

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche*  
*Scientifique*



**Université Abderrahmane Mira de Béjaïa**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Microbiologie**

*Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme de Master en*  
*Biotechnologie Microbienne*

*Thème*

---

**Extraction de xylanases produites par *Jonesia***  
***denitrificans* BN13 en utilisant un système composé**  
**de PEG 6000/Phosphate de potassium**

---

**Présenté par :**

M. CHIBANE Belaïd

M. MERMOURI Lyes

**Devant le jury :**

**Présidente :** M<sup>me</sup> BOUDRIASSE. (MAA, Université A.MIRA/ Bejaia).

**Examineurs :**

M<sup>elle</sup> DJINNI I. (MAA, Université A.MIRA / Bejaia).

M. GAGAOUA M. (MAB, INATAA / Constantine).

**Promotrice :** M<sup>me</sup> BOUCHERBA N. (MCB, Université A.MIRA / Béjaïa).

**Promotion : 2012- 2013**

# Remerciements

*Les travaux qui font l'objet de ce mémoire ont été réalisés au niveau du laboratoire de microbiologie appliquée de l'université Abderrahmane Mira de Bejaïa.*

*Nous voudrions exprimer nos sincères remerciements :*

*Aux membres de jury M<sup>elle</sup> DJINNI. D'avoir accepté de présider le jury, et l'examinatrice M<sup>me</sup> BOUDRIASSE. Ainsi que l'examineur M. GAGAOUA. Pour nous avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.*

*A M<sup>me</sup> BOUCHERBA N. qui nous a donné la possibilité d'effectuer ce travail de fin de cycle. Nous la remercions vivement pour nous avoir apporté un appui constant et pour sa disponibilité.*

*Nos sincères remerciements à M. MESSIS A, M. BETTACHE A et M. GAGAOUA pour leur aide précieuse et leurs conseils avisés.*

*Finalement il nous est agréable d'adresser nos remerciements à tous les enseignants, doctorants et les ingénieurs du laboratoire pour leur aide, leur optimisme, leurs encouragements et leurs nombreux conseils.*

# Dédicaces

Quand une personne te manque, tout le monde est dépeuplé. Donc ; je dédie ce modeste travail à toutes les personnes qui ont pris une place dans mon palace. Vous le demeurerez à jamais.

Belaid

# Dédicaces

*Je voudrais dédier cet humble travail à ma chère mère, à mon cher père, à ma grande mère qui m'ont toujours soutenu dans les moments difficiles et à mon grand père qui nous a quitté à jamais.*

*A mes deux frères Sofiane et Fanis dont l'amour pour eux battra toujours*

*A toute la famille MERMOURI*

*A mes cousins, cousines et oncles*

*A mon binôme belaid et sa famille*

*A mon fidèle ami : Samir*

*A toutes les personnes chères à mon cœur et tout particulièrement Sissa*

*A tout les membres de la chambre J06*

*Mon éternelle reconnaissance :*

*Lyes*

<b>Tableau I.</b> Structure des différents types de xylanes .....	6
<b>Tableau II.</b> Gamme d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs .....	18
<b>Tableau III.</b> Gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines par la macrométhode .....	19
<b>Tableau IV.</b> Gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines par la microméthode .....	19
<b>Tableau V.</b> Préparation des SDPAs .....	20
<b>Tableau VI.</b> Récapitulatif des résultats de la croissance, activité xylanase, concentration des protéines et de l'activité spécifique.....	27
<b>Tableau VII.</b> Production de xylanases dans les fermentations en milieu liquide .....	30
<b>Tableau VIII.</b> Volumes des phases des différents systèmes.....	33
<b>Tableau IX.</b> Récapitulatif des résultats obtenus après SDPA (PEG 6000/KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / NaCl) ...	35
<b>Tableau X.</b> Comparaison des résultats de différents travaux effectués sur l'extraction des xylanases par SDPA .....	43
<b>Tableau XI.</b> Résultats des poids moléculaires des xylanases révélées par SDS-PAGE .....	46

<b>Fig. 01.</b> Micrographie électronique de <i>J.denitrificans</i> 55134T Prévot (résolution 2µm) .....	4
<b>Fig. 02.</b> Structure du xylane de bouleau.....	5
<b>Fig. 03.</b> Structure du xylane et les enzymes impliquées dans sa dégradation .....	5
<b>Fig. 04.</b> Principe de l'extraction liquide-liquide .....	10
<b>Fig. 05.</b> Illustration de La courbe binodale .....	12
<b>Fig. 06.</b> Test d'activité xylanasiqne .....	17
<b>Fig. 07.</b> Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS .....	17
<b>Fig. 08.</b> Principe de la dialyse .....	21
<b>Fig. 09.</b> Cuve et accessoires du dispositif d'électrophorèse .....	23
<b>Fig. 10.</b> Colonies de <i>Jonesia denitrificans</i> BN13 entourées de zones d'hydrolyse du xylane de bouleau .....	25
<b>Fig. 11.</b> Courbe d'étalonnage des sucres réducteurs.....	26
<b>Fig. 12.</b> Droite de dosage des protéines par la macrométhode.....	26
<b>Fig. 13.</b> Droite de dosage des protéines par la microméthode .....	26
<b>Fig. 14.</b> Cinétique de croissance et de production de xylanases chez <i>Jonesia denitrificans</i> BN13 .....	28
<b>Fig. 15.</b> Histogramme représentant la spécificité des xylanases vis-à-vis de 03 substrats : le xylane de bouleau, le xylane d'épeautre et d'avoine et le xylane de hêtre .....	31
<b>Fig. 16.</b> Présentation des phases des différents systèmes .....	32
<b>Fig. 17.</b> Effet de la concentration du PEG sur l'activité xylanasiqne et sur l'activité spécifique .....	36
<b>Fig. 18.</b> Effet de la concentration du PEG sur le coefficient de partage et le ratio volumique....	38

<b>Fig. 19.</b> Influence de la concentration du PEG sur le facteur de purification et la récupération d'enzymes.....	38
<b>Fig. 20.</b> Influence de la concentration de PEG sur le rendement et le ratio de concentration .	39
<b>Fig. 21.</b> Effet du pH sur l'activité xylanasiq ue et sur l'activité spécifique.....	40
<b>Fig. 22.</b> Influence du pH sur le facteur de purification et la récupération d'enzymes.....	41
<b>Fig. 23.</b> Influence du pH sur le coefficient de partage et le ratio volumique.....	41
<b>Fig. 24.</b> Effet de pH sur le rendement et le ratio de concentration .....	42
<b>Fig. 25.</b> Courbe d'étalonnage des marqueurs pour l'estimation du poids moléculaire .....	44
<b>Fig.26.</b> SDS-PAGE et zymogramme de la xylanase de <i>Jonesia denitrificans</i> BN13.....	45

## *LISTE DES ABRÉVIATIONS*

---

<b>G+C</b> .....	Guanine + Cytosine.
<b>ARNr</b> .....	Acide Ribonucléique ribosomale.
<b>Lys</b> .....	Lysine.
<b>Ser</b> .....	Sérine.
<b>Glu</b> .....	Glutamine.
<b>DSMZ</b> .....	Deutsch Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen Gmhb.
<b>Galp</b> .....	Galactopyranose.
<b>Glcp</b> .....	Glucopyranose.
<b>Manp</b> .....	Mannopyranose.
<b>Xylp</b> .....	Xylopyranose.
<b>Araf</b> .....	Arabinofuranose.
<b>Arap</b> .....	Arabinopyranose.
<b>Fucp</b> .....	Fucopyranose.
<b>Me</b> .....	Methyl.
<b>GlcpA</b> .....	Glucopyranose Acetyl.
<b>CAZy</b> .....	Carbohydrale active enzymes.
<b>E.C</b> .....	Enzyme commission.
<b>PPG</b> .....	Polypropylène glycol.
<b>BSA</b> .....	Bovin serum albumin.
<b>PAA</b> .....	polyacrylic acid.
<b>DO</b> .....	Densité optique.
<b>U/ml</b> .....	Unité par millilitre.
<b>rpm</b> .....	Rotation par minute.
<b>DNS</b> .....	L'acide 3,5-dinitrosalicylique.
<b>kDa</b> .....	Kilodaltons.
<b>mA</b> .....	Milli-ampère.
<b>Rf</b> .....	Rapport frontal.
<b>pI</b> .....	Point isoélectrique.
<b>PEG</b> .....	Polyéthylène glycol.
<b>TEMED</b> .....	N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine.



---

INTRODUCTION .....	01
--------------------	----

## ***PREMIERE PARTIE : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE***

<b>I. MICROORGANISMES PRODUCTEURS DE XYLANASES .....</b>	<b>02</b>
1. <i>Jonesia denitrificans</i> .....	02
1.1. Historique.....	02
1.2. Caractères généraux et chimiotaxonomie de <i>Jonesia denitrificans</i> .....	03
<b>II. HEMICELLULOSES .....</b>	<b>04</b>
II.1. Xylane de Bouleau.....	04
II.2. Dégradation du xylane.....	05
<b>III. ENDOXYLANASES .....</b>	<b>06</b>
III.1. Classification des endoxylanases .....	07
III.2. Applications des xylanases .....	07
<b>IV. SYSTEME A DEUX PHASES AQUEUSES (SDPA).....</b>	<b>08</b>
IV.1. Considérations générales.....	08
IV.2. Principe .....	09
IV.3. Facteurs influençant la répartition des biomolécules .....	10
♦ Effet du poids moléculaire .....	10
♦ Effet du pH.....	11
♦ Effet de la présence des sels .....	11
♦ Effet de la température .....	11
<b>V. COURBE BINODALE .....</b>	<b>12</b>
<b>VI. APPLICATIONS DE SDPA .....</b>	<b>14</b>
a. La fermentation extractive .....	14
b. Extraction sur membrane couplée avec SDPA .....	14
c. Récupération des biomolécules de valeur à partir des eaux usées.....	14
<b>VII. AVANTAGE DE L'EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE .....</b>	<b>15</b>

## **DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE**

### **MATERIEL ET METHODES**

<b>I- Matériel .....</b>	<b>16</b>
<b>I.1. Appareillages et réactifs chimiques .....</b>	<b>16</b>
<b>I.2. Matériels biologique .....</b>	<b>16</b>
<b>II. Méthodes .....</b>	<b>16</b>
<b>II.1. Repiquage de la souche <i>Jonesia denitrificans</i> BN13 .....</b>	<b>16</b>
<b>II.2. Préparation et ensemencement des milieux MM7 liquide.....</b>	<b>16</b>
<b>II.3. Méthodes analytiques .....</b>	<b>16</b>
<b>II.3.1. Mesure de la biomasse .....</b>	<b>16</b>
<b>II.3.2. Mesure de l'activité xylanasiqye .....</b>	<b>17</b>
<b>II.3.3. Dosage des protéines .....</b>	<b>19</b>
<b>a- Macrométhode.....</b>	<b>19</b>
<b>b- Microméthode .....</b>	<b>19</b>
<b>III. SPECIFICITE DES XYLANASES DE <i>JONESIA DENITRIFICANS</i> BN13 VIS-A-VIS DE DIFFERENTS SUBSTRATS .....</b>	<b>20</b>
<b>IV. PREPARATION DU SYSTEME A DEUX PHASES AQUEUSES (SDPA) .....</b>	<b>20</b>
<b>V. DIALYSE .....</b>	<b>20</b>
<b>1. Principe .....</b>	<b>20</b>
<b>2. Méthodologie.....</b>	<b>21</b>
<b>V. MESURE DES DIFFERENTS PARAMETRES .....</b>	<b>21</b>
• <b>COEFFICIENT DE PARTAGE .....</b>	<b>21</b>
• <b>RATIO VOLUMIQUE .....</b>	<b>22</b>
• <b>MESURE DE RENDEMENT .....</b>	<b>22</b>

- FACTEUR DE PURIFICATION ..... 22
- RECUPERATION DE L'ENZYME ..... 22
- RATIO DE CONCENTRATION ..... 22

VI. SDS-PAGE ET ZYMOGRAMME..... 22

## RESULTATS ET DISCUSSION

I. Repiquage de la souche *Jonesia denitrificans* BN13..... 25

II. Résultats des méthodes analytiques..... 25

III. Cinétique de croissance et production de xylanases ..... 27

IV. Spécificité des xylanases vis-à-vis des différents substrats..... 31

V. Système à deux phases aqueuses (SDPA) ..... 32

    a. Préparation de SDPA ..... 32

    b. La séparation des deux phases aqueuses ..... 34

        b.1. Effet de la concentration de PEG sur le partitionnement des xylanases ..... 37

        b.2. Effet du pH sur le partitionnement des xylanases ..... 39

VI. Mise en évidence des xylanase par SDS-PAGE et zymogramme..... 44

CONCLUSION..... 47

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## ANNEXES

## RÉSUMÉ

# *INTRODUCTION*

Le recours à la biotechnologie blanche et aux ressources renouvelables en tant qu'alternatives à la chimie industrielle intéressent fortement les acteurs du développement durable et de la Chimie verte.

La biomasse végétale est une source abondante et renouvelable de biopolymères, parmi lesquels la cellulose, la lignine et l'hémicellulose, qui est après la cellulose est le second polymère naturel le plus abondant sur terre (**Coughlan, 1992**).

Les principales enzymes capables de dégrader les hémicelluloses sont des hydrolases nommées hemicellulases. Dans le cas des xylanes, ce sont les xylanases. En raison de la complexité structurale des xylanes, leur dégradation complète implique tout un système xylanolytique comprenant une variété d'enzymes dont les unes hydrolysent la chaîne principale et les autres clivent les liaisons entre les substituants et les résidus xylose de la chaîne principale (**Puls et Schuseil, 1993**).

Au laboratoire, La purification des xylanases nécessite une série d'étapes chromatographiques et non chromatographiques qui sont laborieuses et coûteuses à l'échelle industrielle, cette dernière vise à obtenir des xylanases pures tout en diminuant le nombre d'étapes de purification c'est-à-dire augmenter le rendement de production.

Le système d'extraction à deux phases aqueuse (**SDPA**) répond aux attentes des industriels (**Nitsawang et al., 2006 ; Naganagouda et Mulimani, 2008**).

Ce système a été décrit pour la première fois par **Albertsson (1986)**, c'est une technique simple et économique permettant une séparation rapide des phases avec peu de dénaturation des biomolécules surtout les protéines et une concentration des milieux fermentés dès la première étape d'extraction. Grâce à cette technique, la purification nécessiterait une ou deux étape supplémentaires selon le type de microorganisme producteur et la xylanase à purifier (**Aguilar et al., 2006 ; Raja et al., 2011**).

C'est pour ces raisons que nous avons voulu poursuivre les travaux de **Boucherba (2011)**, en essayant de mettre au point le **SDPA** tout en optimisant la concentration du polyéthylène glycol et le pH du système et en fin un zymogramme a été réalisé afin de révéler les activités xylanasiques dans la phase de séparation.

Une revue bibliographique traitant des considérations générales sur les xylanases notamment les endoxylanases ainsi que le système à deux phases aqueuses est donnée comme support théorique qui permet la compréhension de la partie pratique entreprise au niveau du laboratoire de microbiologie appliquée.

# *SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE*

## I. MICROORGANISMES PRODUCTEURS DE XYLANASES

Les microorganismes sont connus pour leur production de xylanases extracellulaires. Les plus étudiées et les mieux caractérisées sont les xylanases d'origine fongique, parmi lesquelles celles produites par le genre *Aspergillus* (Wase *et al.*, 1985 ; Fernandez *et al.*, 1992 ; Kim *et al.*, 1997 ; Siendenberg *et al.*, 1998 ; Ghanem *et al.*, 2000 ; Carmona *et al.*, 2005 ; Shah *et Madamwar*, 2005 ; Lu *et al.*, 2008 ; Wakiyama *et al.*, 2010 et Ncube *et al.*, 2012). Plusieurs espèces de *Trichoderma* produisent également des xylanases (Biely, 1985 ; Senior *et al.*, 1989 ; Bailey *et al.*, 1993 ; Seyis *et Aksoz*, 2005 ; Mohan *et al.*, 2011 et Grigorevski-Lima *et al.*, 2013).

Les xylanases bactériennes sont synthétisées essentiellement par le genre *Bacillus* (Morales *et al.*, 1995 ; Bataillon *et al.*, 2000 ; Heck *et al.*, 2006 ; Kumar Bajaj *et Manhas*, 2012). Les levures produisent également des xylanases extracellulaires (Morosoli *et al.*, 1986 ; Liu *et al.*, 1998 et Xin *et He*, 2013 ).

Parmi les genres bactériens producteurs de xylanases, on retrouve les actinomycètes, particulièrement le genre *Streptomyces* (Ruiz-Arribas *et al.*, 1995 ; Wang *et al.*, 2003 et Kumar *et al.*, 2012). La production de xylanases par le genre *Jonesia* notamment l'espèce *Jonesia denitrificans* BN 13 a été décrite pour la première fois dans la littérature scientifique par Boucherba *et al.* en 2011.

### 1. *Jonesia denitrificans*

#### 1.1. Historique

L'espèce *Jonesia denitrificans* a été isolée pour la première fois à partir d'un sang de bœuf bouilli, elle fut affiliée dans le genre *Listeria* par Sohier *et al.* en 1948, puis elle a été décrite comme *listeria denitrificans* par Prevot en 1961, bien qu'elle soit morphologiquement différente des autres membres du genre *Listeria*.

La souche Prévot 55134<sup>T</sup> (DSM20603 = ATCC14800 CIP 55.134) est la souche type de l'espèce *Jonesia denitrificans* (Pukall *et al.*, 2009). L'analyse du coefficient de Chargaff et de l'hybridation ADN-ADN ont permis de l'exclure du genre *Listeria* et de la reclasser dans le genre *Jonesia* (Rocourt *et al.*, 1987).

L'analyse de la séquence de l'ARN<sub>r</sub>16s, a permis d'établir une relation entre *Jonesia* et les genres *Promicromonospora* et *Cellulomonas* (Stakbrandt *et Pauser*, 1991), des études

phylogénétiques plus approfondies ont permis tout d'abord d'exclure *Jonesia* de la famille des Promicromonosporaceae (Rainey et al., 1995), puis de la famille des Cellulomonadaceae et de l'affilier à une nouvelle famille nommée Jonesiaceae et au sous-ordre des Micrococcineae (Stackbrand et al., 1997).

Selon Pukall et al. (2009), *Jonesia denitrificans* est classée comme suit :

- ↪ Domaine : Bactérie
- ↪ Phylum : Firmicute
- ↪ Classe : Actinobactérie
- ↪ Sous classe : Actinobacterideae
- ↪ Ordre : Actinomycétales
- ↪ Sous ordre : Micrococcineae
- ↪ Famille : Jonesiaceae
- ↪ Genre : *Jonesia*
- ↪ Espèce : *Jonesia denitrificans*

## 1.2. Caractères généraux et chimiotaxonomie de *Jonesia denitrificans*

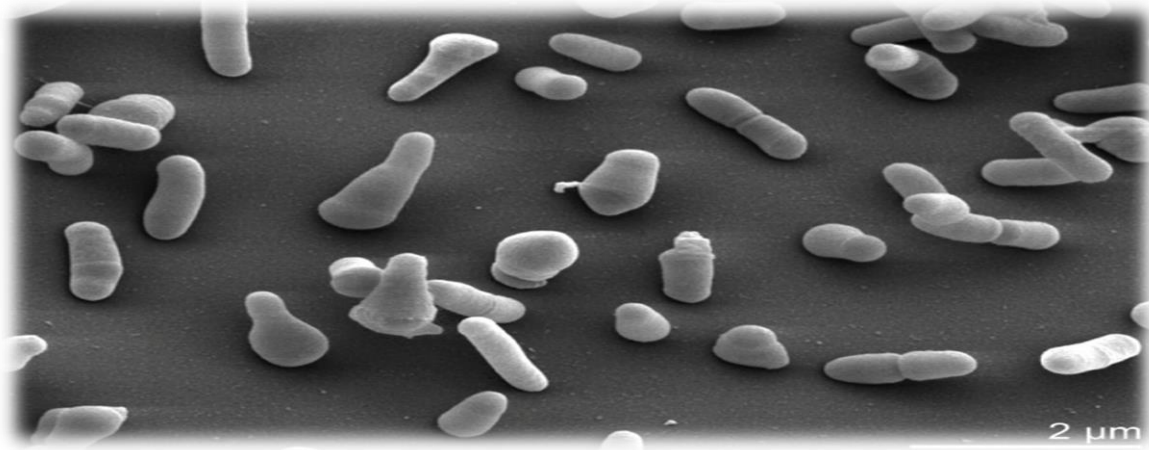
*Jonesia denitrificans* est Gram positive, elle se présente sous forme d'un bâtonnet irrégulier et fin ( $0,3-0,5 \times 2-3 \mu\text{m}$ ). Aéroanaérobie facultative, catalase positive, oxydase négatif, non sporulée. Elle forme des petites colonies convexes et lisses ayant un diamètre de 0,5 à 1,5 millimètre (24 à 48 h), grisâtres et translucides à opaques, devenant jaunâtres après 10 à 20 jours. Sa croissance se fait à des températures allant de 10 à 40°C avec un optimum à 30°C, et à des concentrations de 5% de NaCl. (Pukall et al., 2009).

