaines (Karasuda *et al.*, 2003). L'efficacité de la chitinase produite par *Bacillus licheniformis* J24 a été testée *in vivo* sur les semences de maïs, les résultats ont montré que l'enzyme pouvait réduire de 71,08% la maladie causée par *Fusarium sp.* par rapport aux semences non traitées (Essghaier *et al.*, 2021).

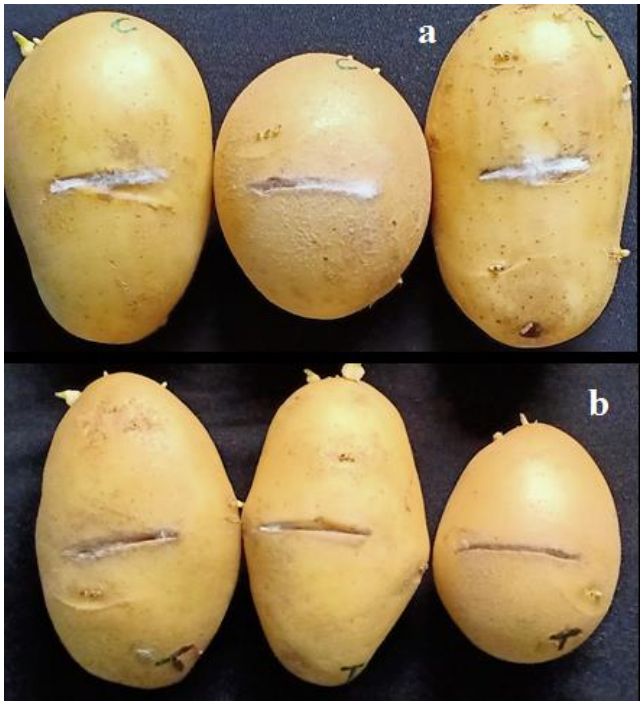


Figure 52. Traitement de la fusariose de la pomme de terre, (a) témoin (b) tubercules traités avec 60 U/mL de la chitinase

3.14. Le potentiel bioinsecticide de la chitinase purifiée

Les grains céréaliers entreposées sont exposées à un certain nombre de facteurs indésirables, qui peuvent entrainer des pertes drastique de rendement, les ravageurs des entrepôts sont considérés comme un facteur essentiel responsable de ces pertes, le charançon du grenier ; *Sitophilus granarius* L est l'agent le plus couramment rencontré (Nietupski *et al.*, 2021), c'est un coléoptère qui se nourrit et se multiplie dans les grains stockés réduisant considérablement leur capacité de germination de 93% à 7%, sa présence et sa croissance dans les grains augmentent l'humidité et la température de la masse stockée, ce qui favorise l'apparition et le développement de moisissures des grains, qui sont une autre source de dégradation de la qualité des grains (Boniecki *et al.*, 2020).

L'effet bioinsecticide de la chitinase purifiée est présenté dans la figure 53, *Sitophilus granarius* L a été exposé à des grains de blé traités avec différentes doses de chitinase (1-10 U/mL), une mortalité de *S. granarius* L a été observée après le contact direct avec les grains traités, et cette mortalité a augmenté avec l'augmentation de la dose enzymatique, le taux de mortalité le plus élevé (52%) a été enregistré après le traitement des grains avec 10 U/mL de chitinase.

Une dose de 0,048 U/mL de chitinase purifiée de *Pseudomonas fluorescens* MP-13 a entraîné une mortalité de 100% de *Helopeltis theivora* (punaise du thé) (Suganthi *et al.*, 2017). Les chitinases de *Xenorhabdus nematophila* HB310 inhibent efficacement la croissance des larves de *Helicoverpa armigera*, en endommagent la membrane péritrophique (Liu *et al.*, 2022). Laribi-Habchi *et al.*, (2020), ont montré l'effet insecticide de la Chitinase produite par *Shewanella inventionis* contre *Sitophilus granarius*, un taux de mortalité de 100% de l'insecte a été atteint. (Aktas *et al.*, 2023), ont purifié une chitinase produite par *Stenotrophomonas maltophilia*, l'enzyme est capable de détruire la chitine du doryphore de la pomme de terre; *Leptinotarsa decemlineata*. Martínez-Zavala *et al.*, (2020), ont constaté que l'activité insecticide de *Bacillus thuringiensis* fait intervenir la sécrétion de chitinases, qui contribuent à l'hydrolyse de la cuticule des insectes, ce qui facilite la dissémination des toxines et des spores.

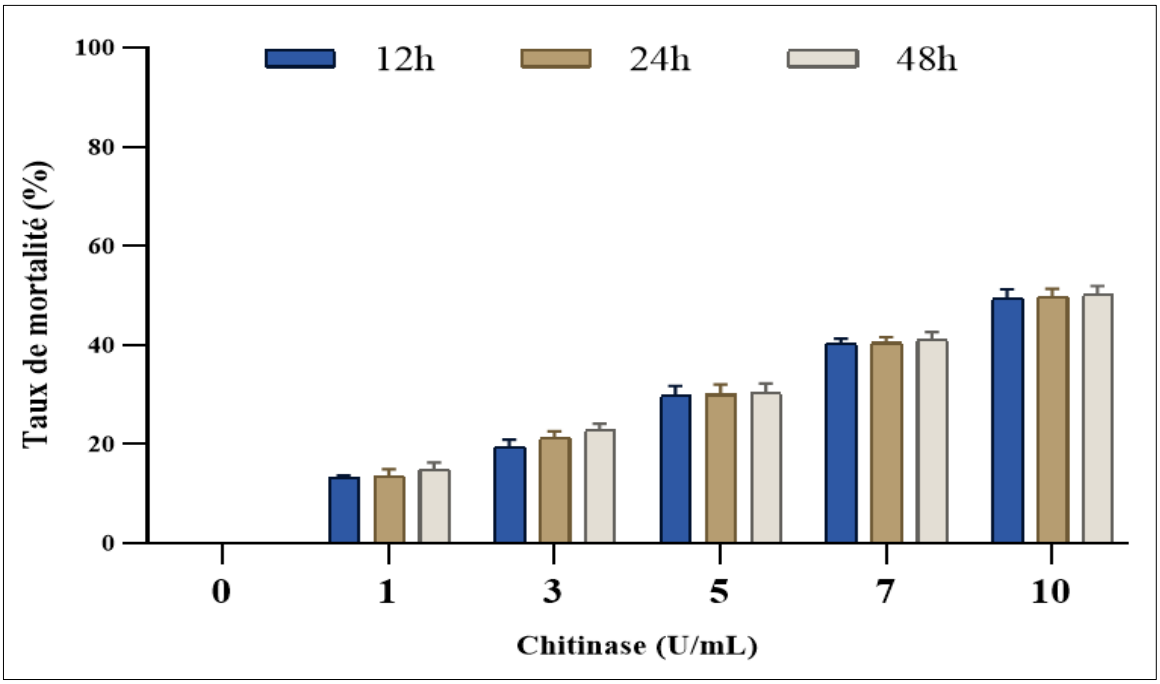


Figure 53. Taux de mortalité de l'insecte ravageur *Sitophilus granarius* L sous l'effet de différentes concentrations de chitinase purifiée.

4. Xylanase

4.1. Criblage qualitatif des bactéries productrices de xylanase

Afin de détecter le potentiel de dégradation du xylane par les souches bactériennes isolées, un test au rouge Congo a été réalisé, il s'agit d'une méthode de dépistage facile à inspecter à l'œil nu, le rouge congo peut former un complexe rouge avec le xylane, mais ne réagit pas avec les produits d'hydrolyse du xylane, les souches ayant une activité xylanase forment des halos transparents sur la gélose. L'indice enzymatique a été utilisé pour sélectionner des isolats puissants, le rapport le plus élevé a été enregistré pour l'isolat RTS11 (Figure 54), qui a été sélectionnée pour d'autres études de fermentation enzymatique.

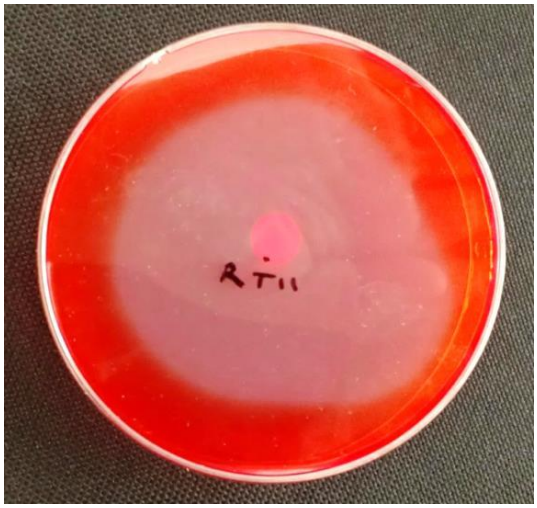


Figure 54. Activité xylanasique de la souche RTS11.

4.2. Estimation de l'activité xylanase en milieu liquide

La souche RTS11 qui présentent une zone claire dans le test précédent, est soumise à un test quantitatif pour déterminer l'activité xylanase dans les conditions non optimisées, en utilisant deux milieux différents et une durée d'incubation de 48 heures. Selon la Figure 55, le profil enzymatique a révélé que la bactérie a produit la xylanase dans les deux milieux de culture à différents niveaux. Le milieu M1 a probablement influencé positivement la production de xylanase (154,12 U) par rapport à l'autre milieu (M2=146), cette variation peut être due à la présence de xylane et d'autres composés en quantités suffisantes qui peuvent être facilement utilisés par l'isolat en croissance, améliorant la capacité des cellules à produire l'enzyme xylanase.

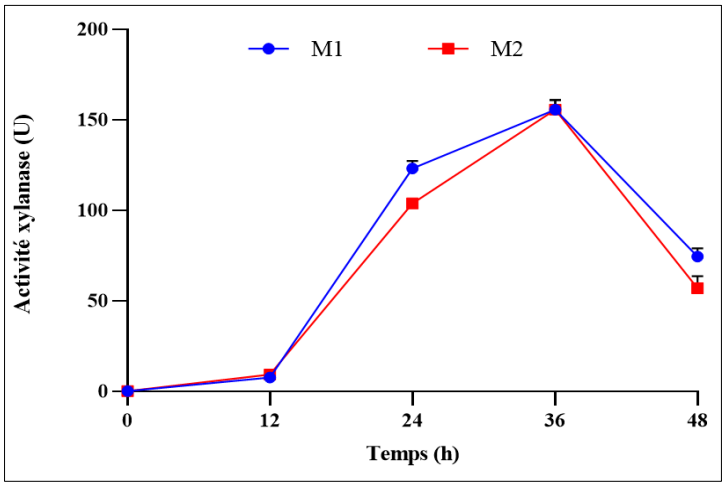


Figure 55. Activité xylanase en bouillon de culture.

4.3. Identification moléculaire

Pour étudier les relations entre les bactéries, l'analyse de similarité a été utilisée en comparant la séquence partielle totale de 1150 pb de l'ARNr 16S avec les séquences NCBI disponibles dans les bases de données à l'aide du programme BLAST. L'arbre phylogénétique (Figure 56) a été tracé pour déterminer l'appartenance taxonomique de l'espèce testée avec les souches de référence *Bacillus sp*. et *Staphylococcus aureus*, les séquences du gène de l'ARNr 16S obtenues dans cette étude ont montré une similarité de 98,69 avec *Bacillus pumilus*. La souche RTS11 a été déposée dans la base de données sous la référence (OL989329).

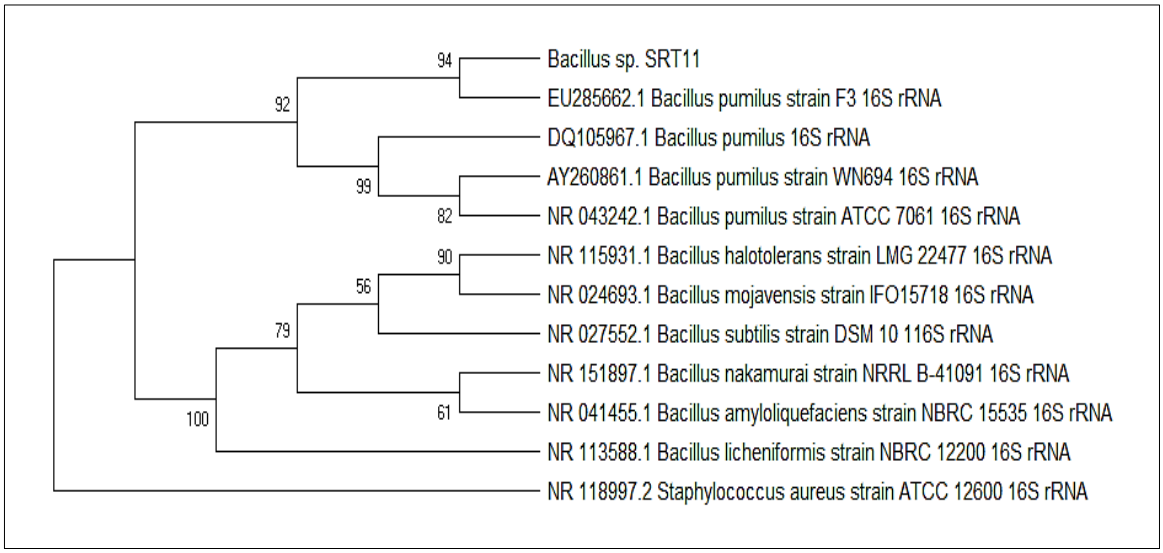


Figure 56. Arbre phylogénétique de la souche RTS11 montrant la similitude avec *Bacillus sp.*

4.4. Capacité de tolérance de l'isolat RTS11 à différents conditions physiologiques (NaCl, pH, température)

La croissance de la souche RTS11 a été testée à différents pH, températures et NaCl (Tableau 26). Une bonne croissance a été observée à différents pH (5 et 10), et à différentes températures (10°C et 50°C), une inhibition a été enregistrée à pH 11, ainsi qu'à 60°C et 70°C. La souche a toléré jusqu'à 7 % de NaCl, et la croissance a été arrêtée avec l'augmentation du NaCl.

Tableau 26. L'effet de différentes concentrations de pH, T°, NaCl sur la croissance de *Bacillus* sp. RTS11.

T°	10	20	30	40	50	60	70
	+	+	+	+	+	-	-
pH	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
	+	+	+	+	+	+	-
NaCl	**0**	**1%**	**3%**	**5%**	**7%**	**10%**	**12%**
	+	+	+	+	+	-	-

4.5. L'effet de sources de carbone comme inducteurs / répresseurs

Les sources de carbone jouent un rôle essentiel dans le métabolisme cellulaire et la synthèse de la xylanase (Kumar *et al.*, 2014). Neuf sources de carbone ont été testés pour déterminer leur influence sur la synthèse de la xylanase par la souche isolée (Figure 57). Parmi les sources de carbone testées, le xylane a été la meilleure source de carbone, une faible activité xylanase a été détectée en présence de divers sucres simples et complexes tels que le xylose, le saccharose, l'amidon, l'arabinose, et la CMC. L'activité xylanase n'a pas été détectée dans les cultures contenant des mélanges de glucose et de xylane, ce qui indique que le glucose agit comme un répresseur catabolique de la xylanase. Cependant, la production maximale de xylanase a été obtenue dans une culture contenant 0,5% de xylane de bouleau, suivi par le xylane d'épeautre d'avoine et le xylane d'épi de maïs, ce qui indique que les substrats contenant du xylane peuvent induire la production de xylanase par la souche RTS11. Le xylane ne peut pas être un inducteur direct, puisqu'il ne peut pas pénétrer directement dans les cellules, mais ses produits d'hydrolyse initiaux tels que le xylobiose, le xylotriose, etc., générés par l'action constitutive de la xylanase, peuvent agir comme des inducteurs (Nagar *et al.*, 2010).

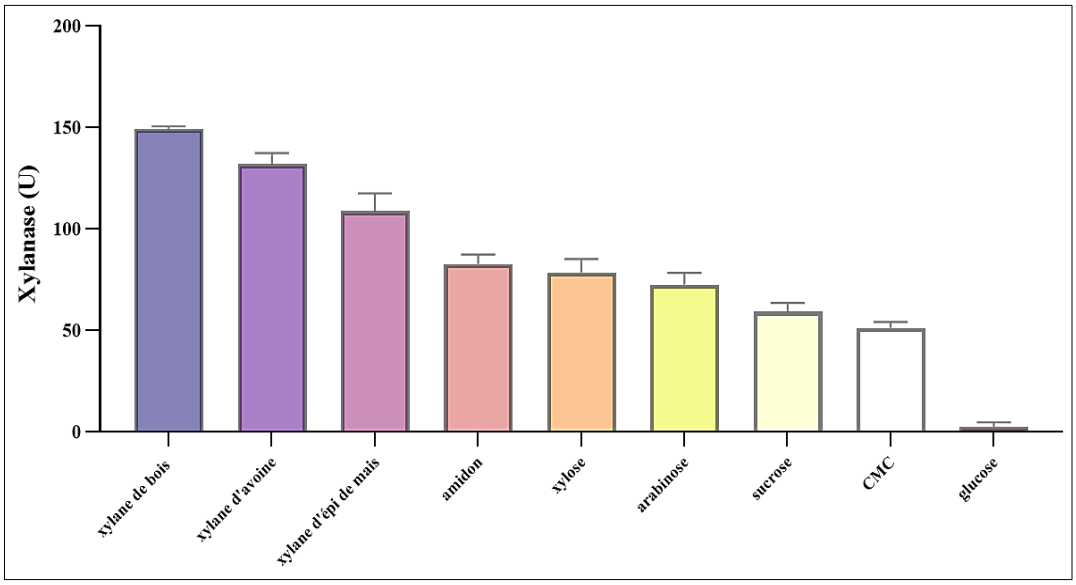


Figure 57. Effet de différentes sources de carbone sur la production de la xylanase par *Bacillus* sp. RTS11.

Emami *et al.*, (2002) ont constaté qu'aucune activité xylanase a été détectée dans un milieu contenant à la fois du xylane et du glucose. Ainsi que le xylane induit le plus haut niveau de production de xylanase par les souches de *Bacillus pumilus* (Poorna et Prema, 2006), *Bacillus pumilus* SV-205 (Nagar *et al.*, 2013), *Bacillus circulans* AB 16 (Dhillon et Khanna, 2000), et *Jonesia denitrificans* (Boucherba *et al.*, 2011). Alors que le xylose stimule la production de xylanase par *Bacillus megaterium* (Sindhu *et al.*, 2006).

4.6. Effet des sources d'azote sur l'activité de la xylanase

Les sources d'azote affectent largement la production de xylanase, en influençant la croissance cellulaire et la synthèse des métabolites, en particulier la production et la sécrétion d'enzymes, et peuvent également affecter de manière significative le pH du milieu au cours de la fermentation et, par conséquent, l'activité et la stabilité de l'enzyme peuvent également être influencées (Bajaj et Abbass, 2011). L'influence de différentes sources d'azote organiques et inorganiques (0,5%) sur la production de xylanase par *Bacillus sp.* RTS11 a été étudiée, la présence de sources d'azote organiques telles que la peptone, l'extrait de levure et l'extrait de malt dans le milieu a permis d'obtenir un rendement enzymatique plus élevé que celui obtenu avec des composés inorganiques, et de faibles niveaux d'enzymes ont été produits en présence de substances azotées inorganiques (Figure 58). Parmi les différentes sources d'azote testées, l'extrait de levure est la meilleure source d'azote pour la production de xylanase, ce qui peut s'expliquer par sa richesse en vitamines et en minéraux nécessaires à la croissance bactérienne

(Kumar *et al.*, 2014). Les variables ayant un impact significatif sur la production d'enzymes sont retenues pour un criblage plus approfondi à l'aide de Plackett-Burman.

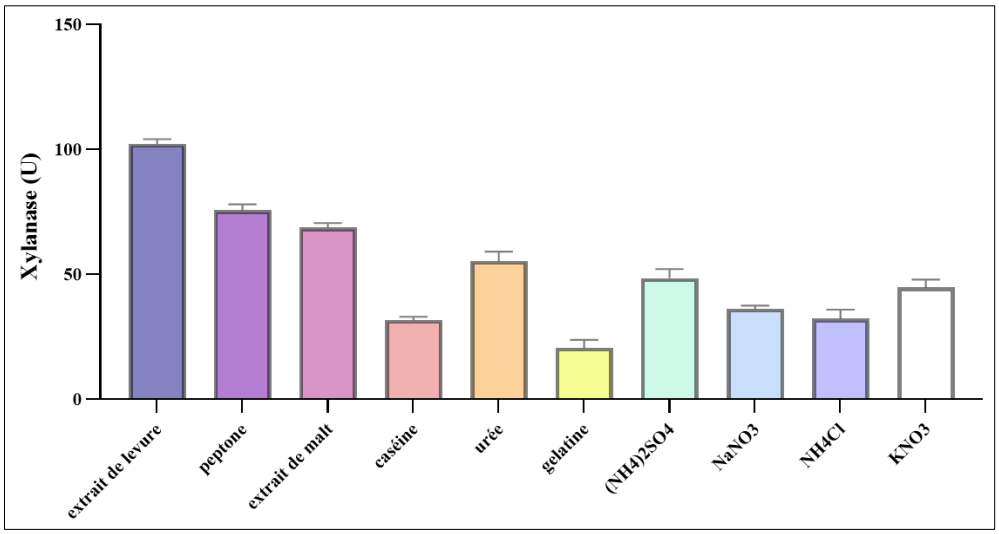


Figure 58. Influence de différentes sources d'azote sur l'activité xylanase de la souche RTS11.

4.7. Effet de différents additifs

Les agents tensioactifs peuvent interagir spécifiquement avec les enzymes après leur sécrétion à l'extérieur de la cellule (Liu *et al.*, 2011). Les tensioactifs peuvent accroître la stabilité des enzymes et empêcher leur dénaturation, ils peuvent également modifier la structure du substrat, le rendant plus accessible à l'hydrolyse enzymatique (Eriksson *et al.*, 2002). L'effet de différents additifs a été examiné sur la production de xylanase, les résultats sont présentés dans la Figure 59. L'ajout de Tween 80 au milieu de base a stimulé la production d'enzyme, tandis que le Tween 20, le Tween 40, le glycérol, et l'acide oléique ont légèrement diminué l'activité enzymatique. Le CTAB et le PEG ont entraîné une réduction significative de l'activité de la xylanase, qui pourrait être due à de multiples raisons telles que des changements de conformation dans la structure tertiaire et secondaire de la protéine, l'attachement de surfactants au site actif de l'enzyme, ou un changement dans le substrat induisant une diminution de la disponibilité des sites actifs, tandis que l'ajout de Tween 80 augmente le rendement en xylanase, car il peut assurer une meilleure stabilité de l'enzyme et empêcher sa dénaturation, et il peut avoir un effet positif sur la structure du substrat, ce qui permet une conversion plus efficace (Akhavan Sepahy *et al.*, 2011). Des rapports précédents montrent que l'ajout de Tween 80 a augmenté la production de xylanase par *Thermoascus aurantiacus* (Gomes *et al.*, 1994), et *Trichoderma viride* IR05 (Irfan *et al.*, 2014).

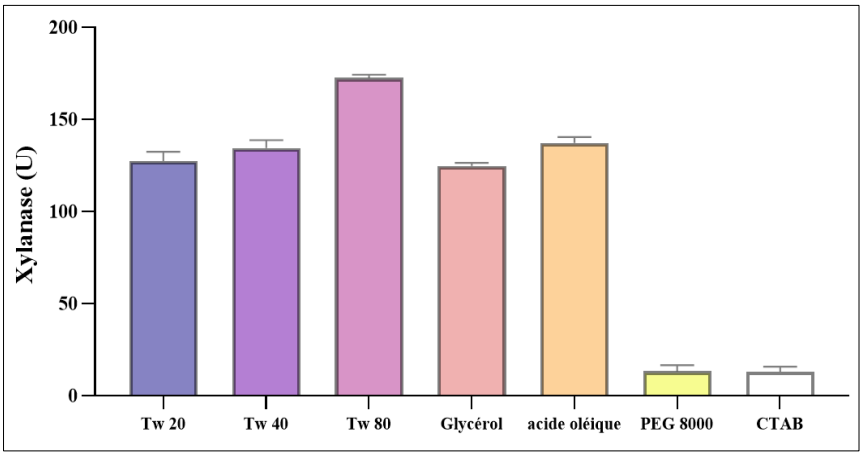


Figure 59. Influence de différents additifs sur l'activité xylanolytique de la souche de *Bacillus sp.* RTS11.

4.8. Optimisation statistique

4.8.1. Criblage de variables significatives à l'aide du plan de Plackett-Burman

La production de xylanase est fortement influencée par la composition du milieu, notamment les sources de carbone et d'azote, ainsi que par les conditions de culture telles que le pH, la température, et le temps d'incubation (Ameen, 2023). Un total de quinze variables a été examiné dans 20 expériences, avec deux niveaux pour chaque variable, les activités enzymatiques résultantes sont présentées dans le tableau 27. Les expériences de Plackett-Burman ont montré une variation significative de la production de xylanase (de 27,03 U à 251,41 U), indiquant clairement la nécessité d'optimiser le milieu pour avoir un meilleur rendement. L'analyse de la variance du modèle de régression montre que le modèle est hautement significatif et applicable, avec des valeurs F=12,17, p= 0,0134, R^2 = 0,9786, CV = 14,58%. D'après le tableau 28, le xylane et le $CoCl_2$ ont été déterminés comme étant les deux facteurs significatifs, dont les valeurs p sont respectivement de 0,0007 et 0,0014. Les autres variables se sont avérées avoir des effets non significatifs et n'ont pas été étudiées. La réponse correspondante de la production de xylanase a été exprimée en termes de l'équation de régression suivante :

Activité = 127.277 + 46.09 A + 3.53 B - 6.06 C+ 0.45 D - 11.09 E+ 9.74 F - 3.54 G -1.15 H -10.88 J + 8.89 K+ 8.28 L – 38 M - 10.234 N - 5.17 O - 7.52 P; Où, A, B, C, E, F, G, H, J, K, L, M, N, O, P représentent xylane, extrait de levure, peptone, KNO_3, urée, $MgSO_4$, NaCl, $CaCl_2$, Tw80, $MnSO_4$, $FeSO_4$, $CoCl_2$, $ZnSO_4$, T°, $(NH_4)_2SO_4$.

Tableau 27 : Matrice de conception expérimentale de Plackett-Burman pour le criblage des facteurs affectant la production de xylanase

Exp	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M	N	O	P	R	R´
1	10	10	5	1	1	0.1	1	0.02	0.1	0.005	0.005	0.02	0.02	30	1	124.94	115.12
2	10	10	1	1	1	0.1	0.1	0.3	0.3	0.02	0.02	0.001	0.02	30	3	237.12	225.15
3	3	10	1	1	1	0.5	1	0.3	0.1	0.02	0.005	0.02	0.001	30	1	80.67	90.49
4	10	10	5	5	1	0.5	1	0.3	0.3	0.02	0.02	0.02	0.02	37	3	128.01	139.98
5	3	10	5	5	1	0.1	1	0.02	0.3	0.005	0.005	0.001	0.001	37	3	100.13	92.76
6	3	1	5	5	0.05	0.1	1	0.02	0.1	0.02	0.02	0.02	0.02	30	3	53.03	58.25
7	10	1	1	1	0.05	0.5	1	0.02	0.1	0.02	0.005	0.001	0.02	37	3	231.66	230.25
8	10	10	5	5	0.05	0.5	0.1	0.3	0.1	0.005	0.005	0.001	0.02	37	1	222.9	228.12
9	3	1	5	1	0.05	0.5	1	0.3	0.3	0.005	0.02	0.001	0.02	30	1	156.82	145.63
10	10	1	5	1	0.05	0.1	0.1	0.3	0.3	0.005	0.005	0.02	0.001	30	3	122.5	138.29
11	3	10	5	1	0.05	0.5	0.1	0.02	0.3	0.02	0.02	0.02	0.001	37	1	119.98	113.98
12	3	1	1	5	1	0.1	0.1	0.3	0.1	0.005	0.02	0.02	0.02	37	1	41.32	39.91
13	3	10	1	5	0.05	0.1	0.1	0.02	0.3	0.02	0.005	0.001	0.02	30	1	144.85	156.82
14	3	1	1	1	1	0.5	0.1	0.02	0.3	0.005	0.005	0.02	0.02	37	3	25.62	27.03
15	10	1	1	5	1	0.5	1	0.02	0.3	0.005	0.02	0.001	0.001	30	1	240.22	251.41
16	3	10	1	1	0.05	0.1	1	0.3	0.1	0.005	0.02	0.001	0.001	37	3	135.23	142.60
17	10	10	1	5	0.05	0.5	0.1	0.02	0.1	0.005	0.02	0.02	0.001	30	3	210.06	198.87
18	10	1	1	5	0.05	0.1	1	0.3	0.3	0.02	0.005	0.02	0.001	37	1	182.48	166.69
19	3	1	5	5	1	0.5	0.1	0.3	0.1	0.02	0.005	0.001	0.001	30	3	150.07	140.25
20	10	1	5	1	1	0.1	0.1	0.02	0.1	0.02	0.02	0.001	0.001	37	1	229.61	235.61

A, B, C, E, F, G, H, J, K, L, M, N, O, P, R, R´ représente le xylane, l'extrait de levure, la peptone, KNO_3, urée, $MgSO_4$, NaCl, $CaCl_2$, Tw80, $MnSO_4$, $FeSO_4$, $CoCl_2$, $ZnSO_4$, T°, $(NH_4)_2SO_4$, l'activité et l'activité prédite.

Tableau 28 . ANOVA pour la conception de Plackett-Burman pour l'activité xylanase.

	Somme de carrés	Moyenne carrée	F	p	Coefficient
Model	83719.37	5581.29	12.17	**0.0134**	
A-Xylane	42483.92	42483.92	92.63	**0.0007**	46.09
B-Extrait de levure	248.94	248.94	0.5428	0.5022	3.53
C-Peptone	734.96	734.96	1.60	0.2743	-6.06
D-KNO_3	3.98	3.98	0.0087	0.9303	0.4460
E-Urée	2459.76	2459.76	5.36	0.0815	-11.09
F-$MgSO_4$	1897.35	1897.35	4.14	0.1117	9.74
G-NaCl	250.92	250.92	0.5471	0.5006	-3.54
H-$CaCl_2$	26.40	26.40	0.0576	0.8222	-1.15
J-Tween 80	23.67	23.67	0.0516	0.8314	-10.88
K-$MnSO_4$	1579.58	1579.58	3.44	0.1371	8.89
L-$FeSO_4$	1370.84	1370.84	2.99	0.1589	8.28
M-$CoCl_2$	28880.00	28880.00	62.97	**0.0014**	-38.00
N-$ZnSO_4$	2094.70	2094.70	4.57	**0.0994**	-10.23
O-Température	533.96	533.96	1.16	0.3413	-5.17
P-$(NH_4)_2SO_4$	1130.41	1130.41	2.46	0.1915	-7.52

4.8.2. Optimisation statistiques des facteurs affectant la production de la xylanase par le plan de Box Behnken

Le xylane a été sélectionné pour une étude d'optimisation plus détaillée à l'aide de Box-Behnken, tandis que le $CoCl_2$ n'a plus été pris en considération. Outre le xylane, quatre autres facteurs ont été optimisés (taux d'inoculum, âge d'inoculum, agitation, pH). Les cinq facteurs sélectionnés ont été étudiés à trois niveaux différents, un ensemble de 46 essais expérimentaux avec différentes combinaisons de 5 facteurs et leurs valeurs expérimentales et prédites sont présentées dans le tableau 29. Le tableau montre que la production de xylanase varie considérablement en fonction des différents facteurs et de leur concentration dans le milieu, le maximum de production de xylanase était de 429,02 U et le minimum de 172,19 U. L'équation polynomiale se présente comme suit :

Activité = 386.04 + 39.54 A + 6.03 B + 12.83 C - 88.68 D - 6.90 E – 21.55 AB + 40.24 AC + 27.89 AD + 10.03 AE + 32.28 BC + 11.85 BD + 6.61 BE + 2.17 CD - 0.3400 CE + 4.26 A^2 - 2.10 B^2 - 43.44 C^2 - 48.48 D^2 + 1.49 E^2; Où A, B, C, D, E sont respectivement l'âge d'inoculum, le taux d'inoculum, le pH, l'agitation, le xylane.

Tableau 29 : Matrice de conception de Box-Behnken avec les valeurs expérimentales et prédites pour l'activité xylanase.

Exp	A	B	C	D	E	R	R´
1	5.5	1	5	100	12.5	**375**	**352.17**
2	5.5	3	5	100	10	**358.11**	**341.56**
3	5.5	5	7.5	200	12.5	**254.46**	**263.96**
4	8	3	7.5	0	12.5	**416.81**	**404.65**
5	5.5	3	10	0	12.5	**395.52**	**396.71**
6	5.5	5	10	100	12.5	**379.13**	**388.83**
7	5.5	3	5	100	15	**325.45**	**313.96**
8	5.5	3	7.5	100	12.5	**407.42**	**389.38**
9	5.5	3	10	100	15	**352.1**	**347.55**
10	5.5	3	5	200	12.5	**172.19**	**189.82**
11	5.5	3	7.5	200	10	**305.44**	**264.08**
12	8	3	5	100	12.5	**376.16**	**378.92**
13	5.5	1	7.5	100	10	**384.57**	**401.63**
14	3	5	7.5	100	12.5	**345.48**	**322.02**
15	5.5	1	7.5	200	12.5	**201.88**	**231.95**
16	5.5	1	10	100	12.5	**346.78**	**316.06**
17	3	3	5	100	12.5	**184.27**	**208.11**
18	8	1	7.5	100	12.5	**401.18**	**404.03**
19	5.5	3	7.5	100	12.5	**401.12**	**398.89**
20	3	1	7.5	100	12.5	**292.64**	**290.60**
21	8	3	7.5	100	15	**374.53**	**389.38**
22	5.5	1	7.5	0	12.5	**415.61**	**434.63**
23	5.5	3	7.5	100	12.5	**377.12**	**389.38**
24	5.5	3	7.5	0	10	**429.02**	**439.08**
25	3	3	7.5	100	15	**265.01**	**288.49**
26	5.5	3	7.5	200	15	**266.57**	**238.18**
27	8	3	10	100	12.5	**335.42**	**326.35**
28	3	3	10	100	12.5	**304.48**	**316.49**
29	5.5	3	7.5	100	12.5	**363.69**	**389.38**
30	8	5	7.5	100	12.5	**407.83**	**389.26**
31	5.5	3	10	100	10	**373.4**	**363.78**
32	5.5	5	7.5	100	15	**400.52**	**388.04**
33	5.5	5	5	100	12.5	**278.25**	**296.48**
34	8	3	7.5	100	10	**389.37**	**400.74**
35	8	3	7.5	200	12.5	**299.98**	**298.43**
36	3	3	7.5	0	12.5	**414.56**	**387.09**
37	5.5	5	7.5	0	12.5	**420.8**	**419.26**
38	5.5	3	7.5	0	15	**398.12**	**421.15**
39	3	3	7.5	200	12.5	**152.19**	**135.33**
40	5.5	3	7.5	100	12.5	**396.57**	**398.38**

41	5.5	3	5	0	12.5	**381.28**	**369.15**
42	5.5	1	7.5	100	15	**375.45**	**361.50**
43	5.5	3	7.5	100	12.5	**390.33**	**389.38**
44	3	3	7.5	100	10	**319.97**	**330.47**
45	5.5	3	10	200	12.5	**187.12**	**218.07**
46	5.5	5	7.5	100	10	**373.2**	**391.73**

A. Age d'inoculum (h), B. Taux d'inoculum (%), C. pH, D. Agitation (rpm), E. Xylane (g/L), R. Activité (U), R´. Activité prédite (U)

La signification statistique de l'équation polynomiale a été vérifiée par le test d'ANOVA, le résultat est donné dans le tableau 30. Les valeurs du modèle *F* (18.90), p (< 0,0001), R^2 (0,9380), et C.V (7.12%) suggère que le modèle est hautement significatif. En prenant la valeur p pour vérifier la signification de chacun des coefficients, l'effet linéaire de A, D, les effets interactifs d'AC, AD, BC, et l'effet quadratique de D^2 sont des termes significatifs du modèle.

Tableau 30 : Analyse de la variance pour le plan de Box-Behnken relatif à l'activité de la xylanase.

	Somme de carrés	**Moyenne carrée**	**F**	**p**
Modèle	2.254E+05	11270.96	18.90	**< 0.0001**
A	32641.65	32641.65	54.74	**< 0.0001**
B	276.89	276.89	0.4643	0.5019
C	3114.76	3114.76	5.22	**0.0310**
D	1.281E+05	1.281E+05	214.90	**< 0.0001**
E	1921.29	1921.29	3.22	0.0848
AB	533.38	533.38	0.8945	0.3533
AC	6476.23	6476.23	10.86	**0.0029**
AD	5295.47	5295.47	8.88	**0.0063**
AE	402.40	402.40	0.6748	0.4191
BC	4166.70	4166.70	6.99	**0.0140**
BD	561.45	561.45	0.9415	0.3412
BE	331.97	331.97	0.5567	0.4625
CD	0.1190	0.1190	0.0002	0.9888
CE	32.26	32.26	0.0541	0.8180
DE	15.88	15.88	0.0266	0.8717
A^2	10379.23	10379.23	17.41	**0.0003**
B^2	101.54	101.54	0.1703	0.6834
C^2	19625.50	19625.50	32.91	**< 0.0001**
D^2	20540.19	20540.19	34.45	**< 0.0001**
E^2	0.5036	0.5036	0.0008	0.9770

Pour étudier les effets des variables sur la production de xylanase, des courbes tridimensionnelles et des contours ont été générés. Le pH et l'âge d'inoculum ont un effet significatif sur la production de xylanase, l'effet de pH et de l'âge d'inoculum sur l'activité de la xylanase est montré dans la figure 60. Le passage du pH de 5 à 7,5, ainsi que l'augmentation de l'âge d'inoculum de 3 à 5,5 ont conduit à une augmentation de l'activité de la xylanase, toute autre augmentation entraîne une diminution de l'activité enzymatique. La production de xylanase par diverses bactéries et champignons est fortement dépendante du pH, le pH acide favorise généralement les xylanases fongiques, tandis que le pH alcalin stimule les xylanases bactériennes (Banu et Ingale, 2012). Un pH optimal de 7,5 a été rapporté pour la production de xylanase par *B. pumilus* B20 (Geetha et Gunasekaran, 2017). Le pH 8 est optimal pour la production de xylanase par *B. pumilus* (Begam *et al.*, 2015).

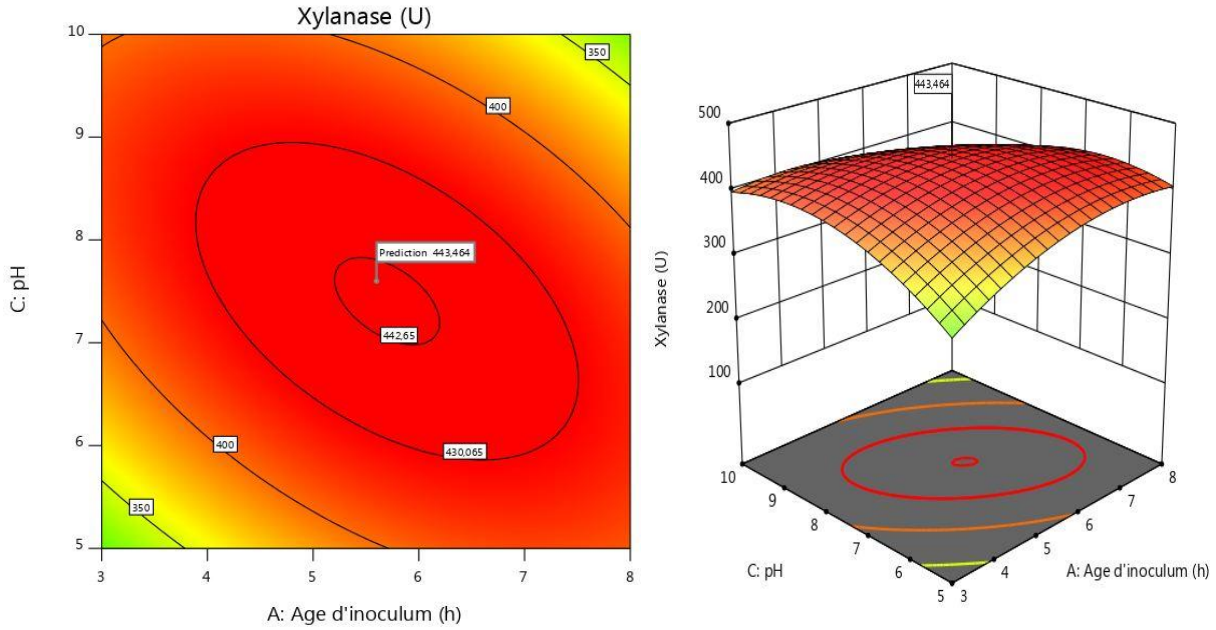


Figure 60. Les tracés de contour et de surface montrant les interactions entre le pH et l'âge d'inoculum.

La figure 61 montre l'effet du taux de l'inoculum sur l'activité xylanase, la synthèse maximale de xylanase est obtenue lorsque le taux de l'inoculum est maintenu à des niveaux moyens (2-3%). Une plus forte concentration d'inoculum n'est pas préférable dans les fermentations industrielles (Battan *et al.*, 2007). Un rendement maximal de xylanase chez la souche de *Bacillus pumilus* ML001 a été obtenu avec 1,25% (*v/v*) d'une culture âgée de 2 h avec OD_{600} nm~0,2 (Duarte *et al.*, 2000). Le titre de xylanase était le plus élevé lorsque 2%

(*v/v*) d'inoculum de *B. pumilus* SV-205 âgé de 24 h (18×10^7 CFU/mL) a été utilisé (Nagar *et al.*, 2012).

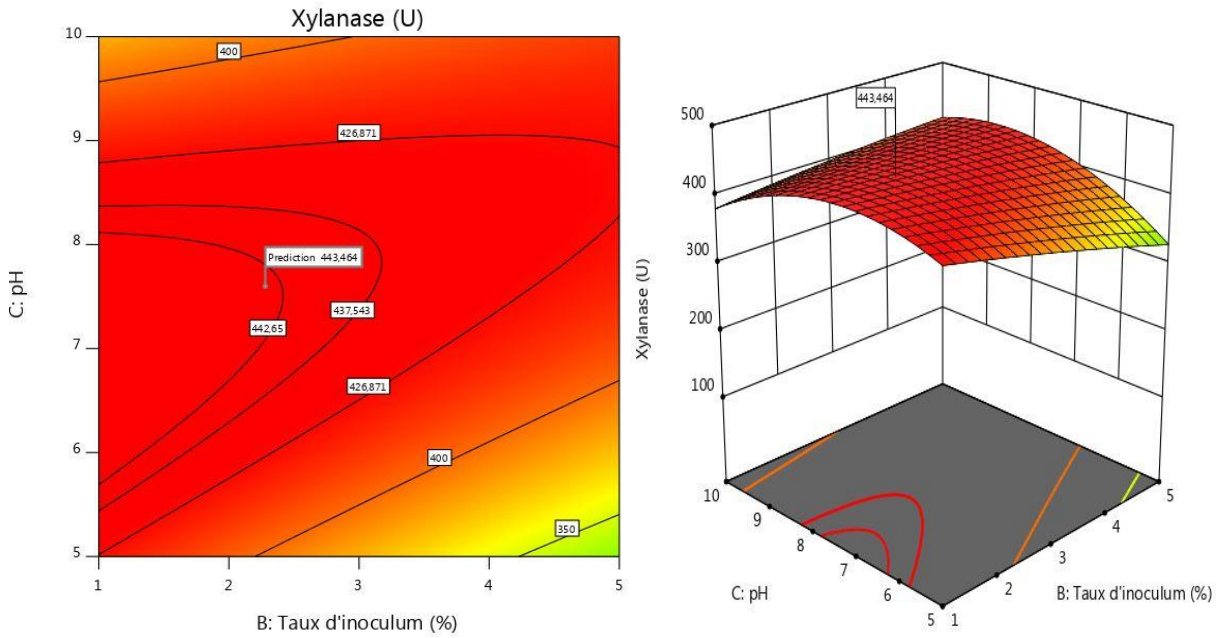


Figure 61. Les tracés de contour et de surface montrant les interactions entre le pH et le taux d'inoculum.

