

**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITÉ ABDERRAHMANE MIRA DE BEJAÏA
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**



DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

**En vue de l'obtention du diplôme de Master en
Biotechnologie Microbienne**

Thème

**Optimisation du système à deux phases aqueuses
(PEG 1000/ K₂HPO₄/ NaCl) pour l'extraction des
xylanases de *Jonesia denitrificans* BN13**

Présenté par :

- M^{elle} : LALOUCHE Amel
- M^{elle} : TEMINE Katia

Président du jury: M^r BENSALD K. (MAA, Université A. MIRA/ Bejaia)

Examineurs: M^r BOUKERROUI A. (MCA, Université A. MIRA/ Bejaia)
M^r MOUSSAOUI B. (MAB, Université A. MIRA/ Bejaia)

Encadré par : M^{me} BOUCHERBA N. (MCB, Université A. MIRA/ Bejaia)

PROMOTION 2013-2014



REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, nous tenons à remercier Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce travail.

Nous adressons toute notre gratitude au Président du jury et aux membres du jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'examiner ce modeste travail et ne feront qu'améliorer la qualité de cet ouvrage.

Nous avons l'honneur et le plaisir de présenter notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à M^{me} BOUCHERBA, pour sa précieuse aide, ses orientations et sa gentillesse afin de permettre le bon déroulement de notre travail.

Nous tenons à remercier l'ensemble du personnel du laboratoire de microbiologie appliquée de l'université Abderrahmane Mira de Béjaïa.

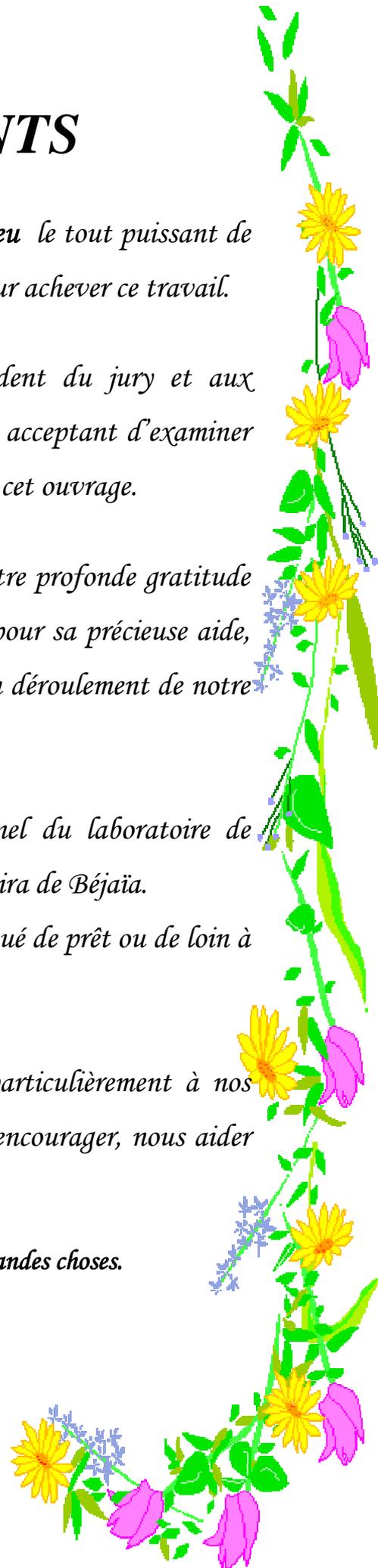
Nos remercions également tous ceux qui ont contribué de prêt ou de loin à l'achèvement de notre Travail.

Enfin, nos remerciements sont adressés plus particulièrement à nos familles et nos amis(es) qui ont su nous soutenir, nous encourager, nous aider et nous supporter tout au long des années.

La force d'être deux fait toujours naître de grandes choses.

Amel

Katia





DEDICACES

*Ce projet s'achève avec l'aide de Dieu, le tout puissant ;
Est dédiée à toutes les personnes que j'aime :*

***A** mes très chers parents qui m'ont tout donné, qui ont toujours été là pour moi, pour tous les sacrifices consentis pour mon bonheur et ma réussite. Merci de m'avoir toujours soutenu dans mes décisions, Merci pour tout votre amour, votre soutien et votre confiance. Que Dieu le tous puissant vous protège et vous accorde une longue vie et nous garde toujours réunis pour le bonheur et la prospérité, vous m'avez appris que s'instruire est l'héritage le plus important dans la vie et j'espère vous faire honneur et que vous serez toujours fier de moi ;*

***M**on cher fiancé SAMIR et toute sa famille.*

***A** mes très chers frères et sœurs : HOUARI, NOURDDINE et son épouse NASSIMA, HALIM, HOCEME, HANANE, HAWA et SARAH.*

***A** toi ma chère sœur et copine Katia et toute ta famille*

***M**es très chères amies en particuliers Nawel, Dahbia, MINA, FIFI, NORRA, Mounir, Jugurta et Kouceila.*

***E**t a la mémoire de notre collègue HEMMAR Mounir.*

***A** toute mes collègues de la promotion 2013/ 1014.*

AMEL





DEDICACES

Ce projet s'achève avec l'aide de Dieu, le tout puissant ;

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents, qui se sont sacrifié pour m'offrir un climat idéal de travail, qui n'ont jamais cessé de me témoigner leur affection et de m'apporter leurs soutient depuis toujours. Notre refuge qui me rattache lors des moments difficile, vous m'avez appris que s'instruire est l'héritage le plus important dans la vie et j'espère vous faire honneur et que vous serez toujours fier de moi

A mes adorables frères Massi et Billy qui mon toujours soutenu tout au long de mes études et que j'aime énormément Merci d'être la pour moi.

Comme je le dédie également au terme de reconnaissance à Amel et sa famille

Et à tous mes amis de prés ou de loin et ceux qui m'ont aidé en particulier Mounia et sa famille, Lynda, Nawel, Sara, Mounir, Kouceila, Jugurta, et Dahbia.

Et a la mémoire de notre collègue HEMMAR Mounir.

A tous mes collègues de la promotion 2013/2014.

KATIA



INTRODUCTION	01
PREMIERE PARTIE : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Microorganismes producteurs de xylanases	02
I.1. Genre <i>Jonesia</i>	02
I.2. <i>Jonesia denitrificans</i>	02
II. Substrats des xylanases	03
III. Enzymes xylanolytiques	04
III.1. Enzymes de dégradation de la chaîne principale	04
III.1.1. Endo--1,4-xylanases	04
III.1.2. β -D-Xylosidases	05
III.2. Enzymes de dégradation de la chaîne latérale	05
➤ α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.2.55)	05
➤ α -D-glucuronosidases (EC 3.2.1.139)	05
➤ Acétyl estérases (EC 3.1.1.6)	05
➤ Féruloyl estérases (EC 3.1.12)	05
IV. Applications industriels des xylanases.....	06
V. Systèmes à deux phases aqueuses (SDPA)	07
V.1. Généralités sur les systèmes à deux phases aqueuses.....	07
VI. Facteurs influençant le partage des biomolécules dans un SDPA	08
1. Poids moléculaire du polymère.....	08
2. Présence de sels neutres.....	09
3. pH.....	09
VII. Applications de SDPA	09
1. La fermentation extractive	10
2. Récupération des Biomolécules de valeur à partir des eaux usées	10

DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE

MATERIEL ET METHODES

I- Matériel	11
I.1. Appareillages et réactifs chimiques	11
I.2. Matériels biologiques	11
II. Méthodes	11
II.1. Repiquage de la souche <i>Jonesia denitrificans</i> BN13	11
II.2. Préparation et ensemencement des milieux MM7 liquides	11
II.3. Spécificité des xylanases de <i>Jonesia denitrificans</i> BN13 vis – à-vis des différents substrats	12
II.4. Méthodes analytiques	12
II.4.1. Mesure de l'activité xylanolytique	12
II.4.2. Dosage des protéines	14
a- Macrométhode	14
III- Préparation et optimisation du système à deux phases aqueuses (SDPA) à différents paramètres	15
III.1. Effet de la concentration du PEG 1000	15
III.2. Effet de la concentration du Chlorure de Sodium (NaCl)	15
III.3. Effet de la variation du pH	16
IV. Mesure des différents paramètres	16
V. SDS-PAGE et zymogramme	17

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Repiquage de la souche <i>Jonesia denitrificans</i> BN13	20
II. Résultats des méthodes analytiques	20
III. Cinétique de croissance et production de xylanases	20
IV. Spécificité des xylanases vis-à-vis des différents substrats	23

V. Préparation et optimisation du système à deux phases aqueuses (SDPA) à différents paramètres	23
V.1. Effet de la concentration du PEG 1000	23
V.2. Effet de la concentration du NaCl	29
V.3. Effet du pH	33
VI. Mise en évidence des xylanases par SDS-PAGE et zymogramme	37
CONCLUSION	39
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	
RÉSUMÉ	

Liste des tableaux

Tableau I	
Gamme d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs	13
Tableau II	
Gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines par la macrométhode	14
Tableau III	
Préparation des SDPAs après variation de la concentration du PEG.....	15
Tableau IV	
Préparation des SDPAs après variation de la concentration du NaCl.	16
Tableau V	
Production de xylanases dans les fermentations en milieu liquide.....	21
Tableau VI	
Volumes des phases des systèmes après variation de la concentration de PEG 1000 ...	
.....	25
Tableau VII	
Récapitulatif des résultats obtenus de SDPA après variation de la concentration du PEG 1000	25
Tableau VIII	
Volumes des phases des systèmes après variation de la concentration du NaCl.....	30
Tableau IX	
Récapitulatif des résultats de SDPA obtenus après optimisation de la concentration du NaCl.	30

Tableau X
Volumés des phases des systèmes après variation du pH 33

Tableau XI.....
Récapitulatif des résultats obtenus après optimisation du pH..... 34

Tableau XII.....
Comparaison des résultats de différents travaux effectués sur l'extraction des xylanases par SDPA..... 37

Liste des figures

Fig. 01 <i>Jonesia denitrificans</i> sous microscope électronique de balayage (résolution 2 μ m)	2
Fig. 02 Structure hypothétique du xylane montrant les différents sites d'attaque des xylanases microbiennes.....	6
Fig. 03 Test d'activité xylanasiq ue et dosage des sucres réducteurs	12
Fig. 04 Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS	13
Fig. 05 Cuve et accessoires du dispositif d'électrophorèse	18
Fig. 06 Colonies de <i>Jonesia denitrificans</i> BN13 entourées de zones d'hydrolyse du xylane de bouleau	20
Fig. 07 Droite d'étalonnage des sucres réducteurs.....	20
Fig. 08 Droite de dosage des protéines par la technique de la macrométhode	20
Fig. 09 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	23
Fig. 10 Exemple d'un SDPA (PEG 1000 à 46,60 % (m / v) / K ₂ HPO ₄ à 13,14 % (m /v) / NaCl à 1,62 % (m / v) / MM7E 30 ml à pH 7), après séparation des phases.	24
Fig. 11 Effet de la concentration du PEG sur l'activité xylanolytique et sur l'activité spécifique	27
Fig. 12 Effet de la concentration du PEG 1000 sur le coefficient de partage et le ratio volumique (Fig. 12 a), le rendement et le ratio de concentration (Fig. 12 b)	28
Fig. 13 Influence de la concentration du PEG sur le facteur de purification et la récupération d'enzymes	29
Fig. 14 Effet de la concentration du NaCl (m/v) sur l'activité xylanolytique et sur l'activité spécifique.	31
Fig. 15 Influence de la concentration du NaCl (m /v) sur le facteur de purification et la récupération d'enzymes	32

Fig. 16 Influence de la concentration du NaCl (m /v) sur le rendement et le ratio de concentration (Fig. 16 b), le ratio volumique et le coefficient du partage (Fig. 16 b) 32

Fig. 17 Effet du pH sur l'activité xylanolytique et sur l'activité spécifique 35

Fig. 18 Effet de pH sur le rendement et le ratio de concentration 35

Fig. 19 Influence de la concentration du PEG sur le rendement et le ratio de concentration 38

Liste des abréviations

BSA	bovin Sérum albumin.
PAA	polyacrylic Acid.
DNS	Dinitrosalicylic acid.
Tris	Tris-(hydroxyméthyl)-amniométhane.
pI	Point isoélectrique.
PEG	Polyéthylène glycol.
TEMED	N, N, N', N'-tétraméthyléthylenediamine.
FR	Facteur de Réduction.
RE	Récupération de l'enzyme.
RC	Ratio de concentration.
K	Coefficient de Partage.
R	Ratio Volumique.
Y	Rendement.
A_x	Activité xylanolytique.
A_{sx}	Activité spécifique.
MM7	Milieu de culture Minimal 7.
MM7E	Milieu de culture Minimal 7 Ensemencé.
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate- Polyacrylamide Gel electrophoresis.

INTRODUCTION

Introduction

La biomasse est une source abondante et renouvelable de biopolymères qui intéressent fortement les acteurs du développement durable et de la Chimie verte. Les matériaux lignocellulosiques, parmi lesquels la cellulose, les hémicelluloses ou encore les lignines, comptent pour environ 80% de cette biomasse. Les hémicelluloses sont, après la cellulose, le second polymère naturel le plus abondant sur Terre. (**BARBAT, 2009**).

Les principales enzymes capables de dégrader les hémicelluloses sont des hydrolases appelées enzymes hémicellulolytiques ou hémicellulases. 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 une hydrolysent la chaîne principale et les autres clivent les liaisons entre les substituants et les résidus xylose de la chaîne principale (**Puls et Schuseil et al., 1993**).

La purification des xylanases au niveau du laboratoire nécessite une succession 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 aqueuses (**SDPA**) répond aux attentes des industriels (**Nitsawang et al., 2006 et Naganagouda et Mulimani, 2008**).

Il a été introduit pour la première fois par **Albertsson (1986)**, c'est une technique simple et économique permettant une séparation rapide des phases avec peu de dénaturation et surtout une concentration des milieux fermentés dès la première étape d'extraction. Grâce à cette technique, la purification nécessiterait une ou deux étapes supplémentaires selon le type du microorganisme producteur et la xylanase à purifier (**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, la concentration du NaCl et le pH.

Un zymogramme a été réalisé afin de révéler les activités xylanasiques dans la phase de séparation du SPDA.

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 génie biologique.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Microorganismes producteurs de xylanases

Les xylanases sont produites par une grande variété d'organismes, y compris les bactéries, les algues, les champignons, les protozoaires, les gastéropodes et les arthropodes (Prade *et al.*, 1995).

Les levures produisent également des xylanases extracellulaires, citons les xylanases de *Cryptococcus* (Biely *et al.*, 1980) et de *Trichosporon cutaneum* SL409 (Liu *et al.*, 1998). Les actinomycètes représentent également une importante source d'enzymes xylanolytiques, particulièrement le genre *Streptomyces* par exemple : *Streptomyces actuosus* A-151, *Streptomyces cyaneus* SN32, *Streptomyces* sp. AMT-3J, *Streptomyces* sp. QG11.3 (Wang *et al.*, 2003 ; Ninawe *et al.*, 2008 ; Nascimento *et al.*, 2002 et Beg *et al.*, 2000). Le genre *Jonesia* est un actinomycète primitif qui a été décrit comme producteur de xylanases (Boucherba *et al.*, 2011).

1. Genre *Jonesia*

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

1.1. *Jonesia denitrificans*

La souche est à Gram positif, elle se présente sous forme d'un bâtonnet irrégulier et fin ($0,3-0,5 \times 2-3 \mu\text{m}$) (Fig. 01), aéroanaérobie facultative, non sporulée. Sur une gélose nutritive, 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 en 10 à 20 jours. Sa croissance se produit à des températures de 10 à 40° C avec un optimum à 30° C et à des concentrations de NaCl de 5 %.