La paroi cellulaire de la souche Prevot 55134<sup>T</sup> (Fig. 01) contient une muréine de type A4 $\alpha$ , composé seulement de L-Lys-L-Ser-D-Glu, c'est le type A11.48 selon le catalogue DSMZ des souches ([http://www.dsmz.de/microorganisme/main.php?contenent\\_id=35](http://www.dsmz.de/microorganisme/main.php?contenent_id=35)). En plus de l'acide muramique et de la glucosamine, la galactosamine a été détectée dans l'hydrolysate de la paroi cellulaire de *Jonesia denitrificans*. L'acide 12-méthyl-tétranoïque (C15 : 0) et l'acide hexanoïque (C16 : 0) constituent les acides gras cellulaires majeurs.

De faibles quantités de l'acide 14-méthyl-hexanoïque (C17:0) et de l'acide tétradécanoïque (C14:0) ont été également détectées dans la paroi cellulaire.



Le diphosphatidylglycérol a été identifié par chromatographie sur couche mince comme étant le lipide polaire et la ménaquinone de type MK-9 a été détectée en tant que composant majeur (Pukall et al., 2009).



**Fig. 01 :** Micrographie électronique de *J.denitrificans* 55134T Prévot (résolution 2µm)  
(Pukall et al., 2009).

## II. HEMICELLULOSES

L'hémicellulose représente, après la cellulose, le polysaccharide le plus abondant dans la nature (Moine, 2005). Les deux grandes classes des hémicelluloses sont les glucomannanes et les xylanes qui présentent différentes structures : les homoxylyanes, les arabinoxylyanes, les glucuronoxylyanes, les arabinoglucuronoxylyanes, les glucuronoarabinoxylyanes (Peng et al., 2011). Les glucuronoxylyanes sont les principaux hémicelluloses du bois dur, des plantes annuelles et des céréales, ils représentent 30 % de la matière sèche de la paroi cellulaire végétale et 25 à 35 % de la matière sèche lignocellulosique (Ebringerova et Heinze, 2000).

### II.1. Xylane de Bouleau

Dans les bois durs (angiospermes), tel que le bouleau blanc, on retrouve des xylanes et des glucomannanes comme hémicelluloses. Plus précisément, chez le bouleau blanc, on retrouve en majorité un xylane partiellement acétylé (4-O méthylglucurono) ainsi que des quantités moins importantes de glucomannane.

Le xylane (4-O méthylglucurono) a comme structure de base une chaîne linéaire qui peut être simplement ramifiée de  $\beta$ -D-xylopyranose liée par des liaisons glycosidiques (1,4). Les ramifications sont des formes pyroniques de l'acide 4-O-méthyl-D-glucuronique liées en

position a. au carbone C2 de l'unité de xylose. Les groupements acétyles seraient attachés de façon aléatoire à l'oxygène aux carbones C2 ou C3 de l'unité de xylose (Girard, 1992).

La figure 2 montre la structure d'un xylane extrait de bouleau ;

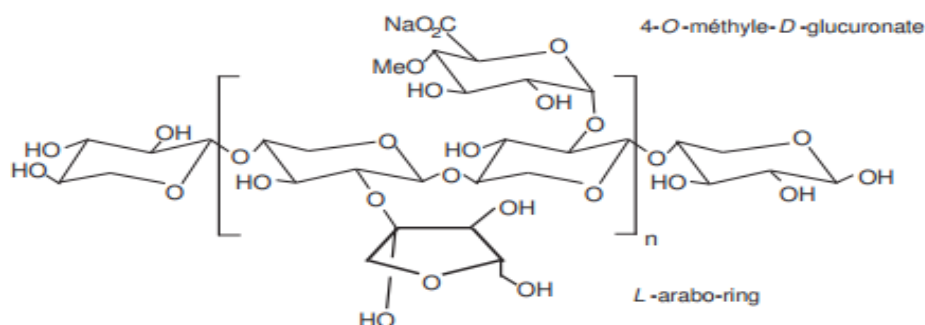


Fig. 02 : Structure du xylane de bouleau (Herring et al., 2004).

## II.2. Dégradation du xylane

L'hydrolyse complète du xylane nécessite l'action synergique des endo- $\beta$ -1,4-xylanases, des  $\beta$ -D-xylosidase, et des enzymes de débranchement de la chaîne latérale du polymère :  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase,  $\alpha$ -D-glucuronidase, acetylxy lanesterase, et feruloyl ou coumaryl estérase (Chávez et al., 2006). La figure 3 illustre la structure du xylane et les sites catalytiques des endoxylanases.

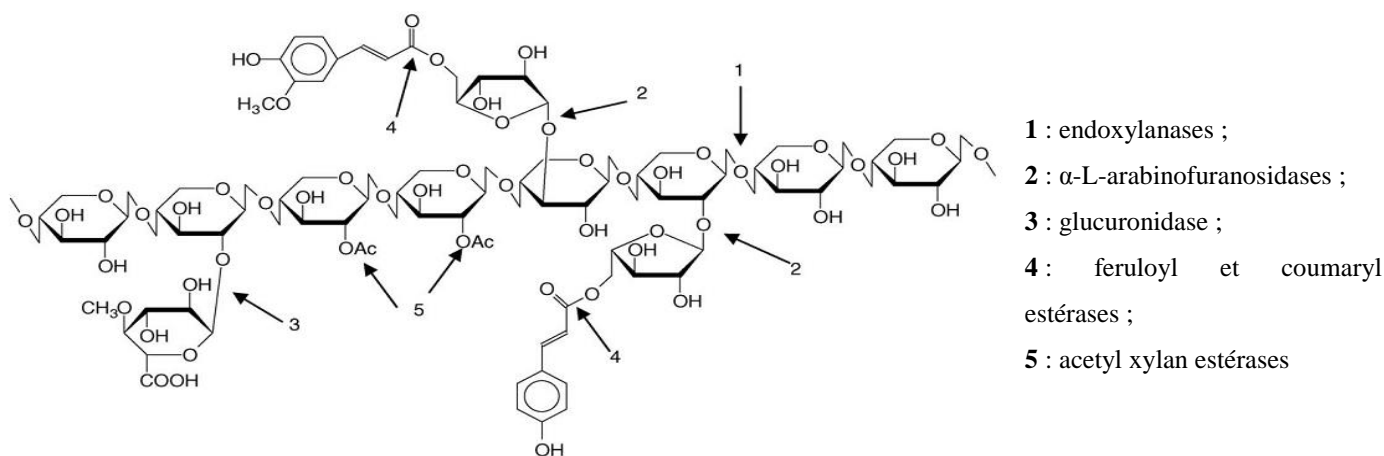


Fig. 03 : Structure du xylane et les enzymes impliquées dans sa dégradation (Chávez et al., 2006).

Le tableau suivant donne la structure des différents types de xylanes.

**Tableau I : Structure des différents types de xylanes (Girio et al., 2010).**

Type du polysaccharide	Origine biologique	(%)	Unités			DP	Représentation Schématique
			Chaîne principale	Chaîne latérale	Liaisons		
Glucuronoxylane	Bois durs	15-30	$\beta$ -D-xylp	4-O-Me- $\alpha$ -D-GlcpA Acétyle	$\alpha$ -(1,2)	100–200	
Arabinoglucuronoxylane	Céréales, Bois tendres, herbes	5–10	$\beta$ -D-Xylp	4-O-Me- $\alpha$ -D- GlcpA $\beta$ -L-Araf	$\alpha$ -(1,2) $\alpha$ -(1,3)	50–185	
Arabinoxylane	Céréales	0.15–30	$\beta$ -D-Xylp	$\alpha$ -L-Araf-Feruloyle	$\alpha$ -(1,2) $\alpha$ -(1,3)	/	
Glucuronoarabinoxylane	Herbe et céréales	15–30	$\beta$ -D-Xylp	$\alpha$ -L-Araf 4-O-Me- $\alpha$ -D-GlcpA Acety	$\alpha$ -(1,2) $\alpha$ -(1,3)	/	
Homoxylane	Algue, tabac	/	$\beta$ -D-Xylp	/	/	/	

(%): g/100 de matière sèche

DP: Degré de polymérisation

,  $\beta$ -D-Galp ;  $\beta$ -D-Glcp ;  $\beta$ -D-Manp ; ,  $\beta$ -D-Xylp ; ,  $\beta$ -L-Araf ; ,  $\beta$ -L-Arap ; ,  $\alpha$ -L-Fucp ;

, 4-O-Me- $\alpha$ -D-GlcpA ; , Acetyl.

### III. ENDOXYLANASES

Les endoxylanases sont des glycosidases (O-glycoside hydrolases, EC 3.2.1.x) qui catalysent l'hydrolyse de la liaison  $\beta$ -1,4-D-xylosidique dans les régions non substituées des chaînes de xylanes pour aboutir au xylose. Elles libèrent des xylooligosaccharides linéaires de haut poids moléculaires (Assamoi, 2009).

### III.1. Classification des endoxylanases

Face à l'hétérogénéité et la complexité des xylanes, les microorganismes produisent plusieurs types d'endoxylanases. Cette variété au niveau des séquences, des structures et des spécificités de substrat a montré les limites de la classification basée uniquement sur le substrat.

Une nouvelle classification des xylanases sur leurs propriétés physicochimiques a alors été introduite (**Wong et al., 1988**). On distingue d'un côté les endoxylanases de masse moléculaire élevée (>30 kDa) et ayant un pI acide, de l'autre côté, celles de faible poids moléculaire (< 30 kDa) et de pI basique. Mais ce système présente lui aussi ses limites, car 30 % d'endoxylanases d'origine fongique, ne peuvent pas y être classées.

Un système de classification basé sur la comparaison des structures primaires des domaines catalytiques est employé. Il est accessible dans la base de données ExPASy (**Henrissat, 1991 ; Henrissat et Davies, 1997**).

D'après cette classification, les enzymes possédants une activité xylanolytique  $\beta$ -(1,4), c'est-à-dire avec la nomenclature E.C.3.2.1.8, appartiennent aux familles 5, 8, 10, 11, 16, 26, 43, et 62. Les endo- $\beta$ -1,4-xylanases les plus étudiés se trouvent dans les familles 10 (anciennement famille F) et 11(anciennement famille G).

Par contre, les familles 16 et 62 contiennent en réalité des enzymes bifonctionnelles avec deux domaines catalytiques distincts (**Flint et al., 1993 ; Hernandez et al., 2001**). Quant à la famille 26, il s'agit de  $\beta$ -1,3-xylanases. Les endo- $\beta$ 1, 4-xylanases avec un seul domaine catalytique se limitent aux familles 5, 8, 10, 11 et 43. 96 familles de xylosidase ont été décrites (**Collins et al., 2005**).

### III.2. Applications des xylanases

Les xylanases sont les enzymes les plus vendues dans le marché des hémicellulases. Elles peuvent être utilisées dans une large gamme de procédés industriels, couvrant tous les secteurs du marché des enzymes industrielles.

Elles sont utilisées dans l'élaboration d'aliments pour les animaux, ils contribuent dans l'amélioration de la digestibilité et la valeur nutritionnelles des aliments. En industrie de jus de fruits et brasseries comme agent améliorant l'extraction ou la filtration. Comme agents de blanchissement dans l'industrie papetière, elles améliorent la pureté de la cellulose et permet

de réduire de 50% la quantité de chlore nécessaire pour le blanchissement de la pâte à papier et de la quantité d'effluents toxiques rejeté dans l'environnement (**Collins et al., 2005**).

Dans l'industrie de textile lors de l'étape de dégraissage et de blanchissement, la méthode classique consiste en un traitement chimique utilisant des concentrations élevées en hydroxyde de sodium, de solution de peroxyde et d'hypochlorite de sodium qui endommage les fibres. La xylanase agit spécifiquement sur les impuretés et cause leurs surpressions de manière efficace ; les fibres deviennent plus lisses et souples (**Dhiman et al., 2008**).

Elles sont utilisées dans la production du bioéthanol : Ce procédé consiste en une bioconversion de la biomasse lignocellulosique en bioéthanol ; celui-ci peut être utilisé pour oxygéner le carburant en élevant son contenu en oxygène, permettant ainsi une meilleure oxydation des hydrocarbonés et une réduction des gaz à effet de serre dans l'atmosphère (**Girio et al., 2010**).

D'autres applications existent, dans l'extraction du café et dans la préparation des cafés solubles, dans les détergents, dans la production des polysaccharides pharmacologiques actifs (pour une utilisation comme agents antimicrobiens ou comme antioxydants) ; dans la production des alkyl glycosides (pour une utilisation comme surfactants) (**Collins et al., 2005**).

#### **IV. SYSTEME A DEUX PHASES AQUEUSES (SDPA)**

##### **IV.1. Considérations générales**

Les avancées en biotechnologie blanche ont ouvert de nombreuses possibilités pour la production de biomolécule à l'échelle industrielle. L'extraction liquide-liquide est une technique prometteuse qui peut probablement être employée au lieu des techniques chromatographiques ou comme des processus complémentaires à ces dernières pour réduire les coûts en aval du traitement de beaucoup de produits biologiques (**Jozala et al., 2012**).

Le système à deux phases aqueuses (SDPA), est une méthode d'extraction liquide-liquide qui emploie deux phases aqueuses, il a été introduit par **Albertsson en 1986**. Il fournit une alternative et une approche efficace pour la purification des biomolécules par partage entre deux phases liquides et il résulte de l'incompatibilité entre deux polymères dans l'eau ou une solution de polymères avec une solution saline (**Banik, 2003**).

Généralement, les systèmes à deux phases aqueuses sont constitués soit de polymère/électrolytes ou polymères/soluté de faible poids moléculaire, qui sont mélangés pour former quatre groupes. Le premier groupe comprend deux copolymères non ioniques tels que polyéthylène glycol (PEG)/dextrane ; PEG/alcool polyvinylique. Le second groupe est constitué d'un polyélectrolyte et d'un polymère non ionique tels que sulfate de dextrane sodique/PPG. Le troisième groupe est formé par deux électrolytes tels que sulfate de dextrane sodique /carboxyméthyl dextrane sodique. Dans le quatrième groupe on retrouve un polymère non ionique et des composés de faible poids moléculaire tels que PEG/phosphate de potassium (**Mazzola et al., 2008**).

Le PEG est utilisé préférentiellement dans le SDPA, car il est disponible à faible coût et forme un système à deux phases avec d'autres polymères neutres ainsi qu'avec des sels, il peut significativement améliorer le repliement des protéines pour les réactiver (**Cleland et al., 1992**).

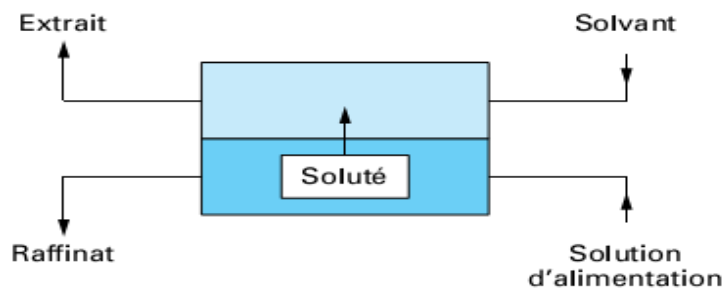
#### **IV.2. Principe**

L'extraction liquide-liquide constitue une opération unitaire de génie chimique. Elle doit son origine à la chimie analytique dont les méthodes d'identification des espèces en solution sont fondées sur des techniques de séparation. Plus précisément, l'extraction liquide-liquide qui est un procédé qui permet la séparation de deux ou plusieurs constituants d'un mélange en mettant à profit leurs distributions inégales entre deux liquides pratiquement non miscibles (**Gérard, 1998**).

En pratique, une extraction par solvant nécessite deux opérations :

- La mise en contact aussi intime que possible de la matière à traiter (solide hétérogène ou liquide) avec le solvant choisi. Le contact est prolongé aussi longtemps qu'il est nécessaire pour parvenir à l'état d'équilibre entre deux phases ;
- La séparation mécanique des deux phases qui fournit :
  - ✓ l'extrait : qui correspond à la solution riche en solvant,
  - ✓ le Raffinat : qui correspond à une seconde couche liquide riche en diluant,

L'ensemble de ses deux opérations constitue une unité ou un étage d'extraction (**Koller, 2010**). La figure 4 illustre le principe de l'extraction liquide-liquide.



**Fig. 04:** Principe de l'extraction liquide-liquide (Gérard, 1998).

### IV.3. Facteurs influençant la répartition des biomolécules

La répartition des biomolécules dans le SDPA est influencée par beaucoup de paramètres tels que ; le type et la concentration du sel, le pH, le type de polymère formant la phase, le poids et la concentration moléculaire, la température (Liu *et al.*, 2011). Ces facteurs sont discutés dans la section suivante (Raja *et al.*, 2011).

#### ◆ Effet du poids moléculaire

Le poids moléculaire du polymère utilisé influence la répartition des biomolécules dans le système à deux phases aqueuses. Plus le poids moléculaire du polymère est élevé, plus la concentration en polymère requise pour la séparation des phases est faible.

L'augmentation de la concentration du polymère, induit une augmentation des différences de densité, de l'indice de réfraction et de la viscosité entre les deux phases.

Dans le cas d'un système PEG/Sel, la répartition des biomolécules est régit par l'effet de volume d'exclusion et l'effet de relargage des sels.

Dans les systèmes qui sont composés d'un polymère de concentration ou de poids moléculaire élevé et une concentration élevée en sel, la répartition des protéines se fera au niveau de l'interphase (Raja *et al.*, 2011).

L'augmentation du coefficient de répartition  $K$  est due à l'un des points suivant :

- Si le poids moléculaire du PEG est faible, il y aura une diminution de la tension superficielle entre les deux phases qui induit une augmentation du coefficient de répartition  $K$  ;
- Si la concentration en sel est élevée, il y aura une augmentation de la force ionique dans la phase inférieure, ce qui améliore la répartition des biomolécules dans la phase supérieure ;

- Si la concentration en PEG est élevée, il y aura augmentation du nombre d'unités de polymère impliqués dans la répartition biomoléculaire, par conséquent les biomolécules se retrouveront dans la phase supérieure à cause de l'interaction hydrophobe entre les biomolécules et le PEG.

◆ **Effet du pH**

Le pH du système affecte la répartition des protéines car il peut modifier la charge du soluté ou le taux des molécules chargées. La charge nette de la protéine dépend du pH. Elle peut être positive quand le pH est supérieur au point isoélectrique (pI), négative lorsque le pI est supérieur au pH, nulle lorsque le pH et le pI sont égaux.

De nombreux travaux ont rapporté qu'à pH élevé, les biomolécules chargées négativement vont être retrouvées dans la phase supérieure. Ainsi, le coefficient de répartition augmente (**Raja et al., 2011**).

◆ **Effet de la présence des sels**

La présence des sels neutres comme le NaCl n'a pas un grand effet sur l'équilibre liquide – liquide des systèmes à deux phases aqueuses. Le NaCl modifie le coefficient de répartition à cause de la distribution différentielle des ions de sel entre les phases.

Le sel ajouté contient des ions avec des Hydrophobicités différentes. Les ions hydrophobes forcent le partitionnement de leurs contre ions dans les phases la plus hydrophobes et vis-versa. L'effet de relargage des sels force le déplacement des biomolécules de la phase riche en sel vers la phase riche en PEG (**Raja et al., 2011**).

◆ **Effet de la température**

L'effet de la température est très différent sur chaque phase du système, il dépend du type de polymère utilisé. A température élevée, la séparation des deux phases se fait facilement à de faibles concentrations en PEG et en sels, alors que dans le cas d'un système PEG/Dextrane la formation des deux phases se fait facilement à de basses températures. Une augmentation de la température cause une différence dans la composition des phases. En effet, elle augmente la concentration du PEG et du sel dans les phases supérieures et inférieures respectivement. Par conséquent ; le nombre de molécules d'eau disponibles pour l'hydratation du soluté diminue dans la phase inférieure à cause de l'augmentation de la concentration du sel. Ceci réduit la solubilité des biomolécules dans la phase. L'augmentation



de la température peut rompre les liaisons des biomolécules qui deviennent plus flexibles (Ratanapongleka, 2010).