La figure 62 montre l'effet de l'agitation sur l'activité xylanase. L'agitation a un effet significatif sur la production de xylanase, l'activité maximale de la xylanase est obtenue en absence totale d'agitation, un accroissement de l'agitation conduisant à une diminution de l'activité. L'agitation est généralement conçue pour répondre à la demande en oxygène, pour assurer un mélange uniforme des nutriments, et pour éviter l'agglutination des cellules au cours du processus de fermentation, cependant, elle peut engendrer des forces de cisaillement susceptibles d'endommager la morphologie et les structures cellulaires des micro-organismes de diverses manières (Zhou *et al.*, 2018). Des vitesses d'agitation de 140 rpm, 200 rpm sont nécessaire pour produire la xylanase par *B. pumilus* RXAIII-5 (Richana *et al.*, 2007), *B. pumilus* VLK-1 (Kumar *et al.*, 2013).

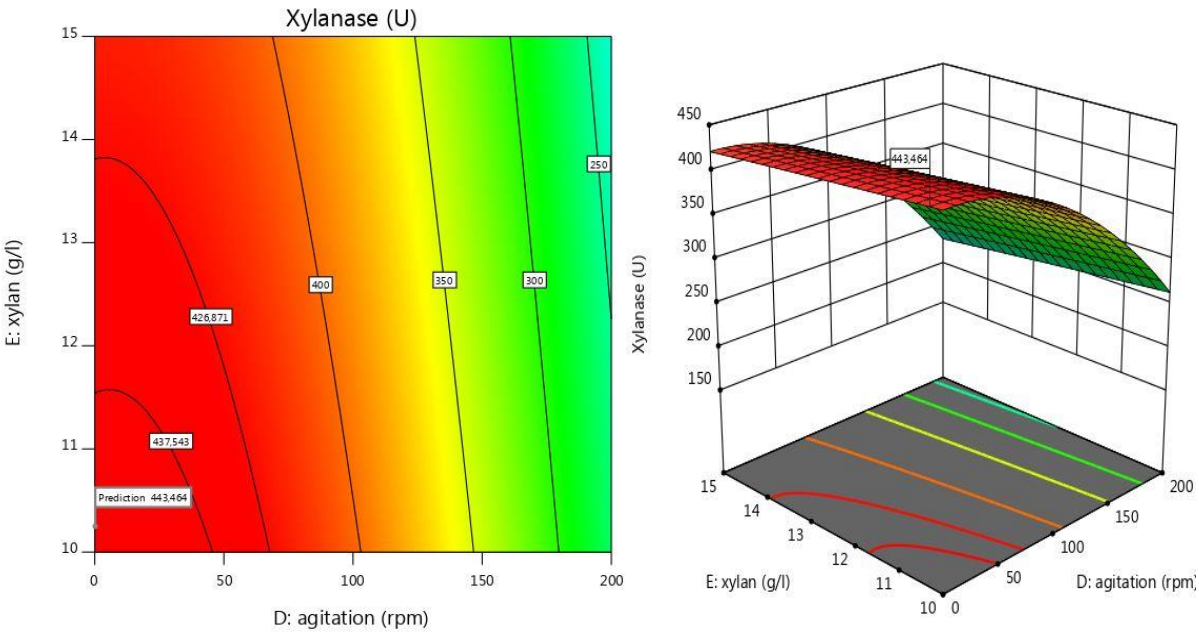


Figure 62. Les tracés de contour et de surface montrant les interactions entre le xylane et l'agitation.

La figure 62 montre également la corrélation entre l'activité xylanase et la concentration en xylane. L'activité xylanase maximale a été observée à une concentration de xylane <10,5 g/L, ensuite, l'activité a diminué avec l'augmentation de la concentration de xylane. La source de carbone peut agir comme un substrat à effet limitatif, dont une faible variation de la concentration affectera le niveau de la synthèse enzymatique (Garai et Kumar, 2013). La présence de xylane dans le milieu de culture peut induire la synthèse des enzymes xylanolytiques (Bueno et Brienzo, 2020). Une concentration de 1% (*w/v*) de xylane de bouleau était suffisante pour obtenir une activité xylanase maximale par *Bacillus amyloliquefaciens* (Las-Casas *et al.*, 2020), *Anoxybacillus kamchatkensis* NASTPD1 (Yadav *et al.*, 2018). Alors qu'un milieu de base contenant 1,5% de xylane de bouleau est recommandé pour les souches de *Bacillus tequilensis* ARMATI (Khusro *et al.*, 2016), et *Bacillus sp.* (Irfan *et al.*, 2016).

Les valeurs optimales ont été obtenues en utilisant le logiciel expert design version 11. L'expérience a été réalisée dans les conditions optimales prédites par l'analyse statistique de Box-Behnken : xylane (10,24 g/L), agitation (0,36 rpm), pH (7,60), âge d'inoculum (5,60 h), taux d'inoculum (2,28%). Le résultat expérimental (448,89 U) était très proche de la valeur prédite (443,46 U) par le modèle.

4.9. Cinétique de croissance et de production de xylanase par *Bacillus sp.* RTS11

La croissance et la production de xylanase ont été suivies à intervalles réguliers pendant 72 h de culture de la souche dans le milieu optimisé. La figure 63 montre qu'après l'inoculation, la culture a commencé à croître jusqu'à 32 h, où la biomasse la plus élevée a été atteinte, puis la croissance est restée presque constante jusqu'à 40 h, pour ensuite décliner. La production de xylanases extracellulaires par la souche RTS11 semble être partiellement associée à la croissance, la synthèse d'enzymes commence après 6 heures de fermentation, mais en faibles quantités, correspondant à une phase de croissance logarithmique, la production maximale de xylanase a été atteinte après 30 heures d'incubation pour une activité de 432,83 U dans la phase de croissance logarithmique tardive. La production enzymatique a été ensuite diminué, et cela pourrait être dû à la protéolyse ou à l'épuisement des nutriments disponibles pour l'isolat. La production de xylanase a atteint son maximum après 36 h pour *B. pumilus* SV-85S (Nagar *et al.*, 2010), après 24 h pour *Bacillus pumilus* MK001 (Kapoor *et al.*, 2008), et après 48 h pendant la phase logarithmique tardive pour *Bacillus pumilus* SILB-X (Kumar *et al.*, 2010).

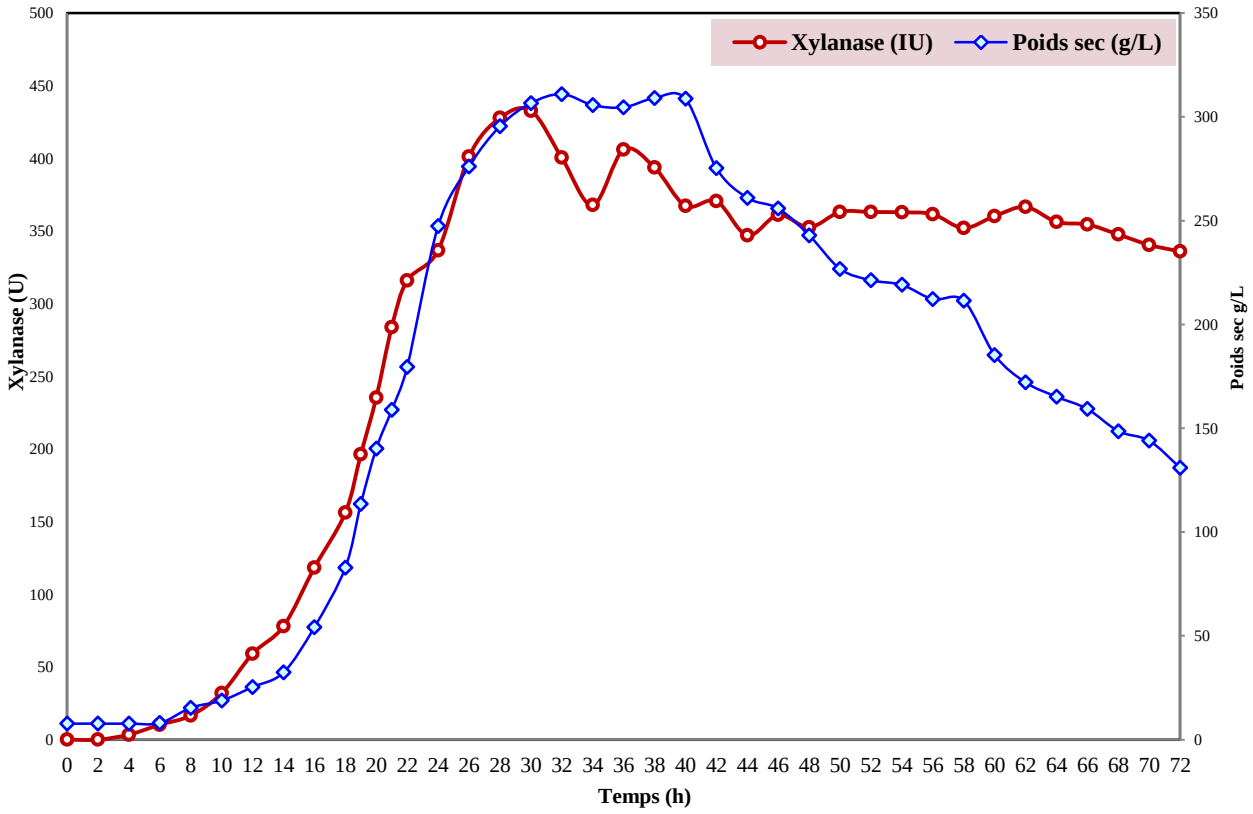


Figure 63. Cinétique de la croissance et la production de xylanase par *Bacillus sp.* RTS11.

Le taux de protéines augmente rapidement, atteignant 1,326 mg/mL à la fin de la phase logarithmique après 32 h. Les glucides sont consommés tout au long de la période de croissance (Figure 64). Le pH augmente avec la libération des protéines, une légère diminution du pH est observée à partir de 40 h probablement suite à la libération d'acide glucuconique dans le milieu, car le xylane des feuillus comporte des branches latérales d'acide glucuronique (Lyczakowski *et al.*, 2017).

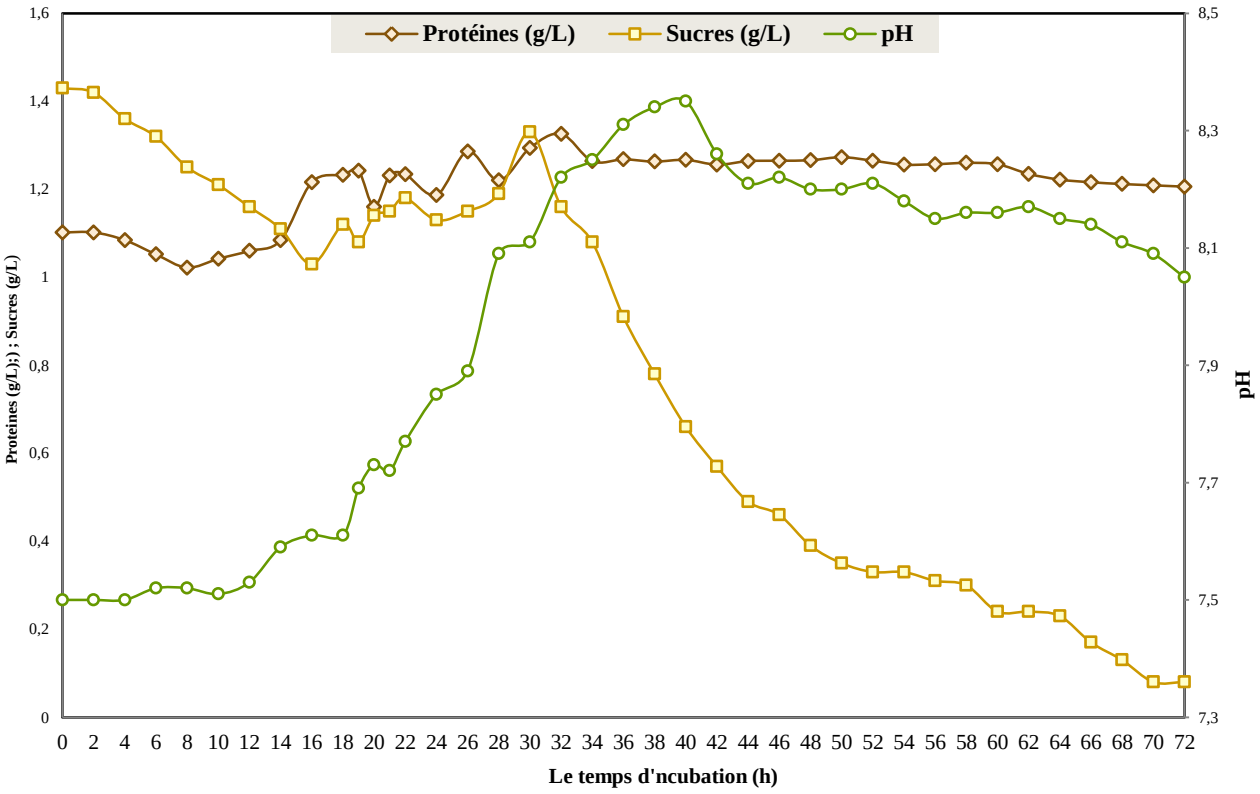


Figure 64. Cinétique des protéines, des glucides, et de pH au cours de la production de chitinase par *Bacillus sp.* RTS11.

4.10. Estimation de l'activité xylanase sans cellulase

Dans l'industrie du papier, la contamination des préparations de xylanase par la cellulase est un problème dans le processus de blanchiment, les xylanases utilisées doivent être dépourvues d'activité cellulasique pour éviter d'endommager la pâte de cellulose (Kumar *et al.*, 2010). La xylanase dégrade le xylane, ce qui rompt le lien entre la cellulose et la lignine, une fois que la lignine est détachée de la cellulose, elle est facilement éliminée lors des étapes de blanchiment ultérieures (Shrinivas *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2016). La xylanase de *Bacillus sp.* RTS11 a une très faible activité cellulasique (1,87 U), et pourrait donc être

impliqué dans le blanchiment du papier. Selon Subramaniyan et Prema, (2002), les quantités négligeables de cellulases permettent aux xylanases de produire des pâtes de bonne qualité avec des dommages minimes à la cellulose, et cette activité peut être attribuée à la présence de domaines de liaison à la cellulose dans les xylanases.

4.11. Purification enzymatique

4.11.1. Purification par la méthode de TPP

Le partitionnement en trois phases permet la précipitation de biomolécules dans une solution aqueuse en mélangeant l'extrait protéique brut avec un sel solide principalement du sulfate d'ammonium $(NH_4)_2SO_4$, et avec un solvant organique qui est généralement du tert-butanol (Gagaoua et Hafid, 2016). L'ajout du solvant organique en présence du sel pousse la protéine hors de la solution pour former une couche interfaciale entre la couche aqueuse inférieure et la couche organique supérieure (Ketnawa *et al.*, 2014). Après centrifugation, les protéines sont sélectivement séparées dans une phase, tandis que les contaminants tels que les pigments et les lipides sont transférés dans les autres phases, la phase organique supérieure contenant les composés non polaires (pigments, lipides), tandis que la phase aqueuse inférieure contient les composés polaires (protéines, hydrates de carbone), si la protéine est présente dans la phase aqueuse, elles peuvent se séparer dans une troisième phase intermédiaire entre la phase aqueuse inférieure et la phase supérieure de *t*-butanol (Ravindran et Jose, 2014; Rajendran *et al.*, 2022). Environ 25 enzymes et protéines ont été isolées par divers travaux à l'aide du TPP (Dennison et Lovrien, 1997). Cette technique a été utilisée dans notre étude pour purifier la xylanase de *Bacillus sp.* RTS11.

4.11.1.1. Optimisation de la concentration de sulfate d'ammonium

La solubilité des protéines dépend de la concentration en sel dans la solution, la saturation en sel est d'une importance cruciale et joue un rôle majeur dans la TPP, le sulfate d'ammonium, $(NH_4)_2SO_4$, est le sel le plus largement utilisé parce qu'il est économique, facilement disponible, stabilise les protéines, et en raison de sa grande solubilité (Gagaoua *et al.*, 2014). L'influence de la saturation en $(NH_4)_2SO_4$ a été étudiée, en maintenant le rapport entre l'extrait brut et le *t*-butanol (1:1), avec un pH 7, et en variant la saturation en $(NH_4)_2SO_4$ de 30% à 80%, Nous avons constaté que lorsque la concentration en sel passait de 30% à 70%, la récupération de l'activité enzymatique augmentait pour atteindre une activité maximale. Au-delà de 70%, l'augmentation de la concentration de sel influençait négativement le processus de séparation (Tableau 31).

Tableau 31: Optimisation de la concentration de sulfate d'ammonium pour la purification de la xylanase par la méthode TPP.

Sulfate d'ammonium	Xylanase (U)
30%	51.09
40%	51.79
50%	67.38
60%	73.62
70%	82.98
80%	77.99

4.11.1.2. Optimisation de *t*-butanol

L'utilisation de différents alcools tels que le n-propanol, le n-butanol, l'isobutanol et le *t*-butanol dans la technique TPP affectera le rendement en protéines, le *t*-butanol est considéré comme le meilleur solvant pour la TPP, car il peut facilement se lier aux protéines (Chew *et al.*, 2019). Le *t*-butanol ne provoque pas la dénaturation de l'enzyme, car il est incapable de pénétrer dans la structure repliée de la protéine en raison de sa taille moléculaire plus importante (Gagaoua et Hafid, 2016). Des solvants tels que l'éthanol ou le méthanol n'ont pas pu former les trois phases, contrairement au *t*-butanol qui est capable de les former, il augmente la flottabilité de la protéine précipitée en se liant à elle, de sorte qu'elle flotte au-dessus de la couche de sel aqueux (Ketnawa *et al.*, 2017). Pour déterminer le meilleur rapport extrait brut:*t*-butanol, la saturation en sulfate d'ammonium a été fixée à 70% (*v/v*), avec un pH 7, en faisant varier le rapport extrait brut/*t*-butanol de 1:0,5 à 1:2 (*v/v*). La plus forte activité enzymatique a été obtenue avec un rapport extrait brut:*t*-butanol de 1:1,75 (Tableau 32).

Tableau 32. Optimisation du rapport extrait brut:*t*-butanol utilisé dans la méthode TPP.

Extrait brut:*t*-butanol	Xylanase (U)
1 :0.5	62.11
1 :0.75	71.25
1 :1	80.72
1 :1.25	82.04
1 :1.5	87. 31
1 :1.75	91.19
1 :2	82.66

4.11.1.3. Optimisation de pH

Une autre étape de purification de protéines par la méthode de TPP était la détermination de l'effet du pH de réaction, la répartition des protéines sont considérablement affectées par le pH en raison des interactions électrostatiques entre les phases et les protéines chargées (Özer *et al.*, 2010 ; Chew *et al.*, 2019). 70% de sulfate d'ammonium avec un rapport extrait brut:*t*-butanol de 1:1,75 ont été utilisés. Différent pH variant de 5 à 10 ont été testées, L'activité enzymatique augmente progressivement lorsque le pH du milieu passe de 5 à 9, puis diminue si le pH continue à augmenter (Tableau 33).

Tableau 33. Optimisation de pH pour la purification de la xylanase par la méthode de TPP.

pH	Xylanase (U)
5	77.38
6	79.61
7	82.55
8	102
9	109
10	105.72

En combinant les paramètres optimisés, à savoir 70% de sulfate d'ammonium, un pH de 9 et un rapport extrait brut/butanol de 1:1,75, et en terminant par la dialyse, un facteur de purification de 0,34 et un rendement de récupération de 22,93% ont été obtenus. La présence de nombreuses bandes de protéines indique l'absence de purification significative. L'une des raisons les plus importantes de la diminution de l'activité enzymatique dans les solvants organiques est la réduction de la flexibilité structurelle (Li *et al.*, 2020).

La séparation en trois phases (TPP) a été utilisée avec efficacité pour purifier l'exo-polygalacturonase d'*Aspergillus sojae* ATCC 20235 (Dogan et Tari, 2008), α-galactosidase d'*Aspergillus oryzae* (Dhananjay et Mulimani, 2009), tandis qu'elle a été utilisée pour purifier partiellement la xylanase et la pectinase d'*Aspergillus niger* (Sharma et Gupta, 2001; Roy *et al.*, 2004), et laccase de *Ganoderma sp.* WR-1 (Rajeeva et Lele, 2011). Dhananjay et Mulimani, (2009) ont trouvé que les conditions optimales de TPP pour purifier l'α-galactosidase étaient 30% de sulfate d'ammonium, avec un ratio 1:1 de *t*-butanol:extrait brut. Vetal et Rathod, (2016), ont purifié une peroxydase par la méthode TPP, avec 50% de sulfate d'ammonium, pH 6, un rapport bouillon:*t*-butanol de 1:1,5 (*v/v*). Les paramètres optimaux de

purification de la cellulase étaient une saturation en sulfate d'ammonium à 40% avec un rapport extrait brut:butanol de 1:1 (v/v) (Duman *et al.*, 2020).

4.11.2. La purification par le protocole chromatographique

L'activité de la xylanase a atteint son maximum (448,89 U) après 30 heures d'incubation. L'enzyme dans l'extrait brut a été récoltée et purifiée jusqu'à l'obtention d'une pureté homogène en utilisant une procédure chromatographique en trois étapes principales (précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie par filtration sur gel, et chromatographie par échange d'anions). Un résumé des procédures de purification est présenté dans le tableau 34. L'extrait brut a d'abord été soumis à une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium (30-80%), la précipitation la plus élevée était obtenue avec une saturation en sulfate d'ammonium de 70%, Le culot recueilli a ensuite été dissous dans un volume minimal de tampon phosphate (pH 7) et dialysé. Ensuite, le dialysat a été soumis à une chromatographie par filtration sur gel (Sephadex-G50). Le profil d'élution des protéines et l'activité xylanase correspondante sont présentés à la figure 65. Deux pics de protéines ont été élués, le premier pic principal montrant une activité xylanase (Figure 65).

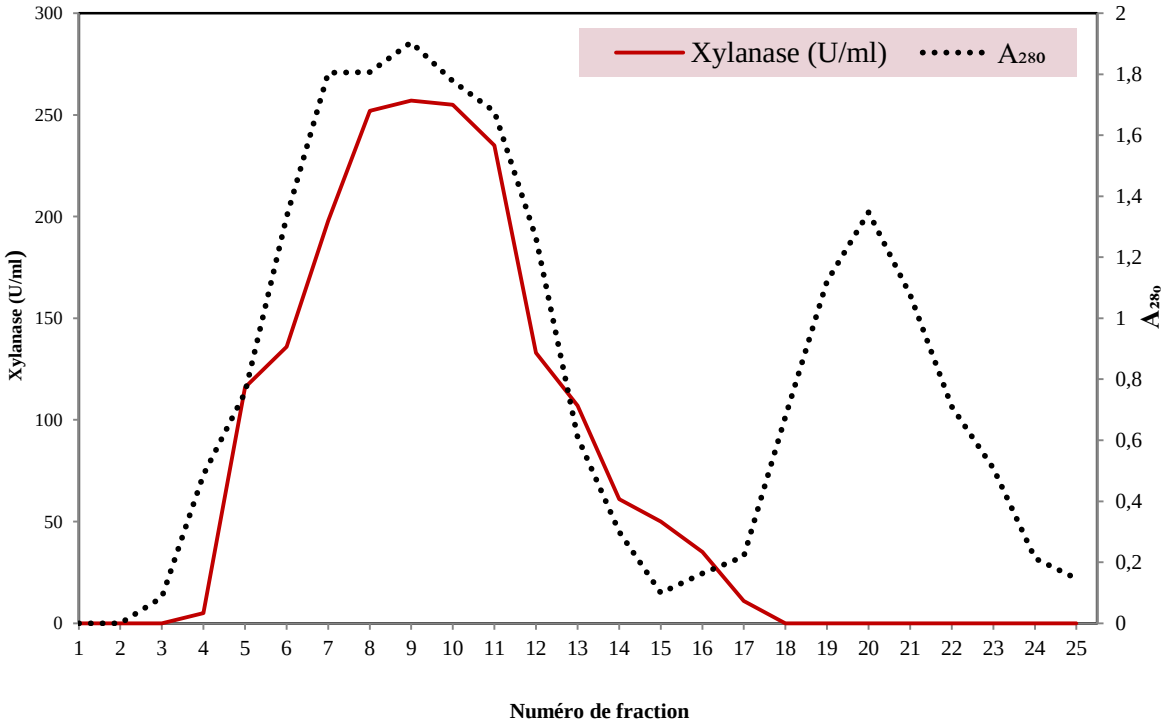


Figure 65. Purification de la xylanase par chromatographie de filtration sur gel.

Les fractions issues de la chromatographie de filtration sur gel qui présentaient une activité xylanase ont été regroupées, concentrées, et soumises à une chromatographie d'échange d'anions. Le tampon phosphate, pH 8, a été utilisé comme tampon d'élution. Les fractions éluées avec 0,4 M NaCl ont montré l'activité enzymatique la plus élevée. On constate qu'un seul pic protéique présentant une activité xylanase a été obtenu (Figure 66). Après la dernière étape de purification, l'enzyme a été purifiée 8,28 fois avec une activité spécifique de 4155,97 U/mg et un rendement de 59,67%.

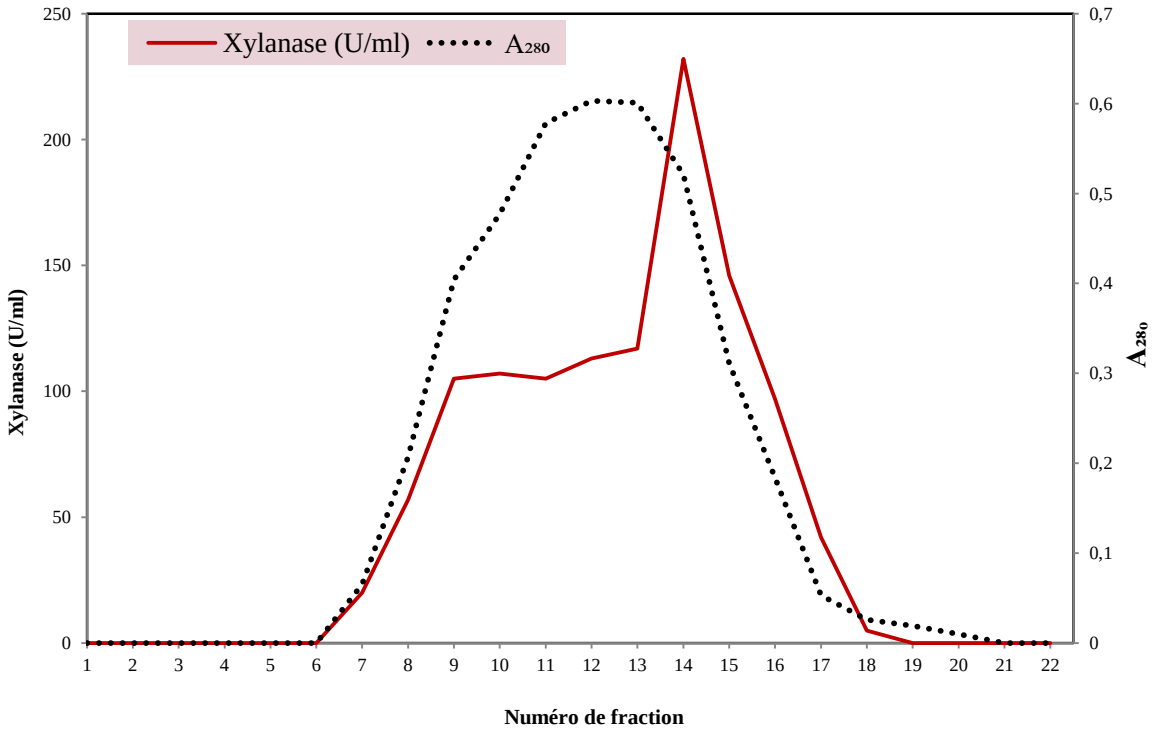


Figure 66. Purification de la xylanase par chromatographie échangeuse d'anions.

Plusieurs xylanase ont été purifiés par chromatographie échangeuse d'anions tels que la xylanase de *Bacillus pumilus* VLK-1 (Kumar *et al.*, 2014), *Bacillus pumilus* B20 (Geetha et Gunasekaran, 2017), *Bacillus pumilus* GESF1 (Menon *et al.*, 2011), *Bacillus arseniciselenatis* DSM 15340 (Kamble et Jadhav, 2012), *Bacillus subtilis* ASH (Sanghi *et al.*, 2010), *Bacillus sp.*YJ6 (Yin *et al.*, 2010), *Trichoderma harzianum* (Dhaver *et al.*, 2022), *Aspergillus flavus* AUMC 10331 (Moubasher *et al.*, 2019), et *Aspergillus fumigatus* (Amir *et al.*, 2013). Alors que d'autres xylanases ne nécessitent qu'une chromatographie de filtration sur gel pour être purifiées, comme la xylanase d'*Aspergillus fumigatus* R1 (Deshmukh *et al.*, 2016), *Anoxybacillus kamchatkensis* NASTPD13 (Yadav *et al.*, 2018), et *Trichoderma inhamatum* (Silva *et al.*, 2015).

Tableau 34. Rendement de purification de la xylanase de *Bacillus sp.* RTS11.

Les étapes de purification	Activité (U)	Protéines (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Purification (facteur)	Rendement (%)
L'extrait brut	466.61	0.930	501.73	1	100
Le sulfate d'ammonium	391.46	0.636	615.30	1.22	83.89
Sephadex G-50	302.57	0.245	1234.97	2.46	64.84
DEAE-Sepharose	278.45	0.067	4155.97	8.28	59.67
TPP	107	0.613	174.55	0.34	22.93

La pureté des échantillons, aux diférents stades de la purification est vérifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Figure 67, Annexe 4b). Une seule bande est apparue au niveau de la sous-unité 6 récupérée par chromatographie d'échange d'anions, dont la masse moléculaire apparente est de 60 kDa. Cette valeur est similaire à celles observées pour la xylanase purifiée à partir de *B. pumilus* (Poorna, 2012). D'autres xylanases provenant de *B. pumilus* (Kapilan et Arasaratnam, 2014), *B. circulans* (Yang *et al.*, 1989), *Bacillus sp.* ASX42 (Köstekçi *et al.*, 2022) avaient des poids moléculaires de 55,4 kDa, 59 kDa, 66 kDa, respectivement.

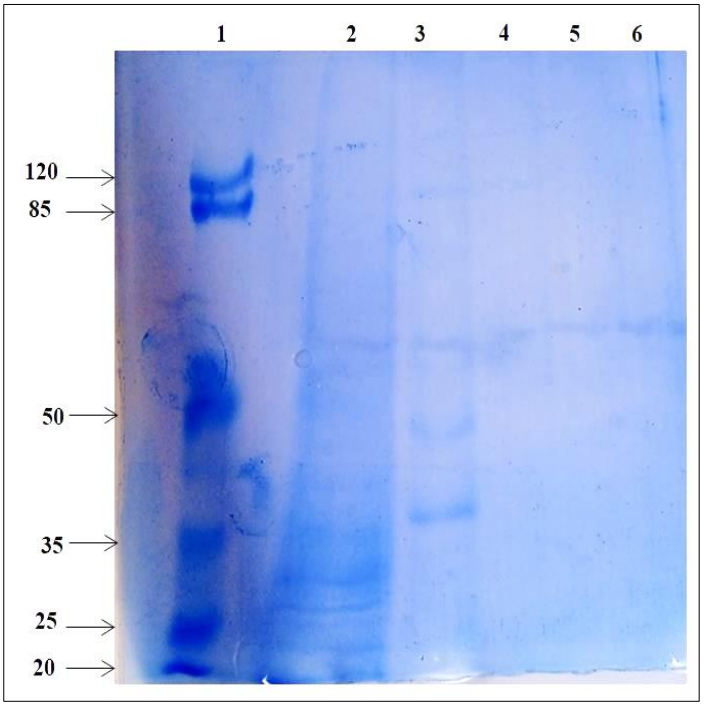


Figure 67. Analyse SDS-PAGE de la xylanase purifiée de *Bacillus sp.* RTS11. Ligne 1. Standards de poids moléculaire. Ligne 2. Échantillon de l'extrait brut. Ligne 3. Protéine fractionnée au sulfate d'ammonium. Ligne 4. Protéines issues de la chromatographie par filtration sur gel. Ligne 5-6. Protéines purifiées par chromatographie d'échange d'anions.

4.12. Caractérisation biochimique de la xylanase purifiée

4.12.1. Effet de pH sur l'activité et la stabilité de xylanase

L'enzyme xylanase a été incubée à différents pH (6-11) à 30°C, l'activité résiduelle a été mesurée (Figure 68a). L'activité enzymatique optimale a été observée à un pH 9, suivi d'un pH 10. Une chute brutale de l'activité a été observée à des pH 4, 5, 6 et 11, tandis qu'à pH 12, une perte totale d'activité a été observée. Comparativement, le pH optimal observé pour la xylanase de *Bacillus sp.* RTS11 est similaire à celui des xylanases d'*Anoxybacillus kamchatkensis* NASTPD13 (Yadav *et al.*, 2018), *Bacillus sp.* AR-009 (Gessesse, 1998), *Bacillus sp.* 41M-1 (Nakamura *et al.*, 1993), *Bacillus pumilus* (Kapilan et Arasaratnam, 2010), et *Bacillus amyloliquefaciens* SK-3 (Kumar *et al.*, 2017).

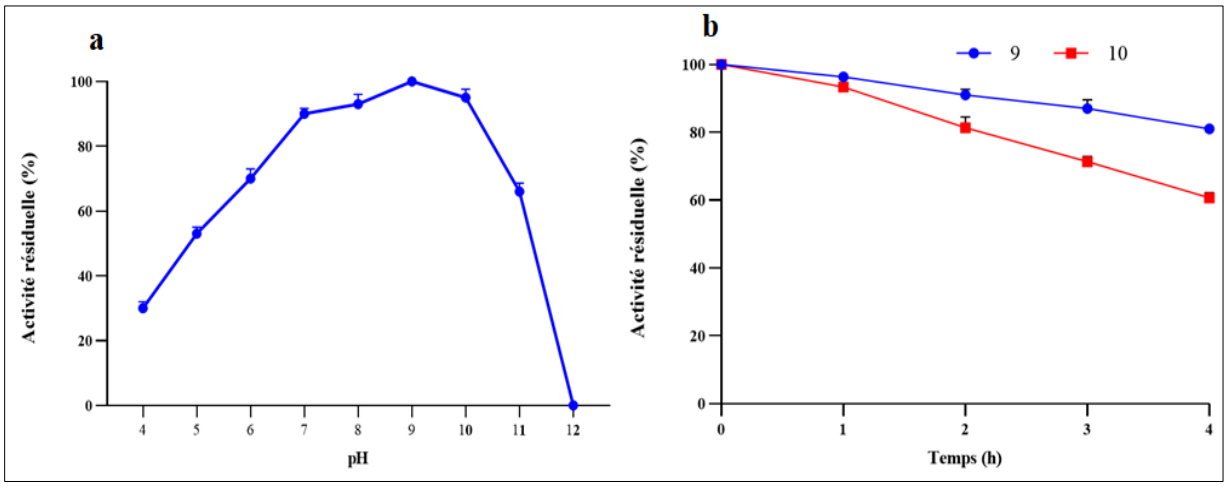


Figure 68. Effet du pH sur la xylanase, (a): effet sur l'activité; (b): Effet sur la stabilité

L'effet du pH sur la stabilité de la xylanase purifiée a été étudié en maintenant l'enzyme dans des tampons avec pH 9 et 10 pendant 4 h, puis en déterminant l'activité résiduelle. Après 4 heures d'incubation à pH 9, plus de 80% de l'activité initiale a été récupérée (Figure 68b), tandis que l'incubation de l'enzyme à un pH 10 a entraîné une perte de 39% de l'activité initiale après 4 h. La xylanase extraite de *B. pumilus* SV-205 était très stable dans une large gamme de pH (6-11) avec une récupération de 100% de l'activité originale après 24 h d'incubation (Nagar *et al.*, 2013). La xylanase de *Fusarium oxysporum* a perdu 45% de son activité initiale à pH 9 après 24 h (Christakopoulos *et al.*, 1996). L'enzyme xylanase sécrétée par *B. amyloliquefaciens* SK-3 a montré une bonne stabilité, avec une récupération de 85% de l'activité après 2 h d'incubation à pH 9 à 50°C. (Kumar *et al.*, 2017). Dans le processus industriel de bioblanchiment, l'utilisation de xylanases d'origine fongique nécessite l'ajustement de pH du milieu dans la gamme neutre pour se rapprocher des optima

de pH des xylanases fongiques qui ont une activité optimale dans la gamme acide/neutre, cependant, par l'utilisation des xylanases actives dans des gammes de pH alcalins, l'étape d'ajustement de pH n'est plus nécessaire (Kumar et Satyanarayana, 2013).

4.12.2. Effet de la température sur l'activité et la stabilité de la xylanase

L'effet de températures (30°C à 80°C) sur l'activité de la xylanase purifiée est illustré dans la figure 69. La température optimale pour l'enzyme est 60°C. Au fur et à mesure que la température augmente au-dessus de 60°C, l'activité de l'enzyme est affectée négativement et diminue progressivement. L'inactivation à haute température de la xylanase étudiée peut être due à l'hydrolyse de la chaîne peptidique, à une conformation incorrecte, ou à la destruction d'acides aminés (Farag *et al.*, 2016). Ce résultat a également été obtenu pour les xylanases produites par *Bacillus subtilis* (Guo *et al.*, 2012), *Bacillus sp.* AR-009 (Gessesse et Gashe, 1997), *Bacillus tequilensis* BT21 (Khandeparker *et al.*, 2017), *Bacillus subtilis* cho40 (Khandeparker *et al.*, 2011), et *Bacillus licheniformis* (Raj *et al.*, 2018).

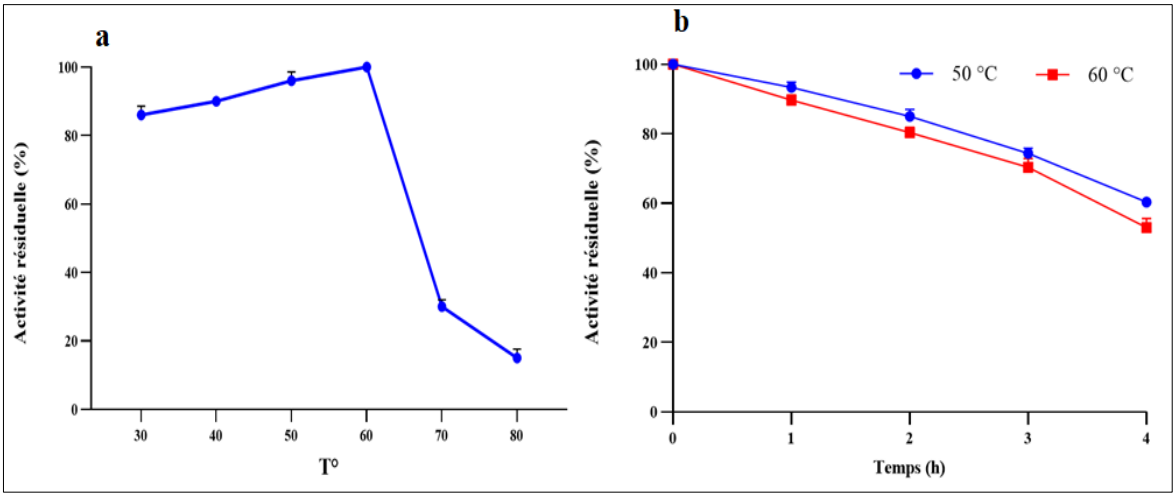


Figure 69. Effet du T° sur la xylanase, (a): effet sur l'activité; (b): Effet sur la stabilité

La xylanase de *Bacillus sp.* RTS11 a conservé >50% et 60% de son activité après 4 heures d'incubation à 60°C et 50°C, respectivement (Figure 69b). D'autres xylanases étaient thermostables à 60°C, comme les xylanases d'*Alicyclobacillus sp.* A4, et de *Bacillus pumilus* SV-85S, qui ont conservé plus de 90% et 50% de leur activité initiale après 1h d'incubation à 60°C, respectivement (Bai *et al.*, 2010; Nagar *et al.*, 2012). 70% d'activité à été retenue à 60°C aprés 30 min pour la xylanase de *Bacillus mojavensis* AG137 (Akhavan Sepahy *et al.*, 2011). La stabilité à 60°C pendant 4 h d'incubation avec une récupération de 51%, 94,3% et 70% de l'activité initiale a été enregistrée pour la xylanase de *Bacillus tequilensis* ARMATI,

Bacillus licheniformis, et *Thermomyces lanuginosus,* respectivement (Kutasi *et al.*, 2001**;** Bajaj et Manhas, 2012; Khusro *et al.*, 2016). La xylanase de *Bacillus circulans* AB16 a conservé 100% de son activité à 60°C, pH 9 après 2 h d'incubation (Dhillon et Khanna, 2000).

4.12.3. Effet des ions métalliques sur l'activité de la xylanase

L'effet de différents ions sur l'enzyme xylanase est illustré dans la figure 70. La xylanase ne requiert aucun ion spécifique pour son activité. Les ions Fe^{+2}, Mn^{+2}, Mg^{+2} stimulent légèrement l'activité enzymatique. Les ions Ca^{+2}, Na^{+}, K^{+} se sont révélés inertes, ne présentant aucun effet sur l'activité enzymatique. Une diminution de l'activité de la xylanase a été détectée en présence de Zn^{+2}, Co^{+2}, Cu^{+2}, tandis que le Hg^{+2} était un inhibiteur efficace de l'activité enzymatique. L'inhibition par le Hg^{+2} semble être une propriété générale des xylanases (Nagar *et al.*, 2013). Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par d'autres recherches concernant l'effet du Mg^{+2} (Jalal *et al.*, 2009), Co^{+2}, Cu^{+2} (Ratanakhanokchai *et al.*, 1999), Mn^{+2} (Kumar *et al.*, 2017), Mn^{+2}, Fe^{+2} (Patel et Dudhagara, 2020), Cu^{+2}, Mn^{+2} (Kiddinamoorthy *et al.*, 2008), Hg^{+2} (Menon *et al.*, 2011), Zn^{+2} (Adhyaru *et al.*, 2014), Zn^{+2}, Co^{+2}, Cu^{+2} (Zhang *et al.*, 2010), Na^{+} (Ayyachamy et Vatsala, 2007), K^{+} (Kumar et Satyanarayana, 2013). L'ajout de tensioactifs tels que Triton X-100, Tw 20, Tw 80, a légèrement augmenté l'activité de la xylanase (Figure 71), un effet similaire a été observé pour la xylanase de *Streptomyces sp.* (Rosmine *et al.*, 2018).

