

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

Université Abderrahmane Mira de Béjaïa



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie

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

## *Thème*

**Optimisation d'un système à deux phases aqueuses  
composé de PEG 4000/  $K_2HPO_4$ / NaCl pour l'extraction  
des xylanases de *Jonesia denitrificans* BN 13**

Présenté par :

M<sup>elle</sup> : SMAIL Dehbia

Devant le jury :

Présidente : M<sup>me</sup> ARKOUB O. (MCB, Université A. MIRA/ Bejaia)

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

Examinatrice : M<sup>elle</sup> KERAMANE B. (MAA, Université A. MIRA/ Bejaia)

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

**Promotion : 2013- 2014**

---

# Sommaire

# SOMMAIRE

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction.....	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
I.Composition de la paroi cellulaire végétale .....	2
I.1. Cellulose.....	2
I.2. Hémicellulose.....	2
I.3. Lignine .....	3
II. Microorganismes dégradant le xylane.....	4
II .1. <i>Jonesia denitrificans</i> .....	4
III. Enzymes xylanolytiques.....	5
III.1. Enzymes principales .....	5
III.2. Enzymes secondaires.....	5
III.3. Domaines d'applications des xylanases .....	6
IV. Système à deux phases aqueuses (SDPA).....	7
IV.1. Principe.....	8
IV.2. Facteurs qui affectent la séparation dans un SDPA .....	9
IV.3. Avantages de l'extraction liquide-liquide .....	10
Chapitre II: Matériel et méthodes	
I. Matériel.....	11
I.1. Matériel biologique .....	11
I.2. Appareillages et réactifs utilisés.....	11
II. Méthodes .....	11
II.1. Repiquage de la souche <i>Jonesia denitrificans</i> BN13.....	11
II.2. Production de xylanases de <i>Jonesia denitrificans</i> BN 13.....	11
II.3. Spécificité vis-à-vis du substrat .....	11
II.4. Méthodes analytiques.....	12
II.4.1. Test d'activité xylanasiq ue .....	12
II.4.2. Dosage des protéines.....	14
III. Préparation et optimisation du système à deux phase aqueuses (SDPA) (polyéthylène glycol 4000 (PEG 4000)/ K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / NaCl).....	15

## SOMMAIRE

III.1. Optimisation de la concentration du PEG 4000 .....	15
III.2. Optimisation de la concentration du chlorure de sodium (NaCl).....	15
III.3. Optimisation du pH du système (PEG 4000/K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaCl) .....	16
IV. Calcul des différents paramètres (Lie et <i>al.</i> , 2011).....	16
V. SDS-page et zymogramme.....	17

### Chapitre III: Résultats et discussions

I. Repiquage de la souche <i>Jonesia denitrificans</i> BN13.....	20
II. Production de xylanases de <i>Jonesia denitrificans</i> BN 13.....	20
III. Spécificité des xylanases vis-à-vis des différents substrats.....	22
IV. Optimisation du système à deux phases aqueuses (SDPA) pour l'extraction des xylanases.....	24
IV.1. Optimisation de la concentration du PEG 4000 .....	24
IV.2. Optimisation de la concentration du chlorure de sodium (NaCl).....	28
IV.3. Optimisation du pH dans le SDPA.....	31
V. Mise en évidence des xylanases par SDS-PAGE et zymogramme.....	35
Conclusion.....	38

Références bibliographiques

Annexes

## Liste des tableaux

Tableau N°	Titre	Page
I	Les différentes et Principales enzymes impliquées dans l'hydrolyse des hémicelluloses	6
II	Application des xylanases dans les industries alimentaires et non-alimentaires.	6
III	Gamme d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs.	13
IV	Gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines par la macrométhode	14
V	Optimisation du SDPA par variation de la concentration du PEG 4000	15
VI	Optimisation du SDPA par variation de la concentration du NaCl.	16
VII	Optimisation du SDPA par variation du pH	16
VIII	Les résultats de l'activité xylanolytique et de l'activité spécifique	22
IX	La production de quelques xylanases dans des fermentations en milieu liquide	23
X	les volumes des différentes phases des systèmes à différentes concentration de PEG 4000.	25
XI	Récapitulatif des paramètres de mesure après décantation des SDPA	25
XII	Les volumes des phases supérieures et inférieures après la variation de la concentration de NaCl	28

## Liste des tableaux

XIII	Paramètres mesurés après la variation de la concentration du NaCl	29
XIV	Volumes des phases supérieures et inférieures après la variation de pH	31
XV	Paramètres mesurés dans le SDPA après la variation du pH	32
XVI	Comparaison des résultats des différents travaux effectués sur l'extraction des xylanases par SDPA	34

## Liste des figures

Figure N°	Titre	Page
01	Représentation schématique des composants de la paroi cellulaire végétale.	2
02	Micrographie électronique de <i>Jonesia denitrificans</i> 55134T Prévot (résolution 2µm).	4
03	Enzymes impliquées dans la dégradation du xylane.	5
04	Schéma de principe de l'extraction liquide-liquide (Andersson et Hahn- Hagerdal, 1990).	9
05	Test d'activité xylanasiq.	12
06	Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode du DNS.	13
07	Cuve et accessoires du dispositif d'électrophorèse Mini Protean II BIORAD	17
08	Colonies de <i>Jonesia denitrificans</i> BN13 entourées de zones d'hydrolyse du xylane de bouleau.	20
09	Droite d'étalonnage pour le dosage du xylose	21
10	Droite d'étalonnage de dosage des protéines par la macrométhode	21
11	Histogramme représentant la spécificité des xylanases vis-à-vis de 03 substrats	22

## Liste des figures

12	Représentation des différentes phases des systèmes après décantation	24
13	Influence de la concentration de PEG sur l'activité xylanase	26
14	Influence de la concentration du PEG sur le K et Y	27
15	Influence de la variation de la concentration du NaCl sur l'activité spécifique et l'activité xylanase des phases supérieures du SDPA	29
16	Effet de la concentration du NaCl sur le rendement et le coefficient de partage	30
17	Influence du pH sur les activités spécifique et xylanase	32
18	Effet du pH sur la variation de coefficient de partage (K) et le rendement (Y)	33
19	Zymogramme de la phase supérieure du SDPA à PEG 4000 en comparaison avec les autres SDPA	36



# Remerciements

*Tout d'abord, je remercie Dieu, le Généreux qui ma donné la force afin d'accomplir ce modeste travail*

*Je tiens à remercier en premier lieu ma promotrice*

*Mme BOUCHERBA*

*Et à lui exprimé ma profonde gratitude pour avoir accepté de m'encadrer et pour sa présence, son aide et sa patience.*

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

*M<sup>me</sup> Arkoub, qui a bien voulu me faire l'honneur de présider ce jury et examiner ce travail, qu'elle reçoit, ici, l'expression de ma profonde gratitude.*

*M<sup>le</sup> Djinni, qui a bien voulu me faire l'honneur d'examiner ce travail, qu'elle reçoit, ici, l'expression de ma profonde gratitude.*

*M<sup>elle</sup> Keramane, qui a bien voulu me faire l'honneur d'examiner ce travail, qu'il reçoit ici, l'expression de ma profonde gratitude.*

*Je tiens à remercier également tous les gens qui m'ont aidés de près ou de loin à réaliser ce travail notamment Mr BETACHE*

*Azzedine et Mr MESSIS Aziz. Il m'ait agréable de leur exprimer mes reconnaissance et mes profond respect.*

*MERCI*





# Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail avant tout à  
la mémoire de notre cher ami Hammar Mounir.*

*-A la mémoire de mes grands parents.*

*-Aux êtres qui me sont très chers : mon père et ma mère  
pour leur patience, leurs encouragements et leur soutien  
inconditionnel.*

*-A mon cher et unique frère Loucif.*

*-A mes très chères Sœurs : Djohra et Nihed.*

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

*-A toutes personnes chères à moi : Nadia, Lydia, Sarra,  
Hamza, Koukou, Djigou, Amirouche.*

*-A toute la promotion « Biotechnologie Microbienne »  
2013/2014*



# Introduction

## Introduction

La biomasse végétale est une source abondante et renouvelable de biopolymères, parmi lesquels la cellulose, la lignine et l'hémicellulose (Coughlan, 1992). A ce titre l'hémicellulose est le polysaccharide le plus abondant dans la paroi des cellules végétales après la cellulose (Sun *et al.*, 1996). l'hydrolyse du xylane est accomplie par des endoxylanases (EC 3.2.1.8) et  $\beta$ -xylosidase (EC 3.2.1.37) avec une variété d'enzymes accessoires (Collins *et al.*, 2005).

Pour d'éventuelles applications des enzymes à l'échelle industrielle, il est nécessaire de choisir des procédés de purification faciles à mettre en œuvre, rapides et à moindre coût (Zhang *et al.*, 2007). Au laboratoire, La purification des xylanases 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 aqueuse (SDPA) répond aux attentes des industriels (Nitsawang *et al.*, 2006 et Naganagouda et Mulimani, 2008).