#### IV.4. Courbe Binodale

Le SDPA a un diagramme monophasique dans un ensemble de conditions particulières telles que le pH et la température (Hatti-Kaul, 2000). Le diagramme de phases fournit des informations sur la concentration de la phase dans laquelle sont formés les composants nécessaires pour la séparation des deux phases, la concentration des composants dans les phases supérieures et inférieures et le ratio des volumes des phases (Raja et al., 2011).

La figure suivante illustre la représentation de la courbe binodale ;

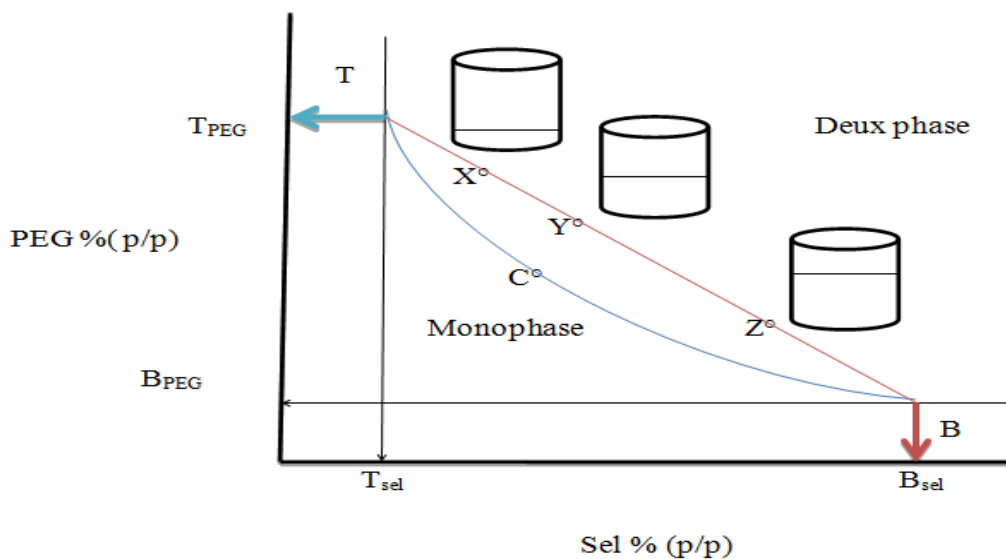


Fig. 05 : Illustration de La courbe binodale (Raja et al., 2011).

Dans la figure : TCB= courbe binodale ; C= point critique ; TB= ligne de jonction, T=composition de la phase supérieure ; B=composition de la phase inférieure ; X, Y et Z= composition totale de SDPA.

Dans la figure n° 5, la courbe binodale TCB divise la région des concentrations des composants qui forment deux phases aqueuses non miscibles (au-dessus de la courbe) de celle qui forme une seule phase (au-dessous de la courbe).

Les trois systèmes X, Y et Z diffèrent dans leurs compositions initiales et dans leurs ratios volumiques, cependant, ils ont tous la même composition dans la phase supérieure (PS) (T<sub>PEG</sub>, T<sub>sel</sub>) et dans la phase inférieure (PI) (B<sub>PEG</sub>, B<sub>sel</sub>) à l'équilibre. Parce qu'ils sont alignés

sur la même ligne de jonction (**TB**), dont les extrémités déterminent les compositions des phases à l'équilibre et se situent dans une courbe convexe appelée la courbe binodale.

Cette courbe représente la séparation entre les deux phases non miscibles. Les données binodales sont nécessaires pour la conception de procédés d'extraction par des SDPA et le développement de modèles qui permettent de prévoir le partitionnement de biomolécules (**Raja et al., 2011**).

La longueur de la ligne de jonction (LLJ) et les concentrations des composants sont exprimées en pourcentage massique (% P/P), elle est reliée à la masse des phases par l'équation :

$$\frac{V_s \rho_s}{V_i \rho_i} = \frac{XB}{XT} \quad (1)$$

Dans laquelle : **V<sub>s</sub>** : Volume de la phase supérieure (**s**) ; **ρ<sub>s</sub>**: Densité de la phase supérieure ; **V<sub>i</sub>** : Volume de la phase inférieure (**i**) ; **ρ<sub>i</sub>**: Densité de la phase inférieure ; **XB** et **XT** sont les longueurs des segments de la ligne de jonction comme ils sont montrés dans la **figure n°5**.

LLJ et la pente de la ligne de jonction (**PLJ**) peut être liée à la composition de la phase à l'équilibre comme suit :

$$LLJ = \sqrt{(B_{sel} - T_{sel})^2 + (B_{PEG} - T_{PEG})^2} \quad (2)$$

Les lignes de jonction sont généralement parallèles, donc la PLJ peut être calculée par la formule suivante facilitant ainsi la construction des autres lignes de jonction :

$$PLJ = \frac{(T_{PEG} - B_{PEG})}{(B_{sel} - T_{sel})} = \frac{\Delta PEG}{\Delta sel} \quad (3)$$

Plus les lignes de jonction diminuent dans leurs longueurs, plus elles se rapprochent d'un point critique (**C**) sur la courbe binodale, où la LLJ=0. Au niveau de ce point, la composition et le volume des deux phases sont théoriquement égales (**Raja et al., 2011**).

## IV.5. Applications du SDPA

### a. La fermentation extractive

La fermentation extractive a été développée pour éviter l'inhibition du produit final, il s'agit d'une technique qui implique la combinaison de SDPA comme première étape pour la récupération d'un produit à partir du bouillon de fermentation pendant sa synthèse. L'extraction des produits en continue permet d'éviter l'inhibition du produit final (**Raja et al., 2011**).

**Chavez-Santoscoy et al. (2010)** ont employés SDPA pour la récupération in situ de  $\beta$ -carotène et la lutéine de *Synechocystis* sp. Ils ont découvert que le PEG/phosphate ne convenait pas pour la récupération de  $\beta$ -carotène car le sel inhibe la croissance cellulaire, Par conséquence, en utilisant le système PEG/dextrane, il est possible de récupérer 95,9% de la  $\beta$ -carotène dans la phase supérieure et 77,4% de la lutéine dans la phase inférieure.

### b. Extraction sur membrane couplée avec SDPA

**Riedl et Raiser (2008)**, ont utilisé cette méthode pour l'extraction de la BSA et des lysozymes en utilisant le système MEMEX qui est composé de SDPA (PEG/phosphate), d'un surfactant (agent tensioactif) Tween-20 (pour augmenter le coefficient de distribution et pour commencer le processus d'extraction) et d'une membrane hydrophobe (Liqui-Cel X40). Puisque la séparation de phase n'est pas nécessaire, elle peut être utilisée comme un processus d'extraction en continu en multi-étages.

### c. Récupération des biomolécules de valeur à partir des eaux usées

Les eaux usées provenant d'aliments, des produits pharmaceutiques, de tanneries, de produits laitiers contiennent beaucoup de biomolécules qui doivent être récupérées. **Saravanan et al. (2007)** ont étudié la récupération des protéines à partir des eaux usées des tanneries en utilisant un SDPA composé de 20,81% PEG 4000/ 20,95% MgSO<sub>4</sub>, 1M NaCl à pH 8, ils ont réussi à récupérer (82,68%) de protéines dans la phase supérieure.

Les mêmes chercheurs ont étudié la récupération des protéines à partir des eaux usées des tanneries en utilisant un SDPA composé de PEG/sulfate de sodium et ont conclu que le système PEG 6000/sulfate de sodium était le meilleur par rapport au PEG6000/sulfate d'ammonium. Dans ce cas, ils ont réussi à récupérer (92,75%) des protéines solubles à partir des eaux usées.

**Rao et Nair (2011)**, ont utilisé un SDPA composé de PEG/PAA pour récupérer les glycosaminoglycanes (GAG) à partir des eaux usées de tanneries. Dans cette étude, ils ont constaté que le système de PEG4000/PAA (54,7% de LLJ, un pH de 8 et une température de 20 ° C) était meilleur et le taux de la récupération a été de (91,5%).

#### **IV.6. Avantages de l'extraction liquide-liquide**

Le SDPA présente de nombreux avantages :

- ✓ Technique simple et non dangereuse (présence de plus de 80% d'eau dans les deux phases) ;
- ✓ une séparation rapide avec peu de dénaturation (les composants organiques volatils ne sont pas utilisés) ;
- ✓ le transfert de masse est rapide (tension interfaciale faible) ;
- ✓ la séparation est sélective (un partage d'affinité) (**Albertsson, 1986**).

# *MATERIEL ET METHODES*

## I. MATERIEL

### I.1. APPAREILLAGES ET REACTIFS CHIMIQUES

L'appareillage et les réactifs chimiques utilisés dans le présent travail sont cités dans l'annexe I.

### I.2. MATERIEL BIOLOGIQUE

La souche *Jonesia denitrificans* BN13 utilisée dans ce travail a été affiliée au genre *Jonesia* selon le séquençage du gène ARNr 16S ; elle se présente sous forme de petit bacille irrégulier, mobile, catalase+ et Aéroanaérobie facultative, elle a été isolée d'un sol de jardin situé dans le village d'ihaddaden de la wilaya de Bejaïa (Boucherba et al., 2011).

## II. METHODES

### II.1. REPIQUAGE DE LA SOUCHE *Jonesia denitrificans* BN13

A partir d'un milieu de culture minimal solide nommé MM7 (Annexe I), contenant le xylane de bouleau comme seule source de carbone, des boîtes de Pétrie contenant le MM7 ont étéensemencées en surface avec 4 colonies de la souche *Jonesia denitrificans* BN13, les milieux sont incubés pendant 5 jours à 37°C.

### II.2. PREPARATION ET ENSEMENCEMENT DES MILIEUX MM7 LIQUIDES

Les milieux MM7 liquides (Annexe I), sont les mêmes que ceux cités ci-dessus, seulement ils ne contiennent pas d'agar, ces derniers sont répartis à raison de 100 ml dans des flacons d'une contenance de 500 ml.

A partir d'une préculture de 48 h, un inoculum de 2% (v/v) est utilisé pour l'ensemencement, les flacons sont incubés de 2 à 5 jours à 37°C. Les milieux de cultures sont centrifugés à 6000 g pendant 10 min afin de récupérer le surnageant qui contient les xylanases. La biomasse ainsi que l'activité xylanasiq ue ont été suivies (voir méthodes analytiques).

### II.3. METHODES ANALYTIQUES

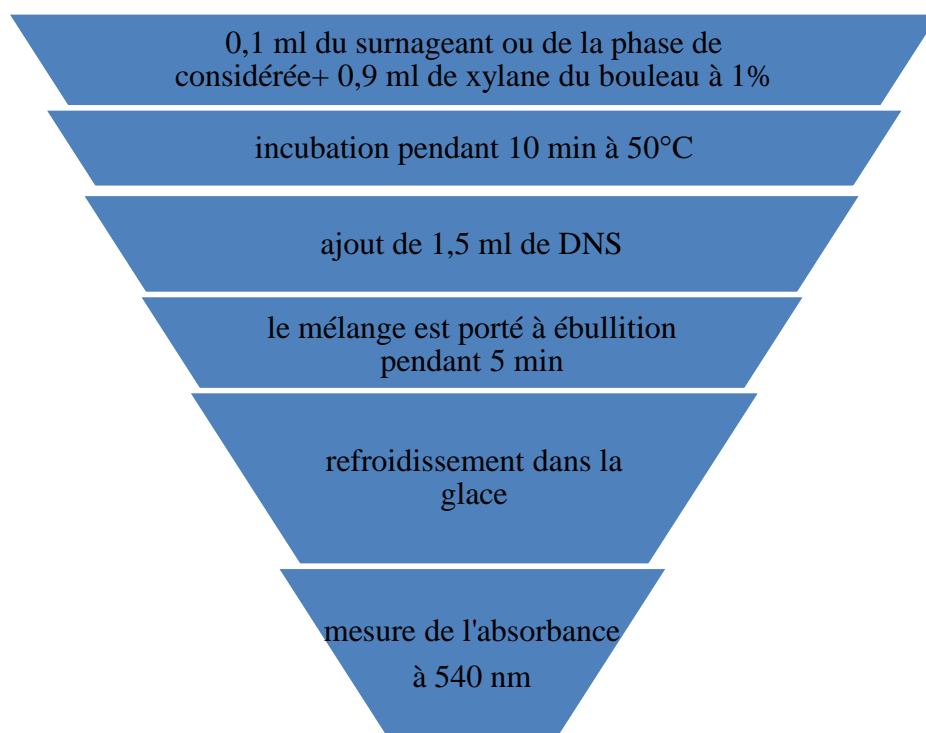
#### II.3.1. MESURE DE LA BIOMASSE

La mesure de la biomasse est effectuée à une longueur d'onde de 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, le témoin contient le milieu de culture sans ensemencement.

### II.3.2. MESURE DE L'ACTIVITE XYLANASIQUE

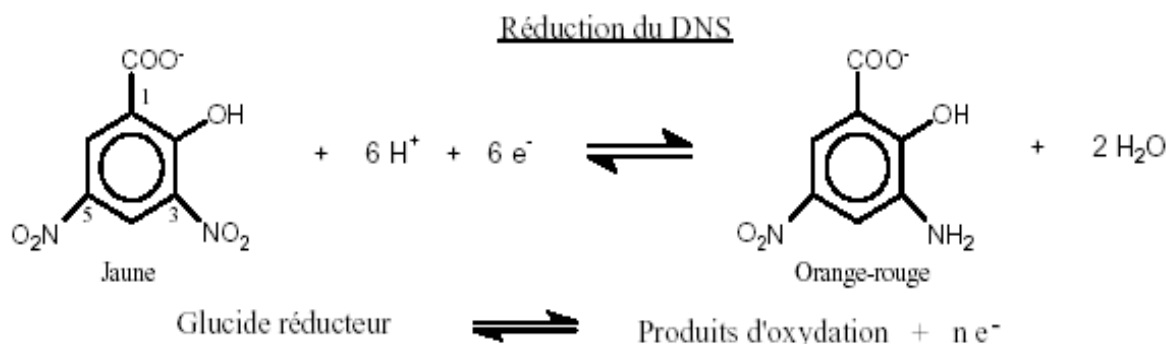
L'activité xylanase est déterminée en présence du xylane de bouleau à raison de 1 % (m/v) préparé dans du tampon phosphate sodique (50 mM, pH 7). Le mélange réactionnel est composé de 100  $\mu$ l du surnageant de culture auquel sont ajoutés 900  $\mu$ l de xylane de bouleau à 1 % à pH 7. Ce mélange est incubé à 50°C pendant 10 min (Wang *et al.*, 2003).

Le dosage des sucres réducteurs est effectué selon la méthode de Miller, 1959 (Voir Figure 06).



**Fig. 06 :** Test d'activité xylanase (Miller, 1959).

En milieu alcalin et à chaud, l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNS) jaune est réduit par les oses réducteurs en acide 3-amino 5-nitrosalicylique rouge orangé (Voir Figure 07).



**Fig. 07 :** Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS (Bailey *et al.*, 1992).

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

Le témoin correspond à la solution de xylane incubée sans le surnageant à 50°C pendant 10 mn, puis on ajoute 1,5 ml de DNS et 100 µl du surnageant.

Après refroidissement dans la glace, la lecture des absorbances est effectuée à 540 nm. La courbe d'étalonnage est réalisée avec une solution de xylose à 1,5 mg/ml. A partir d'une solution mère de xylose à 1,5 mg/ml, différentes solutions ayant les concentrations de 0, 0,3, 0,6, 0,9, 1,2 et 1,5 mg/ml sont préparées (**Voir Tableau II**).

**Tableau II :** Gamme d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs (**Bailey et al., 1992**).

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

Une unité d'activité xylanasiqne est définie comme étant la quantité d'enzyme qui produit une µmole de sucres réducteurs (équivalent en xylose), par minute, dans un ml de surnageant de la culture ou de la phase considérée et dans les conditions expérimentales mentionnées ci-dessus. L'activité xylanasiqne est calculée selon la relation donnée par **Bailey et al. en 1992** :

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

**C<sub>x</sub>** : Concentration des sucres réducteurs du mélange réactionnel (µmole/ml).

**C<sub>t</sub>** : Concentration des sucres réducteurs du mélange témoin (µmole/ml).

**D** : facteur de dilution.

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



### II.3.3. DOSAGE DES PROTEINES

Les quantités de protéines sont estimées selon la méthode de (**Bradford, 1976**), avec le réactif de Bradford (**Voir annexe II**). Le dosage de protéines est effectué selon deux techniques : la macrométhode et la microméthode.

#### a- MACROMETHODE

Cette technique permet de doser des quantités de protéines comprises entre 0,2 et 1mg/ml. Le dosage consiste, dans un premier temps, à ajouter 100µL d'échantillon à 5ml de réactif de Bradford. Le mélange, après homogénéisation, est ensuite placé 5 min à l'obscurité, et l'absorbance est mesurée à 595 nm.

Les concentrations protéiques ont été calculées à partir de la courbe d'étalonnage utilisant l'albumine de sérum bovin (BSA) comme standard (**Voir Tableau III**).

#### Gamme étalon :

Solution mère de BSA à 1mg/ml

**Tableau III** : Gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines par la macrométhode.

<b>BSA (mg/ml)</b>	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
<b>BSA (µl)</b>	0	20	40	60	80	100
<b>Eau déminéralisée (µl)</b>	100	80	60	40	20	0

#### b- MICROMETHODE

Cette technique permet de doser des quantités de protéines comprises entre 2 et 10 µg/ml. Le dosage consiste à ajouter 800µl d'échantillon, dilué 7 fois, à 200µl de réactifs de Bradford. Le mélange, après homogénéisation, est ensuite placé 5 min à l'obscurité, et la densité optique est mesurée à 595 nm (**Voir Tableau IV**).

#### Gamme étalon :

Solution mère de BSA à 10 µg/ml

**Tableau IV** : Gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines par la microméthode.

<b>BSA (µg/ml)</b>	0	2	4	6	8	10
<b>BSA (µl)</b>	0	160	320	480	640	800
<b>Eau déminéralisée (µl)</b>	800	640	480	320	160	0

### III. SPECIFICITE DES XYLANASES DE *JONESIA DENITRIFICANS* BN13 VIS-A-VIS DE DIFFERENTS SUBSTRATS

- ✓ Des solutions du xylane de bouleau, d'épeautre et d'avoine et de hêtre, sont préparées à raison de 1% (m/v) ;
- ✓ Après centrifugation des milieux de cultureensemencés, les surnageants récupérés subissent des tests d'activités xylanasiques (**paragraphe II.3.2**), en changeant à chaque fois le type de la solution du xylane préparée.

### IV. PREPARATION DU SYSTEME A DEUX PHASES AQUEUSES (SDPA)

Les systèmes SDPAs sont préparés à différentes concentrations de PEG 6000 (Prolabo), 13%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (m/v) et 0,1 M NaCl (**Voir Tableau V**) avec 20ml du milieu de cultureensemencé, agité et ajusté à pH 7, puis laisser décanter dans des ampoules à décanter.

Le meilleur SDPA obtenue pour la séparation a été ajusté à différentes valeurs de pH 6 et 8, le système à pH 6 est ajusté par le monophosphate disodique ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) et le système à pH 8 est ajusté par le Tris.

Les activités enzymatiques ainsi que les protéines totales sont dosées selon (paragraphe **II.3.2** et **II.3.3**), les rendements, les coefficients de partage et les facteurs de purification sont calculés.

**Tableau V** : Préparation des SDPAs.

PEG6000 (m/m)		$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (m/m)		NaCl (M)	
(%)	Masse (g)	(%)	Masse (g)	(M)	Masse (g)
<b>10</b>	2,338	13	3,049	0,1	0,11
<b>12</b>	2,8	13	3,049	0,1	0,11
<b>13</b>	3,27	13	3,049	0,1	0,11
<b>14</b>	3,5	13	3,049	0,1	0,11
<b>15</b>	3,04	13	3,049	0,1	0,11

### V. DIALYSE

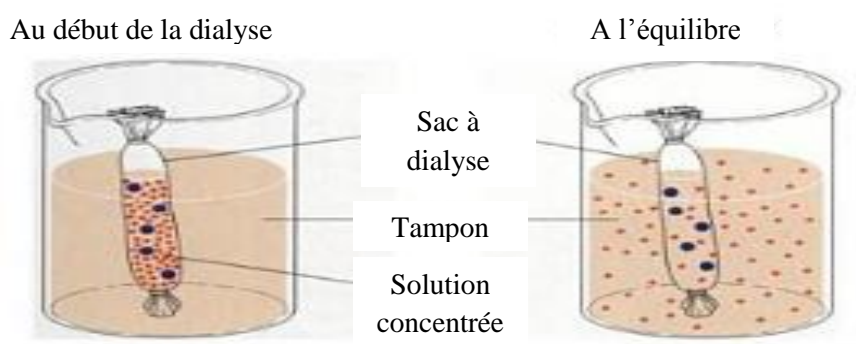
#### 1. Principe

La dialyse permet de séparer les molécules selon leur taille, en utilisant des membranes semi-perméables dont les pores ont une taille inférieure aux dimensions

macromoléculaire. Ces pores laissent diffuser les petites molécules, telles que celles du solvant, des sels, et de petits métabolites, au travers de la membrane mais bloquent le passage de molécules plus grandes.