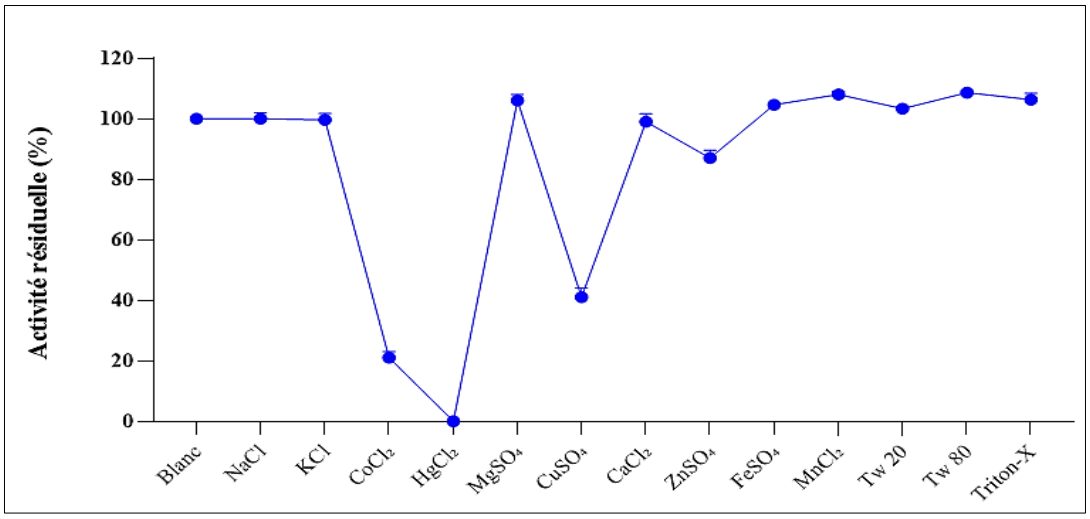


Figure 70 : Effet des ions métalliques sur l'activité de la xylanase purifiée.

4.13. La spécificité du substrat

La spécificité de la xylanase vis-à-vis de différents substrats est présentée dans le tableau 35. La xylanase a montré une forte activité hydrolytique sur les xylanes de différentes sources, avec une faible activité sur la CMC, et sans aucune activité sur l'amidon et la pectine. La xylanase de *Bacillus sp.* RTS11 hydrolyse efficacement les xylanes, ce qui suggère que le domaine de liaison au substrat de la xylanase a une forte affinité pour le xylane, en particulier celui du bois de bouleau, qui peut être dû à des différences dans la structure des polymères de xylane (Dhaver *et al.*, 2022).

Tableau 35. Spécificité relative de la xylanase vis-à-vis de différents substrats.

Substrat	Activité résiduelle (%)
Xylane de bouleau	100
Xylane d'épi de maïs	79
CMC	0.27
Amidon	0
Pectine	0

4.14. Application de la xylanase purifiée

4.14.1. Bio-blanchiment de la pâte à papier

Afin que la pâte puisse subir un bio-blanchiment, la dose de xylanase, la consistance de la pâte, et le temps d'incubation enzyme-substrat ont été optimisés. La libération des sucres réducteurs a augmenté avec la dose d'enzyme (Figure 71a) et le temps de traitement (Figure 71c). La teneur en sucres réducteurs libérés était de 0,165 mg/mL, 0,211 mg/mL, 0,177 mg/Ml et 0,164 mg/mL à 3%, 5%, 10% et 20% de consistance, respectivement (Figure 71b). Pour conclure, la xylanase de *Bacillus sp.* RTS11 est la plus active après un traitement de 4 heures à 60°C, pH 9, en utilisant une dose d'enzyme de 30 U/g de pâte, avec une consistance de 5%.

L'application de xylanases pour améliorer le blanchiment de la pâte a été décrite par plusieurs chercheurs, la xylanase de *Bacillus pumilus* ASH a été utilisée à une dose 5 UI par gramme de pâte séche, à un pH 7, et à une température de 60°C, pendant 180 min (Garg *et al.*, 2012). La bio-blanchiment de la pâte kraft avec la xylanase de *Bacillus pumilus* SV-85S a été maximale à une dose enzymatique de 10 UI/g de pâte, pH 9, 55°C, pendant 120 min d'incubation (Nagar *et al.*, 2012). La stimulation de blanchiment de la pâte Kraft à l'aide de la

xylanase de *Bacillus subtilis* a été obtenue à 55°C après un traitement de 3 h (Saleem *et al.*, 2012). L'activité de blanchiment maximale avec la xylanase de *Paenibacillus campinasensis* BL11 a été obtenue après 4 heures de traitement à pH 9, 65°C, avec une dose enzymatique de 2,5 UI/g de pâte à papier séchée au four (Ko *et al.*, 2010).

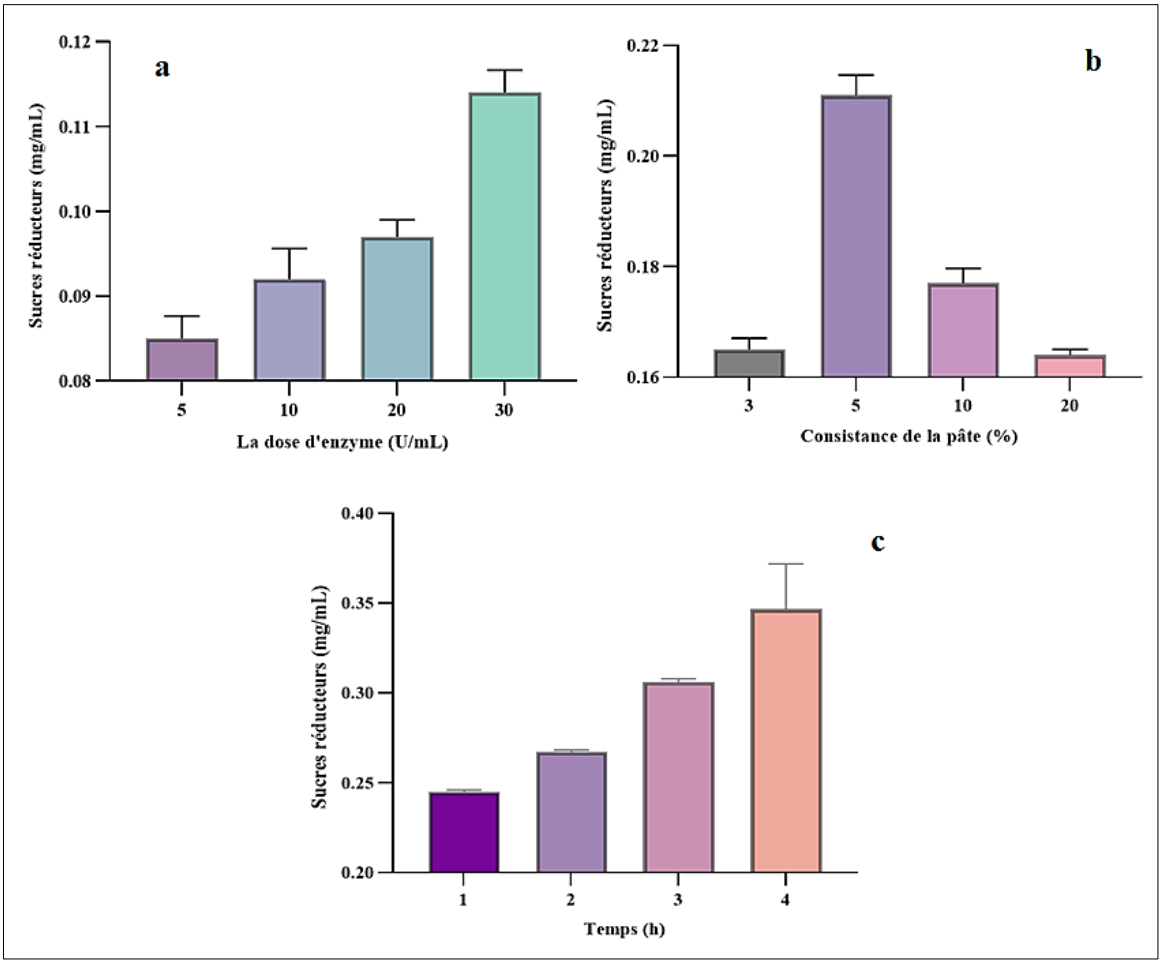


Figure 71. Optimisation de la dose de xylanase (a), la consistance de la pâte (b), et le temps de traitement (c) pour le blanchiment enzymatique de la pâte à papier à 60°C, pH 9.

La libération de sucres réducteurs, de composés phénoliques, et de composés hydrophobes sont présentés dans le tableau 36. Le traitement enzymatique a entraîné une augmentation de la quantité de sucres réducteurs libérés dans le milieu par rapport au témoin, ce qui indique l'action efficace de la xylanase sur la pulpe. La libération de composés phénoliques et hydrophobes associée à la libération de sucres réducteurs suggère la dissociation du complexe lignine-glucides des fibres de pâte sous l'effet de l'activité enzymatique (Kumar *et al.*, 2017). Kamble et Jadhav, (2012) ont rapporté que la libération de chromophore en corrélation avec la libération de sucre peut être considérée comme une

méthode simple pour déterminer l'efficacité du traitement enzymatique. Plusieurs autres rapports soutiennent également l'utilisation de la xylanase dans la biotechnologie de la pâte à papier, en exploitant diverses xylanases bactériennes et fongiques, y compris la xylanase de *Bacillus pumilus* ASH (Garg *et al.*, 2012), de *Bacillus licheniformis* Alk-1 (Raj *et al.*, 2018), de *Cellulosimicrobium cellulans* CKMX1 (Walia *et al.*, 2015), de *Bacillus pumilus* SV-205 (Nagar et Gupta, 2021), et de *Aspergillus sydowii* SBS 45 (Nair *et al.*, 2010).

Le traitement enzymatique dans le blanchiment de la pâte pourrait être utilisé pour ces raisons:

- Le xylane, qui a précipité sur la lignine en raison de l'abaissement du pH à la fin de la phase de cuisson de la pâte, peut être éliminé sous l'action de la xylanase et rendre les produits chimiques de blanchiment plus accessibles aux fibres de la pâte (Sridevi *et al.*, 2016).
- La lignine forme des liaisons complexes avec le xylane, certaines liaisons se sont révélées résistantes aux alcalis et ne peuvent pas être hydrolysées au cours du processus de kraf, la xylanase agit en coupant les liaisons restantes entre la lignine et le xylane (Sridevi *et al.*, 2016).
- Les composés phénoliques de la lignine sont à l'origine de la couleur brune de la pâte du papier non blanchis, et doivent être éliminés pour obtenir du papier blanc, la xylanase hydrolyse les chaînes de xylanes responsables de l'adhésion étroite des fibres lignifiées au réseau de cellulose, et réduit ainsi la nécessité d'utiliser des produits chimiques pour éliminer la lignine (Saleem *et al.*, 2012), étant donné que la xylanase dégrade la chaîne de xylane dans la pâte non blanchie, les chromophores associés à la lignine pourrait être plus facilement éliminé (Ko *et al.*, 2010).

Tableau 36. Effet de traitement enzymatique sur les propriétés physicochimiques de la pulpe à 60°C, pH 9, après 4 h.

Paramètres	Contrôle	Xylanase
Composés hydrophobes (A_{465})	0.11	0.39
Composés chromophores (A_{237})	0.37	1.106
Sucres réducteurs (mg/mL)	0.09	0.323

Afin de préparer des feuilles manuelles, les papiers récupérés par filtration ont été préssés entre deux papiers alluminium, et séchés au four jusqu'à obtention d'un poids constant, les résultats sont présentés dans la figure 72, Les papiers traités à la xylanase ont produit une feuille plus claire, plus uniforme, plus régulière et plus lisese que les papiers témoins traités à l'eau distillée.

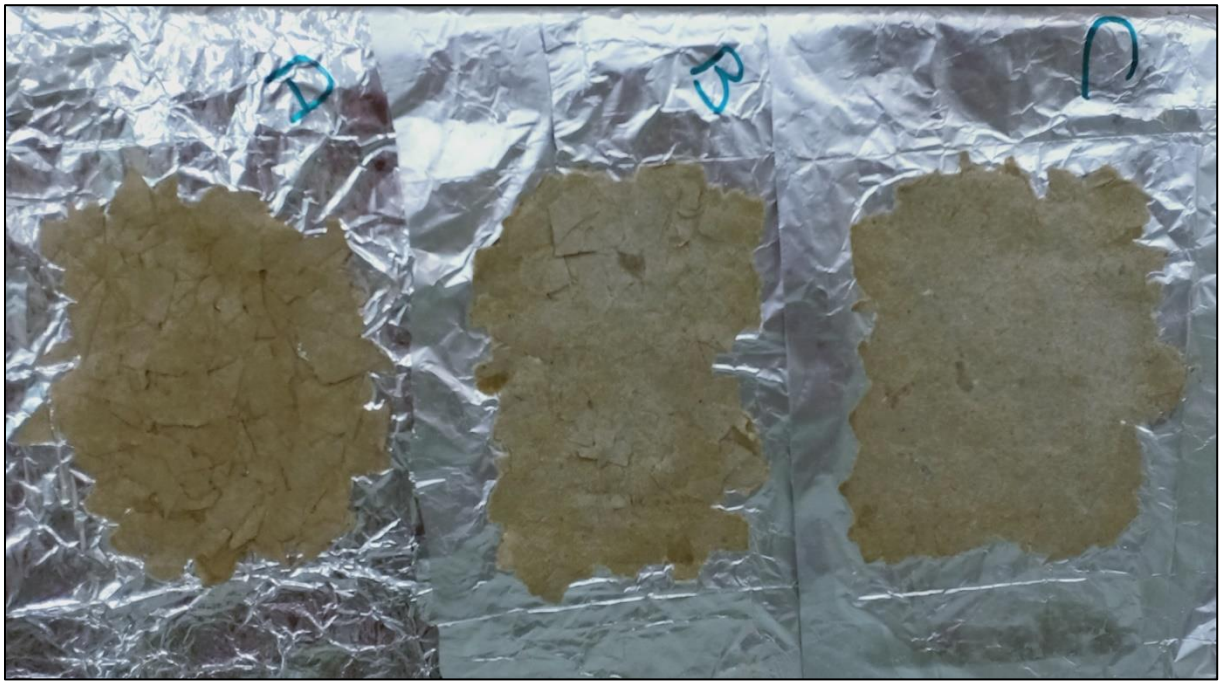


Figure 72. Les feuilles manuelles préparés à partir de papiers traités à : A. Eau distillé, B. Extrait brut, C. La xylanase.

4.14.2. Capacités hydrolytiques de la xylanase purifiée

Des expériences d'hydrolyse de plusieurs résidus agro-industriels ont été réalisées dans des conditions optimales (60°C, pH 9) à l'aide de l'enzyme purifiée. Dans cette expérience, la xylanase purifiée a libéré 1,79 mg/mL de sucres réducteurs en utilisant du xylane de bouleau (qui sert de contrôle), et à libéré 0,908 mg/mL, 0,833 mg/mL, 0,674 mg/mL, 0,626 mg/mL, 0,42 mg/mL de sucres réducteurs à partir de son de blé, déchets de raisin, paille de blé, bagasse de canne à sucre, et sciure de bois, respectivement. Cependant, une petite quantité de sucres a été libérée en utilisant les noyaux d'abricots (0,19 mg/mL) et les déchets de tomates (0,093 mg/mL) (Figure 73). Ces capacités de conversion sont très importantes en raison de l'intérêt croissant des procédés biotechnologiques utilisant les résidus lignocellulosiques, qui sont peu coûteux, renouvelables, riches en hémicelluloses et constituent les principaux substrats potentiels pour la production de biomolécules utiles, en particulier les produits

chimiques organiques et les solvants (Heck *et al.*, 2006). L'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique par les cellulases et les hémicellulases est essentielle pour la conversion efficace de la biomasse lignocellulosique en carburant, les hydrolysats enzymatiques produits par ces enzymes ont également été exploités comme substrats pour la production de produits utiles y compris des produits chimiques (polyphénol, acides organiques) et des solvants (acétone, butanol) (Kang *et al.*, 2004).

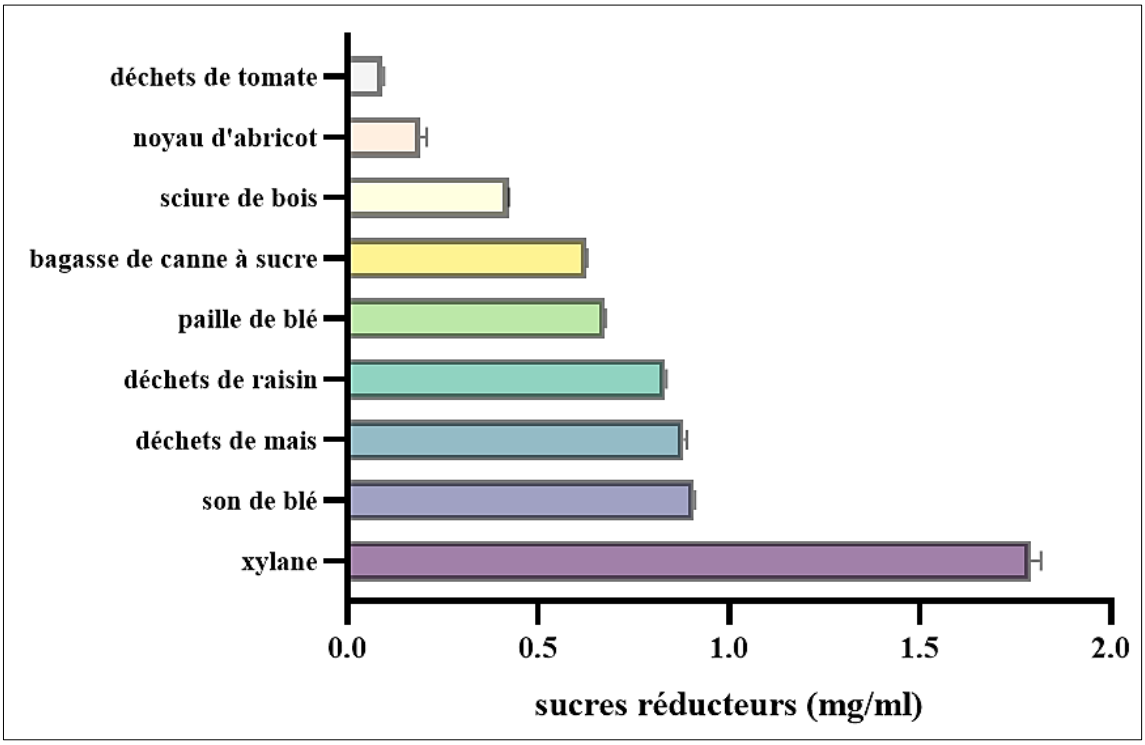


Figure 73. L'hydrolyse des résidus d'agricultures par la xylanase purifiée.

Conclusion

Notre étude montre la possibilité de mettre à profit les environnements désertiques oligotrophes en vue de construire une vaste collection de souches bactériennes dotées d'activités enzymatiques différenciées. Dans cette étude, nous avons identifié deux souches bactériennes qui appartiennent au genre *Bacillus* et qui présentaient les deux plus fortes activités de chitinase et de xylanase. La création de milieux de culture optimaux pour les deux enzymes a été réalisée à l'aide de méthodologies statistiques de Plackett-Burman et Box-Behnken, qui ont considérablement fait augmenter la production enzymatique. La purification des deux enzymes a été effectuée à l'aide de la chromatographie échangeuse d'anions, la xylanase et la chitinase purifiées ont montré des masses moléculaires apparentes de 60 et 31 kDA, respectivement. La xylanase présentait un caractère thermophile et alcalophile avec une activité optimale à pH 9 et 60°C, tandis que la chitinase avait une activité optimale à pH 5 et 40°C. La chitinase purifiée peut être utilisée comme biofongicide et bioinsecticide, en raison de sa propriété de réduire la propagation de l'espèce fongique *Fusarium graminearum* et donc son aptitude à accroître le taux de mortalité de l'insecte ravageur du blé entreposé, *Sitophilus granarius* Linnaeus. En outre, la xylanase a démontré sa capacité catalytique sur divers déchets agricoles, ce qui souligne la faisabilité de son utilisation dans les processus de recyclage. Nos résultats suggèrent également que cette enzyme peut être impliquée dans le processus de bioblanchiment du papier, contribuant ainsi à des procédés plus respectueux de l'environnement. En conclusion, notre étude a permis non seulement d'identifier et d'optimiser l'activité des xylanases et des chitinases, mais aussi de mettre en évidence leur purification, leur caractérisation et leurs différentes capacités catalytiques, témoignant ainsi de l'utilisation potentielle de ces enzymes dans divers secteurs biotechnologiques.

Références bibliographiques

Abada, E.A., Elbaz, R.M., Sonbol, H., and Korany, S.M. (2021) Optimization of Cellulase Production from *Bacillus albus* (MN755587) and Its Involvement in Bioethanol Production. *Pol J Environ Stud* **30**: 2459–2466.

Abd-Elhalim, B., El-Sawy, M., Rawia, F.G., and Abou-Taleb, K. (2015) Production of amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* under submerged fermentation using some agro-industrial by-products. *Annals of Agricultural Science* **60**.

Abedi, E., Fatemi, F., Sefidbakht, Y., and Siadat, S.E.R. (2021) Development and characterization of a thermostable GH11/GH10 xylan degrading chimeric enzyme. *Enzyme and Microbial Technology* **149**: 109854.

Abidin, Z., Malek, N., Zainuddin, Z., and Khan Chowdhury, A.J. (2015) Selective isolation and antagonistic activity of actinomycetes from mangrove forest of Pahang, Malaysia. *Frontiers in Life Science* **9**: 1–8.

Abu-Tahon, M.A., and Isaac, G.S. (2020) Anticancer and antifungal efficiencies of purified chitinase produced from *Trichoderma viride* under submerged fermentation. *J Gen Appl Microbiol* **66**: 32–40.

Adams, D.J. (2004) Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology (Reading)* **150**: 2029–2035.

Adhyaru, D.N., Bhatt, N.S., and Modi, H.A. (2014) Enhanced production of cellulase-free, thermo-alkali-solvent-stable xylanase from *Bacillus altitudinis* DHN8, its characterization and application in sorghum straw saccharification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **3**: 182–190.

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

Aida, F.M., Al-Nusarie, S., and Taghreed, S. (2014) Production, optimization, characterization and antifungal activity of chitinase produced by *Aspergillus terrus*. *ajb* **13** https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/118708. Accessed March 6, 2024.

Akeed, Y., Atrash, F., and Naffaa, W. (2020) Partial purification and characterization of chitinase produced by *Bacillus licheniformis* B307. *Heliyon* **6**: e03858.

Akhavan Sepahy, A., Ghazi, S., and Akhavan Sepahy, M. (2011) Cost-Effective Production and Optimization of Alkaline Xylanase by Indigenous *Bacillus mojavensis* AG137 Fermented on Agricultural Waste. *Enzyme Res* **2011**: 593624.

Aktas, C., Ruzgar, D., Gurkok, S., and Gormez, A. (2023) Purification and characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* chitinase with antifungal and insecticidal properties. *Prep Biochem Biotechnol* **53**: 797–806.

Aktuganov, G.E., Galimzyanova, N.F., Melent'ev, A.I., and Kuz'mina, L.Yu. (2007) Extracellular hydrolases of strain *Bacillus sp.* 739 and their involvement in the lysis of micromycete cell walls. *Microbiology* **76**: 413–420.

Alcántara, A.R., Hernaiz, M.-J., and Sinisterra, J.-V. (2011) 3.28 - Biocatalyzed Production of Fine Chemicals. In *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*. Moo-Young, M. (ed.). Academic

Press, Burlington. pp. 309–331 https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080885049002257. Accessed May 9, 2024.

Ali, S., Ganai, B.A., Kamili, A.N., Bhat, A.A., Mir, Z.A., Bhat, J.A., *et al.* (2018) Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research* **212–213**: 29–37.

Aliabadi, N., Aminzadeh, S., Karkhane, A.A., and Haghbeen, K. (2016) Thermostable chitinase from *Cohnella sp.* A01: isolation and product optimization. *Brazilian Journal of Microbiology* **47**.

Al-Maqtari, Q.A., AL-Ansi, W., and Mahdi, A.A. (2019) Microbial enzymes produced by fermentation and their applications in the food industry - A review. **8**.

Alsharif, W., Saad, Dr.M., and Hirt, H. (2020) Desert Microbes for Boosting Sustainable Agriculture in Extreme Environments. *Frontiers in Microbiology* **11**.

Alvarez Cervantes, J. (2016) Mycosphere Essay 10: Properties and characteristics of microbial xylanases. *Mycosphere* **7**: 1600–1619.

Álvarez-Cervantes, J., Díaz-Godínez, G., Mercado-Flores, Y., Gupta, V.K., and Anducho-Reyes, M.A. (2016) Phylogenetic analysis of β-xylanase SRXL1 of *Sporisorium reilianum* and its relationship with families (GH10 and GH11) of Ascomycetes and Basidiomycetes. *Sci Rep* **6**: 1–9.

Alves-Prado, H., Pavezzi, F., Leite, R., Oliveira, V., Sette, L., and DaSilva, R. (2010) Screening and Production Study of Microbial Xylanase Producers from Brazilian Cerrado. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **161**: 333–346.

Ameen, F. (2023) Purification and Characterization of Xylanase Produced by *Aspergillus fumigatus* Isolated from the Northern Border Region of Saudi Arabia. *Fermentation* **9**: 595.

Amir, A., Arif, M., and Pande, V. (2013) Purification and characterization of xylanase from Aspergillus fumigatus isolated from soil. *ajb* **12** https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/131621. Accessed March 22, 2024.

Amore, A., Parameswaran, B., Kumar, R., Birolo, L., Vinciguerra, R., Marcolongo, L., *et al.* (2015) Application of a new xylanase activity from *Bacillus amyloliquefaciens* XR44A in brewer's spent grain saccharification. *J Chem Technol Biotechnol* **90**: 573–581.

Anbesaw, M.S. (2021) Characterization and Potential Application of Bromelain from Pineapple (*Ananas comosus*) Waste (Peel) in Recovery of Silver from X-Ray Films. *Int J Biomater* **2021**: 9964337.

Anbu, P., Gopinath, S.C.B., Chaulagain, B.P., and Lakshmipriya, T. (2017) Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine 2016. *BioMed Research International* **2017** https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/2195808/. Accessed May 8, 2024.

Andrew, D.R., Fitak, R.R., Munguia-Vega, A., Racolta, A., Martinson, V.G., and Dontsova, K. (2012) Abiotic Factors Shape Microbial Diversity in Sonoran Desert Soils. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 7527–7537.

Annamalai, H., Hafner, J., Sooraj, K.P., and Pillai, P. (2013) Global Warming Shifts the Monsoon Circulation, Drying South Asia. *Journal of Climate* **26**: 2701–2718.

Annamalai, N., Rajeswari, M.V., Vijayalakshmi, S., and Balasubramanian, T. (2011) Purification and characterization of chitinase from *Alcaligenes faecalis* AU02 by utilizing marine wastes and its antioxidant activity. *Annals of Microbiology* **61**: 801.

Aounallah, M.A., Slimene-Debez, I.B., Djebali, K., Gharbi, D., Hammami, M., Azaiez, S., *et al.* (2017) Enhancement of Exochitinase Production by *Bacillus licheniformis* AT6 Strain and Improvement of N-Acetylglucosamine Production. *Appl Biochem Biotechnol* **181**: 650–666.

Arora, N., Ahmad, T., Rajagopal, R., and Bhatnagar, R.K. (2003) A constitutively expressed 36 kDa exochitinase from *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Biochem Biophys Res Commun* **307**: 620–625.

Asmani, K.-L., Bouacem, K., Ouelhadj, A., Yahiaoui, M., Bechami, S., Mechri, S., *et al.* (2020) Biochemical and molecular characterization of an acido-thermostable endo-chitinase from *Bacillus altitudinis* KA15 for industrial degradation of chitinous waste. *Carbohydrate Research* **495**: 108089.

Assamoi, A., Destain, J., and Thonart, P. (2009) Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo-β-1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* **13**.

Ayyachamy, M., and Vatsala, T.M. (2007) Production and partial characterization of cellulase free xylanase by Bacillus subtilis C 01 using agriresidues and its application in biobleaching of nonwoody plant pulps. *Lett Appl Microbiol* **45**: 467–472.

Azizah, S., Mubarik, N., and Sudirman, L. (2015) Potential of Chitinolytic *Bacillus amyloliquefaciens* SAHA 12.07 and Serratia marcescens KAHN 15.12 as Biocontrol Agents of Ganoderma boninense. *Research Journal of Microbiology* **10**: 452–465.

Azua, A., Zúñiga, J., Arenas Fajardo, C., Orellana, M., Salas, L., and Rafael, V. (2013) *Gloeocapsopsis* AAB1, an extremely desiccation-tolerant cyanobacterium isolated from the Atacama Desert. *Extremophiles : life under extreme conditions* **18**.

Bachmann, S.L., and McCarthy, A.J. (1991) Purification and Cooperative Activity of Enzymes Constituting the Xylan-Degrading System of *Thermomonospora fusca*. *Appl Environ Microbiol* **57**: 2121–2130.

Bai, Y., Eijsink, V.G.H., Kielak, A.M., Veen, J.A. van, and Boer, W. de (2016) Genomic comparison of chitinolytic enzyme systems from terrestrial and aquatic bacteria. *Environ Microbiol* **18**: 38–49.

Bai, Y., Wang, J., Zhang, Z., Yang, P., Shi, P., Luo, H., *et al.* (2010) A new xylanase from thermoacidophilic *Alicyclobacillus sp.* A4 with broad-range pH activity and pH stability. *J Ind Microbiol Biotechnol* **37**: 187–194.

Bailey, M., Biely, P., and Poutanen, K. (1992) Interlaboratory Testing of Methods for Assay of Xylanase Activity. *Journal of Biotechnology* **23**: 257–270.

Bailey, M.J., and Nevalainen, K.M.H. (1981) Induction, isolation and testing of stable *Trichoderma reesei* mutants with improved production of solubilizing cellulase. *Enzyme and Microbial Technology* **3**: 153–157.

Bajaj, B.K., and Abbass, M. (2011) Studies on an alkali-thermostable xylanase from *Aspergillus fumigatus* MA28. *3 Biotech* **1**: 161–171.

Bakr, N., and Ali, R. (2019) Statistical relationship between land surface altitude and soil salinity in the enclosed desert depressions of arid regions. *Arabian Journal of Geosciences* **12**.

Bala, A., and Singh, B. (2019) Cellulolytic and xylanolytic enzymes of thermophiles for the production of renewable biofuels. *Renewable Energy* **136**: 1231–1244.

Bansode, V., and Bajekal, S. (2006) Characterization of chitinases from microorganisms isolated from Lonar Lake. *Indian J Biotechnol* **5**.

Banu, A., and Ingale, S. (2012) Xylanase production by *Bacillus pumilus* AB-1 under solid statefermentation and its application. *Bulletin of Environmental and Scientific Research* **1**: 35–43.

Bar-Eyal, L., Eisenberg, I., Faust, A., Raanan, H., Nevo, R., Rappaport, F., *et al.* (2015) An easily reversible structural change underlies mechanisms enabling desert crust cyanobacteria to survive desiccation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1847**: 1267–1273.

Battan, B., Dhiman, S.S., Ahlawat, S., Mahajan, R., and Sharma, J. (2012) Application of Thermostable Xylanase of *Bacillus pumilus* in Textile Processing. *Indian J Microbiol* **52**: 222–229.

Battan, B., Sharma, J., Dhiman, S.S., and Kuhad, R.C. (2007) Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. *Enzyme and Microbial Technology* **41**: 733–739.

Battestin, V., and Macedo, G.A. (2007) Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by *Paecilomyces variotii*. *Electron J Biotechnol* **10**: 0–0.

Baubin, C., Farrell, A.M., Šťovíček, A., Ghazaryan, L., Giladi, I., and Gillor, O. (2019) Seasonal and spatial variability in total and active bacterial communities from desert soil. *Pedobiologia* **74**: 7–14.

Bauer, M.M.T., and Schnapp, G. (2007) 3.19 - Protein Production for Three-Dimensional Structural Analysis. In *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Taylor, J.B., and Triggle, D.J. (eds). Elsevier, Oxford. pp. 411–432 https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B008045044X000924. Accessed March 25, 2024.

Bazzine, M., and Hamdi-Aissa, B. (2014) Etude des Croutes Biologiques de Quelques Sols Gypseux et Salins du Milieu Saharien : Cas de la Cuvette de Ouargla (Sahara Septentrional Est Algerien). *Algerian Journal of Arid Environment* **4**: 45–52.

Bedford, M.R., and Partridge, G.G. (eds) (2010) *Enzymes in farm animal nutrition*. 2nd ed., CABI Pub, Wallingford, Oxfordshire, UK ; Cambridge, MA.

Begam, A., Banu, S., and Priya, V. (2015) Comparison and Optimization of Thermostable Xylanase Production by *Bacillus pumilus* and *Bacillus cereus* using Corn Husk. *International Advanced Research Journal in Science, Engineering and Technology* **2**.

Bell, C., McIntyre, N., Cox, S., Tissue, D., and Zak, J. (2008) Soil Microbial Responses to Temporal Variations of Moisture and Temperature in a Chihuahuan Desert Grassland. *Microb Ecol* **56**: 153–167.

Belov, A.A., Cheptsov, V.S., and Vorobyova, E.A. (2018) Soil bacterial communities of Sahara and Gibson deserts: Physiological and taxonomical characteristics. *AIMS Microbiol* **4**: 685–710.

Bennamoun, L., Hiligsmann, S., Dakhmouche, S., Ait-Kaki, A., Labbani, F.-Z.K., Nouadri, T., *et al.* (2016) Production and Properties of a Thermostable, pH-Stable Exo-Polygalacturonase Using

Aureobasidium pullulans Isolated from Saharan Soil of Algeria Grown on Tomato Pomace. *Foods* **5**: 72.

Berezina, N. (2016) Production and application of chitin. *Physical Sciences Reviews* **1** https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/psr-2016-0048/html. Accessed March 2, 2024.

Berini, F., Katz, C., Gruzdev, N., Casartelli, M., Tettamanti, G., and Marinelli, F. (2018) Microbial and viral chitinases: Attractive biopesticides for integrated pest management. *Biotechnol Adv* **36**: 818–838.

Berkal, I. (2006) Contribution à la connaissance des sols du Sahara d'Algérie. http://localhost:8080/xmlui/handle/123456789/98. Accessed February 28, 2024.

Beygmoradi, A., and Homaei, A. (2017) Marine microbes as a valuable resource for brand new industrial biocatalysts. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **11**: 131–152.

Bhardwaj, N., Kumar, B., and Verma, P. (2019) A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. *Bioresources and Bioprocessing* **6**: 40.

Bhatnagar, A., and Bhatnagar, M. (2005) Microbial diversity in desert ecosystems. *Current Science* **89**: 91–100.

Bhattacharya, D., Nagpure, A., and Gupta, R.K. (2007) Bacterial chitinases: properties and potential. *Crit Rev Biotechnol* **27**: 21–28.

Bhattacharya, S., Das, A., Samadder, S., and Rajan, S.S. (2016) Biosynthesis and characterization of a thermostable, alkali-tolerant chitinase from *Bacillus pumilus* JUBCH08 displaying antagonism against phytopathogenic Fusariumoxysporum. *3 Biotech* **6** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4781814/. Accessed March 11, 2024.

Bhowmik, S., Islam, S., Ahmed, M., Hossain, M.B., and Hossain, M. (2015) Protease Producing Bacteria and Activity in Gut of Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). *Journal of Fisheries and Aquatic Science* **10**.

Biely, P., and Vršanská, M. (1988) Xylanase of *Cryptococcus albidus*. In *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 638–648 https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687988601807. Accessed March 2, 2024.

Bocchini, D.A., Alves-Prado, H.F., Baida, L.C., Roberto, I.C., Gomes, E., and Da Silva, R. (2002) Optimization of xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation using response surface methodology. *Process Biochemistry* **38**: 727–731.

Boniecki, P., Koszela, K., Świerczyński, K., Skwarcz, J., Zaborowicz, M., and Przybył, J. (2020) Neural Visual Detection of Grain Weevil (Sitophilus granarius L.). *Agriculture* **10**: 25.

Bosquez-Molina, E., and Zavaleta-Avejar, L. (2016) New Bioactive Biomaterials Based on Chitosan. In: Silvia Bautista-Baños, editors: Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities, Oxford: Academic Press; 2016, p. 33-64. ISBN:978-0-12-802735-6. pp. 33–64.

Bouacem, K., Laribi-Habchi, H., Mechri, S., Hacene, H., Jaouadi, B., and Bouanane-Darenfed, A. (2018) Biochemical characterization of a novel thermostable chitinase from *Hydrogenophilus hirschii* strain KB-DZ44. *Int J Biol Macromol* **106**: 338–350.

Boucherba, N., Said, B., Copinet, E., Hakim, H., and Duchiron, F. (2011) Production and partial characterization of xylanase produced by Jonesia denitrificans isolated in Algerian soil. *Process Biochemistry* **46**: 519–525.

Bouznada, K., Bouras, N., Mokrane, S., Chaabane Chaouch, F., Zitouni, A., Pötter, G., *et al.* (2017) *Saccharothrix ghardaiensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from Saharan soil. *Antonie Van Leeuwenhoek* **110**: 399–405.

Bragger, J.M., Daniel, R.M., Coolbear, T., and Morgan, H.W. (1989) Very stable enzymes from extremely thermophilic archaebacteria and eubacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **31**: 556–561.

Brzezinska, M.S., and Jankiewicz, U. (2012) Production of Antifungal Chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and Its Potential Role in the Biological Control. *Curr Microbiol* **65**: 666–672.

Bueno, D., and Brienzo, M. (2020) Xylan solubilization and use as carbon source/inductor for microbial xylanase production / Solubilização de Xylan e utilização como fonte/indutor de carbono para a produção de xilanase microbiana. *Brazilian Journal of Development* **6**: 78426–78433.

Bull, A.T., Idris, H., Sanderson, R., Asenjo, J., Andrews, B., and Goodfellow, M. (2018) High altitude, hyper-arid soils of the Central-Andes harbor mega-diverse communities of actinobacteria. *Extremophiles* **22**: 47–57.

Buxton, E.W., Khalifa, O., and Ward, V. (1965) Effect of soil amendment with chitin on pea wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. pisi. *Annals of Applied Biology* **55**: 83–88.

Cardozo, F., Feitosa, V., Pillaca, O., and Pessoa, A. (2023) Endochitinase and Chitobiosidase Production by Marine *Aeromonas caviae* CHZ306: Establishment of Nitrogen Supplementation. *Bioengineering* **10**: 431.

Castañeda, L., Genro, C., Roggia, I., Bender, S., Bender, R., and Pereira, C. (2014) Innovative Rice Seed Coating (*Oryza Sativa*) with Polymer Nanofibres and Microparticles Using the Electrospinning Method. *Journal of Research Updates in Polymer Science* **3**: 33–39.

Castaneda-Alvarez, C., and Aballay, E. (2016) Rhizobacteria with nematicide aptitude: enzymes and compounds associated. *World J Microbiol Biotechnol* **32**: 203.

Castro, A., Carvalho Alves, D., Freire, D., and Castilho, L. (2010) Economic Analysis of the Production of Amylases and Other Hydrolases by *Aspergillus awamori* in Solid-State Fermentation of Babassu Cake. *Enzyme research* **2010**: 576872.

Cd, D., Lb, V., Ma, M., and Md, B. (2021) Extracellular Antifungal Activity of Chitinase-Producing Bacteria Isolated From Guano of Insectivorous Bats. *Curr Microbiol* **78**: 2787–2798.

Chaiharn, M., Pikomol, A., and Lumyoung, S. (2019) Purification and characterization of an extracellular chitinase from *Bacillus thuringiensis* r 176 using solid state fermentation with shrimp shells waste. http://cmuir.cmu.ac.th/jspui/handle/6653943832/66595. Accessed March 12, 2024.

Chaiyaso, T., Kuntiya, A., Techapun, C., Leksawasdi, N., Seesuriyachan, P., and Hanmoungjai, P. (2011) Optimization of Cellulase-Free Xylanase Production by Thermophilic *Streptomyces thermovulgaris* TISTR1948 through Plackett-Burman and Response Surface Methodological Approaches. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**: 531–537.

Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P.L., and Srivastava, A.K. (2016) Bacterial xylanases: biology to biotechnology. *3 Biotech* **6**: 150.

Chakrabortty, S., Bhattacharya, S., and Das, A. (2012) Optimization of Process Parameters for Chitinase Production by a Marine Isolate of *Serratia marcescens. International Journal of Pharmacy and Biological Science* **2**: 8–20.

Chakraborty, A., Puja, R., and Bose, K. (2022) Protein Purification by Ion Exchange Chromatography. pp. 173–198.

Chalidah, N., Khotimah, I., Hakim, A., Meata, B., Puspita, I.D., Nugraheni, P., *et al.* (2018) Chitinase activity of *Pseudomonas stutzeri* PT5 in different fermentation condition. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* **139**: 012042.

Chanal, A., Chapon, V., Benzerara, K., Barakat, M., Christen, R., Achouak, W., *et al.* (2006) The desert of Tataouine: an extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria. *Environmental microbiology* **8**: 514–25.

Chandra, P., Enespa, Singh, R., and Arora, P.K. (2020) Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microbial Cell Factories* **19**: 169.

Chandra, T. (1995) A cellulase-free xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fischeri* Fxn1. *Biotechnology Letters* https://www.academia.edu/5285564/A_cellulase_free_xylanase_from_alkali_tolerant_Aspergillus_fischeri_Fxn1. Accessed March 2, 2024.

Chandrasekaran, R., Revathi, K., Nisha, S., Kirubakaran, S.A., Sathish-Narayanan, S., and Senthil-Nathan, S. (2012) Physiological effect of chitinase purified from *Bacillus subtilis* against the tobacco cutworm *Spodoptera litura* Fab. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **104**: 65–71.

Chang, W.-T., Chen, C.-S., and Wang, S.-L. (2003) An antifungal chitinase produced by *Bacillus cereus* with shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Curr Microbiol* **47**: 102–108.

Chang, W.-T., Chen, M.-L., and Wang, S.-L. (2010) An antifungal chitinase produced by *Bacillus subtilis* using chitin waste as a carbon source. *World J Microbiol Biotechnol* **26**: 945–950.

Chaudhary, P., Janmeda, P., Docea, A.O., Yeskaliyeva, B., Abdull Razis, A.F., Modu, B., *et al.* (2023) Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. *Front Chem* **11**: 1158198.

Cheba, B.A., and Zaghloul, T. (2020) Bacillus Sp. R2 Chitinase: Substrate Specificity, Shelf-Life Stability, and Antifungal Activity. *Procedia Manufacturing* **46**: 879–884.

Cheba, B.A., Zaghloul, T.I., EL-Massry, M.H., and EL-Mahdy, A.R. (2016) Effect of Metal Ions, Chemical Agents, and Organic Solvent on *Bacillus Sp*.R2 Chitinase Activity. *Procedia Technology* **22**: 465–470.

Chemin, M. (2014) Valorisation des xylanes du bois : vers la synthèse de copolymères amphiphiles bio-sourcés. https://theses.hal.science/tel-01152890. Accessed February 29, 2024.

Chen, X.H., Koumoutsi, A., Scholz, R., Schneider, K., Vater, J., Süssmuth, R., *et al.* (2009) Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *J Biotechnol* **140**: 27–37.

Chennafi, H. (2013) THE MANAGEMENT OF SOIL AND WATER FOR DATE PALM EL-HADJIRA REGION, DAIRA OF TOUGGOURT (SOUTH OF ALGERIA). *Acta Hortic* 15–110.

Chernin, L., Ismailov, Z., Haran, S., and Chet, I. (1995) Chitinolytic Enterobacter agglomerans Antagonistic to Fungal Plant Pathogens. *Appl Environ Microbiol* **61**: 1720–1726.

