

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Microbiologie Appliqué
Option : Biotechnologie Microbienne



جامعة بجاية
Tasdawit n Bgayet
Université de Béjaïa

Réf:

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

MASTER

Thème

Isolement et sélection des souches xylanolytiques à partir de sol de jardin et de source thermique : caractérisation physico-chimique des xylanases produites par l'isolat SJ4.

Présenté par :

KERBOUS Mohamed Yacine

MAAFA Yacine

Soutenu le : **15 Juin 2015**

Devant le jury composé de :

M KECHA. M

Mme BOUCHERBA. N

Mme BOUDERIES-SOUAGUI. S

Pr

MCA

MAA

Président

Encadreur

Examineur

Année universitaire : 2014 / 2015

Remerciements

*Tout d'abord, nous remercions Dieu, le Généreux qui nous a
donné la force d'accomplir ce modeste travail.*

On tient à remercier en premier lieu notre promotrice

Mme BOUCHERBA

*pour avoir accepté de nous encadrer et
pour sa présence, son aide et sa patience.*

*On exprime aussi nos remerciements à tous les membres de jury
d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*On tient à remercier également tous les gens qui nous ont
aidé de près ou de loin à réaliser ce travail.*

*Sans oublier l'attaché de laboratoire de génie biologique Badria, et
Mme IDRES notre enseignante pour leurs aides et conseils.*

MERCI

Dédicaces

Je dédie ce travail

*Aux êtres qui me sont très chers: ma mère, mes frères,
mes sœurs, ma femme et mon fils
pour leur patience, leurs encouragements et leur soutien
inconditionnel.*

*A toute ma famille sans exception, oncles, cousins et
cousines.*

A mon binôme, tous mes amis et collègues.

Yacine.M

*...Je dédie ce travail à la famille, à la princesse hayet et à tous mes amis,
Et à tous les scientifiques du monde, les biologistes en particulier ...*

YACINE .K

Liste des Tableaux

Dans le Manuscrit

Tableau I: Composition relative des différents constituants du bois (Govin, 2004).....	03.
Tableau II: Groupes d'hémicellulose de la paroi végétale (Thiebaud, 1995).....	05.
Tableau III: Classification des différentes enzymes hémicellulosiques (shallom et shoham, 2003).....	06.
Tableau IV: Quelques espèces bactériennes et propriétés de leurs xylanases.....	07.
Tableau V: Expression des gènes de xylanases dans différentes hôtes.....	08.
Tableau VI: Gamme d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs (Bailey et <i>al.</i> , 1992).....	15.
Tableau VII: Gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines par la microméthode...	16.
Tableau VIII: Estimation de la croissance des dix isolats et mesure de l'activité xylanasiq...	22.
Tableau IX: Comparaison de l'activité xylanasiq de quelques espèces dans leurs optimums de température.....	26.
Tableau X: Comparaison des temps de demi-vie entre les xylanases de plusieurs microorganismes à différentes températures.....	31.

Dans les Annexes

Tableau XI: Effet de la température sur l'activité xylanasiq de la souche SJ4.....	Annexe VI.
Tableau XII: Effet du pH sur l'activité xylanasiq de la souche SJ4.....	Annexe VI.
Tableau XIII: suivi de l'activité xylanasiq à différentes températures en fonction du temps d'incubation en absence du substrat de surnageant de culture de la souche SJ4.....	Annexe VI.
Tableau XIV: suivi de l'activité xylanasiq à 55 °C en fonction du temps d'incubation en présence du substrat de surnageant de culture de la souche SJ4.....	Annexe VI.

Liste des Figures

Dans le Manuscrit

Figure 01: Schéma représentatif des différents constituants du bois.....	03.
Figure 02: Structure et organisation de la cellulose dans la paroi végétale (Atalla et <i>al.</i> , 1984; O'Sullivan, 1997).....	04.
Figure 03: Schéma structural de la lignine (Adler, 1977).....	04.
Figure 04: Structure du xylane de bouleau (Herring et <i>al.</i> , 2004).....	06.
Figure 05: Mode d'action des hémicellulases impliquées dans la dégradation des Hétéroxylanes (saha et <i>al.</i> , 2000, Hövel et <i>al.</i> , 2003 , Paes et <i>al.</i> , 2008).....	07.
Figure 06: Schéma explicatif sur le devenir de la biomasse lignocellulosique (Hayes, 2009).....	10.
Figure 07: site de prélèvement d'échantillon de sol.....	11.
Figure 08: Site du prélèvement d'échantillon de la source thermale de Hamman Boughrara (Tlemcen).....	12.
Figure 09: Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS (Bailey et <i>al.</i> , 1992).....	15.
Figure 10 : Cuve et accessoires du dispositif d'électrophorèse (Thermo Scientific).....	18.
Figure 11: L'aspect des colonies de quelques isolats du sol de jardin.....	21.
Figure 12: Révélation de l'activité xylanasiq sur milieu MM7 solide.....	22.
Figure 13: Suivi des activités xylanasiques des isolats ET2, SJ3, SJ4 et SJ5.....	23.
Figure 14: Observation microscopique de l'isolat SJ4 (a): Coloration de Gram (Grossissement X1000), (b): bactéries à l'état frais (Grossissement X 400).....	24.
Figure 15: Affinité de la xylanase ou les xylanases vis-à-vis de trois substrats.....	25.

Figure 16: Effet de la température sur l'activité xylanasiq (a): Tubes présentant les résultats des activités xylanasiq en fonction des différentes températures, (b): L'activité xylanasiq relative en fonction de la température.....27.

Figure 17: graphe représentant l'activité xylanasiq relative en fonction de la variation du pH.....28.

Figure 18:Thermostabilité de la ou les xylanases en absence du substrat.....29.

Figure 19: Evolution du Log de l'activité relative en fonction du temps en absence du substrat.....30.

Figure 20: Thermostabilité de la ou les xylanases en présence du substrat à 5532.

Figure 21: Evolution du Log de l'activité relative fonction du temps en présence du substrat.....32.

Figure 22: Profil de migration des protéines sur SDS-PAGE.....34.

Dans les Annexes

Figure 23: Droite d'étalonnage pour le dosage du xylose.....Annexe V.

Figure 24: Droite de Dosage des protéines par la microméthode.....Annexe V.

Figure 25: Droite d'étalonnage des marqueurs pour SDS-PAGE.....Annexe V.

Liste des Abréviations

- ✚ A: Absorbance.
- ✚ ADN: Acide désoxyribonucléique.
- ✚ ASB: Albumine Sérum Bovin.
- ✚ CMC: Carboxy-méthyle Cellulose.
- ✚ DNS: Acide 3,5-Dinitrosalicylique.
- ✚ EC: Enzyme Classification.
- ✚ ET: Eau Thermale.
- ✚ Fig: Figure.
- ✚ KDa: Kilo Dalton.
- ✚ M: Molaire.
- ✚ mM: mili Molaire.
- ✚ m /v: masse par volume.
- ✚ μ : Micro.
- ✚ MM: Masse molaire.
- ✚ MM7: Milieu Minimal à pH 7.
- ✚ N: Normalité.
- ✚ nm: Nanomètre.
- ✚ PM: Poids Moléculaire.
- ✚ PAGE: polyacrylamide gel Electrophoresis.
- ✚ Rf: Rapport frontal.
- ✚ rpm: Rotation par minute.
- ✚ SDS: Sodium dodécyl sulphate.
- ✚ SJ: Souche de Jardin.
- ✚ TEMED: N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine.
- ✚ TRIS: Tris-(hydroxyméthyl)-ammoniométhane.
- ✚ U: Unité enzymatique.
- ✚ v/v: Volume par Volume.

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des Abréviations

Introduction.....01.

Synthèse bibliographique

I-Paroi végétale.....03.

 I-1-Cellulose.....04.

 I-2-Lignine.....04.

 I-3-Hémicellulose.....05.

II-Enzymes xylanasiqes.....06.

 II-1-Classification.....06.

 II-2-Mode d'action des enzymes xylanasiqes.....07.

III-Bactéries productrices de xylanases.....07.

IV-Applications industrielles des xylanases.....08.

 IV-1-Industrie du textile et du papier08.

 IV-2-Bioconversion lignocellulosique.....09.

 IV-3-Industrie alimentaire.....09.

Matériels et méthodes

I-Prélèvement d'échantillons.....11.

II-Isolement et sélection de souches xylanolytiques.....12.

 II-1-Sélection sur milieu de culture solide.....13.

 II-2-Sélection sur milieu de culture liquide et suivi de l'activité xylanasiqes.....13.

III-Identification de la souche.....13.

 III-1-Analyse phénotypique.....13.

IV-Méthodes analytiques.....14.

 IV-1-Estimation de la biomasse.....14.

 IV-2-Mesure de l'activité xylanasiqes.....14.

 IV-3-Dosage des sucres réducteurs.....15.

 IV-4-Dosage des protéines.....16.

V-Caractérisation des xylanases dans le surnageant de culture.....	16.
V-1-Affinité vis à vis du substrat.....	16.
V-2-Température.....	17.
V-3-pH.....	17.
V-4-Thermostabilité.....	17.
V-5-Poids moléculaires et zymogramme.....	17.

Résultats et discussions

I-Isolement de souches xylanolytiques.....	21.
I-1-Sélection sur milieu de culture liquide et estimation de la biomasse.....	22.
II-Caractérisation morphologique de l'isolat SJ4.....	24.
II-1-Identification phénotypique.....	24.
III-Production des xylanases de l'isolat SJ4.....	25.
IV-Caractérisation des xylanases dans le surnageant.....	25.
IV-1-Affinité vis-à-vis du substrat.....	25.
IV-2-Effet de la température et du pH.....	26.
IV-3-Thermostabilité en absence du substrat.....	29.
IV-4-Thermostabilité en présence du substrat.....	32.
V-Electrophorèse (SDS -PAGE) et zymogramme.....	33.
Conclusion.....	35.

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

Les Xylanases sont des enzymes utilisées dans diverses applications industrielles telles que le traitement de la pulpe de papier, l'alimentation animale, la boulangerie, l'industrie du jus, et la brasserie (**Mokni-Tlili et al., 2010**).

La production microbienne des xylanases (EC 3.2.1.8) a été largement étudiée, car l'hydrolyse enzymatique du xylane, un composant important d'hémicellulose des résidus agro-industriels, est avantageuse pour la réutilisation des sucres hexoses et pentoses pour l'usage en tant que matières premières dans de nombreux processus biotechnologiques (**Breccia et al., 1995**). En outre, la tolérance aux températures et aux pH_s élevés sont des propriétés souhaitables pour l'usage efficace des xylanases dans diverses industries (**Porsuk et al., 2012**).

En particulier, les xylanases alcalines sont très importantes pour l'hydrolyse de la matière brute (bois, déchets verts...etc) en pulpe et pour l'application dans les procédés de blanchissement, ce qui offre des avantages industriels tels que la réduction de l'utilisation des agents de blanchissement, étant par conséquent plus favorable à l'environnement (**Porsuk et al., 2012**).

Beaucoup d'études ont été réalisées sur des xylanases bactériennes et fongiques (**Nakamura et al., 1993 ; İnan et al., 2011**). Cependant, les xylanases bactériennes sont moins étudiées par rapport aux champignons vu que ces derniers possèdent un taux de croissance et une production élevés, néanmoins certaines xylanases bactériennes affichent des temps de demi vie élevés et les biotopes extrêmes d'isolement sélectionnent des xylanases ayant des propriétés très intéressantes tels que la thermostabilité, la barophilie et l'alcalophilie (**Amore et al., 2013**).

Au niveau du laboratoire de microbiologie appliquée de l'université de Bejaia, les travaux de Boucherba et collaborateurs (2011, 2014) ont décrit six xylanases produites par la souche *Jonesia denitrificans* qui est un actinomycète, d'autres travaux réalisés en collaboration avec le laboratoire de microbiologie générale de l'institut méditerranéen de l'université Aix Marseille ont donné lieu à la publication de Bouacem et collaborateurs en 2014, cette étude décrit la production de la xylanase de l'espèce *Caldicobacter algeriensis*.

Notre étude s'inscrit dans le même cadre mais cette fois ci en s'intéressant à des xylanases thermostables produites par des bactéries isolées à partir de sol de jardin amendé avec des engrais bovins volontairement ajoutés aux échantillons prélevés.

L'étude concerne la caractérisation physicochimique de la ou les xylanases produites par des bactéries. L'approche méthodologique suivante est adoptée:

- ✓ Isolement à partir de sol de jardin et de source thermale des souches bactériennes productrices de xylanases ;
- ✓ La sélection de la souche la plus productrice de xylanases ;
- ✓ La Caractérisation physicochimique de la ou les xylanases produites dans le surnageant de culture.

Comme support aidant à la compréhension de notre démarche expérimentale, une revue bibliographique succincte limitée à dix pages donne un aperçu général sur les xylanases et leurs applications.

Partie

théorique

I-Paroi végétale

La paroi cellulaire végétale est un édifice multimoléculaire qui assure la rigidité et qui évolue en fonction de l'âge des tissus végétaux. Elle entoure chaque cellule végétale et est essentiellement constituée de polyphénols, protéines et de glucides (90% de la masse de matière sèche) qui peuvent être des hémicelluloses, des pectines ou de la cellulose (Laberche, 1999). Ces glucides sont étroitement liés à la lignine pour former un complexe très rigide (Fig.01).

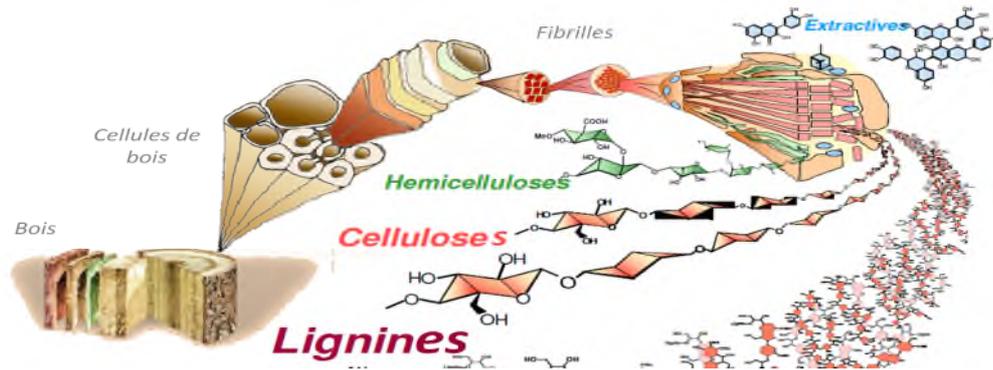


Figure 01 : Schéma représentatif des différents constituants du bois (<http://www.google.fr/imgres?imgurl=http%3A%2F%2Fleves-ose.cma.mines-paristech.fr>).

Ces différents constituants forment un réseau complexe de macromolécules responsable des propriétés mécaniques de la paroi cellulaire. Cette dernière est rigide pour jouer le rôle de barrière, et élastique afin de permettre la croissance du végétal. Néanmoins, les échanges intercellulaires doivent pouvoir se faire. Ces contraintes paradoxales sont à l'origine de la complexité de la paroi végétale. Chimiquement, le bois est essentiellement composé de trois biopolymères : la cellulose, l'hémicellulose et la lignine mais aussi d'extractibles. La proportion relative des différents constituants varie en fonction du type de bois (**Tableau I**) et de la localisation dans la paroi cellulaire. La composition moyenne en polymères est présentée dans le tableau ci-dessous (Govin, 2004).

Tableau I : Composition relative des différents constituants du bois (Govin, 2004).

Constituants	Résineux (% en poids)	Feuillus (% en poids)
Cellulose	42 ± 2	45 ± 2
Lignine	27 ± 2	30 ± 5
Hémicelluloses	28 ± 3	20 ± 4
Extractibles	3 ± 2	5 ± 3

I-1-Cellulose

La cellulose est le polymère le plus abondant sur terre, elle représente 40 à 60% de la biomasse sèche, c'est un homopolymère linéaire composé d'unités « D-glucopyranose » reliés par des liaisons β (1-4) (**Fig.02**). L'orientation de ses liaisons hydrogènes intramoléculeaires et intermoléculeaires rend le polymère rigide et difficile à se déstructurer (**Delmer et Amor, 1995**).