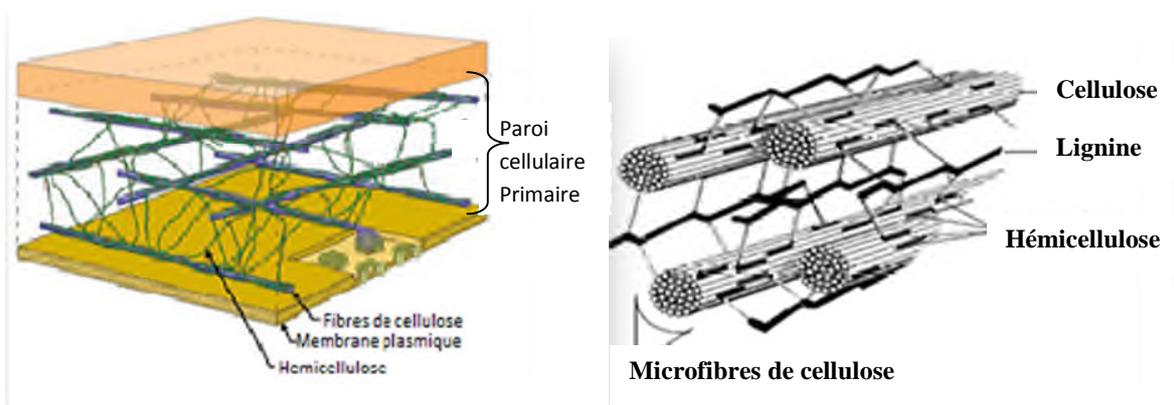
C'est dans cette optique que nous avons voulu poursuivre les travaux de Boucherba (2011), en essayant de mettre au point un système à deux phases aqueuses tout en optimisant la concentration du polyéthylène glycol 4000, le NaCl ainsi que le pH du système.

La première partie de ce document rapporte une synthèse bibliographique sur la biomasse lignocellulosique, un aspect microbiologique du genre *Jonesia*, les enzymes xylanolytique et le système SDPA. Cette étude bibliographique est utilisée comme support théorique pour la compréhension de la partie pratique qui résume le matériel et les méthodes utilisées ainsi que les résultats obtenues des expériences réalisées au laboratoire génie-biologique.

# Synthèse bibliographique

## I. Composition de la paroi cellulaire végétale

C'est une structure rigide microfibrillaire qui assure le rôle d'une barrière protectrice et qui permet la cohésion des cellules, les échanges intercellulaires et le passage des substances nécessaires au métabolisme cellulaire. De façon générale, la biomasse lignocellulosique est composée de polysaccharides (cellulose et hémicellulose) de lignine (fig. 01) et en faible proportion des résidus extractibles : acides et sels minéraux (Shleser, 1994).



**Fig. 01** : Représentation schématique des composants de la paroi cellulaire végétale (Shleser, 1994)

### I.1. Cellulose

Elle représente 40 à 60% de la biomasse sèche, c'est un homopolymère linéaire composé d'unités « D-glucopyranose » reliés par des liaisons  $\beta(1-4)$ . C'est le polysaccharide le plus abondant dans la nature. L'orientation de ses liaisons hydrogènes intramoléculaires et intermoléculaires rend le polymère rigide et difficile à se déstructurer (Boussarsar, 2008).

### I.2. 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 se trouve associé dans la paroi végétale avec la cellulose et la lignine. L'hémicellulose est constituée de différentes unités de sucres neutres présentes à différentes proportions et avec différents substituant 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 galacturoniques. Quatre groupes sont définis en fonction de leur structure primaire : les xyloglycanes (xylanes), les mannoglycanes (mannanes), les  $\beta$ -glucanes et les xyloglucanes (Mirande, 2009).

**a) Les xylanes** sont les hémicelluloses majoritaires des céréales et des monocotylédones. Ils peuvent représenter de 15 à 40% de la matière sèche des céréales (Fry, 1988). Ils sont composés d'une chaîne principale de résidus  $\beta$ -D-xylopyranose reliés par des liaisons  $\beta(1-4)$ . Sur cette chaîne principale sont greffées des ramifications qui sont variables selon l'espèce végétale. Certains de ces résidus xylose, portent des groupements acétyls, méthyls, méthylglucuronyles ou arabinofuranosyles qui forment alors des chaînes latérales (Mirande, 2009). On distingue plusieurs types de xylanes :

↳ **Les homoxylanes** sont constitués uniquement des résidus du xylose qui sont reliés par des liaisons glycosidiques de type  $\beta(1-3)$  et/ou  $\beta(1-4)$ . On les retrouve chez les algues comme les Palmariales (Barry et Dillon, 1940 et Dekker et Richards, 1976).

↳ **Les hétéroxylanes** sont des hétéroxylanes présents dans les céréales, ils sont constitués d'une chaîne principale de  $\beta(1-4)$ -D-xylopyranose et des résidus d'acide uronique et résidu arabinosyl et sont substitués par une variété de chaînes latérales de mono et d'oligo-glycosyl (Sá-Pereira et *al.*, 2003).

↳ **Les arabinoxylanes** : Les arabinoxylanes sont les hémicelluloses majoritaires des parois végétales des graminées. Les résidus D-xylose de la chaîne principale sont principalement substitués par des résidus L-arabinose en O-2 et/ou O-3 avec de plus faibles proportions en substituants acétyle ou glucuronique. Chez les graminées, les résidus arabinoses sont également estérifiés par l'acide férulique en position O-5 (Kato et Nevins, 1985 et Scheller et Ulvskov, 2010).

**I.3. Lignine** elle constitue 20 à 30% de la matière sèche, c'est un polymère complexe de nature phénolique associée aux hémicelluloses, Elle est constituée d'alcools, son caractère phénolique lui confère un rôle biologique protecteur et rend sa structure peu accessible à l'eau et résistante à l'attaque enzymatique (Tchunden, 1990).

## II. Microorganismes dégradant le xylane

Divers genres et espèces de bactéries et de champignons sont producteurs de xylanases. Les plus étudiés et les mieux caractérisés sont les endoxylanases d'origine fongique, parmi lesquelles celles produites par *Aspergillus niger* (Poutanen, 1988). Plusieurs espèces de *Trichoderma* produisent également des endoxylanases (Biely, 1985 et Hrmova et al., 1986). Parmi les genres bactériens producteurs de xylanases, on retrouve les actinomycètes, particulièrement le genre *Streptomyces* (Ruiz-Arribas et al., 1995 et Wang et al., 2003)

La production de xylanases par le genre *Jonesia* notamment l'espèce *Jonesia denitrificans* BN 13 a été décrite pour la première fois dans la littérature scientifique par Boucherba et collaborateurs en 2011.

### II .1. *Jonesia denitrificans*

*Jonesia denitrificans* (Figure 02) est Gram positif, elle se présente sous forme d'un bâtonnet irrégulier et fin (0,3-0,5 x 2-3  $\mu\text{m}$  ). Aéroanaérobie facultative, catalase positive, oxydase négative, non sporulée. Elle forme des petites colonies convexes et lisses ayant un diamètre de 0,5 à 1,5 millimètre pendant une incubation entre 24 à 48 h, grisâtres et translucides à opaques, devenant jaunâtres après 10 à 20 jours. Sa croissance se fait à des températures allant de 10 à 40 °C avec un optimum à 30 °C et à des concentrations de 5% de NaCl (Pukall et al., 2009).

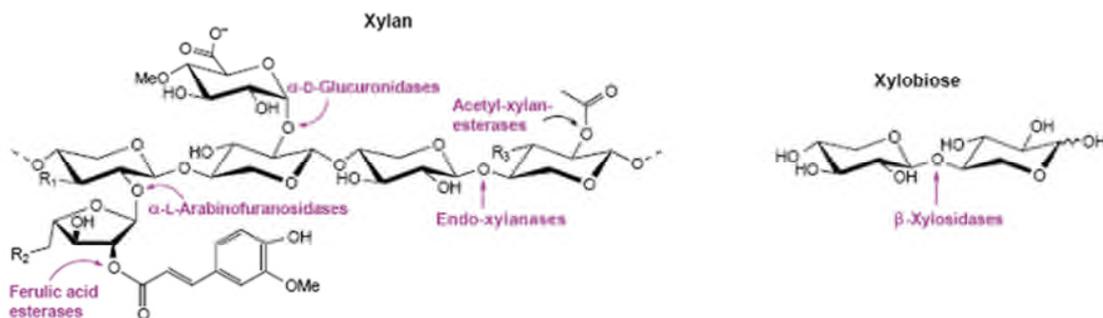


**Fig. 02 :** Micrographie électronique de *Jonesia denitrificans* 55134T Prévot (résolution 2 $\mu\text{m}$ ) (Pukall et al., 2009)

### III. Enzymes xylanolytiques

#### III.1. Enzymes principales

Les endoxylanases (E.C 3.2.1. 8) rompent la liaison  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) glycosidique à l'intérieur de la chaîne principale du xylane. Elles libèrent des oligomères linéaires ou substitués de fort puis de faible degré de polymérisation (Nishitani et Nevins, 1991). L'ensemble des activités nécessaires à l'hydrolyse des liaisons de la chaîne principale est regroupé sous le terme général d'enzymes principales alors que celles qui éliminent les chaînes latérales sont parfois appelées enzymes accessoires (Bonnin *et al.*, 1997). La Figure 03 illustre les sites d'attaque du xylane.



**Fig. 03** : Enzymes impliquées dans la dégradation du xylane (Shallom et Shoham, 2003)

Les  $\beta$ -xylosidases (E.C 3.2.1.37) sont nommés aussi (1,4- $\beta$ -D-xylane-4-xylohydrolase), elle hydrolysent de petits oligomères libérés par les endoxylanases, en xylose (Panbangred *et al.*, 1983 et Debeire *et al.*, 1992).

#### III.2. Enzymes secondaires

Dans le cas des glucuronoxylanes, les enzymes accessoires impliquées dans la libération des substituants sont : Les  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases (E.C 3.2.2.55), Les  $\alpha$ -D-glucuronosidases (E.C 3.2.1.139) et Les acétyls estérases (E.C 3.2.16).

Le tableau I résume les principales enzymes secondaires qui hydrolysent l'hémicellulose.