Chew, K.W., Chia, S.R., Lee, S.Y., Zhu, L., and Show, P.L. (2019) Enhanced microalgal protein extraction and purification using sustainable microwave-assisted multiphase partitioning technique. *Chemical Engineering Journal* **367**: 1–8.

Chia, X.K., Hadibarata, T., Jusoh, M.N.H., Sutiknowati, L.I., Tan, I.S., and Foo, H.C.Y. (2024) Role of Extremophiles in Biodegradation of Emerging Pollutants. *Top Catal* 1–18.

Choudhury (NIT Agartala), P. (2015) Industrial application of lipase: a review. *BioPharm* **1**: 41–47.

Christakopoulos, P., Kekos, D., Macris, B.J., Claeyssens, M., and Bhat, M.K. (1996) Purification and characterisation of a major xylanase with cellulase and transferase activities from *Fusarium oxysporum*. *Carbohydr Res* **289**: 91–104.

Chung, S., and Kim, S.-D. (2007) Escherichia coli can produce recombinant chitinase in the soil to control the pathogenesis by *Fusarium oxysporum* without colonization. *J Microbiol Biotechnol* **17**: 474–480.

Clarke, J.H., Rixon, J.E., Ciruela, A., Gilbert, H.J., and Hazlewood, G.P. (1997) Family-10 and family-11 xylanases differ in their capacity to enhance the bleachability of hardwood and softwood paper pulps. *Appl Microbiol Biotechnol* **48**: 177–183.

Cockell, C., Brown, S., Landenmark, H., Samuels, T., Siddall, R., and Wadsworth, J. (2017) Liquid Water Restricts Habitability in Extreme Deserts. *Astrobiology* **17**: 309–318.

Cohen, E. (2010) Chapter 2 - Chitin Biochemistry: Synthesis, Hydrolysis and Inhibition. In *Advances in Insect Physiology*. Casas, J., and Simpson, S.J. (eds). Academic Press, pp. 5–74 https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065280610380052. Accessed March 2, 2024.

Collins, T., Gerday, C., and Feller, G. (2005a) Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 3–23.

Collins, T., Gerday, C., and Feller, G. (2005b) Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 3–23.

Collins, T., Meuwis, M.-A., Stals, I., Claeyssens, M., Feller, G., and Gerday, C. (2002) A Novel Family 8 Xylanase, Functional and Physicochemical Characterization*. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 35133–35139.

Coman, G., and 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.

Cooke, R.U. (1973) *Geomorphology in Deserts*. Univ of California Pr, Berkeley.

Cooper, G.M. (2000) The Central Role of Enzymes as Biological Catalysts. In *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition*. Sinauer Associates, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9921/. Accessed February 28, 2024.

Cretoiu, M.S., Korthals, G.W., Visser, J.H.M., and Elsas, J.D. van (2013) Chitin Amendment Increases Soil Suppressiveness toward Plant Pathogens and Modulates the Actinobacterial and Oxalobacteraceal Communities in an Experimental Agricultural Field. *Appl Environ Microbiol* **79**: 5291–5301.

Crowell, A.M.J., Wall, M.J., and Doucette, A.A. (2013) Maximizing recovery of water-soluble proteins through acetone precipitation. *Anal Chim Acta* **796**: 48–54.

Csiszár, E., Losonczi, A., Szakács, G., Rusznák, I., Bezúr, L., and Reicher, J. (2001) Enzymes and chelating agent in cotton pretreatment. *Journal of Biotechnology* **89**: 271–279.

Cui, F., and 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, T.-B., Chai, H.-Y., and Jiang, L.-X. (2012) Isolation and Partial Characterization of an Antifungal Protein Produced by *Bacillus licheniformis* BS-3. *Molecules* **17**: 7336.

Dahbi, M., Benatiallah, A., and Sellam, M. (2013) The Analysis of Wind Power Potential in Sahara Site of Algeria-an Estimation Using the 'Weibull' Density Function. *Energy Procedia* **36**: 179–188.

Dahiya, N., Tewari, R., and Hoondal, G.S. (2006) Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**: 773–782.

Dahiya, N., Tewari, R., Tiwari, R., and Hoondal, G. (2005a) Production of an Antifungal Chitinase from *Enterobacter sp.* NRG4 and its Application in Protoplast Production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **21**: 1611–1616.

Dahiya, N., Tewari, R., Tiwari, R.P., and Hoondal, G.S. (2005b) Chitinase from *Enterobacter sp.* NRG4: Its purification, characterization and reaction pattern. *Electron J Biotechnol* **8**: 134–145.

Dahiya, N., Tewari, R., Tiwari, R.P., and Hoondal, G.S. (2005c) Chitinase production in solid-state fermentation by *Enterobacter sp.* NRG4 using statistical experimental design. *Curr Microbiol* **51**: 222–228.

Dai, D.H., Hu, W.L., Huang, G.R., and Li, W. (2011) Purification and characterization of a novel extracellular chitinase from thermophilic *Bacillus sp.* Hu1. *ajb* **10**: 2476–2485.

Dana, M., Khaniki, G.B., Mokhtarieh, A.A., and Davarpanah, S.J. (2017) Biotechnological and Industrial Applications of Laccase: A Review. **4**.

Das, A.K., and Dewanjee, S. (2018) Chapter 3 - Optimization of Extraction Using Mathematical Models and Computation. In *Computational Phytochemistry*. Sarker, S.D., and Nahar, L. (eds). Elsevier, pp. 75–106 https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128123645000031. Accessed March 4, 2024.

Das, M., Rebecca, J., Sharmila, D., Anu, Banerjee, A., and Kumar, D. (2012) Identification and optimization of cultural conditions for chitinase production by *Bacillus amyloliquefaciens* SM3. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* **4**: 4969–4974.

Das Mohapatra, P.K., Maity, C., Rao, R.S., Pati, B.R., and Mondal, K.C. (2009) Tannase production by *Bacillus licheniformis* KBR6: Optimization of submerged culture conditions by Taguchi DOE methodology. *Food Research International* **42**: 430–435.

Debbagh-Nour, H., Belcaid, M., Ibourki, M., Boukcim, H., Ducousso, M., El Kharrassi, Y., *et al.* (2022) *Spatial Distribution of Desert Plant Species According to Soil Salinity*. .

De-hui, D., Wei, L., Wei-lian, H., and Xiao-ying, S. (2011) Effect of Medium Composition on the Synthesis of Chitinase and Chitin Deacetylase from Thermophilic *Paenibacillus sp.*Hul. *Procedia Environmental Sciences* **8**: 620–628.

Demirkan, E., Başkurt, M., and Sevgi, T. (2017) Optimization of Physical Factors Affecting the Production of the α-Amylase from a Newly Isolated *Bacillus sp.* M10 Strain. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi* **7**: 23–30.

Dennison, C., and Lovrien, R. (1997) Three Phase Partitioning: Concentration and Purification of Proteins. *Protein Expression and Purification* **11**: 149–161.

Deshmukh, R., Jagtap, S., Mandal, M., and Mandal, S. (2016) Purification, biochemical characterization and structural modelling of alkali-stable β-1,4-xylan xylanohydrolase from *Aspergillus fumigatus* R1 isolated from soil. *BMC Biotechnology* **16**.

Dey, D., and Roy, A. (2018) Molecular structure and catalytic mechanism of fungal family G acidophilic xylanases. *3 Biotech* **8**.

Dhananjay, S.K., and Mulimani, V.H. (2009) Three-phase partitioning of alpha-galactosidase from fermented media of *Aspergillus oryzae* and comparison with conventional purification techniques. *J Ind Microbiol Biotechnol* **36**: 123–128.

Dhaver, P., Pletschke, B., Sithole, B., and Govinden, R. (2022) Optimization, purification, and characterization of xylanase production by a newly isolated *Trichoderma harzianum* strain by a two-step statistical experimental design strategy. *Sci Rep* **12**: 1–18.

Dhillon, A., and Khanna, S. (2000) Production of a thermostable alkali-tolerant xylanase from *Bacillus circulans* AB 16 grown on wheat straw. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **16**: 325–327.

Dhole, N., Dar, M., and Pandit, R. (2021) Recent advances in the bioprospection and applications of chitinolytic bacteria for valorization of waste chitin. *Archives of Microbiology* **203**.

Dimarogona, M., and Topakas, E. (2016) Regulation and Heterologous Expression of Lignocellulosic Enzymes in *Aspergillus*. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Gupta, V.K. (ed.). Elsevier, Amsterdam. pp. 171–190 https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444635051000129. Accessed February 29, 2024.

Dogan, N., and Tari, C. (2008) Characterization of three-phase partitioned exo-polygalacturonase from *Aspergillus sojae* with unique properties. *Biochemical Engineering Journal* **39**: 43–50.

Dravid, P., Kaushal, D.C., Saxena, J.K., and Kaushal, N.A. (2015) Isolation and characterization of endochitinase and exochitinase of *Setaria cervi*. *Parasitology International* **64**: 579–586.

Driss, F., Kallassy-Awad, M., Zouari, N., and Jaoua, S. (2005) Molecular characterization of a novel chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki. *J Appl Microbiol* **99**: 945–953.

Duarte, M., Pellegrino, A., Portugal, E., Ponezi, A., and Franco, T. (2000) Characterization of alkaline xylanases from *Bacillus pumilus. Brazilian Journal of Microbiology* **31**: 90–94.

DuBois, Michel., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, Fred. (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem* **28**: 350–356.

Duman, Y.A., Kaya, A.U., and Yağci, Ç. (2020) Three-phase partitioning and immobilization of *Bacillus methylotrophicus* Y37 cellulase on organo-bentonite and its kinetic and thermodynamic properties. *Clay Minerals* **55**: 120–131.

Dutta, B., Banerjee, A., Chakraborty, P., and Bandopadhyay, R. (2018) *In silico* studies on bacterial xylanase enzyme: Structural and functional insight. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* **16**: 749–756.

Dwivedi, P., Sharma, A.K., and Singh, S.P. (2021) Biochemical properties and repression studies of an alkaline serine protease from a haloalkaliphilic actinomycete, *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. a*lbirubida* OK-14. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **35**: 102059.

Eid Sayed Ashour, W., Abd El Aty, A., Hamed, E., Mahmoud, A., and Ahmed, I. (2016) Applications of Plackett–Burman and Central Composite Design for the Optimization of Novel *Brevundimonas diminuta* KT277492 Chitinase Production, Investigation of its Antifungal Activity. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **59**.

Elieh-Ali-Komi, D., and Hamblin, M.R. (2016) Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. *Int J Adv Res (Indore)* **4**: 411–427.

El-Okki, A.A.K.E.-H., and Meraihi, Z. (2017) L'α-Amylase d'une nouvelle souche de Rhizopus oryzae FSIS4 isolée de blé des zones arides. https://www.semanticscholar.org/paper/L%E2%80%99%CE%B1-Amylase-d%E2%80%99une-nouvelle-souche-de-Rhizopus-FSIS4-El-Okki-Meraihi/188282fd90b70dec5a58d2748475e29dd1b9515c. Accessed October 13, 2024.

El-Sayed, S., Omar, N.I., El-Sayed, E.-S.M., and Shousha, W. (2017) Evaluation Antioxidant and cytotoxic activities of novel chitooligosaccharides prepared from chitosan via enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **7**: 50–55.

Elshaghabee, F.M.F., Rokana, N., Gulhane, R.D., Sharma, C., and Panwar, H. (2017) *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. *Front Microbiol* **8**: 1490.

Emami, K., Nagy, T., Fontes, C.M.G.A., Ferreira, L.M.A., and Gilbert, H.J. (2002) Evidence for Temporal Regulation of the Two *Pseudomonas cellulosa* Xylanases Belonging to Glycoside Hydrolase Family 11. *J Bacteriol* **184**: 4124–4133.

Eriksson, T., Börjesson, J., and Tjerneld, F. (2002) Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology* **31**: 353–364.

Espinoza-vergara, J., Molina, P., Walter, M., Gulppi, M., Vejar, N., Melo, F., *et al.* (2021) Effect of pH on the Electrochemical Behavior of Hydrogen Peroxide in the Presence of Pseudomonas aeruginosa. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **9** https://research.manchester.ac.uk/en/publications/effect-of-ph-on-the-electrochemical-behavior-of-hydrogen-peroxide. Accessed March 13, 2024.

Essghaier, B., Zouaoui, M., Najjari, A., and Sadfi, N. (2021) Potentialities and Characterization of an Antifungal Chitinase Produced by a Halotolerant *Bacillus licheniformis*. *Curr Microbiol* **78**: 513–521.

Ezcurra, E., Mellink, E., Wehncke, E., González, C., Morrison, S., Warren, A., *et al.* (2006) Chapter 1: Natural History and Evolution of the World's Deserts. In *Global Deserts Outlook*. UNEP, pp. 1–26 https://research.wur.nl/en/publications/chapter-1-natural-history-and-evolution-of-the-worlds-deserts. Accessed February 28, 2024.

Fadhil, L., Kadim, A., and Aljebory, A. (2014) Production of Chitinase by Serratia marcescens from Soil and Its Antifungal Activity. *J Nat Sci Res* **4**.

Falert, S., and Akarapisan, A. (2019) Identification of *Fusarium spp.* Causing dry rot of seed potato tubers in northern, Thailand. http://cmuir.cmu.ac.th/jspui/handle/6653943832/67549. Accessed March 19, 2024.

Fang, B.-Z., Salam, N., Han, M.-X., Jiao, J.-Y., Cheng, J., Wei, D.-Q., *et al.* (2017) Insights on the Effects of Heat Pretreatment, pH, and Calcium Salts on Isolation of Rare Actinobacteria from Karstic Caves. *Front Microbiol* **8**: 1535.

Farag, A., Naby, M. abdel-, Ibrahim, H., and El-Shenawy, M. (2016) Purification, characterization and antimicrobial activity of chitinase from marine-derived *Aspergillus terreus*. *The Egyptian Journal of Aquatic Research* **42**.

Fierer, N., Leff, J.W., Adams, B.J., Nielsen, U.N., Bates, S.T., Lauber, C.L., *et al.* (2012) Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 21390–21395.

Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., and Stanković, S. (2018) Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *J Biotechnol* **285**: 44–55.

Fleuri, L.F., Kawaguti, H.Y., and Sato, H.H. (2009) Production, purification and application of extracellular chitinase from *Cellulosimicrobium cellulans* 191. *Braz J Microbiol* **40**: 623–630.

Frederick, M.M., Kiang, C.H., Frederick, J.R., and Reilly, P.J. (1985) Purification and characterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger*. I. Two isozymes active on xylan backbones near branch points. *Biotechnol Bioeng* **27**: 525–532.

Freitag, R. (2005) LIQUID CHROMATOGRAPHY | Biotechnology Applications. In *Encyclopedia of Analytical Science*. pp. 258–267.

Funkhouser, J.D., and Aronson, N.N. (2007) Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. *BMC Evolutionary Biology* **7**: 96.

Gagaoua, M., Boucherba, N., Bouanane-Darenfed, A., Ziane, F., Nait-Rabah, S., Hafid, K., and Boudechicha, H.-R. (2014) Three-phase partitioning as an efficient method for the purification and recovery of ficin from Mediterranean fig (*Ficus carica* L.) latex. *Separation and Purification Technology* **132**: 461–467.

Gagaoua, M., and Hafid, K. (2016) Three Phase Partitioning System, an Emerging Non-Chromatographic Tool for Proteolytic Enzymes Recovery and Purification. *Biosensors Journal* **5**: 100134.

Galante, R.S., Taranto, A.G., Koblitz, M.G.B., Góes-Neto, A., Pirovani, C.P., Cascardo, J.C.M., *et al.* (2012) Purification, characterization and structural determination of chitinases produced by *Moniliophthora perniciosa*. *An Acad Bras Cienc* **84**: 469–486.

Gálusová, T., Rybanský, Ľ., Mészáros, P., Spieß, N., Piršelová, B., Kuna, R., *et al.* (2015) Variable responses of soybean chitinases to arsenic and cadmium stress at the whole plant level. *Plant Growth Regul* **76**: 147–155.

Gangwar, M., Singh, V., Pandey, A., Tripathi, C., and Mishra, B. (2016) Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces violascens* NRRL B2700. *Indian journal of experimental biology* **54**: 64–71.

Garai, D., and Kumar, V. (2013) A Box–Behnken design approach for the production of xylanase by *Aspergillus candidus* under solid state fermentation and its application in saccharification of agro residues and *Parthenium hysterophorus* L. *Industrial Crops and Products* **44**: 352–363.

Garcia, B.L., Ball, A.S., Rodriguez, J., Pérez-Leblic, M.I., Arias, M.E., and Copa-Patiño, J.L. (1998) Induction of ferulic acid esterase and xylanase activities in *Streptomyces avermitilis* UAH30. *FEMS Microbiology Letters* **158**: 95–99.

Garg, G., Dhiman, S., Gautam, R., Mahajan, R., Kumar, P., Sharma, J., *et al.* (2012) Title: Bioscouring of jute fabric by cellulase-free alkalo-thermostable xylanase from *Bacillus pumilus* ASH. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **85–86**.

Gaur, R., Tiwari, S., Rai, P., and Srivastava, V. (2015) Isolation, Production, and Characterization of Thermotolerant Xylanase from Solvent Tolerant *Bacillus vallismortis* RSPP-15. *International Journal of Polymer Science* **2015**: e986324.

Geetha, K., and Gunasekaran, P. (2010) Optimization of nutrient medium containing agricultural waste for xylanase production by *Bacillus pumilus* B20. *Biotechnol Bioproc E* **15**: 882–889.

Geetha, K., and Gunasekaran, P. (2017) Purification of Endoxylanase from *Bacillus pumilus* B20 for Production of Prebiotic Xylooligosaccharide Syrup; An In vitro Study. *Iran J Biotechnol* **15**: 232–240.

Gessesse, A. (1998) Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline Xylanases from an Alkaliphilic *Bacillus sp. Appl Environ Microbiol* **64**: 3533–3535.

Gessesse, A., and Gashe, B.A. (1997) Production of alkaline xylanase by an alkaliphilic *Bacillus sp.* isolated from an alkalinesoda lake. *Journal of Applied Microbiology* **83**: 402–406.

Geyer, K., Altrichter, A., Van Horn, D., Takacs-Vesbach, C., Gooseff, M., and Barrett, J. (2013) Environmental controls over bacterial communities in polar desert soils. *Ecosphere* **4**.

Ghorbel-Bellaaj, O., Manni, L., Jellouli, K., Hmidet, N., and Nasri, M. (2012) Optimization of protease and chitinase production by Bacillus cereus SV1 on shrimp shell waste using statistical experimental design. Biochemical and molecular characterization of the chitinase. *Ann Microbiol* **62**: 1255–1268.

Gielkens, M. (1999) A molecular analysis of (hemi-)cellulose degradation by Aspergilli. https://www.semanticscholar.org/paper/A-molecular-analysis-of-%28hemi-%29cellulose-by-Gielkens/0dbd8a8544c3c7d1f5f4aec597b5638d1c7a5b5b. Accessed February 29, 2024.

Gilbert, H.J., and Hazlewood, G.P. (1993) Bacterial cellulases and xylanases. *Microbiology* **139**: 187–194.

Gohel, V., Chaudhary, T., Vyas, P., and Chhatpar, H.S. (2006) Statistical screenings of medium components for the production of chitinase by the marine isolate *Pantoea dispersa*. *Biochemical Engineering Journal* **28**: 50–56.

Gomaa, E. (2012) Chitinase Production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their Potential in Antifungal Biocontrol. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)* **50**: 103–11.

Gomaa, E.Z. (2021) Microbial chitinases: properties, enhancement and potential applications. *Protoplasma* **258**: 695–710.

Gomes, D.J., Gomes, J., and Steiner, W. (1994) Production of highly thermostable xylanase by a wild strain of thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and partial characterization of the enzyme. *Journal of Biotechnology* **37**: 11–22.

Gómez-Silva, B. (2018) Lithobiontic life: "Atacama rocks are well and alive." *Antonie Van Leeuwenhoek* **111**: 1333–1343.

Gommeaux, M., Barakat, M., Montagnac, G., Christen, R., Guyot, F., and Heulin, T. (2010) Mineral and Bacterial Diversities of Desert Sand Grains from South-East Morocco. *Geomicrobiology Journal* https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01490450903393066. Accessed March 5, 2024.

Goossens, D., and Offer, Z.Y. (1997) Aeolian dust erosion on different types of hills in a rocky desert: wind tunnel simulations and field measurements. *Journal of Arid Environments* **37**: 209–229.

Gorbacheva, I.V., and Rodionova, N.A. (1977) Studies on xylan degrading enzymes: I. Purification and characterization of endo-1,4-β-xylanase from *Aspergillus niger* STR. 14. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* **484**: 79–93.

Gosselin-Debeire, M. (1991) Mécanismes d'action d'endoxylanases thermophiles bactériennes sur les xylanes isolés et intégrés dans la paroi végétale. *http://www.theses.fr* http://www.theses.fr/1991LIL10138. Accessed March 2, 2024.

Goswami, G., Pathak, R.R., Medicherla, K., and Ramesh, B. (2013) Production, Partial Purification and Biochemical Characterization of Thermostable Xylanase from Bacillus brevis. *Biomedical & Pharmacology Journal* **6**: 435–440.

Grodzki, A.C., and Berenstein, E. (2010) Antibody purification: ammonium sulfate fractionation or gel filtration. *Methods Mol Biol* **588**: 15–26.

Gruber, S., Kubicek, C.P., and Seidl-Seiboth, V. (2011) Differential Regulation of Orthologous Chitinase Genes in Mycoparasitic *Trichoderma* Species. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 7217.

Gueye, N., Kumar, G.K., Ndiaye, M., Sall, S.Y.D., Ndiaye, M.A.F., Diop, T.A., and Ram, M.R. (2020) Factors affecting the chitinase activity of *Trichoderma asperellum* isolated from agriculture field soils. *J App Biol Biotech* **8**: 41–44.

Guo, G., Liu, Z., Xu, J., Liu, J., Dai, X., Xie, D., *et al.* (2012) Purification and characterization of a xylanase from *Bacillus subtilis* isolated from the degumming line. *J Basic Microbiol* **52**: 419–428.

Gupta, Dr.G., Srivastava, Dr.S., Khare, S., and Prakash, V. (2014) Extremophiles: An Overview of Microorganism from Extreme Environment. *International Journal of Agriculture, Environment & Biotechnology* **7**: 371–380.

Gupta, N., Kumar, Laksh, S., Angural, M., and Rana, M. (2017) Process Optimization Of Extracellular Chitinase Production From *Bacillus sp.* Isolated From Fish Waste Dumping Site. *European Journal Of Pharmaceutical And Medical Research* **4**: 474–480.

Gupta, R., Beg, Q., and Lorenz, P. (2002) Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**: 15–32.

Gupta, R., Saxena, R.K., Chaturvedi, P., and Virdi, J.S. (1995) Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cell wall lysis. *J Appl Bacteriol* **78**: 378–383.

Gurav, R., Tang, J., and Jadhav, J. (2017) Novel chitinase producer *Bacillus pumilus* RST25 isolated from the shellfish processing industry revealed antifungal potential against phyto-pathogens. *International Biodeterioration & Biodegradation* **125**: 228–234.

Gurung, N., Ray, S., Bose, S., and Rai, V. (2013) A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *Biomed Res Int* **2013**: 329121.

Hamid, R., Khan, M.A., Ahmad, M., Ahmad, M.M., Abdin, M.Z., Musarrat, J., and Javed, S. (2013) Chitinases: An update. *J Pharm Bioallied Sci* **5**: 21–29.

Han, K.-I., Patnaik, B.B., Kim, Y.H., Kwon, H.-J., Han, Y.S., and Han, M.-D. (2014) Isolation and characterization of chitinase-producing *Bacillus* and *Paenibacillus* strains from salted and fermented shrimp, Acetes japonicus. *J Food Sci* **79**: M665-674.

Han, Y., Yang, B., Zhang, F., Miao, X., and Li, Z. (2009) Characterization of antifungal chitinase from marine *Streptomyces sp.* DA11 associated with South China Sea sponge Craniella australiensis. *Mar Biotechnol (NY)* **11**: 132–140.

Hao, Z., Cai, Y., Liao, X., Zhang, X., Fang, Z., and Zhang, D. (2012) Optimization of nutrition factors on chitinase production from a newly isolated *Chitiolyticbacter meiyuanensis* SYBC-H1. *Braz J Microbiol* **43**: 177–186.

Harris, A.D., and Ramalingam, C. Xylanases and its Application in Food Industry: A Review. **1**.

Harris, S., and Chidambaram, R. (2015) Production of xylanase from watermelon rind by *Bacillus weihenstephanesis* strain ANR1. *International Journal of ChemTech Research* **8**: 1–5.

Hatimi, A., and Tahrouch, S. (2007) Caractérisations chimique, botanique et microbiologique du sol des dunes littorales du Souss-Massa. *Biomatec Echo* **2**.

Hayakawa, M., Sadakata, T., Kajiura, T., and Nonomura, H. (1991) New methods for the highly selective isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **72**: 320–326.

Hayakawa, M., Yoshida, Y., and Iimura, Y. (2004) Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. *J Appl Microbiol* **96**: 973–981.

Heck, J.X., Flôres, S.H., Hertz, P.F., and Ayub, M.A.Z. (2006) Statistical optimization of thermo-tolerant xylanase activity from Amazon isolated *Bacillus circulans* on solid-state cultivation. *Bioresour Technol* **97**: 1902–1906.

Heng, H. (2014) Xylanase Production by Bacillus subtilis in Cost-Effective Medium Using Soybean Hull as Part of Medium Compostion under Submerged Fermentation (Smf) and Solid State Fermentation (SsF). *Journal of Biodiversity, Bioprospecting and Development* **02**.

Herrera-Estrella, A., and Chet, I. (1999) Chitinases in biological control. *EXS* **87**: 171–184.

Hollensteiner, J., Wemheuer, F., Harting, R., Kolarzyk, A.M., Diaz Valerio, S.M., Poehlein, A., *et al.* (2017) *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus weihenstephanensis* Inhibit the Growth of Phytopathogenic Verticillium Species. *Frontiers in Microbiology* **7** https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2016.02171. Accessed March 2, 2024.

Horikoshi, K. (2011) Introduction and History of Alkaliphiles. In *Extremophiles Handbook*. Horikoshi, K. (ed.). Springer Japan, Tokyo. pp. 19–26 http://link.springer.com/10.1007/978-4-431-53898-1_2. Accessed February 28, 2024.

Hou, J., Aydemir, B.E., and Dumanli, A.G. (2021) Understanding the structural diversity of chitins as a versatile biomaterial. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **379**: 20200331.

Houde, A., Kademi, A., and Leblanc, D. (2004) Lipases and their industrial applications. *Appl Biochem Biotechnol* **118**: 155–170.

Hrmová, M., Biely, P., and Vršanská, M. (1989) Cellulose- and xylan-degrading enzymes of *Aspergillus terreus* and *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology* **11**: 610–616.

Hsieh, Y.S.Y., and Harris, P.J. (2019) Xylans of Red and Green Algae: What Is Known about Their Structures and How They Are Synthesised? *Polymers* **11**: 354.

Huang, C.-J., Wang, T.-K., Chung, S.-C., and Chen, C.-Y. (2005) Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28-9. *J Biochem Mol Biol* **38**: 82–88.

Ikram-ul-Haq, null, Ashraf, H., Iqbal, J., and Qadeer, M.A. (2003) Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium. *Bioresour Technol* **87**: 57–61.

Irfan, M., Asghar, U., Nadeem, M., Nelofer, R., and Syed, Q. (2016) Optimization of process parameters for xylanase production by *Bacillus sp.* in submerged fermentation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* **9**: 139–147.

Irfan, M., Nadeem, M., and Syed, Q. (2014) One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride*-IR05 in solid-state fermentation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* **7**: 317–326.

Issa, Q.M. (2016) Optimization, Production and Antifungal Activity of Chitinase Produced by *Trichoderma harezianum*. *JoBRC* **10**: 16–24.

Jahangiri, R., Jamialahmadi, K., Behravan, J., and Najafi, M. (2019) Purification and partial characterization of chitinase from a novel strain *Aeromonas sp.* PTCC 1691. .

Jalal, A., Rashid, N., Rasool, N., and Akhtar, M. (2009) Gene cloning and characterization of a xylanase from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain R5. *Journal of bioscience and bioengineering* **107**: 360–5.

Janaki, T., Nayak, B., and Ganesan, T. (2014) Different Pre-Treatment methods in Selective Isolation of Actinomycetes from Mangrove Sediments of Ariyankuppam Back water Estuary, Puducherry. https://www.semanticscholar.org/paper/Different-Pre-Treatment-methods-in-Selective-of-of-Janaki-Nayak/fc05cf23c3cf1ccc3dd9a4a6debbded9a29794ff. Accessed March 6, 2024.

Jangid, K., Whitman, W., Condron, L.M., Turner, B., and Williams, M. (2013) Progressive and retrogressive ecosystem development coincide with soil bacterial community change in a dune system under lowland temperate rainforest in New Zealand. *Plant and Soil* **367**: 235.

Jegannathan, K.R., and Nielsen, P.H. (2013) Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. *Journal of Cleaner Production* **42**: 228–240.

Jha, S., and Modi, H.A. (2018b) Statistical optimization of chitinase production by *Streptomyces rubiginosus* SP24 and efficacy of purified chitinase to control root-knot nematode infection in Vigna radiata under controlled conditions. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* **5**: 20.

Jiang, Y., Li, Q., Chen, X., and Jiang, C. (2016) Isolation and Cultivation Methods of Actinobacteria. In *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. IntechOpen, https://www.intechopen.com/chapters/49207. Accessed March 4, 2024.

Jj, L., Kb, W., Om, T., N, F.-B., X, Y., D, B., *et al.* (2017) Removal of glucuronic acid from xylan is a strategy to improve the conversion of plant biomass to sugars for bioenergy. *Biotechnology for biofuels* **10** https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28932265/. Accessed October 24, 2024.

Johnson, E., Villa, T., Lewis, M., and Phaff, H. (1978) Simple method for the isolation of astaxanthin from the basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma*. *Applied and environmental microbiology* **35**: 1155–9.

Jordaan, K., Lappan, R., Dong, X., Aitkenhead, I.J., Bay, S.K., Chiri, E., *et al.* (2020) Hydrogen-Oxidizing Bacteria Are Abundant in Desert Soils and Strongly Stimulated by Hydration. *mSystems* **5**: 10.1128/msystems.01131-20.

Jordan, D.B., and Wagschal, K. (2010) Properties and applications of microbial β-D-xylosidases featuring the catalytically efficient enzyme from *Selenomonas ruminantium*. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**: 1647–1658.

Juturu, V., and Wu, J.C. (2012) Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances* **30**: 1219–1227.

Kamble, R., and Jadhav, A. (2012) Isolation, Purification, and Characterization of Xylanase Produced by a New Species of *Bacillus* in Solid State Fermentation. *International journal of microbiology* **2012**: 683193.

Kamil, Z., Rizk, M., Mohamed, M., and Moustafa, S. (2007) Isolation and Identification of Rhizosphere Soil Chitinolytic Bacteria and their Potential in Antifungal Biocontrol. *Global J Mol Sci* **2**.

Kang, S.W., Park, Y.S., Lee, J.S., Hong, S.I., and Kim, S.W. (2004) Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* **91**: 153–156.

Kao, P.-M., Chen, C.-I., Huang, S.-C., Chang, Y.-C., Tsai, P.-J., and Liu, Y.-C. (2007) Effects of shear stress and mass transfer on chitinase production by *Paenibacillus* sp. CHE-N1. *Biochemical Engineering Journal* **34**: 172–178.

Kapilan, R., and Arasaratnam, V. (2010) A Novel *Bacillus pumilus* strain for alkaline xylanase production at and above 40oC. *Ceylon Journal of Science (Bio Science)* **39**: 61–70.

Kapilan, R., and Arasaratnam, V. (2014) Purification of xylanase produced by *Bacillus pumilus*. *J Natn Sci Foundation Sri Lanka* **42**: 365.

Kapilan, R., and Arasaratnam, V. (2017) Industrial Applications of Bacterial Xylanases: A Review. *Middle-East Journal of Scientific Research* **25**: 79–89.

Kapoor, M., Nair, L.M., and Kuhad, R.C. (2008) Cost-effective xylanase production from free and immobilized *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in saccharification of *Prosopis juliflora*. *Biochemical Engineering Journal* **38**: 88–97.

Kapur, M.K., Solanki, R., and Lal, R. (2011) Selective isolation of rare actinomycetes producing novel antimicrobial compounds. *Int J Adv Biotechnol Res* **2**.

Karasuda, S., Tanaka, S., Kajihara, H., Yamamoto, Y., and Koga, D. (2003) Plant chitinase as a possible biocontrol agent for use instead of chemical fungicides. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**: 221–224.

Kasprzewska, A. (2003) Plant chitinases--regulation and function. *Cell Mol Biol Lett* **8**: 809–824.

Kavitha, A., and Vijayalakshmi, M. (2011) Partial purification and antifungal profile of chitinase produced by *Streptomyces tendae* TK-VL_333. *Ann Microbiol* **61**: 597–603.

Ketnawa, S., Benjakul, S., Martínez-Alvarez, O., and Rawdkuen, S. (2014) Three-phase partitioning and proteins hydrolysis patterns of alkaline proteases derived from fish viscera. *Separation and Purification Technology* **132**: 174–181.

Ketnawa, S., Rungraeng, N., and Rawdkuen, S. (2017) Phase partitioning for enzyme separation: An overview and recent applications. *International Food Research Journal* **24**: 1–24.

Kgosi, V.T., Tingting, B., Ying, Z., and Liu, H. (2022) Anti-Fungal Analysis of *Bacillus subtilis* DL76 on Conidiation, Appressorium Formation, Growth, Multiple Stress Response, and Pathogenicity in Magnaporthe oryzae. *Int J Mol Sci* **23**: 5314.

Khan, M.A., Hamid, R., Ahmad, M., Abdin, M.Z., and Javed, S. (2010) Optimization of culture media for enhanced chitinase production from a novel strain of *Stenotrophomonas maltophilia* using response surface methodology. *J Microbiol Biotechnol* **20**: 1597–1602.

Khan, N., Martínez-Hidalgo, P., Ice, T.A., Maymon, M., Humm, E.A., Nejat, N., *et al.* (2018) Antifungal Activity of *Bacillus* Species Against *Fusarium* and Analysis of the Potential Mechanisms Used in Biocontrol. *Front Microbiol* **9** https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2018.02363/full. Accessed March 19, 2024.

Khandeparker, R., Parab, P., and Amberkar, U. (2017) Recombinant Xylanase from *Bacillus tequilensis* BT21: Biochemical Characterisation and Its Application in the Production of Xylobiose from Agricultural Residues. *Food Technol Biotechnol* **55**: 164–172.

Khandeparker, R., Verma, P., and Deobagkar, D. (2011) A novel halotolerant xylanase from marine isolate *Bacillus subtilis* cho40: gene cloning and sequencing. *N Biotechnol* **28**: 814–821.

Kheder, F. (2007) Production et purification d'acide férulique estérases. Application à la synthèse d'esters phénoliques. .

Khelil, O. (2017) Production de cellulase et d'enzymes associées par des souches de Bacillus. https://www.ccdz.cerist.dz/admin/notice.php?id=000000000000000858609000903. Accessed March 3, 2024.

Khleekorn, S., and Wongrueng, S. (2014) Evaluation of antagonistic bacteria inhibitory to Colletotrichum musae on banana. *International Journal of Agricultural Technology* https://www.semanticscholar.org/paper/Evaluation-of-antagonistic-bacteria-inhibitory-to-Khleekorn-Wongrueng/21868ccf06f3e4a33951ee627d1642a9a9e1f7df. Accessed March 4, 2024.

Khursade, P.S., Galande, S.H., Shiva Krishna, P., and Prakasham, R.S. (2019) *Stenotrophomonas maltophilia* Gd2: A potential and novel isolate for fibrinolytic enzyme production. *Saudi J Biol Sci* **26**: 1567–1575.

Khusro, A., Kaliyan, B.K., Al-Dhabi, N.A., Arasu, M.V., and Agastian, P. (2016) Statistical optimization of thermo-alkali stable xylanase production from *Bacillus tequilensis* strain ARMATI. *Electronic Journal of Biotechnology* **22**: 16–25.

Kiddinamoorthy, J., Anceno, A., Desse Haki, G., and Rakshit, S. (2008) Production, purification and characterization of *Bacillus sp.* GRE7 xylanase and its application in eucalyptus Kraft pulp biobleaching. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **24**: 605–612.

Kim, K.-J., Yang, Y.-J., and Kim, J.-G. (2003) Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces sp.* M-20. *J Biochem Mol Biol* **36**: 185–189.

Kim, Y.H., Park, S.K., Hur, J.Y., and Kim, Y.C. (2017) Purification and Characterization of a Major Extracellular Chitinase from a Biocontrol Bacterium, *Paenibacillus elgii* HOA73. *Plant Pathol J* **33**: 318–328.

Kishore, G.K., and Pande, S. (2007) Chitin-supplemented foliar application of chitinolytic *Bacillus cereus* reduces severity of Botrytis gray mold disease in chickpea under controlled conditions. *Lett Appl Microbiol* **44**: 98–105.

Ko, C.-H., Tsai, C.-H., Lin, P.-H., Chang, K.-C., Tu, J., Wang, Y.-N., and Yang, C.-Y. (2010) Characterization and pulp refining activity of a *Paenibacillus campinasensis* cellulase expressed in *Escherichia coli*. *Bioresource Technology* **101**: 7882–7888.

Köberl, M., Müller, H., Ramadan, E.M., and Berg, G. (2011a) Desert Farming Benefits from Microbial Potential in Arid Soils and Promotes Diversity and Plant Health. *PLOS ONE* **6**: e24452.

Köberl, M., Müller, H., Ramadan, E.M., and Berg, G. (2011b) Desert Farming Benefits from Microbial Potential in Arid Soils and Promotes Diversity and Plant Health. *PLOS ONE* **6**: e24452.

Kormelink, F.J.M. (1992) *Characterization and mode of action of xylanases and some accessory enzymes*. .

Köstekçi, S., Aygan, A., Comlekcioglu, N., and Sariturk, S. (2022) Alkaline Cellulase Free Xylanase From *Bacillus sp.* Asx42: Properties, Purification And Its Effect On Seed Germination. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 8.

Kottek, M., Grieser, J., Beck, C., Rudolf, B., and Rubel, F. (2006) World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *metz* **15**: 259–263.

Kramer, K.J., and Muthukrishnan, S. (1997) Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochem Mol Biol* **27**: 887–900.

Krishna, C., and Nokes, S. (2001) Influence of inoculum size on phytase production and growth in solid-state fermentation by *Aspergillus niger*. *Transactions of the ASAE* **44**.

Kuddus, M. (2019) Chapter 1 - Introduction to Food Enzymes. In *Enzymes in Food Biotechnology*. Kuddus, M. (ed.). Academic Press, pp. 1–18 https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128132807000013. Accessed February 28, 2024.

Kuhad, R., Gupta, R., and Singh, A. (2011) Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme research* **2011**: 280696.

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

Kumar, A., Dhar, K., Kanwar, S.S., and Arora, P.K. (2016) Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. *Biol Proced Online* **18**: 2.

Kumar, D., Verma, R., Sharma, priyanka, Rana, A., Sharma, R., Prakash, C., and Bhalla, T. (2010) Production and partial purification of xylanase from a new thermophilic isolate *Bacillus pumilus* SILB-X MTCC 8964. *Biological forum- An International Journal* **2**: 83–87.

Kumar, D.P., Singh, R.K., Anupama, P.D., Solanki, M.K., Kumar, S., Srivastava, A.K., *et al.* (2012) Studies on Exo-Chitinase Production from *Trichoderma asperellum* UTP-16 and Its Characterization. *Indian J Microbiol* **52**: 388–395.

Kumar, L., Kumar, D., Nagar, S., Gupta, R., Garg, N., Kuhad, R.C., and Gupta, V.K. (2014a) Modulation of xylanase production from alkaliphilic *Bacillus pumilus* VLK-1 through process optimization and temperature shift operation. *3 Biotech* **4**: 345.

Kumar, L., Nagar, Dr.S., Mittal, A., Garg, N., and Gupta, V. (2014b) Immobilization of xylanase purified from *Bacillus pumilus* VLK-1 and its application in enrichment of orange and grape juices. *Journal of Food Science and Technology* **51**: 1–13.

Kumar, M., Brar, A., Yadav, M., Chawade, A., Vivekanand, V., and Pareek, N. (2018) Chitinases—Potential Candidates for Enhanced Plant Resistance towards Fungal Pathogens. *Agriculture* **8**: 88.

Kumar, M., Mukherjee, J., Sinha, M., Kaur, P., Sharma, S., Gupta, M.N., and Singh, T.P. (2015) Enhancement of stability of a lipase by subjecting to three phase partitioning (TPP): structures of native and TPP-treated lipase from *Thermomyces lanuginosa*. *Sustain Chem Process* **3**: 1–10.

Kumar, P., Gupta, A., Dhakate, S.R., Mathur, R.B., Nagar, S., and Gupta, V.K. (2013) Covalent immobilization of xylanase produced from *Bacillus pumilus* SV-85S on electrospun polymethyl methacrylate nanofiber membrane. *Biotechnol Appl Biochem* **60**: 162–169.

Kumar, P., Khare, S., and Dubey, R.C. (2012) Diversity of Bacilli from Disease Suppressive Soil and their Role in Plant Growth Promotion and Yield Enhancement. *New York Science Journal , 2012; 5(1)* **5**: 90–111.

Kumar, R., Kumar, A., Nagpal, R., Sharma, J., and Kumari, A. (2010) A novel and sensitive plate assay for screening of tannase-producing bacteria. *Annals of microbiology* **60**: 177–179.

Kumar, R.R., and Jadeja, V.J. (2016) Isolation of Actinomycetes: A Complete Approach. *IntJCurrMicrobiolAppSci* **5**: 606–618.

Kumar, S., Haq, I., Prakash, J., Singh, S.K., Mishra, S., and Raj, A. (2017) Purification, characterization and thermostability improvement of xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens* and its application in pre-bleaching of kraft pulp. *3 Biotech* **7**: 20.

Kumar, S.S., Sreekumar, R., and Sabu, A. (2019) Tannase and Its Applications in Food Processing. In *Green Bio-processes: Enzymes in Industrial Food Processing*. Parameswaran, B., Varjani, S., and Raveendran, S. (eds). Springer, Singapore. pp. 357–381 https://doi.org/10.1007/978-981-13-3263-0_19. Accessed February 29, 2024.

Kumar, V., Chhabra, D., and Shukla, P. (2017d) Xylanase production from *Thermomyces lanuginosus* VAPS-24 using low cost agro-industrial residues via hybrid optimization tools and its potential use for saccharification. *Bioresource Technology* **243**: 1009–1019.

Kumar, V., and Satyanarayana, T. (2013) Biochemical and thermodynamic characteristics of thermo-alkali-stable xylanase from a novel polyextremophilic *Bacillus halodurans* TSEV1. *Extremophiles* **17**: 797–808.

Kumla, J., Suwannarach, N., Sujarit, K., Penkhrue, W., Kakumyan, P., Jatuwong, K., *et al.* (2020) Cultivation of Mushrooms and Their Lignocellulolytic Enzyme Production Through the Utilization of Agro-Industrial Waste. *Molecules* **25**: 2811.

Kummari, R., Puja, R., and Bose, K. (2022) Protein Quantitation and Detection. In *Textbook on Cloning, Expression and Purification of Recombinant Proteins*. Springer, Singapore, pp. 279–299 https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-16-4987-5_11. Accessed October 10, 2024.

Kurrataa'yun, Yopi, and Meryandini, A. (2015) Characterization of Xylanase activity produced by *Paenibacillus* sp. XJ18 from TNBD Jambi, Indonesia. *HAYATI Journal of Biosciences* **22**: 20–26.