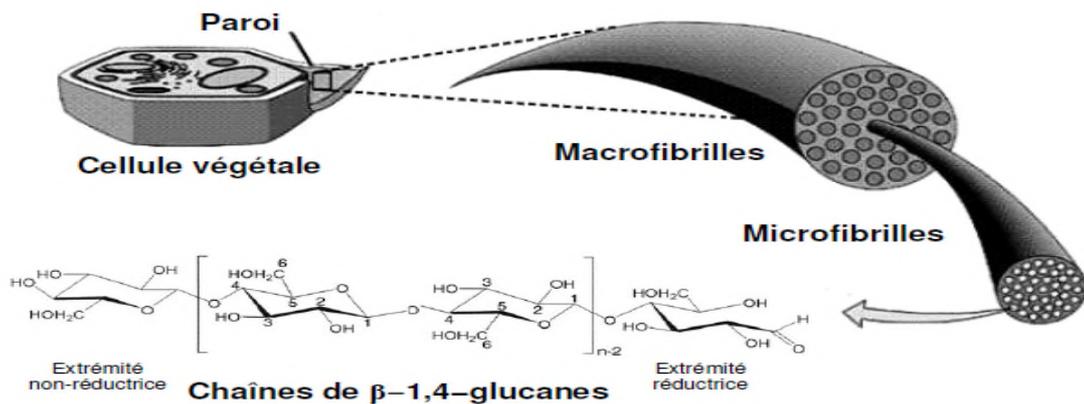


Figure 02 : Structure et organisation de la cellulose dans la paroi végétale (**Atalla et al., 1984; O'Sullivan, 1997**).

I-2-Lignine

Elle constitue 20 à 30% de la matière sèche, c'est un polymère complexe de nature phénolique associé aux hémicelluloses (**Fig.03**), son caractère phénolique lui confère un rôle biologique protecteur et rend sa structure peu accessible à l'eau et résistante aux attaques enzymatiques (**Tchunden, 1990**). Elle forme avec l'hémicellulose, une matrice amorphe dans laquelle les fibrilles de cellulose sont protégées contre la biodégradation (**Fengel et Wegener, 1989**).

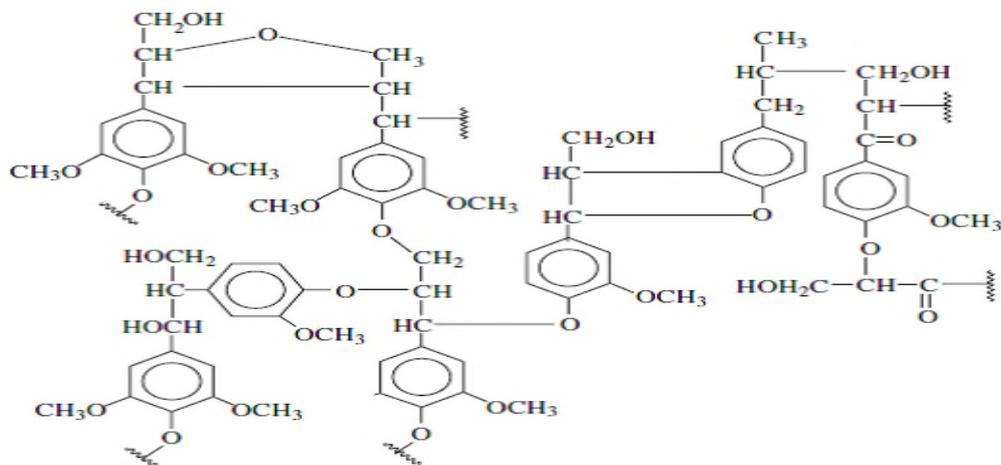


Figure 03 : Schéma structural de la lignine (**Adler, 1977**).

I-3-Hémicellulose

Elle représente 20 à 40% de la matière sèche, c'est le polysaccharide le plus abondant dans la nature après la cellulose, il s'agit d'un hétéropolysaccharide qui est associé à la cellulose et à la lignine. L'hémicellulose est constituée de différentes unités de sucres neutres présentes à différentes proportions, ce qui rend son hydrolyse relativement plus facile que celle de la cellulose (Sun et al., 1996).

L'hémicellulose comprend un ensemble de polyosides, le plus souvent hétérogène, formés par des résidus glucose, xylose, mannose, galactose, arabinose, fucose, acides glucuroniques et acides galacturoniques (Mirande, 2009).

Le tableau suivant représente les différents groupes d'hémicellulose présents dans la paroi végétale.

Tableau II : Groupes d'hémicellulose de la paroi végétale (Thiebaud, 1995).

Groupes	Hémicelluloses	Type de liaisons dans la chaîne principale
Xylanes	Arabinoxylanes 4-O-méthyl glucoronoxylanes Galactoarabinoxylanes Hétéroxylanes complexes	β (1-4)
Mannanes	Galactomannanes Glucomannanes Galactoglucomannanes	β (1-4)
Galactanes	Galactanes acides	β (1-4), β (1-6)
Arabinogalactanes	Glucuronoarabinogalactanes	β (1-3), β (1-6)
Glucanes	Glucanes	β (1-6), β (1-4)

I-3-1-Xylanes

Ce sont les hémicelluloses majoritaires des céréales et des monocotylédones et du bois tendre et dur, ils peuvent représenter 15 à 40% de la matière sèche des céréales (Fry, 1988). Ils sont composés d'une chaîne principale de résidus β -D-xylopyranose reliés par des liaisons β (1-4). Sur cette chaîne principale sont greffées des ramifications qui sont variables selon l'espèce végétale. Certains de ces résidus xylose, portent des groupements acétyles, méthyles, méthylglucuronyles ou arabinofuranosyles qui forment alors des

chaînes latérales (**Mirande, 2009**). Le xylane est une source de carbone abondante dans l'hémicellulose du bois de bouleau (37% du poids sec) (**Gauthier, 1985**).

La figure ci-dessous (**Fig.04**) présente la structure du xylane de bouleau.

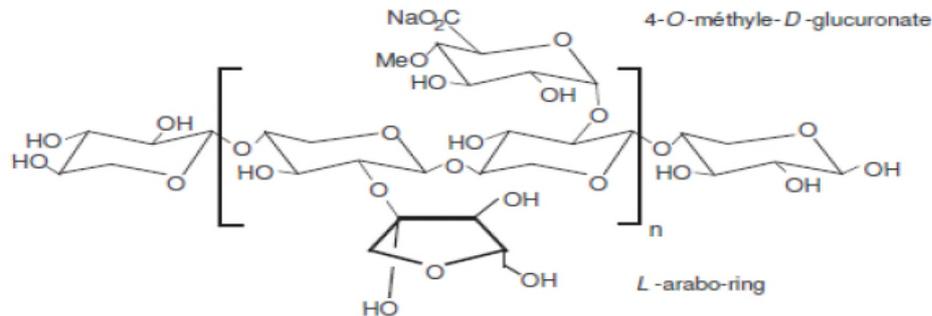


Figure 04 : Structure du xylane de bouleau (**Herring et al., 2004**).

II-Enzymes xylanasiques

II-1-Classification

Le tableau III résume la classification des enzymes qui interviennent dans l'hydrolyse de l'hémicellulose (**shallom et shoham, 2003**).

Tableau III: Classification des différentes enzymes hémicellulosiques (**shallom et shoham, 2003**).

Enzyme	Substrat	EC	Famille
Endo β (1-4) xylanase	β (1-4) xylane	3.2.1.8	GH 5, 8, 10, 11, 43
Exo β (1-4) xylosidase	β (1-4) xylooligomère xylobiose	3.2.1.37	GH 3, 39, 43, 52, 54
α -L Arabinofuranosidase	α -arabinofuranosyl (1-2) α (1-3) xylooligomère α (1-5) arabinane	3.2.1.55	GH 3, 43, 51, 54, 62
Endo α (1-5) arabinanase	α (1-5) arabinane	3.2.1.99	GH 43
Endo β (1-4) mannanase	β (1-4) mannane	3.2.1.78	GH 5, 26
Endo-galactanase	β (1-4) galactane	3.2.1.89	GH 53
Acetyl xylane estérase	2 ou 3-O-acétylxylane	3.1.1.72	CE 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
Acide ferulique et P-cumarique estérases	Acide férulique et P-cumarique	3.1.1.73	CE 1

GH : glycosyle hydrolase ; **CE** : carbohydate estérase.

II-2-Mode d'action des enzymes xylanasiques

Les enzymes xylanasiques agissent à différents sites au niveau du substrat, la figure suivante (**Fig.05**) résume le mode d'action.

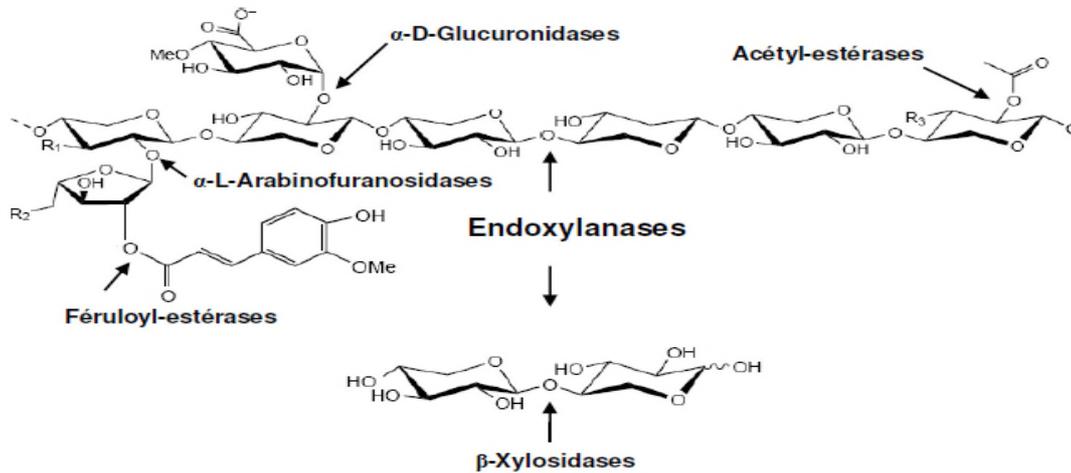


Figure 05 : Mode d'action des hémicellulases impliquées dans la dégradation des Hétéroxylanes (Saha *et al.*, 2000, Hövel *et al.*, 2003 , Paes *et al.*, 2008).

III-Bactéries productrices de xylanases

Une grande variété de microorganismes (bactéries, levures, moisissures et protozoaires) produisent des enzymes xylanasiques (Collins *et al.*, 2005). Parmi les bactéries productrices de xylanases, on peut citer quelques espèces présentées dans le tableau suivant :

Tableau IV : Quelques espèces bactériennes et propriétés de leurs xylanases.

Bactéries	MM (kDa)	Optimum		Stabilité		PI	K _m (mg/ml)	V _{max} (μM/min/mg)	Référence
		pH	T (°C)	pH	T (°C)				
<i>Acidobacterium Capsulatum</i>	41	5	65	3-8	50/20 min	7,3	3,5	403	Inagaki <i>et al.</i> , 1998
<i>Arthrobacter sp.</i> MTCC 5214	20	-	100	-	80/30 min	-	0,9	3571	Khandeparkar et Bhosle, 2006
<i>Bacillus sp.</i> SPS-0	-	6	75	6-9	85	-	-	-	Bataillon et <i>al.</i> , 1998
<i>Enterobacter sp.</i> MTCC 5112	43	9	100	-	50/48 h	-	3,3	5000	Khandeparkar et Bhosle, 2006

<i>Cellulomonas</i> sp. N.C.I.M. 2353	22- 33-53	6,5	55	-	-	8	1,7- 1,5	380- 690	Chaudhary et Deobagkar, 1997
<i>Micrococcus</i> sp. AR-135	56	7,5- 9	55	6,5- 10	40	-	-	-	Gessesse et Mamo, 1998
<i>Staphylococcus</i> sp. SG-13	60	7,5- 9,2	50	7,5- 9,5	50	-	4	90	Gupta et al., 2000

PI: Point Isoélectrique ; **K_m:** Constante de Michaelis Menten ; **V_{max}:** Vitesse maximale

La technologie de la recombinaison d'ADN permet de réaliser des insertions de gènes codant pour les xylanases dans le but d'obtenir des clones bactériens (**Tableau V**) qui permettent une meilleure production de xylanases (**Kormelink et al., 1993**).

Tableau V : Expression des gènes de xylanases dans différentes hôtes.

Source de gène	Type d'enzyme	Hôte	Substrat	Activité xylanasique	Référence
<i>Neocallimastix frontalis</i> <i>Neocallimastix patriciarum</i>	Endo-xylanase	<i>Escherichia coli</i>	Xylane d'épeautre et d'avoine	20,74 U ml ⁻¹	Hseu et Huang, 2007
<i>N. frontalis</i> <i>N. patriciarum</i>	Endo-xylanase	<i>Pseudomonas methanolica</i>	Xylane d'épeautre et d'avoine	71,68 U ml ⁻¹	Hseu et Huang, 2007
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Endo-xylanase	<i>Escherichia coli</i>	RBB-Xylan (Remazol brilliant blue R-D-xylan)	123 U µg ⁻¹	Chuang et al., 2000

IV-Applications industrielles des xylanases

IV-1-Industrie du textile et du papier

Les xylanases ont été utilisées pour le prétraitement des fibres de jute, flex de chanvre et de ramie de mauvaise qualité. Ces fibres sont riches en hémicellulose, ce qui provoque des problèmes dans la filature. Le prétraitement des fibres avec des xylanases thermostables élimine le xylane sans compromettre la résistance et la souplesse du fil (**Patra et Madhu, 2010**).

Dans l'industrie papetière les xylanases jouent un rôle dans le Blanchissement des pâtes kraft, l'élimination des encres, la réduction de l'utilisation d'agents chlorés et alcalins, et l'amélioration des procédés mécaniques du traitement de la pâte qui engendre une économie dans la consommation d'énergie (Collins et al., 2005).

IV-2-Bioconversion lignocellulosique

La saccharification de la matière lignocellulosique par Les xylanases libère les sucres qui peuvent être utilisés pour produire le bioéthanol, le xylitol et les acides organiques (Barnard et al., 2010).

IV-2-1-Fabrication du xylitol, du 2,3 butanediol et de la vanilline

La fabrication du xylitol se fait par la réduction enzymatique du xylose en conditions alcalines ; son rendement à partir de la fraction xylane est de 50-60% ou de 8 à 15% selon le déchet agricole ou industriel utilisé (Polizeli et al., 2005 ; Dhiman et al., 2008).

L'hydrolyse d'hémicellulose donne le 2,3 butanediol qui est utilisé comme solvant, biocarburant et précurseurs de plusieurs résines et polymères synthétiques. La déshydratation du 2,3 butanediol donne le méthyle éthyle cétone qui est préféré comme biocarburant pour son faible point d'ébullition. L'acide férulique est la source d'acide cinnamique qui se trouve dans la paroi des cellules végétales, l'acide férulique estérase peut être utilisée pour convertir l'acide férulique en acide vanillique qui lorsqu'il est réduit donne la vanilline (Dhiman et al., 2008).

IV-3-Industrie alimentaire

Il existe plusieurs applications des xylanases dans l'industrie alimentaire :

- Le traitement des céréales et des millets avec la xylanase abouti à la réduction du temps de traitement lors de la fermentation de ces aliments (Maat et al, 1992).
- Le traitement de la farine de blé avec des xylanases réduit l'absorption d'eau de la pâte ainsi que les changements dans la texture du pain (Maat et al, 1992).
- Les xylanases en association avec les amylases sont capable d'améliorer la qualité et le volume du pain (Maat et al, 1992).
- Les xylanases sont également utilisés dans la clarification des jus de fruits et des vins en combinaisons avec les enzymes pectinolytiques, ils sont utilisés aussi pour la liquéfaction des fruits (Biely, 1985 ; Yusof et Ibrahim, 1994).

La figure ci dessous résume les étapes de traitement de la biomasse lignocellulosique jusqu'à obtention de différents produits à usage industriel.