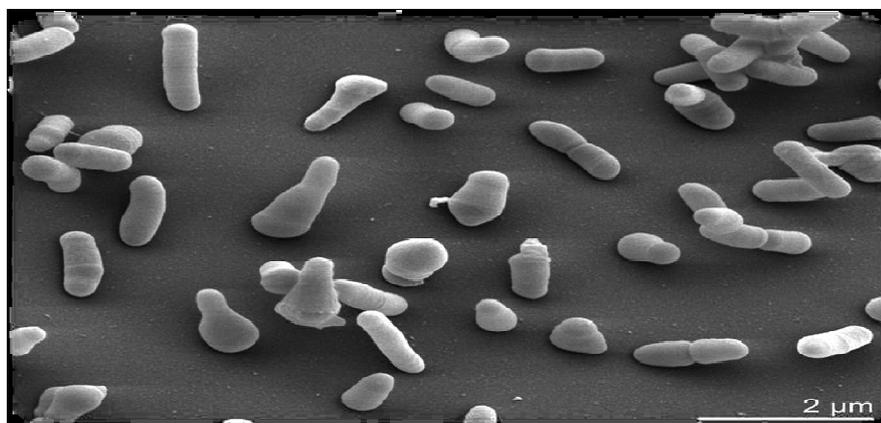


Fig. 01 : *Jonesia denitrificans* sous microscope électronique de balayage (résolution 2 μm) (Pukall *et al.*, 2009).

Selon **Field et al., 2008**, dans la classification des actinomycètes, l'espèce *Jonesia denitrificans* est classée comme suit :

- Domaine : Bactéries
- Phylum : Firmicutes
- Classe : Actinobactérie
- Sous classe : Actinobacteridae
- Ordre : Actinomycétales
- Sous ordre : Micrococccinea
- Famille : Jonesiaceae
- Genre : *Jonesia*
- Espèce : *Jonesia denitrificans*

II. Substrats des xylanases

L'utilisation de déchets agricoles et industriels contribue à la valorisation de la biomasse végétale et des rejets industriels et résout un problème de pollution de l'environnement.

Schulze (1891), a introduit pour la première fois le terme d'hémicellulose pour désigner les fractions isolées et extraites à partir des plantes avec des alcalis dilués. Les hémicelluloses (20 - 40 %), représentent le second polymère renouvelable le plus abondant après la cellulose. Ce sont des hétéropolysaccharides qui se trouvent associées dans la paroi végétale avec la cellulose et la lignine.

Les hémicelluloses les plus connues sont les glucomannanes et les xylanes qui sont les plus abondants et qui se présentent sous plusieurs formes : les arabinoglucuronoxylanes, les xyloglucanes, les arabinoxylanes, les homoxylanes, les hétéroxylanes complexes et les glucuronoxylanes dont fait partie le xylane de bouleau.

Plusieurs travaux ont testé la production de xylanases sur milieu à base de xylane pur : xylane de bouleau, xylane d'épeautre et d'avoine et xylane de hêtre.

Le bouleau blanc est une espèce végétale, pionnière qui présente une croissance rapide au début de son cycle suite à une perturbation majeure telle un feu ou une coupe totale (**Safford et al., 1990**). Cette espèce présente une distribution boréale continue et la blancheur de son écorce serait une adaptation à l'insolation hivernale en territoires nordiques (**Karels et Boonstra, 2003**).

Le bouleau blanc est reconnu pour coloniser un grand nombre de types de stations forestières au Québec et en Ontario, préférant toutefois des sols frais à bon drainage,

modérément acides et présentant un fort pourcentage de matière organique (**Bell, 1991 et Jobidon, 1995**).

Les hémicelluloses du hêtre, sont composées globalement de 85% de xylane et de 15% de glucomannane. Il convient de signaler qu'une proportion de 5,95% de groupes O-acétyles sur base sèche a été mesurée pour les hémicelluloses du hêtre tandis que celle-ci est nulle pour le xylane commercial utilisé. Par ailleurs, ce composé est légèrement coloré.

Ces substrats sont des inducteurs potentiels de xylanases, mais leur coût élevé est une contrainte à l'échelle industrielle d'où la nécessité d'utiliser des substrats bon marché (**Gawande et Kamat, 1999**).

III. Enzymes xylanolytiques

Elles sont des glycosidases β (1,4) D-xylosidique (hydrolases O- glycosidiques, EC 3.2.1.x) qui catalysent les endohydrolyses de liaison β (1,4) D- xylosidiques. La fonction principale de ces enzymes est d'hydrolyser l'hémicellulose.

III.1. Enzymes de dégradation de la chaîne principale

III.1.1. Endo β -1,4 xylanase

Elles sont appelées aussi les β 1,4- D- xylane xylanohydrolases (EC.3.2.1.8), elles sont des enzymes qui hydrolysent les liaisons β (1,4) entre deux résidus β -D - xylanopyranoses. Il en est fait mention pour la première fois en 1953 même si l'hydrolyse du xylane par les micro-organismes est connue depuis la fin du 19^{ème} siècle. La première préparation enzymatique d'une xylanase et sa purification partielle à partir du mycélium d'*Aspergillus foetidus* date d'un demi-siècle seulement (**Whistler et Masak 1955**). Par la suite de nombreuses xylanases d'origine bactérienne ; fongique ou même léveuriennne et végétale ont été isolées, purifiées et caractérisées (**PAÏS, 2005**).

Avec l'avènement du génie génétique dans les années 1980 et l'invention de PCR sont apparues les premières xylanases recombinantes, mais il fallait attendre l'année 1994 pour que soient publiées les premières structures de xylanases (**Drewenda et al., 1994 ; Harris et al., 1994 ; Torronen et al., 1994 et Whitte et al., 1994**).

III.1.2. β -D-Xylosidases

Les B-D-xylosidases sont des exoglycosidases (1,4 β -D-xylane hydrolases, EC 3.2.1.37); ces enzymes hydrolysent les xylo-oligosaccharides à partir de l'extrémité N-terminale (Wong *et al.*, 1988). En général, elles n'attaquent pas les hétéroxylanes, mais dans certains cas, on a observé une libération lente de xylose à partir de ces polymères (Dekker et Richards, 1976). Le substrat préféré de ces enzymes est le xylobiose, l'affinité de la xylosidase envers les xylo-oligosaccharides décroît avec l'augmentation du degré de polymérisation (Van Doorsaler *et al.*, 1985).

L'action combinée des β -xylosidases et d'endo- β -1,4-xylanases pourrait aboutir à la bioconversion totale de la chaîne linéaire du xylane (Benamrouche-Stitou, 2002).

III.2. Enzymes de dégradation de la chaîne latérale

Il existe une variété :

➤ **α -L arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55)** : qui sont généralement des exo-enzymes qui hydrolysent à partir de l'extrémité N-terminale, elles sont capables de cliver les liaisons α (1,2), α (1,3) et α (1,5) et sont actives sur le para-nitrophyle- α -L-arabinofuranose (pNP-Araf) (Saha *et al.*, 2000).

➤ **α -D-glucuronosidases (EC 3.2.1.139)** : Elles hydrolysent les liaisons α (1,2) entre les acides 4-O-méthyl-D-glucuroniques et les résidus de xylose de la chaîne d'hétéroxylanes. La sélection de xylo-oligosaccharides ramifiés se fait à côté de la région N-terminale où la présence d'acide uronique en position O₂ de xylose est requise pour l'hydrolyse.

➤ **Acétyl estérases (EC 3.1.1.6)** : Ces enzymes libèrent des groupements acétyles liés en position C-2 ou C-3 d'un xylose, elles sont souvent peu actives sur de longues chaînes de xylose, mais plus efficaces sur des xylo-oligosaccharides. De nombreux acétyles estérases nécessitent donc l'action préalable d'endoxylanases afin d'obtenir une diminution de la taille du substrat. L'action des endoxylanases interviendrait dans des régions faiblement acétylées libérant des xylo-oligosaccharides acétylés qui seront alors des substrats des acétyl estérases. Ce type d'enzyme associé à une endoxylanase conduit parfois à une action synergique (Blum *et al.*, 1999).

➤ **Féruloyl estérases (EC 3.1.12)** : Elles sont capables de libérer l'acide férulique estérifié à l'arabinose ramifiant les arabinoxylanes. Les féruloyles estérases agissent préférentiellement sur des substrats de petite taille (oligomère)

(Mac Kenzie et Bilous, 1988), mais peuvent parfois agir sur des substrats polymériques (Tenkanen et al., 1991 et Bartolomé et al., 1997). Il a été montré qu'en combinaison avec des endoxylanases, les féruloylestérases pouvaient solubiliser des taux variables d'acides féruliques pariétaux (Faulds et al., 2003).

La figure n° 02, illustre les sites d'attaques des xylanases microbiennes.

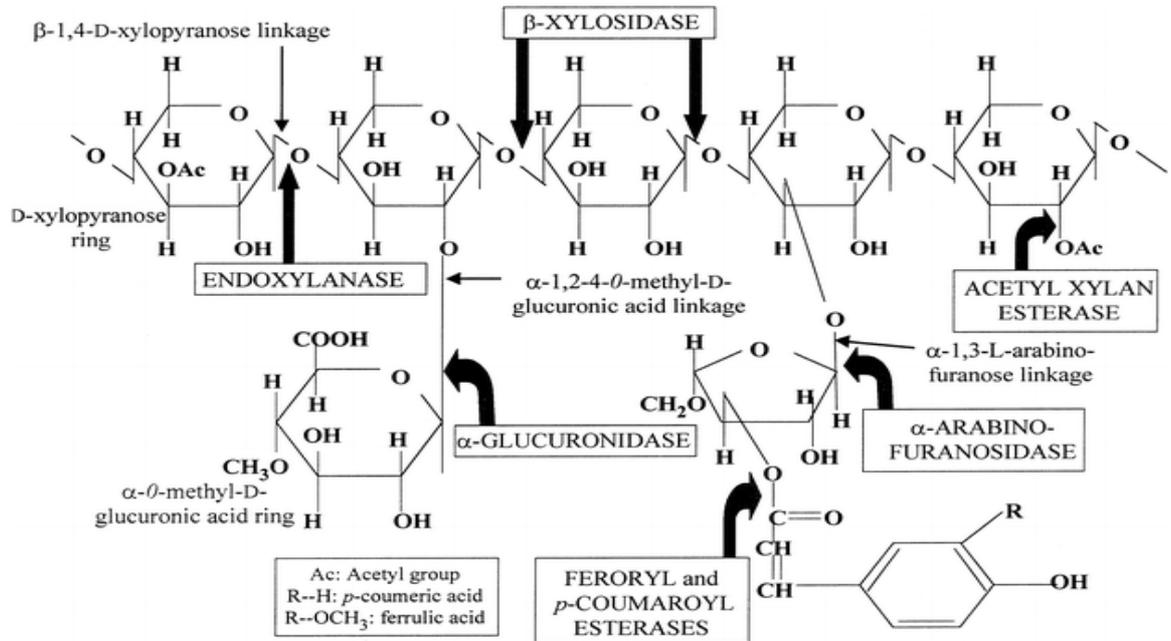


Fig. 02 : Structure hypothétique du xylane montrant les différents sites d'attaque des xylanases microbiennes (Beg et al., 2001).

IV. Application industriels des xylanases

Les xylanases sont utilisées dans :

➤ Alimentation humaine

Fabrication des jus, nectars, huiles, vin : pour l'amélioration, la macération et la clarification des jus, Réduction de la viscosité, augmentation des taux d'extraction et de la filtration.

Dans la panification : pour l'amélioration de l'élasticité et de la résistance de la pâte pour une meilleure manipulation et pour une meilleure texture du pain.

➤ Alimentation animale

Nourriture pour animaux monogastrique et ruminants : dans le but de diminuer le contenu en polysaccharide non amidon d'où une baisse de la viscosité et une meilleure disponibilité des protéines et de l'amidon qui accroît la digestibilité et la valeur nutritionnelle des aliments.

➤ **Industries non alimentaires**

Pâte et papier : Blanchiment des pates Kraft, séparation des encres, donc réduction de l'utilisation en agents chlorés et alcalins.

Amélioration des procédés mécaniques de pulping qui aboutit à une baisse de la consommation d'énergie.

➤ **Bioconversion**

Par le traitement des déchets pour production des composés fermentescibles renouvelables (bioéthanol) et chimie fine (tensio actifs).

➤ **Textiles**

Séparation des fibres par trempage et macération remplaçant les procédés chimiques.

➤ **Amidon**

Séparation facilitée de l'amidon et du gluten par réduction de la viscosité (**collins et al., 2005**)

V. Système à deux phases aqueuses (SDPA)

V.1. Généralités sur les systèmes à deux phases aqueuses

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**, utilisé pour la séparation et la purification du matériel biologique. La purification recouvre 70% du processus de traitement en aval des biomolécules (**Belter et Cussler, 1988**), d'où la nécessité de recourir à des méthodes simples et à faibles coût pour purifier ces biomolécules. Les méthodes conventionnelles de purification de biomolécules impliquent plusieurs étapes pour une unité d'opération, d'où le coût élevé de celles-ci et la perte, en général, d'une grande quantité de la molécule cible (**Albertsson, 1986**).

Une méthode alternative pour la séparation des biomolécules s'est avérée primordiale, d'où le recours au SDPA qui réduit le nombre des étapes de purification et ainsi réduit le coût total, ce qui permet son utilisation à grande échelle. Il a été appliqué dans plusieurs domaines des biotechnologies tels que : la récupération des protéines, des enzymes et dans la fermentation extractive (**Nitsawang et al., 2006 et Naganagouda et Mulimani, 2008**).

Le SDPA présente de nombreux avantages :

- ✓ Technique simple (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 selon l'affinité) (**Raja et al., 2011**).

Deux grands types de SDPA sont disponibles ; le système polymère / polymère (par exemple : polyéthylène glycol / Dextrane) et le système polymère / sel (par exemple : polyéthylène glycol / phosphate) et lorsque les concentrations limites sont dépassées, deux phases aqueuses non miscibles sont formées. Les concentrations limites dépendent du type des composants qui forment la phase, du pH, de la force ionique et de la température de la solution. Le polyéthylène glycol (PEG) est préférentiellement utilisé 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. En raison du coût élevé et de la viscosité élevée du système Polymère / polymère, il est préférable d'utiliser le système polymère / sel (**Cleland, 1992**).

VI. Facteurs influençant le partage des biomolécules dans un SDPA

1. Poids moléculaire du polymère

La masse moléculaire du polymère utilisé influence sur le partitionnement des biomolécules. Plus le poids moléculaire du polymère est élevé, plus la concentration du polymère requise pour la séparation des phases est faible. Avec l'augmentation de la concentration du polymère, il y aura une augmentation de la densité, de l'indice de réfraction et de la viscosité entre les phases.

Dans le système de PEG /Sel, le partitionnement des biomolécules est régi par l'effet de volume d'exclusion et d'effet de relargage (riche en sel). Les systèmes avec des concentrations ou des poids moléculaires élevés de polymère et les concentrations élevées en sel se traduiront par un partitionnement de biomolécules à l'interphase en raison de l'influence à la fois de l'effet du volume d'exclusion et de relargage du sel (**Babu et al., 2008**).

Dans les systèmes PEG /Sel, l'augmentation de K peut être en raison de:

- ✓ Si le poids moléculaire du PEG est faible, la tension inter-faciale est plus faible entre les deux phases (**Johansson, 1985**) ;

✓ Si la concentration en sel est élevée, la force ionique augmente dans la phase inférieure ce qui améliore la partition des biomolécules dans la phase supérieure (Johansson, 1985) ;

✓ Si la concentration de PEG est élevée, le nombre de motifs polymériques impliqués dans la séparation des biomolécules également augmente, le partitionnement des biomolécules sera dans la phase PEG en raison de l'interaction hydrophobe entre la biomolécule et le PEG (Tello *et al.*, 1994).