Küster, E., and Williams, S.T. (1964) Selection of Media for Isolation of Streptomycetes. *Nature* **202**: 928–929.

Kutasi, J., Bata, A., Brydl, E., Rafai, P., and Jurkovich, V. (2001) Characterisation and effects of a xylanase enzyme preparation extracted from *Thermomyces lanuginosus* cultures. *Acta Vet Hung* **49**: 175–184.

Kuzu, S.B., Güvenmez, H.K., and Denizci, A.A. (2012) Production of a Thermostable and Alkaline Chitinase by *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki Strain HBK-51. *Biotechnol Res Int* **2012**: 135498.

Kyu, K.L., Ratanakhanokchai, K., Uttapap, D., and Tanticharoen, M. (1994) Induction of xylanase in *Bacillus circulans* B6. *Bioresource Technology* **48**: 163–167.

Lacap-Bugler, D.C., Lee, K.K., Archer, S., Gillman, L.N., Lau, M.C.Y., Lee, C.K., *et al.* (2017) Global Diversity of Desert Hypolithic Cyanobacteria. *Front Microbiol* **8**: 248744.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.

Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmaeel, Q., El Hamss, H., *et al.* (2022) Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective. *Microorganisms* **10**: 596.

Langner, T., and Göhre, V. (2016) Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions. *Curr Genet* **62**: 243–254.

Laribi-Habchi, H., Bouacem, K., Allala, F., Jabeur, F., Selama, O., Mechri, S., *et al.* (2020) Characterization of chitinase from *Shewanella inventionis* HE3 with bio-insecticidal effect against granary weevil, *Sitophilus granarius* Linnaeus (Coleoptera: *Curculionidae*). *Process Biochemistry* **97**: 222–233.

Laribi-Habchi, H., Bouanane-Darenfed, A., Drouiche, N., Pauss, A., and Mameri, N. (2015) Purification, characterization, and molecular cloning of an extracellular chitinase from *Bacillus licheniformis* stain LHH100 isolated from wastewater samples in Algeria. *Int J Biol Macromol* **72**: 1117–1128.

Las-Casas, B., Martinazzo, A.P., Coca, B., Souza, A., and Teodoro, C. (2020) Optimization of production and partial characterization of xylanase from a newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens*. *Ciência e Natura* **42**: e9.

Latgé, J.-P. (2007) The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol* **66**: 279–290.

Lee, C.G., Da Silva, C.A., Dela Cruz, C.S., Ahangari, F., Ma, B., Kang, M.-J., *et al.* (2011) Role of Chitin and Chitinase/Chitinase-Like Proteins in Inflammation, Tissue Remodeling, and Injury. *Annu Rev Physiol* **73**: 10.1146/annurev-physiol-012110–142250.

Lee, C.-K., Jang, M.-Y., Park, H.R., Choo, G.-C., Cho, H.S., Park, S.-B., *et al.* (2016) Cloning and characterization of xylanase in cellulolytic *Bacillus sp.* strain JMY1 isolated from forest soil. *Appl Biol Chem* **59**: 415–423.

Lee, H.-J., Lee, Y.-S., and Choi, Y.-L. (2018) Cloning, purification, and characterization of an organic solvent-tolerant chitinase, MtCh509, from *Microbulbifer thermotolerans* DAU221. *Biotechnology for Biofuels* **11**: 303.

Lee, H.S., Han, D.S., Choi, S.J., Choi, S.W., Kim, D.S., Bai, D.H., and Yu, J.H. (2000) Purification, characterization, and primary structure of a chitinase from *Pseudomonas sp.* YHS-A2. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**: 397–405.

Lee, L.P., Karbul, H.M., Citartan, M., Gopinath, S.C.B., Lakshmipriya, T., and Tang, T.-H. (2015) Lipase-Secreting *Bacillus* Species in an Oil-Contaminated Habitat: Promising Strains to Alleviate Oil Pollution. *Biomed Res Int* **2015**: 820575.

Lee, Y.S., and Kim, K.Y. (2015) Statistical optimization of medium components for chitinase production by *Pseudomonas fluorescens* strain HN1205: role of chitinase on egg hatching inhibition of root-knot nematode. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13102818.2015.1010702. Accessed March 2, 2024.

Lertcanawanichakul, M., Wiwat, C., Bhumiratana, A., and Dean, D.H. (2004) Expression of chitinase-encoding genes in *Bacillus thuringiensis* and toxicity of engineered *B. thuringiensis* subsp. aizawai toward Lymantria dispar larvae. *Curr Microbiol* **48**: 175–181.

Lestari, P., Prihatiningsih, N., and Djatmiko, H. (2017) Partial biochemical characterization of crude extract extracellular chitinase enzyme from *Bacillus subtilis* B 298. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* **172**: 012041.

Lester, E., Satomi, M., and Ponce, A. (2007) Microflora of extreme arid Atacama Desert soils. *Soil Biology and Biochemistry* **39**: 704–708.

Li, H., Driesche, S. van den, Bunge, F., Yang, B., and Vellekoop, M.J. (2019) Optimization of on-chip bacterial culture conditions using the Box-Behnken design response surface methodology for faster drug susceptibility screening. *Talanta* **194**: 627–633.

Li, H., Xue, Y., Wu, J., Wu, H., Qin, G., Li, C., *et al.* (2016) Enzymatic hydrolysis of hemicelluloses from *Miscanthus* to monosaccharides or xylo-oligosaccharides by recombinant hemicellulases. *Industrial Crops and Products* **79**: 170–179.

Li, J., and Du, J. (2019) Molecular Characterization of Arabinoxylan from Wheat Beer, Beer Foam and Defoamed Beer. *Molecules* **24**: 1230.

Li, J.-G., Jiang, Z.-Q., Xu, L.-P., Sun, F.-F., and Guo, J.-H. (2008) Characterization of chitinase secreted by *Bacillus cereus* strain CH2 and evaluation of its efficacy against Verticillium wilt of eggplant. *BioControl* **53**: 931–944.

Li, S.-J., Hua, Z.-S., Huang, L.-N., Li, J., Shi, S.-H., Chen, L.-X., *et al.* (2014) Microbial communities evolve faster in extreme environments. *Sci Rep* **4**: 6205.

Li, Y., Liu, Z., Zhao, H., Xu, Y., and Cui, F. (2007a) Statistical optimization of xylanase production from new isolated *Penicillium oxalicum* ZH-30 in submerged fermentation. *Biochemical Engineering Journal* **34**: 82–86.

Li, Y., Lopez, P., Durand, P., Ouazzani, J., Badet, B., and Badet-Denisot, M.-A. (2007b) An enzyme-coupled assay for amidotransferase activity of glucosamine-6-phosphate synthase. *Analytical Biochemistry* **370**: 142–146.

Liang, T.-W., Chen, Y.-Y., Pan, P.-S., and Wang, S.-L. (2014) Purification of chitinase/chitosanase from *Bacillus cereus* and discovery of an enzyme inhibitor. *Int J Biol Macromol* **63**: 8–14.

Liao, H., Zheng, H., Li, S., Wei, Z., Mei, X., Ma, H., *et al.* (2015) Functional diversity and properties of multiple xylanases from *Penicillium oxalicum* GZ-2. *Scientific reports* **5**: 12631.

Liebs, P., Riedel, K., Graba, J.P., Schrapel, D., and Tischler, U. (1988) Formation of some extracellular enzymes during the exponential growth of *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiol (Praha)* **33**: 88–95.

Lin, X., Han, S., Zhang, N., Hu, H., Zheng, S., Ye, Y., and Lin, Y. (2013) Bleach boosting effect of xylanase A from *Bacillus halodurans* C-125 in ECF bleaching of wheat straw pulp. *Enzyme Microb Technol* **52**: 91–98.

Linares-Pastén, J.A., Aronsson, A., and Karlsson, E.N. (2018) Structural Considerations on the Use of Endo-Xylanases for the Production of prebiotic Xylooligosaccharides from Biomass. *Curr Protein Pept Sci* **19**: 48–67.

Link, H., and Weuster-Botz, D. (2011) Medium Formulation and Development. In *Comprehensive Biotechnology (Third Edition)*. pp. 199–213.

Littlechild, J.A. (2015) Enzymes from Extreme Environments and Their Industrial Applications. *Front Bioeng Biotechnol* **3**: 161.

Liu, B.-L., Kao, P.-M., Tzeng, Y.-M., and Feng, K.-C. (2003) Production of chitinase from *Verticillium lecanii* F091 using submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* **33**: 410–415.

Liu, C., Shen, N., Wu, J., Jiang, M., Shi, S., Wang, J., *et al.* (2020) Cloning, expression and characterization of a chitinase from *Paenibacillus chitinolyticus* strain UMBR 0002. *PeerJ* **8**: e8964.

Liu, D., Cai, J., Xie, C., Liu, C., and Chen, Y. (2010) Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri*, and its biocontrol potential. *Enzyme and Microbial Technology* **46**: 252–256.

Liu, J., Bai, H., Song, P., Nangong, Z., Dong, Z., Li, Z., and Wang, Q. (2022) Insecticidal Activity of Chitinases from *Xenorhabdus nematophila* HB310 and Its Relationship with the Toxin Complex. *Toxins (Basel)* **14**: 646.

Liu, N., Ru, Y., Tang, D., Xu, T., and Partridge, G. (2011) Effects of corn distillers dried grains with solubles and xylanase on growth performance and digestibility of diet components in broilers. *Fuel and Energy Abstracts* **163**: 260–266.

Loc, N.H., Huy, N.D., Quang, H.T., Lan, T.T., and Thu Ha, T.T. (2019) Characterisation and antifungal activity of extracellular chitinase from a biocontrol fungus, *Trichoderma asperellum* PQ34. *Mycology* **11**: 38–48.

Loc, N.H., Quang, H.T., Hung, N.B., Huy, N.D., Phuong, T.T.B., and Ha, T.T.T. (2011) *Trichoderma asperellum* Chi42 Genes Encode Chitinase. *Mycobiology* **39**: 182–186.

Lorito, M., Woo, S.L., Garcia, I., Colucci, G., Harman, G.E., Pintor-Toro, J.A., *et al.* (1998) Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7860–7865.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265–275.

Lu, Y., Fang, C., Wang, Q., Zhou, Y., Zhang, G., and Ma, Y. (2016) High-level expression of improved thermo-stable alkaline xylanase variant in Pichia Pastoris through codon optimization, multiple gene insertion and high-density fermentation. *Sci Rep* **6**: 37869.

Luo, Y., Yan, Z., Liu, S., Chen, J., Li, K., Mohammat, A., and Han, W. (2021) Variation in desert shrub foliar pH in relation to drought and salinity in Xinjiang, China. *Journal of Vegetation Science* **32**: e13031.

Lupetti, A., Boer, M.G.J. de, Erba, P., Campa, M., and Nibbering, P.H. (2011) Radiotracers for fungal infection imaging. *Med Mycol* **49 Suppl 1**: S62-69.

Maillard, F., Didion-Gency, M., Laure, F., Bach, C., and Buée, M. (2018) N-Acetylglucosaminidase activity, a functional trait of chitin degradation, is regulated differentially within two orders of ectomycorrhizal fungi: Boletales and Agaricales. *Mycorrhiza* **28**.

Makhalanyane, T.P., Valverde, A., Gunnigle, E., Frossard, A., Ramond, J.-B., and Cowan, D.A. (2015) Microbial ecology of hot desert edaphic systems. *FEMS Microbiology Reviews* **39**: 203–221.

Malakar, R. (2010) PULLULANASE: A POTENTIAL ENZYME FOR INDUSTRIAL APPLICATION. *International Journal of Biomedical Research* .

Malgas, S., Mafa, M.S., Mkabayi, L., and Pletschke, B.I. (2019) A mini review of xylanolytic enzymes with regards to their synergistic interactions during hetero-xylan degradation. *World J Microbiol Biotechnol* **35**: 187.

Malik, M.S., Rehman, A., Khan, I.U., Khan, T.A., Jamil, M., Rha, E.S., and Anees, M. (2023) Thermo-neutrophilic cellulases and chitinases characterized from a novel putative antifungal biocontrol agent: *Bacillus subtilis* TD11. *PLoS One* **18**: e0281102.

Maltman, C., and Yurkov, V. (2019) Extreme Environments and High-Level Bacterial Tellurite Resistance. *Microorganisms* **7** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6955997/. Accessed February 28, 2024.

Martínez, M.E., Jorquera, L., Poirrier, P., Díaz, K., and Chamy, R. (2023) Effect of Inoculum Size and Age, and Sucrose Concentration on Cell Growth to Promote Metabolites Production in Cultured Taraxacum officinale (Weber) Cells. *Plants (Basel)* **12**: 1116.

Martínez-Zavala, S.A., Barboza-Pérez, U.E., Hernández-Guzmán, G., Bideshi, D.K., and Barboza-Corona, J.E. (2020a) Chitinases of Bacillus thuringiensis: Phylogeny, Modular Structure, and Applied Potentials. *Frontiers in Microbiology* **10** https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.03032. Accessed March 1, 2024.

Mathew, G.M., Madhavan, A., Arun, K.B., Sindhu, R., Binod, P., Singhania, R.R., *et al.* (2021) Thermophilic Chitinases: Structural, Functional and Engineering Attributes for Industrial Applications. *Appl Biochem Biotechnol* **193**: 142–164.

Mathivanan, N., Kabilan, V., and Murugesan, K. (1998) Purification, characterization, and antifungal activity of chitinase from Fusarium chlamydosporum, a mycoparasite to groundnut rust, Puccinia arachidis. *Can J Microbiol* **44**: 646–651.

Mazumder, K., Peña, M.J., O'Neill, M.A., and York, W.S. (2012) Structural Characterization of the Heteroxylans from Poplar and Switchgrass. In *Biomass Conversion*. Himmel, M.E. (ed.). Humana Press, Totowa, NJ. pp. 215–228 https://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-956-3_19. Accessed May 16, 2024.

McHugh, T.A., Compson, Z., Gestel, N. van, Hayer, M., Ballard, L., Haverty, M., *et al.* (2017) Climate controls prokaryotic community composition in desert soils of the southwestern United States. *FEMS Microbiology Ecology* **93**: fix116.

Meddeb-Mouelhi, F., Moisan, J.K., and Beauregard, M. (2014) A comparison of plate assay methods for detecting extracellular cellulase and xylanase activity. *Enzyme Microb Technol* **66**: 16–19.

Meena, S., Gothwal, R., Saxena, J., Medicherla, K., and Ghosh, P. (2014) Chitinase production by a newly isolated thermotolerant *Paenibacillus sp* BISR-047. *Annals of Microbiology* **64**: 787–797.

Mendrofa, A., Munir, E., Yurnaliza, Y., Lutfia, A., and Hartanto, A. (2021) Chitinase and Antifungal Activity of Endophytic Fungi Isolated from Hedychium coronarium J. Koenig. **86**.

Menendez, E., Garcia-Fraile, P., Rivas, R., Menendez, E., Garcia-Fraile, P., and Rivas, R. (2015) Biotechnological applications of bacterial cellulases. *AIMSBOA* **2**: 163–182.

Menon, G., Mody, K., Keshri, J., and Jha, B. (2011) Isolation, Purification, and Characterization of Haloalkaline Xylanase from a Marine *Bacillus pumilus* Strain, GESF-1. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **15**: 998–1005.

Meriem, G., and Mahmoud, K. (2017) Optimization of chitinase production by a new *Streptomyces griseorubens* C9 isolate using response surface methodology. *Ann Microbiol* **67**: 175–183.

Merín, M.G., Martín, M.C., Rantsiou, K., Cocolin, L., and Ambrosini, V.I.M. de (2015) Characterization of pectinase activity for enology from yeasts occurring in Argentine Bonarda grape. *Braz J Microbiol* **46**: 815–823.

Merzendorfer, H., and Zimoch, L. (2003) Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J Exp Biol* **206**: 4393–4412.

Mesbah, N.M. (2022) Industrial Biotechnology Based on Enzymes From Extreme Environments. *Front Bioeng Biotechnol* **10**: 870083.

Mesbah, N.M., and Wiegel, J. (2012) Life under Multiple Extreme Conditions: Diversity and Physiology of the Halophilic Alkalithermophiles. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 4074.

Metcalfe, A.C., Krsek, M., Gooday, G.W., Prosser, J.I., and Wellington, E.M.H. (2002) Molecular analysis of a bacterial chitinolytic community in an upland pasture. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5042–5050.

Miller, G.L. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem* **31**: 426–428.

Moebius, N., Üzüm, Z., Dijksterhuis, J., Lackner, G., and Hertweck, C. (2014) Active invasion of bacteria into living fungal cells. *eLife* **3**: e03007.

Mohamed, H. (2015) Chitin extration, Composition of Different Six Insect Species and Their Comparable Characteristics with That of the Shrimp. *The journal of american science* **11**: 127–134.

Mohamed, H., Miloud, B., Zohra, F., García-Arenzana, J.M., Veloso, A., and Rodríguez-Couto, S. (2017) Isolation and Characterization of Actinobacteria from Algerian Sahara Soils with Antimicrobial Activities. *Int J Mol Cell Med* **6**: 109–120.

Mohamed, S., Bouacem, K., Mechri, S., Addou, N.A., Laribi-Habchi, H., Fardeau, M.-L., *et al.* (2019) Purification and biochemical characterization of a novel acido-halotolerant and thermostable endochitinase from *Melghiribacillus thermohalophilus* strain Nari2AT. *Carbohydr Res* **473**: 46–56.

Mohammadipanah, F., and Wink, J. (2016a) Actinobacteria from Arid and Desert Habitats: Diversity and Biological Activity. *Frontiers in Microbiology* **6** https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2015.01541. Accessed March 5, 2024.

Mohammadipanah, F., and Wink, J. (2016b) Actinobacteria from Arid and Desert Habitats: Diversity and Biological Activity. *Front Microbiol* **6**: 156935.

Monge, E.C., Tuveng, T.R., Vaaje-Kolstad, G., Eijsink, V.G.H., and Gardner, J.G. (2018) Systems analysis of the glycoside hydrolase family 18 enzymes from *Cellvibrio japonicus* characterizes essential chitin degradation functions. *J Biol Chem* **293**: 3849–3859.

Monreal, J., and Reese, E.T. (1969) The chitinase of Serratia marcescens. *Can J Microbiol* **15**: 689–696.

Morosoli, R., Durand, S., and Boucher, F. (1989) Stimulation of xylanase synthesis in *Cryptococcus albidus* by cyclic AMP. *FEMS Microbiology Letters* **57**: 57–60.

Motta, F.L., Andrade, C.C.P., Santana, M.H.A., Motta, F.L., Andrade, C.C.P., and Santana, M.H.A. (2013) A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. In *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*. IntechOpen, https://www.intechopen.com/chapters/44332. Accessed March 3, 2024.

Moubasher, A.H., Ismail, M.A., Mohamed, R.A., and Al-Bedak, O.A. (2019) Production and purification of extreme xylanase from *Aspergillus flavus* AUMC 10331 in sub-merged fermentation. https://zenodo.org/record/2586103. Accessed March 22, 2024.

Moussian, B. (2019) Chitin: Structure, Chemistry and Biology. *Adv Exp Med Biol* **1142**: 5–18.

Muley, A.B., Mulchandani, K.H., and Singhal, R.S. (2020) Immobilization of enzymes on iron oxide magnetic nanoparticles: Synthesis, characterization, kinetics and thermodynamics. *Methods Enzymol* **630**: 39–79.

Musilova, M., Wright, G., Ward, J., and Dartnell, L. (2015) Isolation of Radiation-Resistant Bacteria from Mars Analog Antarctic Dry Valleys by Preselection, and the Correlation between Radiation and Desiccation Resistance. *Astrobiology* **15**: 1076–1090.

Nagar, Dr.S., and Gupta, V. (2021) Hyper Production and Eco-Friendly Bleaching of Kraft Pulp by Xylanase From *Bacillus pumilus* SV-205 Using Agro Waste Material. *Waste and Biomass Valorization* **12**.

Nagar, Dr.S., Mittal, A., and Gupta, V. (2013) Enzymatic Clarification of Fruit Juices (Apple, Pineapple, and Tomato) Using Purified *Bacillus pumilus* SV-85S Xylanase. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **17**.

Nagar, S., Gupta, V.K., Kumar, D., Kumar, L., and Kuhad, R.C. (2010) Production and optimization of cellulase-free, alkali-stable xylanase by *Bacillus pumilus* SV-85S in submerged fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol* **37**: 71–83.

Nagar, S., Mittal, A., and Gupta, V.K. (2012a) Enzymatic clarification of fruit juices (Apple, Pineapple, and Tomato) using purified *Bacillus pumilus* SV-85S xylanase. *Biotechnol Bioproc E* **17**: 1165–1175.

Nagar, S., Mittal, A., Kumar, D., and Gupta, V.K. (2012b) Production of alkali tolerant cellulase free xylanase in high levels by *Bacillus pumilus* SV-205. *Int J Biol Macromol* **50**: 414–420.

Nair, S., Raveendran, S., and Shashidhar, S. (2010) Enzymatic bleaching of kraft pulp by xylanase from *Aspergillus sydowii* SBS 45. *Indian journal of microbiology* **50**: 332–8.

Najjarzadeh, N., Matsakas, L., Rova, U., and Christakopoulos, P. (2020) Effect of Oligosaccharide Degree of Polymerization on the Induction of Xylan-Degrading Enzymes by *Fusarium oxysporum* f. sp. Lycopersici. *Molecules* **25**: 5849.

Nakamura, S., Wakabayashi, K., Nakai, R., Aono, R., and Horikoshi, K. (1993) Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus sp.* strain 41M-1. *Appl Environ Microbiol* **59**: 2311–2316.

Narayana, K.J.P., and Vijayalakshmi, M. (2009) Chitinase Production by Streptomyces sp. ANU 6277. *Braz J Microbiol* **40**: 725–733.

Natsir, H., Patong, A., Suhartono, M., and Ahmad, A. (2010) Production and Characterization of Chitinase Enzymes from Sulili Hot Spring in South Sulawesi, *Bacillus licheniformis* HSA3-1a. *Indo J Chem* **10**: 263–267.

Navarro Llorens, J.M., Tormo, A., and Martínez-García, E. (2010) Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 476–495.

Nawani, N.N., and Kapadnis, B.P. (2001) One-step purification of chitinase from *Serratia marcescens* NK1, a soil isolate. *J Appl Microbiol* **90**: 803–808.

Nawani, N.N., Kapadnis, B.P., Das, A.D., Rao, A.S., and Mahajan, S.K. (2002) Purification and characterization of a thermophilic and acidophilic chitinase from *Microbispora sp.* V2. *Journal of Applied Microbiology* **93**: 965–975.

Neeraja, C., Anil, K., Purushotham, P., Suma, K., Sarma, P., Moerschbacher, B.M., and Podile, A.R. (2010) Biotechnological approaches to develop bacterial chitinases as a bioshield against fungal diseases of plants. *Crit Rev Biotechnol* **30**: 231–241.

Nevalainen, H., and Te'o, V. (2003) Enzyme Production in Industrial Fungi-Molecular Genetic Strategies for Integrated Strain Improvement. *Applied Mycology and Biotechnology* **3**: 241–259.

Nguyen, H.Q., Quyen, D.T., Nguyen, S.L.T., and Vu, V.H. (2015) An extracellular antifungal chitinase from *Lecanicillium lecanii*: purification, properties, and application in biocontrol against plant pathogenic fungi. *Turkish Journal of Biology* **39**: 6–14.

Nielsen, S.S. (2010) Phenol-Sulfuric Acid Method for Total Carbohydrates. In *Food Analysis Laboratory Manual*. Nielsen, S.S. (ed.). Springer US, Boston, MA. pp. 47–53 https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1463-7_6. Accessed March 4, 2024.

Nietupski, M., Ludwiczak, E., Cabaj, R., Purwin, C., and Kordan, B. (2021) Fatty Acids Present in Wheat Kernels Influence the Development of the Grain Weevil (*Sitophilus granarius* L.). *Insects* **12**: 806.

Nirmala, D., Yudha, P., and Cahyanto, D. (2021) The effect of pH and incubation time on rude protease enzymes activity of *Bacillus* mycoides from anchovy isolates (*Stolephorus sp.*). *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci* **679**: 012075.

Njenga, P., Mwaura, Jm, W., and Em, G. (2017) Methods of Isolating Actinomycetes from the Soils of Menengai Crater in Kenya. *Arch Clin Microbiol* **08** http://www.acmicrob.com/microbiology/methods-of-isolating-actinomycetes-from-thesoils-of-menengai-crater-in-kenya.php?aid=19330. Accessed March 6, 2024.

Noguez, A.M., Arita, H.T., Escalante, A.E., Forney, L.J., García-Oliva, F., and Souza, V. (2005) Microbial macroecology: highly structured prokaryotic soil assemblages in a tropical deciduous forest. *Global Ecology and Biogeography* **14**: 241–248.

Oarga, A. Life in extreme environments. .

Ó'Fágáin, C., Cummins, P.M., and O'Connor, B.F. (2017) Gel-Filtration Chromatography. *Methods Mol Biol* **1485**: 15–25.

O.Guerreiro, C., Paula, S., and Ferreira Filho, E. (2001) Production of xylan-degrading enzymes by a *Trichoderma harzianum* strain. *Brazilian Journal of Microbiology* **32**.

Okpara, M.O. (2022) Microbial Enzymes and Their Applications in Food Industry: A Mini-Review. *Advances in Enzyme Research* **10**: 23–47.

Oliveira, D.M. de, Finger-Teixeira, A., Rodrigues Mota, T., Salvador, V.H., Moreira-Vilar, F.C., Correa Molinari, H.B., *et al.* (2015) Ferulic acid: a key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis. *Plant Biotechnology Journal* **13**: 1224–1232.

Om, H. (2020) Role of Chitinases as a waste management to control global crisis. .

Onilude, A.A., Fadaunsi, I.F., and Garuba, E.O. (2012) Inulinase production by *Saccharomyces sp.* in solid state fermentation using wheat bran as substrate. *Ann Microbiol* **62**: 843–848.

Osbon, Y., Kumar, M., Osbon, Y., and Kumar, M. (2019) Biocatalysis and Strategies for Enzyme Improvement. In *Biophysical Chemistry - Advance Applications*. IntechOpen, https://www.intechopen.com/chapters/66503. Accessed February 28, 2024.

Otten, L.G., and Quax, W.J. (2005) Directed evolution: selecting today's biocatalysts. *Biomol Eng* **22**: 1–9.

Oyeleye, A., and Normi, Y.M. (2018) Chitinase: diversity, limitations, and trends in engineering for suitable applications. *Biosci Rep* **38**: BSR2018032300.

Özalpar, B., DemiRkan, E., and Sevgi, T. (2024) Obtaining Efficient Mutant from the Wild Type *Bacillus subtilis* E6-5 by Physical and Chemical Mutagenesis for High Efficiency Protease Production, Optimizing the Mutant's Culture Medium. *Gazi University Journal of Science* **37**: 1–14.

Ozer, A., Uzuner, U., Guler, H.I., Ay Sal, F., Belduz, A.O., Deniz, I., and Canakci, S. (2018) Improved pulp bleaching potential of *Bacillus subtilis* WB800 through overexpression of three lignolytic enzymes from various bacteria. *Biotechnol Appl Biochem* **65**: 560–571.

Özer, B., Akardere, E., Çelem, E.B., and Önal, S. (2010) Three-phase partitioning as a rapid and efficient method for purification of invertase from tomato. *Biochemical Engineering Journal* **50**: 110–115.

Pal, A., and Khanum, F. (2011) Identification and Optimization of Critical Medium Components Using Statistical Experimental Designs for Enhanced Production of Xylanase from *Aspergillus flavus* DFR-6. *Food Technology and Biotechnology* **49**: 228–236.

Pandya, U., and Saraf, M. (2015) Purification and characterization of antifungal chitinase from *Bacillus safensis* MBCU6 and its application for production of chito-oligosaccharides. *Biologia* **70**: 863–868.

Park, J.K., Morita, K., Fukumoto, I., Yamasaki, Y., Nakagawa, T., Kawamukai, M., and Matsuda, H. (1997) Purification and Characterization of the Chitinase (ChiA) from *Enterobacter sp.* G-l. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1271/bbb.61.684. Accessed March 12, 2024.

Parvathy Eswari, A., Anu Alias Meena, R., Yukesh Kannah, R., Sakthinathan, G., Karthikeyan, O.P., and Rajesh Banu, J. (2020) 22 - Bioconversion of marine waste biomass for biofuel and value-added products recovery. In *Refining Biomass Residues for Sustainable Energy and Bioproducts*. Kumar, R.P., Gnansounou, E., Raman, J.K., and Baskar, G. (eds). Academic Press, pp. 481–507 https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128189962000223. Accessed March 2, 2024.

Pasha, K.M., Anuradha, P., and Subbarao, D. (2013) Applications of Pectinases in Industrial Sector. 89–95.

Patel, A.K., Singhania, R.R., and Pandey, A. (2017) Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes. In *Biotechnology of Microbial Enzymes*. Elsevier, pp. 13–41 https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128037256000029. Accessed May 8, 2024.

Patel, K., and Dudhagara, P. (2020) Optimization of xylanase production by *Bacillus tequilensis* strain UD-3 using economical agricultural substrate and its application in rice straw pulp bleaching. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **30**: 101846.

Patel, V.B., Mori, J., McLean, B.A., Basu, R., Das, S.K., Ramprasath, T., *et al.* (2016) ACE2 Deficiency Worsens Epicardial Adipose Tissue Inflammation and Cardiac Dysfunction in Response to Diet-Induced Obesity. *Diabetes* **65**: 85–95.

Perez Oseguera, M.A., Guereca, L., and Lopez-Munguia, A. (1996) Properties of levansucrase from *Bacillus circulans*. *Appl Microbiol Biotechnol* **45**: 465–471.

Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., and Amorim, D.S. (2005) Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**: 577–591.

Poorna, A. (2012) Purification and Biochemical Characterization of Xylanases from *Bacillus pumilus* and their Potential for Hydrolysis of Polysaccharides. *Fermentation Technology* **01**.

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

Poria, V., Rana, A., Kumari, A., Grewal, J., Pranaw, K., and Singh, S. (2021a) Current Perspectives on Chitinolytic Enzymes and Their Agro-Industrial Applications. *Biology (Basel)* **10**: 1319.

Poria, V., Rana, A., Kumari, A., Grewal, J., Pranaw, K., and Singh, S. (2021b) Current Perspectives on Chitinolytic Enzymes and Their Agro-Industrial Applications. *Biology (Basel)* **10**: 1319.

Prade, R. (1996) Xylanases: from Biology to BioTechnology. *Biotechnology & genetic engineering reviews* **13**: 101–31.

Prapagdee, B., Kuekulvong, C., and Mongkolsuk, S. (2008) Antifungal Potential of Extracellular Metabolites Produced by *Streptomyces hygroscopicus* against Phytopathogenic Fungi. *Int J Biol Sci* **4**: 330–337.

Prapulla, S.G., and Karanth, N.G. (2014) Fermentation (Industrial): Recovery of Metabolites. In *Encyclopedia of Food Microbiology*. pp. 822–833.

Preston, L.J., and Dartnell, L.R. (2014) Planetary habitability: lessons learned from terrestrial analogues. *International Journal of Astrobiology* **13**: 81–98.

Purkarthofer, H., Sinner, M., and Steiner, W. (1993) Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization of production in submerged and solid-state culture. *Enzyme and Microbial Technology* **15**: 677–682.

R, J., A, N., M, M., Mu, H., H, M., I, U.H., and R, A. (2018) Extraction, Purification and Industrial Applications of Pectinase: A Review. *JBB* **1**: 1–6.

Rachmawaty, R., and M. Saleh, M. (2016) Characterization of crude chitinase produced by *Trichoderma virens* in solid state fermentation. Makassar, Indonesia. pp. 347–354 http://ojs.unm.ac.id/index.php/icmstea/article/view/2677/1415. Accessed March 14, 2024.

Raddadi, N., Cherif, A., Daffonchio, D., Neifar, M., and Fava, F. (2015) Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**: 7907–7913.

Rahayu, S., Tanuwidjaja, F., Rukayadi, Y., Suwanto, A., Suhartono, M., Hwang, J.K., and Pyun, Y. (2004) Study of thermostable chitinase enzymes from Indonesian *Bacillus* K29-14. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **14**: 647–652.

Rahman, A.K.M.S., Sugitani, N., Hatsu, M., and Takamizawa, K. (2011) A role of xylanase, α-L-arabinofuranosidase, and xylosidase in xylan degradation. *Canadian Journal of Microbiology* https://cdnsciencepub.com/doi/10.1139/w02-114. Accessed February 29, 2024.

Raj, A., Kumar, S., Singh, S.K., and Prakash, J. (2018) Production and purification of xylanase from alkaliphilic *Bacillus licheniformis* and its pretreatment of eucalyptus kraft pulp. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **15**: 199–209.

Rajeeva, S., and Lele, S.S. (2011) Three-phase partitioning for concentration and purification of laccase produced by submerged cultures of *Ganoderma sp. WR-1*. *Biochemical Engineering Journal* **54**: 103–110.

Rajendran, D.S., Th, A., Kumar, P., Venkataraman, S., Muthusamy, S., Vo, D.-V., *et al.* (2022) Three-phase partitioning for the separation of proteins, enzymes, biopolymers, oils and pigments: a review. *Environmental Chemistry Letters* **21**.

Ramalingam, P., Aswini, V., Pradeepa, P., Sriram, S., and Swathi, H. (2013) Partial purification and characterization of cellulase, pectinase and xylanase from *Penicillium chrysogenum*. *IOSR J Environ Sci Toxicol Food Technol* **5**: 48–59.

Ramos, O. (2010) 3.48 - Food-Grade Enzymes. In *Comprehensive Biotechnology*. pp. 555–569.

Ramos, P.M., Pedrão, M.R., Bell, L.C., and Scheffler, T.L. (2021) Early Postmortem Metabolism and Protease Activation in Fast Glycolytic and Slow Oxidative Bovine Muscles. *Meat and Muscle Biology* **5** https://www.iastatedigitalpress.com/mmb/article/id/12977/. Accessed February 28, 2024.

Rampelotto, P.H. (2013) Extremophiles and Extreme Environments. *Life : Open Access Journal* **3**: 482.

Rao, A.V., and Venkateswarlu, B. (1983) Microbial ecology of the soils of Indian desert. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **10**: 361–369.

Rashad, F.M., Fathy, H.M., El-Zayat, A.S., and Elghonaimy, A.M. (2015) Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematicidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. *Microbiol Res* **175**: 34–47.

Rashid, R., and Sohail, M. (2021) Xylanolytic *Bacillus* species for xylooligosaccharides production: a critical review. *Bioresources and Bioprocessing* **8**: 16.

Ratanakhanokchai, K., Kyu, K.L., and Tanticharoen, M. (1999) Purification and Properties of a Xylan-Binding Endoxylanase from Alkaliphilic *Bacillus sp.* Strain K-1. *Appl Environ Microbiol* **65**: 694–697.

Ratanakhanokchai, K., Waeonukul, R., Pason, P., Tachaapaikoon, C., Kyu, K.L., Sakka, K., *et al.* (2013) *Paenibacillus curdlanolyticus* Strain B-6 Multienzyme Complex: A Novel System for Biomass Utilization. In *Biomass Now - Cultivation and Utilization*. IntechOpen, https://www.intechopen.com/chapters/44405. Accessed February 29, 2024.

Rathore, A.S., and Gupta, R.D. (2015) Chitinases from Bacteria to Human: Properties, Applications, and Future Perspectives. *Enzyme Research* **2015** https://www.hindawi.com/journals/er/2015/791907/. Accessed March 2, 2024.

Ravindran, R., and Jose, L. (2014) Three phase partitioning - A novel protein purification method. *International Journal of ChemTech Research* **6**: 3467–3472.

Rawashdeh, R., Saadoun, I., and Mahasneh, A. (2005) Effect of cultural conditions on xylanase production by *Streptomyces sp.* (strain Ib 24D) and its potential to utilize tomato pomace. *ajb* **4** https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/15089. Accessed March 5, 2024.

Reddy, M.P.C., and Saritha, K.V. (2016) Effects of the culture media optimization on pectinase production by *Enterobacter sp.* PSTB-1. *3 Biotech* **6**: 207.

Regev, A., Keller, M., Strizhov, N., Sneh, B., Prudovsky, E., Chet, I., *et al.* (1996) Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against Spodoptera littoralis larvae. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3581–3586.

Ren, Y., Wee, K.E., and Chang, F.N. (2000) Deficiency of current methods in assaying endochitinase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **268**: 302–305.

Revah-Moiseev, S., and Carroad, P.A. (1981) Conversion of the enzymatic hydrolysate of shellfish waste chitin to single-cell protein. *Biotech & Bioengineering* **23**: 1067–1078.

Reyes-ramírez, A., Escudero-Abarca, B.I., Aguilar-Uscanga, G., Hayward-Jones, P.M., and Barboza-Corona, J.E. (2004) Antifungal Activity of *Bacillus thuringiensis* Chitinase and Its Potential for the Biocontrol of Phytopathogenic Fungi in Soybean Seeds. *Journal of Food Science* **69**: M131–M134.

Richana, N., Irawadi, T.T., Nur, M.A., Sailah, I., and Syamsu, K. (2007) The Process of Xylanase Production from *Bacillus pumilus* RXAIII-5. *Microbiol indones* **1**: 6–6.

Rifaat, H.M., Nagieb, Z.A., and Ahmed, Y.M. (2006) PRODUCTION OF XYLANASES BY STREPTOMYCES SPECIES AND THEIR BLEACHING EFFECT ON RICE STRAW PULP. *Applied Ecology and Environmental Research* https://www.semanticscholar.org/paper/PRODUCTION-OF-XYLANASES-BY-STREPTOMYCES-SPECIES-AND-Rifaat-Nagieb/ce312ed6a8e7df8a2cd3c1b669036e1ffe1aa1b0. Accessed July 21, 2024.

Rishad, K.S., Rebello, S., Shabanamol, P.S., and Jisha, M.S. (2017) Biocontrol potential of Halotolerant bacterial chitinase from high yielding novel *Bacillus pumilus MCB-7* autochthonous to mangrove ecosystem. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **137**: 36–41.

Roberts, W.K., and Selitrennikoff, C.P. (1988) Plant and Bacterial Chitinases Differ in Antifungal Activity. *Microbiology* **134**: 169–176.

Robinson, P.K. (2015) Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem* **59**: 1–41.

Rocha, E.P.C., Matic, I., and Taddei, F. (2002) Over-representation of repeats in stress response genes: a strategy to increase versatility under stressful conditions? *Nucleic Acids Res* **30**: 1886–1894.

Ronca, S., Ramond, J.-B., Jones, B., Seely, M., and Cowan, D. (2015) Namib Desert dune/interdune transects exhibit habitat-specific edaphic bacterial communities. *Frontiers in microbiology* **6**: 845.

Rosmine, E., Silvester, R., A.V., S., and Sainjan, N. (2018) Screening And Characterisation Of Xylanase Producing Aquatic *Streptomyces sp.* From The Sediments Of Cochin Backwater System. .

Rothschild, L.J., and Mancinelli, R.L. (2001) Life in extreme environments. *Nature* **409**: 1092–1101.

Roy, I., Sharma, A., and Gupta, M.N. (2004) Three-phase partitioning for simultaneous renaturation and partial purification of *Aspergillus niger* xylanase. *Biochim Biophys Acta* **1698**: 107–110.

Roy, J., Salaün, F., Giraud, S., Ferri, A., Guan, J., and Chen, G. (2017) Solubility of Chitin: Solvents, Solution Behaviors and Their Related Mechanisms. .

Ruttanasutja, P., and Pathom-aree, W. (2015) Selective isolation of cultivable actinomycetes from thai coastal marine sediment. https://www.semanticscholar.org/paper/Selective-isolation-of-cultivable-actinomycetes-Ruttanasutja-Pathom-aree/b2966f905701c1ff555f4ab5fccab7cc494df82a. Accessed March 6, 2024.

Saber, W.I.A., Ghoneem, K.M., Al-Askar, A.A., Rashad, Y.M., Ali, A.A., and Rashad, E.M. (2015) Chitinase production by *Bacillus subtilis* ATCC 11774 and its effect on biocontrol of Rhizoctonia diseases of potato. *Acta Biol Hung* **66**: 436–448.

Sabu, A., Kiran, G.S., and Pandey, A. (2005) Purification and Characterization of Tannin Acyl Hydrolase from *Aspergillus niger* ATCC 16620. .

Sachslehner, A., Nidetzky, B., Kulbe, K.D., and Haltrich, D. (1998) Induction of Mannanase, Xylanase, and Endoglucanase Activities in *Sclerotium rolfsii*. *Appl Environ Microbiol* **64**: 594–600.

Saeed, E.E., Sham, A., Salmin, Z., Abdelmowla, Y., Iratni, R., El-Tarabily, K., and AbuQamar, S. (2017) *Streptomyces globosus* UAE1, a Potential Effective Biocontrol Agent for Black Scorch Disease in Date Palm Plantations. *Front Microbiol* **8**: 1455.

Saha, B.C. (2003) Purification and properties of an extracellular β-xylosidase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. *Bioresource Technology* **90**: 33–38.

Sahai, A.S., and Manocha, M.S. (1993) Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiology Reviews* **11**: 317–338.

Saima, Kuddus, M., Roohi, and Ahmad, I.Z. (2013) Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* **11**: 39–46.

Saleem, M., Aslam, F., Akhtar, M.S., Tariq, M., and Rajoka, M.I. (2012) Characterization of a thermostable and alkaline xylanase from *Bacillus sp.* and its bleaching impact on wheat straw pulp. *World J Microbiol Biotechnol* **28**: 513–522.

Sandhya, C., Adapa, L.K., Nampoothiri, K.M., Binod, P., Szakacs, G., and Pandey, A. (2004) Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation. *J Basic Microbiol* **44**: 49–58.

Sanghi, A., Garg, N., Gupta, V.K., Mittal, A., and Kuhad, R.C. (2010) One-step purification and characterization of cellulase-free xylanase produced by alkalophilic *Bacillus subtilis* ash. *Braz J Microbiol* **41**: 467–476.

Santos, T. (2012) Up-To-Date Insight on Industrial Enzymes Applications and Global Market. *J Bioproces Biotechniq* .

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

Sathya, P. (2012) Efficient utilization of xylanase and lipase producing thermophilic marine actinomycetes (*Streptomyces albus* and *Streptomyces hygroscopicus*) in the production of ecofriendly alternative energy from waste. *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY* **11**.

Schoffelmeer, E.A., Klis, F.M., Sietsma, J.H., and Cornelissen, B.J. (1999) The cell wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet Biol* **27**: 275–282.

Schuster, M., Duringer, P., Ghienne, J.-F., Vignaud, P., Mackaye, H., Likius, A., and Brunet, M. (2006) The Age of the Sahara Desert. *Science (New York, NY)* **311**: 821.

Selbmann, L., Egidi, E., Isola, D., Onofri, S., Zucconi, L., Hoog, G.S. de, *et al.* (2013) Biodiversity, evolution and adaptation of fungi in extreme environments. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* **147**: 237–246.

Sena, A., Santos, A., Gouveia, M., Mello, M., Leite, T., Moreira, K., and Assis, S. (2014) Production, Characterization and Application of a Thermostable Tannase from *Pestalotiopsis guepinii* URM 7114. *Food Technology and Biotechnology* **52**: 459–467.

Senol, M., Nadaroglu, H., Dikbas, N., and Kotan, R. (2014) Purification of Chitinase enzymes from *Bacillus subtilis* bacteria TV-125, investigation of kinetic properties and antifungal activity against Fusarium culmorum. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **13**: 35.

Shaikh, S., Wani, S., Sayyed, R., Thakur, R., and Gulati, A. (2018) Production, purification and kinetics of chitinase of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from rhizospheric soil. *Indian journal of experimental biology* **56**: 274–278.