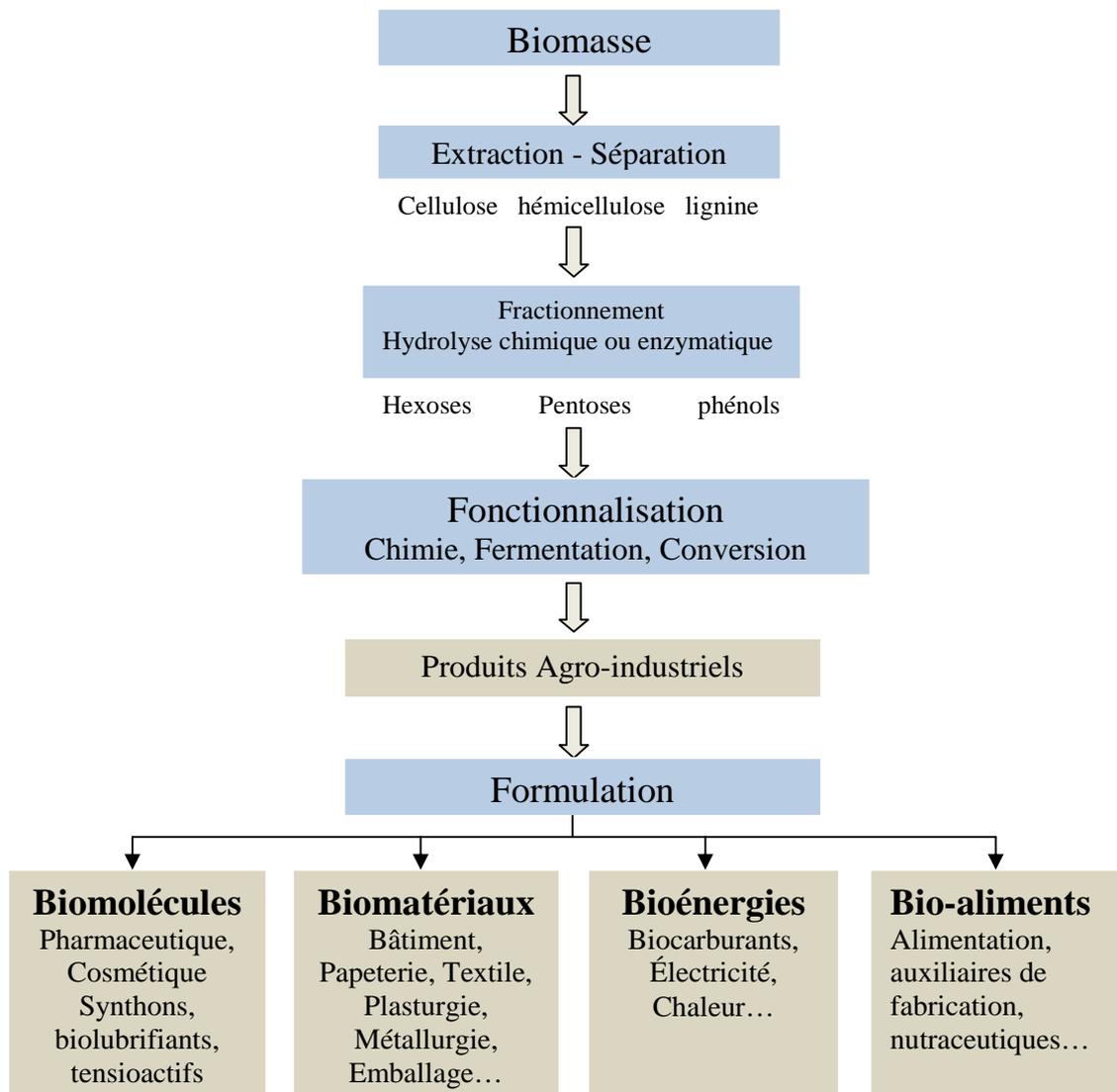


Figure 06: Schéma explicatif sur le devenir de la biomasse lignocellulosique (Hayes, 2009).

Matériels

et

Méthodes

I-Prélèvement d'échantillons

Des échantillons de sol ont été collectés en Février 2015 au niveau d'un jardin amendé avec de la bouse de veaux, ce qui engendre une activité microbienne accrue, en l'occurrence, une activité xylanasiqque qui pourrait être favorisée par l'incorporation de bouse de veaux dans le sol. Ces types d'environnements sont utilisés dans plusieurs travaux comme sources d'isolement de xylanases (Nakamura *et al.*, 1993 ; Dhillon *et al.*, 2000 ; Techapun *et al.*, 2002 ; Battan *et al.*, 2007).

Le site est situé dans la wilaya de Bejaia (Ihaddaden Ouffela, voir Fig.07). On élimine approximativement 3 centimètres de sol en surface, puis Cinq carottes de sol sont prélevées à une profondeur de 10 cm à des points différents et distants, par la suite on a réalisé un échantillon aliquote en mélangeant l'ensemble des prélèvements, 12,5 g de sol sont mis en suspension dans 250 ml d'eau distillée stérile (Boucherba, 2011).

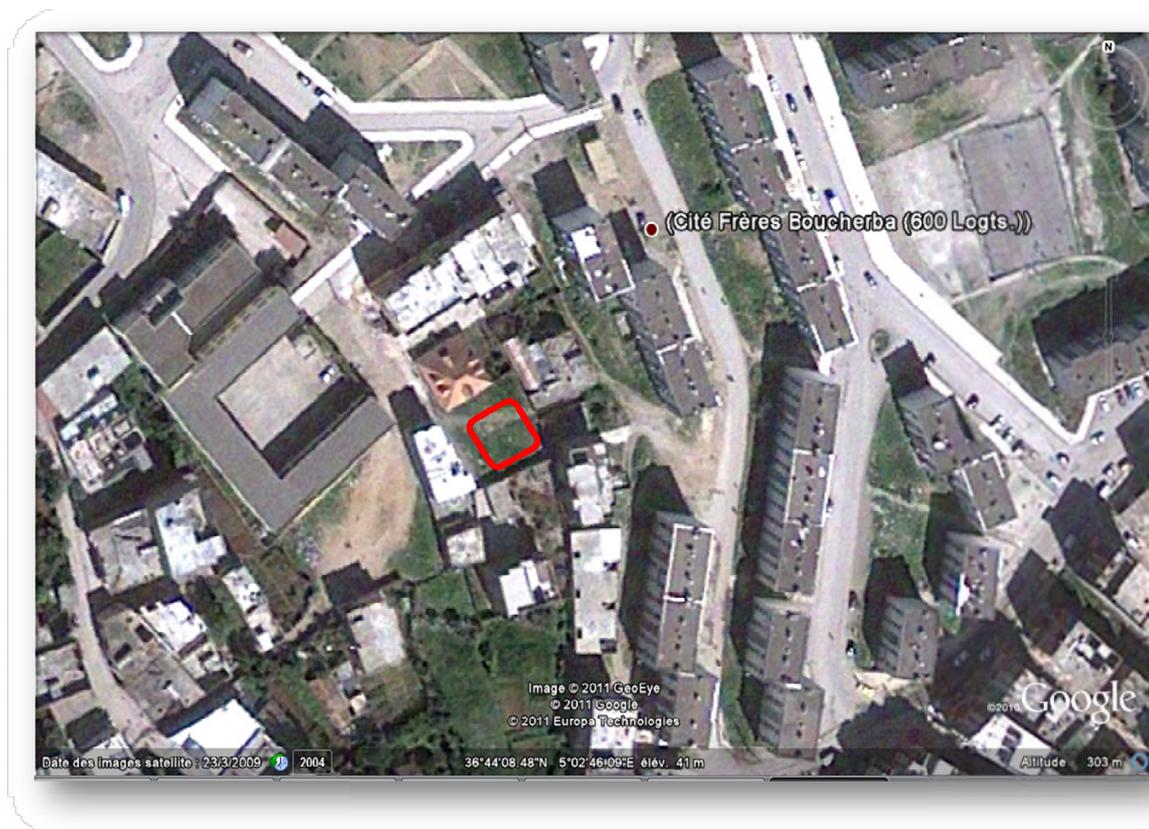


Figure 07: site de prélèvement d'échantillon de sol.

Un autre échantillon (100 ml) a été prélevé en même temps que le précédent à partir d'une source d'eau thermale (**Hamam Boughrara**) sise à Tlemcen (**Fig.08**), la température de cette eau est de 52 °C en été et 40 °C en hiver.



Figure 08: Site du prélèvement d'échantillon de la source thermale de Hamam Boughrara (Tlemcen).

II-Isolement et sélection de souches xylanolytiques

Les suspensions de sol sont agitées pendant 20 minutes à 300 rpm avec un agitateur à mouvements orbitales (Heidolph Vibramax 100) et à température ambiante, après décantation on a réalisé une série de dilutions jusqu'à 10^{-3} à partir de la solution mère. 0,1 ml de chaque dilution y compris la solution mère estensemencé en surface sur milieu solide nommé MM7 à pH 7,0 (**Annexe II**) puis incubée à 37 °C, pendant 48 à 72 heures.

1ml d'échantillon d'eau de source thermale a servis pour ensemencer deux boites de Petrie contenant le milieu MM7 à pH 7,0 puis incubées à 40 °C pendant 48 à 72 heures.

Le milieu MM7 contient le xylane de bouleau comme seule source de carbone (**Viet et al., 1991**).

II-1-Sélection sur milieu de culture solide

Les colonies qui ont montré un aspect et une couleur différents sont sélectionnées parmi l'ensemble des isolats obtenus sur milieu MM7, tous sont retenus pour le criblage, ils sont repiqués sur le milieu MM7 jusqu'à obtention de souches pures, puis conservées à 4 °C sur des géloses nutritives.

II-1-1-Révélation qualitative de l'activité xylanasiq

La révélation de l'activité xylanasiq sur milieu de culture MM7 solide se fait par inondation de la boîte avec une solution de rouge de Congo à 0,1 % pendant 30 min suivi d'un lavage avec du NaCl à 1 M (Gessesse et Gashe, 1997).

II-2-Sélection sur milieu de culture liquide et suivi de l'activité xylanasiq

Les isolats obtenus à pH 7 sont ensemencés dans des tubes contenant 05 ml du milieu MM7 liquide, après 24 heures d'incubation à 37 °C, les surnageants de cultures sont récupérés par centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 minutes.

Les isolats sélectionnés ont fait l'objet d'un suivi de l'activité xylanasiq après 17 h, 24 h, 41 h, 47 h 30 min, 65 h et 71 h 30 min.

L'activité xylanasiq dans les surnageants est mesurée selon le test à l'acide dinitrosalicylique (voir méthodes analytiques).

III-Identification de la souche

III-1-Analyse phénotypique

La caractérisation morphologique des isolats est effectuée selon les méthodes d'identification conventionnelles.

III-1-1-Observations microscopiques

Les souches âgées de 24 heures et 48 heures font l'objet d'une coloration de Gram. Un état frais est observé puis photographié au grossissement X 400 à l'aide d'un microscope optique (OPTIKA).

La mobilité est déterminée par examen microscopique des souches à l'état frais entre lame et lamelle.

IV-Méthodes analytiques

IV-1-Estimation de la biomasse

La biomasse est estimée par mesure de la densité optique des cultures à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de type Shimadzu UVmin-1240.

IV-2-Mesure de l'activité xylanasiq

L'activité xylanasiq est déterminée en présence du xylane de bouleau, qui est mis en suspension à raison de 1 % (m/v) dans du tampon phosphate sodique (50 mM à pH 7). Le mélange réactionnel est composé de surnageant de culture (100 µl) auquel est ajouté 900 µl du xylane (1 % (m/v) à pH 7). Ce mélange est chauffé à 50 °C pendant 10 min (Wang *et al.*, 2003).

Le dosage des sucres réducteurs est effectué selon la méthode de Miller (1959). La réaction enzymatique est arrêtée par addition de 1,5 ml d'une solution à base d'acide dinitrosalicylique (DNS) (Annexe III), puis le mélange est porté à ébullition pendant 5 min.

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

Une unité d'activité xylanasiq est définie comme étant la quantité d'enzyme qui produit un µmole de sucres réducteurs (équivalent en xylose) par minute, dans un ml du surnageant et dans les conditions expérimentales mentionnées ci-dessous.

L'activité xylanasiq est calculée selon Bailey et collaborateurs en 1992 comme suit:

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

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

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

D : facteur de dilution.

t : temps d'incubation (minutes).

IV-3-Dosage des sucres réducteurs

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.09**).

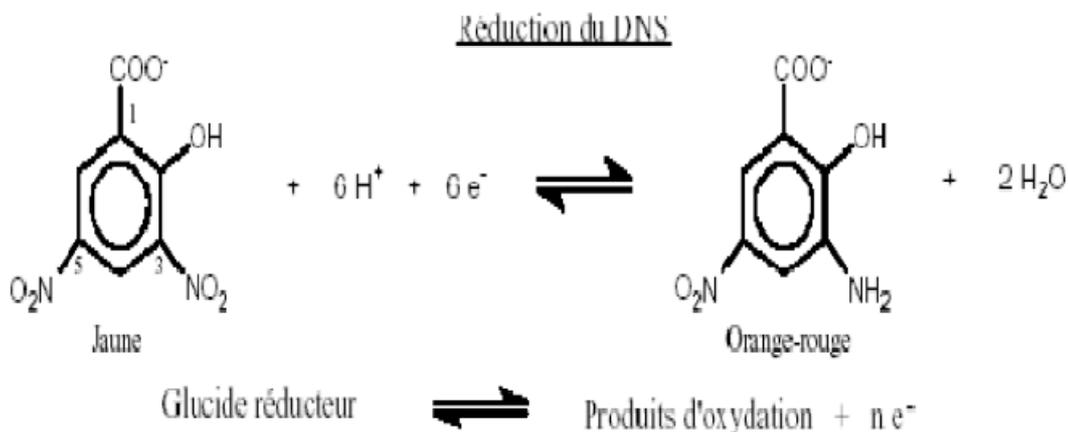


Figure 09: Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS (**Bailey et al., 1992**).

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

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

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

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

IV-4-Dosage des protéines (méthode de Bradford, 1976)

IV-4-1-Microméthode

Cette technique permet de doser des quantités de protéines comprises entre 2 et 10 $\mu\text{g/ml}$. Le dosage consiste à ajouter 800 μl d'échantillon, convenablement dilué, à 200 μl de réactifs de BIORAD. Le mélange, après homogénéisation, est ensuite placé 5 min à l'obscurité, et la densité optique est mesurée à 595 nm.

Gamme étalon :

Solution mère de l'albumine du sérum bovin (ASB) à 10 $\mu\text{g/ml}$.

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

ASB ($\mu\text{g/ml}$)	0	2	4	6	8	10
ASB (μl)	0	160	320	480	640	800
Eau déminéralisée (μl)	800	640	480	320	160	0

La gamme d'étalonnage subit les mêmes traitements cités précédemment, la courbe d'étalonnage est donnée dans (**Annexe V**).

V-Caractérisation des xylanases dans le surnageant de culture

Les cultures sont réalisées dans des Erlens Mayer d'une capacité de 250 ml contenant un volume utile de 20 ml du milieu de culture MM7 liquide ajusté à pH 7,0, l'incubation se fait dans un bain Marie agitateur (KIKA LABORTECHNIK HS-B20 digital) à 37 °C pendant 24 à 48 heures. Le milieu est ensuite récupéré puis centrifugé à 10 000 rpm pendant 10 min, le surnageant de culture est conservé à 4 °C pour utilisation ultérieure.

V-1-Affinité vis à vis du substrat

L'affinité a été déterminée vis-à-vis de trois différents substrats à citer : le xylane d'épeautre et d'avoine, le xylane de bouleau et la carboxyméthyl cellulose (CMC), le test d'activité xylanasiq ue est élaboré selon la méthode au DNS.

V-2-Température

La température optimale est déterminée en testant l'activité enzymatique entre 9 °C et 100 °C, l'activité xylanasique est mesurée selon la méthode décrite précédemment sauf que le xylane de bouleau a été remplacé par le xylane d'épeautre et d'avoine à 1 % (m/v).

V-3-pH

L'activité xylanasique est déterminée par incubation d'un mélange réactionnel composé de 0,9 ml de xylane d'épeautre et d'avoine à 1 % et de 0,1 ml de surnageant de culture à des pH variant de 4 à 10. Trois différents tampons à 50 mM sont utilisés : Le tampon acétate sodique à des pH de 4 à 5; le tampon phosphate pour les pH de 6 à 8 et le tampon Tris-HCl pour des pH_s allant de 8 à 10.

V-4-Thermostabilité

La thermostabilité est déterminée en absence du substrat à des températures de 50, 55, 60, 95 et 100 °C et en présence du substrat à 55 °C dans un intervalle de temps allant de 30 min à 7 h, l'activité xylanasique relative est par la suite calculée.

V-5-Poids moléculaires et zymogramme (SDS-PAGE selon le protocole de Laemmli, 1970)

V-5-1-Préparation des gels d'électrophorèse

On ajoute du xylane d'épeautre et d'avoine à 0,1 % (m/v) à un gel de séparation de 12 % (**Annexe IV**), ce mélange est versé entre deux plaques en verre mises dans un dispositif (Thermo Scientific) qui les maintient, le gel occupe deux tiers de la plaque. Après polymérisation, le gel de concentration à 7,5% (**Annexe IV**) est coulé au-dessus du gel de séparation, un peigne d'une épaisseur de 1,5 mm est inséré immédiatement jusqu'à complète polymérisation du gel de concentration.

V-5-2-Préparation des échantillons

Un surnageant (7,5 ml) est concentré cinq fois avec un rotavapor de marque STUART, 75 µl du surnageant concentré sont mélangés avec 25 µl du tampon d'échantillon (**Annexe IV**). Un kit de marqueurs protéiques de type Thermo Scientific contenant 10 protéines ayant les poids moléculaires suivants : 11, 17, 26, 34, 43, 55, 70, 95, 130 et 250 KDa, l'échantillon et les marqueurs sont déposés dans les puits du gel afin d'estimer le poids moléculaire de la ou les xylanases de la souche la plus productrice.

V-5-3-Réalisation de l'électrophorèse

Tout d'abord le peigne est retiré du gel et les plaques sont mises dans la cuve d'électrophorèse (**Fig.10**), le compartiment intérieur et extérieur sont remplis avec du tampon de migration (**Annexe IV**), L'échantillon (20 μ l à raison de 20 μ g) et les marqueurs à raison de 10 μ l sont déposés dans les puits, La migration se fait à 150 V (43 mA), on arrête la migration après que le bleu de bromophenol est à 1 centimètre du bord inférieur du gel.