**Tableau I** : Les différents et Principales enzymes impliquées dans l'hydrolyse des hémicelluloses (White et *al.*, 1993)

Enzymes	Substrat	Liaison clivée	Produit d'hydrolyse
<i>a</i> -L-arabinofuranosidase	Arabinoxylane	<i>a</i> -1,3	Arabinoxylane et arabinose
<i>a</i> -glucuronidase	Glucuronoxylane	<i>a</i> -1,3 ou 1,2 ac glucuronique	Glucuronoxylane et ac glucuronique
O-acétyl xylane Estérase	Acétyl xylane	Acétyl ester	Acétyl xylane et acétate
Acide férulique Estérase	Acide férulique lié aux résidus arabinose	Féruloly ester	Acide férulique et xylane
Acide p-coumarique estérase	Acide p- coumarique lié aux résidus arabinose	p-coumarique ester	Acide p-coumarique et xylane

### III.3. Domaines d'applications des xylanases

Les xylanases sont des enzymes ayant une vaste gamme d'applications industrielles. Elles constituent la proportion commerciale majoritaire des hémicellulases. Les xylanases sont utilisées dans la fabrication du papier, l'extraction du café, la fabrication des biocarburants) et la production des produits chimiques (Biely, 1985). Le tableau II résume les applications industrielles des xylanases.

**Tableau II** : Application des xylanases dans les industries alimentaires et non-alimentaires (Collins et *al.*, 2005)

Marché	Application	Fonction
Alimentation humaine	Jus de fruits, nectars, purées, huiles, vins	Amélioration de la macération et de la clarification des jus et réduction de la viscosité. Augmentation des taux d'extraction et de la filtration.
	Panification	Amélioration de l'élasticité et de la résistance de la pâte, meilleur manipulation et meilleur texture du pain.

Alimentation animale	Nourriture pour animaux monogastrique et ruminants	Diminution du contenu en polysaccharides non-amidon d'où une baisse de la viscosité et une meilleure disponibilité des protéines et de l'amidon qui accroît la digestion et la valeur nutritionnelle des aliments.
Industries non-alimentaires	Pâtes et papiers	Blanchiment des pâtes kraft, séparation des encres, réduction de l'utilisation en agents chlorés et alcalins. Amélioration des procédés mécaniques du traitement de pâte qui aboutit à une baisse de la consommation d'énergie.
	Amidon	Séparation facilitée de l'amidon et du gluten par réduction de la viscosité.
	Textiles	Préparation des fibres par trempage et macération remplaçant les procédés chimiques.
	Bioconversion	Traitement des déchets Production de composés fermentescible, carburants renouvelables (bioéthanol), chimie fine (tensio-actifs).

#### IV. Système à deux phases aqueuses (SDPA)

L'extraction liquide-liquide est une technique de séparation largement utilisée à l'échelle industrielle, dans des domaines aussi variés que l'hydrométallurgie classique, la pétrochimie, l'industrie pharmaceutique et l'industrie agroalimentaire. Cette méthode remplace des techniques de précipitation, de filtration, d'échange d'anions et adsorption sur charbon actif. Par ailleurs, l'extraction liquide-liquide peut être envisagée pour la séparation de plusieurs composés, étant donné qu'elle consomme peu d'énergie et peut remplacer des techniques classiques comme la distillation et la cristallisation (Duarte, 2005).

La séparation de phase est un phénomène qui se produit lorsque deux solutions de polymères solubles dans l'eau sont mélangées. Au lieu d'utiliser deux polymères : le polyéthylène glycol (PEG) et le dextrane, un polymère et une solution de sel peut être utilisé pour former un système à deux phases aqueuses. Parmi les systèmes polymères/sel, on

distingue : PEG / phosphate, PEG/sulfate de potassium, PEG/magnésium sont les plus fréquemment utilisés. Le PEG est un polymère linéaire synthétique avec des poids moléculaires dans la gamme varie de 200 à 40 000 Dalton.

Le dextrane est un polymère naturel produit par *Leuconostoc mesenteroides*. Il s'agit d'un polymère de glucose lié par des liaisons  $\alpha$  (1-6) et il est ramifié par des liaisons  $\alpha$  (1-3). Le PEG est plus hydrophobe que le dextrane (Andersson et Hahn-Hagerdal, 1990).

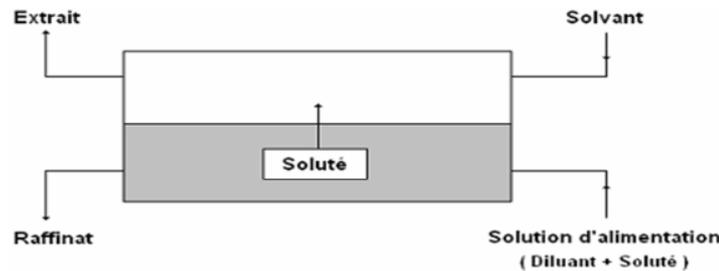
Le PEG est utilisé préférentiellement dans le SDPA, car il est disponible à faible coût et forme un système à deux phases avec d'autres polymères neutres ainsi qu'avec des sels, il peut significativement améliorer le repliement des protéines pour les réactiver (Cleland et *al.*, 1992).

#### IV.1. Principe

L'extraction liquide-liquide est une méthode physico-chimique permettant la séparation d'un ou plusieurs constituants dans un mélange. Elle est basée sur leur distribution inégale entre deux liquides peu miscibles. Bien que le principe de cette technique soit relativement simple, les modalités de mise en œuvre sont choisies en fonction d'un grand nombre de paramètres : température, pH, divers solvants, etc.

En pratique, une extraction par solvant nécessite deux opérations :

- La mise en contact intime d'une solution d'alimentation, contenant les solutés à séparer avec une seconde phase liquide appelée solvant qui extrait préférentiellement un ou plusieurs solutés. Le solvant qui contient alors le ou les solutés est désigné sous le terme d'extrait, la solution d'alimentation ayant perdu la majeure partie de ces mêmes constituants est appelée raffinat (Figure. 04).
- La séparation des phases (extrait et raffinat) se fait sous l'effet de la gravité naturelle à laquelle peut s'ajouter dans certains cas la mise en œuvre d'autres forces.



**Fig. 04:** Schéma de principe de l'extraction liquide-liquide (Andersson et Hahn-Hagerdal, 1990).

#### IV.2. Facteurs qui affectent la séparation dans un SDPA

Le partage des solutés dans un SDPA dépend de plusieurs facteurs citant le choix des composants du système, le poids moléculaire du polymère, la concentration des polymères et de sels, la force ionique, le pH du système et celui de la protéine cible, l'hydrophobicité, la charge et le poids moléculaire de la protéine (He et *al.*, 2005).

##### ❖ Effet des Polymères

Le polyéthylène glycol et le dextrane sont les polymères les plus généralement utilisés, qui se prêtent bien pour des applications alimentaires et pharmaceutiques. Pour des applications industrielles, le dextrane est cher donc les systèmes les plus appropriés sont les systèmes à base de polyéthylène glycol/sel (Srinivas et *al.*, 1999).

Le poids moléculaire du polymère utilisé influence aussi sur le partitionnement des protéines. Plus le poids moléculaire est grand, plus la concentration nécessaire pour la phase de séparation est petite (Albertsson, 1986).

❖ **Effet du pH** Si on considère la protéine et sa solubilité qui est principalement liée à des interactions de charges superficielles avec les ions en solution, la distribution de charge est un paramètre très important dans des systèmes à deux phases aqueuses, de sorte que le pH et la force ionique sont des facteurs importants dans le processus (Silva et Franco, 2000).

En général, la phase supérieure (phase riche en PEG) porte une charge positive pendant que la phase inférieure (phase riche en phosphate) a une charge négative. Les enzymes sont

chargées négativement donc elles passent directement à la phase supérieure. La séparation est alors liée aux propriétés de surface de l'enzyme. Au point isoélectrique de la protéine (pI), la somme de toutes les charges de la protéine est nulle. Pour toutes les autres valeurs du pH, la protéine a une charge nette positive ou négative (Chang et *al.*, 2004).

#### ❖ Effet de l'addition du chlorure de sodium (NaCl)

L'addition de sel neutre affecte les propriétés de partitionnement de la protéine entre deux phases en diminuant l'hydrophobicité de la protéine (Yücekan et Önal, 2011).

De plus, quand l'ion de sel neutre est inégalement réparti entre les phases du système, il provoque une différence du potentiel électrostatique et conduit au changement du coefficient de partage des protéines spécifiques en fonction de leur charge. Une augmentation de la concentration du NaCl favorise le partitionnement de l'enzyme dans la phase inférieure ce qui abaisse le coefficient de partage (Albertsson, 1990 et Engel et *al.*, 2000).

### IV.3. Avantages de l'extraction liquide-liquide

Le SDPA présente de nombreux avantages :

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

# Matériel et Méthodes

## I. Matériel

### I.1. Matériel biologique

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

### I.2. Appareillages et réactifs utilisés

Les produits chimiques et l'appareillage utilisés au cours de cette étude sont regroupés dans l'annexe I.

## 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 étéensemencées en surface avec 4 colonies de la souche *Jonesia denitrificans* BN13, les milieux sont ensuite incubés pendant 48 h à 37 °C.

### II.2. Production de xylanases de *Jonesia denitrificans* BN 13

Le milieu liquide MM7 est réparti à raison de 100 ml dans des flacons de 500 ml. A partir d'une préculture de 24 h, un inoculum de 2% (v/v) est utilisé pour l'ensemencement d'un flacon de 500 ml. Ce dernier est incubé 48 h à 37°C dans un bain Marie agitateur.

Le milieu de culture est centrifugé à 6000 g pendant 10 min afin de récupérer le surnageant qui contient les xylanases. L'activité xylanasiq ue et le dosage des protéines sont mesurés (voire méthodes analytiques).

### II.3. Spécificité vis-à-vis du substrat

Des solutions de différents substrats : xylane de bouleau, d'épeautre et d'avoine et de hêtre, sont préparées à raison de 1% (m/v) dans du tampon phosphate 50 Mm à pH 7. Le teste d'activité xylanasiq ue est effectué selon la technique décrite dans la partie « Méthode analytique » en variant à chaque fois le substrat.