Shallom, D., and Shoham, Y. (2003) Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology* **6**: 219–228.

Sharma, A., Adhikari, S., and Satyanarayana, T. (2007) Alkali-thermostable and cellulase-free xylanase production by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans*. *World J Microbiol Biotechnol* **23**: 483–490.

Sharma, A., and Gupta, M.N. (2001) Purification of pectinases by three-phase partitioning. *Biotechnology Letters* **23**: 1625–1627.

Sharma, D.C., and Satyanarayana, T. (2012) Biotechnological Potential of Agro Residues for Economical Production of Thermoalkali-Stable Pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 by Solid-State Fermentation and Its Efficacy in the Treatment of Ramie Fibres. *Enzyme Research* **2012**: 1–7.

Sharma, N., and Sharma, N. (2021) Microbial Xylanases And Their Industrial Applications As Well As Future Perspectives: A Review. 5–12.

Sharma, R., Manda, R., Gupta, S., Kumar, S., and Kumar, V. (2013) Isolation and characterization of osmotolerant bacteria from Thar Desert of Western Rajasthan (India). *Revista de Biología Tropical* **61**: 1551–1562.

Shi, W., Dong, Z., Chen, G., Bai, Z., and Ma, F. (2022) Spatial and Temporal Variation of the Near-Surface Wind Environment in the Sahara Desert, North Africa. *Frontiers in Earth Science* **9** https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/feart.2021.789800. Accessed February 28, 2024.

Shikhman, A.R., Kuhn, K., Alaaeddine, N., and Lotz, M. (2001) N-acetylglucosamine prevents IL-1 beta-mediated activation of human chondrocytes. *J Immunol* **166**: 5155–5160.

Shivalee, A., Lingappa, K., and Mahesh, D. (2018) Influence of bioprocess variables on the production of extracellular chitinase under submerged fermentation by *Streptomyces pratensis* strain KLSL55. *J Genet Eng Biotechnol* **16**: 421–426.

Shrinivas, D., Savitha, G., Raviranjan, K., and Naik, G.R. (2010) A highly thermostable alkaline cellulase-free xylanase from thermoalkalophilic *Bacillus sp.* JB 99 suitable for paper and pulp industry: purification and characterization. *Appl Biochem Biotechnol* **162**: 2049–2057.

Shternshis, M.V., Beljaev, A.A., Shpatova, T.V., Bokova, J.V., and Duzhak, A.B. (2002) Field testing of BACTICIDE®, PHYTOVERM® and CHITINASE for control of the raspberry midge blight in Siberia. *BioControl* **47**: 697–706.

Shternshis, M.V., Beljaev, A.A., Shpatova, T.V., Duzhak, A.B., and Panfilova, Z.I. (2006) The Effect of Chitinase on *Didymella applanata*, the Causal Agent of Raspberry Cane Spur light. *Biocontrol* **51**: 311–322.

Shukla, E., Bendre, A.D., Gaikwad, S.M., Shukla, E., Bendre, A.D., and Gaikwad, S.M. (2022) Hydrolases: The Most Diverse Class of Enzymes. In *Hydrolases*. IntechOpen, https://www.intechopen.com/chapters/80269. Accessed May 8, 2024.

Siahmoshteh, F., Hamidi-Esfahani, Z., Spadaro, D., Shams-Ghahfarokhi, M., and Razzaghi-Abyaneh, M. (2018) Unraveling the mode of antifungal action of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* as potential biocontrol agents against aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Food Control* **89**: 300–307.

Sibero, M., Frederick, E., Sabdono, A., Wijayanti, D., Pringgenies, D., Radjasa, ocky karna, *et al.* (2022) First report of seaweed-associated yeast from Indonesia: Species composition and screening of their polysaccharides-degrading enzymes. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity* **23**: 1408–1419.

Silva, L.A.O., Terrasan, C.R.F., and Carmona, E.C. (2015) Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma inhamatum*. *Electronic Journal of Biotechnology* **18**: 307–313.

Sindhu, I., Chhibber, S., Capalash, N., and Sharma, P. (2006) Production of cellulase-free xylanase from Bacillus megaterium by solid state fermentation for biobleaching of pulp. *Curr Microbiol* **53**: 167–172.

Sindhu, S.S., and Dadarwal, K.R. (2001) Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. Cicer in chickpea. *Microbiological Research* **156**: 353–358.

Singh, J., and Kaur, P. (2012) Optimization of process parameters for cellulase production from *Bacillus sp.* JS14 in solid substrate fermentation using response surface methodology. *Braz arch biol technol* **55**: 505–512.

Singh, N., Malik, S., Gupta, A., and Srivastava, K.R. (2021) Revolutionizing enzyme engineering through artificial intelligence and machine learning. *Emerg Top Life Sci* **5**: 113–125.

Singh, P., and Kumar, S. (2019) Chapter 2 - Microbial Enzyme in Food Biotechnology. In *Enzymes in Food Biotechnology*. Kuddus, M. (ed.). Academic Press, pp. 19–28 https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128132807000025. Accessed February 28, 2024.

Singh, P.P., Shin, Y.C., Park, C.S., and Chung, Y.R. (1999) Biological control of fusarium wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology* **89**: 92–99.

Singh, R.K., Kumar, D.P., Solanki, M.K., Singh, P., Srivastva, A.K., Kumar, S., *et al.* (2013) Optimization of media components for chitinase production by chickpea rhizosphere associated *Lysinibacillus fusiformis* B-CM18. *J Basic Microbiol* **53**: 451–460.

Singh, S., Madlala, M., and Prior, B. (2003) Thermomyces lanuginosus: Properties of strains and their hemicellulases. *FEMS microbiology reviews* **27**: 3–16.

Sipriyadi, S., Wahyudi, A.T., Suhartono, M.T., and Meryandini, A. (2020) Optimization of Xylanase Production by *Streptomyces costaricanus* 45I-3 Using Various Substrates through Submerged Fermentation. *Microbiol indones* **14**: 5–5.

Sivakumar, M.V.K., and Stefanski, R. (2007) Climate and Land Degradation — an Overview. In *Climate and Land Degradation*. Sivakumar, M.V.K., and Ndiang'ui, N. (eds). Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 105–135 https://doi.org/10.1007/978-3-540-72438-4_6. Accessed February 28, 2024.

Soumaya, H. (2014) Production, optimisation et étude de xylanases chez une nouvelle souche d'Actinomycète thermophile isolée du compost de poulet. https://www.ccdz.cerist.dz/admin/notice.php?id=000000000000000838230000854. Accessed March 1, 2024.

Sridevi, A., Sandhya, A., Ramanjaneyulu, G., Narasimha, G., and Devi, P.S. (2016) Biocatalytic activity of *Aspergillus niger* xylanase in paper pulp biobleaching. *3 Biotech* **6**: 165.

Srivastava, R., and Srivastava, A.K. (1993) Characterization of a bacterial xylanase resistant to repression by glucose and xylose. *Biotechnol Lett* **15**: 847–852.

Stefańczyk, E., Sobkowiak, S., Brylińska, M., and Śliwka, J. (2016) Diversity of *Fusarium spp*. associated with dry rot of potato tubers in Poland. *European Journal of Plant Pathology* **145**.

Stomeo, F., Valverde, A., Pointing, S.B., McKay, C.P., Warren-Rhodes, K.A., Tuffin, M.I., *et al.* (2013) Hypolithic and soil microbial community assembly along an aridity gradient in the Namib Desert. *Extremophiles* **17**: 329–337.

Šťovíček, A., Kim, M., Or, D., and Gillor, O. (2017) Microbial community response to hydration-desiccation cycles in desert soil. *Sci Rep* **7**: 45735.

Stoykov, Y.M., Pavlov, A.I., and Krastanov, A.I. (2015) Chitinase biotechnology: Production, purification, and application. *Engineering in Life Sciences* **15**: 30–38.

Subbanna, A.R.N.S., Rajasekhara, H., Stanley, J., Mishra, K.K., and Pattanayak, A. (2018) Pesticidal prospectives of chitinolytic bacteria in agricultural pest management. *Soil Biology and Biochemistry* **116**: 52–66.

Subramanian, K., Sadaiappan, B., Wilson, A., Kumarappan, A., Thirunavukarasu, R., Srinivasan, P., *et al.* (2020) Bioconversion of chitin and concomitant production of chitinase and N-acetylglucosamine by novel *Achromobacter xylosoxidans* isolated from shrimp waste disposal area. *Scientific Reports* **11898**.

Subramaniyan, S., and Prema, P. (2002) Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Crit Rev Biotechnol* **22**: 33–64.

Suci, M., Arbianti, R., and Hermansyah, H. (2018) Lipase production from *Bacillus subtilis* with submerged fermentation using waste cooking oil. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci* **105**: 012126.

Suganthi, M., Senthilkumar, P., Arvinth, S., and Chandrashekara, K.N. (2017) Chitinase from *Pseudomonas fluorescens* and its insecticidal activity against Helopeltis theivora. *J Gen Appl Microbiol* **63**: 222–227.

Suginta, W., Chumjan, W., Mahendran, K.R., Janning, P., Schulte, A., and Winterhalter, M. (2013) Molecular Uptake of Chitooligosaccharides through Chitoporin from the Marine Bacterium *Vibrio harveyi*. *PLOS ONE* **8**: e55126.

Suhairin, A., Manap, M.Y., Hussin, A.S.M., and Mustafa, S. (2010) Phytase: application in food industry. https://www.semanticscholar.org/paper/Phytase%3A-application-in-food-industry-Suhairin-Manap/e87094fce73fb194892903c560bdd451910a1074. Accessed February 29, 2024.

Sysoev, M., Grötzinger, S.W., Renn, D., Eppinger, J., Rueping, M., and Karan, R. (2021) Bioprospecting of Novel Extremozymes From Prokaryotes—The Advent of Culture-Independent Methods. *Front Microbiol* **12** https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2021.630013/full. Accessed May 9, 2024.

Taechowisan, T., Peberdy, J., and Lumyong, S. (2003) Chitinase production by endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and its antagonism against phytopathogenic fungi. *Ann Microbiol* **53**.

Tahtamouni, M., Hameed, K., and Saadoun, I. (2006) Biological Control of *Sclerotinia sclerotiorum* Using Indigenous Chitinolytic Actinomycetes in Jordan. *The Plant Pathology Journal* **22**.

Tanaka, T., Fujiwara, S., Nishikori, S., Fukui, T., Takagi, M., and Imanaka, T. (1999) A unique chitinase with dual active sites and triple substrate binding sites from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. *Appl Environ Microbiol* **65**: 5338–5344.

Tangtua, J., Techapun, C., Pratanaphon, R., Kuntiya, A., Sanguanchaipaiwong, V., Chaiyaso, T., *et al.* (2017) Partial purification and comparison of precipitation techniques of pyruvate decarboxylase enzyme. **44**: 184–192.

Tasharrofi, N., Adrangi, S., Fazeli, M., Rastegar, H., Khoshayand, M.R., and Faramarzi, M.A. (2011) Optimization of Chitinase Production by *Bacillus pumilus* Using Plackett-Burman Design and Response Surface Methodology. *Iran J Pharm Res* **10**: 759–768.

Tayyaba, A., Pirzada, A., Asma, A., Siddiqui, N.N., and Shah, A.-Q. (2019) Influence of chemical stress on the stability of chitinase produced by *Glutamicibacter uratoxydans* KIBGE-IB41. *International Journal of Biology and Biotechnology* **16**: 261–266.

Teplitsky, A., Shulami, S., Moryles, S., Shoham, Y., and Shoham, G. (2000) Crystallization and preliminary X-ray analysis of an intracellular xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* **56**: 181–4.

Thomas, L., Ushasree, M.V., and Pandey, A. (2014) An alkali-thermostable xylanase from *Bacillus pumilus* functionally expressed in *Kluyveromyces lactis* and evaluation of its deinking efficiency. *Bioresource Technology* **165**: 309–313.

Thompson, S.E., Smith, M., Wilkinson, M.C., and Peek, K. (2001) Identification and characterization of a chitinase antigen from *Pseudomonas aeruginosa* strain 385. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4001–4008.

Thomson, J.A. (1993) Molecular biology of xylan degradation. *FEMS Microbiol Rev* **10**: 65–82.

Tiwari, R.K., Kumar, R., Sharma, S., Sagar, V., Aggarwal, R., Naga, K.C., *et al.* (2020) Potato dry rot disease: current status, pathogenomics and management. *3 Biotech* **10**: 503.

Toharisman, A., Suhartono, M.T., Spindler-Barth, M., Hwang, J.-K., and Pyun, Y.-R. (2005) Purification and characterization of a thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* Mb-2. *World J Microbiol Biotechnol* **21**: 733–738.

Topakas, E., Panagiotou, G., and Christakopoulos, P. (2013) 9. Xylanases: Characteristics, Sources, Production, and Applications. pp. 147–166.

Torsvik, V., and Øvreås, L. (2008) Microbial Diversity, Life Strategies, and Adaptation to Life in Extreme Soils. In *Microbiology of Extreme Soils*. Dion, P., and Nautiyal, C.S. (eds). Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 15–43 https://doi.org/10.1007/978-3-540-74231-9_2. Accessed February 28, 2024.

Toufiq, N., Tabassum, B., Bhatti, M.U., Khan, A., Tariq, M., Shahid, N., *et al.* (2018) Improved antifungal activity of barley derived chitinase I gene that overexpress a 32 kDa recombinant chitinase in *Escherichia coli* host. *Brazilian Journal of Microbiology* **49**: 414–421.

Tran, T.N., Doan, C.T., and Wang, S.-L. (2021) Conversion of Wheat Bran to Xylanases and Dye Adsorbent by *Streptomyces thermocarboxydus*. *Polymers (Basel)* **13**: 287.

Tuncer, M. (2000) Characterization of Endoxylanase Activity From *Thermomonospora Fusca* BD25. *Turk J Biol* **24**.

Tyagi, D., and Sharma, D.D. (2021) Production and Industrial Applications of Xylanase: A Review. *International Journal of Scientific Research* **7**.

Uffen, R.L. (1997) Xylan degradation: a glimpse at microbial diversity. *J Ind Microbiol Biotech* **19**: 1–6.

Ustin, S., Jacquemoud, S., Palacios-Orueta, A., li, L., and Whiting, M. (2009) Remote sensing based assessment of biophysical indicators for land degradation and desertification. *Recent Advances in Remote Sensing and Geoinformation Processing for Land Degradation Assessment* .

Utt, E.A., Eddy, C.K., Keshav, K.F., and Ingram, L.O. (1991) Sequencing and expression of the *Butyrivibrio fibrisolvens* xylB gene encoding a novel bifunctional protein with beta-D-xylosidase and alpha-L-arabinofuranosidase activities. *Appl Environ Microbiol* **57**: 1227–1234.

Vaaje-Kolstad, G., Horn, S.J., Sørlie, M., and Eijsink, V.G.H. (2013) The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens*--a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *FEBS J* **280**: 3028–3049.

Vaidya, R.J., Macmil, S.L.A., Vyas, P.R., and Chhatpar, H.S. (2003) The novel method for isolating chitinolytic bacteria and its application in screening for hyperchitinase producing mutant of *Alcaligenes xylosoxydans*. *Lett Appl Microbiol* **36**: 129–134.

Vanisree, C.R., Singh, P., Jadhav, E.B., Nair, M.S., Sankhla, M.S., Parihar, K., and Awasthi, K.K. (2022) Chapter 20 - Effect of climate change and soil dynamics on soil microbes and fertility of soil. In *Microbiome Under Changing Climate*. Kumar, A., Singh, J., and Ferreira, L.F.R. (eds). Woodhead Publishing, pp. 437–468 https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323905718000201. Accessed February 28, 2024.

Vega, L.M. de la, Barboza-Corona, J.E., Aguilar-Uscanga, M.G., and Ramírez-Lepe, M. (2006) Purification and characterization of an exochitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. aizawai and its action against phytopathogenic fungi. *Can J Microbiol* **52**: 651–657.

Veliz, E.A., Martínez-Hidalgo, P., and Hirsch, A.M. (2017) Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol. *AIMS Microbiol* **3**: 689–705.

Verma, D., and Satyanarayana, T. (2012) Molecular approaches for ameliorating microbial xylanases. *Bioresour Technol* **117**: 360–367.

Verma, D., and Satyanarayana, T. (2020) Xylanolytic Extremozymes Retrieved From Environmental Metagenomes: Characteristics, Genetic Engineering, and Applications. *Frontiers in Microbiology* **11**: 551109.

Verma, K., and Garg, N. (2022) ANTIFUNGAL ACTIVITY AND PROTOPLAST FORMATION BY CHITINASE PRODUCED FROM *Bacillus licheniformis* NK-7. .

Vetal, M., and Rathod, V. (2016) Ultrasound assisted three phase partitioning of peroxidase from waste orange peels. *Green Processing and Synthesis* **5**.

Victorino da Silva Amatto, I., Gonsales da Rosa-Garzon, N., Antônio de Oliveira Simões, F., Santiago, F., Pereira da Silva Leite, N., Raspante Martins, J., and Cabral, H. (2022) Enzyme engineering and its industrial applications. *Biotechnol Appl Biochem* **69**: 389–409.

Viel, M., Collet, F., and Lanos, C. (2018) Chemical and multi-physical characterization of agro-resources' by-product as a possible raw building material. *Industrial Crops and Products* **120**: 214–237.

Vijayaraghavan, P., Raj, S.R.F., and Vincent, S.G.P. (2016) Chapter 4 - Industrial Enzymes: Recovery and Purification Challenges. In *Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production*. Dhillon, G.S., and Kaur, S. (eds). Academic Press, San Diego. pp. 95–110 https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128023921000046. Accessed March 4, 2024.

Villarreal-Delgado, M.F., Villa-Rodríguez, E.D., Cira-Chávez, L.A., Estrada-Alvarado, M.I., Parra-Cota, F.I., and Santos-Villalobos, S. de los (2018) The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Mexican Journal of Phytopathology* **36** https://www.rmf.smf.org.mx/ojs/index.php/RMF/article/view/100. Accessed March 19, 2024.

Vyas, P., and Deshpande, M. (1991) Enzymatic hydrolysis of chitin by *Myrothecium verrucaria* chitinase complex and its utilization to produce SCP. *J Gen Appl Microbiol* **37**: 267–275.

Walia, A., Mehta, P., Guleria, S., and Shirkot, C.K. (2015) Modification in the properties of paper by using cellulase-free xylanase produced from alkalophilic *Cellulosimicrobium cellulans* CKMX1 in biobleaching of wheat straw pulp. *Can J Microbiol* **61**: 671–681.

Walia, A., Mehta, P., Guleria Sharma, S., Chauhan, A., and Parkash, J. (2017) Microbial xylanases and their application in pulp biobleaching: a review. *3Biotech* **7**.

Wang, K., Yan, P., and Cao, L. (2014a) Chitinase from a Novel Strain of *Serratia marcescens* JPP1 for Biocontrol of Aflatoxin: Molecular Characterization and Production Optimization Using Response Surface Methodology. *Biomed Res Int* **2014**: 482623.

Wang, L., Zhang, X., and Xu, S. (2020) Is salinity the main ecological factor that influences foliar nutrient resorption of desert plants in a hyper-arid environment? *BMC Plant Biol* **20**: 1–13.

Wang, M., Xing, Y., Wang, J., Xu, Y., and Wang, G. (2014b) The role of the chi1 gene from the endophytic bacteria *Serratia proteamaculans* 336x in the biological control of wheat take-all. *Can J Microbiol* **60**: 533–540.

Wang, S.-L., Hsiao, W.-J., and Chang, W.-T. (2002a) Purification and characterization of an antimicrobial chitinase extracellularly produced by *Monascus purpureus* CCRC31499 in a shrimp and crab shell powder medium. *J Agric Food Chem* **50**: 2249–2255.

Wang, S.-L., Liu, C.-P., and Liang, T.-W. (2012) Fermented and enzymatic production of chitin/chitosan oligosaccharides by extracellular chitinases from *Bacillus cereus* TKU027. *Carbohydrate Polymers* **90**: 1305–1313.

Wang, S.-L., Shih, I.-L., Liang, T.-W., and Wang, C.-H. (2002b) Purification and characterization of two antifungal chitinases extracellularly produced by *Bacillus amyloliquefacien*s V656 in a shrimp and crab shell powder medium. *J Agric Food Chem* **50**: 2241–2248.

Wang, Y.-J., Jiang, W.-X., Zhang, Y.-S., Cao, H.-Y., Zhang, Y., Chen, X.-L., *et al.* (2019) Structural Insight Into Chitin Degradation and Thermostability of a Novel Endochitinase From the Glycoside Hydrolase Family 18. *Front Microbiol* **10**: 2457.

Wen, C.-M., Tseng, C.-S., Cheng, C.-Y., and Li, Y.-K. (2002) Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus sp.* NCTU2. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **35**: 213–219.

Widowati, E., Utami, R., Mahadjoeno, E., and Saputro, G.P. (2017) Effect of temperature and pH on polygalacturonase production by pectinolytic bacteria *Bacillus licheniformis* strain GD2a in

submerged medium from Raja Nangka (*Musa paradisiaca* var. *formatypica*) banana peel waste. *IOP Conf Ser: Mater Sci Eng* **193**: 012018.

Wiesman, Z. (2009) Key characteristics of the desert environment. pp. 31–53.

Williams, M.G.C. for E.S.M.A.J., and Jr, I. of C.R.C.B. (1995) *Interactions of Desertification and Climate*. Hodder Education Publishers, London.

Wilson, K. (2010) Enzymes. In *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*. Cambridge University Press, pp. 581–624 https://www.cambridge.org/core/books/principles-and-techniques-of-biochemistry-and-molecular-biology/enzymes/10382334B13C92480C86AA1E10F9DABD. Accessed February 28, 2024.

Wiwat, C., Siwayaprahm, P., and Bhumiratana, A. (1999) Purification and characterization of chitinase from B*acillus circulans* No.4.1. *Curr Microbiol* **39**: 134–140.

Wiwat, C., Thaithanun, S., Pantuwatana, S., and Bhumiratana, A. (2000) Toxicity of chitinase-producing *Bacillus thuringiensis* ssp. kurstaki HD-1 (G) toward Plutella xylostella. *J Invertebr Pathol* **76**: 270–277.

Wong, K., and Saddler, J. (1992) Trichoderma Xylanases, Their Properties and Application. *Critical Reviews in Biotechnology - CRIT REV BIOTECHNOL* **12**: 413–435.

Wong, K.K., Tan, L.U., and Saddler, J.N. (1988) Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol Rev* **52**: 305–317.

Woo, C.-J., Yun, U.-J., and Park, H.-D. (1996) Isolation of Chitin-utilizing Bacterium and Production of Its Extracellular Chitinase. **6**: 439–444.

Woo, S., Donzelli, B., Scala, F., Mach, R., Harman, G., Kubicek, C., *et al.* (1999) Disruption of the ech42 (Endochitinase-Encoding) Gene Affects Biocontrol Activity in *Trichoderma harzianum* P1. *Molecular Plant-microbe Interactions - MOL PLANT MICROBE INTERACTION* **12**: 419–429.

Wörner, S., and Pester, M. (2019) Microbial Succession of Anaerobic Chitin Degradation in Freshwater Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **85**: e00963-19.

Xie, F., and Pathom-aree, W. (2021) Actinobacteria From Desert: Diversity and Biotechnological Applications. *Frontiers in Microbiology* **12** https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2021.765531. Accessed March 4, 2024.

Xu, J., Nogawa, M., Okada, H., and Morikawa, Y. (1998) Xylanase Induction by L-Sorbose in a Fungus, *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**: 1555–1559.

Xu, W., Wang, H., Lv, Z., Shi, Y., and Wang, Z. (2019) Antifungal activity and functional components of cell-free supernatant from *Bacillus amyloliquefaciens* LZN01 inhibit Fusarium oxysporum f. sp. niveum growth. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13102818.2019.1637279. Accessed March 19, 2024.

Y, H., B, Y., F, Z., X, M., and Z, L. (2009) Characterization of antifungal chitinase from marine *Streptomyces sp.* DA11 associated with South China Sea sponge Craniella australiensis. *Marine biotechnology (New York, NY)* **11** https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18626709/. Accessed July 22, 2024.

Yadav, P., Maharjan, J., Korpole, S., Prasad, G.S., Sahni, G., Bhattarai, T., and Sreerama, L. (2018) Production, Purification, and Characterization of Thermostable Alkaline Xylanase From *Anoxybacillus kamchatkensis* NASTPD13. *Front Bioeng Biotechnol* **6**: 65.

Yahiaoui, M., Laribi-Habchi, H., Bouacem, K., Asmani, K.-L., Mechri, S., Harir, M., *et al.* (2019) Purification and biochemical characterization of a new organic solvent-tolerant chitinase from *Paenibacillus timonensis* strain LK-DZ15 isolated from the Djurdjura Mountains in Kabylia, Algeria. *Carbohydrate Research* **483**: 107747.

Yang, R.C., MacKenzie, C.R., Bilous, D., and Narang, S.A. (1989) Identification of two distinct *Bacillus circulans* xylanases by molecular cloning of the genes and expression in Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol* **55**: 568–572.

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

Yeoman, C.J., Han, Y., Dodd, D., Schroeder, C.M., Mackie, R.I., and Cann, I.K.O. (2010) Chapter 1 - Thermostable Enzymes as Biocatalysts in the Biofuel Industry. In *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, pp. 1–55 https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065216410700010. Accessed February 29, 2024.

Yin, L.-J., Lin, H.-H., Chiang, Y.-I., and Jiang, S.-T. (2010) Bioproperties and Purification of Xylanase from *Bacillus sp.* YJ6. *J Agric Food Chem* **58**: 557–562.

Yin, W., Wang, Y., Liu, L., and He, J. (2019) Biofilms: The Microbial "Protective Clothing" in Extreme Environments. *Int J Mol Sci* **20**: 3423.

Yoon, S.-H., Ha, S.-M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., and Chun, J. (2017) Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* **67**: 1613–1617.

Yu, W.Q., Zheng, G.P., Qiu, D.W., Yan, F.C., Liu, W.Z., and Liu, W.X. (2019) Paenibacillus terrae NK3-4: A potential biocontrol agent that produces β-1,3-glucanase. *Biological Control* **129**: 92–101.

Zarei, M., Aminzadeh, S., Zolgharnein, H., Safahieh, A., Daliri, M., Noghabi, K.A., *et al.* (2011) Characterization of a chitinase with antifungal activity from a native *Serratia marcescens* B4A. *Braz J Microbiol* **42**: 1017–1029.

Zeng, J., Gao, X., Dai, Z., Tang, B., and Tang, X.-F. (2014) Effects of Metal Ions on Stability and Activity of Hyperthermophilic Pyrolysin and Further Stabilization of This Enzyme by Modification of a Ca2+-Binding Site. *Applied and Environmental Microbiology* **80**: 2763.

Zhang, B., Sun, Z., Jiang, D., and Niu, T. (2009) Isolation and purification of alkaline keratinase from *Bacillus sp.* 50-3. *ajb* **8** https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/60780. Accessed March 11, 2024.

Zhang, G., Mao, L., Zhao, Y., Xue, Y., and Ma, Y. (2010a) Characterization of a thermostable xylanase from an alkaliphilic *Bacillus sp. Biotechnol Lett* **32**: 1915–1920.

Zhang, G., Mao, L., Zhao, Y., Xue, Y., and Ma, Y. (2010b) Characterization of a thermostable xylanase from an alkaliphilic *Bacillus sp. Biotechnol Lett* **32**: 1915–1920.

Zhang, W., Ma, J., Yan, Q., Jiang, Z., and Yang, S. (2021) Biochemical characterization of a novel acidic chitinase with antifungal activity from *Paenibacillus xylanexedens* Z2-4. *Int J Biol Macromol* **182**: 1528–1536.

Zhang, Y., Zhou, Z., Liu, Y., Cao, Y., He, S., Huo, F., *et al.* (2013) High-yield production of a chitinase from *Aeromonas veronii* B565 as a potential feed supplement for warm-water aquaculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**: 1651.

Zhou, Y., Han, L.-R., He, H.-W., Sang, B., Yu, D.-L., Feng, J.-T., and Zhang, X. (2018) Effects of Agitation, Aeration and Temperature on Production of a Novel Glycoprotein GP-1 by *Streptomyces kanasenisi* ZX01 and Scale-Up Based on Volumetric Oxygen Transfer Coefficient. *Molecules* **23**: 125.

Zhu, L., Wu, Q., Dai, J., Zhang, S., and Wei, F. (2011) Evidence of cellulose metabolism by the giant panda gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 17714–17719.

Annexe 1

1. Réactifs DNS :

Dissoudre 1g de DNS (acide 3,5 dinitrosalycilique) dans 20 mL de NaOH (2N) et 50 mL d'eau distillée. Ajouter 30 g de tartrate double Na, K. Compléter à 100 Ml avec de l'eau distillée. Filtrer. Le réactif doit etre conservé à l'abri de la lumière (Miller, 1959).

2. Dosage des protéines :

Le dosage est effectuée selon la méthode de Lowry, (1951)

- **Solution A :** carbonate de sodium à 2% dans le NaOH 0.1N.
- **Solution B :** tartrate double de sodium et de potassium à 2% (w/v) dans l'eau distillée.
- **Solution C :** sulfate de cuivre à 1% (w/v) dans l'eau distillée.
- **Solution D :** 0,5 mL de C + 0,5 mL de B + 50 mL de A.
- **Solution E :** réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/3.

Le milieu réactionnel est préparé comme suit :

- 1 mL d'échantillon à doser
- Solution D : 5 mL

Le mélange a été agité et reposé pendant 10 min. Ensuite, la solution E a été ajouté. Après une deuxième agitation, le développement de la coloration est obtenu après une incubation de 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'absorbance à été mesuré à 750 nm.

3. Dosage des glucides :

Le dosage est effectuée selon la méthode Dubois, (1956)

Les solution utilisées :

- Solution de phénol à 5% dans l'eau distillée
- Acide sulfirique concentré

Le milieu réactionnel est préparé comme suit :

- 1 mL de la solution à doser
- 1 mL de la solution de phénol
- 5 mL d'acide sulfurique

Le mélange est agité et reposé pendant 30 min à température ambiante, L'absorbance à été mesuré à 490 nm.

Annexe 2

La technique électrophorétique :

- **Préparation du gel** : Le gel (12% d'acrylamide) est utilisé dans cette expérimentation, il est créé par la polymérisation d'acrylamide et de bis-acrylamide, en présence d'agents de polymérisation (TEMED, persulfate d'ammonium par exemple).

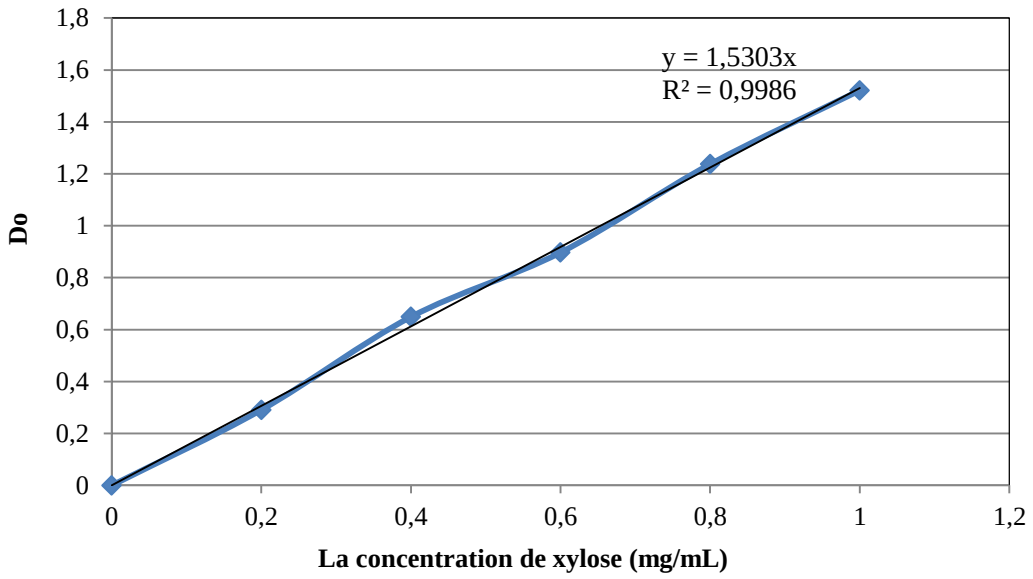
- **Dépôt des échantillons** : les échantillons d'enzymes sont déposés après dénaturation par chauffage à 100°C pendant 5 min.

- **Migration** : La migration des protéines a été effectué pendent 4 h, la séparation est réalisée en conditions dénaturantes par l'ajout de SDS, en se liant à la protéine, le SDS empêche son repliement et lui confère une charge nette négative, provoquant la migration vers l'anode.

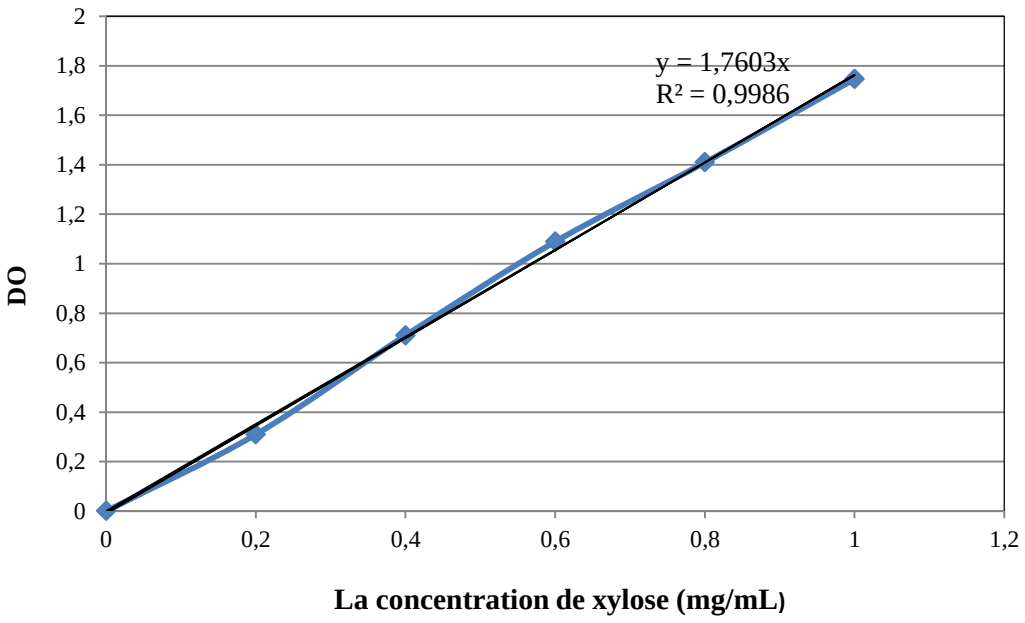
- **La révélation** : Une fois que les protéines ont été séparées, leur révélation sur le gel peut être effectuée en les colorant directement avec le Bleu de Coomassie. Cette coloration permet de visualiser toutes les protéines dans l'échantillon. Le gel coloré peut être ensuite transparisé à l'aide d'un mélange méthanol/acide acétique.

Annexe 3

1. La gamme d'étallonnage de N-acétylglucosamine



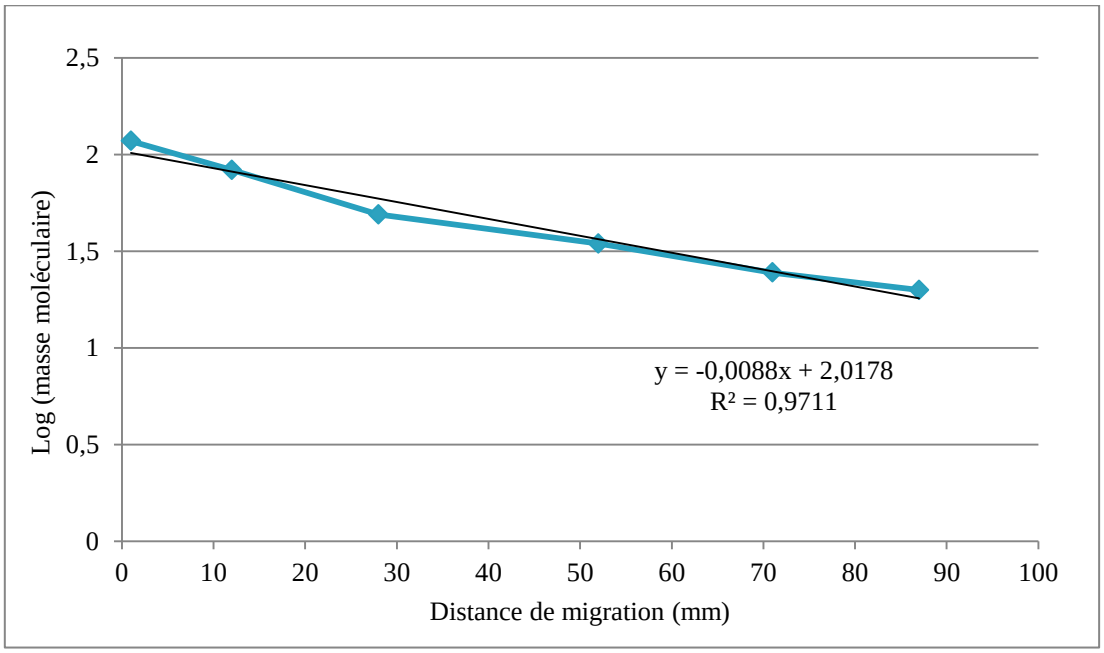
2. La gamme d'étallonnage de xylose



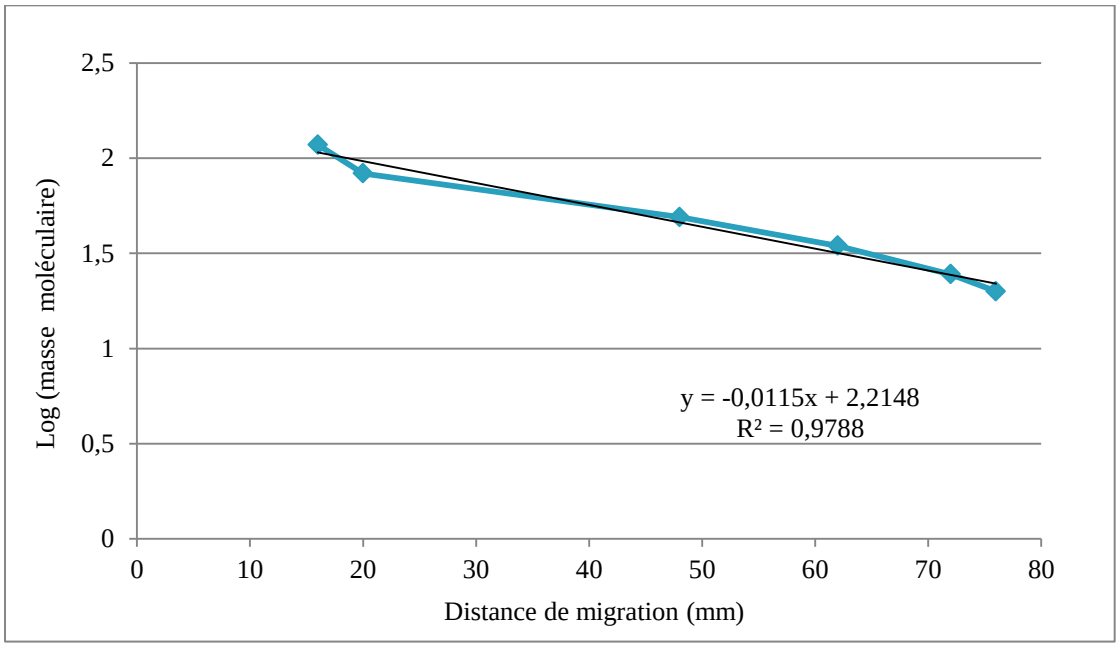
Annexe 4

Les courbes log (masse molaire) = f(distance de migration)

a. Chitinase



b. Xylanase



Annexe 5

Analyses de la variance

Tableau 1 : Analyse de la variance pour déterminer l'effet de pH sur l'activité de la chitinase.

ANOVA			
F			113,6
P			<0,0001
R			0,9799
Test de comparaison multiples de Tukey			
Test	P	sign	q
3 vs. 4	<0,0001	****	10,862
3 vs. 5	<0,0001	****	16,293
3 vs. 6	<0,0001	****	13,88
3 vs. 7	0,0825	ns	4,4254
3 vs. 8	0,03	*	5,23
3 vs. 9	<0,0001	****	12,874
4 vs. 5	0,0232	*	5,4311
4 vs. 6	0,3857	ns	3,0173
4 vs. 7	0,0064	**	6,4369
4 vs. 8	<0,0001	****	16,092
4 vs. 9	<0,0001	****	23,736
5 vs. 6	0,6228	ns	2,4138
5 vs. 7	<0,0001	****	11,868
5 vs. 8	<0,0001	****	21,523
5 vs. 9	<0,0001	****	29,167
6 vs. 7	0,0002	***	9,4542
6 vs. 8	<0,0001	****	19,11
6 vs. 9	<0,0001	****	26,753
7 vs. 8	0,0001	***	9,6553
7 vs. 9	<0,0001	****	17,299
8 vs. 9	0,0014	**	7,6438

Tableau 2 : Analyse de la variance pour déterminer l'effet de la température sur l'activité de la chitinase.

ANOVA			
F		141,2	
P		<0,0001	
R		0,9833	
Test de comparaison multiples de Tukey			
Test	**P**	**sign**	**q**
30 vs. 20	0,9697	ns	1,072
40 vs. 20	0,449	ns	2,68
50 vs. 20	0,7324	ns	1,965
60 vs. 20	0,23	ns	3,394
70 vs. 20	<0,0001	*	28,94
40 vs. 30	0,857	ns	1,608
50 vs. 30	0,3271	ns	3,037
60 vs. 30	0,0699	ns	4,466
70 vs. 30	<0,0001	**	30,01
50 vs. 40	0,0566	****	4,645
60 vs. 40	0,0103	****	6,074
70 vs. 40	<0,0001	ns	31,62
60 vs. 50	0,9057	ns	1,429
70 vs. 50	<0,0001	****	26,98
70 vs. 60	<0,0001	****	25,55

Tableau 3 : analyse de la variance pour déterminer la dose optimale de chitinase nécessaire à l'activité insecticide.

ANOVA			
F		1472	
P		<0,0001	
R^2		0,9984	
Test de comparaisons multiples de Dunnett			
Test	**Diff moyenne**	**P**	**q**
1% vs. 0%	13,87	<0,0001	20,77
3% vs. 0%	21,13	<0,0001	31,65
5% vs. 0%	30,07	<0,0001	45,03
7% vs. 0%	40,53	<0,0001	60,7
10% vs. 0%	49,8	<0,0001	74,58

Tableau 4 : analyse de la variance pour déterminer l'effet de la température sur l'activité de la xylanase.

ANOVA			
F			141,2
P			<0,0001
R			0,9833
Test de comparaison multiples de Tukey			
Test	**P**	**sign**	**q**
40 vs. 30	0,246	ns	3,328
50 vs. 30	0,0008	***	8,321
60 vs. 30	<0,0001	****	11,65
70 vs. 30	<0,0001	****	46,59
80 vs. 30	<0,0001	****	59,08
50 vs. 40	0,0375	*	4,992
60 vs. 40	0,0008	***	8,321
70 vs. 40	<0,0001	****	49,92
80 vs. 40	<0,0001	****	62,4
60 vs. 50	0,246	ns	3,328
70 vs. 50	<0,0001	****	54,92
80 vs. 50	<0,0001	****	67,4
70 vs. 60	<0,0001	****	58,24
80 vs. 60	<0,0001	****	70,72
80 vs. 70	<0,0001	****	12,48

Tableau 5 : analyse de la variance pour déterminer l'effet du pH sur l'activité de la xylanase.