Figure 10 : Cuve et accessoires du dispositif d'électrophorèse (Thermo Scientific).

V-5-4-Coloration au bleu de Coomassie et réalisation du zymogramme

La migration est arrêtée lorsque le bleu de bromophénol est à 1cm du bord inférieur de la plaque, une fois la migration est terminée, la visualisation du profil de migration se fait après le traitement du gel comme suit :

- le gel est rincé à l'eau distillée et coupé en deux portions, le premier gel sert pour la réalisation de la coloration au bleu de Coomassie R250 et le deuxième gel pour la réalisation du zymogramme.

Pour la coloration au bleu de Coomassie le gel subi les traitements suivants :

- Rinçage à l'eau distillée puis coloration dans la solution de bleu de Coomassie R250 (**Annexe IV**) sous faible agitation jusqu'à coloration des bandes en bleu ;
- Lavage à l'eau distillée puis trempage dans la solution de décoloration (**Annexe IV**) avec un changement de bain (2 à 3 fois).

Les masses moléculaires des xylanases sont déterminées en utilisant la courbe d'étalonnage « $R_f = f(\log PM)$ ». Le rapport frontal (Rf) est calculé selon la formule suivante :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par la protéine}}{\text{Distance de migration du bleu de bromophénol}}$$

Le deuxième gel destiné pour la réalisation du zymogramme, subit les traitements suivants (**Gallardo et al., 2004**):

- Immersion dans une solution de Triton X-100 à 2,5 % (m/v) pendant 30 min ;
- le gel est débarrassé du Triton X-100 par rinçage à l'eau distillée puis incubé dans du tampon phosphate 50 mM à pH 7 à 55 °C pendant 20 min ;

- Coloration au rouge de congo (0,1 %) pendant 20 min ;
- Lavage avec une solution de NaCl à 1 M ;
- Immersion dans de l'acide acétique à 0,5 % (m/v) pour stopper la réaction et augmenter le contraste .

Résultats

et

discussions

I-Isolement de souches xylanolytiques

Une dizaine de souches xylanolytiques sont isolées sur un milieu minimal à pH 7 (MM7) contenant le xylane de bouleau, dont 8 isolats sont obtenus à partir de sol de jardin (SJ1, SJ2, SJ3, SJ4, SJ5, SJ6, SJ7 et SJ8) (**Fig.11**) incubés à 37 °C pendant 24 à 48 heures et 2 isolats sont obtenus à partir d'eau de source thermale (ET1 et ET2) incubés à 40°C pendant 24 à 48 heures.

Cette sélection sur milieu solide a pour but la révélation de l'activité xylanasiq ue des isolats (**Fig.12**).

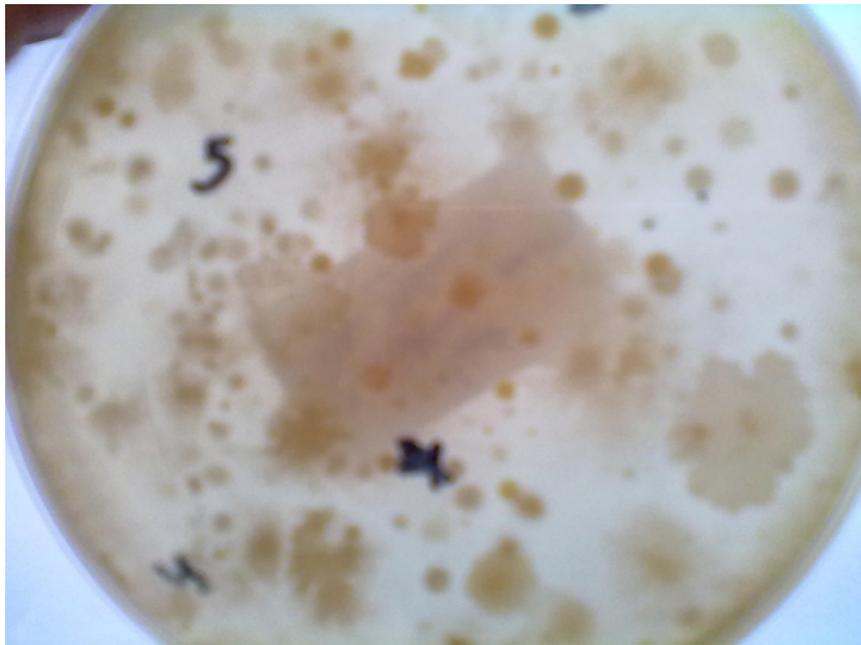


Figure 11: L'aspect des colonies de quelques isolats du sol de jardin.

La révélation qualitative de l'activité xylanasiq ue a montré après application du rouge de congo à 0,1 % qui interagit avec les xylooligomères pour former des zones oranges claires sur gélose colorée en rouge, ce ci est dû à l'hydrolyse du xylane de bouleau par les xylanases produites par les isolats (**Fig.12**).

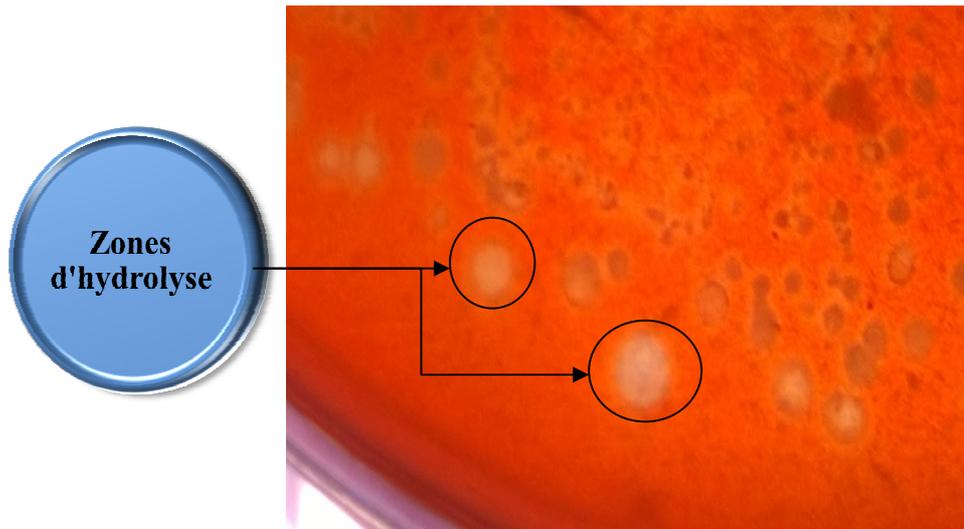


Figure 12: Révélation de l'activité xylanasiq sur milieu MM7 solide.

I-1-Sélection sur milieu de culture liquide et estimation de la biomasse

Cette sélection est basée sur la mesure de l'activité xylanasiq dans un milieu de culture MM7 liquide, la croissance bactérienne est suivie par mesure de la biomasse à 600 nm.

Les résultats des activités des 10 souches sélectionnées ainsi que les absorbances à 600 nm sont rassemblés dans le Tableau VIII.

Tableau VIII: Estimation de la croissance des dix isolats et mesure de l'activité xylanasiq.

Souches	Absorbance à 600 nm	Activité xylanasiq (U/ml) (à 50 °C et à pH 7)
ET1	0,36	0,33
ET2	0,50	1,57
SJ1	0,38	0,4
SJ2	0,66	0,29
SJ3	0,12	0,7
SJ4	0,64	2,2
SJ5	0,38	0,6
SJ6	0,45	0,4

SJ7	0,16	0,41
SJ8	0,26	0,3

Les souches ET2, SJ3, SJ4 et SJ5 révèlent des activités xylanasiques relativement importantes. Cependant la souche SJ4 présente la meilleure activité xylanasique (2,2 U/ml). Si on compare nos résultats avec ceux de Boucherba (2011), on remarque que l'activité de la SJ4 est sensiblement identique à l'activité de l'isolat SJ11 qui est de 2,33 U/ml, par contre elle est inférieure à l'activité xylanasique de l'espèce *Jonesia denitrificans* BN13 qui est de 3,79 U/ml.

A partir de ces résultats, les quatre souches ont fait l'objet d'un suivi de l'activité xylanasique après 17 h, 24 h, 41 h, 47 h 30 min, 65 h et 71 h 30 min (**Fig.13**).

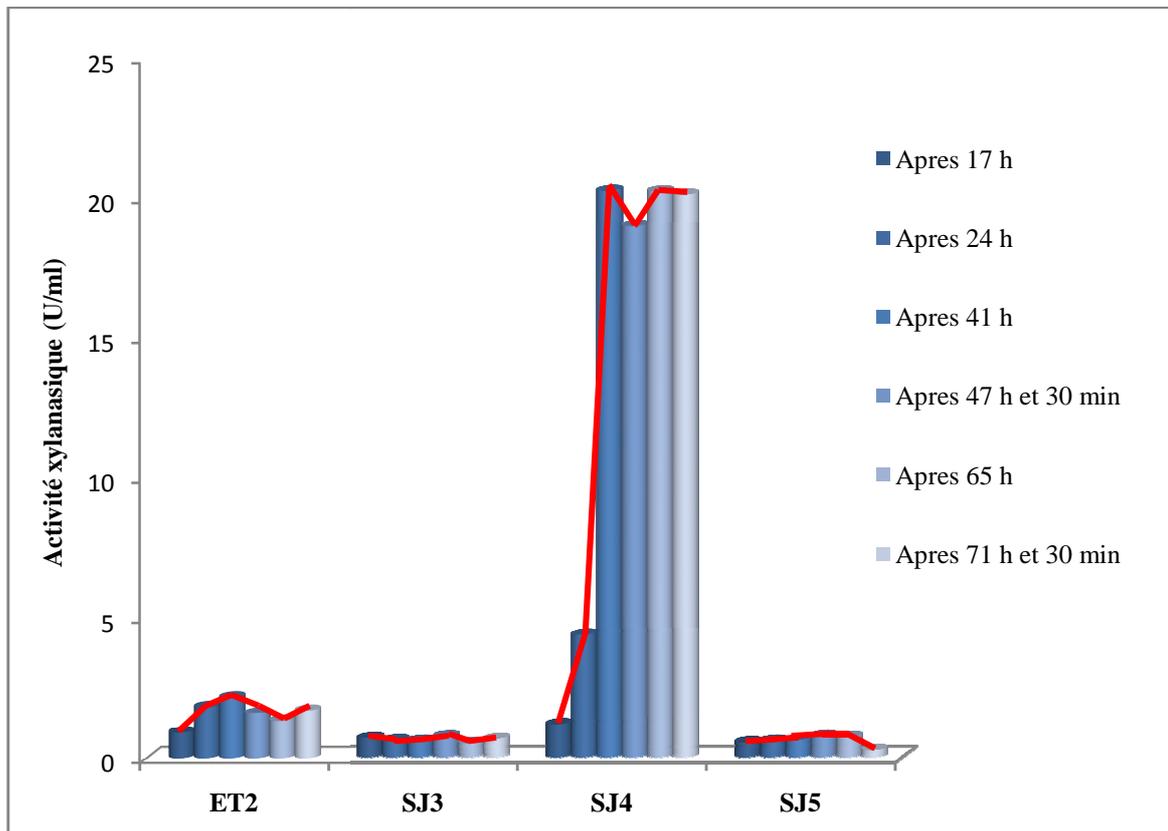


Figure 13: Suivi des activités xylanasiques des isolats ET2, SJ3, SJ4 et SJ5.

L'isolat ET2 présente une activité plus importante que les isolats SJ5 et SJ3, l'activité est estimée à 2,15 U/ml au bout de 41 h d'incubation.

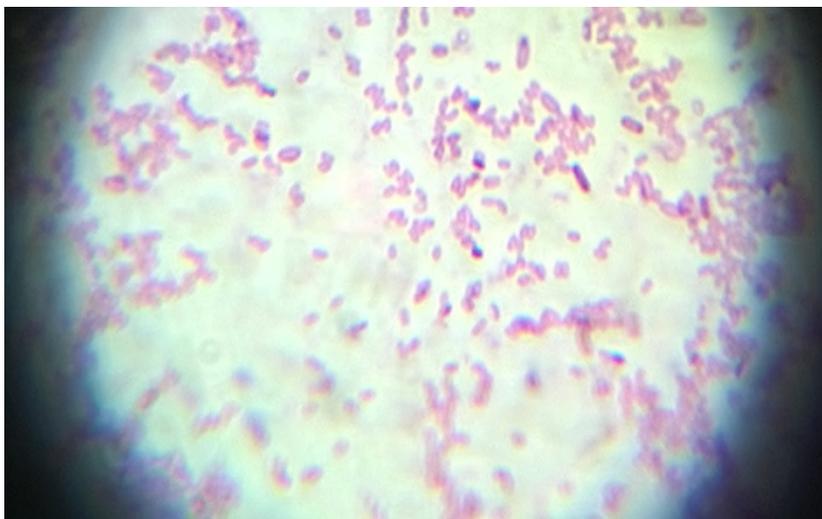
La souche SJ4 comme présenté dans la figure montre une forte activité xylanase qui atteint un maximum de 20,24 U/ml au bout de 41 heures. De ce fait la souche SJ4 est retenue comme étant la meilleure souche productrice de xylanase, et fera l'objet d'étude de ce travail.

II- Caractérisation morphologique de l'isolat SJ4

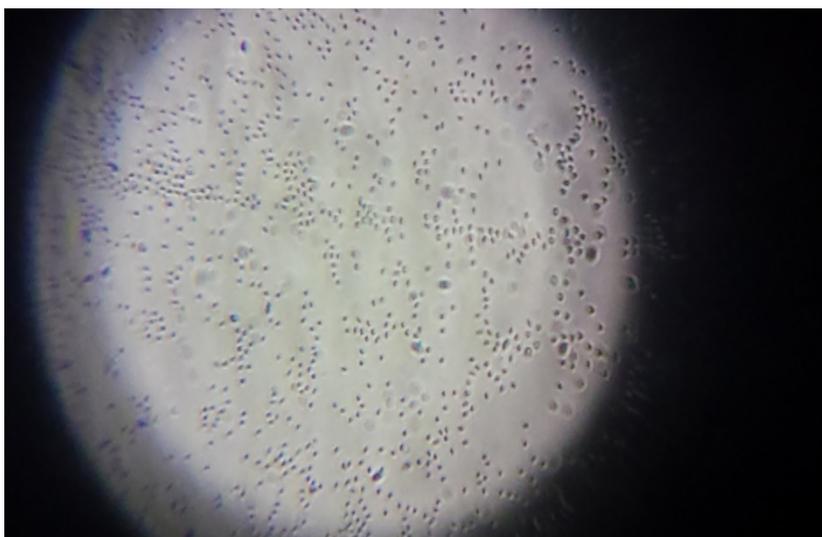
II-1- Identification phénotypique

II-1-1- Observations microscopiques

L'observation au microscope optique révèle des petits bacilles Gram négatif (**Fig.14. a**), à l'état frais, la souche se présente sous forme de bacilles courts à extrémités arrondies et mobile (**Fig.14. b**).



(a) : Coloration de Gram
(Grossissement X 1000).



(b) : bactéries à l'état frais
(Grossissement X 400).

Figure 14: Observation microscopique de l'isolat SJ4 (a) : Coloration de Gram (Grossissement X1000), (b) : bactéries à l'état frais (Grossissement X 400).

III-Production des xylanases de l'isolat SJ4

On a récupéré 37 ml du surnageant de culture contenant des xylanases extracellulaires, Les résultats montrent une activité de 20,24 U/ml au bout de 41 h, probablement l'isolat SJ4 était en fin de phase exponentielle ou au début de la phase stationnaire.

IV-Characterisation des xylanases dans le surnageant

IV-1-Affinité vis-à-vis du substrat

L'affinité vis-à-vis du xylane de bouleau (20,24 U/ml), le xylane d'épeautre et d'avoine et la CMC cellulose est illustrée dans la figure 15. La meilleure activité xylanasiqque est obtenue avec le xylane de bouleau, ce résultat est en accord avec les travaux de Xu et collaborateurs en 2005, ces derniers ont mesuré les activités xylanasiqques chez l'espèce *Pseudomonas stutzeri* NRRL-B-30615 et l'espèce *Pseudomonas sp* WLUNO24. La ou les xylanases de l'isolat SJ4 catalysent également le xylane d'épeautre et d'avoine (16,7 U/ml), Georis et collaborateurs en 2000 ont rapporté un résultat de (31 U/ml) avec la même source de carbone avec l'espèce *Streptomyces actuosus* A-151.

La xylanase ou les xylanases semblent être bifonctionnelles c'est-à-dire capables d'hydrolyser la CMC cellulose néanmoins l'activité reste faible (3,99 U /ml).

Probablement Certaines xylanases ou l'ensemble de ces enzymes ne sont pas des vraies xylanases, elles pourraient être utilisées dans la bioconversion des hémicelluloses afin de produire divers métabolites à savoir le bioéthanol.