2. Présence de sels neutres

La présence de sels neutres tels que le NaCl n'affecte pas les données d'équilibre liquide-liquide du SDPA, mais la concentration élevée en sel (supérieure à 1 M) modifie le diagramme de phase (Albertsson, 1986).

La présence de NaCl dans le SDPA modifie le coefficient de partage en raison de la répartition différentielle des ions de sel entre les phases. Le sel ajouté contient des ions avec des hydrophobicités différentes ; les ions hydrophobes forcent la séparation de leurs contre-ions dans la phase la plus hydrophobe et vice-versa (Saravanan *et al.*, 2006).

L'effet de relargage force les biomolécules à se déplacer à partir de la phase riche en sel à la phase riche en PEG (Zhi *et al.*, 2004).

3. pH

Le pH du système affecte le partitionnement des biomolécules, car il peut modifier la charge du soluté ou exactement le rapport des molécules chargées. La charge nette des protéines dépend du pH : si le pH est supérieur à pI (négatif), si le pH est inférieur de pI (positif), si le pH est égal à pI (zéro). Plusieurs études ont rapporté qu'à pH élevé, la biomolécule chargée négativement préfère la phase supérieure et le coefficient de partage augmente (Asenjo *et al.*, 1994).

VII. Applications du SDPA

1. 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 du SDPA comme première étape pour

la récupération d'un produit à partir du bouillon de fermentation et puisque le produit est retiré en continu, son inhibition peut être évitée (**Raja et al., 2011**).

Chavez-Santoscoy et collaborateur en 2010 ont employé le SDPA pour la récupération in situ de la β -carotène et la lutéine de *Synechocystis sp.* Ils ont trouvé que le PEG /phosphate ne convenait pas pour la récupération de la β -carotène car le sel inhibe la croissance cellulaire, Par conséquent, en utilisant le système PEG /dextrane, il a été possible de récupérer 95,9% de la β -carotène en phase supérieure et 77,4% de la lutéine dans la phase inférieure.

2. Récupération des coproduits à partir des eaux usées

Les eaux usées provenant d'industrie : agroalimentaire, pharmaceutique, du cuir et laitière contiennent beaucoup des biomolécules récupérables.

Saravanan et collaborateur en 2006 ont étudié la récupération des protéines à partir des eaux usées des tanneries en utilisant un SDPA composé de PEG 4000 à 20,81% /MgSO₄ à 20,95%, / NaCl à 1 M, à pH 8, ils ont réussi à récupérer 82,68 % de protéines dans la phase supérieure.

La même équipe a étudié la récupération des protéines solubles en utilisant un SDPA composé de PEG /Sel du sulfate, les résultats ont montré que le PEG 6000 /sulfate de sodium était mieux que le PEG 6000 /sulfate d'ammonium. Dans ce cas, ils ont réussi à récupérer 92,75 % des protéines solubles à partir des eaux usées.

Rao et Nair en 2011 ont utilisé un SDPA composé de PEG /PAA pour récupérer les glycosaminoglycanes (GAG) à partir des eaux usées de tanneries. Ils ont constaté que le système de PEG 4000 /PAA (pH 8, 20° C) donnait un taux de récupération de 91,5 %.

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel

I.1. Appareillages et réactifs chimiques

L'appareillage et les réactifs chimiques utilisés au cours de notre travail expérimentale sont cités dans l'**annexe I**.

I.2. Matériel biologique

La souche utilisée dans ce travail est *Jonesia denitrificans* BN13, elle est isolée à partir des échantillons de sol collecté au niveau d'un jardin situé dans le village d'Ihaddaden Ouffela de la wilaya de Béjaïa, la souche est Gram positif sous forme de bâtonnet irrégulier et fin, mobile, aéroanaérobie facultative, oxydase (-) et catalase (+) et d'après les analyses phylogénétique, le séquençage du gène ARNr 16S a permis d'affilier la souche au genre *Jonesia* (Boucherba et al., 2011).

II. Méthodes

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 été ensemencées en surface avec 4 colonies de la souche *Jonesia denitrificans* BN13, les milieux sont par la suite incubés pendant 48 h à 37° C.

II.2. Préparation et ensemencement des milieux MM7 liquides

Les milieux MM7 liquides 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 24 h sur MM7 liquide, un inoculum de 4% (v/v) est utilisé pour l'ensemencement, les flacons sont incubés 48 h à 37° C. Les milieux de cultures sont centrifugés à 6000 g pendant 10 min afin de récupérer le surnageant qui contient les xylanases.

L'activité xylanasiqne et le dosage des protéines sont réalisés selon les techniques citées dans la partie « méthodes analytiques ».

II. 3. Spécificité des xylanases de *Jonesia denitrificans* BN13 vis – à-vis des différents substrats

Des solutions de substrats à base de xylane de bouleau, de xylane d'épeautre et d'avoine et de xylane de hêtre sont préparées à raison de 1 % (m/v) dans du tampon phosphate 50 Mm à pH 7 , les surnageants de culture font l'objet de tests d'activités xylanolytiques en changeant à chaque fois le substrat dans les conditions définies dans la partie « méthodes analytiques ».

II.4. Méthodes analytiques

II.4.1. Mesure de l'activité xylanolytique

L'activité xylanasiqye est déterminée en présence du xylane d'épeautre et d'avoine à raison de 1 % (m/v) préparé dans du tampon phosphate sodique (50 mM, pH 7). Le mélange réactionnel est composé de 100 µl du surnageant de culture ou de la phase considérée auquel sont ajoutés 900 µl de xylane d'épeautre et d'avoine 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) (Fig. 06).

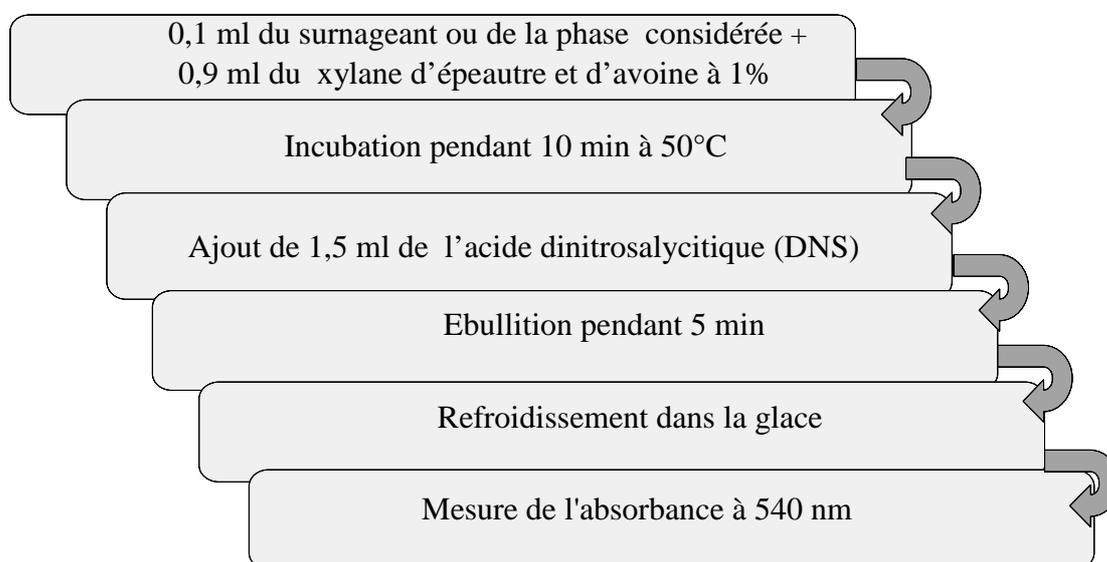


Fig. 03 : Test d'activité xylanasiqye et dosage des sucres réducteurs (Wang *et al.*, 2003 et Miller, 1959).

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 (**Fig. 07**).

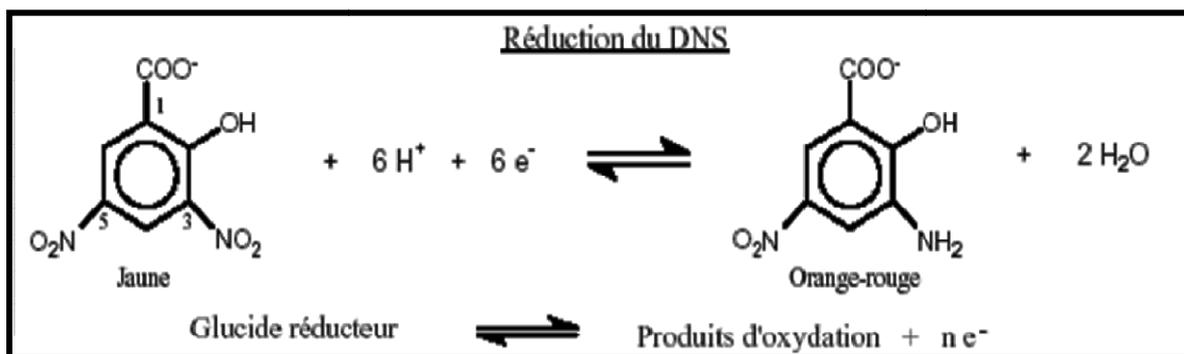


Fig. 04 : Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS (**Bailey et al., 1992**).

La réaction enzymatique est arrêtée par addition de 1,5 ml de 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 ou la phase du système à deux phases aqueuses (SDPA) à 50° C pendant 10 min, puis on ajoute 1,5 ml de DNS et 100 µl du surnageant de la culture ou la phase du (SDPA).

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 (**Tableau I**).

Tableau I : 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 xylanolytique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui produit une μ mole de sucres réducteurs (équivalent en xylose), par minute, dans un ml de surnageant de la culture ou de la phase du (SDPA) et dans les conditions expérimentales mentionnées ci-dessus. L'activité xylanolytique est calculée selon la relation donnée par **Bailey et collaborateur en 1992** :

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

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

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

D : facteur de dilution.

t : temps d'incubation (minutes).

II.4.2. Dosage des protéines

Les quantités de protéines sont estimées selon la méthode de **Bradford (1976)**, avec le réactif de Bradford (**annexe II**). C'est la technique de la macrométhode qui est choisi.

a- Macrométhode

Cette technique permet de doser des quantités de protéines comprises entre 0,2 et 1 mg /ml. Le dosage consiste, dans un premier temps, à ajouter 100 μ L d'échantillon à 5 ml 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 (**Tableau II**).

Gamme étalon :

Solution mère du BSA à 1 mg /ml

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

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

III. Préparation et optimisation du système à deux phases aqueuses (SDPA) à différents paramètres

III.1. Effet de la concentration du PEG 1000

Les systèmes SDPAs sont préparés à différentes concentrations de PEG 1000 à 8,33%, 10% , 12% , 14% et 16% (m /v), dans chaque système, du phosphate dipotassique K_2HPO_4 à 13,14% (m/v), du NaCl à 1,62% (m /v) et du milieu de cultureensemencé à 46 % sont ajoutés au mélange (Tableau III), la mixture est agitée et ajustée à pH 7, puis on la laisse décanter dans des ampoules à décanter pendant une nuit.

Tableau III : Préparation des SDPAs après variation de la concentration du PEG.

Préparation des SDPAs		
	Pourcentage (%)	Masse (g)
PEG1000 (m/v)	8,33	5
	10	6
	12	7,2
	14	8,4
	16	9,6
K_2HPO_4 (m/v)	13,14	8,75
NaCl (m/v)	1,62	1
Echantillon (ml)	(%) (m/v)	Volume (ml)
	46	30

III.2. Effet de la concentration du Chlorure de Sodium (NaCl)

Une fois la concentration du PEG 1000 optimisé, Les SDPAs sont préparés à différentes concentrations de NaCl : 2%, 3% et 4%, toujours en présence de K_2HPO_4 à 13,14% (m/v) et pourcentage et du milieu de cultureensemencé à 46 % (Tableau IV), le mélange est agité et ajusté à pH 7, puis laisser décanter dans des ampoules à décanter.

Tableau IV : Préparation des SDPAs après variation de la concentration du NaCl.

Préparation des SDPAs		
NaCl (m/v)	Pourcentage (%)	Masse (g)
	1,62	1
	2	1,23
	3	1,85
	4	2,46
PEG1000 (m/v)	8,33	5
K ₂ HPO ₄ (m/v)	13,14	8,75
Echantillon (ml)	(%) (m/v)	Volume (ml)
	46	30

III.3. Effet de la variation du pH

Les meilleurs concentrations de PEG 1000 et de NaCl sont préparées avec du K₂HPO₄ à 13,14% (m /v) ainsi qu'avec 46 % du milieu de cultureensemencé mais en ajustant le pH à 6 et 8 avec le monophosphate disodique (Na₂HPO₄).

Les activités enzymatiques ainsi que les protéines totales sont dosées à chaque fois dans les phases obtenues après décantation du mélange.

Le facteur de purification (FP), la récupération de l'enzyme (RE), le ratio de concentration (RC), le coefficient de Partage (K), le ratio volumique (R) et le rendement (Y) sont calculés.

IV. Mesure des différents paramètres (Li et al., 2011)

➤ Coefficient de partage (K)

Le coefficient de partage de la xylanase est dû à une différence de polarité entre deux phases liquide non miscible il est défini comme : $K = U_{sup} / U_{inf}$

U_{sup} c'est l'activité enzymatique dans la phase supérieure ; U_{inf} c'est l'activité enzymatique dans la phase inférieure.

➤ Le ratio volumique (R)

Le ratio volumique de phase est défini comme : $R = V_{sup} / V_{inf}$

V_{sup} est le volume de la phase supérieure ; V_{inf} est le volume de la phase inférieure.

➤ **Mesure de rendement (%)**

Le rendement de la xylanase en phase supérieure est défini comme :

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

K est le coefficient de partage ; **R** est le ratio volumique.

➤ **Facteur de purification (FP)**

C'est le rapport de l'activité spécifique après SPDA sur l'activité spécifique avant SPDA.

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

➤ **Récupération de l'enzyme (RE)**

C'est l'activité enzymatique de la phase considérée / l'activité enzymatique du surnageant de culture.

➤ **Ratio de concentration (RC)**

C'est le volume de l'échantillon (phase supérieure + phase inférieure) / le volume de la phase supérieure.

V. SDS-PAGE et zymogramme

Dans le but de voir le profil des protéines de la phase du SDPA considérée 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 BIORAD) (**Fig. 08**) utilisé est conçu pour les mini gels, il s'agit d'une cuve et d'une panoplie d'accessoires (peigne, plaques à encoche et un dispositif pour couler le gel).

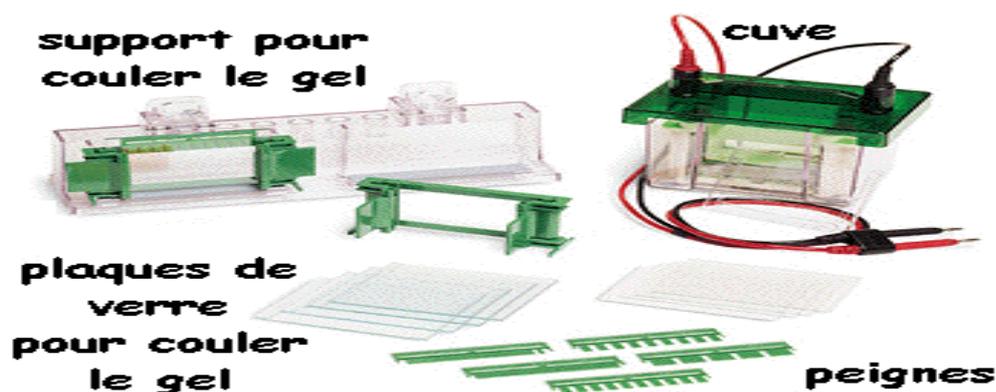


Fig. 05 : Cuve et accessoires du dispositif d'électrophorèse (Mini Protean II, BIORAD).