## II.4. Méthodes analytiques

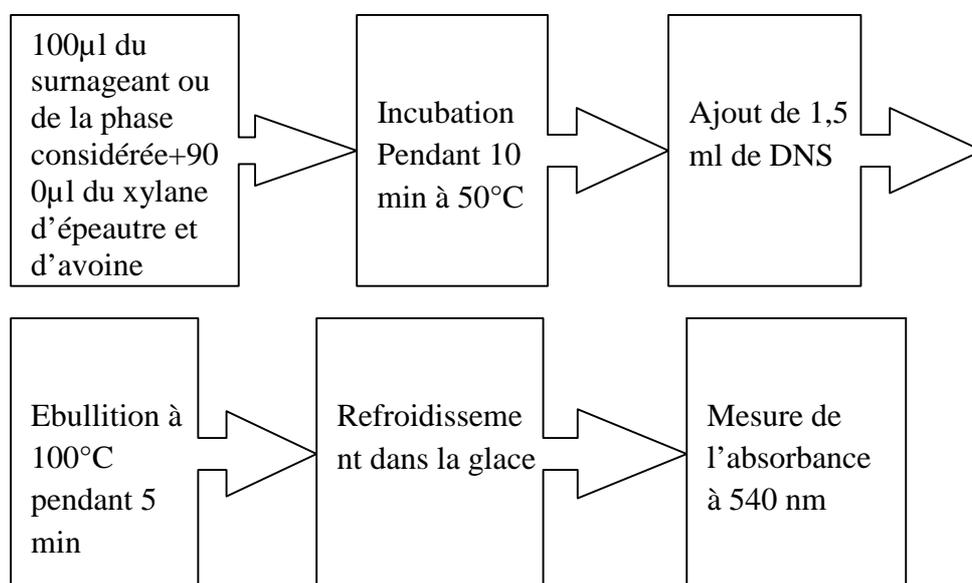
### II.4.1. Test d'activité xylanasiq

L'activité xylanasiq 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 du SDPA (Système à deux phases aqueuses) auquel sont ajoutés 900µl de xylane d'épeautre et d'avoine à pH7. Ce mélange est incubé à 50°C pendant 10 min (Wang *et al.*, 2003).

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

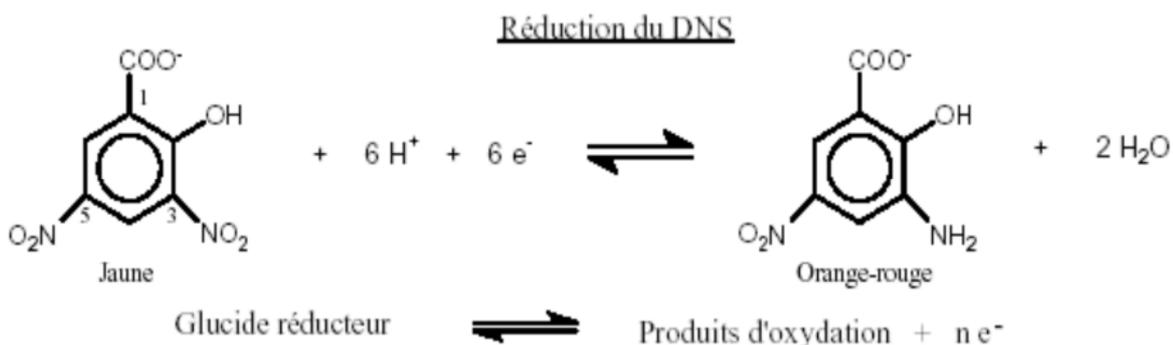
Dans ce cas le témoin contient le xylane incubé sans le surnageant ou la phase de SDPA, puis on ajoute 1,5 ml de DNS et 100 µl du surnageant ou de la phase du SDPA. Après refroidissement dans la glace, la lecture de l'absorbances est effectuée à 540 nm.

Le dosage des sucres réducteurs est effectué selon la méthode de Miller (1959) (Figure 05).



**Fig. 05** : Test d'activité xylanasiq (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 (Figure 06).



**Fig. 06** : Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode du DNS (Bailey et al., 1992)

La courbe d'étalonnage est réalisée avec une solution de xylose à 1,5 mg/ml. A partir de laquelle différentes solutions ayant les concentrations de 0 ; 0,3 ; 0,6 ; 0,9 ; 1,2 et 1,5 mg/ml sont préparées (Tableau III).

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

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

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

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

D : facteur de dilution.

t : temps d'incubation (minutes).

### II.4.2. Dosage des protéines

De nombreuses méthodes ont été mises au point pour doser les protéines. Ce sont généralement des méthodes spectrophotométriques basées sur diverses caractéristiques spectrales ou réactionnelles des acides aminés constituant les protéines (Davis, 1988 )

La quantité de protéine est estimée selon la méthode de Bradford (1976), utilisant le réactif de Bradford (annexe II). Le dosage des protéines est effectué selon La technique de la macrométhode.

#### La macrométhode

Cette technique permet de doser des quantités de protéines comprises entre 0,2 et 1mg/ml. Le dosage a été effectué comme suit :

L'échantillon de 100 $\mu$ L est ajouté au réactif de Bradford (5ml), après homogénéisation le mélange est placé 5 min à l'obscurité puis 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 IV).

Gamme étalon :

Solution mère de BSA à 1mg/ml

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

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

### III. Préparation et optimisation du système à deux phase aqueuses (SDPA) (polyéthylène glycol 4000 (PEG 4000)/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaCl)

#### III.1. Optimisation de la concentration du PEG 4000

Les systèmes SDPA sont préparés à différentes concentrations de PEG 4000 : 8%, 10%, 12%, 14% et 16% (m/v), le PEG est ajouté au mélange composé de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> à 14% (m/v), de NaCl à 1,63% (m/v) et de 47,31% (m/v) soit 30 ml du milieu de cultureensemencé. (Tableau V). L'ensemble des composants du système est bien agité puis ajusté à pH7, on laisse décanter dans des ampoules à décanter. (Srinivas et *al.*, 2002). Après séparation des phases, les activités enzymatiques ainsi que les protéines totales sont dosées selon les techniques citées dans les paragraphes II.4.1 et II.4.2, les rendements, les coefficients de partage et les facteurs de purification sont calculés.

**Tableau V** : Optimisation du SDPA par variation de la concentration du PEG 4000

PEG 4000 (m/v)		K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (m/v)		NaCl	
(%)	Masse (g)	(%)	Masse (g)	(%)	Masse (g)
08	5	14	8,75	1,63	1
10	6,10	14	8,75	1,63	1
12	7,32	14	8,75	1,63	1
14	8,54	14	8,75	1,63	1
16	9,76	14	8,75	1,63	1

#### III.2. Optimisation de la concentration du chlorure de sodium (NaCl)

La valeur de la concentration du PEG 4000 optimisé est maintenue constante pour faire varier les concentrations de NaCl de 1,63 %, 2%, 3% et 4% (m/v), le mélange est additionné de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> à 14% et de 47,31% (m/v) de milieu de cultureensemencé puis ajusté à pH7 (tableau VI). On laisse sédimenter dans des ampoules de décantation. Après chaque séparation de phase, les activités enzymatiques ainsi que les protéines totales sont dosées selon les techniques décrites précédemment, les rendements, les coefficients de partage et les facteurs de purification sont calculés.

**Tableau VI** : Optimisation du SDPA par variation de la concentration du NaCl

NaCl		K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (m/v)		PEG 4000	
(%)	Masse (g)	(%)	Masse (g)	(%)	Masse (g)
1,63	1	14	8,75	12	7,32
2	1,39	14	8,75	12	7,32
3	2,9	14	8,75	12	7,32
4	2,79	14	8,75	12	7,32

### III.3. Optimisation du pH du système (PEG 4000/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaCl)

Le système (PEG 4000/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaCl) optimisé et la composition de chaque système est présenté dans le tableau VII, est ensuite sont ajustés à différentes valeurs de pH : 6 et 8. Après chaque décantation les activités enzymatiques ainsi que les protéines totales sont dosées, les rendements, les coefficients de partage et les facteurs de purification sont calculés.

**Tableau VII** : Optimisation du SDPA par variation du pH

pH	NaCl		K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (m/v)		PEG 4000	
	(%)	Masse (g)	(%)	Masse (g)	(%)	Masse (g)
6	2	1,39	14	8,75	12	7,32
7	2	1,39	14	8,75	12	7,32
8	2	1,39	14	8,75	12	7,32

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

### Coefficient de partage (K)

Le coefficient de partage de la xylanase est calculé selon la formule suivante :

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

- U<sub>sup</sub> c'est activité enzymatique dans la phase supérieure.
- U<sub>inf</sub> c'est activité enzymatique de la phase inférieure.

### 🌐 Le ratio volumique (R)

Le ratio volumique de phase est mesuré selon la formule suivante :

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

- $V_{\text{sup}}$  c'est le volume de la phase supérieure.
- $V_{\text{inf}}$  c'est le volume de la phase inférieure.

### 🌐 Calcul du rendement (%)

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

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

Où K et R sont respectivement le coefficient de partage et le ratio volumique.

## V. SDS-page et zymogramme

Dans le but de voir le profil des protéines de la phase du SDPA et afin de visualiser l'activité xylanasique dans le gel de séparation, nous avons choisi la technique SDS-PAGE Laemmli (1970) et la technique du zymogramme (Gallardo et *al.*, 2004). Le dispositif d'électrophorèse (Mini Protean II BIORAD) (Fig. 07) utilisé est conçu pour les mini gels, il s'agit d'une cuve et d'une panoplie d'accessoires (peigne, plaque à encoches et un dispositif pour couler le gel).