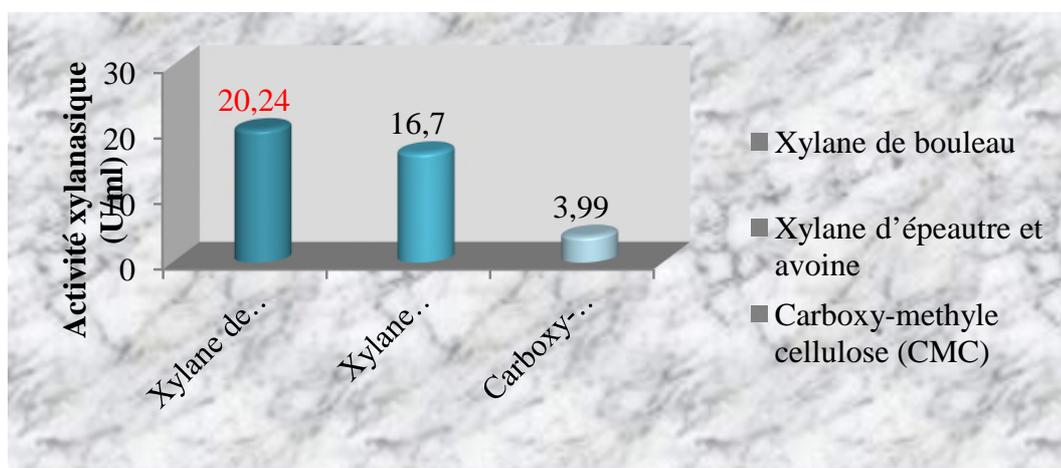


Figure 15: Affinité de la xylanase ou les xylanases vis-à-vis de trois substrats.

IV-2-Effet de la température et du pH

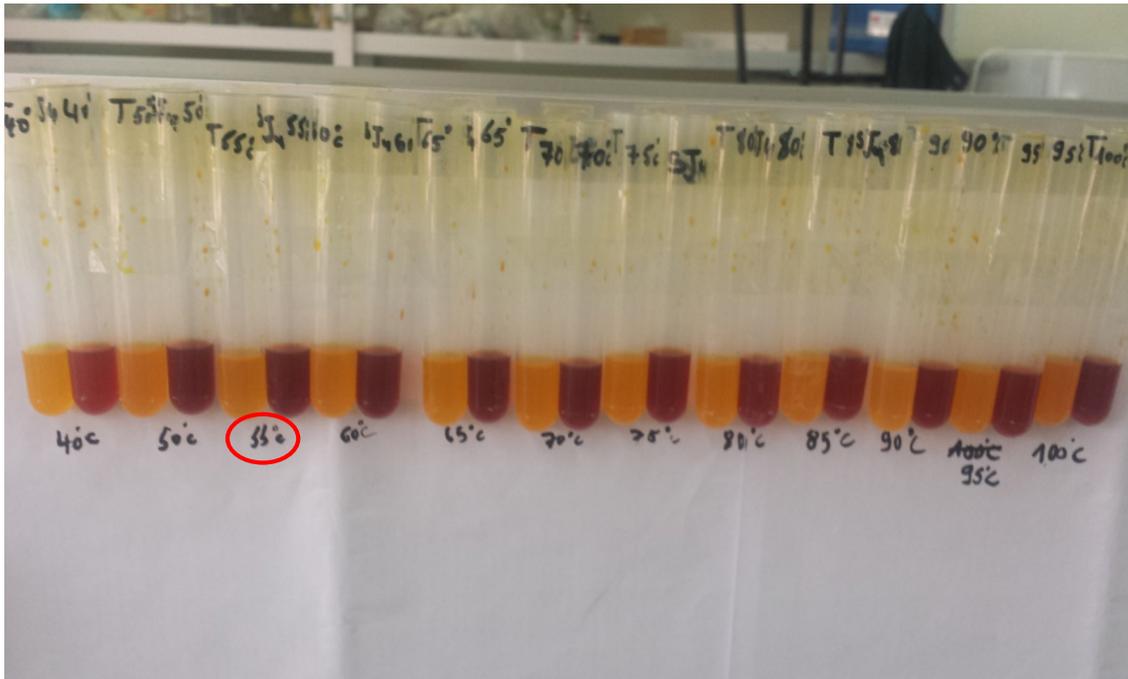
L'effet de la température sur l'activité xylanase est illustré dans les figures ci-dessous (**Fig.16.a et b**). On constate que la température optimale est de 55°C pour une activité xylanase de 19,58 U/ml (en utilisant le xylane d'épeautre et d'avoine comme substrat) ; Cheng et collaborateurs en 2009 ont étudié la xylanase produite par *Bacillus alcalophilus*, ils ont rapporté une température optimale similaire avec celle de l'isolat SJ4.

Lorsque la température est de 9°C, l'activité relative est de 82,73 %, et lorsque la température est de 100°C, l'activité relative est de 88,86%. Ce qui montre que la ou les xylanases de l'isolat SJ4 peuvent catalyser des réactions entre 9 °C et 100 °C, ce qui est très intéressant et nécessiterai une étude plus approfondie de la séquence en acides aminés ainsi que de la structure tridimensionnelle de la xylanase. Ce qui permettrait à ces xylanases de les utiliser dans les applications alimentaires et non alimentaires (biocarburants verts).

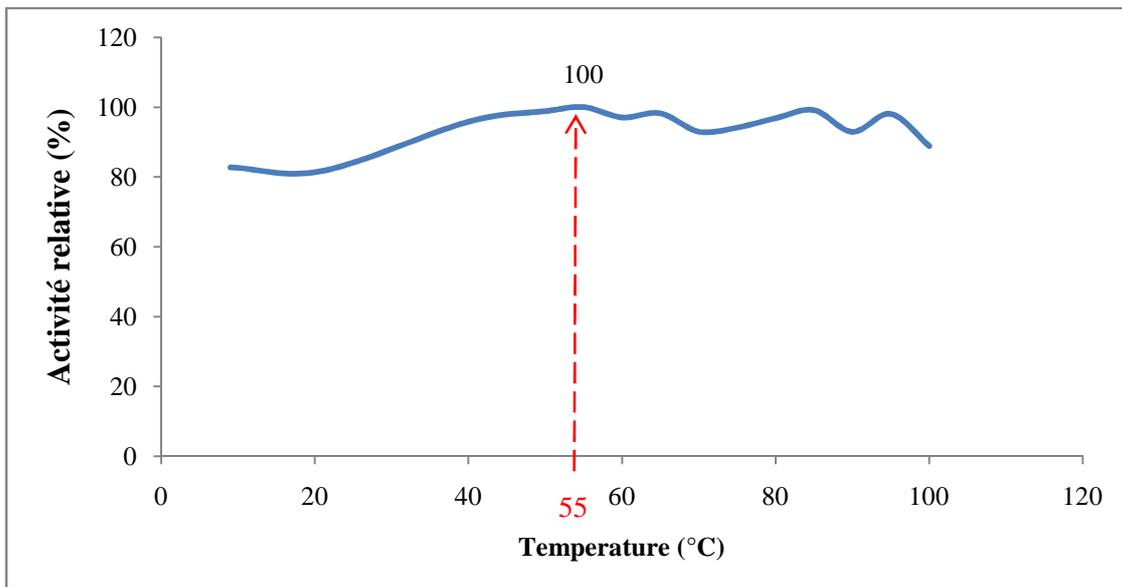
Tableau IX: Comparaison de l'activité xylanase de quelques espèces dans leurs optimums de température.

Souche	Température optimum (°C)	Activité xylanase (U/ml)	Référence
SJ4	55	20,24	Présent travail
<i>Jonesia denitrificans</i>	50	10,80	Boucherba et al., 2011
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	50	0.7	Song et Wei, 2010

L'activité xylanase de l'isolat SJ4 est beaucoup plus élevée à son optimum de température de 55 °C par rapport à celles de *Jonesia denitrificans* et *Cellulosimicrobium cellulans* ayant un optimum de 50 °C.



(a): Tubes présentant les résultats des activités xylanasiques en fonction des différentes températures.



(b): Graphique représentant l'activité xylanasique relative en fonction de la température.

Figure 16: Effet de la température sur l'activité xylanasique (a): Tubes présentant les résultats des activités xylanasiques en fonction des différentes températures, (b): L'activité xylanasique relative en fonction de la température.

Concernant le pH, L'activité xylanasiqne est importante entre 4,0 et 10,0 avec un optimum à pH 7,0 (**Fig.17**), ces résultats concordent avec les pH des xylanases produites par les souches *Bacillus stearothermophilus* (**Zamost et Elm, 1996**), *Bacillus licheniformis* A 99 (**Archana et Satyanarayana, 1997**), *Thermotoga thermarum* (**Sunna et al., 1999**), on a également remarqué une activité relativement élevée à pH 4 pour des résultats comparables à ceux de Uchino et Fukuda en 1983 concernant la souche *Bacillus acidocaldarius*, les mêmes résultats ont été observé à pH 10 et qui sont similaires avec ceux de l'espèce *Bacillus sp.* C-125 (**Honda et al., 1985**).

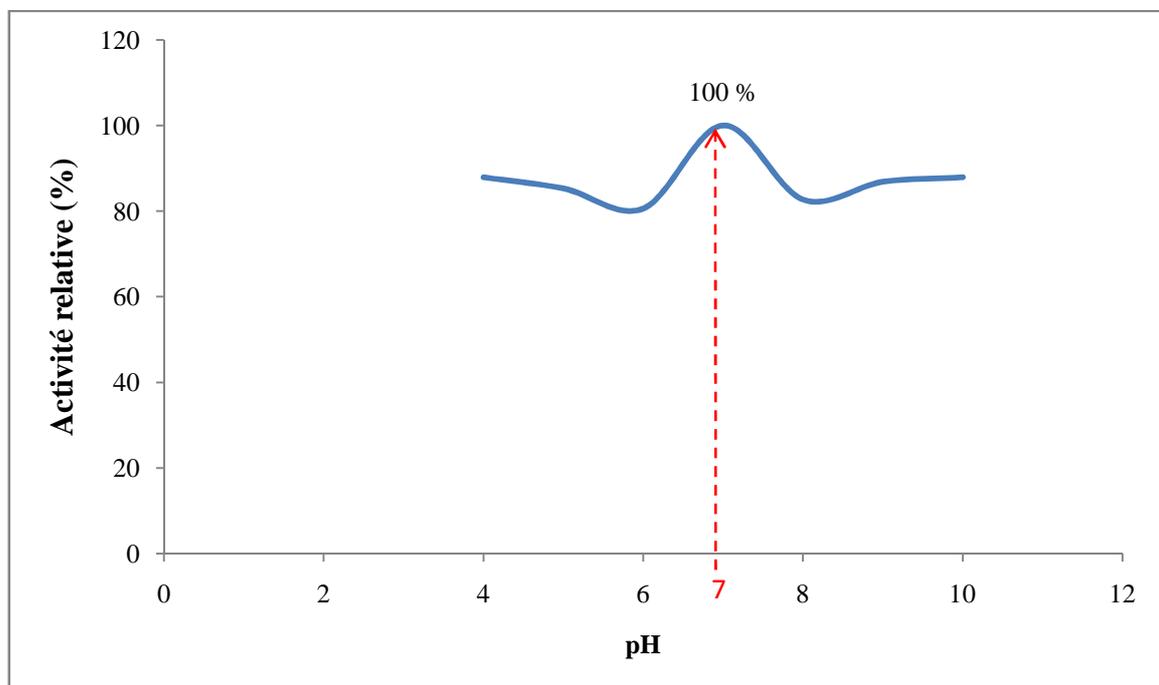


Figure 17: graphe représentant l'activité xylanasiqne relative en fonction de la variation du pH.

IV-3-Thermostabilité en absence du substrat

La thermostabilité est étudiée en absence du substrat en incubant le surnageant jusqu'à 7 heures à des températures de 50, 55, 60, 95 et 100 °C (**Fig.18**).

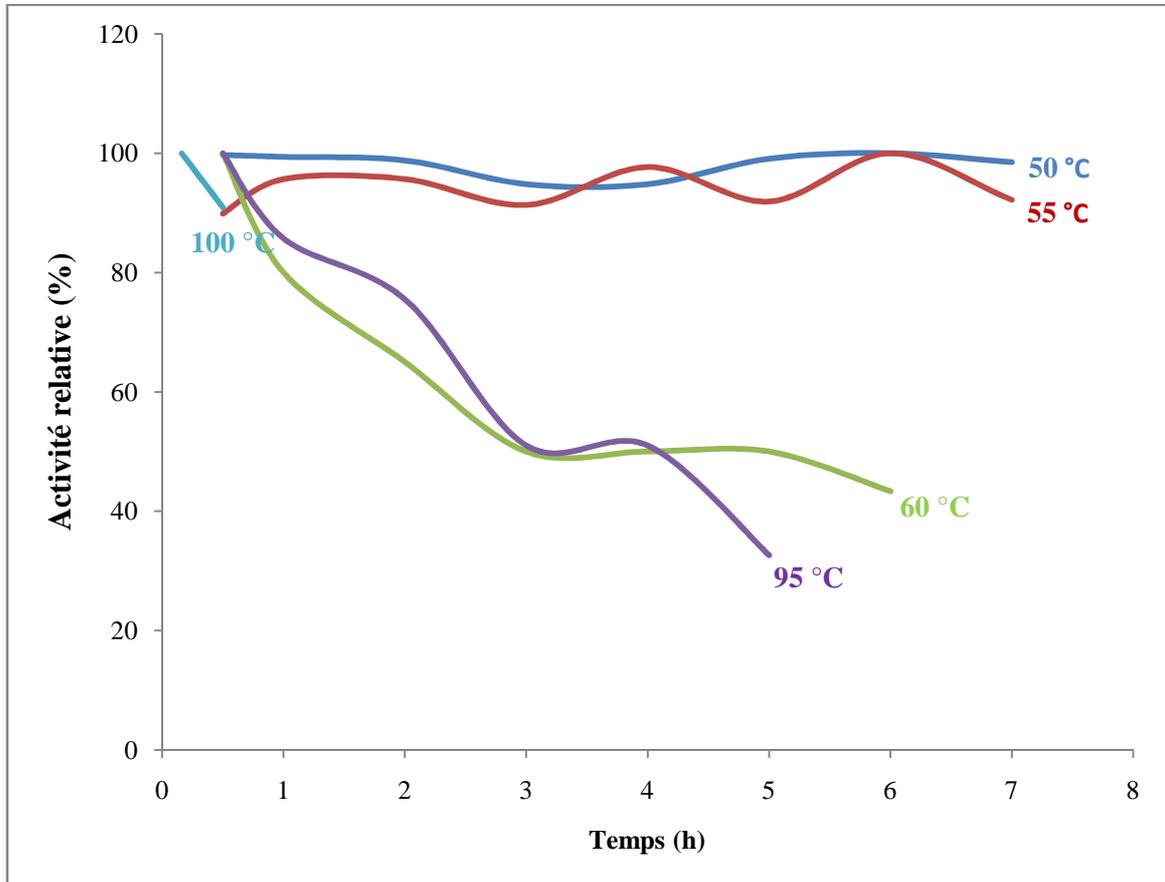


Figure 18: Thermostabilité de la ou les xylanases en absence du substrat.

On a marqué une bonne thermostabilité à 55 °C qui atteint son maximum au bout de 6 heures (17,3 U/ml). Une thermostabilité a été également observée à 50 °C au bout du même temps (16,4 U/ml). La thermostabilité à 60, 95 et 100 °C décroît en fonction de temps.

Les temps de demi-vie sont déterminés graphiquement (Log de l'activité relative en fonction de temps) pour les températures: 60, 95 et 100 °C (**Fig.19**).