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 le zymogramme.

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

La réaction de polymérisation est initiée par addition de 100 μ l de persulfate d'ammonium à 15% puis accélérée par ajout de 20 μ 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 1 ml 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**).

Après fixation des deux plaques dans la cuve, on verse le tampon de migration dans la chambre intérieure et extérieure.

L'échantillon est préparé de la manière suivante : 75 μ l de la phase considérée est mélangée avec 25 μ L du tampon d'échantillon (**Annexe II**) suivi d'un chauffage à 100° C pendant 5 min.

Les marqueurs 20 μ l (BIO RAD) et les dépôts sont de l'ordre de 6,8 μ g.

Le courant électrique est véhiculé par le tampon d'électrophorèse, la migration se fait à 80 (V) dans le gel de concentration et 120 (V) dans le gel de séparation,

45 milli ampère (mA) pendant 2 h jusqu' à ce que le bleu de bromophénol soit à 1cm 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 Coomassie 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.

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 50 mM 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 1 M 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**).

- **Etudes statistique**

Les graphes et histogrammes sont tracés selon le logiciel Exel.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Repiquage de la souche *Jonesia denitrificans* BN13

La formation des zones claires autour des colonies (**Fig. 06**), se traduit par la dégradation du xylane de bouleau par les xylanases produites après 48 h d'incubation de la souche *Jonesia denitrificans* BN13 dans le milieu MM7 à 37°C, ce qui confirme le développement de la souche et la production de xylanases extracellulaires.

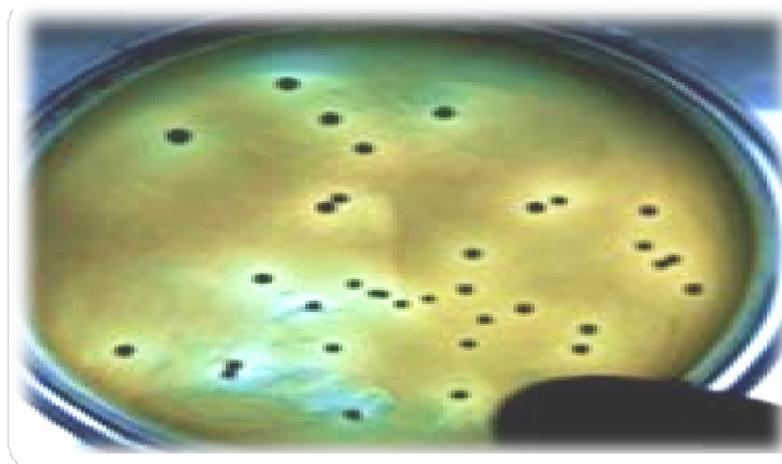


Fig. 06 : Colonies de *Jonesia denitrificans* BN13 entourées de zones d'hydrolyse du xylane de bouleau (Boucherba, 2011).

II. Résultats des méthodes analytiques

L'activité xylanolytique ainsi que la quantification des protéines sont calculées à partir des courbes d'étalonnages (**Fig. 07**, et **Fig. 08**) illustrées ci-dessous. Ces courbes ont permis de calculer la concentration du xylose dans les mélanges réactionnels et par conséquent l'activité xylanolytique ainsi que la concentration des protéines (**Annexe III**); à partir des résultats obtenus, l'activité spécifique est calculée.

III. Production de xylanases de *Jonesia denitrificans* BN13

Après préparation des milieux liquides et ensemencement de la souche sur ces derniers, une incubation de 48 h à 37° C sous agitation est réalisée, puis les milieux ensemencés sont centrifugés, les surnageants obtenus font l'objet d'un test d'activité xylanasiq, ce qui nous a permis d'obtenir une activité xylanasiq de 0,23 U/ml ainsi qu'une activité spécifique de 0,5 U/mg.

D'après les travaux de **Boucherba et collaborateur en 2011**, une activité xylanasiq de 10,80 U/ml est obtenue au bout de 35 h à 37° C dans un fermenteur de 4 L sous des conditions optimisées, soit une agitation de 100 rpm et une aération de 2 vvm.

Cependant, dans le cas de notre étude, il s'agit d'une fermentation en erlen sous agitation en mouvement réciproque dans un bain Marie agitateur, alors que même en utilisant une fermentation en erlen, l'idéal est d'utiliser des shakers. Selon toujours l'étude de **Boucherba en 2011**, l'activité xylanase est de 2,5 U/ml lorsque des cultures en erlen sous agitation rotatoire (shakers) sont mises en œuvre.

Le **tableau V** indique la production de quelques xylanases dans des fermentations en milieu liquide.

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

Microorganisme	Substrat	Conditions de Culture	Activités (U/ml)	Références
<i>Jonesia Denitrificans BN13</i>	Xylane de bouleau, 7g /l	Milieu MM7 liquide, 37°C, pH 7, 2 jours, (culture en erlen) avec agitation réciproque	0,23	Travail actuel
<i>Jonesia denitrificans BN13</i>	Xylane de bouleau, 7g/l	Milieu MM7 liquide, 37°C, pH 7, 2 jours (culture en erlen) avec agitation rotative	2,5	Boucherba, 2011
<i>Jonesia denitrificans BN13</i>	Xylane de bouleau, 7g/l	fermenteur de 4l, 37 °C, pH 7, 2 jours	10,80	Boucherba et al., 2011
<i>Streptomyces sp. QG113</i>	Xylane de bouleau, 10g/l	Erlen sous agitation, 37°C, pH 8, 5 jours	7,50	Beg et al., 2000
<i>Streptomyces sp. Ab106</i>	Xylane, 10g/l	Fermenteur de 4l, 55 °C, pH 7,5, 5 jours	8	Techapun et al., 2002
<i>Streptomyces malaysiensis</i>	Xylane de bouleau, 10g/l	Erlen sous agitation, 30 °C, pH 7, 6 jours	11,90	Nascimento et al., 2002
<i>Bacillus coagulans</i>	Xylane de bouleau, 10g/l	Erlen sous agitation, 45 °C, pH 7, 24h	24,20	Choudhury et al., 2006
<i>Bacillus subtilis</i>	Xylane de bouleau, 10g/l	Fermenteur de 3l, 55°C, pH 9, 48h	128	Annamalai et al., 2009
<i>Aspergillus foetidus MTCC 4898</i>	Xylane de bouleau, 10g/l	Erlen sous agitation, 30 °C, pH 5, 3 jours	210	Shah et Madamwar, 2005
<i>Penicillium Kloeckeri NRRL 1017</i>	Xylane de bouleau, 10g/l	Erlen sous agitation, 26-28° C, 5 jours	12,20	Farrel et al., 1996

Les xylanases produites montrent une activité de 0, 23 U/ml qui est très faible par rapport aux activités xylanases des autres actinomycètes (**Nascimento et al., 2002 et Wang et al., 2003**), à cause des conditions de culture qu'on a évoqué et aussi parce que la

concentration du substrat utilisé à savoir le xylane de bouleau est faible (7 g/l) par rapport aux autres cultures qui utilisent des concentration de 10 g/l. Cependant, **Nascimento et collaborateurs en 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 collaborateurs en 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 **10 g/l** (55° C, pH 7,5).

Les activités des xylanases des cultures fongiques (**Farrel et al., 1996 ; Gupta et al., 2009 et Shah et al., 1991**) sont généralement plus élevées que celles de *Jonesia denitrificans* BN13.

Cependant, l'activité xylanasiqme mesurée dans notre étude reste inférieure à celle obtenue par **Geweely et Neveen en 2011 (0,39 U/ml)**. Il faut préciser que cette activité a été rapportée pour *Aspergillus terreus* cultivée dans un milieu de culture de **10 g/l** de xylane de bouleau. Il est néanmoins difficile de comparer l'activité xylanasiqme obtenue dans notre travail avec d'autres travaux déjà cités. Ceci est dû à la variété des milieux utilisés et les différentes méthodes d'expression des activités xylanasiqme, à savoir :

- Les préparations de xylane qui sont différentes les unes des autres selon le type et le degré de substitutions qui influence l'activité xylanasiqme mesurée.
- Le test d'activité, notamment le dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS (acide dinitrosalicylique) donne des activités apparentes faibles par rapport à la méthode de Somogyi-Nelson (**Royer et Nakas, 1989**).
- Si on compare ces résultats avec ceux obtenus par **Boucherba et collaborateur (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 les éventuelles mutations causées par les repiquages successifs qui induisent la diminution de l'activité xylanasiqme et du rendement de notre souche.

I.V. Spécificité des xylanases vis-à-vis des différents substrats

Les résultats de la spécificité des xylanases vis-à-vis du xylane de bouleau, du xylane d'épeautre et d'avoine et le xylane de hêtre sont représentés dans la figure ci-dessous.

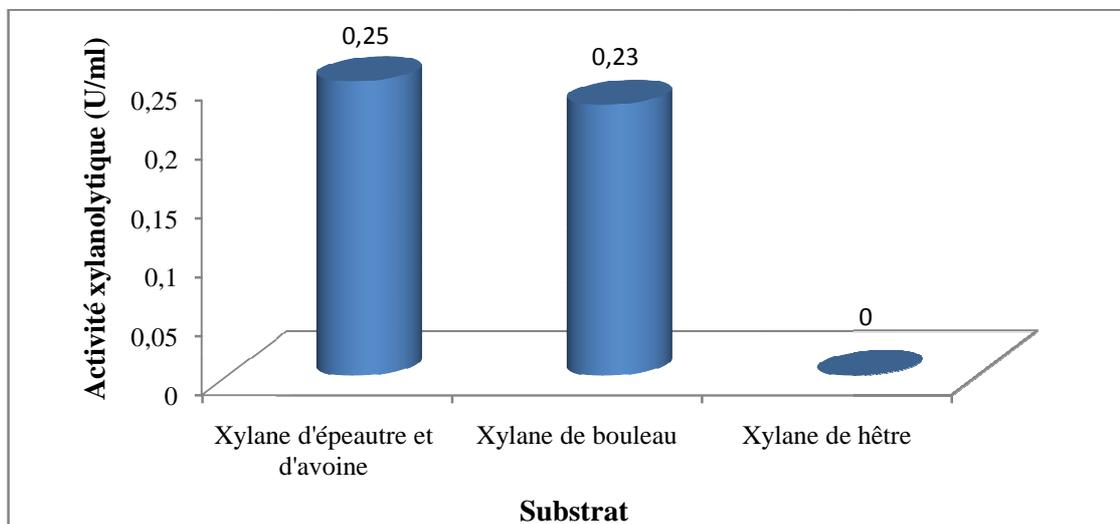


Fig. 09 : Histogramme représentant la spécificité des xylanases vis-à-vis de 03 substrats : le xylane d'épeautre et d'avoine, le xylane de bouleau et le xylane de hêtre.

Parmi les trois substrats testés, les xylanases de *Jonesia denitrificans* BN13 ont dégradé seulement le xylane de bouleau et le xylane d'épeautre et d'avoine, mais avec une activité légèrement élevée pour le xylane d'épeautre et d'avoine (0,25 U/ml) en comparaison avec le xylane de bouleau (0,23 U/ml). Aucune activité n'a été détectée vis-à-vis du xylane de hêtre, ce qui est dû au fait que le substrat contient des groupements latéraux qui empêchent l'accès de la xylanase aux liaisons β (1-4) de la chaîne principale du xylane (Boucherba, 2011).

V. Préparation et optimisation du système à deux phases aqueuses (SDPA) à différents paramètres

V.1. Effet de la concentration du PEG 1000

Après une nuit de décantation du mélange [PEG 1000 / K_2HPO_4 / NaCl / Milieu Minimal 7 Ensemencé (MM7E)] à pH 7, deux phases sont obtenues : la phase supérieure (PS) et la phase inférieure (PI), comme il est illustré dans la figure 13, qui montre un exemple du système SDPA où la concentration du PEG est à 14 %.

On remarque qu'il n'y a pas de formation d'interphase dans les différents systèmes.

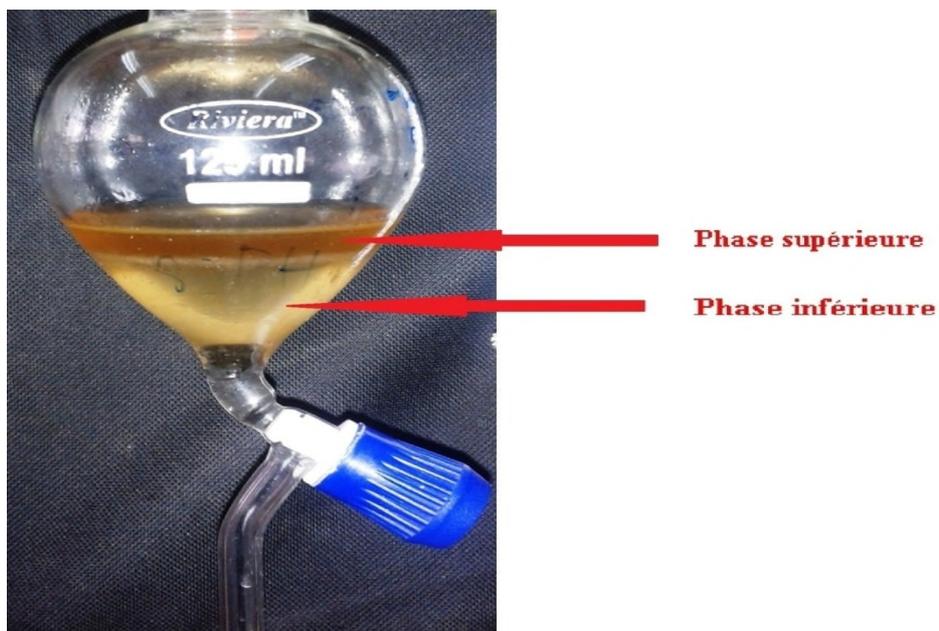


Fig. 10 : Exemple d'un SDPA (PEG 1000 à 46,60 % (m /v) / K_2HPO_4 à 13,14 % (m /v) / NaCl à 1,62 % (m / v) / 46% de MM7E à pH 7), après séparation des phases.

Chaque SDPA est nommé différemment afin de faciliter la lecture des résultats :

Système (A) : (PEG 1000 à 8,33% (m/v)/ K_2HPO_4 à 13,14% (m /v)/ NaCl à 1,62% (m /v) à pH 7) ;

Système (B) : (PEG 1000 à 10% (m/v)/ K_2HPO_4 à 13,14% (m /v)/ NaCl à 1,62% (m/ v) à pH 7) ;

Système (C) : (PEG 1000 à 12% (m/v)/ K_2HPO_4 à 13,14% (m/v)/ NaCl à 1,62% (m/v) à pH 7) ;

Système (D) : (PEG 1000 à 14% (m/v)/ K_2HPO_4 à 13,14% (m /v)/ NaCl à 1,62% (m/v) à pH 7) ;

Système (E) : (PEG 1000 à 16% (m/v)/ K_2HPO_4 à 13,14% (m/v)/ NaCl à 1,62% (m /v) à pH 7).

Les phases supérieures et inférieures des systèmes (A), (B), (C), (D) et (E) sont récupérées et leurs volumes respectifs sont mesurés, le **Tableau V** indique ces volumes.

Tableau VI : Volumes des phases des systèmes après variation de la concentration de PEG 1000.

Système SDPA	Volume de la Phase Inférieure (ml)	Volume de la Phase Supérieure (ml)	Facteur de Réduction (FR)
(A)	36	12	3
(B)	25	14,5	1,72
(C)	33	17,5	1,88
(D)	31	19	1,63
(E)	28	22	1,27

Dans le système (A), le volume de la phase supérieur est réduit par rapport à la phase inférieure avec un facteur de 3.