**Fig. 07** : Cuve et accessoires du dispositif d'électrophorèse Mini Protean II BIORAD

Une plaque électrophorétique est préparée selon la procédure de Laemmli (1970) de manière que la moitié du gel est réservé pour la réalisation de la SDS-PAGE et l'autre moitié soit utilisée pour la réalisation du 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 100µl de persulfate d'ammonium à 15% puis accélérée par ajout de 20 µl de TEMED. Le gel est coulé entre deux plaques d'une épaisseur de 1mm, Le gel de séparation occupe deux tiers de la plaque, on verse 1ml d'un mélange éthanol-eau 50% (v/v). Après polymérisation on élimine l'éthanol-eau puis un gel de concentration à 7,5% d'acrylamide (Annexe II) est coulé au-dessus du gel de séparation et un peigne est enchâssé entre ces plaques.

Après polymérisation du gel, le peigne est retiré formant ainsi des puits qui sont ensuite lavés avec du tampon d'électrophorèse (Annexe II).

L'échantillon et les marqueurs sont préparés de la manière suivante : 75µl de la phase du SDPA est à ajouté à 25µL du tampon d'échantillon (Annexe II), suivi d'un chauffage à 100 °C pendant 5 min.

Les marqueurs 20 µl (BIO RAD) et les dépôts de l'ordre de 10 µl. La migration s'effectue sous l'action d'un champ électrique à 80 V dans le gel de concentration et 120 (V) dans le gel de séparation, 54 milli ampère (mA) pendant 2h jusqu'à ce que le bleu de bromophénol soit à 1cm du bord inférieur de la plaque.

Après migration, le gel est démoulé, puis rincé par l'eau distillée puis coupé en deux, la moitié du gel qui sert pour la réalisation de la SDS-PAGE va subir une fixation des protéines par une solution de fixation et de décoloration (Annexe II).

Le gel est rincé par l'eau distillée et les enzymes sont révélées par une coloration avec le bleu de Coomassie R250 sous faible agitation pendant une nuit.

Le gel est par la suite trempé dans la solution de décoloration et on obtient différentes bandes protéiques colorées en bleu sur fond transparent.

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

Les zymogrammes résultants contiennent des zones transparentes sur fond opaque (Royer et Nakas, 1989). La moitié du gel qui est réservé pour le zymogramme, subit les étapes suivantes :

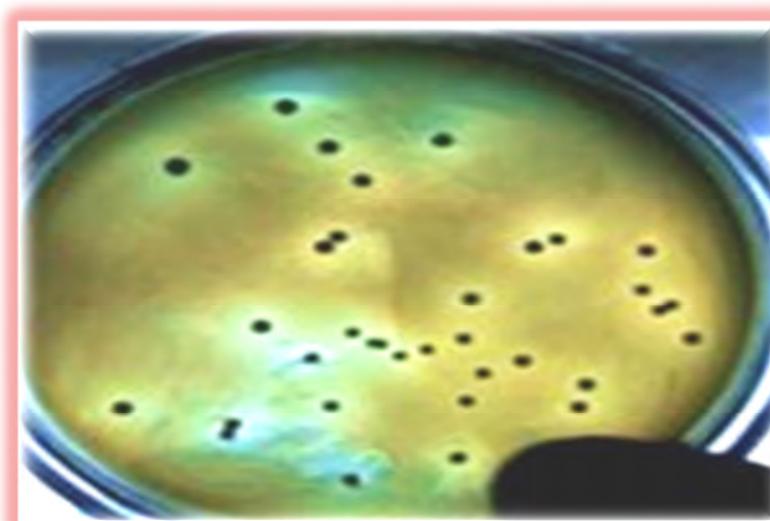
- Après électrophorèse, le gel est mis dans une solution de Triton X-100 à 2,5% (m/v) (Annexe II) pendant 30 min.
- Rinçage du gel par de l'eau distillée puis incubation dans du tampon phosphate 50mM à pH 7 à 50°C pendant 20 min.
- La coloration du gel est faite avec le rouge de Congo (0,1%) (m/v) pendant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

# Résultats et discussions

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

La souche *Jonesia denitrificans* BN13 a été revivifié sur le milieu MM7 solide pendant 48 h d'incubation à 37°C, la croissance de la souche est confirmé par l'apparition des colonies en surface de la gélose.

La production de xylanases extracellulaires se traduit par la formation de zones claires autour des colonies (Fig. 08). Ces zones sont dues à la dégradation du xylane de bouleau.



**Fig. 08 :** Colonies de *Jonesia denitrificans* BN13 entourées de zones d'hydrolyse du xylane de bouleau (Boucherba, 2011)

### II. Production de xylanases de *Jonesia denitrificans* BN 13

En utilisant les courbes d'étalonnages (Fig.09 et 10), on a calculé l'activité xylanolytique et doser les protéines, ce qui nous a permis de déduire l'activité spécifique.

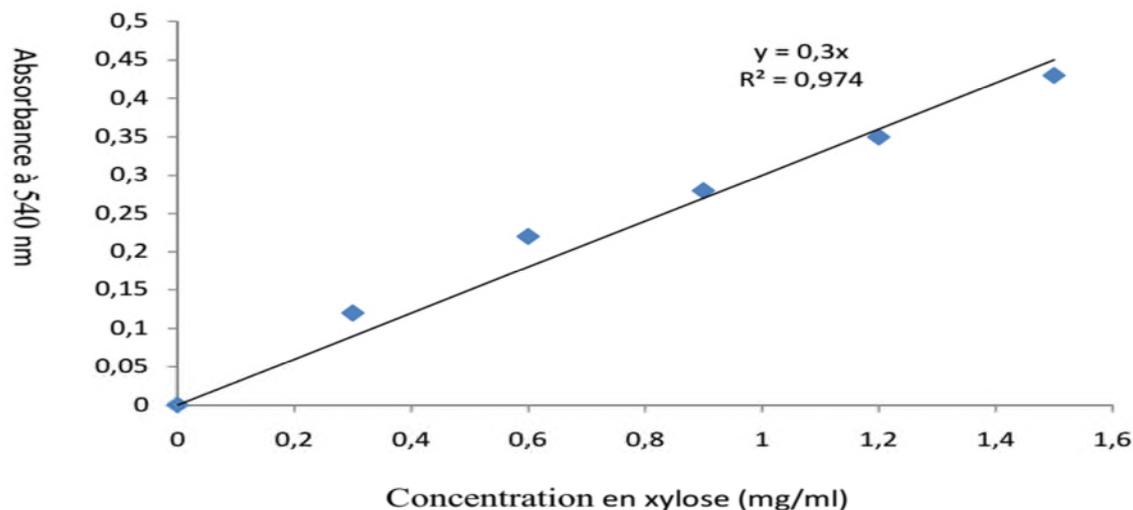


Fig. 09 : Droite d'étalonnage pour le dosage du xylose

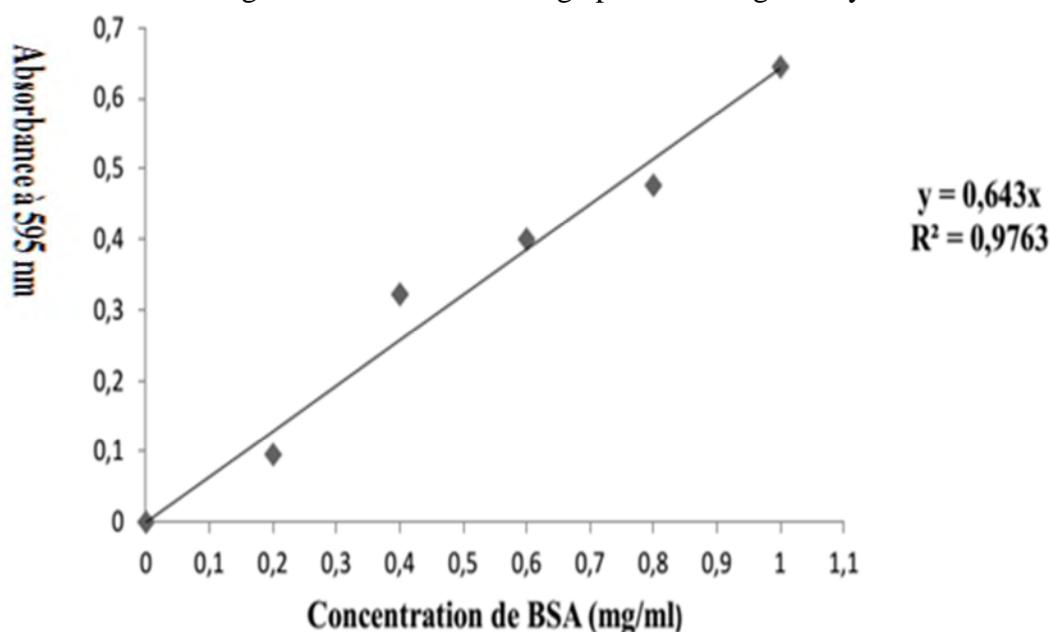


Fig. 10 : Droite d'étalonnage de dosage des protéines par la macrométhode

Après la centrifugation du milieu MM7 liquide l'activité xylanasiqne est testée, elle est de 0,51 U/ ml alors que l'activité spécifique est de 1,08 U/mg. Le tableau VIII résume les résultats de l'activité xylanasiqne et l'activité spécifique

Tableau VIII : Les résultats de l'activité xylanolytique et de l'activité spécifique

Temps d'incubation (jours)	DO à 540 nm	Concentration du xylose (mg/ml)	Activité xylanolytique (U/ml)	DO à 595 nm	Concentration des protéines (mg/ml)	Activité spécifique (U/mg)
2	0,23	0,83	0,51	0,30	0,46	1,08

L'activité xylanolytique obtenue (0,51 U/ ml) est faible par rapport aux travaux de Boucherba (2011) qui a trouvé une activité de 2,5 U/ ml dans les surnagent de culture statique en Erlen. Lorsque la souche *Jonesia denitrificans* est cultivé dans des conditions optimisées à savoir dans un fermenteur de 4 L à 48 h pendant 35 °C, sous agitation de 100 rpm et une aération de 2 vvm, une activité maximale de 10,8 U/ ml est obtenue. La valeur de l'activité xylanasiqque qu'on a trouvé est très faible en comparaison avec les travaux décrits avec les souches d'actinomycètes (Wang *et al.*, 2003).