La cellophane (acétate de cellulose) est le matériau de dialyse le plus utilisé. Les poids moléculaires d'exclusion des membranes de dialyse (taille de la plus petite particule qui ne peut les traverser) varient de 0,5 à 500 kDa (Voet et Voet, 2005).

La figure suivante illustre le principe de la dialyse



**Fig.08** : Principe de la dialyse (Voet et Voet, 2005).

## 2. Méthodologie

Des membranes de dialyse ayant un seuil de coupure de 10 kDa ont été lavées avec l'eau distillée afin d'éliminer les métaux lourds et les résidus soufrés.

Les étapes de la dialyse sont résumées comme suit :

La phase contenant l'enzyme a été versé dans un boudin de dialyse, On refermant les deux bouts de ce boudin avec un fil de pêche. Le boudin est placé dans un bécher contenant 500 ml du liquide de contre dialyse (tampon phosphate à 50mM à pH 7) sous agitation pendant 1h30.

## VI. MESURE DES DIFFERENTS PARAMETRES

- **COEFFICIENT DE PARTAGE (K)**

Le coefficient de partage de la xylanase est défini comme ;

$$K = U_{\text{sup}} / U_{\text{inf}}$$

Où  $U_{sup}$  et  $U_{inf}$  sont les activités enzymatiques dans la phase supérieure et inférieure, respectivement d'après (Li et al., 2011).

- **LE RATIO VOLUMIQUE (R)**

Le ratio volumique de phase est défini comme

$$R = V_{sup} / V_{inf}$$

Où  $V_{sup}$  et  $V_{inf}$  sont le volume de la phase supérieure et inférieure, respectivement (Li et al., 2011).

- **MESURE DE RENDEMENT (%)**

Le rendement de la xylanase en phase supérieure est défini comme

$$Y (\%) = 100 \times K / (K + 1/R)$$

Où  $K$  et  $R$  sont le coefficient de partage et le ratio volumique, respectivement (Li et al., 2011).

- **FACTEUR DE PURIFICATION (FP)**

C'est le rapport de l'activité spécifique après SPDA sur cette grandeur avant l'application de ce système (Li et al., 2011).

**FP** = activité spécifique de l'étape considérée / activité spécifique de l'étape initiale.

- **RECUPERATION DE L'ENZYME (RE)**

C'est l'activité enzymatique de la phase considérée / l'activité enzymatique de surnageant de culture (Li et al., 2011).

- **RATIO DE CONCENTRATION (RC)**

C'est le volume de l'échantillon (phase supérieure + phase inférieure) / le volume de la phase supérieure (Li et al., 2011).

## VI. SDS-PAGE ET ZYMOGRAMME

Dans le but de voir le profil des protéines de la cultureensemencée et afin de visualiser l'activité xylanasiq ue dans le gel de séparation, nous avons choisi la technique SDS-PAGE de Laemmli, (1970) et la technique du zymogramme (Gallardo et al., 2004). Le dispositif d'électrophorèse (Mini Protean II BIO RAD) (voir Fig. 08) utilisé est conçu pour

les mini gels, il s'agit d'une cuve et d'une panoplie d'accessoires (peigne, espaceurs et un dispositif pour couler le gel).

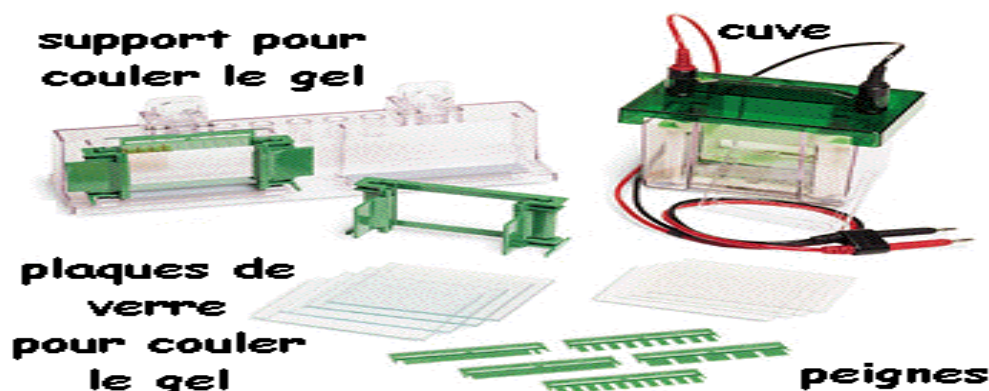


Fig. 09: Cuve et accessoires du dispositif d'électrophorèse (Mini Protean II, Bio Rad).

Une plaque électrophorétique est préparée selon la procédure de **Laemmli, (1970)** de façon que la moitié du gel serve pour la réalisation de la SDS-PAGE et l'autre moitié soit utilisée pour l'analyse du zymogramme.

Le gel de séparation à 12% d'acrylamide (**Annexe II**), contient 0,1% (m/v) de xylane de bouleau.

La réaction de polymérisation est initiée par addition de 70 $\mu$ l de persulfate d'ammonium à 10% puis accélérée par ajout de 20  $\mu$ l de TEMED, le mélange est versé entre deux plaques de verre séparées avec des espaceurs de 1mm. Le gel de séparation occupe deux tiers de la plaque, on verse 1ml d'un mélange éthanol-eau 50% (v/v). Après polymérisation on élimine l'éthanol-eau puis un gel de concentration à 7,5% d'acrylamide (**Annexe II**) est coulé au-dessus du gel de séparation, un peigne est immédiatement inséré, au moment de l'emploi le peigne est retiré et les puits sont lavés avec du tampon d'électrophorèse (**Annexe II**).

L'échantillon est préparé de la manière suivante : 150 $\mu$ l de la phase supérieure ou inférieure sont mélangés avec 40 $\mu$ L du tampon d'échantillon (**Annexe II**). Un chauffage à 100°C pendant 5 min.

Les marqueurs 7  $\mu$ l (dual color BIO RAD) et les dépôts sont de l'ordre de 15 $\mu$ L et utilisés à une concentration de 1mg/ml.

Le courant électrique est véhiculé par le tampon d'électrophorèse, la migration se fait à 80 (V) dans le gel de concentration et 150 (V) dans le gel de séparation, 11 milli ampère

(mA) pendant 5h jusqu'à ce que le bleu de bromophénol soit à 3 cm du bord inférieur de la plaque.

La visualisation du profil de migration se fait après le traitement du gel comme suit :

Après démoulage, le gel est rincé par l'eau distillée puis coupé en deux portions, la moitié du gel qui sert pour la réalisation de la SDS-PAGE est trempé pendant une heure dans une solution de fixation et de décoloration (**Annexe II**).

Le gel est rincé par l'eau distillée puis coloré dans la solution de bleu de comassie R250 sous faible agitation pendant une nuit.

Le gel est par la suite trempé dans la solution de décoloration et de fixation jusqu'à apparition de bandes protéiques colorées en bleu sur fond transparent.

La masse moléculaire de la xylanase est déterminée en utilisant la courbe d'étalonnage «  $R_f = f(\log PM)$  ».

$R_f$  = rapport frontal qui est calculé selon la formule suivante :

$R_f$  = distance parcourue par la protéine / distance de migration du bleu de bromophénol

L'activité xylanasiq ue est mise en évidence par la technique du zymogramme qui est une méthode qui peut détecter l'activité enzymatique en gel de polyacrylamide.

Les zymogrammes résultants contiennent des bandes transparentes sur fond opaque (**Royer et Nakas., 1989**).

La moitié du gel qui sert pour le zymogramme, subit les traitements suivants :

- Après électrophorèse, le gel est mis dans une solution de Triton X-100 à 2,5% (m/v) (**Annexe II**) pendant 30 min, le gel est débarrassé de ce dernier par rinçage à l'eau distillée puis incubé dans un tampon phosphate 50mM à pH 7 à 50°C pendant 20 min.
- La coloration du gel est faite avec le rouge de Congo (0,1%) (m/v) (**Annexe II**) pendant une nuit, puis le gel est rincé à l'eau distillée puis trempé dans une solution de NaCl à 1M et enfin, il est immergé dans l'acide acétique à 0,5% (m/v) pour stopper la réaction et augmenter le contraste (**Gallardo et al., 2004**).

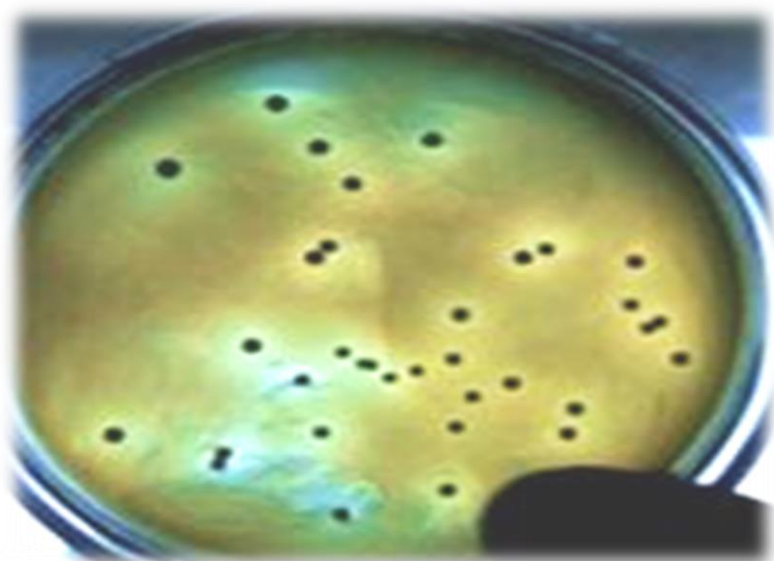
# RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

### I. REPIQUAGE DE LA SOUCHE *Jonesia denitrificans* BN13

La souche *Jonesia denitrificans* BN13 s'est développée sur le milieu MM7 solide au bout de 5 jours d'incubation à 37°C, ce résultat est confirmé par le développement de colonies sur l'ensemble de la boîte de Pétrie.

La production de xylanases extracellulaires se traduit par la formation de zones claires autour des colonies (**Fig. 10**). Ces zones sont dues à la dégradation du xylane du bouleau par les xylanases.



**Fig. 10** : Colonies de *Jonesia denitrificans* BN13 entourées de zones d'hydrolyse du xylane de bouleau (Boucherba, 2011).

### II. RESULTATS DES METHODES ANALYTIQUES

L'activité xylanasiqne ainsi que la quantification des protéines sont calculées à partir des courbes d'étalonnages (**Fig. 11, 12 et 13**) illustrées ci-après. Ces courbes nous ont permis de calculer la concentration du xylose dans les milieux, ainsi que l'activité de la xylanase et de calculer aussi la concentration des protéines et donc l'activité spécifique.



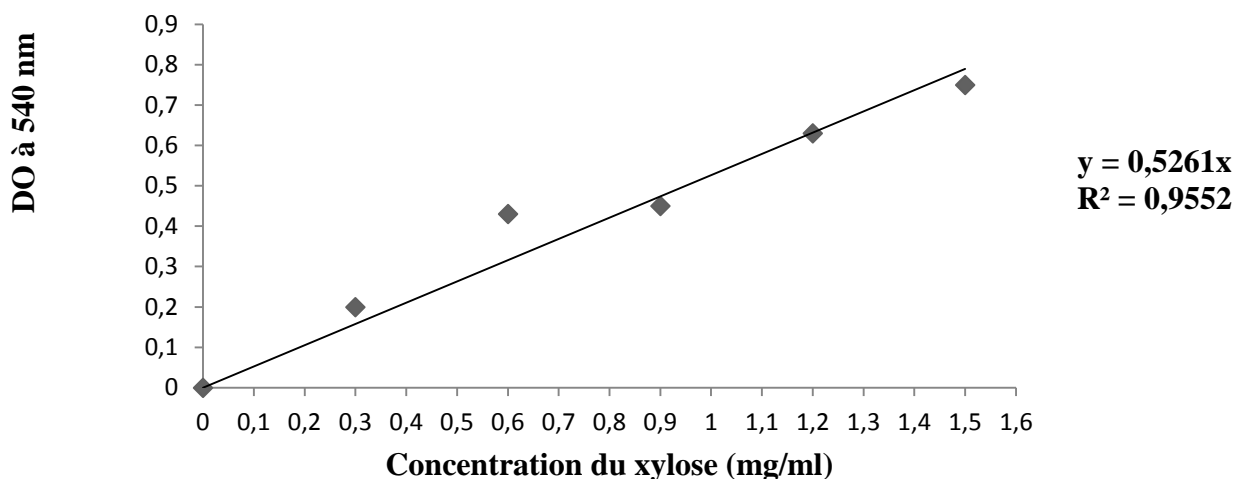


Fig. 11 : Courbe d'étalonnage des sucres réducteurs.

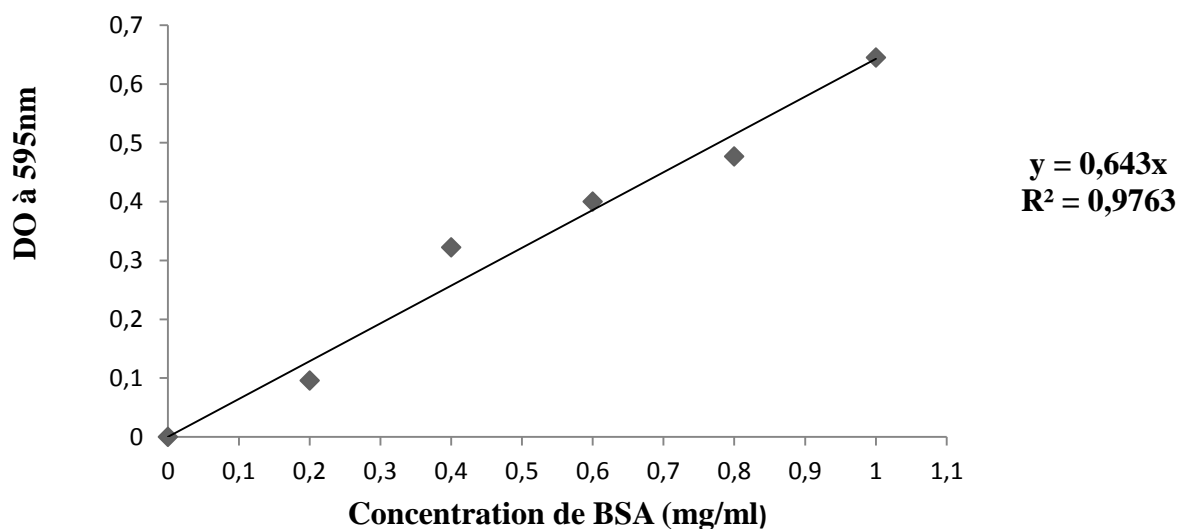


Fig. 12 : Droite de dosage des protéines par la macrométhode.

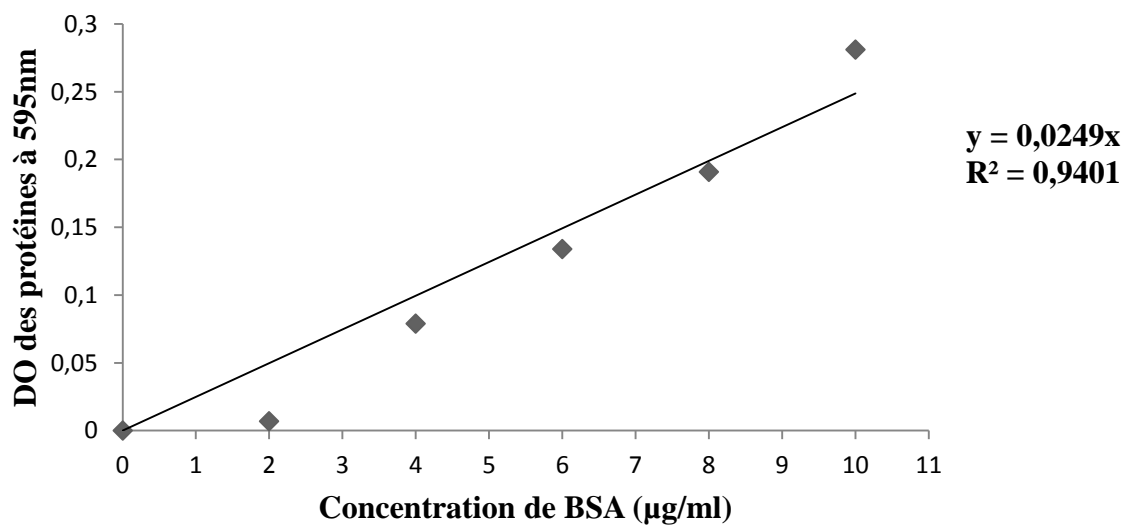


Fig. 13 : Droite de dosage des protéines par la microméthode.

### III. CINÉTIQUE DE CROISSANCE ET PRODUCTION DE XYLANASES

Les résultats de la croissance, de la production de xylanases et de dosage des protéines, sont représentés dans le tableau ci-dessous (**Tableau VI**).

**Tableau VI** : Récapitulatif des résultats de la croissance, activité xylanasique, concentration des protéines et de l'activité spécifique.

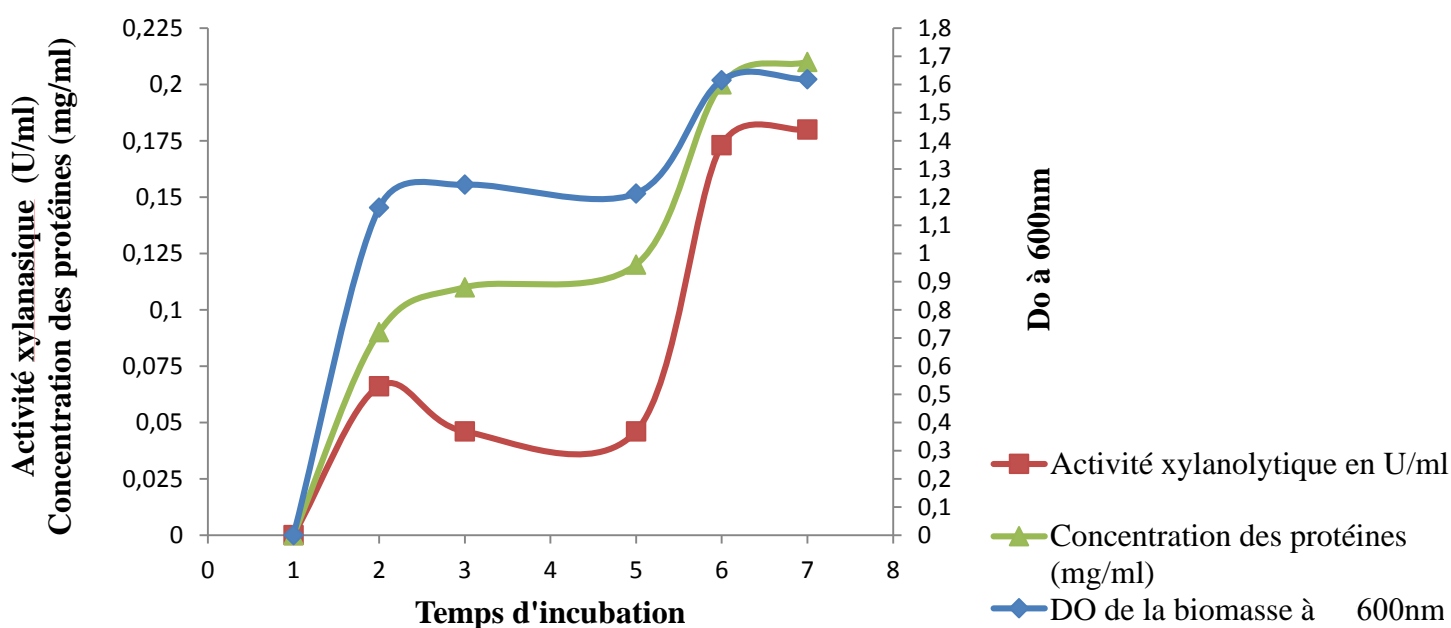
Temps d'incubation (jours)	1	2	3	5	6	7
<b>DO à 600nm</b>	0	1,162	1,244	1,213	1,615	<b>1,618</b>
<b>DO à 540nm</b>	0	0,054	0,038	0,039	0,141	<b>0,143</b>
<b>Concentration du xylose (mg/ml)</b>	0	0,10	0,07	0,07	0,26	<b>0,27</b>
<b>Concentration du xylose (µmol/ml)</b>	0	0,66	0,46	0,46	1,73	<b>1,8</b>
<b>Activité xylanasique (U/ml)</b>	0	0,066	0,046	0,046	0,173	<b>0,180</b>
<b>DO à 595 nm</b>	0,002	0,064	0,072	0,075	0,131	<b>0,133</b>
<b>Concentration des protéines (mg/ml)</b>	3,11. 10 <sup>-3</sup>	0,09	0,11	0,12	0,2	<b>0,21</b>
<b>Activité spécifique (U/mg)</b>	0	0,73	0,41	0,38	<b>0,86</b>	<b>0,86</b>

Après préparation des milieux liquides et ensemencement de la souche sur ces derniers, le suivi de la croissance est initié après 24 heures d'incubation à 37°C où nous avons observé une absence de la croissance, ce résultat peut être expliqué par la présence de la phase de latence qui permet à la souche de s'adapter au nouveau milieu et ainsi réactiver ses fonctions physiologiques, mais au bout de 48 heures.