Dans le système (E), le volume de la phase supérieure est réduit avec un facteur de 1,27 ce qui prouve que ce système est plus concentré probablement en terme de xylanase que les autres systèmes.

Le tableau ci-dessous donne l'ensemble des différents paramètres mesurés.

Tableau VII : Récapitulatif des résultats obtenus de SDPA après variation de la concentration du PEG 1000.

SDPA	Phases	Activité de la xylanase en U/ml	Activité spécifique en U/mg	FP	RE	RC	K	R	Y(%)
(A)	PI	0,01	0,02	0,024	0,04	4	86,66	0,33	96,62
	PS	0,82	2,41	2,90	3,28				
(B)	PI	0,06	0,15	0,18	0,24	2,72	8,10	0,58	88,57
	PS	0,72	2	2,40	2,88				
(C)	PI	0,04	0,12	0,14	0,16	2,88	10,58	0,53	84,91
	PS	0,43	1,34	1,61	1,72				
(D)	PI	0,01	0,02	0,024	0,04	2,63	52,41	0,58	96,82
	PS	0,46	1,24	1,49	1,84				
(E)	PI	0,01	0,02	0,024	0,04	2,27	31,11	0,78	96,04
	PS	0,28	0,73	0,87	1,12				

Système (A) : (PEG 1000 à 8,33 % (m/v) / K₂HPO₄ à 13,14 % (m/v) / NaCl à 1,62 % (m/v) à pH 7) ;

Système (B) : (PEG 1000 à 10 % (m/v) / K₂HPO₄ à 13,14 % (m/v) / NaCl à 1,62 % (m/v) à pH 7) ;

Système (C) : (PEG 1000 à 12 % (m/v) / K₂HPO₄ à 13,14 % (m/v) / NaCl à 1,62 % (m/v) à pH 7) ;

Système (D) : (PEG 1000 à 14 % (m/v) / K₂HPO₄ à 13,14 % (m/v) / NaCl à 1,62 % (m/v) à pH 7) ;

Système (E) : (PEG 1000 à 16 % (m/v) / K₂HPO₄ à 13,14 % (m/v) / NaCl à 1,62 % (m/v) à pH 7).

FP : Facteur de purification ; **RE** : Récupération de l'enzyme ; **RC** : Ratio de concentration ; **K** : Coefficient De Partage ; **R** : Ratio Volumique ; **Y(%)** : Rendement.

Selon le tableau VI, l'activité xylanolytique est toujours élevée au niveau de la phase supérieure et dans les phases inférieures, elle est presque indétectable.

D'après les résultats du tableau, on remarque que la meilleure concentration du PEG est de 8,33 % (m/v), on obtient l'activité la plus importante de tous les systèmes, elle est de 0,82 U/ml (l'activité spécifique est de 2,41 U /mg), il en est de même pour les autres paramètres, le coefficient de partage est estimé à 86,66 et le rendement est de 96,62 %.

C'est pour cette raison que nous avons choisi de travailler avec une concentration de PEG de 8,33 %.

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 que la phase inférieure (**Walter et Johansson, 1994**).

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**).

Les xylanases de *Jonesia denitrificans* BN13 se retrouvent dans la phase supérieure ; ce qui concorde avec les travaux de **Walter et Johanssons en 1994** et aussi les travaux de **Asenjo et collaborateurs en 1994**.

Les résultats des travaux de **Babu et collaborateurs en 2008** ont montré qu'une augmentation de la concentration du PEG 1000 de 12 à 18 % (m/m) amène à une augmentation de la répartition de la polyphénoloxydase dans la phase inférieure.

La figure suivante montre l'effet de la concentration du PEG sur l'activité spécifique.

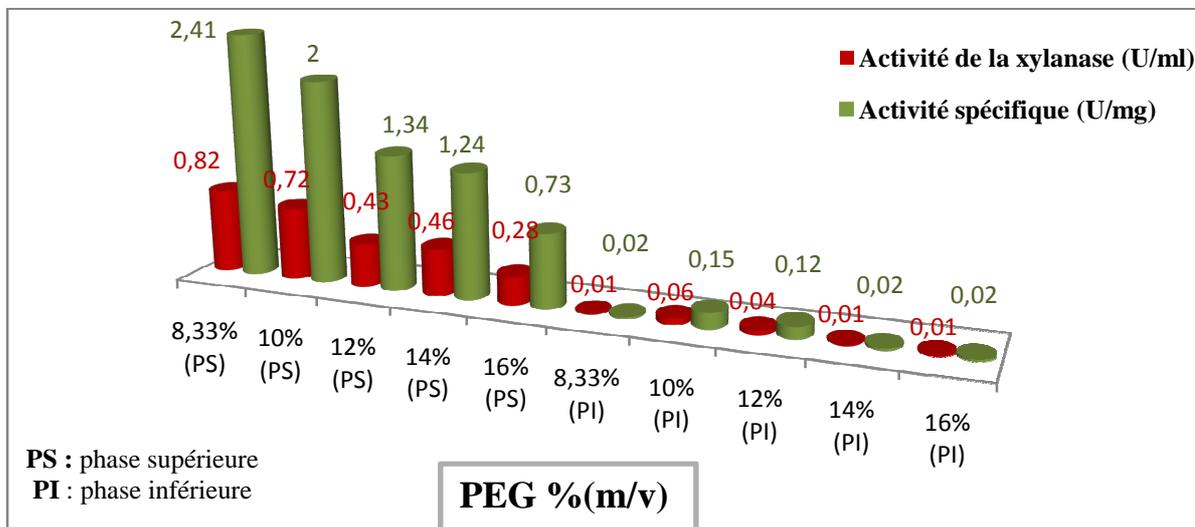


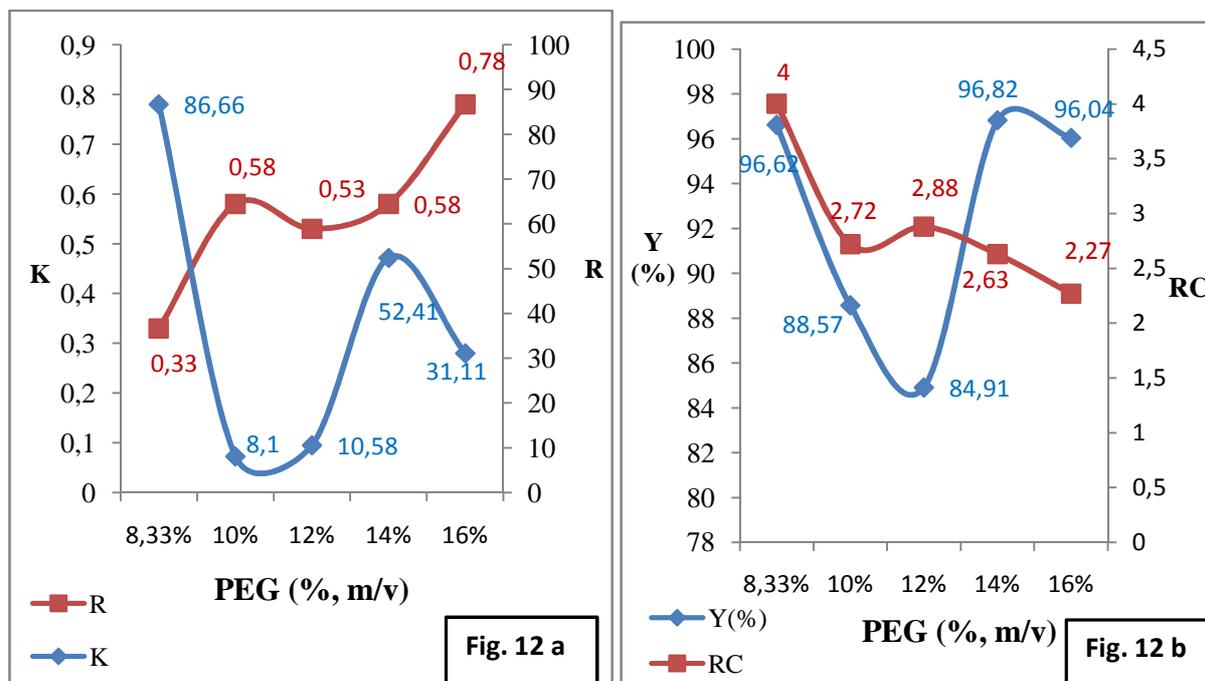
Fig. 11 : Effet de la concentration du PEG sur l'activité xylanolytique et sur l'activité spécifique.

L'activité spécifique est aussi un critère permettant le choix du meilleur système pour l'extraction et la purification des xylanases. D'après tous les résultats obtenus, le système (A) est considéré comme étant le meilleur.

L'activité spécifique (A_{SX}) nous informe sur la pureté des xylanases. Les activités xylanolytiques dans les phases inférieures ont des valeurs faibles par rapport aux phases supérieures, il en est de même pour les activités spécifiques dans les phases inférieures. Dans les phases supérieures, l'activité spécifique diminue avec l'augmentation de la concentration du PEG, elle est proportionnelle à l'activité des xylanases de *Jonesia denitrificans*.

Dans le système A, le facteur de purification est le plus élevé (2,90) en comparaison avec le protocole de purification des xylanases de *Jonesia denitrificans* BN 13, au niveau de l'étape d'ultrafiltration, d'ailleurs il est de 2 (**Boucherba et al., 2014**) ce qui confirme que le système (A) peut être utilisé comme une première étape de purification.

La **Fig. 12** montre l'effet de la concentration du PEG 1000 sur le coefficient de partage et le ratio volumique et sur le rendement et le ratio de concentration.



Y (%) : Rendement ; RC : Ratio de concentration ; R : Ratio Volumique ; K : Coefficient De Partage.

Fig. 12 : Effet de la concentration du PEG 1000 sur le coefficient de partage et le ratio volumique (Fig. 12 a), le rendement et le ratio de concentration (Fig. 12 b).

Dans les SDPAs, le meilleur coefficient de partage est de **86,66** au niveau du système (A), l'augmentation de la concentration du PEG 1000 conduit relativement à une diminution des coefficients de partage, comme montré dans la (Fig. 15 a), Cela concorde avec les travaux rapporté par **Draginja et collaborateur en 2008**. Cependant on remarque une augmentation du K à une concentration de PEG 1000 à 14 %.

D'après la (fig. 12 a), le ratio volumique augmente de 0,33 à 0,78, ce résultat collabore avec celui retrouvé par l'équipe de **Yang en 2008**, effectivement en augmentant la concentration de PEG 1000, le ratio volumique (R) augmente parallèlement dans un SDPA.

On remarque dans la (Fig. 12 b) que le ratio de concentration (RC) diminue de 4 jusqu'à 2,27 avec l'augmentation de la concentration du PEG 1000, par contre, le rendement de purification (Y) n'est pas stable dans le système (A), il atteint 96,62 %. Alors que dans le système (E) il est de 96,82 %.

Les résultats obtenus dans le système (A) indiquent que 96,62 % des xylanases sont retrouvées dans la phase supérieure, 3 fois plus purifiées et 4 fois plus concentrées.

Par contre, les travaux de **Yasinok et al., 2010** sur l'extraction de xylanases produites par *Bacillus pumilus* qui a été réalisée dans un système composé de : PEG 1000 à 3,5 % / K_2HPO_4 à 14% / KI à 9 %, 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 sont essentiellement collectées à l'interphase ou dans la phase inférieure.

La **Fig. 13** représente l'effet de la concentration du PEG 1000 sur le facteur de la purification et la récupération de l'enzyme.

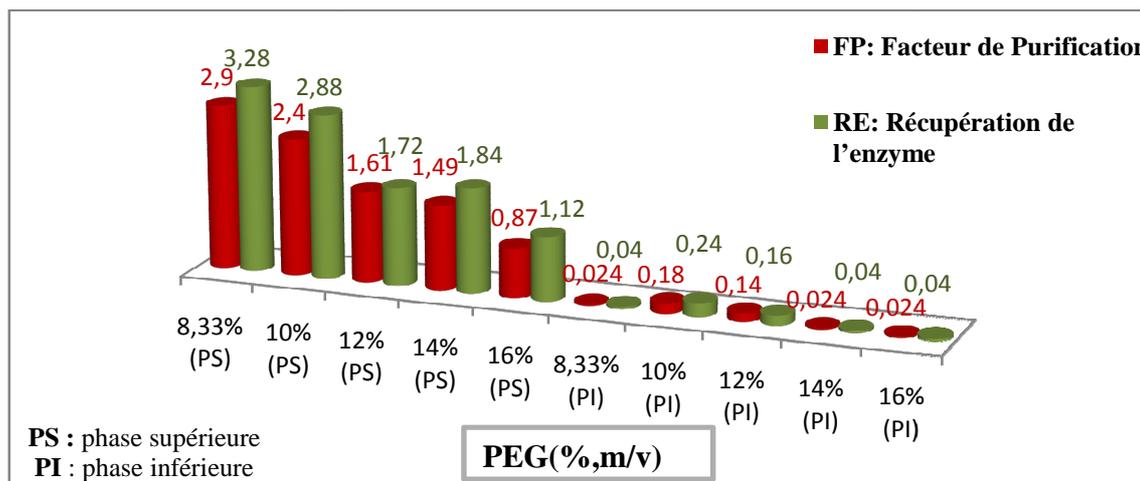


Fig. 13 : Influence de la concentration du PEG sur le facteur de purification et la récupération d'enzymes.

Dans toutes les phases des systèmes, les valeurs du FP et le RE diminuent avec l'augmentation de la concentration du PEG ; pour le système A, les valeurs de FP et de RE de la phase supérieure sont respectivement de 2,90 et 3,28, ils sont élevés par rapport à celles de la phase inférieure qui sont respectivement de 0,024 et 0,24 et par rapport aux autres systèmes.

V.2. Effet de la concentration du NaCl

Chaque SDPA a été nommé différemment afin de faciliter la lecture des résultats :

Système (A) : (PEG 1000 à 8,33 % (m/v) / K_2HPO_4 à 13,14 % (m/v) / NaCl à 1,62 % (m/v) à pH 7 ;

Système (F) : (PEG 1000 à 8,33 % (m/v) / K_2HPO_4 à 13,14 % (m/v) / NaCl à 2% (m/v) à pH 7 ;

Système (G) : (PEG 1000 à 8,33 % (m/v) / K_2HPO_4 à 13,14 % (m/v) / NaCl à 3% (m/v) à pH 7 ;

Système (H) : (PEG 1000 à 8,33 % (m/v) / K_2HPO_4 à 13,14 % (m/v) / NaCl à 4% (m/v) à pH 7.

Les phases supérieures et inférieures des systèmes (A), (F), (G) et (H) sont récupérées et leurs volumes respectifs sont mesurés, le **Tableau VIII** indique ces volumes et le système A est considéré comme référence.

Tableau VIII : Volumes des phases des systèmes après variation de la concentration du NaCl.

Système SDPA	Volume de la Phase Inferieure (ml)	Volume de la Phase Supérieure (ml)	Facteur de réduction (FR)
(A)	36	12	3
(F)	25	16	1,65
(G)	30	19	1,57
(H)	26	17	1,52

Dans le système (A), le volume de la phase supérieur est réduit d'un facteur de 3, par contre les autres systèmes sont réduits d'un facteur inférieur à celui du système (A) qui sont respectivement de 1,65- 1,57 et 1,52.

Avec l'augmentation de la concentration du sel de 8 à 18%, le volume de la phase supérieure diminue de 13 à 3 ml (**Kulkarni et al., 1999**).

Le tableau ci-dessous donne l'ensemble des différents paramètres mesurés.

Tableau IX : Récapitulatif des résultats de SDPA obtenus après optimisation de la concentration du NaCl.