### III. Spécificité des xylanases vis-à-vis des différents substrats

Les résultats de la spécificité des xylanases vis-à-vis des différents substrats sont représentés dans la figure 11.

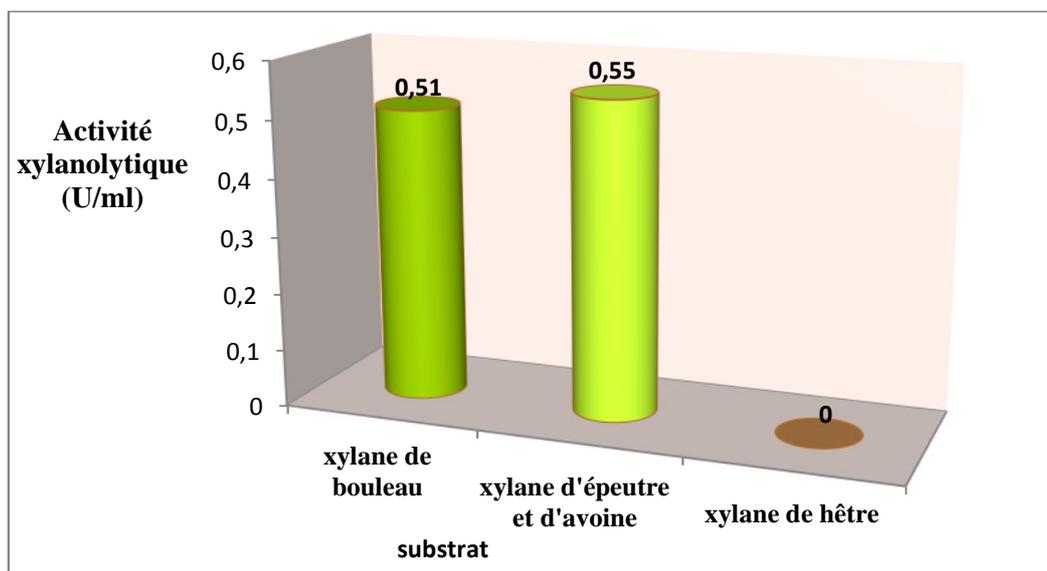


Fig. 11 : Histogramme représentant la spécificité des xylanases vis-à-vis de 03 substrats

D'après les résultats de l'histogramme (fig. 11), on déduit que les xylanases de la souche *Jonesia denitrificans* BN13 dégradent que le xylane de bouleau et le xylane d'épeautre et d'avoine parmi les trois substrats testés. L'activité xylanasiqque vis-à-vis du

xylane d'épeautre et d'avoine (0,55 U/ml) est plus élevée que l'activité xylanase du xylane de bouleau (0,51 U/ml), par contre aucune activité n'est décelable en présence du xylane de hêtre ce qui confirme que la xylanase de *Jonesia denitrificans* a aucune affinité vis-à-vis du xylane de hêtre, l'absence d'activité est due probablement aux chaînes latérales qui empêchaient l'accès de l'endoxylanase à la chaîne principale afin d'exercer une action d'hydrolyse.

Le xylane n'est pas aléatoirement hydrolysé mais les liaisons sélectionnées pour l'hydrolyse dépendent de la nature du substrat tel que la longueur de la chaîne, le degré de ramification et la présence de substituant (Li et al., 2000).

Dans la plupart des articles retrouvés dans la littérature scientifique, les xylanases ont plus de spécificité vis-à-vis du xylane de bouleau. Le Tableau IX indique la production de quelques xylanases à base de différents substrats et leurs activités xylanasiques.

**Tableau IX** : La production de quelques xylanases dans des fermentations en milieu liquide

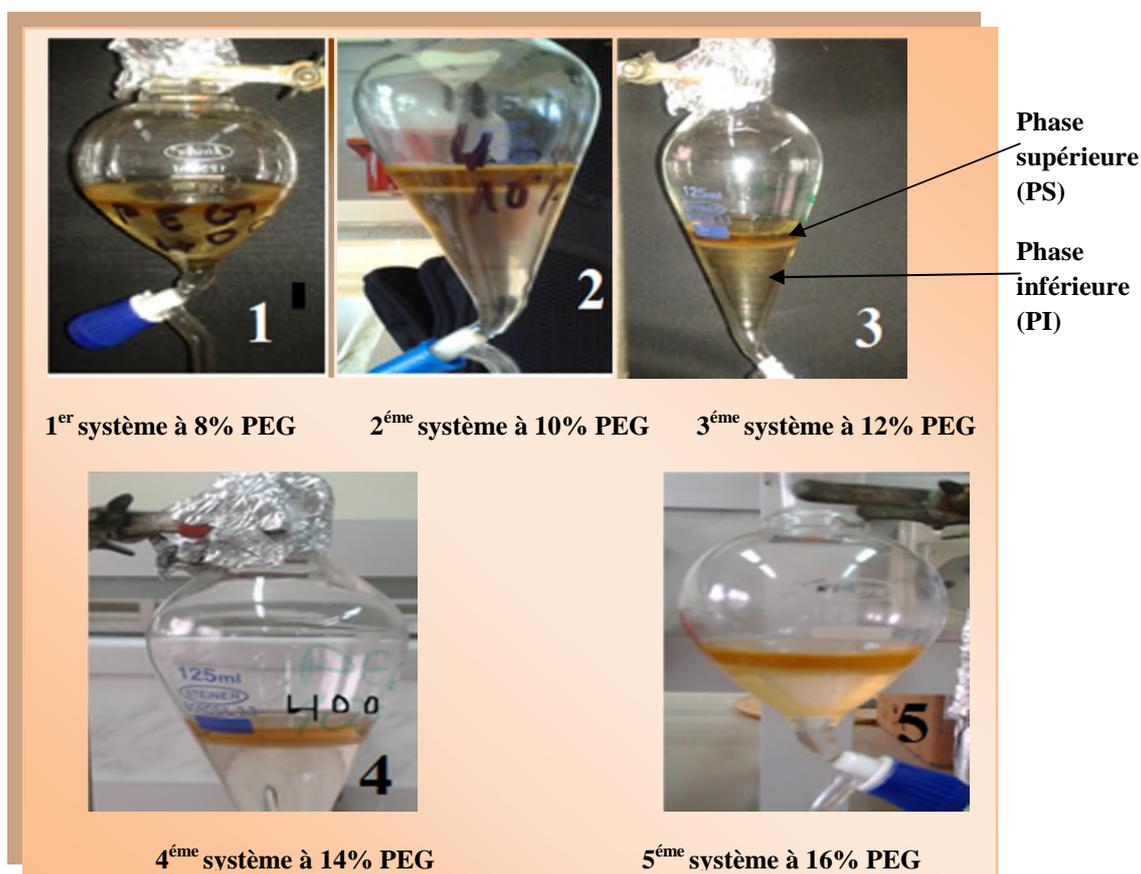
Microorganisme	Substrats	Condition de culture	Activités (U/ml)	Référence
<i>Jonesia denitrificans</i> BN13	Xylane de bouleau 7 g/l	Milieu MM7 liquide, 37°C, pH 6 / 2jours	0,51	Travail actuel
<i>Jonesia denitrificans</i> BN13	Xylane de bouleau 7 g/l	fermenteur de 4L, 37 °C, pH 7 / 2 jours	10,80	Boucherba et al., 2011
<i>Streptomyces sp.</i> QG113	Xylane de bouleau, 10 g/l	Erlen sous agitation, 37°C, pH 8/ 5 jours	7,50	Beg et al., 2000
<i>Streptomyces sp.</i> Ab106	xylane, 10 g/l	Fermenteur de 4L, 55 °C, pH 7,5 / 5jours	8	Techapun et al., 2002
<i>Streptomyces actuosus</i>	Son de riz, 50 g/l	37°C, pH 5, 4 jours	11,60	Wang et al., 2003
<i>Bacillus coagulans</i>	Xylane de bouleau, 10 g/l	Erlen sous agitation, 45 °C, pH 7/ 24h	24,20	Choudhury et al., 2006

## IV. Optimisation du système à deux phases aqueuses (SDPA) pour l'extraction des xylanases

### IV.1. Optimisation de la concentration du PEG 4000

Après décantation des phases pendant 24h, deux phases sont observées (Fig.12) : la phase supérieure et la phase inférieure, on a également observé l'absence d'une interphase. Par contre les travaux de Ouazib et Rehrah (2013), démontre la présence d'une interphase dans un SDPA composé de PEG 4000 à 14% /  $K_2HPO_4$  à 13% et NaCl 0,1 M, lorsque la décantation dure 1h.

Le changement de la concentration en  $K_2HPO_4$  (14%) et du NaCl (1,63%) ainsi que le temps de décantation de 24h influe sur la répartition des phases.



**Fig. 12** : Représentation des différentes phases des systèmes après décantation  
Le tableau suivant donne les volumes des phases supérieures et inférieures :

**Tableau X** : les volumes des différentes phases des systèmes à différentes concentrations de PEG 4000

PEG(%)	8	10	12	14	16
V de PI (ml)	36	38,5	40	30	28
Vde PS (ml)	12	15	15	9,5	17
FR	3	2,56	2,66	3,15	1,64

V PI : Volume de phase inférieure / V PS : Volume de phase supérieure FR : facteur de réduction

A partir de ce tableau on remarque que le volume est réduit à un facteur de 3 pour les systèmes où la concentration du PEG est respectivement de 8, 10, 12 et 14%, alors que dans le système où le PEG est à 16%, le facteur de réduction est de 1,64, lorsque le PEG est à 14% on obtient une meilleure concentration du volume dans la phase supérieure.