ANOVA			
F		717,2	
P		<0,0001	
R		0,9969	
Test de comparaison multiples de Tukey			
Test	**P**	**sign**	**q**
5 vs. 4	<0,0001	****	18,23
6 vs. 4	<0,0001	****	31,7
7 vs. 4	<0,0001	****	47,54
8 vs. 4	<0,0001	****	49,92
9 vs. 4	<0,0001	****	55,47
10 vs. 4	<0,0001	****	51,51
11 vs. 4	<0,0001	****	28,53
12 vs. 4	<0,0001	****	23,77
6 vs. 5	<0,0001	****	13,47
7 vs. 5	<0,0001	****	29,32
8 vs. 5	<0,0001	****	31,7
9 vs. 5	<0,0001	****	37,24
10 vs. 5	<0,0001	****	33,28
11 vs. 5	<0,0001	****	10,3
12 vs. 5	<0,0001	****	42
7 vs. 6	<0,0001	****	15,85
8 vs. 6	<0,0001	****	18,23
9 vs. 6	<0,0001	****	23,77
10 vs. 6	<0,0001	****	19,81
11 vs. 6	0,422	ns	3,17
12 vs. 6	<0,0001	****	55,47
8 vs. 7	0,75	ns	2,377
9 vs. 7	0,0007	***	7,924
10 vs. 7	0,1816	ns	3,962
11 vs. 7	<0,0001	****	19,02
12 vs. 7	<0,0001	****	71,32
9 vs. 8	0,0217	*	5,547
10 vs. 8	0,9631	ns	1,585
11 vs. 8	<0,0001	****	21,39
12 vs. 8	<0,0001	****	73,69
10 vs. 9	0,1816	ns	3,962
11 vs. 9	<0,0001	****	26,94
12 vs. 9	<0,0001	****	79,24
11 vs. 10	<0,0001	****	22,98
12 vs. 10	<0,0001	****	75,28
12 vs. 11	<0,0001	****	52,3

Tableau 6 : analyse de la variance pour déterminer l'effet de la dose enzymatique sur le bioblanchiment.

ANOVA			
F		59,1	
P		<0,0001	
R^2		0,9568	
Test de comparaisons multiples de Tukey			
Test	**Diff moyenne**	**P**	**q**
10 vs. 5	0,007	0,0594	4,355
20 vs. 5	0,012	0,0033	7,466
30 vs. 5	0,029	<0,0001	18,04
20 vs. 10	0,005	0,2029	3,111
30 vs. 10	0,022	<0,0001	13,69
30 vs. 20	0,017	0,0003	10,58

Tableau 7 : analyse de la variance pour déterminer l'effet de la consistance de la pâte sur le bioblanchiment.

ANOVA			
F		231,8	
P		<0,0001	
R^2		0,9886	
Test de comparaisons multiples de Tukey			
Test	**Diff moyenne**	**P**	**q**
5 vs. 3	0,046	<0,0001	31,87
10 vs. 3	0,012	0,0017	8,314
20 vs. 3	-0,001	0,9592	0,6928
10 vs. 5	-0,034	<0,0001	23,56
20 vs. 5	-0,047	<0,0001	32,56
20 vs. 10	-0,013	0,001	9,007

Tableau 8 : analyse de la variance pour déterminer l'effet du temps d'incubation sur le bioblanchiment.

ANOVA			
F		37,7	
P		<0,0001	
R^2		0,9339	
Test de comparaisons multiples de Tukey			
Test	**Diff moyenne**	**P**	**q**
2 vs. 1	0,022	0,2218	3,016
3 vs. 1	0,061	0,0016	8,364
4 vs. 1	0,1017	<0,0001	13,94
3 vs. 2	0,039	0,0224	5,347
4 vs. 2	0,07967	0,0003	10,92
4 vs. 3	0,04067	0,018	5,576

Tableau 9 : analyse de la variance pour déterminer l'effet de la xylanase sur les deshets agricoles.

ANOVA			
F		5937	
P		<0,0001	
R^2		0,9996	
Test de comparaisons multiples de Dunnett			
Test	**Diff moyenne**	**P**	**q**
son de blé vs. xylane	-0,882	<0,0001	96,3
déshets de mais vs. xylane	-0,91	<0,0001	99,36
déshets de raisin vs. xylane	-0,9567	<0,0001	104,5
paille de blé vs. xylane	-1,116	<0,0001	121,9
bagasse de canne à sucre vs. xylane	-1,164	<0,0001	127,1
sciure de bois vs. xylane	-1,368	<0,0001	149,4

Cell. Mol. Biol. (ISSN: 1165-158X)

Journal Homepage: www.cellmolbiol.org

Cellular and Molecular Biology

Original Article

Enhancing the efficiency and functionality of xylanase from *Bacillus sp*. RTS11: Optimization, purification, characterization, and prospects in kraft pulp bleaching

Sara Sahnoun[1], Bilal Yahiaoui[1], Aicha Benlounissi[2], Abdenacer Mouffok[1], Barbara Ernst[3], Manawwer Alam[4], Karim Houali[5,*], Yacine Benguerba[6]

[1] *Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Microbiology, Ferhat Abbas University, Setif, Algeria*
[2] *Higher National School of Biotechnology, Taoufik Khaznadar University, Constantine, Algeria*
[3] *Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, Laboratoire de Reconnaissance et Procédés de Séparation Moléculaire (RePSeM), ECPM 25 rue Becquerel, F-67000, Strasbourg, France*
[4] *Department of Chemistry, College of Science, King Saud University, PO Box 2455, Riyadh, 11451, Saudi Arabia*
[5] *Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB), Mouloud Mammeri University. Tizi-Ouzou, Algeria*
[6] *Laboratoire de Biopharmacie Et Pharmacotechnie (LPBT), Ferhat Abbas Setif 1 University, Setif, Algeria*

Article Info

Article history:

Received: October 21, 2023
Accepted: December 28, 2023
Published: January 31, 2024

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Bacillus sp. RTS11, a xylanolytic strain, was isolated from the Algerian Sahara desert rocks. Genetic analysis revealed a remarkable 98.69% similarity to *Bacillus pumilus*. We harnessed optimization techniques, including Plackett-Burman screening and Box-Behnken optimization design to amplify xylanase production and activity. The outcome of these efforts was an optimized medium that yielded an impressive xylanase production titer of 448.89 U, a threefold increase compared to the non-optimized medium (146 U). The purification of xylanase was achieved through the three-phase partitioning technique, employing t-butanol and various chromatographic methods. Notably, anion exchange chromatography led to isolating a highly pure enzyme with a molecular weight of 60 kDa. The xylanase exhibited its peak activity at a temperature of 60°C and a pH of 9.0. When applied to pulp pretreatment, 20 U/g of xylanase demonstrated a substantial increase in the release of phenolic and chromophore compounds while reducing sugar content in the pulp. Furthermore, this versatile xylanase shows its ability to efficiently hydrolyze a variety of agro-industrial residues, including wheat bran, corn and grape waste, wheat straw, and sugarcane bagasse. These findings underscore the significant potential of this xylanase enzyme in biobleaching processes and the utilization of agro-industrial waste, opening up exciting avenues for sustainable and environmentally friendly industrial applications.

Keywords: *Bacillus sp.* RTS11, Xylanase, Statistical optimization, Kraft pulp treatment, Agricultural waste recycling

1. Introduction

Xylan is a biopolymer widely found in plant tissues and is a key constituent of the primary cell wall. It is a complex molecule composed of a highly branched hetero-polysaccharide with a linear backbone consisting of d-xylopyranose units linked together in a β-1,4 configuration [1]. In addition to this fundamental structure, xylan incorporates various side chains, including glucuronopyranosyl, 4-O-methyl-D-glucopyranosyl, a-L-arabinofuranosyl, and acetyl branches. Furthermore, it can contain feruloyl and coumaryl components of lignin, the proportions and distribution of which vary depending on the specific plant species [2]. To fully break down xylan, the collaborative action of different xylanolytic enzymes is required, as observed by Asha Poorna and Prema [3]. Enzymes involved in xy- lan degradation can be categorized based on the specific substrates they hydrolyze [4], including xylanase, β-D-xylosidase, α-L-arabinofuranosidase, α-L-glucuronidase, acetyl xylan esterase, ferulic acid esterase, and q-coumaric acid esterase [5]. Among bacteria, common producers of xylanase enzymes include *Bacillus*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Acetovibrio*, *Streptomyces*, *Ruminococcus*, and *Aerobacter* [6]. *Bacillus* strains, in particular, are highly appealing due to their capacity to generate cellulase-free extracellular xylanases at substantial levels, and these enzymes remain stable even in high-temperature and alkaline pH conditions [7]. Xylanases have a wide range of biotechnological applications, including improving the digestibility and feed absorption of livestock when added to animal feed, facilitating dough handling and improving bakery product quality in baking, clarifying fruit juices using pectinase and cellulase, improving fiber quality in the textile industry, and decreasing chlorine consumption for pulp bleaching in the pulp and paper industry [8-10]. In summary, this investigation extensively explores xylanase production, purification, and characterization, along with

* Corresponding author.
E-mail address: houalitizi@yahoo.fr (D. Houali).
Doi: http://dx.doi.org/10.14715/cmb/2024.70.1.10

practical evaluations of its performance in critical industrial processes. This underscores the enzyme's significance in both biotechnological and environmental contexts.

2. Materials and Methods

2.1. Microorganism

The strain of *Bacillus sp.* RTS11 was isolated from rock fragments collected from the El-Hoggar mountain range, Tamanrasset, Algerian Sahara desert (22°47'37.8"N, 5°34'32.4"E).

2.2. Estimation of xylanase activity

The xylanase activity of RTS11 isolate was quantita- tively evaluated using liquid medium (g/l): xylan, 5; yeast extract, 5; peptone, 5; KH_2PO_4, 1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1. The culture is incubated at 30°C for 72 h with stirring (100 rpm). After incubation, the cultures were centrifuged at 12 000 rpm, 10 min at 4°C, and the supernatant was analyzed for xylanase activity.

2.3. Enzymatic assay and protein estimation

The xylanase enzyme's activity was assessed using the procedure outlined by Bailey *et al*. [11]. To determine this activity, we combined 0.5 ml of the enzymatic solution with 0.5 ml of a 1% xylan solution in a 0.05 M phosphate buffer at pH 7. The resulting mixture was incubated at 60°C for 15 minutes. Subsequently, we introduced 1.5 ml of DNS into the mix and set it at 90°C for 5 minutes. The quantification of xylanase activity was based on releasing one mole of xylose per minute. For protein analysis, we employed the method detailed by Lowry *et al*. [12].

2.4. Estimation of xylanase activity without cellulase

Cellulase activity was determined using 1% (w/v) carboxymethylcellulose (CMC) as substrate and glucose as standard. This test was performed to detect the presence or absence of cellulosic activity of the xylanase produced.

2.5. Biomass estimation

The bacterial cells in the fermentation broth were harvested by centrifugation (12000 rpm, 10 min, 4°C), washed with distilled water, and dried in an oven at 80 °C until a constant weight was reached. Biomass has been reported as dry cell mass (mg/l) [13].

2.6. DNA extraction and identification of the isolate RTS11

The strain's genomic DNA was prepared from LB- grown bacteria using a Wizard Genomic DNA Purifica- tion Kit. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of the 16S rRNA gene was performed using two primers: 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Amplification was performed using HOT FIREPol® (Solis Biodyne, Esto- nia) according to the supplier's recommendations. Cycling conditions were as follows: activation at 95°C for 10 min, 35 cycles of 95°C for 30 s, 58°C for 30 s, and 72°C for 1 mn. The sequencing was done using an ABI 3730 XL gene analyzer (Applied Biosystem, ThermoFisher, USA). The obtained 16S rRNA gene sequence data was analyzed using an advanced BLAST search program at the NCBI website: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. The nucleotide sequence data were deposited to the gene bank for accession number assignation. Phylogenetic analysis was performed using a neighbor-joining method in MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms [14].

2.7. The effect of specific mono and polysaccharides on enzyme production

Carbon sources were used to supplement the basal medium to determine their effectiveness in inducing the production of xylanase by the *Bacillus sp*. strain following the protocol [83]. For this purpose, 50 ml of mineral salt broth was prepared and added with 0.3% (w/v) of one of the following carbon sources: birch xylan, spelled oat xylan, corncob, xylose, glucose, starch, and carboxymethylcellulose and 0.2% birch xylan, for a total of 0.5% carbon source. The cultures were incubated for 48 h. The broth was centrifuged and analyzed for xylanase activity.

2.8. Plackett-Burman experimental design

The Plackett-Burman experimental design was used to screen and evaluate essential factors that influence the yield of xylanase produced by *Bacillus sp*. RTS11 and rank factors according to their importance. Fifteen variables were selected as possible factors affecting xylanase production (Xylan, Yeast extract, Peptone, KNO_3, Urea, $MgSO_4$, NaCl, $CaCl_2$, Tween 80, $MnSO_4$, $FeSO_4$, $CoCl_2$, $ZnSO_4$, Temperature, $(NH_4)_2SO_4$). Sixteen experimental tests were conducted, and Design Expert 11 software (Stat Ease, Inc., Minneapolis, USA) was used to generate the design table and analyze the data.

2.9. Box-Behnken Experimental design

Plackett-Burman's design allowed us to select Xylan for its significant effect on xylanase production. Five vari- ables of A (*Inoculum* Age), B (*Inoculum* Rate), C (pH), D (Agitation), and E (Xylan) were chosen for further study based on the Box-Behnken design.

2.10. Enzymatic Purification

2.10.1. Purification by the TPP technique

After recovery of the crude extract by centrifugation of the culture broth at 12 000 rpm, 4°C, and 15 min, The TPP experiments were performed following the protocol described by Gagaoua *et al*. [15]. The interfacial phase containing the enzyme xylanase was carefully recovered, dissolved in Tris-HCl buffer 50 mM (pH 7.5), and dialyzed overnight at 4°C.

2.10.2. Purification by chromatographic technique

The crude extract of xylanase enzyme was subjected to fractional precipitation of 70% ammonium salt with stirring at 4°C overnight and centrifuged at 12 000 rpm for 10 min. The pellet obtained was dialyzed against a sodium phosphate buffer of 50 mM at 4°C. The dialysate was applied to a gel filtration column (Sephadex-G50), and protein elution was performed with the same dialysis buffer. Fractions were analyzed for xylanase activity, and absorbance at 280 nm was used for protein measurements. The fractions with xylanase activity were collected and concentrated by ultrafiltration with an Amicon membrane (Millipore). The resulting filtrate was loaded onto a DE-AE-Sepharose (Sigma-Aldrich) anion exchange column. The unbound proteins were removed with sodium phosphate buffer 50 mM, pH 7.5, and the enzymes were eluted with a gradient of 0 to 0.5 M NaCl. The fractions were

collected with a volume of 4 ml. The fractions collected were used for the determination of proteins and xylanase activity.

2.11. Determination of molecular weight by SDS-PAGE

The molecular weight of xylanase was determined by SDS-PAGE electrophoresis (12 %) using the Laemmli method [16], using bright blue from Coomassie R-250 to stain the gel and molecular weight markers from 20.0 to 120.0 kDa (Thermo Scientific).

2.12. Biochemical characterization of purified xylanase

To determine the effect of temperature and pH on purified xylanase activity, the enzyme was maintained at different temperatures (30 to 80°C) and pH (6 to 12) using phosphate buffers (pH 6 to 8), glycine-NaOH buffer (pH 9 to 12). The effect of many 5 mM metal ions (Hg^{+2}, Cu^{+2}, Zn^{+2}, Mg^{+2}, Co^{+2}, Na^{+}, Fe^{+2}, Mn^{+2}, Ca^{+2}, K^{+}), as well as the effect of Tween 20, Tween 80 and Triton-X on purified xylanase activity, were also studied.

2.13. Application of xylanase

2.13.1. Preparation of the pulp

Cardboard boxes were cut into small pieces, soaked in distilled water, and kiln-dried to remove the absorbed water until it reached a constant weight.

2.13.2. Parameter optimization

Different amounts of xylanases (5, 10, 15, and 20 U) were used to treat one gram of pulp, the reaction mixture was incubated for 1 h at 60°C, and the amount of reducing sugars was analyzed by the DNS method. The pulp's consistency was optimized using different concentrations of oven-dried dough (3.0%, 5%, and 10%), and the reaction medium was maintained at 60°C for 1 h. The optimal pulp treatment time with xylanase was also optimized, incubating the enzyme with the pulp at varying time intervals (1 to 4 h).

2.13.3. Bleaching of xylanase pulp

The reaction medium containing 20 U xylanase/g pulp in 20 ml glycine buffer (pH 9.0, 0.05 M) was incubated for 4 h with stirring (100 rpm). After incubation, the wa- ter was removed by filtration, and the leaves were pressed and dried at 60°C. The filtrate was analyzed for the release of phenolic and chromophore compounds from the pulp, measuring absorbance at 280 and 465 nm, respectively, and reducing sugar release according to the DNS method.

2.13.4. Hydrolysis of agro-industrial residues

To evaluate the capacity of xylanase to hydrolyze specific agro-industrial residues, reaction mixtures containing 20 U of purified enzymatic solution and 50 mg dry weight of agro-industrial residues (wheat bran, wheat straw, apricot kernel, grape, corn, and tomato waste, sugar cane bagasse, corn cob, and sawdust). The enzyme and each substrate were suspended in glycine buffer (0.05 M, pH 9.0) and incubated for 24 h at 60°C. Reducing sugars were quantified by the dinitrosalicylic acid method.

2.14. Statistical analysis

Data are presented as mean ± standard error (SE). The significance of the difference between the different groups was tested using ANOVA analysis on GraphPad prism 10 software. Significance was determined at the $p < 0.05$ level.

3. Results

3.1. Estimation of xylanase activity

RTS11 isolate was tested for its ability to produce xyla- nase in a non-optimized culture broth; maximum enzyme activity (174.17 U) was observed after 24 h of incubation.

3.2. Molecular identification

The BLAST analysis of the RTS11 isolate's partial 16S rRNA sequence demonstrated high similarity with organisms belonging to the *Bacillus* genus. A sequence alignment was conducted to explore this relationship further, comparing the 16S rRNA gene of the RTS11 isolate with a select group of representative members from both the *Bacillus* genus and *Staphylococcus aureus*. The resulting data was then visualized as a phylogenetic tree (Figure 1). Notably, the partial molecular sequencing of the 16S rRNA gene revealed a striking 98.69% similarity with the *Bacillus pumilus* strain. As a testament to these findings, the RTS11 strain has been officially deposited in the database and can be referenced using the identifier OL989329.

3.3. The effect of certain sugars on stimulating or inhibiting xylanase activity

The influence of nine individually supplemented car- bon sources in the fermentation medium on xylanase production was studied. Low xylanasic activity was observed in the presence of xylose, sucrose, starch, and CMC. Of the carbon sources tested, xylan in all its forms was found to be the best source of carbon, while in the medium containing glucose and xylan, the enzyme activity was zero, indicating that glucose acts as a catabolic repressor of xylanase. However, maximum xylanase production was achieved in a birch xylan crop, followed by oat-spelled xylan and corn cob xylan as the second and third-best carbon sources. This result indicated that xylan-containing substrates could induce xylanase production by the *Bacillus sp* strain RTS11.

3.4. Temporal and growth kinetic evolution for xylanase production by *Bacillus sp.* RTS11

The temporal evolution of xylanase production was monitored at regular intervals during 72 h of a culture of the strain in the optimized medium and under static conditions (Figure 2). After inoculation, the crop began to grow until 32 h, when the highest biomass was reached, remained almost constant until 40 h, and decreased afterward. The production of xylanases by strain RTS11 appears to be partially associated with growth. The enzyme synthesis begins at the beginning of fermentation but in

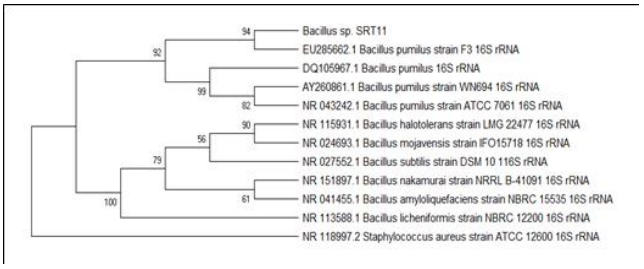


Fig. 1. Phylogenetic tree of strain RTS11 showing the similarity with *Bacillus pumilus* strains.

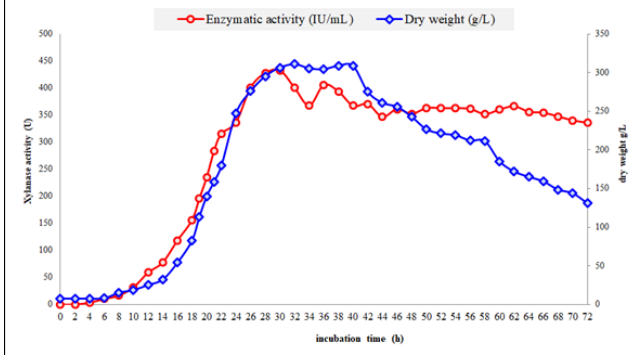


Fig. 2. The profile of growth and production of xylanase by the strain of *Bacillus sp.* RTS11.

small quantities, corresponding to a logarithmic growth phase. On the other hand, optimal xylanase production was achieved at 30 h (432.83 U) in the late logarithmic growth phase. Xylanase activity decreased after reaching a maximum value, possibly due to proteolysis or depletion of nutrients available for the isolate.

3.5. Estimation of xylanase activity without cellulase

In general, xylanase secretion is accompanied by cellulase production of varying degrees. It was for this reason that the cellulase activity of xylanase was determined. our xylanase showed showed very low cellulase activity (1.87 U).

3.6. Plackett-Burman design

The Plackett-Burman plan was used to screen crop parameters to select the most significant ones capable of increasing xylanase production. The Plackett-Burman experiments are presented in Table 1. They showed a wide variation in xylanase production (from 27.03 U to 251.41 U), which reflects the importance of optimizing the medium to achieve a better yield.

The analysis of variance (ANOVA) of the model demonstrates that the model is highly significant, with an *F* value of 12.17, *p* of 0.0134, and R^2 of 0.9786. The variables, which were significant at the 95% level ($p<0.05$), were considered to impact xylanase production. From Table 2, Xylan and $CoCl_2$ were determined as the two significant factors, with *p* values corresponding to 0.0007 and 0.0014, respectively. The other variables were found to have insignificant effects on xylanase production and were not studied. Xylanase production was expressed in terms of the following regression equation:

Activity = 127.277 + 46.09 A + 3.53 B - 6.06 C+ 0.45 D - 11.09 E+ 9.74 F - 3.54 G -1.15 H -10.88 J + 8.89 K+ 8.28 L – 38 M - 10.234 N - 5.17 O - 7.52 P;

Where A, B, C, E, F, G, H, J, K, L, M, N, O, P represents xylan, yeast extract, peptone, KNO_3, urea, $MgSO_4$, NaCl, $CaCl_2$, Tw80, $MnSO_4$, $FeSO_4$, $CoCl_2$, $ZnSO_4$, T°, $(NH_4)_2SO_4$.

3.7. Box Behnken design

This design indicates the statistical optimization of xylanase production. The Plackett-Burman plan allowed us to select xylan as a component affecting xylanase production. In addition to xylan, four other factors were included in the optimization (*inoculum* rate, *inoculum* age, agitation, and pH). A set of 46 experimental tests are presented in Table 3. The second-order polynomial equation is shown as follows:

$$Y = 386.04 + 39.54 A + 6.03 B + 12.83 C - 88.68 D - 6.90 E – 21.55 AB + 40.24 AC + 27.89 AD + 10.03 AE + 32.28 BC + 11.85 BD + 6.61 BE + 2.17 CD - 0.3400 EC + 4.26 A^2 - 2.10 B^2 - 43.44 C^2 - 48.48 D^2 + 1.49 E^2$$

Where Y is the xylanase activity (U), A, B, C, D, and E are *inoculum* age, *inoculum* rate, pH, agitation, and xylan, respectively.

Analysis of variance (ANOVA) for the quadratic response surface model is given in Table 4. Model values *F* and *p* and R^2 were calculated as 18.90, 0.0001, and 0.9380, respectively, indicating the model's meaning. The linear effect of A and D, the interactive effects of AC, AD, and

Table 1. Plackett-Burman experimental design matrix for screening factors affecting xylanase production by *Bacillus sp.* RTS11.

Run	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M	N	O	P	R_1	R_2
1	10	10	5	1	1	0.1	1	0.02	0.1	0.005	0.005	0.02	0.02	30	1	124.94	115.12
2	10	10	1	1	1	0.1	0.1	0.3	0.3	0.02	0.02	0.001	0.02	30	3	237.12	225.15
3	3	10	1	1	1	0.5	1	0.3	0.1	0.02	0.005	0.02	0.001	30	1	80.67	90.49
4	10	10	5	5	1	0.5	1	0.3	0.3	0.02	0.02	0.02	0.02	37	3	128.01	139.98
5	3	10	5	5	1	0.1	1	0.02	0.3	0.005	0.005	0.001	0.001	37	3	100.13	92.76
6	3	1	5	5	0.05	0.1	1	0.02	0.1	0.02	0.02	0.02	0.02	30	3	53.03	58.25
7	10	1	1	1	0.05	0.5	1	0.02	0.1	0.02	0.005	0.001	0.02	37	3	231.66	230.25
8	10	10	5	5	0.05	0.5	0.1	0.3	0.1	0.005	0.005	0.001	0.02	37	1	222.9	228.12
9	3	1	5	1	0.05	0.5	1	0.3	0.3	0.005	0.02	0.001	0.02	30	1	156.82	145.63
10	10	1	5	1	0.05	0.1	0.1	0.3	0.3	0.005	0.005	0.02	0.001	30	3	122.5	138.29
11	3	10	5	1	0.05	0.5	0.1	0.02	0.3	0.02	0.02	0.02	0.001	37	1	119.98	113.98
12	3	1	1	5	1	0.1	0.1	0.3	0.1	0.005	0.02	0.02	0.02	37	1	41.32	39.91
13	3	10	1	5	0.05	0.1	0.1	0.02	0.3	0.02	0.005	0.001	0.02	30	1	144.85	156.82
14	3	1	1	1	1	0.5	0.1	0.02	0.3	0.005	0.005	0.02	0.02	37	3	25.62	27.03
15	10	1	1	5	1	0.5	1	0.02	0.3	0.005	0.02	0.001	0.001	30	1	240.22	251.41
16	3	10	1	1	0.05	0.1	1	0.3	0.1	0.005	0.02	0.001	0.001	37	3	135.23	142.60
17	10	10	1	5	0.05	0.5	0.1	0.02	0.1	0.005	0.02	0.02	0.001	30	3	210.06	198.87
18	10	1	1	5	0.05	0.1	1	0.3	0.3	0.02	0.005	0.02	0.001	37	1	182.48	166.69
19	3	1	5	5	1	0.5	0.1	0.3	0.1	0.02	0.005	0.001	0.001	30	3	150.07	140.25
20	10	1	5	1	1	0.1	0.1	0.02	0.1	0.02	0.02	0.001	0.001	37	1	229.61	235.61

A, xylan (; B, yeast extract; C, peptone; D, KNO_3; E, urea; F, $MgSO_4$; G, NaCl; H, $CaCl_2$; J, Tw80; K, $MnSO_4$; L, $FeSO_4$; M, $CoCl_2$; N, $ZnSO_4$; QT°; P, $(NH_4)_2SO_4$; R_1, Activity (U); R_2, Predicted activity (U).

Table 2. Estimates of xylanase production effects from Plackett-Burman design results.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	*p*-value	Estimation
Model	83719.37	15	5581.29	12.17	0.0134	
A-Xylan	42483.92	1	42483.92	92.63	0.0007	46.09
B-Yeast extract	248.94	1	248.94	0.5428	0.5022	3.53
C-Peptone	734.96	1	734.96	1.60	0.2743	-6.06
D-KNO_3	3.98	1	3.98	0.0087	0.9303	0.4460
E-Urea	2459.76	1	2459.76	5.36	0.0815	-11.09
F-$MgSO_4$	1897.35	1	1897.35	4.14	0.1117	9.74
G-NaCl	250.92	1	250.92	0.5471	0.5006	-3.54
H-$CaCl_2$	26.40	1	26.40	0.0576	0.8222	-1.15
J-Tween 80	23.67	1	23.67	0.0516	0.8314	-10.88
K-$MnSO_4$	1579.58	1	1579.58	3.44	0.1371	8.89
L-$FeSO_4$	1370.84	1	1370.84	2.99	0.1589	8.28
M-$CoCl_2$	28880.00	1	28880.00	62.97	0.0014	-38.00
N-$ZnSO_4$	2094.70	1	2094.70	4.57	0.0994	-10.23
O-Temperature	533.96	1	533.96	1.16	0.3413	-5.17
P-$(NH_4)_2SO_4$	1130.41	1	1130.41	2.46	0.1915	-7.52
Residual	1834.56	4	458.64			
Cor Total	85553.93	19				

Table 3. Box-Behnken design matrix with experimental and predicted values of xylanase activity.

Run	*Inoculum* age (h)	*Inoculum* size (%)	pH	Agitation (rpm)	Xylan (g/l)	Activity (U)	Predicted Activity (U)
1	5.5	1	5	100	12.5	375	352.17
2	5.5	3	5	100	10	358.11	341.56
3	5.5	5	7.5	200	12.5	254.46	263.96
4	8	3	7.5	0	12.5	416.81	404.65
5	5.5	3	10	0	12.5	395.52	396.71
6	5.5	5	10	100	12.5	379.13	388.83
7	5.5	3	5	100	15	325.45	313.96
8	5.5	3	7.5	100	12.5	407.42	389.38
9	5.5	3	10	100	15	352.1	347.55
10	5.5	3	5	200	12.5	172.19	189.82
11	5.5	3	7.5	200	10	305.44	264.08
12	8	3	5	100	12.5	376.16	378.92
13	5.5	1	7.5	100	10	384.57	401.63
14	3	5	7.5	100	12.5	345.48	322.02
15	5.5	1	7.5	200	12.5	201.88	231.95
16	5.5	1	10	100	12.5	346.78	316.06
17	3	3	5	100	12.5	184.27	208.11
18	8	1	7.5	100	12.5	401.18	404.03
19	5.5	3	7.5	100	12.5	401.12	398.89
20	3	1	7.5	100	12.5	292.64	290.60
21	8	3	7.5	100	15	374.53	389.38
22	5.5	1	7.5	0	12.5	415.61	434.63
23	5.5	3	7.5	100	12.5	377.12	389.38
24	5.5	3	7.5	0	10	429.02	439.08
25	3	3	7.5	100	15	265.01	288.49
26	5.5	3	7.5	200	15	266.57	238.18
27	8	3	10	100	12.5	335.42	326.35
28	3	3	10	100	12.5	304.48	316.49
29	5.5	3	7.5	100	12.5	363.69	389.38
30	8	5	7.5	100	12.5	407.83	389.26
31	5.5	3	10	100	10	373.4	363.78
32	5.5	5	7.5	100	15	400.52	388.04
33	5.5	5	5	100	12.5	278.25	296.48
34	8	3	7.5	100	10	389.37	400.74
35	8	3	7.5	200	12.5	299.98	298.43
36	3	3	7.5	0	12.5	414.56	387.09
37	5.5	5	7.5	0	12.5	420.8	419.26
38	5.5	3	7.5	0	15	398.12	421.15
39	3	3	7.5	200	12.5	152.19	135.33
40	5.5	3	7.5	100	12.5	396.57	398.38
41	5.5	3	5	0	12.5	381.28	369.15
42	5.5	1	7.5	100	15	375.45	361.50
43	5.5	3	7.5	100	12.5	390.33	389.38
44	3	3	7.5	100	10	319.97	330.47
45	5.5	3	10	200	12.5	187.12	218.07
46	5.5	5	7.5	100	10	373.2	391.73

Table 4. Analysis of variance (ANOVA) for the fitted quadratic model of xylanase activity as a function of independent variables.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	Estimation des coefficients
Model	2.254E+05	20	11270.96	18.90	< 0.0001	
A-Age	32641.65	1	32641.65	54.74	< 0.0001	45.17
B-Size	276.89	1	276.89	0.4643	0.5019	4.16
C-pH	3114.76	1	3114.76	5.22	0.0310	13.95
D- agitation	1.281E+05	1	1.281E+05	214.90	< 0.0001	-89.49
E-xylan	1921.29	1	1921.29	3.22	0.0848	-10.96
AB	533.38	1	533.38	0.8945	0.3533	-11.55
AC	6476.23	1	6476.23	10.86	0.0029	-40.24
AD	5295.47	1	5295.47	8.88	0.0063	36.38
AE	402.40	1	402.40	0.6748	0.4191	10.03
BC	4166.70	1	4166.70	6.99	0.0140	32.28
BD	561.45	1	561.45	0.9415	0.3412	11.85
BE	331.97	1	331.97	0.5567	0.4625	9.11
CD	0.1190	1	0.1190	0.0002	0.9888	0.1725
CE	32.26	1	32.26	0.0541	0.8180	2.84
DE	15.88	1	15.88	0.0266	0.8717	-1.99
A^2	10379.23	1	10379.23	17.41	0.0003	-34.49
B^2	101.54	1	101.54	0.1703	0.6834	-3.41
C^2	19625.50	1	19625.50	32.91	< 0.0001	-47.42
D^2	20540.19	1	20540.19	34.45	< 0.0001	-48.51
E^2	0.5036	1	0.5036	0.0008	0.9770	-0.2402
Residual	14907.70	25	596.31			
Lack of Fit	13581.55	20	679.08	2.56	0.1506	not significant
Pure Error	1326.15	5	265.23			
Cor Total	2.403E+05	45				

BC, and the square effects of D^2 are significant model terms. The pH and age of the inoculum significantly affect xylanase production.

The pH and age of the inoculum significantly affect xylanase production. The effect of pH and age of *inoculum* on chitinase activity is shown in Figure 3 (AC). Initially, an increase in pH (7-8) and *inoculum* age (5-6 h) indicated a rise in xylanase activity, a remarkable decrease after increasing the latter above the previous interval. Figure 3 (AD) shows the effect of agitation on xylanase activity. Xylanase activity levels were not significantly influenced by crop agitation. As can be seen in the figure, maximum xylanase activity was obtained due to a lack of agitation, but increased agitation resulted in decreased activity. Figure 3 (DE) shows the dependence of xylanase activity on xylan concentration. Maximum xylanase activity was observed at lower xylan values (<10.5 g/l), and xylanase activity decreased with a further increase in xylanase. Figure 3 (BC) shows the effect of *inoculum* level on xylanase activity. It can be deduced that the maximum synthesis of xylanase occurred when the *inoculum* level was maintained at intermediate levels (2-3%).

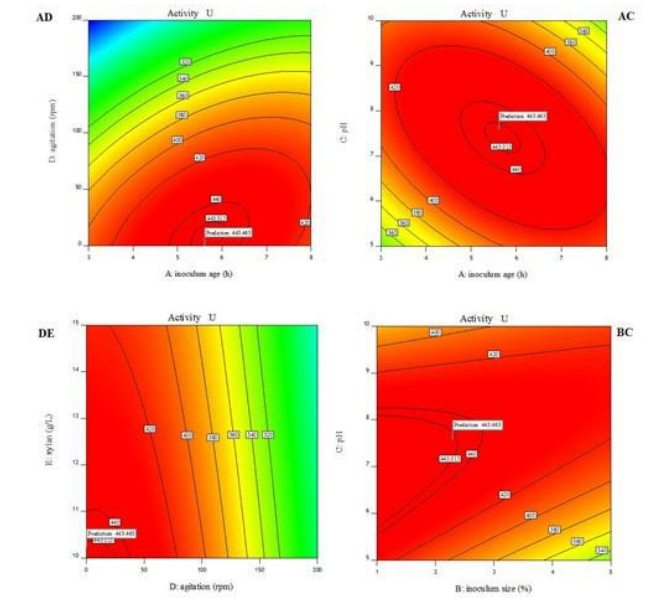


Fig. 3. Response surface curves of xylanase production by Bacillus sp. RTS11 shows the interactions between pH and *inoculum* age (AC), agitation and *inoculum* age (AD), pH and *inoculum* rate (BC), and between Xylan and agitation (DE).

Model validation

The experiment was conducted under optimized conditions predicted by the statistical analysis of the Box-Behnken: xylan (10.24 g/l), agitation (0.36 rpm), pH (7.60), *inoculum* age (5.60 h), *inoculum* level (2.28%). The experimental result (448.89 IU) was close to the mod- el's predicted value (443.46 IU). After optimization, the excellent correlation between predicted and experimental values justified the model's validity.

3.8. Purification of xylanase produced by the strain of *Bacillus sp.* RTS11

To purify the xylanase of *Bacillus sp.* RTS11, The purification technique included t-butanol, and the concentration of ammonium sulfate, t-butanol, and pH was optimized to facilitate enzymatic purification. Purification involved precipitation of the enzyme extract by 70% ammonium sulfate at pH 9 and an enzyme extract ratio: t-butanol (v/v) (1/1.75). A purification factor of 0.34 and a recovery efficiency of 22.93% were achieved. On the SDS page, different protein bands probably indicate the absence of significant purification.

In a second step, a xylanase enzyme purification test was carried out by a three-step chromatographic proce- dure: precipitation with ammonium sulfate, gel filtration chromatography, and anion exchange chromatography.

Table 5. Summary of purification profile of the enzyme xylanase secreted by *Bacillus sp.* RTS11.

Purification steps	Enzymatic activity (U)	Proteins (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Purification yield (%)
Culture supernatant	466.61	0.930	501.73	1	100
Ammonium sulfate precipitation	391.46	0.636	615.30	1.22	83.89
Sephadex G-50	302.57	0.245	1234.97	2.46	64.84
DEAE-Sepharose	278.45	0.067	4155.97	8.28	59.67
TPP	107	0.613	174.55	0.34	22.93

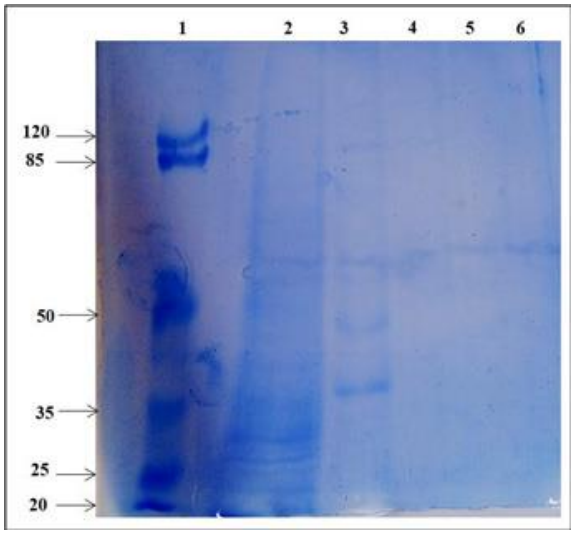


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of the purified xylanase from *Bacillus sp.* RTS11. Lane 1. Molecular weight standards. Lane 2. Sample of the crude extract. Lane 3. Ammonium sulfate fractionated protein. Lane 4. Proteins of gel filtration chromatography. Lane 5-6. Proteins are purified by ion exchange chromatography.

The different steps of xylanase purification are presented in Table 5. The culture filtrate had a total xylanase activity of 466.61 U. After the three purification steps. Xylanase was purified 8.28 fold with a yield of 59.67% and a specific activity of 4155.97 U/mg.

3.9. Characterization of purified xylanase

3.9.1. Effect of pH and temperature on xylanase activity

The enzyme was incubated at different pH values (6 to 12) at 30°C, and residual activity was measured (Figure 5a). Purified xylanase showed optimal enzyme activity at pH 9, with decreased activity at pH 6-11, while at pH 12, no activity was recorded.

The effect of various temperatures (30-80°C) on the enzymatic activity of purified xylanase is shown in Figure 5b. The optimum temperature of the enzyme turned out to be 60°C. When the temperature rose above 60°C, the enzyme activity was reduced.

3.9.2. Effect of metal ions and Surfactants on xylanase activity

The effect of inhibitors and enzyme activators on the activity of purified xylanase is shown in Figure 5c. It can be concluded that the xylanase activity of *Bacillus sp.* RTS11 was slightly strengthened in the presence of Fe^{+2}, Mn^{+2}, and Mg^{+2}, and decreased in the presence of Zn^{+2}, Co^{+2}, Cu^{+2} and was inhibited in the presence of Hg^{+2}. The ions Ca^{+2}, Na^{+}, and K^{+} are inert and do not affect this en- zyme's activity. The addition of surfactants, such as Triton X-100, Tw 20, and Tw 80, slightly increased xylanase ac tivity.

3.10. Biobleaching of pulp

The xylanase dose, pulp consistency, and incubation time of the enzyme-substrate for pulp biobleaching at 60°C were optimized. The release of reducing sugars was increased with increasing enzyme dose (Figure 6a) and treatment time (Figure 6c). As well as the reducing sugars released were 0.165 mg/ml, 0.211 mg/ml, 0.177 mg/ml,
and 0.164 mg/ml at 3%, 5%, 10%, and 20% consistency, respectively (Figure 6b).
it can be concluded that the effectiveness of biobleach- ing of xylanase from *Bacillus sp.* RTS11 was maximum after 4 h of Treatment at 60°C, pH 9 using a xylanase dose of 20 U/g pulp, at a pulp consistency of 5 %. Details on the release of reducing sugars, phenolic compounds, and other hydrophobic compounds are presented in Table 6. Enzy- matic treatment increased the amount of reducing sugars released into the medium compared to the control, indicat- ing the effective action of xylanase on the

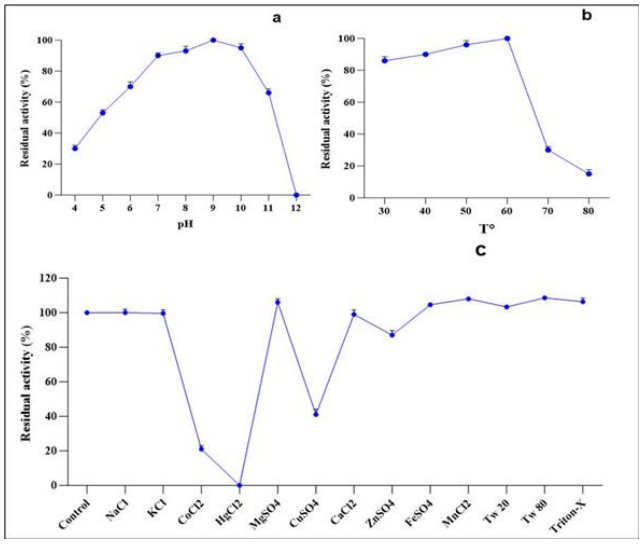


Fig. 5. Effect of pH (a), Temperature (b), metal ions, and surfactants (c) on the activity of xylanase.

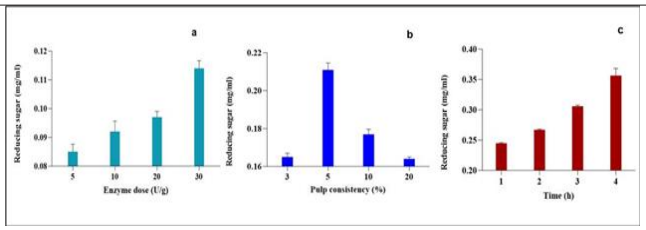


Fig. 6. Effect of xylanase dose (a), pulp consistency (b), and incuba- tion time (c) on pulp bleaching.

Table 6. Effect of xylanase treatment on bleaching of paper pulp at 60 °C, pH 9.0, after 4h.