SDPA	Phases	Activité de la xylanase en U/ml	Activité spécifique en U/mg	FP	RE	RC	K	R	Y(%)
(A)	PI	0,01	0,02	0,024	0,04	4	86,66	0,33	96,62
	PS	0,82	2,41	2,90	3,28				
(F)	PI	0,01	0,02	0,024	0,04	2,56	30	0,64	95,05
	PS	0,27	0,69	0,83	1,08				
(G)	PI	0,01	0,012	0,01	0,04	2,57	15,55	0,63	90,77
	PS	0,14	0,31	0,37	0,56				
(H)	PI	0,03	0,06	0,07	0,12	2,52	5,92	0,66	79,46
	PS	0,16	0,39	0,46	0,64				

Système (A) : (PEG 1000 à 8,33 % (m/v) / K_2HPO_4 à 13,14 % (m/v) / NaCl à 1,62 % (m/v) à pH7 ;

Système (F) : (PEG 1000 à 8,33 % (m/v) / K_2HPO_4 à 13,14 % (m/v) / NaCl à 2 % (m/v) à pH 7 ;

Système (G) : (PEG 1000 à 8,33 % (m/v) / K_2HPO_4 à 13,14 % (m/v) / NaCl à 3 % (m/v) à pH 7 ;

Système (H) : (PEG 1000 à 8,33 % (m/v) / K_2HPO_4 à 13,14 % (m/v) / NaCl à 4 % (m/v) à pH 7.

FP : Facteur de purification ; **RE** : Récupération de l'enzyme ; **RC** : Ratio de concentration ; **K** : Coefficient De Partage ; **R** : Ratio Volumique ; **Y(%)** : Rendement.

Dans la présente étude, en variant la concentration du NaCl de 1,62 à 4% (m/v), on a trouvé une répartition des xylanases dans la phase supérieure. Alors que d'après **Tjerneld et al., 1986**, la répartition des xylanases se fait dans la phase inférieure lorsqu'on augmente la concentration du NaCl.

En augmentant la concentration du NaCl de 1,62 à 4 % (m/v), le rendement diminue, ce qui signifie que la meilleure concentration de NaCl est de 1,62 %.

Le NaCl à **1,62%**, est utilisé en combinaison avec le PEG 1000 à 8,33 % et KH_2PO_4 à 13,14 % à pH 7 est le meilleur de système de répartition des xylanases.

La **Fig. 14** rapporte l'effet de la concentration du NaCl sur l'activité xylanasiq et l'activité spécifique.

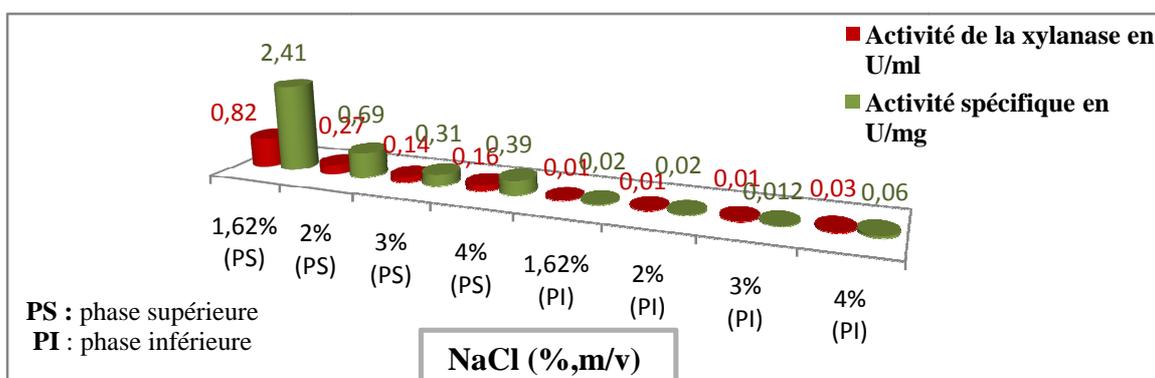


Fig. 14 : Effet de la concentration du NaCl (m/v) sur l'activité xylanolytique et sur l'activité spécifique.

D'après les activités xylanasiques obtenues (**Fig. 14**), on remarque que les xylanases se répartissent dans les phases supérieures à pH 7 dans tous les SDPA réalisés, alors qu'une activité presque indétectable est observée dans les phases inférieures.

A une concentration de NaCl à 1,62%, on remarque que dans le système (A) a la meilleure activité spécifique 2,41 U /mg est obtenue, cependant dans le système (G),

l'activité spécifique était de 0,31 U/mg qui est la plus faible a une concentration de NaCl à 3%.

La Fig. 15 illustre l'effet de variation de la concentration du NaCl sur le facteur de purification et la récupération de l'enzyme.

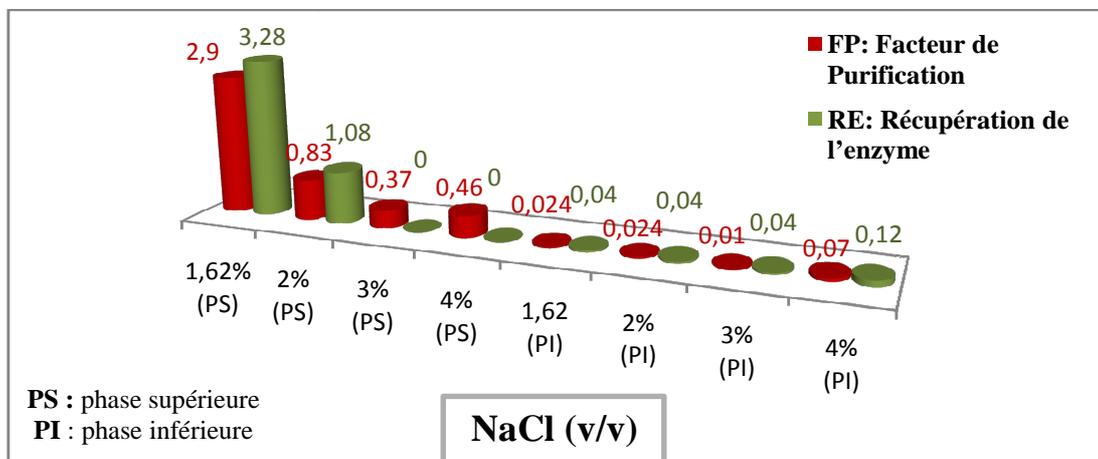


Fig. 15 : Influence de la concentration du NaCl (m/v) sur le facteur de purification et la récupération d'enzymes.

Dans toutes les phases des systèmes (A), (F), (G) et (H), les valeurs du FP et le RE diminue avec l'augmentation de la concentration du NaCl ; pour le système A, les valeurs de FP et de RE de la phase supérieure sont respectivement de 2,90 et 3,28.

D'après les travaux de Kulkarni et collaborateurs en 1999, le facteur de purification augmente de 1,05 à 1,20 avec l'augmentation de la concentration du NaCl de 8 à 12 %, puis il diminue jusqu'à 1,075 pour une concentration de NaCl de 18 %.

La Fig. 16 indique l'effet de concentration du NaCl sur le rendement et le ratio de la concentration et sur le ratio volumique et le coefficient du partage.

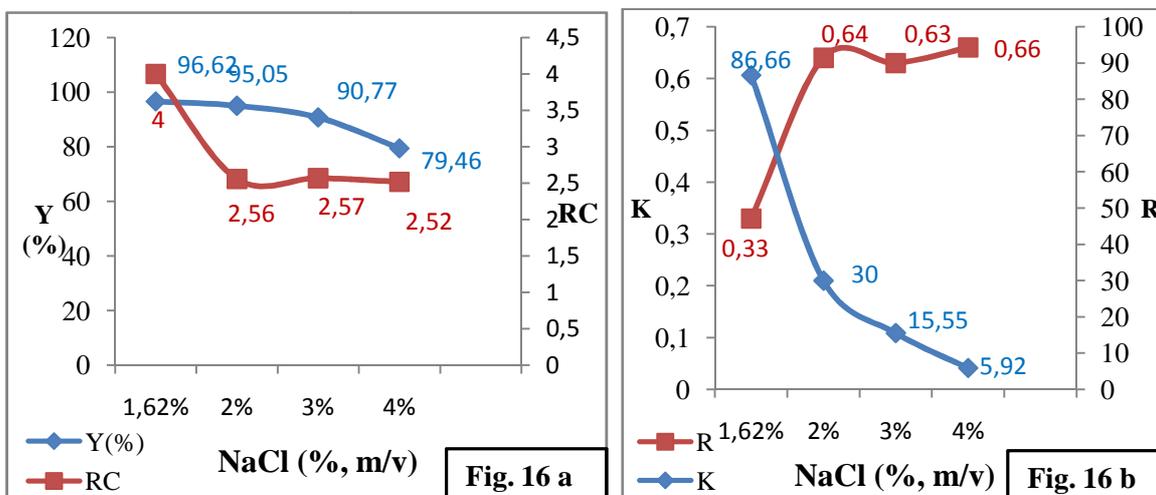


Fig. 16 : Influence de la concentration du NaCl (m/v) sur le rendement et le ratio de la concentration (Fig. 19 b), le ratio volumique et le coefficient du partage (Fig. 19 b).

Les conditions les plus favorables pour la distribution des xylanases de *Jonesia denitrificans* BN13 dans la phase supérieure sont atteintes dans un système contenant 8,33 % de PEG 1000 et NaCl à 1,62 %, où (RC) et (Y) sont respectivement de 4 et 96,62 %, comme l'indique la (**Fig. 16 a**).

On remarque dans la (**Fig. 16 b**), que le coefficient de partage (**K**) diminue de 86,66 à 15,55 avec la variation de NaCl, par contre, le ratio volumique (**R**) augmente progressivement de 0,33 à 0,66.

D'après **S. Y. Dong et collaborateurs en 2012** : l'effet de la concentration de NaCl sur l'extraction est important, car le rendement d'extraction augmente avec l'élévation de la concentration de NaCl.

V.3. Effet du pH

Chaque SDPA a été nommé différemment afin de faciliter la lecture des résultats

Système (I) : (PEG 1000 à 8,33 % (m/v) / K₂HPO₄ à 13,14 % (m/v) /NaCl à 1,62 % (m/v) à pH 6.

Système (A) : (PEG 1000 à 8,33 % (m/v) / K₂HPO₄ à 13,14 % (m/v)/NaCl à 1,62 % (m/v) à pH 7.

Système (J) : (PEG 1000 à 8,33 % (m/v) / K₂HPO₄ à 13,14 % (m/v) /NaCl à 1,62 % (m/v) à pH 8.

Les volumes des phases obtenus après décantation des systèmes (I), (A) et (J) sont donnés dans le tableau ci-dessous.

Tableau X : Volumes des phases des systèmes après variation du pH.

Système SDPA	Volume de la Phase Inferieur (ml)	Volume de la Phase Supérieure (ml)	Facteur de Réduction (FR)
(I)	46,5	17,5	2,65
(A)	36	12	3
(J)	20	19	1,05

Le volume de la phase supérieure du système (**J**) est réduit avec un facteur de **1,05**, alors que le système (**A**) est réduit d'un facteur de **3** donc c'est la phase la mieux concentré.

D'après **Yang et collaborateurs en 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.

Le tableau ci-dessous donne l'ensemble des résultats d'optimisation du pH.

Tableau XI : Récapitulatif des résultats obtenus après optimisation du pH.

SDPA	Phases	Activité de la xylanase en U/ml	Activité spécifique en U/mg	FP	RE	RC	K	R	Y(%)
(I)	PI	0,01	0,03	0,03	0,04	3,65	81,11	0,36	96,77
	PS	0,73	2,14	2,57	2,92				
(A)	PI	0,01	0,02	0,024	0,04	4	86,66	0,33	96,62
	PS	0,82	2,41	2,90	3,28				
(J)	PI	0,016	0,04	0,04	0,064	2,05	15,14	0,95	93,51
	PS	0,24	0,5	0,60	0,96				

Système (I) : (PEG 1000 à 8,33 % (m/v) / K₂HPO₄ à 13,14 % (m/v) /NaCl à 1,62 % (m/v) à pH 6.

Système (A) : (PEG 1000 à 8,33 % (m/v) / K₂HPO₄ à 13,14 % (m/v)/NaCl à 1,62 % (m/v) à pH 7.

Système (J) : (PEG 1000 à 8,33 % (m/v) / K₂HPO₄ à 13,14 % (m/v) /NaCl à 1,62 % (m/v) à pH 8.

FP : Facteur de purification ; **RE** : Récupération de l'enzyme ; **RC** : Ratio de concentration ; **K** : Coefficient de Partage ; **R** : Ratio Volumique ; **Y(%)** : Rendement.

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 presque indétectable est observée dans les phases inférieures, ceci est expliqué par les résultats des coefficients de partage comme l'indique le **Tableau IX**.

Selon les résultats du tableau, un bon partitionnement des xylanases est obtenu à pH 7 dans le système (A).

Au niveau du système (J) à **pH 8**, il y'a une perte d'activité xylanolytique (**0,24 U/ml**) dans la phase supérieure, on peut supposer que le pH de la majorité des xylanases est égale à leur point isoélectrique, donc elles ne sont pas actives.

La Fig. 17 rapporte l'effet du pH sur l'activité xylanolytique et sur l'activité spécifique.

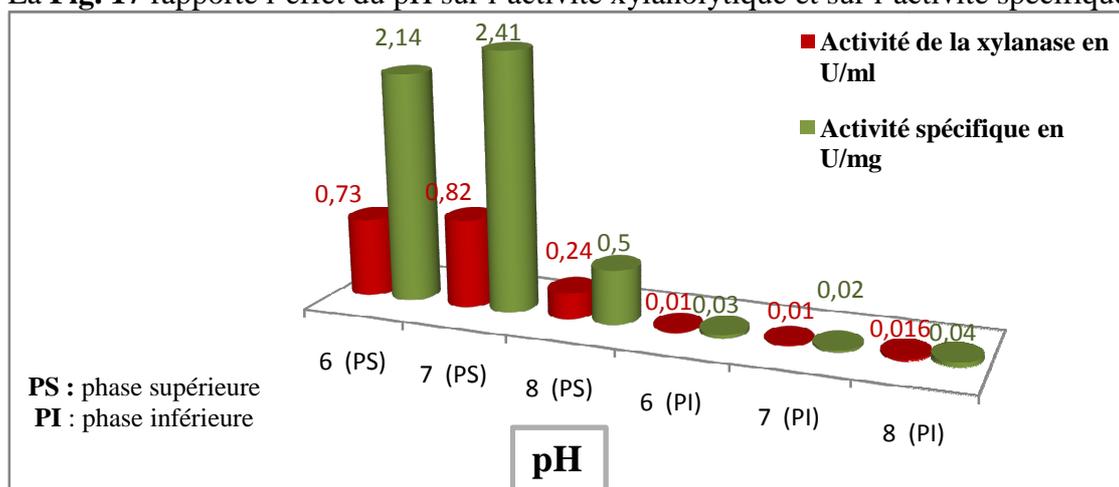
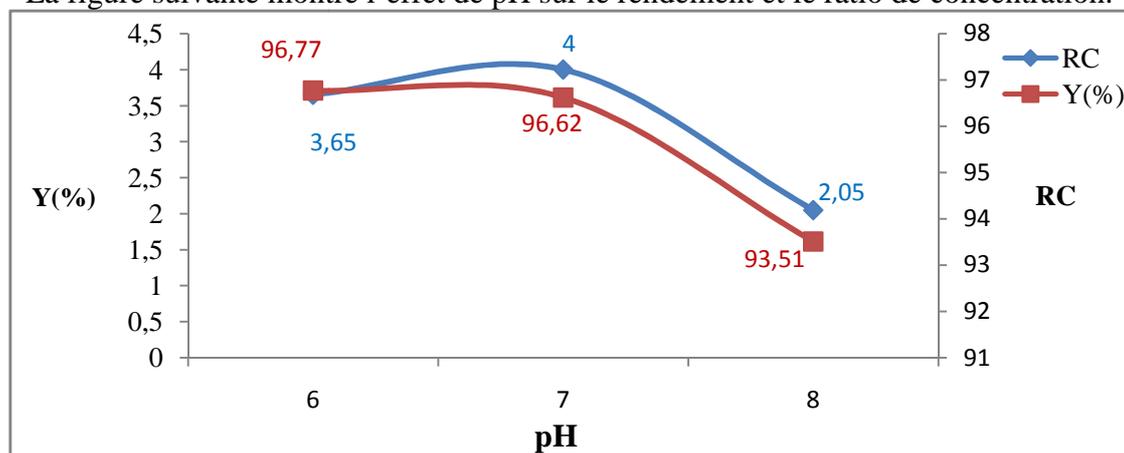


Fig. 17 : Effet du pH sur l'activité xylanolytique et sur l'activité spécifique.