Le tableau ci-dessous présente les résultats des différents paramètres après la variation des concentrations du PEG.

**Tableau XI** : Récapitulatif des paramètres de mesure après décantation des SDPA

SDPA	1 <sup>ème</sup> système		2 <sup>ème</sup> système		3 <sup>ème</sup> Système		4 <sup>ème</sup> Système		5 <sup>ème</sup> Système	
	PS	PI	PS	PI	PS	PI	PS	PI	PS	PI
Phases										
Activité de la xylanase en U/ml	1,42	0,02	1,77	0,22	1,66	0,02	0,48	0,42	0,15	0,02
Concentration des protéines (mg/ml)	0,62	0,55	0,69	0,54	0,59	0,57	0,54	0,49	0,54	0,65
Activité spécifique en U/mg	2,29	0,036	2,56	0,40	2,71	0,03	0,88	0,85	0,27	0,03
K	71		8,04		80		1,14		7,5	
R	0,33		0,38		0,37		0,31		0,60	
Y (%)	95,90		75,35		96,78		26,14		81,87	

K : coefficient de partage/ R : ration volumique/ Y : rendement/ PI : phase inférieure/ PS : phase supérieure.

1<sup>er</sup> système : PEG (8%) / K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (14%) / NaCl (1,63%) à pH 7

2<sup>ème</sup> système : PEG (10%) / K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (14%) / NaCl (1,63%) à pH 7

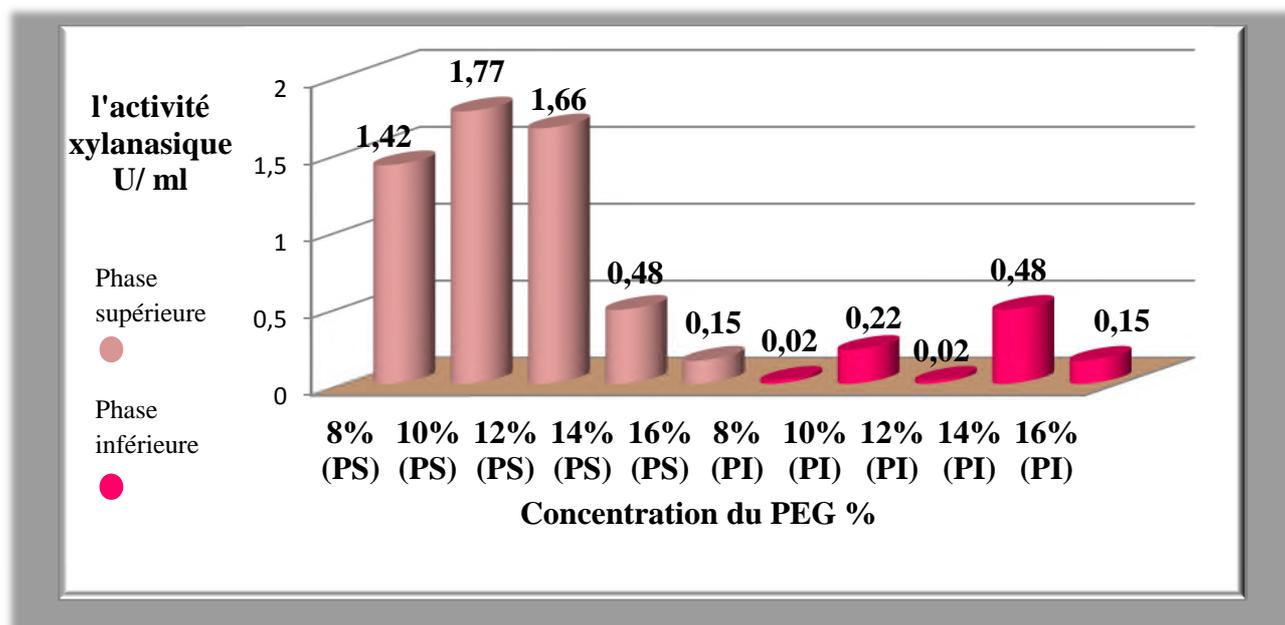
3<sup>ème</sup> système : PEG (12%) / K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (14%) / NaCl (1,63%) à pH 7

4<sup>ème</sup> système : PEG (14%) / K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (14%) / NaCl (1,63%) à pH 7

5<sup>ème</sup> système : PEG (16%) / K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (14%) / NaCl (1,63%) à pH 7

Plusieurs études ont démontré l'influence des différentes concentrations de PEG (7-21%) sur le coefficient de partage. Leurs résultats ont montré l'effet de la concentration du PEG sur la répartition des biomolécules dans les SDPA. Ils ont montrés aussi que la concentration la plus élevée du PEG abaissé le K, la concentration intermédiaire de PEG/sel est plus applicable pour la bonne séparation des biomolécules (Hemavathi et Raghavarao, (2011) ; Karkas et Önal, (2012) et Mehrnoush et *al.*, 2011).

La figure 13 suivante montre l'influence de la concentration du PEG sur l'activité xylanasiq.



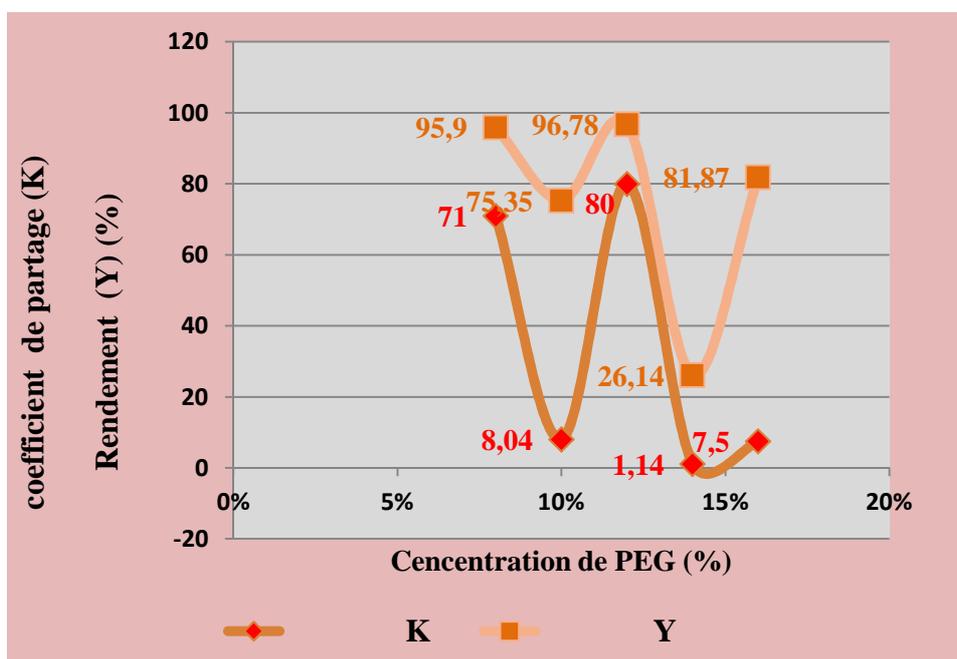
**Fig. 13** : Influence de la concentration de PEG sur l'activité xylanasiq

Avec la variation des concentrations du PEG 4000 de 8% à 16%, le partitionnement de la xylanase de *Jonesia denitrificans* BN13 a été étudié.

Selon les activités xylanasiques obtenues après la variation des concentrations du PEG (Fig. 13), on remarque que les xylanases se répartissent dans les phases supérieures du système dans tous les SDPA réalisés, en revanche des activités plus au moins faibles

sont observées dans les phases inférieures, elle sont presque indétectable dans le 1<sup>er</sup> système, le 3<sup>ème</sup> système et le 5<sup>ème</sup> système, dans le 2<sup>ème</sup> système il a eu une répartition partiel des xylanase vu que l'activité est de 0,22 U/ml dans la phase inférieure alors que dans le 4<sup>ème</sup> système les valeurs de l'activité xylanase dans les deux phases sont presque identiques; ceci est expliqué par les résultats des coefficients de partage (K) qui est de 1,14.

La figure suivante montre l'influence de la concentration du PEG sur le coefficient de partage et sur le rendement :



**Fig. 14 :** Influence de la concentration du PEG sur le coefficient de partage (K) et le rendement (Y)

L'augmentation de la concentration du PEG conduit à l'augmentation des activités xylanasiques dans la phase supérieure jusqu'à 1,77 U/ml et 1,66 U/ml dans le 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> système, on remarque aussi que les valeurs de l'activité spécifique sont proportionnelles à l'activité de la xylanase, avec une valeur maximale de 2,71 U/mg dans le 3<sup>ème</sup> système (Tableau XI). ce dernier est choisi comme meilleur système car le rendement atteint un maximum de 96,78% et un facteur de partage de 80.

Mehrnoosh et collaborateurs (2011), ont rapporté approximativement les mêmes résultats de rendement à 96,7% en utilisant le système PEG 6000 à 16% / MgSO<sub>4</sub> à 15% /

NaCl à 4% à pH7 pour la purification de la protéase des feuilles de Kesinai (*Streblus asper*).

Nos résultats du coefficient de partage et le rendement concorde avec les travaux de Ratanapongleka (2012) qui a trouvé un meilleur rendement de 99,01% avec un K de 66,93 dans un SDPA composé de PEG à 16% / phosphate de potassium à 14% m/m à pH7.