La croissance commence à se distinguer avec une absorbance de 1,162 et continue d'augmenter jusqu'à atteindre une valeur de 1,618 au bout du 7<sup>ème</sup> jour et la fermentation a été arrêtée. D'après **Boucherba et al., 2011**, la souche *Jonesia denitrificans* BN13, sous des conditions optimales de croissance (agitation à 100 rpm), se développe au bout de 48 heures d'incubation à 37°C.

Le profil de la croissance obtenu dans la figure 14 correspond à la plupart des courbes de croissance des microorganismes avec la présence des différentes phases à commencer par la phase de latence jusqu'à la phase stationnaire (la phase de déclin n'est pas montrée dans la figure). Ce profil correspond à la courbe de la cinétique de croissance de *Jonesia denitrificans* BN13 obtenu par **Boucherba et al. en 2011**. Les protéines solubles augmentent avec la croissance et présentent une cinétique similaire.

Après centrifugation des milieux MM7 liquides ensemencés, les surnageants obtenus font l'objet d'un test d'activité xylanasiq.



**Fig. 14** : Cinétique de croissance et de production de xylanases chez *Jonesia denitrificans* BN13.

La production des xylanases est indiquée par l'activité xylanasiq qui augmente graduellement (avec une diminution légère au 3<sup>ème</sup> jour), mais continue d'augmenter au 5<sup>ème</sup> jour jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour, où elle atteint son maximum (**0,180 U/ml**). Ce résultat concorde avec les résultats des travaux de **Duarte et al. en 1999**.

La production des xylanases semble être liée partiellement à la croissance de *Jonesia denitrificans*, alors que chez les actinomycètes, elle est généralement associée à la croissance. Cependant quelques rares exceptions ont été rapportées, c'est le cas de la souche *Streptomyces* sp. AMT-3 dont la production des xylanases n'est pas associée à la croissance (Lodha et al., 1989).

Les xylanases produites montrent une activité maximale de **0,180 U/ml** qui est beaucoup plus faible par rapport aux activités xylanasiques des autres actinomycètes (Nascimento et al., 2002 et Wang et al., 2003). Cependant ; Boucherba et al. en 2011, ont rapporté une activité xylanasique de **10,80 U/ml** après une culture de *Jonesia denitrificans* BN13 dans un fermenteur de 4l pendant 35h en utilisant le xylane de bouleau comme substrat.

Nascimento et al., (2002) ont rapporté une activité de **10,3 U/ml** pendant 10 jours de culture de la souche *Streptomyces* sp AMT-3 en utilisant le xylane de bouleau comme substrat.

Techapun et al., (2002) ont rapporté une activité de **8 U/ml** de la xylanase pour une culture de *Streptomyces* sp. Ab 106 avec le xylane de bouleau à (**1%**) (55° C, pH 7,5).

Les activités des xylanases des cultures fongiques (Farrel et al., 1996 ; Gupta et al., 2009 ; Shah et al., 1991) sont généralement plus élevées que celles de *Jonesia denitrificans* BN13, néanmoins une activité de **0,39 U/ml** a été rapportée chez *Aspergillus terreus* cultivée dans **1%** de xylane de bouleau (Geweely et Neveen, 2011).

Les préparations de xylane peuvent être différentes les unes des autres selon le type et le degré de substitutions qui influence l'activité xylanasique mesurée. Le test d'activité, notamment le dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS donne des activités apparentes faibles par rapport à la méthode de Somogyi-Nelson (Royer et Nakas, 1989).

La comparaison de nos résultats avec les autres travaux doit tenir compte des conditions de travail (présence d'éventuels contaminants) et de la concentration du substrat et si on compare ces résultats avec ceux obtenus par Boucherba et al en 2011 sur la même souche, on trouve que l'activité des xylanases du présent travail est beaucoup plus faible, ce résultat peut être expliqué par l'absence d'un Shaker pendant la fermentation mais aussi les repiquages successifs qui ont conduit peut être à d'éventuelles mutations et ainsi à la diminution de l'activité xylanasique, ce qui a amené à une diminution du rendement de notre souche.

Le **Tableau VII** indique la production de quelques xylanases dans des fermentations en milieu liquide.

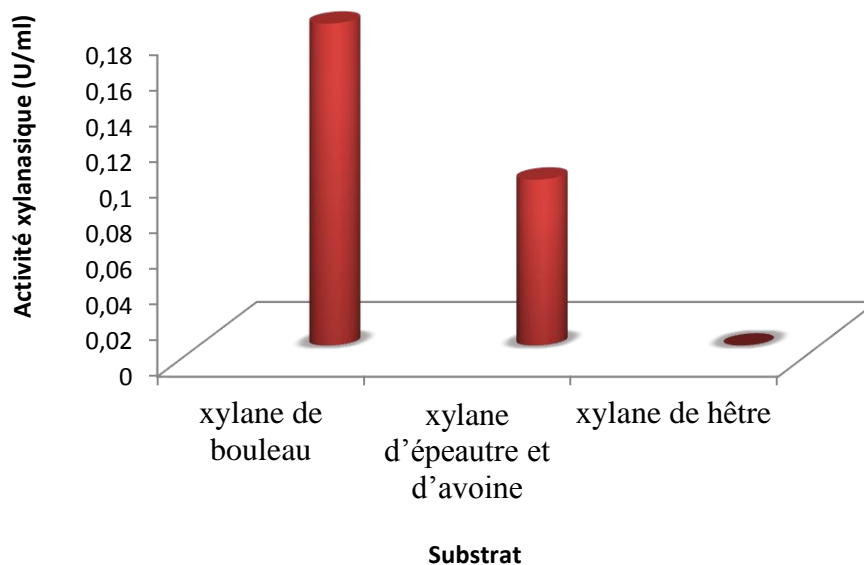
**Tableau VII** : Production de xylanases dans les fermentations en milieu liquide.

Microorganisme	Substrat	Conditions de culture	Activités (U/ml)	Références
<i>Jonesia denitrificans</i> BN13	Xylane de bouleau 7 g/l	Milieu MM7 liquide, 37°C, pH 7, 7 jours	0,18	Travail actuel
<i>Jonesia denitrificans</i> BN13	Xylane de bouleau, 7 g/l	fermenteur de 4l, 37 °C, pH 7, 2 jours	10,80	<b>Boucherba et al., 2011</b>
<i>Streptomyces</i> sp. QG113	Xylane de bouleau, 10 g/l	Erlen sous agitation, 37°C, pH 8.0, 5 jours	7,50	<b>Beg et al., 2000</b>
<i>Streptomyces</i> sp. Ab106	xylane, 10 g/l	Fermenteur de 4l, 55 °C, pH 7,5, 5 jours	8	<b>Techapun et al., 2002</b>
<i>Streptomyces malaysiensis</i>	Xylane de bouleau, 10 g/l	Erlen sous agitation, 30 °C, pH 7, 6 jours	11,90	<b>Nascimento et al., 2002</b>
<i>Bacillus coagulans</i>	Xylane de bouleau, 10 g/l	Erlen sous agitation, 45 °C, pH 7, 24h	24,20	<b>Choudhury et al., 2006</b>
<i>Bacillus subtilis</i>	Xylane de bouleau, 10 g/l	Fermenteur de 3l, 55°C, PH 9, 48h	128	<b>Annamalai et al., 2009</b>
<i>Aspergillus foetidus</i> MTCC 4898	Xylane de bouleau, 10 g/l	Erlen sous agitation, 30 °C, pH 5, 3 jours	210	<b>Shah et Madamwar, 2005</b>
<i>Penicillium kloeckeri</i> NRRL 1017	Xylane de bouleau, 10 g/l	Erlen sous agitation, 26-28° C, 5 jours	12,20	<b>Farrel et al., 1996</b>

La quantité des xylanases qui se trouvent dans le milieu MM7 liquide ensemencé est exprimée par l'activité spécifique qui est élevée (0,86 U/mg) au bout du 6<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> jour.

#### IV. SPECIFICITE DES XYLANASES VIS-A-VIS DES DIFFERENTS SUBSTRATS

Les résultats de la spécificité des xylanases vis-à-vis des différents substrats sont représentés dans la figure 15 ci-dessous.



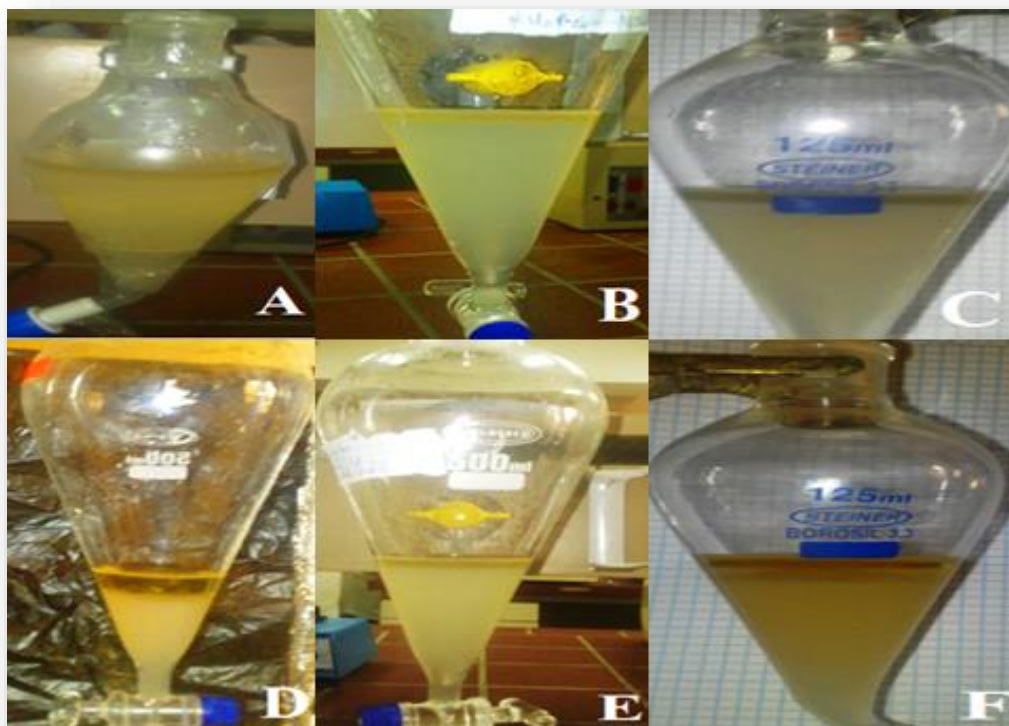
**Fig. 15** : Histogramme représentant la spécificité des xylanases vis-à-vis de 03 substrats : le xylane de bouleau, le xylane d'épeautre et d'avoine et le xylane de hêtre.

Les xylanases de *Jonesia denitrificans* BN13 ne dégradent que le xylane de bouleau et le xylane d'épeautre et d'avoine parmi les trois substrats testés, mais avec une affinité plus élevée pour le xylane de bouleau (**0,18 U/ml**), et moindre pour le xylane d'épeautre et d'avoine (**0,093 U/ml**).

Aucune activité n'a été détectée vis-à-vis du xylane de hêtre, ce qui est probablement dû au fait que le substrat contient des groupements latéraux qui empêchent l'accès de la xylanase aux liaisons B 1-4 de la chaîne principale du xylane.

**V. SYSTEME A DEUX PHASES AQUEUSES (SDPA)****a. PREPARATION DU SDPA**

Après décantation du mélange (20 ml du milieu MM7 liquideensemencé/SDPA), deux phases sont obtenues : la phase supérieure (PS) et la phase inférieure (PI), comme l'indique la **figure 16** ci-dessous.



**Fig. 16** : Présentation des phases des différents systèmes.

(A) : 12% PEG/13%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ / 0,1 M NaCl, à pH 7.

(B) : 13% PEG/13%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ / 0,1 M NaCl, à pH 7.

(C) : 14% PEG/13%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ / 0,1 M NaCl, à pH 7.

(D) : 15% PEG/13%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ / 0,1 M NaCl, à pH 6.

(E) : 15% PEG/13%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ / 0,1 M NaCl, à pH 7.

(F) : 15% PEG/13%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ / 0,1 M NaCl, à pH 8.

Les PSs et les PIs sont récupérées et leurs volumes respectifs sont mesurés, le Tableau VIII indique ces volumes.

**Tableau VIII :** Volumes des phases des différents systèmes.

PEG(%)	10	12	13	14	15 à pH 7	15 à pH 6	15 à pH 8
V de PI (ml)	/	72	82	55	59	28	34,8
V de PS (ml)	/	08	10	7,5	11	07	08

A partir de ce tableau, on constate que le volume initial du milieu de culture qui était de 20 ml est réduit à 8 ml dans la phase supérieure du 2<sup>ème</sup> système (PEG 12%/13% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/0,1M NaCl à pH 7), soit une concentration de 2,5 fois, ce qui peut être obtenu par une ultrafiltration sur membrane, qui est une technique coûteuse à l'échelle industrielle et qui présente de nombreux inconvénients citons ; le colmatage et la mauvaise répartition des pores de membrane ce qui induit généralement à des pertes de xylanases contrairement au SDPA qui concentre toutes les xylanases présentes dans le système.

Dans le 6<sup>ème</sup> système (PEG 15%/ 13% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/0,1M de NaCl à pH 6), le volume initial du milieu de culture est concentré 2,85 fois.

La séparation de phases n'est pas observée dans le 1<sup>er</sup> système (10% PEG/13% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/0,1M NaCl à pH 7), ceci est dû au fait que la concentration du PEG nécessaire pour la séparation n'est pas atteinte et qui en retour dépend de la concentration du sel (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) dans le système. Ce résultat est expliqué à partir de la courbe binodale qui divise le graphe en deux régions où on a une seule phase dans la région inférieure et deux phases dans la région supérieure. Donc, on peut dire que la concentration de 10% du PEG n'est pas suffisante pour atteindre la région supérieure de la courbe binodale. De ce fait sa concentration dépend de la concentration du sel, ces deux paramètres permettent une meilleure séparation des phases, une concentration faible du sel est nécessaire lorsqu'une concentration élevée du PEG est utilisée (Ratanapongleka, 2010).

En général, l'augmentation de la concentration du PEG est liée à la densité élevée, à l'indice de réfraction et à la viscosité des phases. La concentration élevée du PEG fournit une grande différence des propriétés entre les phases. Quand il y'a augmentation de la concentration du PEG, la composition des phases du système est éloignée du point critique



(C) sur la courbe binodale et la tension interfaciale augmente. Par conséquent, les biomolécules favorisent beaucoup plus la phase supérieure ou la phase inférieure (**Walter et Johansson, 1994**).

**Babu et al., 2008** ont trouvé une augmentation de la concentration du PEG 1500 de 12 à 18% (m/m) qui amène à une augmentation de la répartition de la polyphénoloxydase dans la phase inférieure. Avec l'augmentation de la concentration du PEG, le nombre d'unités du polymère impliquées dans le partitionnement des biomolécules augmente et conduit à une répartition beaucoup plus élevée dans la phase où le polymère se concentre ; qui est due aux interactions hydrophobes entre les biomolécules et le PEG (**Asenjo et al., 1994**).

### **b. LA SEPARATION DES DEUX PHASES AQUEUSES**

Le partitionnement des xylanases dans les différentes phases sous différentes conditions est étudié. Le tableau IX donne l'ensemble des résultats obtenus à savoir l'activité xylanasiq (A<sub>x</sub>), l'activité spécifique (A<sub>sx</sub>), le facteur de purification (FP), la récupération de l'enzyme (RE), le coefficient de partage (K), le ratio volumique (R), le rendement (Y) et le ratio de concentration (RC).

On remarque qu'il n'y a pas de formation de l'interphase dans les différents systèmes. L'addition des sels dans le SDPA peut avoir une influence significative dans le partitionnement des molécules chargée tel que les protéines (**Albertson, 1986**). Cela n'a pas été démontré dans notre étude. L'ajout de NaCl dans le système améliore la purification et la récupération de l'enzyme.

Le système à deux phases aqueuses constitue une étape clé pour la purification d'enzymes à l'échelle industrielle, en effet c'est la première étape entreprise, car elle permet de concentrer le milieu de culture, cependant ; les enzymes obtenues par cette méthode contiennent encore des impuretés (**Gaikaiwari et al., 1996 ; Mayerhoff et al., 2004 ; Gautam et simon, 2006 ; Vaidya et al., 2006 ; Duarte et al., 1999 ; Antov et al., 2005**).

Tableau IX : Récapitulatif des résultats obtenus après SDPA (PEG 6000/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/ NaCl).

SDPA	2 <sup>ème</sup> système		3 <sup>ème</sup> système		4 <sup>ème</sup> système		5 <sup>ème</sup> système		6 <sup>ème</sup> système		7 <sup>ème</sup> système	
	PS	PI	PS	PI	PS	PI	PS	PI	PS	PI	PS	PI
Activité de la xylanase en U/ml	0,053	0	0,044	0,002	0,126	0,006	<b>0,933</b>	0,046	0,053	0,933	0,173	0,026
Activité spécifique en U/mg	0,28	0	0,23	2,06	0,48	4,19	<b>5,04</b>	0,27	0,75	3,88	1,23	0,12
<b>FP</b>	0,32	0	0,27	2,39	0,56	4,87	<b>5,86</b>	0,31	0,87	4,51	1,43	0,14
<b>RE</b>	0,29	0	0,24	0,01	0,7	0,03	<b>5,18</b>	0,25	0,29	5,18	0,96	0,14
<b>K</b>	/		<b>22</b>		<b>21</b>		20,28		0,05		6,65	
<b>R</b>	0,11		0,12		0,13		0,18		<b>0,25</b>		0,3	
<b>Y (%)</b>	/		72,52		73		<b>78,5</b>		1,23		66,61	
<b>RC</b>	<b>2,5</b>		2		<b>2,66</b>		1,81		<b>2,85</b>		2,5	

1<sup>er</sup> système : 10% PEG/13% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/ 0,1 M NaCl, à pH 7.

2<sup>ème</sup> système : 12% PEG/13% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/ 0,1 M NaCl, à pH 7.

3<sup>ème</sup> système : 13% PEG/13% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/ 0,1 M NaCl, à pH 7.

4<sup>ème</sup> système : 14% PEG/13% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/ 0,1 M NaCl, à pH 7.

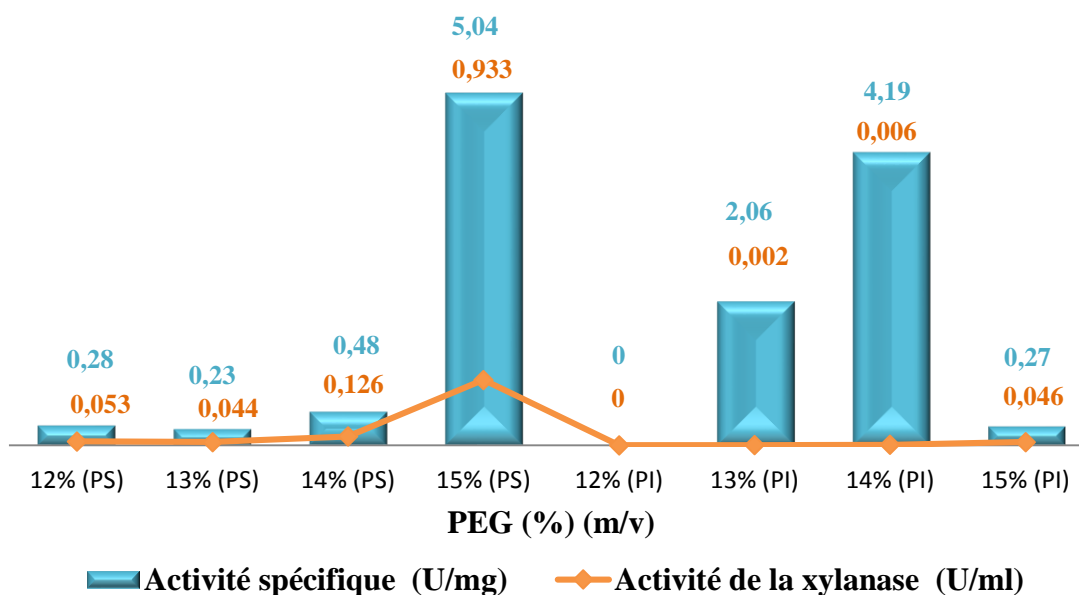
5<sup>ème</sup> système : 15% PEG/13% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/ 0,1 M NaCl, à pH 7.