A pH 6, le partitionnement des xylanases a changé de comportement par rapport au pH 7, on remarque une baisse de l'activité xylanolytique qui diminue de 0,09 U/ml, alors que l'activité spécifique diminue de 0,27 U/ml. A pH 8, l'activité des xylanases diminue jusqu'à 0,24 (U/ml) dans la phase supérieure et de 0,016 (U/ml) dans phase inférieure. On peut dire aussi que la plupart des xylanases sont chargées négativement (Fig. 17).

Les travaux de Babu et collaborateurs en 2008 ont montré que la répartition des enzymes dans la phase supérieure augmente avec l'augmentation du pH de 6 à 9 et entraîne l'augmentation du coefficient de partage.

La figure suivante montre l'effet de pH sur le rendement et le ratio de concentration.



Y(%) : Rendement ; RC : Ratio de concentration.

Fig. 18 : Effet du pH sur le rendement et le ratio de concentration.

On remarque que le rendement de purification diminue avec la variation de pH de 96,77 à pH 6 jusqu'à 93,51 à pH 8, par contre, le ratio de concentration augmente de 3,65 (pH 6) à 4 (pH 7) puis diminue à 2,05 (pH 8), ces résultats collaborent avec les résultats de

Yasinok et collaborateurs en 2010, qui ont trouvé qu'une augmentation de pH, engendre une diminution de la récupération de l'enzyme.

En conclusion les xylanases de *Jonesia denitrificans* BN13 sont actives dans un SDPA à pH 7, ce qui est en accord avec les travaux de **Azoug et Manadi (2013)** et **Kerdouche et Kernou (2012)**.

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 système (I).

La différence de volumes dans les phases dépend de la concentration de PEG et de la concentration du sel et du pH, ces trois paramètres permettent une meilleure séparation des phases, une concentration faible de sel est nécessaire lorsqu'une concentration élevée du PEG est utilisée (**Ratanapongleka, 2010**). Ces résultats ne concordent pas avec celles du présent travail puisque une faible concentration de PEG et de NaCl a été utilisée dans le système (A).

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 et Antov et al., 2005**).

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

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

Espèce	Poids moléculaire du PEG	Composition de SDPA	K	R	Y	FP	Références
<i>Jonesia denitrificans</i> BN13	1000	PEG à 8,33% / KH ₂ PO ₄ à 13,14% / NaCl à 1,62% / 46% de MM7E à pH 7	86,66	0,33	96,62	2,90	Travail actuel
<i>Paecilomyces thermophila</i> J18	4000	PEG à 12,5% / (NH ₄) ₂ SO ₄ à 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	4000	PEG à 3,5% / KH ₂ PO ₄ à 14% / KI à 9% à pH 9	/	/	70	7	Yasinok et al., 2010
<i>Aspergillus candidus</i>	4000	PEG à 8,66% / Na H ₂ PO ₄ à 22,4%	8,41	/	88,1	3	Garai et Kumar, 2013
<i>Polyporus squamosus</i>	1500	PEG à 10% / phosphate d'ammonium à 70% / 70% d'extrait brut à pH 5,1	85,6	/	97,37	4,8	Antov et al., 2005
<i>Trichoderma viride</i>	6000	PEG à 12,99% / citrate de sodium à 12,09%	47,35	0,69	97,03	/	Li et al., 2011
<i>Bacillus pumilus</i>	6000	PEG à 22% / K ₂ HPO ₄ / NaCl à 12%	46,9	/	98	33	Bim et Franco, 2000

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

L'analyse du zymogramme est réalisé pour mettre en évidence l'activité des xylanases.

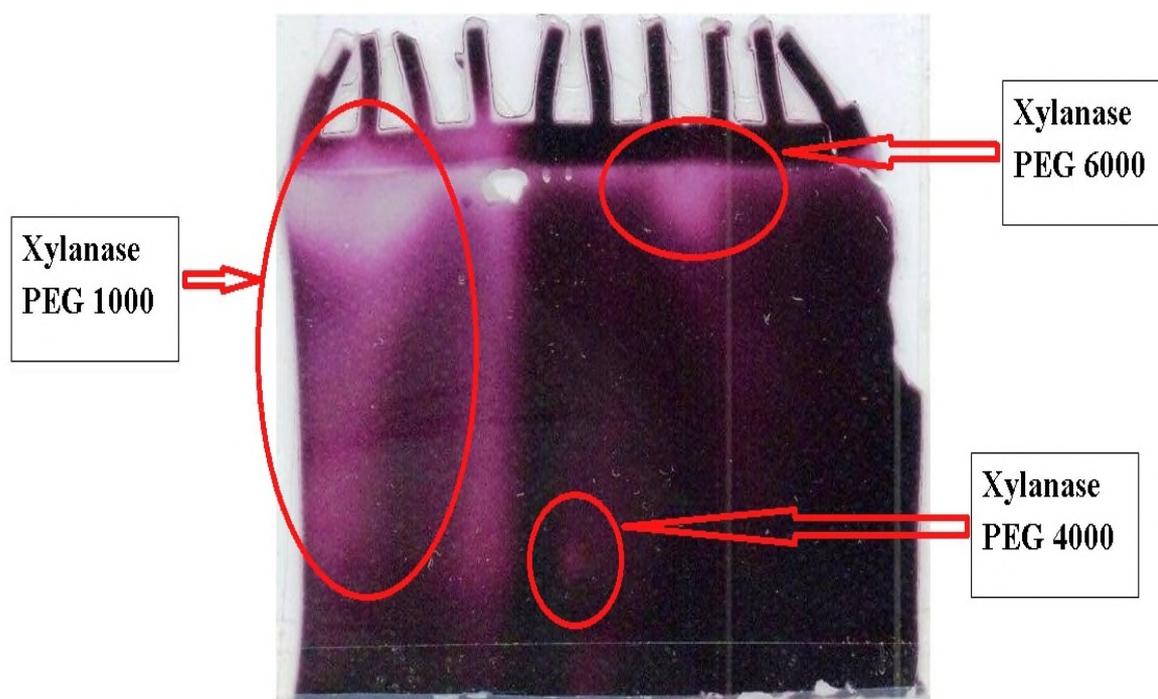


Fig. 19 : Zymogramme de la xylanase de la phase supérieure du SDPA.

Selon la méthode de Laemmli (1970), une SDS-PAGE a été réalisée mais les protéines de *Jonesia denitrificans* n'ont pas été révélées par la coloration au bleu de Coomassie malgré que la concentration des protéines a été suffisante pour pouvoir les visualiser.

C'est probablement dû au fait qu'on n'a pas dialysé l'échantillon, car la présence de sels métalliques peut activer les métalloprotéases qui peuvent hydrolyser les xylanases, néanmoins on a obtenu un zymogramme (**Fig. 23**) montrant les activités xylanolytiques résiduelles.

Dans le présent travail, la phase supérieure du système PEG 1000 à une concentration de 8,33%, montre un profil de zymogramme dans lequel l'activité est apparente dans le dépôt et dans le gel, ce qui veut dire qu'on a affaire à plusieurs xylanases (isoenzymes) probablement six isoenzymes ayant des poids moléculaires de : 250 – 150 - 69,64 – 42 - 40 et 26 kDa, selon les travaux de **Boucherba et collaborateurs en 2014**.

En comparaison avec le système à PEG 4000, on remarque une faible activité située en bas du gel, c'est probablement la xylanase 6 ayant un poids moléculaire de 26 kDa.

La phase supérieure du système à base de PEG 6000 montre une activité tout en haut du gel, il s'agira peut être de la xylanase 1 ayant un poids moléculaire de 250 kDa selon les travaux de **Boucherba et collaborateurs en 2014**.

CONCLUSION

Conclusion

Dans le but d'extraire des enzymes xylanolytiques produites par la souche *Jonesia denitrificans* BN13 isolée et caractérisée par **Boucherba et collaborateur (2011)**, nous avons procédé à une extraction par un système à deux phases aqueuses (**SDPA**) composé de PEG 1000 /K₂HPO₄ / NaCl.

Plusieurs systèmes d' SDPA ont été réalisés afin d'étudier l'influence des différents facteurs tels que la concentration du PEG et du NaCl et le pH, sur la répartition et l'extraction des xylanases.

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

La meilleure extraction et répartition des xylanases est obtenue dans un système SDPA composé de : PEG à 8,33 % (m/ v), K₂HPO₄ à 13,14 % (m / v) et de NaCl à 1,62 % à pH 7 comme première étape de purification qui ne nécessite pas de centrifugation pour la récupération des cellules.

A partir de ce système le rendement était de 96,62 %, l'activité spécifique était de 2,41 U / mg et le coefficient de partage était de 86,66, ont été obtenus. De plus, la répartition des xylanases est obtenue au bout de 48 h ce qui montre la rapidité et le gain de temps en utilisant le SDPA.

Afin de compléter et affiner nos travaux de recherche, différentes perspectives pourraient être envisagées.

- En particulier, Détecter la présence de xylosidases et des autres enzymes accessoires tel que les cellulases, les laccases afin de les purifier et les caractériser 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 K₂HPO₄, le volume de l'échantillon et la température de système SDPA .

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUE

Références 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.
- Antov MG, Draginja MP et Milica Get Dasic. (2005). Aqueous two-phase partitioning of xylanase produced by solid-state cultivation of *Polyporus squamosus*. *Process Biochem.* **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 A* .**668**, 47–54.
- Azoug N et Manadi H. (2013) .production et extraction des xylanases par un système à deux phases aqueuses .mémoire master en microbiologie microbienne. Université A MIRA de Béjaia , faculté des science de la nature et de la vie.43 p.

-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, Poutanen K (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J Biotechnol.* **23**,257-270.
- Bartolomé B, Faulds CB, Kroon PA, Waldron K, Gilbert HJ, Hazlewood G, Williamson G .(1997) .An *Aspergillus pigeresterase* (ferulic acid esterase III) and a recombinant *Pseudomonas fluorescens* sub sp. *cellulosa* esterase (Xy1D) release a 5-5' ferulic dehydrodimer (diferulic acid) from barley and wheat cell walls. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 208-212.
- Beg QK, Kappor M, Mahajan L, Hondal GS. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol.* **20**,325–33.

- Bell FW. (1991). Critical silvics of conifer crop species and selected competitive vegetation in northwestern Ontario. NWFTDU Tech Rep. **19**, 177 p.
- Belter PA et Cussler EL. (1988). Bioseparations. Wiley Interscience. New York, p.5.
- Biely P., Microbial xylanolytic systems, *Trends Biotechnol Adv.* **3**, 286-290.
- Blum DL, Li XL, Chen H, Ljungdahl LG. (1999). Characterization of an acetyl xylan esterase from the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain PC-2. *Appl Environ Microbiol.* **65(9)**, 3990-3995.
- Boucherba N, Benallaoua S, Copinet E, Hebal H, Duchiron F. (2011). Production and partial characterization of xylanase produced by *Jonesia denitrificans* isolated in Algerian soil. *Process Biochem.* **46**, 519- 525.
- Boucherba N. (2011). Production, purification et caractérisation d'une xylanase produite par *Jonesia denitrificans* BN13. Thèse de doctorat en science biologique. Université A/MIRA de Béjaïa, Faculté des sciences de la nature et de la vie, 108p.
- Bradford MM. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-Dye Binding. *Anal Biochem.* **72**, 248-254.

-C-

- Chavez-Santoscoy A, Benavides J, Vermaas W et Ri-to-Palomares M. (2010). Application of aqueous two-phase systems for the potential extractive fermentation of cyanobacterial product. *Chem Eng Technol.* **33**, 177–182.
- Cleland J L, Hedgpeeth C et Wang D I. (1992). Polyethylene glycol enhanced refolding of bovine carbonic anhydrase B. Reaction stoichiometry and refolding model. *J Biol Chem.* **267**, 13327-13334.
- Collins T, Meuwist M-A, Stals I, Chaeyssens M, Fellert G Gerday C. (2002). A novel family 8 xylanase, functional and physicochemical characterization. *J Biol Chem.* **277**, 35133-35139.

-D-

- Dekker R F H et Richards G N. (1976). Hemicellulases: their occurrence, purification, properties and mode of action, *Adv Carbohydr Chem.* **32**,277-352.
- Derwenda V, Swensson L, Green R, Wei Y, Morosoli R, Shareck F, Kluepfel D et Derwenda Z.S.(1994). Crystal structure at 1,6-Å resolution, of the *Streptomyces lividans* xylanase A, a member of the F family of beta-1,4-D- glucanases . *J Biol Chem.* **269**, 20811- 20814.
- Draginja Pericin, Ljiljana Radulovic, Svetlana Trivicet Etelka Dimic. (2008). Evaluation of solubility of pumpkin seed globulins by response surface method. *J Food Eng.* **84 (4)**, 591–594.
- Duarte MCT, Portugal EP, Ponezi AN, Bim MA, Tagilari CV et Franco TT. (1999). Production and purification of alkaline xylanases. *Bioresour Technol.* **68 (1)**, 49–53.

-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-Universitätsverlag. 485–489.
- Faulds CB, Zanichelli D, Crepin VF, Connerton IF, Juge N, Bhat MK, Waldron KW (2003). Specificity of féruloyl esterases for water-extractable and water unextractable feruloylated polysaccharides: influence of xylanase. *J. Cereal Sci.* **38**,281-288.

-G-

- Gallardo O, Diaz P, Pastor FI. (2004). Cloning and characterization of xylanase A from the strain *Bacillus* sp. BP-7: comparison with alkaline pi-low molecular weight xylanases of family 11. *Curr Microbiol.* **48**,276-279.
- Gautam S et Simon L. (2006). Partitioning of β -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.

- Gawande P, Kamat MY. (1999). Purification of *Aspergillus* sp. Xylanase by precipitation with an anionic polymer Eudrajit S100. *Process Biochem.* **34**, 577-580
- Geweely et Neveen. (2011). Purification and characterization of acido-thermophilic xylanase from *Aspergillus terreus*. Biological science department (Microbiology), Australian J basic applied Sci. **5 (10)**, 214-219.
- Graikaiwari R, Shendye A, Kulkurani N et Rao M. (1996). Two phase separation of xylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* using a poly (ethylene glycol)-K₂HPO₄ system. *Biotechnol Appl biochem.* **23**, 237-241.
- Graikaiwari R, Shendye A, Kulkurani N et Rao M. (1996). Two phase separation of xylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* using a poly (ethylene glycol) K₂HPO₄ system. *Biotechnol App biochem.* **23**, 237-241
- 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-

- Harris GW, Jenkins J A, Connerton I, Cummings N, Loleggio L, Scott M, Hazlewood G P, Laurie J I, Gilbert H J et Pickersgill R W. (1994). Structure of the catalytic core of the family F xylanase from *Pseudomonas fluorescens* and identification of the xylopentaose –binding sites, structure .2,1107-1116.