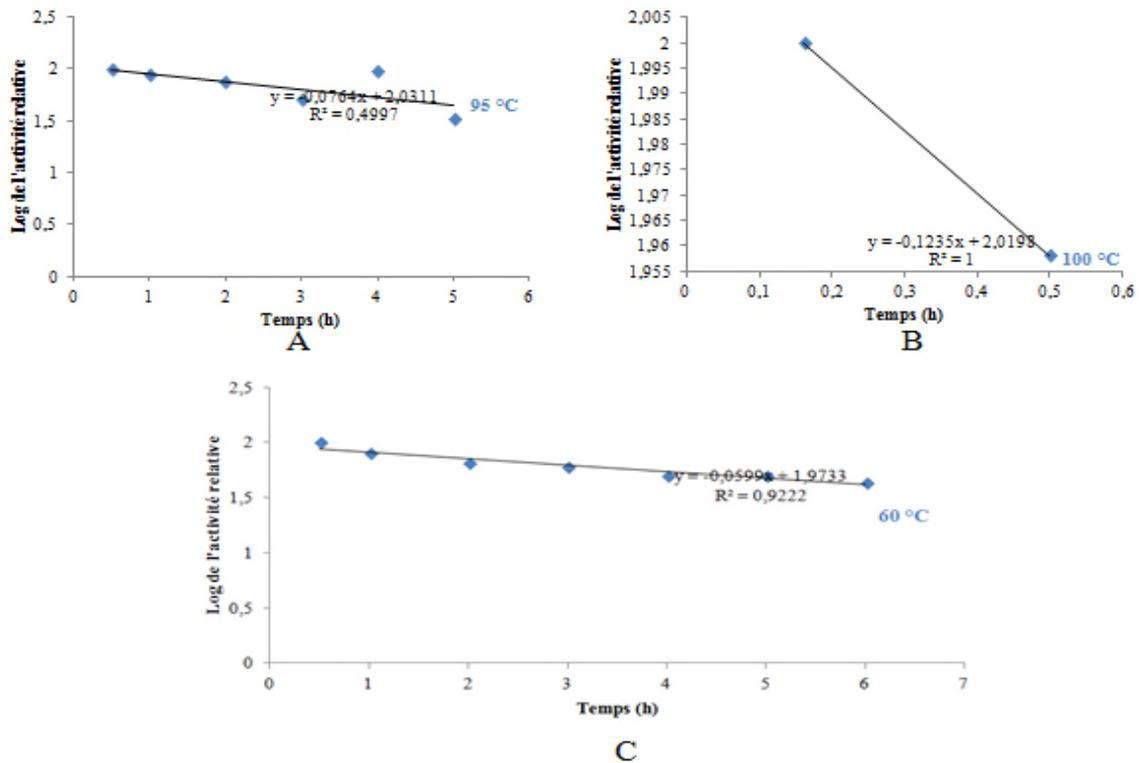


Figure 19: Evolution du Log de l'activité relative en fonction du temps en absence du substrat.

A 60 °C le temps de demi-vie de la xylanase est de 4,72 h (**Fig.19.C**). Song et collaborateurs en 2014 ont rapportés des résultats similaires avec la xylanase (NTfus) de *Thermobacillus xylanilyticus*.

A 95 °C le temps de demi-vie de la xylanase est de 4,46 h (**Fig.19.A**).

A 100 °C le temps de demi-vie de la xylanase est de 2,67 h (**Fig.19.B**), ce résultat est obtenu au bout de trois essais, ce qui révèle que la xylanase produit par l'isolat SJ4 présente sans doute une thermostabilité comparable aux archeas hyperthermophiles et aux espèces du genre *Thermotoga*.

A 50 °C et à 55 °C, on n'a pas pu déterminer le temps de demi-vie car il fallait pousser le test de l'activité xylanasiq ue plus de 7 heures. Au bout de cette durée (7 heures) l'activité relative est restée importante (entre 80 et 100 %), ce qui nous permet de dire que les enzymes de l'isolat SJ4 sont plus thermostables à ces deux températures en comparaison avec les autres températures (60, 95 ,100 °C).

Tableau X: Comparaison des temps de demi-vie entre les xylanases de plusieurs microorganismes à différentes températures.

Souches	Températures (°C)	Temps de demi-vie (h)	Références
SJ4	50	ND	Travail actuel
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	50	51	Gomes et al., 1993
SJ4	55	ND	Travail actuel
<i>Aspergillus nidulans</i>	55	2	Fernandez-Espinar et al., 1993
SJ4	60	4,72	Travail actuel
<i>Chaetomium thermophilum</i>	60	25	Hakulinen et al., 2003
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	60	8	Gomes et al., 1993
SJ4	95	4,46	Travail actuel
<i>Thermotoga maritima</i>	95	2,08	Winterhalter C et Liebel W, 1995
<i>Nonomuraea flexuosa</i>	95	0,65	Hakulinen et al., 2003
SJ4	100	2,67	Travail actuel
<i>Nonomuraea flexuosa</i>	100	0,46	Hakulinen et al., 2003

ND: Non Déterminé.

Les temps de demi-vie de l'activité xylanasique des souches *Chaetomium thermophilum* et *Thermomyces lanuginosus* sont plus importants par rapport à l'isolat SJ4 (4,72 h) à 60 °C, tandis que à 95 °C le temps de demi-vie de la SJ4 (4,46 h) est plus élevé que ceux de *Thermotoga maritima* et *Nonomuraea flexuosa*, à 100 °C *Nonomuraea flexuosa* présente un temps de demi-vie moins important par rapport a la SJ4 qui a marqué un temps de (2,67 h) ce qui montre sa grande thermostabilité.

IV-4-Thermostabilité en présence du substrat

La thermostabilité est étudiée en incubant le surnageant jusqu'à 7 heures à une température de 55 °C (Fig.20).

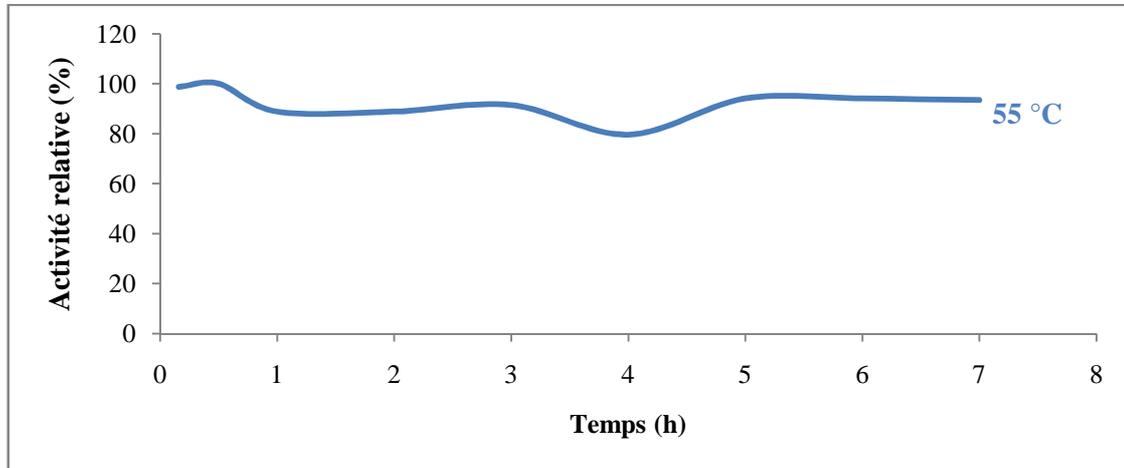


Figure 20: Thermostabilité de la ou les xylanases en présence du substrat à 55 °C.

En présence du substrat, la thermostabilité des enzymes produites par l'isolat SJ4 a été marquée importante au bout de 7 heures pour atteindre un maximum d'activité après 30min d'incubation (15,2 U/ml).

La thermostabilité en présence du substrat à 55 °C a été déterminée par le calcul du temps de demi-vie à partir du graphique ci-dessous (Fig.21).

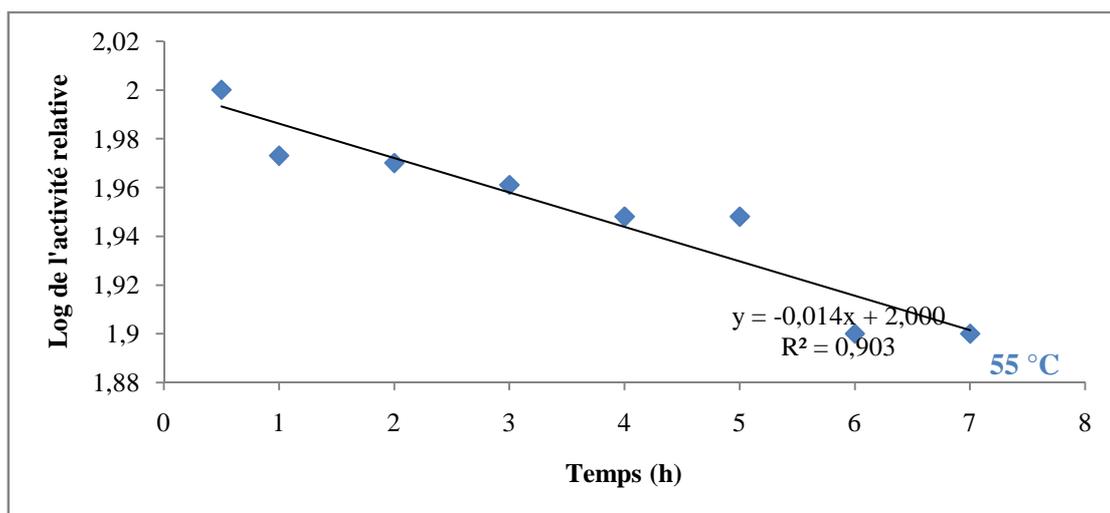


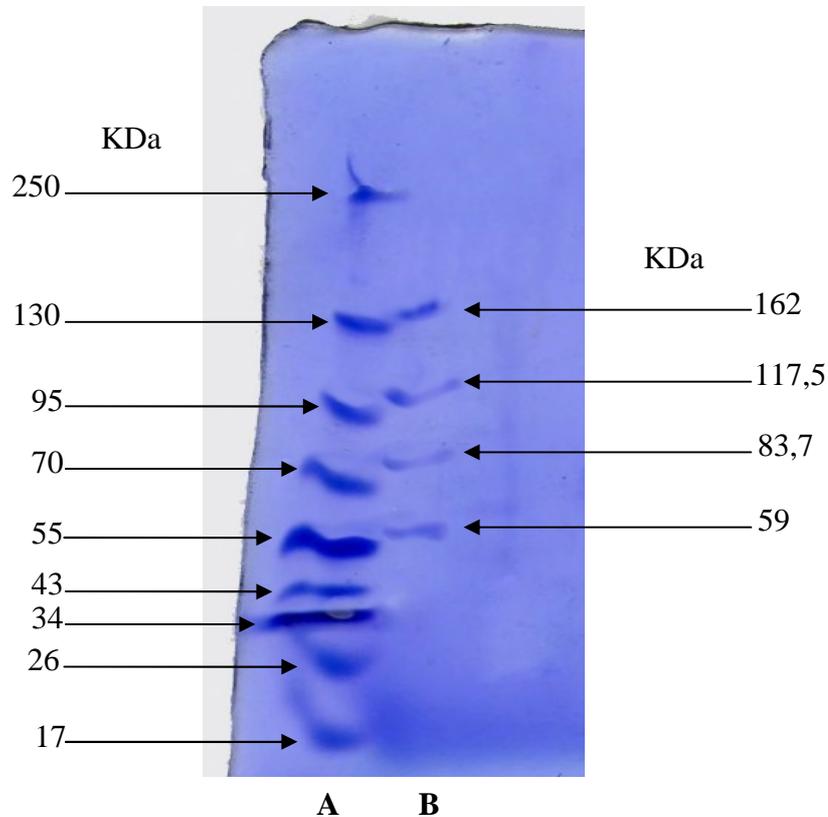
Figure 21: Evolution du Log de l'activité relative fonction du temps en présence du substrat.

Le temps de demi vie est de 22,00 h en présence du substrat, Boucherba et collaborateurs en 2013 ont rapportés un temps de demi-vie de 7 h avec *Jonesia denitrificans* à 50 °C, ce qui prouve que la ou les xylanases de l'isolat SJ4 sont très thermostables et prometteuses pour un vaste secteur industriel (alimentaire et non alimentaire).

V-Electrophorèse (SDS -PAGE) et zymogramme

Selon le profil de migration des protéines sur SDS-PAGE (**Fig.22**) qui montre la présence de quatre bandes protéiques dans le surnageant de culture, la courbe d'étalonnage des marqueurs pour SDS-PAGE (**Annexe IV**) permet d'estimer les poids moléculaires des quatre bandes protéiques obtenues. La première protéine possède un poids moléculaire (PM) de 162 KDa, suivie de la deuxième 117,5 KDa, la troisième protéine vient juste après avec PM de 83,7 KDa, et la dernière ayant un PM de 59 KDa. Si toutes les protéines étaient des xylanases, elles sont induites par le xylane d'épeautre et d'avoine car les xylanases possédant un poids moléculaire inférieur à 40 KDa sont des xylanases constitutives.

Le profil du zymogramme était négatif vu que le gel a été mis par erreur dans la solution de coloration au bleu de Coomassie donc on ne peut pas révéler sur gel la présence de xylanases.



A: PM des marqueurs de taille, B: PM des 4 bandes protéiques obtenues.

Figure 22: Profil de migration des protéines sur SDS-PAGE.

Selon les travaux de Boucherba et collaborateurs en 2014, la souche *Jonesia denitrificans* BN13 produit six xylanases possédant des PM de 250 ; 150 ; 70 ; 42 ; 40 et 26 KDa, alors que dans le présent travail c'est 4 xylanases (si zymogramme positif) ayant des PM de 162 ; 117,5 ; 83,7 et 59 KDa.

Conclusion

et

perspectives

Conclusion & perspectives

Dans ce travail, des isolats xylanolytiques ont été obtenus à partir d'un sol de jardin à Bejaia, et à partir d'eau d'une source thermale sise à Tlemcen, et sont par la suite examinés pour leurs activités xylanasiques.

Dix isolats ont été sélectionnés sur milieu solide à base de xylane de bouleau et d'épeautre et d'avoine, dont huit proviennent de l'échantillon aliquote du sol de jardin (il s'agit de : SJ1, SJ2, SJ3, SJ4, SJ5, SJ6, SJ7 et SJ8) et deux sélectionnées à partir de l'échantillon de la source thermale (ET1 et ET2).

Les isolats sont par la suite mis en cultures sur milieu liquide MM7 afin d'estimer la croissance bactérienne et de mesurer l'activité xylanasiqne dont le but est de sélectionner les souches les plus performantes.

D'après les activités xylanasiques sur milieu liquide, l'isolat SJ4 a présenté une activité de 20,24 U/ml, sur cette base nous avons retenu cet isolat pour la suite des travaux.

Une série de tests physicochimiques ont été menés sur le surnageant de culture de l'isolat SJ4 pour aboutir à des résultats qui révèlent une grande affinité de la ou les xylanases produites par cet isolat vis-à-vis du xylane de bouleau, un optimum de température de 55 °C et un pH optimum de 7,0, et montrent également une grande thermostabilité à 50 et 55 °C en absence du substrat et à 55 °C en présence de ce dernier, avec un temps de demi-vie de 22 heures. Ces résultats révèlent aussi que la ou les xylanases du surnageant de culture sont actives sur une large gamme de température allant de 9 °C jusqu'à 100 °C.

Le profil de migration sur SDS- PAGE montre la présence de 4 protéines ayant des poids moléculaires respectifs de: 162 ; 117,5 ; 83,7 et 59 KDa.

Diverses industries s'intéressent à l'ensemble de ces propriétés qui répondent à leurs exigences telles que la thermostabilité et l'alcalophilie pour l'industrie papetière ainsi que pour la production du bioéthanol.

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

- ✓ Le séquençage de l'ARN 16s a été entamé au niveau du laboratoire de microbiologie de l'université Aix Marseille.
- ✓ Une mise en culture de l'isolat dans un fermenteur de 1,5L et éventuellement dans un fermenteur pilote.
- ✓ Purification et caractérisation d'une ou plusieurs xylanases en utilisant le système a deux phases aqueuses compatibles avec l'industrie (économie viable).
- ✓ Refaire le zymogramme et faire une focalisation isoélectrique afin de déterminer le point isoélectrique.
- ✓ Etude de la séquence protéique.
- ✓ Déterminer la composition en acides aminés du site actif de l'enzyme afin de l'affilier à une famille bien déterminée.

Références

bibliographiques

Références bibliographiques

A

- ❖ Adler E. (1977). Lignin chemistry: past, present and futures. *Wood Sci.Technol.* **11**, 169–218.
- ❖ Amore A, Pepe O, Ventorino V, Aliberti A et Faraco V. (2013). Cellulolytic *Bacillus* strains from natural habitats - a review. *Chimica Oggi - Chem Today.* **31**, 6–9.
- ❖ Archana A et Satyanarayana T. (1997). Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A 99 in solid state fermentation. *Enzyme Microbiol. Technol.* **21**, 12-17.
- ❖ Atalla RH et Vanderhart DL. (1984). Native Cellulose: A Composite of Two Distinct Crystalline Forms. *Science* **223**, (4633), 283-285.