6<sup>ème</sup> système : 15% PEG/13% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/ 0,1 M NaCl, à pH 6.

7<sup>ème</sup> système : 15% PEG/13% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/ 0,1 M NaCl, à pH 8.

D'après les activités xylanasiques obtenues, on remarque que les xylanases se répartissent dans les phases supérieures à pH 7 dans tous les SDPA réalisés, alors qu'une activité plus au moins faible est observée dans les phases inférieures, ce qui démontre qu'une petite quantité de l'enzyme reste dans la phase inférieure, ceci est expliqué par les résultats des coefficients de partage qui sont respectivement de 22, 21 et 20,28. Ce qui confirme que le SDPA est un système à purification partielle.

L'activité spécifique ( $A_{SX}$ ) nous informe sur la pureté des xylanases. Les activités xylanasiques dans les phases inférieures ont des valeurs faibles par rapport aux phases supérieures, mais les activités spécifiques dans ces phases sont importantes par rapport aux phases supérieures. Par conséquent ; sur l'ensemble des protéines présentes dans les phases inférieures, les xylanases sont les plus dominantes sauf pour la phase inférieure du 5<sup>ème</sup> système où  $A_{SX} = 0.27$  U/mg. Dans ce dernier, la répartition de l'enzyme s'est penchée vers la phase supérieure avec  $A_{SX} = 5.04$  U/mg. Dans les phases inférieures l'activité spécifique augmente avec l'augmentation de la concentration du PEG (sauf 5<sup>ème</sup> système), elle est proportionnelle à l'activité des xylanases de *Jonesia denitrificans* BN13 (**Fig. 17**).



**Fig. 17** : Effet de la concentration du PEG sur l'activité xylanasique et sur l'activité spécifique.

**PS** : phase supérieure / **PI** : phase inférieure.

L'activité spécifique nous permet de choisir le meilleur système pour la purification des xylanases. D'après les résultats obtenus, le 5<sup>ème</sup> système est considéré comme étant le meilleur.

Dans le protocole de purification réalisé sur les xylanases de *Jonesia denitrificans* BN 13 (Boucherba, 2011), un facteur de purification de 19 est obtenu avec le SDPA qui est quasiment équivalent à celui de l'ultrafiltration.

### **b.1. EFFET DE LA CONCENTRATION DU PEG SUR LE PARTITIONNEMENT DES XYLANASES**

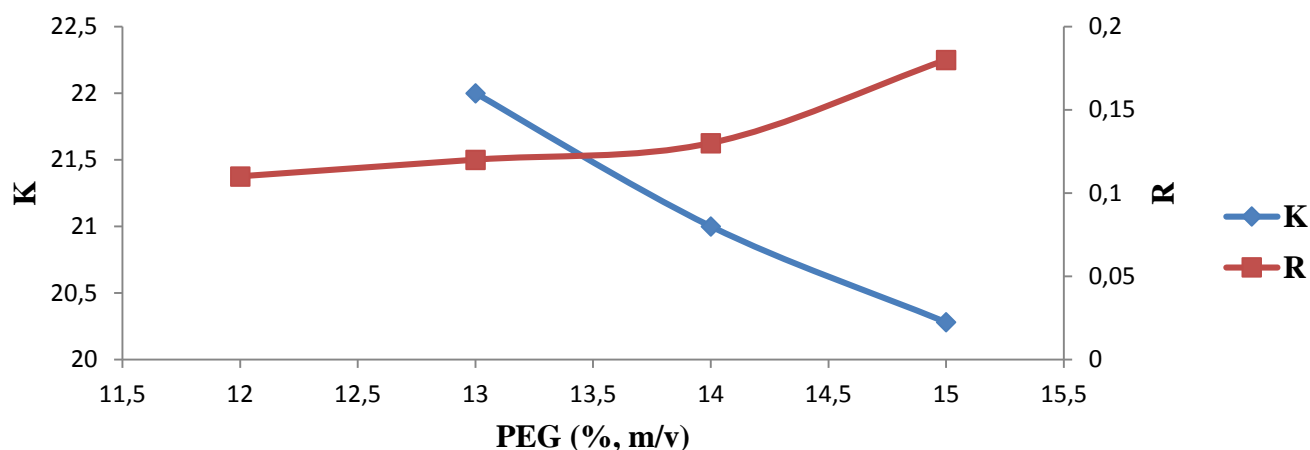
Le PEG 6000 est utilisé en combinaison avec 13%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à pH7 pour étudier l'effet de sa concentration (10-15%) sur l'extraction des xylanases.

Dans les SDPAs, contenant 13%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et des différentes concentrations (m/v) du PEG 6000, l'augmentation de la concentration du PEG conduit à une diminution des coefficients de partage, comme montré dans la (Fig. 18), Cela concorde avec les travaux rapporté par (Draginja et al., 2008).

Les conditions les plus favorables pour la distribution des xylanases de *Jonesia denitrificans* BN13 dans la phase supérieure sont atteintes dans un système contenant 15% PEG et 13%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , ou (K) et (Y) sont de 20,28 et 78,5%, respectivement.

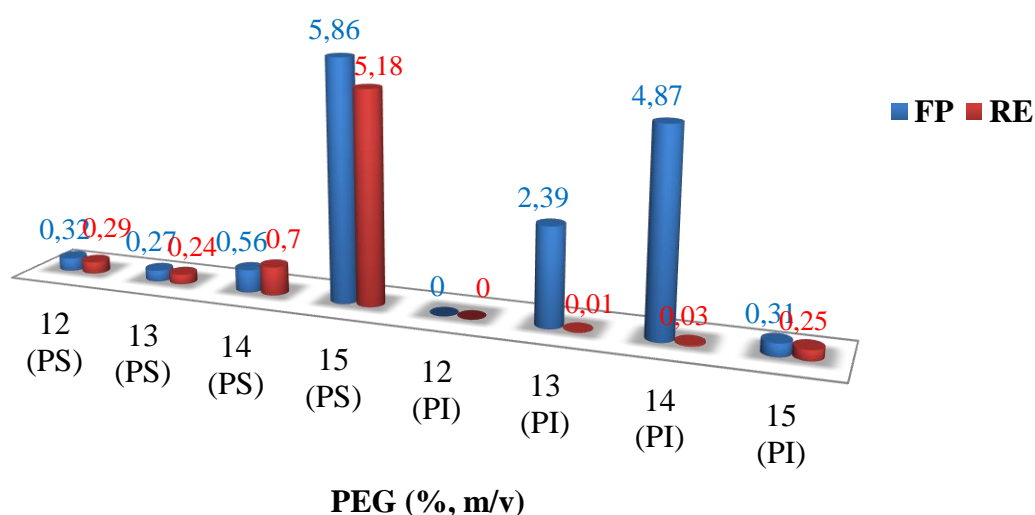
Il a été trouvé qu'en augmentant la concentration du PEG 6000, le ratio volumique (R) augmente parallèlement dans un SDPA (Yang et al., 2008).

Contrairement au coefficient de partage qui diminue avec l'augmentation de la concentration du PEG qui nous renseigne sur la répartition des xylanases dans les phases des systèmes (Fig. 18).



**Fig. 18 :** Effet de la concentration du PEG sur le coefficient de partage et le ratio volumique.

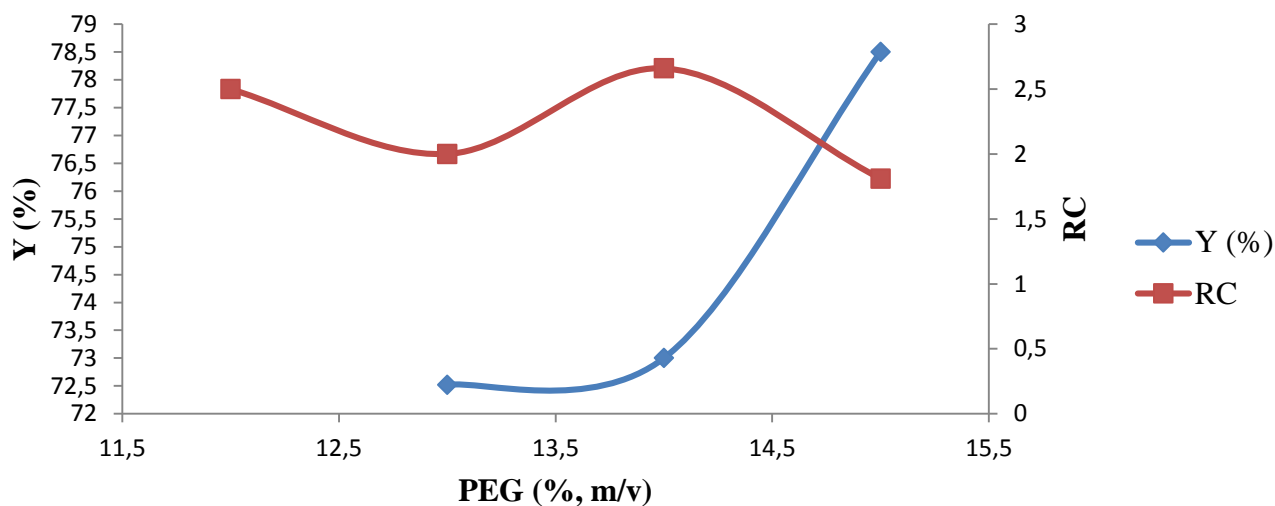
Dans toutes les phases du système, les valeurs du FP et le RE augmentent avec l'augmentation de la concentration du PEG ; pour le 5<sup>ème</sup> système, les valeurs de FP et de RE de la phase supérieure sont élevées par rapport à la phase inférieure et les autres systèmes, donc la quantité d'enzymes dans cette phase est la plus élevée (**Fig. 19**).



**Fig. 19 :** Influence de la concentration du PEG sur le facteur de purification (FP) et la récupération d'enzymes (RE).

PS : phase supérieure / PI : phase inférieure

On remarque dans la (Fig. 20) que le ratio de concentration (RC) diminue avec l'augmentation de la concentration du PEG, par contre, le rendement de purification (Y) augmente avec l'augmentation de la concentration du PEG où il atteint son maximum dans le 5<sup>ème</sup> système (78,5%), ce paramètre nous renseigne sur le la quantité des xylanases purifiées.



**Fig. 20 :** Influence de la concentration du PEG sur le rendement et le ratio de concentration.

Les résultats obtenus dans le 5<sup>ème</sup> système indiquent que 78,5% des xylanases sont retrouvées dans la phase supérieure, 6 fois plus purifiées et 2 fois plus concentrées, et une activité faible dans la phase inférieure où on a eu une petite quantité de xylanases,

par contre, les travaux de **Yasinok et al., 2010** sur l'extraction de xylanases produites par *Bacillus Pumilus* à partir du milieu de culture contenant les cellules microbiennes est réalisée par un système composé de 3,5% PEG, 14%  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  et 9% KI, ont indiqué que 70% des xylanases ont été retrouvées dans la phase supérieure, 7 fois plus purifiées et 4 fois plus concentrées ; aucune activité n'est retrouvée dans la phase inférieure et les cellules microbiennes d'autre part sont essentiellement collectées à l'interface ou dans la phase inférieure.

## b.2. EFFET DU pH SUR LE PARTITIONNEMENT DES XYLANASES

Au pH 6, le partitionnement des xylanases a changé de comportement par rapport au pH 7, alors qu'au pH 8, l'activité des xylanases a diminué ( $A_x=0,173$  pour PS et 0,026 pour PI) dans les deux phases, alors que le comportement de répartition est resté le même que celui du 5<sup>ème</sup> système (Fig. 21).

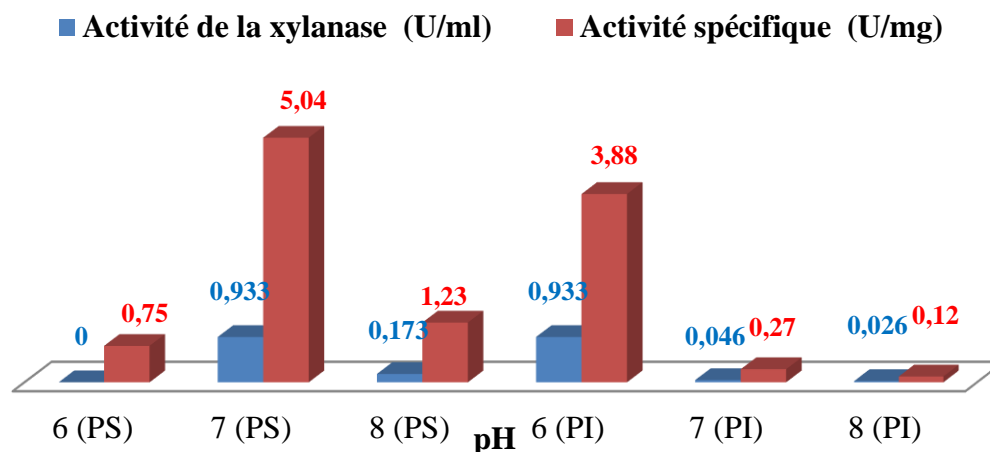
En conclusion les xylanases de *Jonesia denitrificans* BN13 sont actives à pH 7, ce qui est en accord avec les travaux de **Boucherba et al., 2011**. Le changement de comportement de répartition peut être expliqué par le pI des xylanases.

D'après **Yang et al., 2008**, les protéines chargées positivement se répartissent dans la phase inférieure pendant que celles chargées négativement se dirigent vers la phase supérieure. Le partitionnement des protéines totales de l'enzyme dans les phases du système dépendent de leur pI.

Les xylanases sont classées en deux groupes d'enzymes ; acides avec un pI entre 3.6-4.5 et les xylanases basiques ayant un pI entre 8.3-10 (**Wong et al., 1988**). De ce fait on peut considérer que notre protéine est chargée négativement par rapport au pH du 5<sup>ème</sup> système.

Dans le 6<sup>ème</sup> système les xylanases se dirigent vers la phase inférieure ceci suggère que les xylanases sont chargées positivement par rapport au pH du système. En conclusion ; si les xylanases sont chargées négativement par rapport au pH du système, elles auront tendance à se répartir dans la phase supérieure et vice-versa.

Il faut noter que le pH influence sur l'activité spécifique des xylanases.

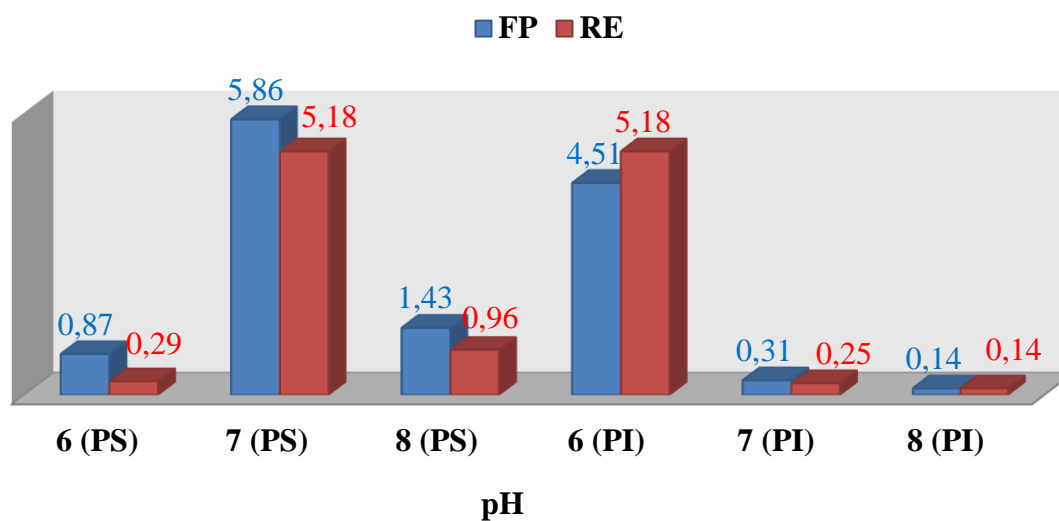


**Fig. 21** : Effet du pH sur l'activité xylanasiqne et sur l'activité spécifique.

\*PS : phase supérieure / PI : phase inférieure

\* La concentration du PEG est de 15%

Le facteur de purification et la récupération de l'enzyme diminuent avec la variation du pH par rapport au pH neutre (pH 7), que ça soit pour un pH acide (pH 6) ou pour un pH basique (pH 8). (**Fig. 22**).

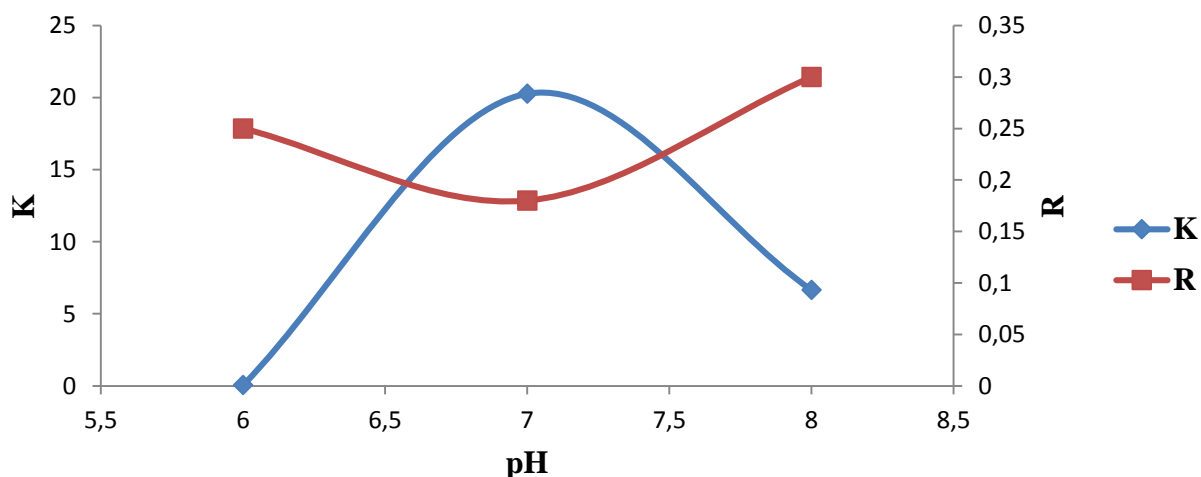


\*PS : phase supérieure / PI : phase inférieure

\*la concentration du PEG est de 15%.

**Fig. 22** : Influence du pH sur le facteur de purification et la récupération d'enzyme.

On remarque que le coefficient de partage diminue avec la variation de pH, par contre, le ratio volumique augmente, par rapport au pH neutre (pH 7) (**Fig. 22**).

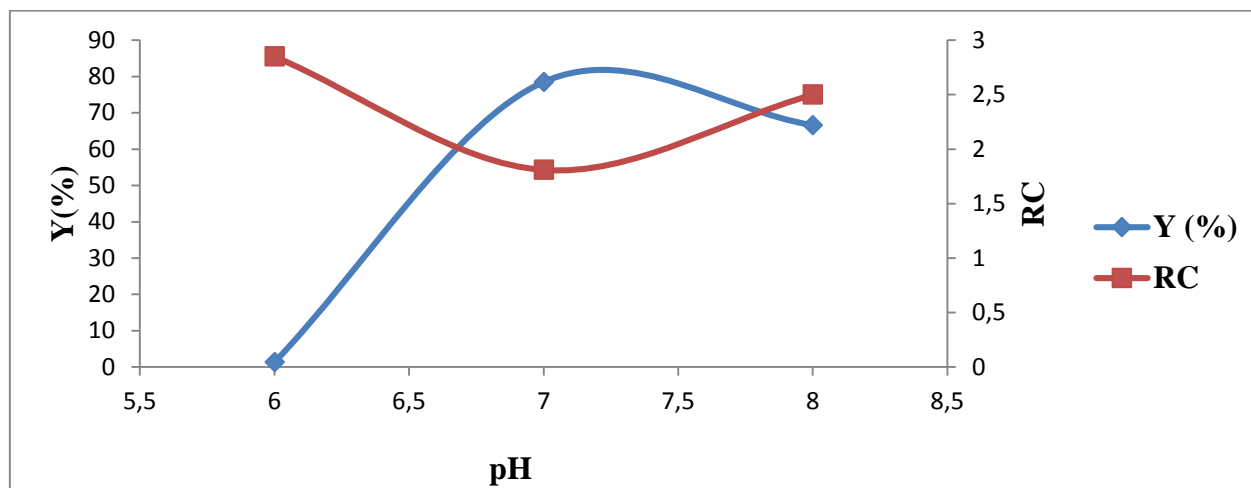


\*la concentration du PEG est de 15%.