Parameter	Control	Xylanase
Hydrophobic compounds (A_{465})	0.11	0.39
Chromophoric compounds (A_{237})	0.37	1.106
Reducing sugar (mg/ml)	0.09	0.323

3.11. Hydrolytic capabilities of purified xylanase

Hydrolysis experiments of specific agro-industrial residues were conducted under optimal conditions (60°C and pH 9.0) using purified xylanase and birch xylan as control (1.79 mg/ml of reducing sugars). The results were expressed in Figure 7, 0.908 mg/ml of reducing sugars were released from wheat bran, 0.88 mg/ml from corn cob, 0.833 mg/ml grape waste, 0.674 mg/ml wheat straw, 0.626 mg/ml sugarcane bagasse, and 0.422 mg/ml saw- dust. However, a small amount of sugar was released in the case of apricot kernels (0.19 mg/ml) and tomato waste (0.093 mg/ml).

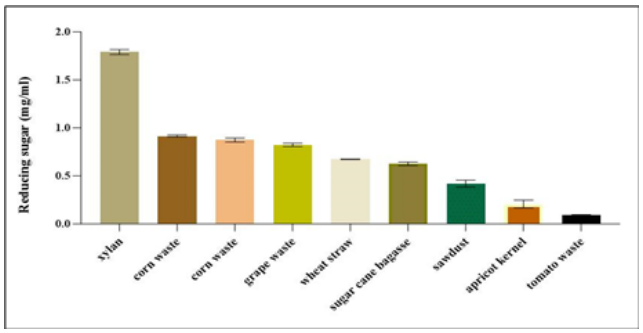


Fig. 7. Hydrolysis of agricultural waste by purified xylanase.

4. Discussion

Xylan is one of the most common hemicellulose components in soft and hard woods. Xylanases are the hydrolytic enzymes responsible for degrading this polymer [84]. Many micro-organisms, including bacteria, fungi, yeasts, are capable of producing xylanase. Although fungi generally produce large quantities of xylanase, the enzymes produced by bacteria are more stable [85]. *Bacillus* are interesting industrial organisms because of their rapid growth rate, which enables a short fermentation cycle, and their ability to secrete various enzymes into the external environment, including xylanase [72]. Carbon sources are essential in cellular metabolism and xylanase synthesis [17]. Xylan, generally considered the best inducer, can induce xylanase enzymes, while easily assimilated sugars such as glucose, lactose and xylose have a repressive effect on xylanase [30]. Xylan is not the direct inducer since it cannot penetrate directly into cells. The products resulted from its hydrolysis under the action of xylanases such as xylobiose and xylotriose, which can play the role of inducer [18]. Kapilan *et al.* [19] reported that higher xylanase production by *B. pumilus* was achieved with arabinose in corn cob media. While xylan induces the highest level of xylanase production by strains of *B. pumilus* [20], *B. pumilus* SV-205 [21], *Bacillus circulans* AB 16 [22], and *Jonesia denitrificans* [23]. Xylose increased xylanase production by *Bacillus megaterium* [24]. The fermentation time required to achieve optimal xylanolytic activity depends on the growth rate of the microorganism and its enzyme production pattern. It varies from one strain to another and from one fermentation medium to another [23]. A literature review revealed the highest enzyme production from *B. pumilus* SV-85S after 36 h [18], *B. pumilus* MK001 after 24 h [25], and *B. pumilus* SILB-X MTCC 8964 after 48 h during the late logarithmic phase [26].

During xylanase production, it became important to know what effect a specific nutritional variable had on hydrolytic enzyme activities when different factors were modified at the same time. Several statistical models have been developed to optimize fermentation conditions for xylanase production, including the Plackett-Burman and Box-Behnken designs. An optimal *inoculum* level is necessary to balance biomass and available nutrients to achieve maximum enzyme yield. Lower enzyme yield at a higher *inoculum* level may result from faster nutrient intake [28]. Also, a higher concentration of *inoculum* is not preferable in industrial fermentations [29]. Other researchers recorded observations for age and *inoculum* levels, and a maximum xylanase yield of the *B. pumilus* strain ML001 was obtained with 1.25% (v/v) of a culture aged 2h with OD_{600} nm = 0.2 [27]. Xylanase titer was highest when 2% (v/v) of a 24 h (18×10^7 CFU/ml) *B. pumilus SV-205 inocu- lum* was used for xylanase production [21].

The production of xylanase by various bacteria and fungi is highly pH-dependent. The acidic pH (4–6) gener- ally favors fungal xylanases, while the higher pH favors bacterial xylanases [30]. Initial pH influences many enzyme systems and the transport of several enzyme species across the cell membrane [31]. Similar results to our result were obtained. An optimal pH of 7.5 was reported for xylanase production from *B. pumilus* B20 [5], with a pH of 7.0 *for B. pumilus* AB-1 [32]. Other results indicate that among a wide range of initial pH of the production medium tested, pH 8 was optimal for xylanase production by *B. pumilus* [33].

It is well known that microbial growth and the produc- tion of their metabolites are strongly influenced by the components of the medium and physical factors, such as agitation and aeration [34]. Our result shows maximum xylanase activity under stationary conditions (0 rpm). Other reports indicate that activity is higher under stirring conditions than under stationary conditions, an agitation speed of 140 rpm is required for *B. pumilus* RXAIII-5 [4]. The presence of xylan in the culture medium can in- duce the synthesis of xylanolytic enzymes. 1.0% (w/v) birch xylan was sufficient to achieve maximum xylanase activity by *Bacillus amyloliquefaciens* [35], *Anoxybacillus kamchatkensis* NASTPD1 [36]. A base medium containing 1.5% birch xylan is preferable for the *Bacillus tequilensis* ARMATI strain [37], *Bacillus megaterium* BM07 [38]. This implies that the carbon source can act as a limiting substrate, and little change in their concentration will affect the level of enzyme synthesis [39].

Triphasic partitioning involves precipitating biomolecules present in an aqueous solution by means of a mixture of a crude protein extract with a solid salt, essentially ammonium sulfate $(NH_4)_2SO_4$, and an organic solvent, typically tert-butanol. The organic solvent added in the

presence of the salt forces the protein out of solution and forms an interfacial precipitate layer between the lower aqueous layer and the upper organic layer [70]. In our study, this method failed to purify xylanase properly, but it has been used effectively in other research. it has been used to purify in a single step the exo-polygalacturonase of *Aspergillus sojae* ATCC 20235 [40], α-galactosidase of *Aspergillus oryzae* [41], while partially purified xylanase [42] and pectinase [43] of *Aspergillus niger*, laccase of *Ganoderma sp.* WR-1 [44]. Our xylanase was harvested and purified to absolute homogeneity by a chromatographic procedure including gel filtration chromatography and anion exchange chromatography. Other *Bacillus* xylanase has also been purified by anion exchange chromatography, such as *B. pumilus* VLK-1 xylanase [17], *B. pumilus* B20 [45], *B. pumilus* GESF1 [46], *Bacillus arseniciselenatis* DSM 15340 [47], *Bacillus subtilis* ASH [48]. Our enzyme had a molecular mass of 60 kDa, it is similar to those to those observed for *B. pumilus* [49], other xylanases of *B. pumilus* [50], *B. pumilus* B20 [45], *Bacillus circulans* [51], *Bacillus* sp. ASX42 [52] had molecular weights of 55.4 kDa, 85 kDa, 59 kDa, and 66 kDa.

Our research aims to produce an alkaline xylanase, an enzyme that performs well in alkaline conditions. This quality is crucial when selecting xylanases for bleach- ing, as industrial pulp processing typically occurs in an alkaline environment [81]. Early studies on bleaching primarily utilized xylanases derived from fungi. Howev- er, a notable limitation of these fungal xylanases is that they function optimally at acidic pH levels [82]. Xyla- nases produced by thermophilic bacterial systems offer distinct advantages. They can withstand higher tempera- tures and exhibit a broader range of optimal pH values, which makes these enzymes stable and highly suitable for various industrial applications [80]. As a result, *Bacillus* strains have garnered attention as attractive candidates for producing substantial quantities of extracellular xylanases that remain active under high temperatures and alkaline pH conditions [68]. Our xylanase enzyme demonstrated its most increased activity in alkaline pH environments, specifically at pH 9 and 10 and at a temperature of 60°C. These characteristics suggest that our xylanase could potentially play a valuable role in the bleaching process, given its ability to perform effectively under the conditions typically encountered in industrial pulp bleaching. The optimum pH observed for xylanase from *Bacillus sp.* RTS11 corresponds to those of *Bacillus sp.* AR-009 [53], *Anoxybacillus kamchatkensis* NASTPD13 [36] and *B. pumilus* 13_a [27], Its optimum temperature is equivalent to those obtained for xylanases produced by *Bacillus subtilis* [54], *B. tequilensis* BT21 [55], *B. subtilis* cho40 [56] and *B. licheniformis* [57]. Concerning metal ions, our result is similar to those reported by other research on the effect of Mg^{+2} [58], Co^{+2}, Cu^{+2} [59], Mn^{+2} [60], Mn^{+2}, Fe^{+2} [61], Cu^{+2}, Mn^{+2} [62], Zn^{+2}, Co^{+2}, Cu^{+2} [63], Na^{+} [64], K^{+} [65]. Inhibition by Hg^{+2} ions is a common feature of xylanases due to cysteine thiol groups near or in the enzyme's active site [21]. The addition of surfactants slightly increased xylanase activity, and a similar effect was observed for xylanase from *Streptomyces sp.* [66].

In paper industries, contamination of xylanase preparations with cellulase is a problem in the bleaching process. Treatment with xylanases facilitates the extraction of lignin from the pulp. The positive effect of xylanase is generally attributed to the degradation of Xylan, breaking the bond between cellulose and lignin. Once the lignin is detached from the cellulose, it is easily reduced in subsequent bleaching steps. Still, the xylanases used must be free of cellulase activity to avoid damage to the cellulosic pulp [27,76,77]. *Bacillus sp.* RTS11 xylanase has low cellulase activity (1.87 U). According to Subramaniyan and Prema [78]. Negligible amounts of cellulases do not prevent xylanases from producing good quality pulps with minimal cellulose damage, and this activity can be attributed to the presence of cellulose-binding domains in xylanases (CBD). Different species of *Bacillus* are recognized for their ability to secrete xylanases devoid of cellulase activity such as *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus aerophilus* [79]. Mushrooms are particularly interesting producers of xylanases; they produce considerable levels of xylanases, but generally, this production is accompanied by high cellulase activity, which deteriorates the quality of the fibers [80].

The application of xylanases for the improvement of pulp bleaching has been reported by several researchers using *B. pumilus* ASH xylanase with a xylanase dose of 5 IU/g dried paste, pH 7, 60C°, and 180 min of Treat- ment [67], *B. pumilus* SV-85S xylanase with an enzymatic amount of 10 IU/g of oven-dried paste, pH 9.0 and 120 min incubation at 55°C [68]. Several other reports also support xylanase pretreatment in pulp biotechnology. They have exploited various bacterial and fungal xylanases, among them *Bacillus cereus* xylanase [69], *Bacillus licheniformis* Alk-1 [59], *B. pumilus* SV-205 [71]. The release of pheno- lic and hydrophobic compounds and reducing sugars sug- gest dissociating the lignin-carbohydrate complex (LCC) from pulp fibers by enzymatic action [60]. Kamble and Jadhav [47] reported that chromophore release is well cor- related with total sugar release, which can be considered a simple method to determine the effectiveness of enzyme therapy.

Recycling lignocellulosic waste receives a lot of atten- tion because it is inexpensive. Its richness in hemicellu- loses makes it the primary substrate for the production of valuable biomolecules, including chemicals (polyphenol, organic acids) and organic solvents (acetone, butanol), as well as the enzymatic degradation of these wastes via cellulases and hemicellulases is essential for their conversion into fuel [73, 74]. As well as industrial production of xylanases recognizing obstacles and limitations due to the high costs of using pure Xylan, agricultural waste could be an inexpensive alternative substrate for xylanase production because of its hemicellulose richness [75].

5. Conclusions

In this study, we successfully identified and harnessed xylanase activity from *Bacillus sp.* RTS11. Through the application of statistical methodologies such as Plackett-Burman and Box-Behnken, we not only optimized but significantly increased the enzyme's activity, achieving an impressive titer of 448.89 U. This enhancement was achieved while maintaining the enzyme's efficacy under non-optimized conditions, highlighting its robust performance. Moreover, we pursued the purification of this enzyme, resulting in a purification factor of 8.28 and an impressive yield of 59.67%. Characterization of the en-

zyme revealed a molecular weight of approximately 60 kDa, underscoring its suitability for various industrial applications. Furthermore, this xylanase demonstrated its versatility by displaying catalytic activity towards various agricultural waste substrates, showcasing its potential for sustainable waste utilization. Our findings suggest that this enzyme can play a pivotal role in the paper biobleaching process, contributing to more eco-friendly and efficient practices. In conclusion, our study not only identified and optimized xylanase activity from *Bacillus sp.* RTS11, but also highlighted its purification, characterization, and diverse catalytic capabilities. These results emphasize the enzyme's potential in various biotechnological and industrial applications, further advancing the field of enzymology and sustainable practices.

Conflict of Interests

The author has no conflicts with any step of the article preparation.

Consent for publications

The author read and approved the final manuscript for publication.

Ethics approval and consent to participate

No human or animals were used in the present research.

Informed Consent

The authors declare not used any patients in this research.

Availability of data and material

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Author contribution

SS, BY: writing original draft manuscript; SS, BY, AM, HLH, AB: methodology; SS, BY, HLH: analysis and investigation; SS, AM reviewed the statistical optimization section; MA, YB, KH: review and editing; BY: supervision and funding acquisition. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This research was funded by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (MESRS)'s Directorate-General of Scientific Research and Technological Development (DGRSDT). The authors are thankful to the Researchers Supporting Project (RSP2023R113), King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia.

References

1. Assamoi AA, Destain J, Thonart P (2008) 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.
2. Pal A, Khanum F (2011) Identification and optimization of critical medium components using statistical experimental designs for enhanced production of xylanase from *Aspergillus flavus* DFR-6. Food Technol Biotechnol 49(2): 228-236.
3. Asha Poorna C, Prema P (2007) Production of cellulase-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerent *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling. Bioresour Technol 98(3): 485-490. doi: 10.1016/j.biortech.2006.02.033.
4. Richana N, Irawadi T, Nur M, Saillah I, Syamsu K (2007) The Process of Xylanase Production from *Bacillus pumilus* RXAIII-5. Microbiol Indones 1(2): 74-80. doi:10.5454/mi.1.2.6
5. Kuruppasamy G, Gunasekaran P (2010) Optimization of Nutrient Medium Containing Agricultural Waste for Xylanase Production by *Bacillus pumilus* B20. Biotechnol Bioprocess Eng 15: 882-889. doi:10.1007/s12257-009-3094-0
6. Kaur P, Bhardwaj N, Sharma J (2016) Process optimization for hyper production of xylanase via statistical methodology from isolated *Bacillus pumilus* 3gah using lignocellulosic waste. Biocatal Agric Biotechnol 6: 159-167. doi:10.1016/j.bcab.2016.03.009
7. Wejse P, Ingvorsen K, Mortensen K (2003) Xylanase production by a novel halophilic bacterium increased 20-fold by response surface methodology. Enzyme Microb Technol 32(6): 721-727. doi:10.1016/S0141-0229(03)00033-4
8. Nagar S, Mittal A, Kumar D, Kumar L, Kuhad RC, Gupta VK (2011) Hyperproduction of alkali stable xylanase in lesser duration by *Bacillus pumilus* SV-85S using wheat bran under solid state fermentation. N Biotechnol 28(6): 581-7. doi: 10.1016/j.nbt.2010.12.004.
9. Uma M, Murthy V (2009) Partial purification and characterization of *Bacillus pumilus* xylanase from soil source. Kathmandu University Journal of Science, Engineering, and Technology 5: 137-148.
10. Wang YL, Wang Q, Yuan R, Sheng XF, He LY (2018) Isolation and characterization of mineral-dissolving bacteria from different levels of altered mica schist surfaces and the adjacent soil. World J Microbiol Biotechnol 35(1): 2. doi: 10.1007/s11274-018-2573-x.
11. Bailey MJ, Biely P, Poutanen K (1992) Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. J Biotechnol 23(2): 257-270. doi:10.1016/0168-1656(92)90074-J
12. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265-75.
13. Gaur R, Tiwari S, Rai P, Srivastava V (2015) Isolation, Production, and Characterization of Thermotolerant Xylanase from Solvent Tolerant *Bacillus vallismortis* RSPP-15. Int J Polym Sci 2015(14). doi:10.1155/2015/986324
14. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol Biol Evol 35: 1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.
15. Gagaoua M, Hoggas N, Hafid K (2015) Three-phase partitioning of zingibain, a milk-clotting enzyme from *Zingiber officinale* Roscoe rhizomes. Int J Biol Macromol 73: 245-252. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.10.069.
16. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227(5259): 680-5. doi: 10.1038/227680a0.
17. Kumar L, Kumar D, Nagar S, Gupta R, Garg N, Kuhad RC, Gupta VK (2014) Modulation of xylanase production from alkaliphilic *Bacillus pumilus* VLK-1 through process optimization and temperature shift operation. 3 Biotech 4(4): 345-356. doi: 10.1007/s13205-013-0160-2
18. Nagar S, Gupta VK, Kumar D, Kumar L, Kuhad RC (2010) Production and optimization of cellulase-free, alkali-stable xylanase by *Bacillus pumilus* SV-85S in submerged fermentation. J Ind Microbiol Biotechnol 37(1): 71-83. doi: 10.1007/s10295-009-0650-8.
19. Kapilan R, Arasaratnam V (2011) Paddy Husk as Support for Solid State Fermentation to Produce Xylanase from *Bacillus pumilus.* Rice Sci 18(1): 36-45.*doi:10.1016/S1672-6308(11)60006-1*

20. Asha Poorna C, Prema P (2006) Production and partial characterization of endoxylanase by *Bacillus pumilus* using agro-industrial residues. Biochem Eng J 32(2): 106-112. doi:10.1016/j.bej.2006.09.016
21. 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(2): 414-20. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2011.12.026.
22. Dhillon A, Gupta JK, Jauhari BM, Khannaa S (2000) A cellulase-poor, thermostable, alkalitolerant xylanase produced by *Bacillus circulans* AB 16 grown on rice straw and its application in biobleaching of eucalyptus pulp. Bioresour Technol 73(3): 273-277. doi:10.1016/S0960-8524(99)00116-9
23. Boucherba, N, Said B, Copinet E, Hakim H, Duchiron F (2011) Production and partial characterization of xylanase produced by *Jonesia denitrificans* isolated in Algerian soil. Process Biochem 46(2): 519-525. doi: 10.1155/2016/4575024
24. Sindhu I, Chhibber S, Capalash N, Sharma P (2006) Production of Cellulase-Free Xylanase from *Bacillus megaterium* by Solid State Fermentation for Biobleaching of Pulp. Curr Microbiol 53(2): 167-172. doi: 10.1007/s00284-006-0051-4.
25. Kapoor M, Nair LM, Kuhad RC (2008) Cost-effective xylanase production from free and immobilized *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in saccharification of *Prosopis juliflora*. Biochem Eng J 38(1): 88-97. doi:10.1016/j.bej.2007.06.009.
26. Kumar D, Verma R, Sharma P, Sharma R, Prakash C, Bhalla T (2010) Production and partial Purification of xylanase from a new thermophilic isolate *Bacillus pumilus* SILB-X MTCC 8964. Biol Forum 2: 83-87.
27. Teixeira Duarte MC, Alcazar Pellegrino AC, Portugal EP, Ponezi AN, Franco TT (2000) Characterization of alkaline xylanases from *Bacillus pumilus*. Braz J Microbiol 31(2): 90-94.
28. Nagah M, Abdelaziz M, Elsherbiny G, Moghannem S, Shawky B (2016) Qualitative and Quantitative Screening of Cellulases from Different Local Egyptian Fungal Strains. Middle East Journal of Applied Sciences 6(3): 579-587.
29. Battan B, Sharma J, Dhiman S, Kuhad R (2007) Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. Enzyme Microb Technol 41(6): 733-739. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.06.006
30. Bueno D, Brienzo M (2020) Xylan solubilization and use as carbon source/inductor for microbial xylanase production. Braz J of Develop 6(10): 78426-78433. doi:10.34117/bjdv6n10-320
31. Jin Q, Kirk MF (2018) pH as a Primary Control in Environmental Microbiology: 1. Thermodynamic Perspective. Front Environ Sci *6.* doi: 10.3389/fenvs.2018.00021
32. Banu A, Ingale S (2012) Xylanase production by *Bacillus pumilus* AB-1 under solid state fermentation and its application. Bulletin of Environmental and Scientific Research 1: 35-43.
33. Begam, A, Banu S, Priya V (2015) Comparison and Optimization of Thermostable Xylanase Production by *Bacillus pumilus* and *Bacillus cereus* using Corn Husk. Int adv res j 2(9). doi:10.17148/IARJSET.2015.2907
34. Zhou Y, Han LR, He HW, Sang B, Yu DL, Feng JT, Zhang X (2018) Effects of Agitation, Aeration and Temperature on Production of a Novel Glycoprotein GP-1 by *Streptomyces kanasenisi* ZX01 and Scale-Up Based on Volumetric Oxygen Transfer Coefficient. Molecules 23(1): 125. doi:10.3390/molecules23010125.
35. Las-Casas B, Martinazzo A P, Coca B, Souza A, Teodoro C (2020) Optimization of production and partial characterization of xylanase from a newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens* 42: e9. doi:10.5902/2179460X42741
36. Yadav P, Maharjan J, Korpole S, Prasad G S., Sahni G, Bhattarai T, Sreerama L (2018) Production, Purification, and Characterization of Thermostable Alkaline Xylanase From *Anoxybacil- lus kamchatkensis* NASTPD13. Front Bioeng Biotechnol 6: 65. doi:10.5902/2179460X42741
37. Khusro A, Kaliyan B K, Al-Dhabi N A, Arasu M V, Agastian P (2016) Statistical optimization of thermo-alkali stable xylanase production from *Bacillus tequilensis* strain ARMATI. Electron J Biotechnol 22: 16-25. doi:10.1016/j.ejbt.2016.04.002
38. Irfan M, Nadeem M, Syed Q (2014) One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride*-IR05 in solid-state fermentation. J Radiat Res Appl Sci 7(3): 317-326. doi:10.1016/j.jrras.2014.04.004
39. Garai D, Kumar V (2013) Response surface optimization for xylanase with high volumetric productivity by indigenous alkali tolerant *Aspergillus candidus* under submerged cultivation. 3 Biotech 3(2): 127-136. doi: 10.1007/s13205-012-0077-1.
40. Dogan N, Tari C (2008) Characterization of three-phase partitioned exo-polygalacturonase from *Aspergillus sojae* with unique properties. Biochem Eng J 39(1): 43–50. doi:10.1016/j.bej.2007.08.008
41. Dhananjay SK, Mulimani VH (2009) Three-phase partitioning of alpha-galactosidase from fermented media of *Aspergillus oryzae* and comparison with conventional purification techniques. J Ind Microbiol Biotechnol 36(1): 123-8. doi: 10.1007/s10295-008-0479-6.
42. Roy I, Sharma A, Gupta MN (2004) Three-phase partitioning for simultaneous renaturation and partial Purification of *Aspergillus niger* xylanase. Biochim Biophys Acta 1698(1): 107-10. doi: 10.1016/j.bbapap.2003.11.003.
43. Sharma A, Gupta M (2001) Purification of pectinases by three-phase partitioning. Biotechnol Lett 23: 1625-1627. doi : 10.1023/A:1011984517432
44. Rajeeva S, Lele SS (2011) Three-phase partitioning for concentration and Purification of laccase produced by submerged cultures of *Ganoderma sp.* WR-1. Biochem Eng J 54(2): 103-110. doi:10.1016/j.bej.2011.02.006
45. Geetha K, Gunasekaran P (2017) Purification of Endoxylanase from *Bacillus pumilus* B20 for Production of Prebiotic Xylooligosaccharide Syrup; An In vitro Study. Iran J Biotechnol 29; 15(4): 232-240. doi: 10.15171/ijb.1494
46. Menon G, Mody K, Keshri J, Jha B (2010) Isolation, Purification, and characterization of haloalkaline xylanase from a marine *Bacillus pumilus* strain, GESF-1. *Biotechnol Bioproc E* 15(6): 998-1005 (2010). doi:10.1007/s12257-010-0116-x
47. Kamble RD, Jadhav AR (2012) Isolation, Purification, and characterization of xylanase produced by a new species of *Bacillus* in solid-state fermentation. Int J Microbiol 2012: 683193. doi: 10.1155/2012/683193.
48. Sanghi A, Garg N, Gupta VK, Mittal A, Kuhad RC (2010) One-step Purification and characterization of cellulase-free xylanase produced by alkalophilic *Bacillus subtilis* ash. Braz J Microbiol 41(2): 467-76. doi: 10.1590/S1517-838220100002000029.
49. Poorna AC (2012) Purification and Biochemical Characterization of Xylanases from *Bacillus pumilus* and their Potential for Hydrolysis of Polysaccharides. Fermentation Technology 1(1): 1-5. doi:10.4172/2167-7972.1000101
50. Kapilan R, Arasaratnam V (2014) Purification of xylanase produced by *Bacillus pumilus*. J Natl Sci Found 42(4): 365–368. doi:10.4038/jnsfsr.v42i4.7736
51. Yang RC, MacKenzie CR, Bilous D, Narang SA (1989) Identification of two distinct *Bacillus circulans* xylanases by molecular cloning of the genes and expression in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 55(3): 568-72. doi: 10.1128/aem.55.3.568-572.1989.

52. Köstekçi S, Aygan A, Comlekcioglu N, Sariturk S (2022) alkaline cellulase free xylanase from *Bacillus sp.* asx42: properties, Purification and its effect on seed germination- Journal of Microbiol Biotechnol Food Sci doi:10.55251/jmbfs.4431
53. Gessesse A, Gashe BA (2023) Production of alkaline xylanase by an alkaliphilic *Bacillus sp.* isolated from an alkaline soda lake. J Appl Microbiol 83(4): 402-406.doi:10.1046/j.1365-2672.1997.00242.x
54. Guo G, Liu Z, Xu J, Liu J, Dai X, Xie D, Peng K, Feng X, Duan S, Zheng K, Cheng L, Fu Y. (2012) Purification and characterization of a xylanase from *Bacillus subtilis* isolated from the degumming line. J Basic Microbiol 52(4): 419-28. doi: 10.1002/jobm.201100262.
55. Khandeparker R, Parab P, Amberkar U (2017) Recombinant Xylanase from *Bacillus tequilensis* BT21: Biochemical Characterisation and Its Application in the Production of Xylobiose from Agricultural Residues. Food Technol Biotechnol 55(2): 164-172. doi: 10.17113/ftb.55.02.17.4896
56. Khandeparker R, Verma P, Deobagkar D (2011) A novel halotolerant xylanase from marine isolate *Bacillus subtilis* cho40: gene cloning and sequencing. N Biotechnol 28(6): 814-21. doi: 10.1016/j.nbt.2011.08.001.
57. Raj A, Kumar S, Singh SK, Prakash J (2018) Production and Purification of xylanase from alkaliphilic *Bacillus licheniformis* and its pretreatment of eucalyptus kraft pulp. Biocata Agric Biotechnol 15: 199-209. doi:10.1016/j.bcab.2018.06.018
58. Jalal A, Rashid N, Rasool N, Akhtar M (2009) Gene cloning and characterization of a xylanase from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain R5. J Biosci Bioeng 107(4): 360-5. doi: 10.1016/j.jbiosc.2008.12.005.
59. Ratanakhanokchai K, Kyu KL, Tanticharoen M (1999) Purification and properties of a xylan-binding endoxylanase from Alkaliphilic *Bacillus sp.* strain K-1. Appl Environ Microbiol 65(2): 694-7. doi: 10.1128/aem.65.2.694-697.1999
60. Kumar S, Haq I, Prakash J, Singh SK, Mishra S, Raj A (2017) Purification, characterization and thermostability improvement of xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens* and its application in pre-bleaching of kraft pulp. 3 Biotech 7(1): 20. doi: 10.1007/s13205-017-0615-y.
61. Patel K, Dudhagara P (2020) Optimization of xylanase production by *Bacillus tequilensis* strain UD-3 using economical agricultural substrate and its application in rice straw pulp bleaching. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 30*:* 101846. doi:10.1016/j.bcab.2020.101846
62. Kiddinamoorthy J, Anceno AJ, Haki GD, Rakshit S (2008) Production, Purification and characterization of *Bacillus* sp. GRE7 xylanase and its application in eucalyptus Kraft pulp biobleaching. World J Microbiol Biotechnol 24(5): 605-612. doi:10.1007/s11274-007-9516-2
63. Zhang G, Mao L, Zhao Y, Xue Y, Ma Y (2010) Characterization of a thermostable xylanase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* Biotechnol Lett 32(12): 1915-20. doi: 10.1007/s10529-010-0372-z.
64. Ayyachamy M, Vatsala TM (2007) Production and partial characterization of cellulase-free xylanase by *Bacillus subtilis* C 01 using agriresidues and its application in biobleaching of non-woody plant pulps. Lett Appl Microbiol 45(5): 467-72. doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02223.x.
65. Kumar V, Satyanarayana T (2013) Biochemical and thermodynamic characteristics of thermo-alkali-stable xylanase from a novel polyextremophilic *Bacillus halodurans* TSEV1. Extremophiles 17(5): 797-808. doi: 10.1007/s00792-013-0565-1.
66. Rosmine E, Sainjan N, Silvester R, Alikunju A (2017) Statistical optimization of xylanase production by estuarine *Streptomyces sp.* and its application in clarification of fruit juice. J Genet Eng Biotechnol 15(2): 393-401. doi:10.1016/j.jgeb.2017.06.001
67. Garg G, Dhiman S, Gautam R, Mahajan R, Kumar P, Sharma J (2012) Title: Bioscouring of jute fabric by cellulase-free alkalothermostable xylanase from *Bacillus pumilus* ASH. J Mol Catal 85-86. doi:10.1016/j.molcatb.2012.08.002
68. Nagar S, Jain RK, Thakur VV, Gupta VK (2013) Biobleaching application of cellulase poor and alkali stable xylanase from *Bacillus pumilus* SV-85S. 3 Biotech 3(4): 277-285. doi: 10.1007/s13205-012-0096-y
69. Tremblay L, Archibald F (1993) Production of a cloned xylanase in *Bacillus cereus* and its performance in kraft pulp prebleaching. Can J Microbiol 39(9): 853-60. doi: 10.1139/m93-127.
70. Gagaoua M, Hafid K (2016) Three Phase Partitioning System, an Emerging Non Chromatographic Tool for Proteolytic Enzymes Recovery and Purification. Biosens J 5 (1): 1-4. doi:10.4172/2090-4967.1000134
71. Nagar S, Gupta V (2020) Hyper Production and Eco-friendly Bleaching of Kraft Pulp by Xylanase From *Bacillus pumilus* Sv-205 Using Agro Waste Material. Waste Biomass Valorization 12(7): 4019-4031. doi:10.1007/s12649-020-01258-0
72. Ammoneh H, Harba M, Akeed Y, Al-Halabi M, Bakri Y (2014) Isolation and identification of local *Bacillus* isolates for xylanase biosynthesis. Iran J Microbiol 6(2): 127-32.
73. Kang SW, Park YS, Lee JS, Hong SI, Kim SW (2004) Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. Bioresour Technol 91(2): 153-6. doi: 10.1016/s0960-8524(03)00172-x.
74. Heck JX, Flores SH, Hertz PF, Ayub MAZ (2006) Statistical optimization of thermo-tolerant xylanase activity from Amazon isolated *Bacillus circulans* on solid-state cultivation. Bioresour Technol 97(15): 1902–1906. doi: 10.1016/j.biortech.2005.08.013.
75. Kalpana VN, Rajeswari V (2015) Production of Xylanase from Various Lignocellulosic Waste Materials by *Streptomyces* sp. and its Potential Role in Deinking of Newsprint. Asian J Biochem 10(5): 222-229. doi: 10.3923/ajb.2015.222.229
76. Shrinivas D, Savitha G, Raviranjan K, Naik GR (2010) A highly thermostable alkaline cellulase-free xylanase from thermoalkalophilic *Bacillus sp.* JB 99 suitable for paper and pulp industry: Purification and characterization. Appl Biochem Biotechnol 162(7): 2049-57. doi: 10.1007/s12010-010-8980-6.
77. Lu Y, Fang C, Wang Q, Zhou Y, Zhang G, Ma Y (2017) Corrigendum: High-level expression of improved thermo-stable alkaline xylanase variant in *Pichia Pastoris* through codon optimization, multiple gene insertion and high-density fermentation. Sci Rep 7: 44719. doi: 10.1038/srep44719.
78. Subramaniyan S, Prema P (2000) Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. FEMS Microbiol Lett 183(1): 1-7. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb08925.x.
79. Bajaj BK, Manhas K (2012) Production and characterization of xylanase from *Bacillus licheniformis* P11 (C) with potential for fruit juice and bakery industry. Biocatal Agric Biotechnol 1(4): 330-337. doi:10.1016/j.bcab.2012.07.003
80. Immerzeel P, Fiskari J (2023) Synergism of enzymes in chemical pulp bleaching from an industrial point of view : A critical review. Can J Chem Eng 101(1): 312–321. doi:10.1002/cjce.24374
81. Mamo G, Thunnissen M, Hatti-Kaul R, Mattiasson B (2009) An alkaline active xylanase: insights into mechanisms of high pH catalytic adaptation. Biochimie 91(9): 1187-96. doi: 10.1016/j.biochi.2009.06.017.
82. Yang VW, Zhuang Z, Elegir G, Jeffries TW (1995) Alkaline-active xylanase produced by an alkaliphilic Bacillus sp isolated from kraft pulp. J Ind Microbiol 15(5): 434–441. doi:10.1007/BF01569971
83. Rawashdeh RR, Saadoun I, Mahasneh AA (2005) Effect of cultur-

al conditions on xylanase production by *Streptomyces sp.* (strain Ib 24D) and its potential to utilize tomato pomace. Afr J Biotech- nol 4*:* 251-255. doi:10.5897/AJB2005.000-3048

84. Phuyal M, Budhathoki U, Bista D, Shakya S, Shrestha R, Shrestha AK (2023) Xylanase-Producing Microbes and Their Real-World Application, Int J Chem Eng 2023: 14. doi:10.1155/2023/3593035
85. Rodrigues ID, Silva CG, Silva RS, Dolabella SS, Fernandes MF, Fernandes RP (2019) Screening of bacterial extracellular xylanase producers with potential for cellulose pulp biobleaching. Acta sci Biol sci 41(1): 42101. doi:10.4025/actascibiolsci.v41i1.42101

الملخص

من خلال بحثنا هذا تمت معالجة عينات من الرمال و الصخور ما خوذة من الصحراء الجزائرية فقد تم الحصول على 120 سلالة بكتيرية. بعد ذلك تم تحليل هذه السلالات لتقييم أنشطتها الإنزيمية من الكيتيناز والكزيلاناز. ثم تم فرزها وفقًا لقدرتها الإنزيمية من أجل اختيار من هي أكثر كفاءة. تم إختيار سلالتين و تحديد هويتهما من خلال تحليل التسلسل الجزئي للحمض النووي الريبي. السلالة الأولى، المسماة SRIT8 مشابهة بنسبة 98% ل*Bacillus amylolequifaciens* واستخدمت لإنتاج إنزيم الكيتيناز ولتعزيز نشاطها، تم تنفيذ الفحص الإحصائي وخطط التحسين Plackett-Burman و Box-Behnken لتحسين إنتاج الإنزيم. وقد مكّن ذلك من زيادة تخليق الإنزيم إلى الحد الأقصى، مما أدى إلى زيادة ملحوظة في النشاط من 2.36 إلى 112 وحدة. تم عزل الكيتيناز الذي تم إنتاجه باستعمال الكروماتوغرافيا الأيونية، و تم الكشف عن شريط بروتين واحد يبلغ حوالي 31 كيلو دالتون عن طريق الرحلان الكهربائي الهلامي متعدد الأكريلاميد المحتوي على دوديسولفات الصوديوم. تم تسجيل النشاط الأمثل عند درجة حموضة 5 و 40 درجة مئوية. اختُبر النشاط المضاد للفطريات لأنزيم الكيتيناز ضد *Fusarium graminearum*. فقلل الانزيم من نمو الفطريات على وسط وعلى درنات البطاطس. بالإضافة إلى ذلك، كان الإنزيم قادرًا على تقليل الإصابات الفطرية على حبوب القمح خلال عملية الإنبات. كما أثبت الإنزيم أيضًا فعاليته كمبيد حشري حيوي، مما أدى إلى نفوق 52% من حشرة *Sitophilus granarius* Linnaeus ، وهي نوع من الآفات الحشرية للحبوب المخزنة. السلالة الثانية التي تحمل اسم ، وهي سلالة محللة للإكزيلاناز بنسبة 98.69% مشابهة ل *Bacillus pumilus* . استغللنا أيضًا تقنيات التحسين الإحصائي التي أدت إلى إنشاء وسط مثالي أدى إلى زيادة إنتاج إكزيلاناز من 146 وحدة إلى 448.89 وحدة. أثبتت تقنية التقسيم ثلاثي الأطوار أنها غير كافية لتنقية الإنزيم، في حين تم تحقيق تنقية فعالة عن طريق كروماتوغرافيا تبادل الأنيون التي أدت إلى نقاء الإنزيم بكتلة جزيئية تبلغ 60 كيلو دالتون. يبلغ الحد الأقصى لمستوى نشاط إنزيم ال إكزيلاناز عند درجة حرارة 60 درجة مئوية و9 درجة حموضة. وقد تم استخدام إنزيما الإكزيلاناز المنقى كعامل غسيل حيوي لللب، حيث تؤدي جرعة 20 وحدة من الإنزيم لكل جرام من اللب إلى إطلاق المركبات الفينولية والكروموفورات، مع انخفاض محتوى اللب من السكر. كما أثبت الزيلاناز أيضًا أنه عامل معالجة حيوية، حيث يعمل على تحلل مجموعة متنوعة من المخلفات الزراعية الصناعية بشكل فعال، بما في ذلك نخالة القمح والذرة ومخلفات الذرة والعنب وقش القمح وتفل قصب السكر

الكلمات المفتاحية:

الكيتيناز، الإكزيلاناز *Bacillus sp.* ، التحسين الإحصائي، عامل المكافحة الحيوية، الغسل الحيوي للباب الورق، إعادة تدوير المخلفات الزراعية

Résumé

Des échantillons de sables et de pierres prélevés dans le désert algérien ont été exploités pour isoler 120 souches bactériennes, qui ont ensuite été soumises à un criblage enzymatique afin d'évaluer leurs activités chitinolytiques et xylanolytiques. Les souches ont été triées en fonction de leur potentiel enzymatique afin de sélectionner les plus performantes. Deux souches ont été retenues, et leur identité a été établie par l'analyse de la séquence partielle de l'ARNr 16S. La première souche, désignée SRIT8, présentait une similitude de 98% avec *Bacillus amylolequifaciens*, elle a été utilisée pour produire la chitinase. Afin de renforcer son activité, des plans statistiques de criblage et d'optimisation de Plackett-Burman et Box-Behnken ont été mis en œuvre, ils ont permis de maximiser le rendement enzymatique, aboutissant à une augmentation remarquable de l'activité allant de 2,36 U à 112 U. La chitinase ainsi produite a été purifiée par chromatographie échangeuse d'anions, révélant une bande protéique unique de masse moléculaire estimée à 31 kDa, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. L'activité optimale de la chitinase purifiée a été enregistrée à pH 5 et 40°C. L'activité antifongique de la chitinase a été testée, *in vitro* contre l'agent phytopathogène *Fusarium graminearum* sur le milieu PDA et sur les tubercules de pomme de terre, l'enzyme a réduit la croissance mycélienne du champignon sur le milieu PDA ainsi que le développement de la pourriture sèche fusarienne sur les tubercules de pomme de terre. En outre, l'enzyme permettrait de minimiser les infections fongiques sur les grains de blé tout au long du processus de germination. L'enzyme s'est également révélée efficace en tant que bioinsecticide, en entraînant une mortalité de 52% de *Sitophilus granarius* Linnaeus, une espèce d'insecte ravageur des céréales stockées. La seconde souche, nommée RTS11, une souche xylanolytique similaire à 98,69% à *Bacillus pumilus*. Les plans d'optimisation statistique ont permis de créer un milieu optimal faisant passer la production xylanasique de 146 U à 448,89 U. La technique de partitionnement en trois phases s'est avérée insuffisante pour purifier l'enzyme, contrairement à la chromatographie d'échange d'anions, qui a permis de purifier efficacement l'enzyme et de faire apparaître une seule bande d'une masse moléculaire de 60 kDa sur le gel de polyacrylamide. La xylanase est plus active à un pH 9 et à 60°C. La xylanase purifiée a été testée en tant qu'agent de bioblanchiment de la pâte, une dose de 20 U de xylanase par gramme de pâte entraînant la libération de composés phénoliques et de chromophores, ainsi qu'une réduction de la teneur en sucre de la pâte. Notre xylanase s'est également révélée être un agent de bioremédiation, dégradant efficacement une variété de résidus agro-industriels, y compris le son de blé, les déchets de maïs et de raisin, la paille de blé et la bagasse de canne à sucre.

Mots clés : Chitinase, Xylanase, *Bacillus sp*, Optimisation statistique, Agent de lutte biologique, Bioblanchiment de la pâte à papier, Recyclage des résidus d'agricoles.

Summary

Samples of sand and stones taken from the Algerian desert were processed to obtain 120 bacterial strains. These strains were then analysed to assess their chitinase and xylanase enzymatic activities. They were then sorted according to their enzymatic potential in order to select the most efficient. Two strains were selected, and their identity was established by analysis of the partial 16S rRNA sequence. The first strain, designated SRIT8, was 98 % similar to *Bacillus amylolequifaciens* and was used to produce chitinase. In order to enhance its activity, statistical screening and Plackett-Burman and Box-Behnken optimization schemes were implemented to optimize enzyme production. This enabled the synthesis of the enzyme to be maximized, resulting in a remarkable increase in activity from 2.36 U to 112 U. The chitinase thus produced was purified by anion exchange chromatography, revealing a single protein band of around 31 kDa, by sodium dodecysulphate-containing polyacrylamide gel electrophoresis. Optimal activity was recorded at pH 5 and 40°C. The antifungal activity of purified chitinase was tested in vitro against *Fusarium graminearum*, reducing its growth on PDA medium and delaying the development of Fusarium dry rot on potato tubers. In addition, the enzyme was able to minimize fungal infections on wheat grains throughout the germination process. The enzyme also proved effective as a bioinsecticide, resulting in 52% mortality of Sitophilus granarius Linnaeus, a species of insect pest of stored cereals. The second strain, named RTS11, a xylanolytic strain 98.69 % similar to *Bacillus pumilus*. We also exploited statistical optimization techniques, which led to the creation of an optimal medium that increased xylanase production from 146 U to 448.89 U. The three-phase partitioning technique proved insufficient to purify the enzyme, whereas efficient purification was achieved by anion exchange chromatography, which led to the purity of the enzyme with a molecular mass of 60 kDa. Xylanase has a maximum level of activity at a temperature of 60°C and a pH of 9. Xylanase has a maximum level of activity at a temperature of 60°C and a pH of 9. Purified xylanase has been used as a biobleaching agent for pulp, with a dose of 20 U of xylanase per gram of pulp resulting in a release of phenolic compounds and chromophores, with a reduction in the sugar content of the pulp. Our xylanase also proved to be a bioremediation agent, effectively degrading a variety of agro-industrial residues, including wheat bran, maize and grape waste, wheat straw and sugar cane bagasse.

Key words: Chitinase, Xylanase, *Bacillus sp.*, Statistical optimization, Biocontrol agent, Biobleaching of paper pulp, Recycling of agricultural residues.