B

- ❖ Bailey MJ, Biely P, Poutanen K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J Biotechnol.* **23**, 257-270.
 - ❖ Barnard D, Casanueva A, Tuffin M et Cowan D. (2010). Extremophiles in biofuel synthesis. *Environ. Technol.* **31**, 871–888.
 - ❖ Bataillon M, Cardinali APN, Duchiron F. (1998). Production of xylanases from a newly isolated alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp. *Biotechnol Lett.* **20**, 1067-1071.
 - ❖ Battan B, Sharma J, Dhiman SS et Kuhad RC. (2007). Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. *Enzyme Microb Tech.* **41**, 733-739.
 - ❖ Biely P, Puls J et Schneider H. (1985). Acetyl xylan esterases in fungal cellulolytic systems. *FEBS Lett.* **186**, 80-84.
 - ❖ Boucherba N. (2014). Characterization of the xylanase produced by *Jonesia denitrificans* BN13. *Appl Biochem biotechnol.* **172**, 2694- 2705.
 - ❖ Boucherba N. (2011). Production, purification et caractérisation d'une xylanase produite par *Jonesia denitrificans* BN13. Thèse de doctorat en science biologique. Université d'Abd-Arrahman MIRA de Béjaïa, Faculté des sciences et de la vie, 108.
-

- ❖ Boucherba N, Benallaoua S, Copinet E, Hebal H et Duchiron F. (2011). Production and partial characterization of xylanase produced by *Jonesia denitrificans* BN13 isolated in Algerian soil. *Process Biochem.* **46**, 519- 525.
- ❖ Boucherba N, Gagaoua M, Copinet E, Bettache A, Duchiron F et Benallaoua S. (2013). Purification and Characterization of the Xylanase Produced by *Jonesia denitrificans* BN-13. *Appl Biochem Biotechnol.* DOI 10.1007/s12010-013-0709-x.
- ❖ Breccia JD, Castro GR et Baigori MD. (1995). Screening of xylanolytic bacteria using a color plate method. *J Appl Bacteriol.* **78**, 469–472.

C

- ❖ Chaudhary P et Deobagkar D. (1997). Purification and characterization of xylanase from *Cellulomonas* sp. N.C.I.M. 2353. *Biotechnol Appl Biochem.* **25**, 127-133.
- ❖ Cheng KJ, Chen YC, Cheng HL, Lin SH, Liu JR et Yu B. (2009). Xylanase gene sequences from the genomic DNA of unpurified rumen microorganisms. US Patent 7635471.
- ❖ Chuang MH, Jeng KS, Wu SY, Lin LS et Chang EL. (2000). Recombinant xylanase, the preparation and use of thereof. US Patent 6083734.
- ❖ Collins T, Gerday C et Feller G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev.* **29**, 3-23.

D

- ❖ Delmer DP et Amor Y. (1995). Cellulose biosynthesis. *Plant Cel.* **7**, 987-1000.
- ❖ Dhillon A, Gupta JK, Jauhari BM et Khanna S. (2000). A cellulase-poor, thermostable, alkalitolerant xylanase produced by *Bacillus circulans* AB16 grown on rice straw and its application in biobleaching of eucalyptus pulp. *Biores Technol.* **73**, 273-277.
- ❖ Dhiman SS, Sharma J et Battan B. (2008). Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: A review. *BioResources.* **3** (4), 1377-1402.

F

- ❖ Fengel D, Wegener G. (1989). *Wood : chemistry, ultrastructure, reactions*, Walter de gruyter,. Berlin. 3.

- ❖ Fernandez-Espinar MT, Pinaga F, Sanz P, Ramon D, et Vallés S. (1993). Purification and characterization of a neutral endoxylanase from *Aspergillus nidulans*. FEMS Microbiol Lett. **113**, 223-228.
- ❖ Fry S (1988). Introduction to the growing cell wall. In: The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. Longman Scientific & Technical, Essex, pp. 1-14.

G

- ❖ Gallardo O, Diaz P et Pastor FI. (2004). Cloning and characterization of xylanase A from the strain *Bacillus* sp. BP-7: comparaison with alkaline pi-low molecular weight xylanases of family 11. Current Microbiology. **48**, 276-279.
- ❖ Gauthier V. (1985). Hydrolases des polymérasés et enzymes d'intérêts industriels. Paris: BORDAS. P.192.
- ❖ Georis J, Giannotta F, Buyl ED, Granier B et Frère JM. (2000). Purification and properties of three endo-1,4-xylanases produced by *Streptomyces* sp. strain S38 which differ in their ability to enhance the bleaching of kraft pulps. Enzyme Microb Technol. **26**, 178–86.
- ❖ Gessesse A et Gashe BA. (1997). Production of alkali xylanase by an alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolated from an alkaline soda lake. J Appl Microbiol. **83**, 402-406.
- ❖ Gessesse A, Mamo G. (1998). Purification and characterization of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Micrococcus* sp. AR-135. J Ind Microbiol Biotechnol. **20**, 210-214.
- ❖ Gomes J, Gomes I, Kreiner W, Esterbauer H et Sinner M. (1993). Production of high level of cellulose-free and thermostable xylanase by a wild strain of *Thermomyces lanuginosus* using beechwood xylan. J.Biotech. **30**, 283-297.
- ❖ Govin A. (2004). Aspects physico-chimiques de l'interaction bois-ciment - Modification de l'hydratation du ciment par le bois. Thèse de Doctorat. Université Jean Monnet et ENS des Mines, St Etienne, 202 p.
- ❖ Gupta S, Bhushan B et Hoondal GS. (2000). Isolation, purification and characterization of xylanase from *Staphylococcus* sp. SG-13 and its application in biobleaching of kraft pulp. J Appl Microbiol. **88**, 325-334.

H

- ❖ Hakulinen N, Turunen O, Janis J, Leisola M, et Rouvinen J. (2003). Three-dimensional structures of thermophilic β -1,4-xylanases from *Chaetomium thermophilum* and *Nonomuraea flexuosa*. *Eur.J.Biochem.* **270**, 1399-1412.
- ❖ Hayes DJ. (2009). examination of biorefining processes catalysts and challenges *Catalysts Today* . **145** (1-2), 138-151.
- ❖ Herring AM, McKinnon JT, Gneshin KW, PavelkaR, Petrick DE, McCloskey BD et Filley J. (2004). Detection of reactive intermediates from and characterization of biomass char by laser pyrolysis molecular beam mass spectroscopy. *Fuel.* **83**, 1483-1494.
- ❖ Honda H, Kudo T, Ikura Y et Horikoshi K. (1985). Two types of xylanases of alkalophilic *Bacillus* sp. No. C- 125. *Can. J. Microbiol.* **31**, 538-542.
- ❖ Hövel K, Shallom D, Niefind K, Belakhov V, Shoham G, Baasov T, Shoham Y et Schomburg D. (2003). Crystal structure and snapshots along the reaction pathway of a family 51 -L-arabinofuranosidase. *The EMBO Journal.* **22**, 4922 - 4932.
- ❖ Hseu RS et Huang YH. (2007). Recombinant xylanases derived from anaerobic fungi, and the relevant sequences, expression vectors and hosts. US Patent 7226772.
- ❖ http://www.google.fr/imgres?imgurl=http%3A%2F%2Feleves-ose.cma.mines-paristech.fr%2F2013%2Fimages%2Fnews%2F%2Farticle_biomasse_papier%2Fbiomasse_en_tete.png&imgrefurl=http%3A%2F%2Feleves-ose.cma.mines-paristech.fr%2F2013%2Fcommentaires_news.php%3Fid%3D6&h=475&w=961&tbid=ZVyxZfFTPRRYM%3A&zoom=1&docid=Nmw6tmF2_pOSPM&ei=6tRtVbfiKuj7ywP4soHIDA&tbm=isch&iact=rc&uact=3&dur=599&page=1&start=0&ndsp=15&ved=0CEIQrQMwCw&biw=1366&bih=634.

I

- ❖ Inagaki K, Nakahira K, Mukai K, Tamura T et Tanaka H. (1998). Gene cloning and characterization of an acidic xylanase from *Acidobacterium capsulatum*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **62**, 1061-1067.

- ❖ İnan K, Çanakçı S et Beldüz AO. (2011). Isolation and characterization of xylanolytic new strains of *Anoxybacillus* from some hot springs in Turkey. *Turk J Biol.* **35**, 529–542.

K

- ❖ Khandeparkar RDS et Bhosle NB. (2006). Purification and characterization of thermoalkalophilic xylanase isolated from the *Enterobacter* sp. MTCC 5112. *Research Microbiol.* **157**, 315-325.
- ❖ Kormelink FJM, Searle-Van Leeuwen MJF, Wood TM et Voragen AGJ. (1993). Purification and characterization of three endo-(1,4)- β -xylanases and one β -xylosidase from *Aspergillus awamori*. *J Biotechnol.* **27**, 249–65.

L

- ❖ Laberche JC. (1999). L'organisation cellulaire. In *Biologie végétale*. Dunod, Ed. 81-83.
- ❖ Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.

M

- ❖ Maat J, Roza M, Verbakel J, Stam H, Dasilva MJS, Egmond MR, Hagemams M, Vangarcom RFM, Hessing JGM et Vanrotterdam C. (1992). “Xylanases and their application in bakery” In : Visser J, Beldman G, Someren MAK and Voragen AG (eds.), *xylan and xylanases*, Elsevier, Amsterdam, pp.349-360.
 - ❖ Mirande C. (2009). Dégradation des fibres pariétales et système xylanolytique de *Bacteroides xylanisolvens* XB1AT et *Roseburia intestinalis* XB6B4, espèces bactériennes du microbiote intestinal humain. Thèse de Doctorat d'Ecologie. Université Blaise Pascal Clermont-Ferrand, Faculté des Sciences de la Vie et de la Santé. 516P.
 - ❖ Mokni-Tlili S, Abdelmalek IB et Jedidi N. (2010). Exploitation of biological wastes for the production of value-added hydrolases by *Streptomyces* sp. MSWC1 isolated from municipal solid waste compost. *Waste Manage Res.* **28**, 828–837.
-

N

- ❖ Nakamura S, Wakabayashi K, Nakai R, Aono R et Horikoshi K. (1993). Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric.Biol. Chem.* **49**, 2033–2039.

O

- ❖ O'Sullivan A. (1997). Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* **4**, (3), 173-207.

P

- ❖ Paes G, Skov LK, O'Donohue MJ, Rémond C, Kastrup JS, Gajhede M et Mirza O. (2008). The Structure of the Complex between a Branched Pentasaccharide and *Thermobacillus xylanilyticus* GH-51 Arabinofuranosidase Reveals Xylan-Binding Determinants and Induced Fit. *Biochemistry.* **47**, (28), 7441-7451.
- ❖ Patra AK et Madhu A. (2010). Studies on enzymatic pretreatment of linen. *Indian J.Fibre Text.* **35**, 337–341.
- ❖ Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA et Amorim DS. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* **67** (5), 577–591.
- ❖ PORSUK İ, ZAKIN S, BALI B et İNCE YILMAZ E. (2012). Department of Biology, Faculty of Science, Dicle University, 21280 Diyarbakır, Turkey.

S

- ❖ Saha BC. (2000). alpha-L-Arabinofuranosidases - biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnology Advances.* **18**, 403-423.
- ❖ Shallom D et Shohan Y. (2003). Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology.* **6**, 219-228.
- ❖ Song JM et Wei DZ. (2010). Production and characterization of cellulases and xylanases of *Cellulosimicrobium cellulans* grown in pretreated and extracted bagasse and minimal nutrient medium M9. *biomass and bioenergy.* **34**, 1930-1934.

- ❖ Song L, Dumon C, Siguier B, André I, Eneyskayae E, Kulminskayae A, Bozonnet S et O'Donohue MJ. (2014). Impact of an N-terminal extension on the stability and activity of the GH11 xylanase from *Thermobacillus xylanilyticus*. *Journal of Biotechnology*. **174**, 64–72.
- ❖ Sun RC, Lawther JM et Banks WB. (1996). Carbohydr Polym 29 325. *Tech Ass Paper Pulp Ind.* **43** (2), 209A-218A.
- ❖ Sunna A, Puls J et Antranikian G. (1999). Purification N. Kulkarni et al. /FEMS Microbiology Reviews. **23** (1996) 411-456 and characterization of two thermostable endo-1,4-L-D-xylanases from *Thermotoga thermarum*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **24**, 177-185.

T

- ❖ Tchunden J. (1990). Cellulolyse Anaérobie Mésophile: Etude de l'amélioration de la production de cellulases par *Cl. Cellulolyticum* ATCC35319. Thèse de Doctorat de biochimie appliqué. Université de Nancy. 09 P.
- ❖ Techapun C, Charoenrat T, Poosaran N, Watanabe M et Sasaki K. (2002). Thermostable and alkaline-tolerant cellulase-free xylanase produced by thermotolerant *Streptomyces sp.* Ab106. *J Biosci Bioeng.* **93**, 431–3.
- ❖ Thiebaud S. (1995). Valorisation chimique de composés lignocellulosique : obtention de nouveaux matériaux. Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse. P.194.

U

- ❖ Uchino F et Fukuda O. (1983). Taxonomic characteristics of an acidophilic strain of *Bacillus* producing thermophilic acidophilic amylase and thermostable xylanase. *Agric Biol Chem.* **47**, 965-967.

V

- ❖ Viet DN, Kamio Y, Abe N, Kaneko J et Izaki K. (1991). Purification and Properties of β -1,4- Xylanase from *Aeromonas caviae* W-61. *Appl Environ Microbiol.* **57**, 445–9.

W

- ❖ Wang SL, Yen YH, Shin IL, Chang AC, Chang WT, Wu WC, et al. (2003). Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. *Enzyme Microb Technol.* **33**, 917–25.
- ❖ Winterhalter C et Liebel W. (1995). Two extremely thermostable xylanases of the hyperthermo philic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Appl Environ Microbiol.* **61**, 1810-1815.

X

- ❖ Xu S, Yang R, Wang Z et Yang W. (2005). Aqueous extraction of corncob xylan and production of xylooligosaccharides. *LWT.* **38**, 677-682.

Y

- ❖ Yusof S et Ibrahim N. (1994). Quality of soursop juice after pectinase enzyme treatment. *Food Chemistry.* **51**, 83-88.

Z

- ❖ Zamost BL et Elm DD. (1996). Thermostable xylosidase produced by *Bacillus stearothermophilus* NRRL B-18659, *Bacillus stearothermophilus* NRRL B-18660 and *Bacillus stearothermophilus* NRRL B-18661. US Patent 5489526.

Annexes

Annexes I: Matériels et produits utilisés.

1. Matériels utilisés

- ✓ Balance (Scouttpro) (Ae ADAM AFA-120LC).
- ✓ Bain Marie (raypa).
- ✓ Bain Marie (julabo tw 12).
- ✓ Étuve (Mettler).
- ✓ Centrifugeuse (Sigma 2-16K).
- ✓ pH-mètre (Boeco).
- ✓ Spectrophotomètre (UVmini 1240 SHIMADZU).
- ✓ Dispositif d'électrophorèse (Thermo scientific).
- ✓ Un agitateur à mouvements réciproques (HeidolphVibramax 100).
- ✓ Un bain Marie agitateur (KIKA LABORTECHNIK HS-B20digital).

2. Produits utilisés

- ✓ Xylane de bouleau (birchwood xylan) (SIGMA).
 - ✓ Xylane d'épeautre et d'avoine (oat spelt xylan) (SIGMA).
 - ✓ Bleu de coomassie G250 (Fluka).
 - ✓ Bleu de coomassie R250 (Fluka).
 - ✓ Rouge de congo (SIGMA).
 - ✓ Marqueurs protéiques (Thermo scientific).
-

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

Milieu de culture MM7 (Milieu Minimal à base de xylane, pH 7,0) (Viet, *et al.*, 1990)

- Milieu de culture MM7 solide :
 - ✓ Xylane.....10 g.
 - ✓ Extrait de levure.....2 g.
 - ✓ NaCl.....2,5 g.
 - ✓ NH₄Cl.....5 g.
 - ✓ KH₂PO₄.....15 g.
 - ✓ Na₂HPO₄.....30 g.
 - ✓ MgSO₄, 7H₂O.....0,25 g.
 - ✓ Agar.....15 g.
 - ✓ Eau distillée.....qsp.....1 L.

- Milieu de culture MM7 liquide :
 - ✓ Xylane.....10 g.
 - ✓ Extrait de levure.....2 g.
 - ✓ NaCl.....2,5 g.
 - ✓ NH₄Cl.....5 g.
 - ✓ KH₂PO₄.....15 g.
 - ✓ Na₂HPO₄.....30 g.
 - ✓ MgSO₄7H₂O.....0,25 g.
 - ✓ Eau distillée.....qsp.....1 L.

Gélose nutritive (GN) :

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

Bouillon nutritif :

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

Annexe III: Solutions et tampons préparés.

Solution à base d'acide dinitrosalicylique (DNS)

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

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

Eau physiologique :

- ✓ NaCl.....9 g.
- ✓ Eau distillée.....qsp.....1 L.

Solution de NaCl à 1M :

- ✓ NaCl.....58,44 g.
- ✓ Eau distillée.....qsp.....1 L.

Solution de rouge de congo à 0,1 % :

- ✓ Rouge de congo.....1 g.
- ✓ Eau distillée.....qsp.....1 L.

Tampon phosphate sodique 50 mM à pH 7 (1000 ml) :

- ✓ (A) Na_2HPO_4500 ml.
- ✓ (B) NaH_2PO_4500 ml.
- ✓ (A) + (B).....jusqu'à pH 6 ; 7 ; 8.