**Fig. 23** : Influence de pH sur le coefficient de partage et le ratio volumique.



On remarque que le rendement de purification diminue avec la variation de pH, par contre, le ratio de concentration augmente, par rapport au pH neutre (pH 7), ce résultat est confirmé par **Yasinok et al., en 2010**, qui ont trouvé une augmentation du pH, engendre une diminution de la récupération de l'enzyme. (**Fig. 24**).



\*la concentration du PEG est de 15%.

**Fig. 24** : Effet de pH sur le rendement et le ratio de concentration.

Un tableau de comparaison des résultats de notre étude par rapport aux autres travaux est présenté ci-dessous.

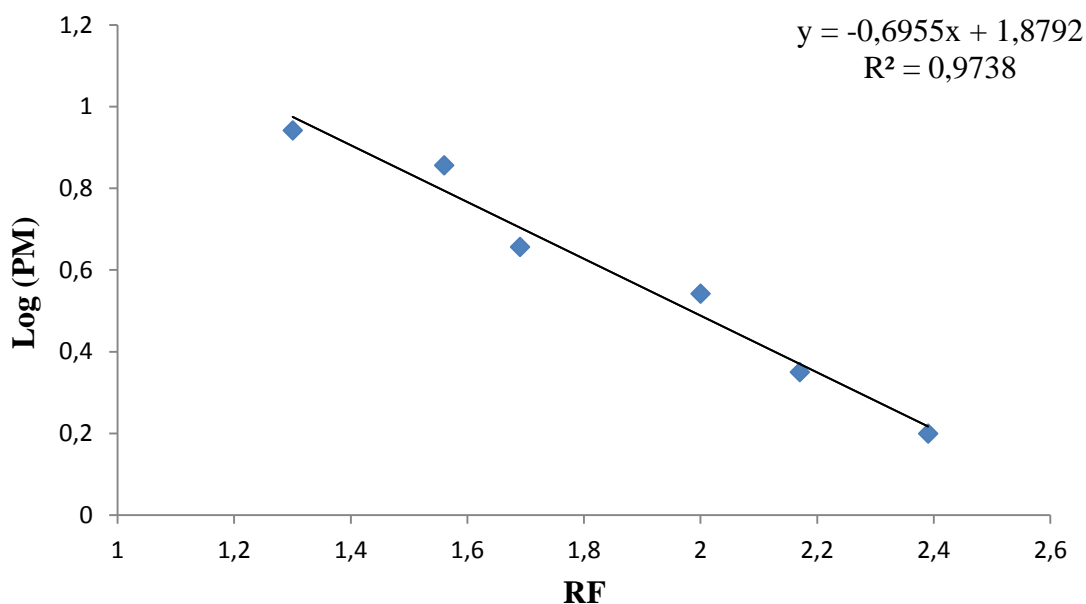
**Tableau X** : Comparaison des résultats de différents travaux effectués sur l'extraction des xylanases par SDPA.

Espèce	Enzyme	Poids moléculaire du PEG	Composition de SDPA	K	R	Y	FP	Références
<i>Jonesia denitrificans</i> BN13	Xylanase	6000	15% PEG/KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / 0,1 M + 20ml de la solution d'enzyme à pH 7	20,28	0,18	78,5	5,86	Travail actuel
<i>Paecilomyces thermophila</i> J18	Xylanase	4000	12,5% PEG/(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / 0,1 M + 50% de la solution d'enzyme à pH 7,2	231,7	0,33±0,0014	98,7	5,54	Yang et al., 2008
<i>Bacillus pumilus</i> SB-M13	Xylanase	4000	3,5% PEG/ 14% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / 9% KI à pH 9	/	/	70	7	Yasinok et al., 2010
<i>Aspergillus candidus</i>	Xylanase	4000	8,66% PEG/ 22,4% Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,41	/	88,1	3	Garai et Kumar, 2013
<i>Polyporus squamosus</i>	Xylanase	1500	10% PEG/ 70% phosphate d'ammonium 70% l'enzyme brut à pH 5,1	85,6	/	97,37	4,8	Antov et al., 2005
<i>Trichoderma viride</i>	Xylanase	6000	12,99% PEG/ 12,09% citrate de sodium	47,35	0,69	97,03	/	Li et al., 2011
<i>Bacillus pumilus</i>	Xylanase	6000	22% PEG/K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / 12% NaCl	46,9	/	98	33	Bim et Franco, 2000

## VI. MISE EN EVIDENCE DES XYLANASES PAR SDS-PAGE ET ZYMOGRAMME

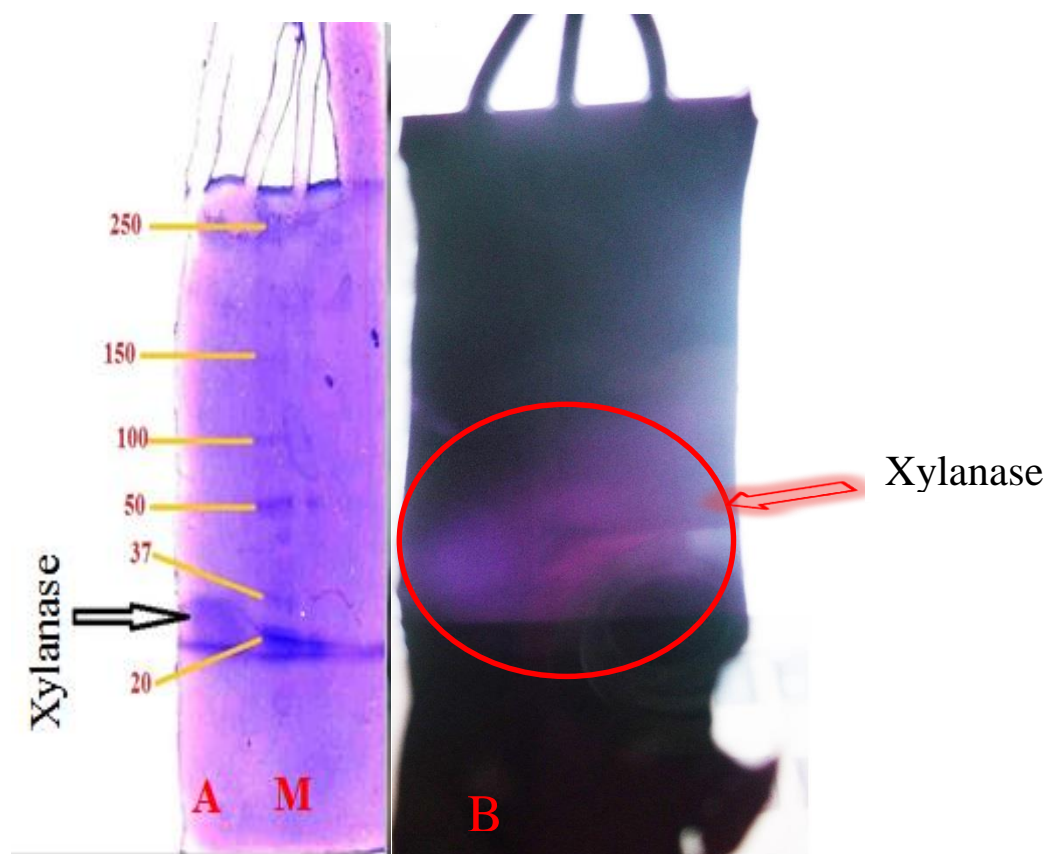
Les conditions de travail sont similaires à celles de **Boucherba (2011)**.

La masse moléculaire de la xylanase est déterminée par calcul à partir de la courbe d'étalonnage préétablie avec des marqueurs protéiques de masse moléculaire connue (**Fig. 25**).



**Fig. 25** : Courbe d'étalonnage pour l'estimation de la masse moléculaire.

L'analyse du zymogramme sur gel de polyacrylamide en présence de SDS contenant le xylane de bouleau à 0,1 % (m/v) est réalisé pour mettre en évidence l'activité des xylanases. La xylanase produite par *Jonesia denitrificans* BN13 a montré une bande relativement claire sur fond opaque sur le gel du zymogramme (**Fig. 26**), indiquant que cette dernière est une xylanase et non pas une autre enzyme.



**Fig.26** : SDS-PAGE et zymogramme de la xylanase de *Jonesia denitrificans* BN13.

**A** : Profil électrophorétique de la xylanase de *Jonesia denitrificans* BN13. **B** : Zymogramme de la xylanase de *Jonesia denitrificans* BN13. **M** : Marqueurs protéiques (BIORAD).

Une seule bande protéique est obtenue (**Fig. 26**) et selon la courbe d'étalonnage des marqueurs protéiques (**Fig. 23**), la xylanase possède un poids moléculaire de **26,85 kDa**.

Les résultats de **Boucherba, 2011** révèle qu'il s'agit de la **xylanase 6** qui est une xylanase minoritaire retrouvée dans le surnageant de culture de *Jonesia denitrificans* BN13.

Le **tableau XI**, résume les résultats des poids moléculaires des xylanases révélées par SDS-PAGE, obtenues par le système SDPA ou par une autre technique d'extraction.

**Tableau XI** : Résultats des poids moléculaires des xylanases révélées par SDS-PAGE.

<b>Espèce</b>	<b>Poids moléculaire des xylanases (kDa)</b>	<b>Références</b>
<i>Jonesia denitrificans</i> BN13	26,85	<b>Travail actuel</b>
<i>Jonesia denitrificans</i> BN13	6 isoenzymes : 250 ; 150 ; 70 ; 42 ; 40 et 26	<b>Boucherba, 2011</b>
<i>Bacillus pumilus</i> SB-M13	24,8	<b>Yasinok et al., 2010</b>
<i>Bacillus pumilus</i>	3 isoenzymes : 22,6 ; 32,6 ; 74,2	<b>Bim et Franco, 2000</b>
<i>Aspergillus niger</i>	24	<b>Gorbacheva et Rodionova, 1977</b>
<i>Bacillus thermantarcticus</i>	45	<b>Lama et al., 2004</b>
<i>Bacillus stearothermophilus</i> T-6	43	<b>Khasin et al., 1993</b>
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	39,5	<b>Nanmori et al., 1990</b>

*CONCLUSION*

Dans le but d'extraire des xylanases produites par la souche *Jonesia denitrificans* **BN13** Isolée et caractérisée par **Boucherba et al., 2011**, nous avons procédé à une extraction par un système à deux phases aqueuses (**SDPA**) composé de PEG6000/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/ NaCl.

Pour choisir le meilleur système d'extraction, plusieurs systèmes SDPA sont réalisés à différentes concentrations de PEG et à différentes valeurs de pH, et l'effet de ces deux paramètres a été étudié.

L'étude de l'affinité des xylanases vis-à-vis des différents substrats montre que le xylane de bouleau est le substrat préférentiel de la souche *Jonesia denitrificans* **BN13**.

Les résultats révèlent aussi que le système composé de 15% de PEG 6000, 13% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1M de NaCl et à pH 7 est le meilleur système car c'est une première étape de purification ne nécessitant pas de centrifugation pour la récupération des cellules, ce système optimisé nous a permis d'obtenir un rendement (**Y**) de **78,5%**, un facteur de purification (**FP**) de **5,86** et un ratio de concentration de **1,81**.

La SDS- PAGE ayant un gel de séparation de 12% a révélé l'existence d'une seule bande protéique de poids moléculaire de **26,85 kDa** et à partir des résultats du zymogramme qui présente une zone claire sur fond opaque, nous avons confirmé la présence d'une endoxylanase. D'après **Boucherba et al., 2011**, la xylanase extraite est appelée : la **xylanase 6 (Xyl 6)**.

En conclusion ; ce travail nous a permis d'effectuer une extraction par SDPA de la xylanase 6 produite par *Jonesia denitrificans* **BN13**.

Afin de poursuivre ce travail, il est recommandé d'entreprendre les études qui suivent :

- Utiliser des déchets agricoles comme source de carbone (écorce d'orange et le noyau des dattes) ; car le xylane de bouleau et le xylane d'épeautre et d'avoine, qui sont communément utilisés comme substrats pour la production des xylanases, sont coûteux. L'utilisation efficace de tels déchets agricoles résout des problèmes tant sur le plan économique et environnemental (ce travail a été entamé dans cette étude mais malheureusement les problèmes de contaminations par des champignons ont entravé sa réalisation).
- Utiliser une étuve agitatrice (Shaker) car l'agitation augmente la production des xylanases selon **Boucherba, 2011**.

- Suivre la production de cellulases, de laccases et de xylanases simultanément et appliquer le système adéquat pour les récupérer.
- Optimisation des SDPAs, pour l'utilisation à l'échelle industrielle en jouant sur les différents facteurs qui influencent sur la répartition, tels que le poids moléculaire de PEG, la concentration de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , changement du type du sel.



*REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

*A*

- **Albertsson PA.** (1986). Partitioning of Cell Particles and Macromolecules: separation and purification of biomolecules, cell organelles, membranes, and cells in aqueous polymer two-phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology. Edition: Wiley–Interscience. New York, 346p.
- **Annamalai N, Thavasi R, Jayalakshmi S et Balasubramanian T.** (2009). Thermostable and alkaline tolerant xylanase production by *Bacillus subtilis* isolated from marine environment. Ind J Biotechnol. **13**, 291–7.
- **Antov MG, Draginja MP, Milica Get Dasic.** (2005). Aqueous two-phase partitioning of xylanase produced by solid-statecultivation of *Polyporussquamosus*. Process Biochemistry. **41**, 232–235.
- **Asenjo JA, Schmidt AS, Hachem F et Andrews BA.** (1994). Peptide fusion tags with tryptophan and charged residues for control of protein partitioning in PEG–potassium phosphate aqueous two-phase systems J. Chromatogr. **A668**, 47–54.
- **Assamoi A, Destin J et Thonart P.** (2009). Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- $\beta$ -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. **13** (2), 281-294.

*B*

- **Babu BR, Rastogi NK et Raghavarao KSMS.** (2008). Liquide-liquide extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase systems. Chem. Eng. Process. **47**, 83–89.
- **Bailey MJ, Biely P et Poutanen K.** (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. J Biotechnol. **23**, 257-270.
- **Bailey MJ, Butchert J et Viikari L.** (1993). Effect of pH on production of xylanase by *Trichoderma reesei* on xylan-and cellulose-based media. Applied Microbiology and Biotechnology. **40** (2-3), 244- 229.
- **Banik RM, Santhiagu A, Kanari B, Sabarinath C et Upadhyay SN.** (2003). Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two-phase systems. World Journal of Microbiology and Biotechnology. **19** (4), 337-348.

- **Bataillon M, Nunes Cardinali AP, Castillon N et Duchiron F.** (2000). Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase from *Bacillus* sp. strain SPS-0. *Enzyme and Microbial Technology*. **26** (2), 87–192.
- **Beg QK, Bhushan B, Kapoor M et Hoondal GS.** (2000). Effect of amino acids on production of xylanase and pectinase from a *Streptomyces* sp. QG-11-3. *World J Microbiol Biotechnol*. **16**, 211-213.
- **Beg QK, Bhushan B, Kapoor M et Hoondal GS.** (2000). Enhanced production of a in biobleaching of eucalyptus Kraft pulp. *Enzyme Microb Technol*. **27**, 459- 466.
- **Beg QK, Bhushan B, Kapoor M et Hoondal GS.** (2000). Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from a *Streptomyces* sp. QG-11-3. *J Ind Microbiol Biotechnol*. **24**, 396-402.
- **Biely P.** (1982). Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnology*. **3** (11), 286-290.
- **Bim MA et Franco TT.** (2000). Extraction in aqueous two-phase systems of alkaline xylanase produced by *Bacillus pumilus* and its application in kraft pulp bleaching. *J Chromatogr B*. **743**: 349–356.
- **Boucherba N.** (2011). Production, purification et caractérisation d'une xylanase produite par *Jonesia denitrificans* BN13. Thèse de doctorat en science biologique. Université de AbdArraheman MIRA de Béjaïa, Faculté des sciences et de la vie, 108p.
- **Boucherba N, Benallaoua S, Estelle C, Hebal H et Duchiron F.** (2011). Production and partial characterization of xylanase produced by *Jonesia denitrificans* isolated in Algerian soil. *Process Biochemistry*. **46** (2), 519-525.
- **Bradford MM.** (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principale of protein-Dye Binding. *Anal. Biochem*. **72**, 248-254.

## C

- **Carmona EC, Fialho MB, Buchgnani ÉB, Coelho GD, Brocheto-Braga MR et Jorge JA.** (2005). Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*. *Process Biochemistry*. **40** (1), 359-364.
- **Chávez R, Bull P et Eyzaguirre J.** (2006). The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *Journal of biotechnology*. **123** (4), 413-433.

- **Chavez-Santoscoy A, Benavides J, Vermaas W et Rito-Palomares M.** (2010). Application of Aqueous Two-Phase Systems for the Potential Extractive Fermentation of Cyanobacterial Products. *Chemical engineering & technology*. **33** (1), 177-182.
- **Choudhury B, Chauhan S, Singh SN et Ghosh P.** (2006). Application of xylanase enzyme of *Bacillus coagulans* as a prebleaching agent on non-woody pulps. *Process Biochemistry*. **41**, 226–231.
- **Cleland JL, Builde SE, Swartz JR, Winkler M, Chang JY et Wang DI.** (1992). Polyethylene glycol enhanced protein refolding. *Nature Biotechnology*. **10** (9), 1013-1019.
- **Collins T, Gerday C, et Feller G.** (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS microbiology reviews*. **29**(1), 3-23.
- **Cote G.** (1998). Extraction liquide-liquide: Présentation générale. *Techniques de l'ingénieur. Génie des procédés*. **2**, J2760-1.

**D**

- **Dhiman SS, Sharma J et Battan B.** (2008). Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: A review. *BioResources*. **3** (4), 1377-1402.
- **Duarte MCT, Portugal EP, Ponezi AN, Bim MA, Tagilari CV et Franco TT.** (1999). Production and purification of alkaline xylanases. *BioresourceTechnol*. **68** (1), 49–53.
- **Draginja Pericin, Ljiljana Radulovic, Svetlana Trivicet Etelka Dimic.** (2008). Evaluation of solubility of pumpkin seed globulins by response surface method. *Journal of Food Engineering*. **84** (4), 591–594.

**E**

- **Ebringerova A et Heinze T.** (2000). Xylan and xylan derivatives–biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular rapid communications*. **21** (9), 542-556.

**F**

- **Farrel RL, Biely P et McKay DL.** (1996). Production of hemicellulase by the fungus *Penicillium kloeckeri* in biotechnology in the pulp and paper industry. Vienna: Facultas-Universitats verlag. pp 485–489.

- **Fernández-Espinar MT, Ramón D, Piñaga F, et Vallés S.** (1992). Xylanase production by *Aspergillus nidulans*. FEMS microbiology letters. **91** (2), 91-96.
  
- **Flint HJ, Martin J, McPherson CA, Daniel AS et Zhang JX.** (1993). A bifunctional enzyme, with separate xylanase and beta (1, 3-1, 4)-glucanase domains, encoded by the xynD gene of *Ruminococcus flavefaciens*. Journal of bacteriology. **175** (10), 2943-2951.

**G**

- **Gallardo O, Diaz P et Pastor FI.** (2004). Cloning and characterization of xylanase A from the strain *Bacillus sp.* BP-7: comparaison with alkaline pi-low molecular weight xylanases of family 11. Current Microbiology. **48**, 276-279.
- **Garai D et Kumar V.** (2013). Aqueous two phase extraction of alkaline fungal xylanases in PEG/ phosphate system: Optimization by Box–Behnken design approach. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 2. 125–131.
- **Gautam S et simon L.** (2006). Partitioning of  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma reesei* in poly (ethylene glycol) and potassium phosphate aqueous Two-Phase Systems: influence of pH and temperature. Biochem. Eng. J. **30**, 104-108.
- **Geweelyet Neveen.** (2011). Purification and characterization of acido-thermophilic xylanase from *Aspergillus terreus*. Biological science department (Microbiology), Australian J. of basic and applied Sci. **5** (10), 214-219.
- **Ghanem BN, Yucef HH, Mahrouse HK.** (2000). Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. Bioresource Technology. **73**, 113-121.
- **Girard R.** (1996). Mise en pâte sans soufre - procédé de solvololyse. Mémoire de recherche. Université du Québec, 134p.
- **Gírio FM, Fonseca C, Carvalheiro F, Duart LC, Marques S et Bogel-Łukasik R.** (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. Bioresource Technology, **101** (13), 4775-4800.
- **Gorbacheva IV et Rodionova NA.** (1977). Action pattern of endo-1,4-xylanase from *Aspergillus niger* on xylan and xylooligosaccharides. Biochim. Biophys. Acta. **484**, 94-102.