-J-

- Jobidon R. (1995). Autécologie de quelques espèces de compétition d'importance pour la régénération forestière au Québec. MRN. Mémoire de recherche forestière. No **117**, 180 p.
- Johansson G. (1985). Liquid-liquid extraction of biomolecules in downstream processing - a review paper. *J Chromatogr.* **331**, 11-21.

-K-

- Karels TJ et Boonstra R. (2003). Reducing solar heat gain during winter: the role of white bark in northern deciduous trees. *Arctic*. **56**, 168-174.
- Kerdouche .K. et Kernou .O. (2012). extraction des xylanases à partir de milieux à base de trois coproduits agricoles par un système à deux phases aqueuses .mémoire d'ingénierie d'état en génie biologique.39P.

-L-

- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227 (5259)**, 680-685.
- Liu W, Zhu W, Lu Y, Kong J et Ma G. (1998). Production, partial purification and characterization of xylanase from *Trichosporoncutaneum* SL409. *Process Biochem*. **33 (3)**, 331-336.

-M-

- Mac Kenzie CR, Bilous D (1988). Ferulic acid esterase activity from *Schizophyllum* commune. *Appl Environ Microbiol*. **54**, 1170-1173.182
- Mayerhoff, ZD, Roberto, IC et Franco TT. (2004). Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems. *Biochem eng J*. **18 (3)**, 217-223.
- Miller GL. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal.Chem.***31**, 87-95.

-N-

- N Kulkarni, A Vaidya et M Rao1.(1999). Extractive Cultivation of Recombinant *Escherichia coli* Using Aqueous Two Phase Systems for Production and Separation of Extracellular Xylanase. *Biochem Biophys Res Communications* .**255**, 274–278.
- Naganagouda K et Mulimani VH. (2008). Aqueous two-phase systems extraction (ATPE): an attractive and economically viable technology for downstream processing of *Aspergillus oryzae* α -galactosidase. *Process Biochem.***43**, 1293-1299.
- Nascimento RP, Coelho, RRR, Marques S, Alves L, Girio FM, Bon EPS et Amaral-Collaco MT. (2002). Production and partial characterisation of xylanases from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme Microbial Technology*. **31 (4)**, 549-555.
- N Boucharba , M Gagaoua, E Copinet, A Bettache , F Duchiron et S Benallaoua . (2014). purification and characterization of the xylanase produced by *Jonesia denitrificans* BN13. *Appl Biochem Biotech* .**172**, 2694-2705.
- Ninawe S, Kapoor M et Kuhad RC.(2008). Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. *Biores Technol*. doi: 10.1016/j.biortech.02.016.
- Nitsawang S et Hatti-Kaul RP. (2006). Purification of papain from *Carica papaya* latex: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. *Enzyme Microb technol*. **39 (5)**, 1103-1107.

-P-

- Prade R.A. (1995). Xylanases: from biology to biotechnology, *biotechnol Genet Eng Rev*. **13**,101-131.
- 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-

- Raja S, Murty VR, Thivaharan V, Rajasekar V et Ramesh V. (2011). Aqueous Two Phase Systems for the Recovery of Biomolecules – A Review. *Sci Technol.* **1 (1)**, 7-16.
- Rao JR et Nair BU. (2011). Bioresour. Novel approach towards recovery of glycosaminoglycans from tannery wastewater. *Technol.* **102**, 872-878.
- Ratanapongleka K. (2010). Recovery of biological products in aqueous two phase systems. *Int J Chem Eng Appl.* **1 (2)**, 191-198.
- Rocourt J, Wehmeyer U et Stackebrandt E. (1987). Transfer of *Listeria denitrificans* to a new genus, *Jonesia* gen. nov, as *Jonesia denitrificans* comb. Nov *Int J Syst Bacteriol.* **37**, 266–270.
- Royer JC et Nakas JP. (1989). Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum*. *Enzyme Microb.* **11**, 405–10.

-S-

- Safford LO, Bjorkbom JC et Zasada, JC. (1990). *Betula papyrifera* Marsh. paper birch. Burns, Russell M.; Honkala, Barbara H., tech coords *Silvics of North America.* **2**, 158-171.
- Saha B.C. (2000). α -L-arabinofuranosidases : biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnol Adv.* **18**, 403-423.
- Saravanan S, Reena JA, Rao JR, Murugesan T et Nair BU. (2006). Phase Equilibrium Compositions, Densities, and Viscosities of Aqueous Two-Phase Poly (ethylene glycol) + Poly (acrylic acid) System at Various Temperatures. *J Chem Eng Data.* **51**, 1246-1249.
- Schulze E. (1891). Information regarding chemical composition of plant cell membrane. *Ber Dtsch Chem Ges.* **24**, 2277-2287.
- Schumann P, Cui X, Stackebrandt E, Kroppenstedt RM, Xu L et Jiang C. (2004). *Jonesia quinghaiensis* sp. nov., a new member of the suborder micrococccineae. *Internat J System Evol Microbiol.* **54**, 2181-2184.

- Shah AR et Madamwar D. (2005). Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. *Process Biochem.* **40**, 1763–71.
- Shallon D, Leon M , Bravman T, Ben-David A, Zaide G, Belakhov V, Shoham G, Shomburg D, Baasov T et Shoham Y. (2005). Biochemical characterization and identification of the catalytic residues of a family 43 β -D-xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6. *Biochem.* **44**,387-397.
- She Ying Dong, Zhen Yang , Penghui H, Zhang , Qing Hu et Ting Lin Huang. (2012). Comparative study of hollow-fiber liquid-phase micro-extraction and an aqueous two phase system for determination of phytohormones in soil. *Anal Bioanal Chem.* **403**, 1743–1749.

-T-

- Tello PG, Camacho F et Blazquez G. (1994). Density and Viscosity of Concentrated Aqueous Solutions of Polyethylene Glycol. *J Chem Eng. Data.* **39**, 611–614.
- Tenkanen M, Schuseil J, Poutanen K. (1991). Production, purification and characterization of an esterase liberating phenolic acids from lignocellulosics. *J Biotechnol.* **18**, 69-84.
- Torronen A, Harkki A et Rouvinen J. (1994). three- dimensional structure of endo – 1.4 β –xylanase II from *Trichoderma reesei* : two conformational states in the active site , *EMBO J.***13**, 2493-2501.

-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.

- Van Doorsaler E, Kersers –Hilderson H et De Bruyne C.K.(1985). Hydrolysis of β -D xylooligosaccharides by β -D-xylosidase from *Bacillus Pumilus*. Carbohydr Res. **140**,342-346.

-W-

- Walter H et Johansson GT. (1994). Methods in enzymology: Aqueous two-phase systems. Academic press, San Diego, CA.
- Wang SL, Yen YH, Shin IL, Chang AC, Chang WT, Wu WC et Chai YD. (2003). Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. Enzyme Microb Technol.**33**, 917–25.
- Wang SL, Yen YH, Shin IL, Chang AC, Chang WT, Wu WC et Chai YD. (2003). Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus*A-151.Enzyme Microb Technol.**33**, 917–25.
- Whistler R.L.et Msak E. (1955). Enzymatic hydrolysis of xylan.J Am Chem Soc.**77**, 1241-1243.
- White A, Withers S G, Gilkes N.R et Rose D.R. (1994). C ristal structure of the catalytic domain of the beta-1,4 – glucanasecex from *cellulomonasfini* . Biochem. **33**, 12546-12552.
- Wong K K Y, Tan L U L et Sadder J N. (1988). Multiplicity of β -1,4- xylanases in microorganisms functions and applications , *Microb Rev.***52**, 305-317.
- Wong KK, Tan LU et Saddler JN. (1988). Multiplicity of beta-1, 4-xylanase in microorganisms: functions and applications. Microbiol Rev. **52 (3)**, 305.

-Y-

- 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.

-Z-

- Zhi W, Song J, Bi J et Ouyang F. (2004). Partial purification of α -amylase from culture supernatant of *Bacillus subtilis* in aqueous two-phase systems. Bioproc Biosyst Eng. **27**, 3–9.

I. Matériel utilisé

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

- Balance (Scouttmpro) ;
- Balance (Ae ADAM AFA-120LC) ;
- Bain marie (Memmert) ;
- Bain marie (GFL) ;
- Étuve (Memmert) ;
- Centrifugeuse (Sigma 2-16K) ;
- Centrifugeuse (mikro 120 Hettick Zentrifugen) ;
- pH-mètre (HANNA pH210) ;
- Spectrophotomètre (UV^{mini}₁₂₄₀ SHIMADZU) ;
- Dispositif d'électrophorèse (**Mini Protean II, Bio Rad**).

II. Produits utilisés

- Xylane de bouleau (birchwoodxylan) (SIGMA) ;
- Xylane d'épeautre et d'avoine (oatspeltxylan) (SIGMA) ;
- Xylane de hêtre (larchwoodxylan) (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 ₄ Cl	5g
KH ₂ PO ₄	15g
Na ₂ HPO ₄	30g
MgSO ₄ /7H ₂ 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 ₄ Cl	5g
KH ₂ PO ₄	15g
Na ₂ HPO ₄	30g
MgSO ₄ /7H ₂ O	0,25g
Agar	15g
Eau distillée qsp	1L

Préparation des réactifs, des tampons et des gels d'électrophorèse

1. Solution à base d'acide dinitrosalicylique (DNS)

Acide dinitrosalicylique.....	10 g
Soude.....	16 g
Tartrate de potassium sodique.....	300 g
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	10 mg
Éthanol 99,5 %	5 ml
Acide phosphorique 85 %	10 ml
Eau distillée.....	qsp.. 100 ml

3. Tampon Tris-HCl à 50Mm à pH 8,5

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

Ajuster le pH à 8,5 avec du HCl concentré.

4. Gel de séparation à 12%

Solution d'acrylamide.....	2,5 ml
Tampon de séparation.....	5,2 ml
TEMED.....	20 µL
Persulfate d'ammonium (APS)	100 µL
Xylane de bouleau.....	0,8 ml
Eau distillée.....	qsp.....4,4ml

5. Gel de concentration à 7,5%

Solution d'acrylamide.....	2,5 ml
Tampon de concentration.....	2,5 ml
TEMED.....	10 μ L
Persulfate d'ammonium (APS)	100 μ L
Eau distillée.....qsp.....	4900 μ L

6. Tampon de séparation à pH 8,8

Tris-HCL (3 M).....	72,7 g
SDS (0,8 %)......	1,6 g
Mercaptoéthanol (0,8 ml).....	0,8 ml
Eau distillée.....qsp.....	200 ml

Ajuster le pH à 8,8 avec HCl concentré

7. Tampon de concentration

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

Ajuster le pH à 6,8

8. Tampon de migration (X10) à pH 8,3

Tris (0,025M).....	1,05 g
Glycine (0,192M).....	5,04 g
Mercaptoéthanol (0,05 %)......	175 μ L

SDS (0,1 %).....0,35 g

Eau distillée.....qsp ...1000 ml

Ajuster le pH à 8,3

9. Tampon échantillon à pH 6,8

Trizma base.....0,303 g

SDS (Sigma).....0,8 g

Eau distillée.....4 ml

Ajuster le pH à 6,75 avec du HCl concentré

Glycérol.....4 ml

β -mercaptoéthanol à 14,3M.....2 ml

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.....2,5 g

Eau distillée.....qsp... 100 ml

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

Rouge de Congo.....0.1g

Eau distillée.....qsp... 100 ml.

1. Droites d'étalonnage des sucres réducteurs

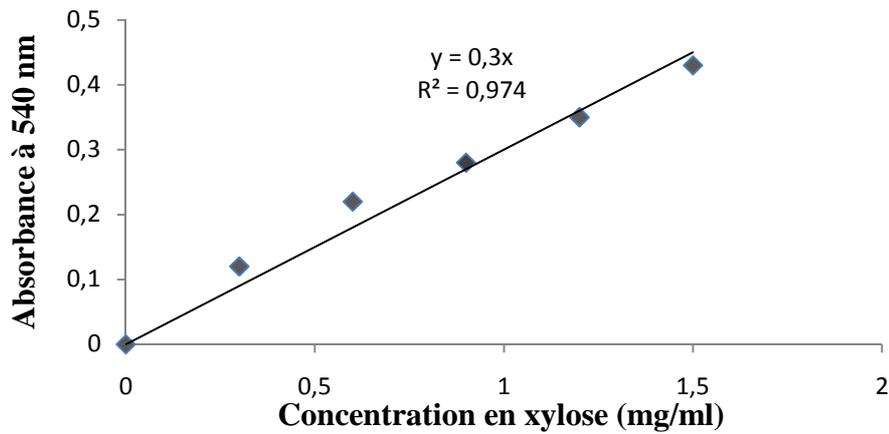


Fig. 07 : Droite d'étalonnage des sucres réducteurs.

2. Droites de dosage des protéines par la technique de la macrométhode

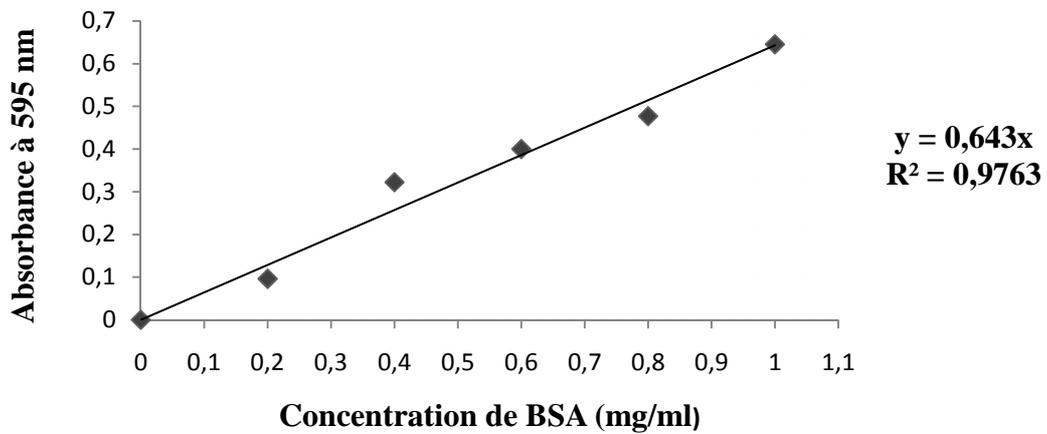


Fig. 08 : Droite de dosage des protéines par la technique de la macrométhode.

Résumé

Le but de cette étude est l'extraction des xylanases produites par *Jonesia denitrificans* BN13 dans un milieu MM7 à base de xylane d'épeautre et d'avoine par un système à deux phases aqueuses (SDPA). Le meilleur SDPA est composé de PEG 1000 à 8,33% / KH_2PO_4 à 14,13% / NaCl à 1,62 %, à pH 7, avec un rendement de 96,62 %, d'une activité xylanolytique à 0,82 U/ml qui est retrouvée dans la phase supérieure, un coefficient de partage (K) de 86,66 et un facteur de purification (FP) de 2,90. Les xylanases produites ont été analysées par zymogramme.

Mots-clés : *Jonesia denitrificans* BN13, Xylanase, système à deux phases aqueuses, Zymogramme.

Sammary

The aim of this study is the extraction of *Jonesia denitrificans* xylanases by aqueous two phases system (ATPS). The best ATPS contain PEG 1000 at 8.33% / KH_2PO_4 at 14.13% / NaCl at 1.62%, pH 7, a xylanolytic activity of 0.82 U / ml was found in the upper phase, a partition coefficient (K) of 86.66 and a purification factor (FP) of 2.90 and yield of 96.62% were obtained, the zymogram showed xylanolytic activity.

Keywords: *Jonesia denitrificans* BN13, Xylanase, Aqueous two-phase system, Zymogram.