Tampon acétate :

- Tampon acétate à pH 4 (50 ml) :
 - ✓ Solution d'acide acétique à 0,2 M.....41 ml.
 - ✓ Solution d'acétate de sodium à 0,2 M.....9 ml.
- Tampon acétate à pH 5 (50 ml) :
 - ✓ Solution d'acide acétique à 0,2 M.....14,8 ml.
 - ✓ Solution d'acétate de sodium à 0,2 M.....35,2 ml.

Tampon tris-HCl à 50 mM :

- Tampon tris-HCl à 50 mM à pH 9 (10 ml) :
 - ✓ Solution tris-HCl à 50 mM.....10 ml.
 - ✓ HCl.....quelques gouttes.

- Tampon tris-HCl à 50 mM à pH 10 (10 ml) :
 - ✓ Solution tris-HCl à 50 mM.....10 ml.
 - ✓ HCl.....quelques gouttes.



Annexe IV : Gels, tampons et solutions préparés pour l'électrophorèse.**1. Préparation des gels**

- Gel de séparation
 - ✓ Acrylamide/Bis.....7,5 ml.
 - ✓ Tampon tris-HCl.....15,6 ml.
 - ✓ Xylane.....800 µl.
 - ✓ Eau distillée.....37,5 ml.
 - ✓ TEMED.....60 µl.
 - ✓ Persulfate d'ammonium.....210 µl.
- Gel de concentration
 - ✓ Acrylamide/Bis.....7,5 ml.
 - ✓ Tampon tris-HCl.....7,5 ml.
 - ✓ Eau distillée30 ml.
 - ✓ Temed.....30 µl.
 - ✓ Persulfate d'ammonium a 10%.....300 µl.

2. Préparation des tampons

- Tampon de séparation
 - ✓ Tris.....18,15 g.
 - ✓ SDS.....0,4 g.
 - ✓ Eau distillée.....100 ml.
 - ✓ Ajuster le pH à 8,8 avec HCl concentré.
 - Tampon de concentration
 - ✓ Tris.....12,11 g.
 - ✓ SDS (Sigma).....0,8 mg.
 - ✓ Eau distillée.....200 ml.
 - ✓ Ajuster le pH à 6,8.
-

- Tampon de migration (X10)
 - ✓ Tris.....30,3 g.
 - ✓ Glycine.....144 g.
 - ✓ SDS (Sigma).....10 g.
 - ✓ Eau distillée.....qsp.... 1L.
 - ✓ Ajuster le pH à 8,3.
 - ✓ Le tampon de migration est réalisé par dilution 10 fois de cette solution.
- Tampon échantillon (X4)
 - ✓ Tris0,303 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.
 - ✓ (Aliquote de 1ml à -20°C).

3. Préparation des solutions

- Solution de fixation
 - ✓ Acide trichloroacétique (sigma).....57 g.
 - ✓ Ethanol absolu (charbonneau).....150 ml.
 - ✓ Eau distillée.....qsp.....500 ml.
- Solution de coloration
 - ✓ Bleu de Coomassie R250 (sigma).....0,5 g.
 - ✓ Méthanol (charbonneaux).....225 ml.
 - ✓ Acide acétique.....50 ml.
 - ✓ Eau distillée.....qsp.....500 ml.

Le colorant est solubilisé dans le mélange méthanol/eau puis l'acide acétique est ajouté. La solution obtenue est filtrée sur filtre papier (prolabo).

- Solution de décoloration
 - ✓ Méthanol.....125 ml.
 - ✓ Acide acétique.....50 ml.
 - ✓ Eau distillée.....qsp.....500 ml.
 - ✓ Changement de bain deux à trois fois 8,3.

Annexe V

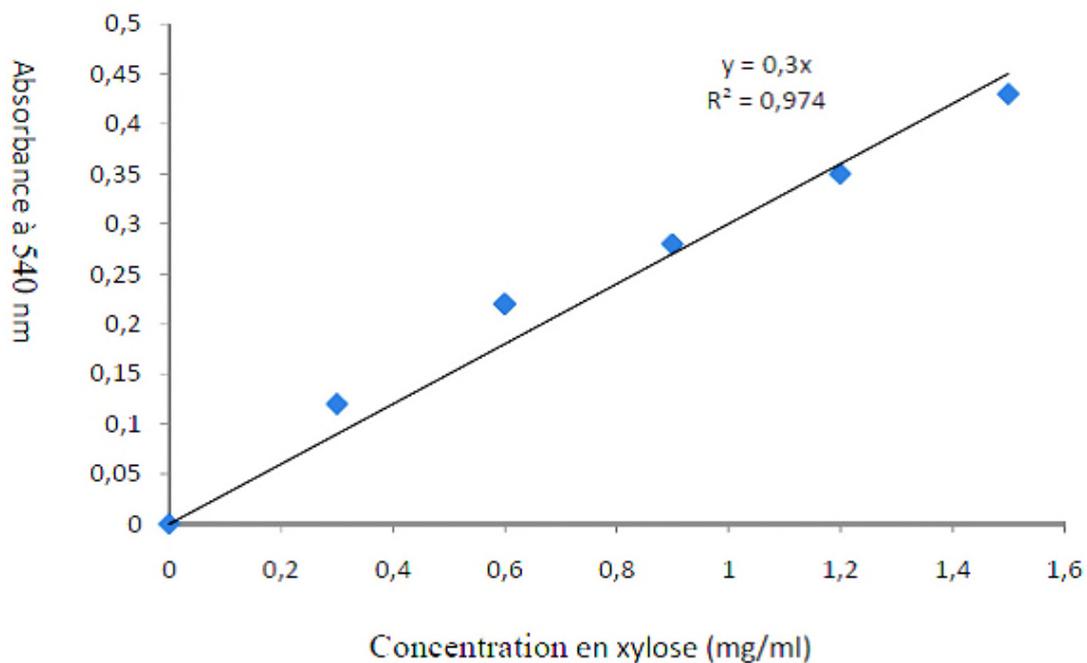


Figure 23: Droite d'étalonnage pour le dosage du xylose.

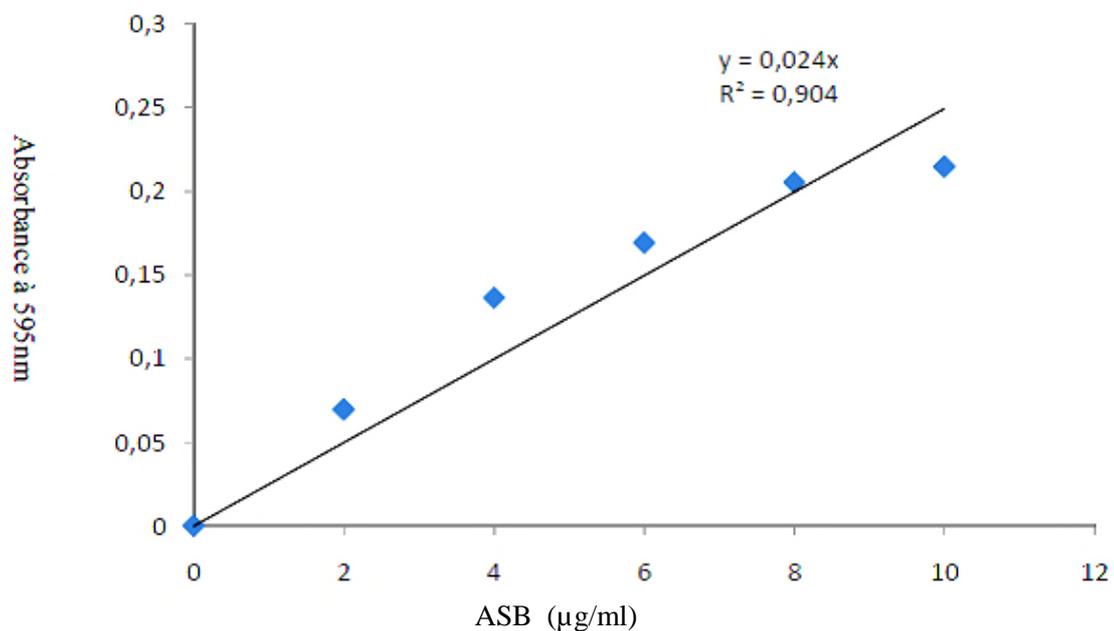


Figure 24: Droite de Dosage des protéines par la microméthode.

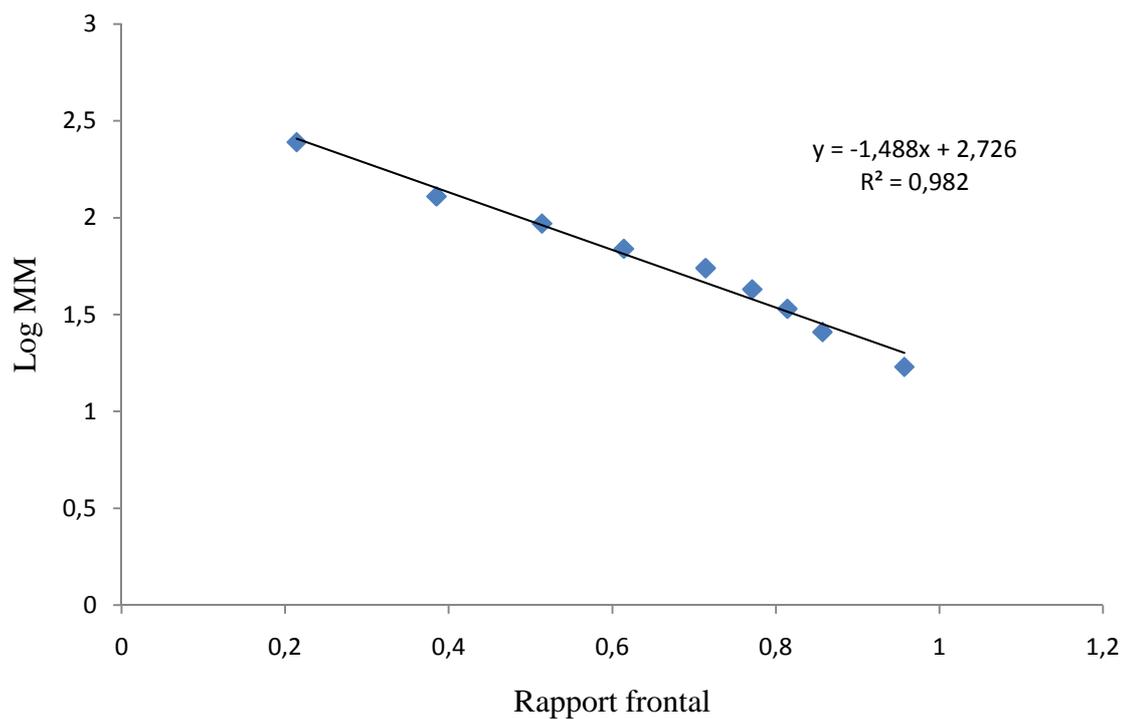


Figure 25: Droite d'étalonnage des marqueurs pour SDS-PAGE.

Annexe VI

Tableau XI: Effet de la température sur l'activité xylanasiqne de la souche SJ4.

Température (°C)	Activité xylanasiqne (U/ml)	Activité relative (%)
9	16,20 ± 1,15	82,73
21	16,00 ± 1,15	81,71
40	18,76 ± 1,15	95,81
50	19,35 ± 1,15	98,82
55	19,58 ± 1,15	100
60	19,00 ± 1,15	97,03
65	19,23 ± 1,15	98,21
70	18,20 ± 1,15	92,95
75	18,43 ± 1,15	94,12
80	18,96 ± 1,15	96,83
85	19,41 ± 1,15	99,13
90	18,19 ± 1,15	92,90
95	19,20 ± 1,15	98,05
100	17,40 ± 1,15	88,86

Tableau XII: Effet du pH sur l'activité xylanasiqne de la souche SJ4.

pH	Activité xylanasiqne (U/ml)	Activité relative (%)
4	16,9 ± 1,30	87,88
5	16,4 ± 1,30	85,28
6	15,5 ± 1,30	80,60
7	19,23 ± 1,30	100
8	15,9 ± 1,30	82,68
9	16,7 ± 1,30	86,84
10	16,9 ± 1,30	87,88

Tableau XIII: suivi de l'activité xylanase à différentes températures en fonction du temps d'incubation en absence du substrat de surnageant de culture de la souche SJ4.

Température (°C)	Temps d'incubation (h)	Activité xylanase (U/ml)	Activité relative (%)	Log Activité relative (%)
50	0,5	16,35 ± 0,37	99,69	1,998
	1	16,3 ± 0,37	99,39	1,997
	2	16,2 ± 0,37	98,78	1,994
	3	15,55 ± 0,37	94,81	1,976
	4	15,55 ± 0,37	94,81	1,976
	5	16,25 ± 0,37	99,08	1,995
	6	16,4 ± 0,37	100	2
	7	16,15 ± 0,37	98,49	1,993
55	0,5	15,55 ± 0,63	89,88	1,953
	1	16,55 ± 0,63	95,66	1,980
	2	16,55 ± 0,63	95,66	1,980
	3	15,8 ± 0,63	91,32	1,960
	4	16,9 ± 0,63	97,68	1,989
	5	15,9 ± 0,63	91,90	1,963
	6	17,3 ± 0,63	100	2
	7	15,95 ± 0,63	92,19	1,964
60	0,5	6,0 ± 1,16	100	2
	1	4,8 ± 1,16	80	1,903
	2	3,9 ± 1,16	65	1,812
	3	3,0 ± 1,16	50	1,698
	4	3,0 ± 1,16	50	1,698
	5	3,6 ± 1,16	60	1,778
	6	2,6 ± 1,16	43,33	1,636
	7	2,45 ± 0,47	100	2
95	1	2,1 ± 0,47	85,71	1,933
	2	1,85 ± 0,47	75,51	1,878
	3	1,25 ± 0,47	51,02	1,707
	4	2,3 ± 0,47	93,87	1,972
	5	0,8 ± 0,47	32,65	1,513
	100	0,16	2,2	100
	0,5	2,0	90,90	1,958

Tableau XIV: suivi de l'activité xylanasiqne à 55 °C en fonction du temps d'incubation en présence du substrat de surnageant de culture de la souche SJ4.

Température (°C)	Temps d'incubation (h)	Activité xylanasiqne (U/ml)	Activité relative (%)	Log Activité relative
55	10 mn	15,0 ± 1,04	98,6	1,994
	0,5	15,2 ± 1,04	100	2
	1	13,5 ± 1,04	88,81	1,948
	2	13,5 ± 1,04	88,81	1,948
	3	13,9 ± 1,04	91,44	1,961
	4	12,1 ± 1,04	79,60	1,900
	5	14,3 ± 1,04	94,07	1,973
	6	-	-	-
	7	14,2 ± 1,04	93,42	1,970

Résumé

Le but de ce travail est d'isoler et sélectionner des souches xylanolytiques à partir de sol de jardin et d'eau de source thermale situés au nord de l'Algérie (Béjaia et Tlemcen).

L'isolement et la sélection sur milieu solide est basé sur l'aptitude des souches à hydrolyser le xylane, le milieu liquide MM7 a permis de sélectionner l'isolat le plus producteur de xylanase, par la suite, le surnageant de culture a fait l'objet d'une caractérisation physicochimique (pH, température et thermostabilité) et enfin une électrophorèse dénaturante SDS-PAGE afin de déterminer le poids moléculaire des xylanases.

Parmi les 10 isolats, seuls 4 sont sélectionnés, l'isolat SJ4 était le plus performant (20,24 U/ml), la caractérisation physicochimique a montré que la ou les xylanases de cet isolat ont une grande affinité vis à vis du xylane de bouleau, et présentent un optimum de température de 55 °C, et un pH optimum de 7,0, et une grande thermostabilité à 50 et 55°C en absence du substrat et à 55 °C avec un temps de demi vie de 22 heures en présence du substrat. La SDS-PAGE a révélé la présence de 4 bandes protéiques ayant des poids moléculaires respectifs: 162 ; 117,5 ; 83,7 et 59 KDa.

La grande thermostabilité de la ou les xylanases de l'isolat SJ4 est un critère très important qui permet d'utiliser la ou les xylanases dans diverses industries alimentaires et non alimentaires.

Mots clés: Activité Xylanasiq, thermostabilité, isolement, sélection, SDS-PAGE.

Abstract

The purpose of this work is to isolate and select xylanolytic bacteria from garden soil of Bejaia and hot spring water of Tlemcen.

Soil samples and hot spring water were collected, which serve to isolate xylanases producers strains. The supernatant was studied following a physicochemical characterization.

Among the 10 isolates, only 4 were selected, the SJ4 isolate was the best xylanases producer (20.24 U/ml), the xylanase has a high affinity towards birchwood xylan and has an optimal temperature of 55 °C and an optimum pH of 7.0, and a high thermostability at 50 and 55 °C in the absence of substrate and at 55 °C in the presence of the substrate with a half life of 22 hours. The SDS-PAGE showed 4 protein bands with a respective molecular weight of: 162; 117.5; 83.7 and 59 KDa.

Keywords: xylanase activity, thermal stability, isolation, selection, SDS-PAGE.