- **Graikaiwari R, Shendye A, Kulkurani N et Rao M.** (1996). Two phase separation of xylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* using a poly (ethylene glycol)-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> system. *Biotechnology and Applied biochemistry*. **23**, 237-241
  
- **Grigorevski-Lima AL, de Oliveira MM, do Nascimento RP, da Silva bon EP, Coelho RR.** (2013). Production and Partial Characterization of Cellulases and Xylanases from *Trichoderma atroviride* 676 Using Lignocellulosic Residual Biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **169** (4), 1373- 1385.
- **Gupta VK, Gaur R, Gautam N, Kumar P, Yadav IJ et Darmwal NS.** (2009). Optimization of xylanase production from *Fusarium solani* F7. *Amer J Food Technol World*. **4** (1), 20-29.

### *H*

- **Hatti-Kaul R.** (2001). Aqueous two-phase systems. *Molecular biotechnology*. **19** (3), 269-277.
- **Heck JX, Flôres SH, Hertz PF et Ayub MAZ.** (2006). Statistical optimization of thermo-tolerant xylanase activity from Amazon isolated *Bacillus circulans* on solid-state cultivation. *Bioresource technology*. **97** (15), 1902-1906.
- **Henrissat B.** (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*. **280** (2), 309.
- **Henrissat B et Davies GJ.** (1997). Structural and sequences-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Bio*. **7**, 637-644.
- **Hernandez A, Copa-Patino JL et Soliveri J.** (2001). Xln23 From *Streptomyces chattanoogensis* UAH23 encodes a putative enzyme with separate xylanase and arabinofuranosidase catalytic domains. *Mitochondrial DNA*. **12** (3), 167-177.

### *J*

- **Jozala AF, Lopes AM, de Lencastre Novaes LC, Mazzola PG, Penna TCV et Júnior AP.** (2012). Aqueous Two-Phase Micellar System for Nisin Extraction in the Presence of Electrolytes. *Food and Bioprocess Technology*. 1-6.

K

- **Khasin A, Alchanati I, Shoham Y.** (1993). Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Appl Environ Microbiol.* **59**, 1725-1730.
- **Kim SW, Kang SW, et Lee JS.** (1997). Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. *Bioresource technology.* **59** (1), 63-67.
- **Koller E.** (2010). Aide-mémoire de génie chimique. Edition : Dunod. Paris. 636p.
- **Kumar A, Gupta R, Shrivastava B, Khasa YP et Kuhad RC.** (2012). Xylanase production from an alkalophilic actinomycete isolate *Streptomyces* sp. RCK-2010, its characterization and application in saccharification of second generation biomass. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* **74** (3), 170-177.
- **Kumar Bajaj B et Manhas K.** (2012). Production and characterization of xylanase from *Bacillus licheniformis* P11 (C) with potential for fruit juice and bakery industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* **1**(4), 330–337.

L

- **Laemmli UK.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227** (5259), 680-685.
- **Lama L, Calandrelli V, Gambacorta A, Nicolaus B.** (2004). Purification and characterization of thermostable xylanase and B-xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarctius*. *Research microbiol.* **155**, 283-289.
- **Li Xin, ZhinaLian, Bo Dong, Yong Xu, Qiang Yong, et Shiyuan Yu.** (2011). Extractive bioconversion of xylan for production of xylobiose and xylotriose using a PEG6000/sodium citrate aqueous two-phase system. *Korean J. Chem. Eng.,* **28** (9), 1897-1901.
- **Liu W, Zhu W, Lu Y, Kong J et Ma G.** (1998). Production, partial purification and characterization of xylanase from *Trichosporon cutaneum* SL409. *Process Biochemistry.* **33** (3), 331-336.
- **Liu Y, Yu YL, Chen MZ, Xiao X.** (2011). Advances in Aqueous Two-Phase Systems and Applications in Protein Separation and Purification. *Canadian Journal on Chemical Engineering & Technology.* **2** (2), 1-6.

- **Lodha SJ, Korus RA et Crawford DL.** (1989). Production of major extracellular enzymes during lignocelluloses degradation by two *Streptomyces* in agitated submerged culture. *Appl Environ Microbiol.* **55**, 1165-1187.
- **Lu F, Lu M, Lu Z, Bie X, Zhao H, et Wang Y.** (2008). Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. *Bioresource Technology.* **99** (13), 5938-5941.

### M

- **Mayerhoff, ZD, Roberto, IC et Franco TT.** (2004). Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems. *Biochemical engineering journal.* **18** (3), 217-223.
- **Mazzola PG, Lopes AM., Hasmann FA, Jozala AF, Penna TC, Magalhaes PO et Pessoa Jr.A.** (2008). Liquid–liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* **83** (2), 143-157.
- **Miller GL.** (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 87-95.
- **Mohane G, Guhankumar P et Balakrishnan V.** (2011). Isolation of Xylan degrading enzyme from *Trichoderma* spp. *Research in Plant Biology.* **1** (3), 15-20.
- **Moine C.** (2005). Extraction, caractérisation structurale et valorisation d'une famille d'hémicelluloses du bois. Obtention de matériaux plastiques par modification des xylanes. Thèse de doctorat. Ecole Doctorale Sciences – Technologie – Santé. Faculté des Sciences et Techniques, Limoges, 238p.
- **Morales P, Madarro A, Flors A, Sendra J, et Pérez-González J.** (1995). Purification and characterization of a xylanase and an arabinofuranosidase from *Bacillus polymyxa*. *Enzyme and microbial technology.* **17** (5), 424-429.
- **Morosoli R, Roy C et Yaguchi M.** (1986). Isolation and partial primary sequence of a xylanase from the yeast *Cryptococcus albidus*. *Biochimica et Biophysica Acta.* **870**, 473-478.



*N*

- **Nascimento RP, Coelho, RRR., Marques S, Alves L, Girio FM, Bon EPS et Amaral-Collação MT.** (2002). Production and partial characterisation of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme and Microbial Technology*. **31** (4), 549-555.
- **Nanmori T, Watanabe T, Shinke R, Kohno A and Kawamura Y (1990).** Purification and properties of thermostable xylanase and  $\beta$ -xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothersophilus* strain. *J Bacteriol*. **172** (12), 6669-6672.
- **Ncube T, Howard RL, Abotsi EK, Jansen van Rensburg JL et Ncube I.** (2012). *Jatropha curcas* seed cake as substrate for production of xylanase and cellulase by *Aspergillus niger* FGSCA733 in solid-state fermentation. *Industrial Crops and Products*. **37**, 118-123.

*P*

- **Peng P, Peng F, Bian J, Xu F, Sun RC, et Kennedy JF.** (2011). Isolation and structural characterization of hemicelluloses from the bamboo species *Phyllostachys incarnate* Wen. *Carbohydrate polymers*. **86** (2), 883-890.
- **Prevot S.** (1961). *Traité de bactériologie systématique*. Edition: Dunod. Paris, 472p.
- **Pukall R, Gehrich-Schröter G, Lapidus A, Nolan M, Del Rio TG, Lucas S,.... et Han C.** (2009). Complete genome sequence of *Jonesia denitrificans* type strain (Prevot 55134T). *Standards in genomic sciences*. **1** (3), 262.

*R*

- **Raghava Rao J, Nair BU.** (2011). Novel approach towards recovery of glycosaminoglycans from tannery wastewater. *Bioresource technology*. **102** (2), 872-878.
- **Rainey FA, Weiss N et Stackebrandt E.** (1995). Phylogenetic analysis of the genera *Cellulomonas*, *Promicromonospora*, and *Jonesia* and proposal to exclude the

genus *Jonesia* from the family Cellulomonadaceae. International journal of systematic bacteriology. **45** (4), 649-652.

- **Raja S, Murty VR, Thivaharan V, Rajasekar V, et Ramesh V.** (2011). Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules—a review. Science and Technology. **1** (1), 7-16.
- **Ratanapongleka K.** (2010). Recovery of biological products in aqueous two phase systems. Int J Chem Eng Appl. **1** (2), 191-198.
- **Riedl W et Raiser T.** (2008). Membrane-supported extraction of biomolecules with aqueous two-phase systems. Desalination. **224** (1), 160-167.
- **Rocourt J, Wehmeyer U et Stackebrandt E.** (1987). Transfer of *Listeria denitrificans* to a New Genus, *Jonesia* gen. nov., as *Jonesia denitrificans* comb. nov. International journal of systematic bacteriology. **37** (3), 266-270.
- **Royer JC et Nakas JP.** (1989). Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum*. Enzyme Microb. **11**, 405–10.
- **Ruiz-Arribas A, Fernández-Ábalos JM., Sánchez P, Garda AL et Santamaría RI.** (1995). Overproduction, purification, and biochemical characterization of a xylanase (Xys1) from *Streptomyces halstedii* JM8. Applied and environmental microbiology. **61** (6), 2414-2419.

### S

- **Saravanan S, Rao JR, Murugesan T, Nair BU et Ramasami T.** (2007). Partition of tannery wastewater proteins in aqueous two-phase poly (ethylene glycol)-magnesium sulfate systems: Effects of molecular weights and pH. Chemical engineering science. **62** (4), 969-978.
- **Senior DJ, Mayers PR et Saddler JN.** (1989). Xylanase production by *Trichoderma harzianum* E58. Appl Microbiol Biotechnol. **32**, 137-142.
- **Seyis I et Aksoz N.** (2005). Xylanase production from *Trichoderma harzianum* 1073 D3 with alternative carbon and nitrogen Sources. Food Technol. Biotechnol. **43** (1), 37–40.
- **Shah KB, Jain U, Belusko RJ, Kumar P, Foy BK, Montoya A et Rao TLK.** (1991). Subclavian artery laceration and acute hemothorax on attempted internal jugular vein cannulation. Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia. **5** (6),

608-610.

- **Shah AR et Madamwar D.** (2005). Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. *Process Biochemistry*. **40** (5), 1763-1771.
- **Siedenberg D, Gerlach SR, Schügerl K, Giuseppi MLF, et Hunik J.** (1998). Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on synthetic medium in shake flask cultures. *Process Biochemistry*. **33** (4), 429-433.
- **Sohier R, Benazet F et Piechaud M.** (1948). Sur un germe du genre *Listeria* apparemment non pathogène. *Ann Inst Pasteur (Paris)*. (74), 54-57.
- **Stackebrandt E et Prauser H.** (1992). The family Cellulomonadaceae. In *The Prokaryotes: Ecophysiology, Isolation, Identification, Application*, Belows, Trüper, Dworkin, Harder et Schleifer. (Eds), Springer. New York, pp. 1323-1345.
- **Stackebrandt E, Rainey FA et Ward-Rainey NL.** (1997). Proposal for a new hierachic classification system, *Actinobacteria classis nov.* *Int J Syst Bacteriol*. **47** (2), 479-491.

*T*

- **Techapun C, Charoenrat T, Poosaran N, Watanabe M et Sasaki K.** (2002). Thermostable and alkaline-tolerant cellulase-free xylanase produced by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106. *J Biosci Bio eng*. **93** (4), 431–433.

*V*

- **Vaidya BK, Suthar HK, Kasture S et Nene S.** (2006). Purification of potato polyphenol oxidase (PPO) by partitioning aqueous two phase system. *Biochem. Eng. J.* **28**, 161-166.
- **Voet et Voet.** (2005). *Biochimie. De boeck*, 2ème édition. page 139.

*W*

- **Wakiyama M, Yoshihara K, Hayashi S et Ohta K.** (2010). An extracellular endo-1,4-β-xylanase from *Aspergillus japonicus*: Purification, properties, and characterization of the encoding gene. *Journal of bioscience and bioengineering*. **109** (3), 227-229.

- **Walter H et Johansson GT.** (1994). Methods in enzymology: Aqueous two-phase systems. Academic press, San Diego, CA
- **Wang SL, Yen YH, Shih IL, Chang AC, Chang WT, Wu WC, Chai YD.** (2003). Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. Enzyme and Microbial Technology. **33**, 917-925.
- **Wase DAJ, Raymahasay S et Wang CW.** (1985). Production of  $\beta$ -d-glucosidase, endo-1, 4- $\beta$ -d-glucanase and d-xylanase from straw by *Aspergillus 11umigates*. Enzyme and microbial technology. **7** (5), 225-229.
- **Wong KK, Tan LU et Saddler JN.** (1988). Multiplicity of beta-1, 4-xylanase in microorganisms: functions and applications. Microbiological Reviews. **52** (3), 305.

$\chi$

- **Xin F, He J.** (2013). Characterization of a thermostable xylanase from a newly isolated *Kluyvera species* and its application for biobutanol production. Bioresource Technology. **135**, 309- 3015.

$\gamma$

- **Yang S, Huang Z, Jiang Z et Li L.** (2008). Partition and purification of a thermostable xylanase produced by *Paecilomyces thermophile* in solid state fermentation using aqueous two-phase systems. Process Biochem. **43**, 56–61.
- **Yasinok AE, Suzan Biran, Aytac Kocabas et Bakir U.** (2010). Xylanase from a soil isolate, *Bacillus pumilus*: gene isolation, enzyme production, purification, characterization and one-step separation by aqueous-two-phase system. World J Microbiol Biotechnol. **26**, 1641–1652.

ANNEXES

## I. MATÉRIEL UTILISÉ

Pour réaliser ce travail, nous avons utilisé le matériel suivant :

- Balance (Scout<sup>tm</sup>pro) ;
- Balance (Ae ADAM AFA-120LC) ;
- Bain marie (Mettler) ;
- Bain marie (GFL) ;
- Étuve (Mettler) ;
- Centrifugeuse (Sigma 2-16K) ;
- Centrifugeuse (mikro 120 Hettick Zentrifugen) ;
- pH-mètre (HANNA pH210) ;
- Spectrophotomètre (UV<sup>mini</sup><sub>1240</sub> SHIMADZU) ;
- Dispositif d'électrophorèse (**Mini Protean II, Bio Rad**).

## II. PRODUITS UTILISÉS

- Xylane de bouleau (birchwood xylan) (SIGMA) ;
- Xylane d'épeautre et d'avoine (oat spelt xylan) (SIGMA) ;
- Xylane de hêtre (larchwood xylan) (SIGMA);
- PEG (polyéthylène glycol) (Prolabo) ;
- BSA (bovine sérum albumine) (Fluka) ;
- Bleu de coomassie G250 (Fluka) ;
- Bleu de coomassie R250 (Fluka) ;
- Rouge de congo (SIGMA);
- Marqueurs protéiques (Dual color BIORAD) ;
- Triton X-100 (Fluka) ;

### III. PREPARATION DU MILIEU MM7 LIQUIDE

Composition du milieu :

<i>Réactifs et ingrédients</i>	<i>Quantité en gramme (g)</i>
Xylane de bouleau	7g
Extrait de levure	2g
NaCl	2,5g
NH <sub>4</sub> Cl	5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	30g
MgSO <sub>4</sub> /7H <sub>2</sub> O	0,25g
Eau distillée (qsp)	1L

- ✓ Agitation et chauffage à 100°C jusqu'à la dissolution totale des ingrédients ;
- ✓ Le milieu est ajusté à pH 7 avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 1N (**viet et al., 1990**), avec agitation en permanence sur une plaque agitatrice ;
- ✓ Autoclavage pendant à 120°C pendant 20 minutes;

### IV. MILIEU MM7 SOLIDE

<i>Réactifs et ingrédients</i>	<i>Quantité en gramme (g)</i>
Xylane de bouleau	7g
Extrait de levure	2g
NaCl	2,5g
NH <sub>4</sub> Cl	5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	30g
MgSO <sub>4</sub> /7H <sub>2</sub> O	0,25g
Agar	15g
Eau distillée qsp	1L

---

**PREPARATION DES REACTIFS, DES TAMPONS ET DES GELS  
D'ELECTROPHORESE****1. Solution à base d'acide dinitrosalicylique (DNS)**

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

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

**2. Solution de bleu de coomassie G250 pour le dosage des protéines**

Bleu de Coomassie G250 .....	10mg
Éthanol 99,5% .....	5ml
Acide phosphorique 85% .....	10ml
Eau distillée.....	qsp.. 100ml

**3. Tampon Tris-HCL à 50 mM à pH 8,5**

Tris.....	6,057g
Eau distillée.....	qsp... 1L

Ajuster le pH à 8,5 avec du HCL concentré (37,6%).

**4. Gel de séparation à 12%**

Solution d'acrylamide/ bisacrylamide.....	2,5ml
Tampon de séparation.....	5,2ml
TEMED.....	20 $\mu$ L
Persulfate d'ammonium (APS) .....	70 $\mu$ L
Xylane de bouleau.....	0,8ml
Eau distillée.....	qsp..... 12,5ml

**5. Gel de concentration à 7,5%**

Solution d'acrylamide / bisacrylamide.....	2,5ml
Tampon de concentration.....	2,5ml



TEMED.....10 $\mu$ L  
Persulfate d'ammonium(APS) .....100 $\mu$ L  
Eau distillée.....qsp.....10ml

#### **6. Tampon de séparation à pH 8,8**

Tris-HCL (3M).....72,7g  
SDS (0,8%).....1,6g  
Mercaptoéthanol (0,8ml).....0,8ml  
Eau distillée.....qsp.....200ml  
Ajuster le pH à 8,8 avec HCl concentré

#### **7. Tampon de concentration**

Tris-HCL (0,5M).....12,114g  
SDS (0,4%).....0,8g  
Mercaptoéthanol (0,2%).....0,8ml  
Eau distillée.....qsp.....200ml  
Ajuster le pH à 6,6

#### **8. Tampon de migration (X10) à pH 8,3**

Tris (0,025M)..... 3,028g  
Glycine (0,192M).....14,41g  
Mercaptoéthanol (0,05%).....500 $\mu$ L  
SDS (0,1%).....1g  
Eau distillée..... qsp .....1000ml  
Ajuster le pH à 8,3

#### **9. Tampon échantillon à pH 6,8**

Trizma base.....0,303g  
SDS (Sigma).....0,8g

Eau distillée.....4ml

Ajuster le pH à 6,75 avec du HCl concentré

Glycérol.....4ml

$\beta$ -mercaptoéthanol à 14,3M...2ml

Bleu de bromophénol.....0,1 mg

**10. Solution de fixation et de décoloration**

Alcool (éthanol) .....30%

Acide acétique.....5%

**11. Solution de coloration**

Bleu de Coomassie R250.....2,9 mM

Alcool (éthanol) .....40%

Acide acétique.....10%

**12. Tampon Triton X-100 à 2,5% (m/v)**

Triton X-100.....2,5g

Eau distillée.....qsp... 100ml

**13. Solution de rouge de Congo à 0,1% (100ml)**

Rouge de Congo.....0.1g

Eau distillée.....qsp... 100ml

# RÉSUMÉ

Le but de cette étude est l'extraction des xylanases produites par *Jonesia denitrificans* BN13 par un système à deux phases aqueuses (SDPA), composé de 15% de PEG/13% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /0,1M de NaCl, à pH 7, avec un rendement de 78,5% de l'activité xylanolytique qui est retrouvée dans la phase supérieure, un coefficient de partage (K) de 20,28 et un facteur de purification (FP) de 5,86.

Ces xylanases ont été analysées par électrophorèse dénaturante et par zymogramme. Une seule xylanase de 26,85 kDa est obtenue.

**Mots-clés :** *Jonesia denitrificans* BN13, Xylanase, Xylane de bouleau, SDS-PAGE, Zymogramme.

# SUMMARY

The aim of this study is the extraction of *Jonesia denitrificans* BN13 xylanase by the aqueous two phases system (ATPS), comprised by 15% PEG/13 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  / 0.1 M NaCl, pH 7, the yield is about 78.5 % of the xylanolytic activity which is found in the top phase , the partition coefficient (K) 20.28 and a purification factor (PF) of 5.86.

These xylanases were analyzed by denaturing electrophoresis and zymogram. One xylanase with molecular weight of 26.85 kDa was obtained.

**Keywords:** *Jonesia denitrificans* BN13, Xylanase, Birchwood xylan, SDS-PAGE, Zymogram.