Selon les travaux de Ouazib et Rehra, (2013) la répartition des xylanases se fait dans l'interphase d'un SDPA composé de PEG 13% /  $K_2HPO_4$  13% / NaCl 0,1M à pH 7, le rendement était 60,22% beaucoup plus faible que le rendement obtenue dans la présente étude.

#### IV.2. Optimisation de la concentration du chlorure de sodium (NaCl)

Après la variation des concentrations de PEG et le choix du meilleur système selon le bon rendement ( $Y$ ) = 96,78% on a varié les concentrations de NaCl de 1,63%, 2%, 3% et 4%, les volumes des phases supérieures et inférieures de chaque système sont présentes dans le tableau ci-dessous :

**Tableau XII** : Les volumes des phases supérieures et inférieures après la variation de la concentration de NaCl

NaCl(%)	1,63	02	03	04
Volume de phase inférieure (ml)	40	28	32,5	27,5
Volume de phase Supérieure (ml)	15	15	16	15
Facteur de réduction (FR)	2,66	1,86	2,03	1,83

Les volumes des phases supérieures sont petits par rapport aux volumes des phases inférieures. D'après les résultats du tableau, le FR est maximal à une concentration de 1,63% de NaCl. Après la variation des concentrations des sels (NaCl) on a calculé les paramètres représentés dans le tableau suivant :

Tableau XIII : Paramètres mesurés après la variation de la concentration du NaCl

SDPA	1 <sup>er</sup> système		2 <sup>ème</sup> système		3 <sup>ème</sup> Système		4 <sup>ème</sup> Système	
	PS	PI	PS	PI	PS	PI	PS	PI
Les phases	PS	PI	PS	PI	PS	PI	PS	PI
Activité de la xylanase en U/ml	1,66	0,02	0,66	0,35	0,62	0,02	0,11	0,06
Concentration des protéines (mg/ml)	0,59	0,57	0,55	0,52	0,65	0,57	0,62	0,55
Activité spécifique en U/mg	2,71	0,03	1,2	0,67	0,95	0,03	0,17	0,11
K	80		1,90		31,11		1,85	
R	0,37		0,53		0,49		0,54	
Y (%)	96,78		50,26		93,84		50	

1<sup>er</sup> système : PEG (12%) / NaCl (1,63%) / K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (14%) à pH 7

2<sup>ème</sup> système : PEG (12%) / NaCl (2%) / K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (14%) à pH 7

3<sup>ème</sup> système : PEG (12%) / NaCl (3%) / K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (14%) à pH 7

4<sup>ème</sup> système : PEG (12%) / NaCl (4%) / K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (14%) à pH 7

La figure suivante montre l'évolution de l'activité xylanasique et l'activité spécifique après variation du NaCl

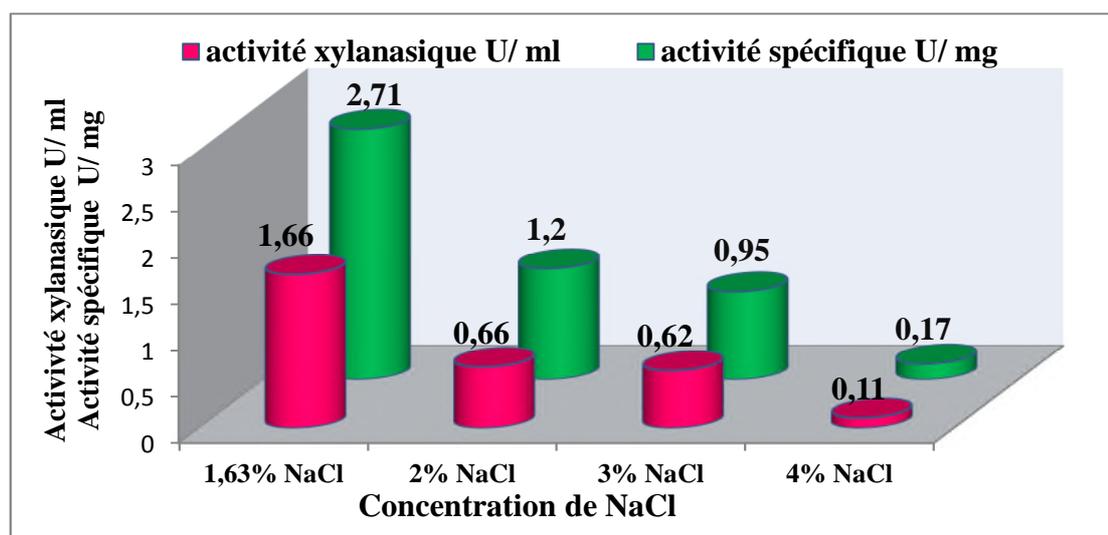


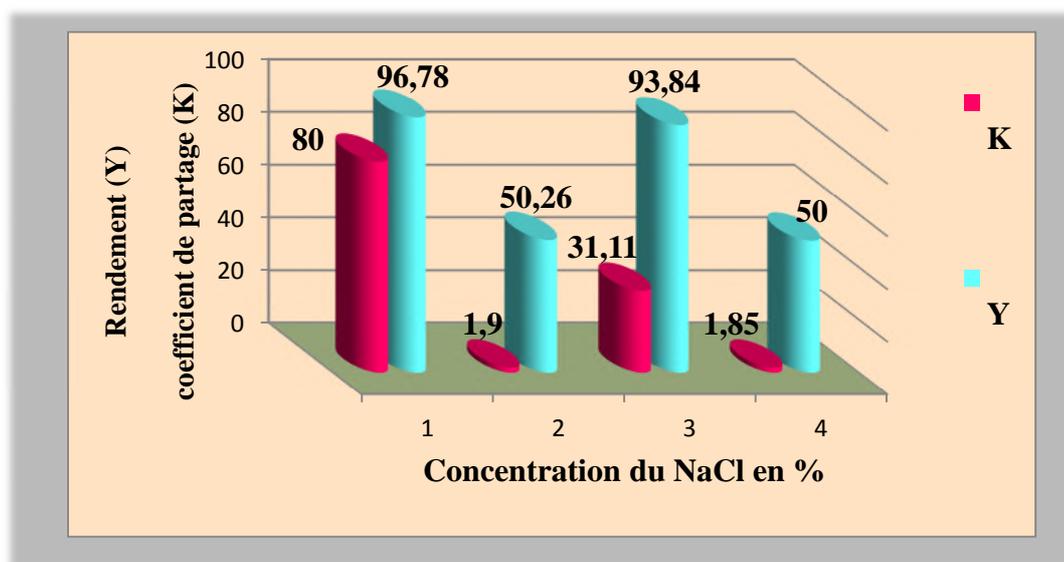
Fig. 15 : Influence de la variation de la concentration en NaCl sur l'activité spécifique et l'activité xylanasique des phases supérieures du SDPA

Dans la Figure ci-dessus, on remarque que l'activité xylanasiqne dans la phase supérieure du 1<sup>er</sup> système qui contient du NaCl à une concentration de 1,63 %, atteint une valeur maximale à 1,66 U/ml et elle diminue jusqu'à 0,11 U/ml dans le 4<sup>ème</sup> système contenant 4% de NaCl.

Le même cas est observé pour l'activité spécifique dans les phases supérieures des systèmes, une meilleure activité spécifique de 2,71 U/mg est obtenue dans le 1<sup>er</sup> système, et elle diminue avec l'augmentation de la concentration du NaCl jusqu'à 0,17 U/mg.

Les deux paramètres calculés diminuent avec l'augmentation de la concentration de NaCl et le meilleur système selon l'activité xylanasiqne et l'activité spécifique c'est le 1<sup>er</sup> système composé de NaCl 1,63% / PEG 12% / K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14% à pH 7.

La figure ci-dessous illustre la variation de K et Y en fonction de la variation de la concentration de NaCl.



**Fig. 16** : Effet de la concentration du NaCl sur le rendement (Y) et le coefficient de partage (K).

Le rendement varie en parallèle avec la variation de K, le meilleur rendement et le meilleur coefficient de partage sont obtenus dans le 1<sup>er</sup> système avec des valeurs respectives de : 96,78% et 80.

Ces résultats sont similaires à ceux de Ratanapongleka en 2012, qui a travaillé sur la purification de la laccase produite par *Lentinus polychrous* ; en utilisant le SDPA, il a

trouvé que le rendement a diminué avec l'augmentation de la concentration du NaCl (0 – 5 %). En effet quand il n'a pas additionné le NaCl, le coefficient de partage était de 88,30 et le rendement était de 99,08%. Il en est de même avec les résultats de Ketnawa et collaborateurs en 2010 qui ont précisé que l'activité de l'enzyme diminue lorsque le NaCl est ajouté. L'addition du sel à des concentrations élevées peut mener à l'agrégation, suivi de la précipitation des protéines.

En général, l'addition de sels neutres, tels que le NaCl à l'SDPA se traduit par une augmentation de l'hydrophobicité causé par une différence de potentiel électrique entre les deux phases du système (Hachem, et *al.*, 1996 ; Gu et Glatz, 2007 et Mehrnoush et *al.*, 2011). L'augmentation de l'hydrophobicité amplifie la force ionique et améliore la migration des composés de faible poids moléculaire vers la phase supérieure, en particulier dans le PEG 4000 (Benavides et Rito-Palomares, 2008).

#### IV.3. Optimisation du pH dans le SDPA

Les volumes obtenus après la variation du pH dans le SDPA sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau XIV** : Volumes des phases supérieures et inférieures après la variation de pH

pH	6	7	8
Volume de Phase inférieure (ml)	46,5	40	23,5
Volume de phase supérieure (ml)	17,5	15	14,5
Facteur de réduction	2,65	2,66	1,62

Les volumes du SDPA à pH 6 et 7 sont réduits d'un facteur de 2,6 alors que dans le SDPA à pH 8 il y'a réduction d'un facteur de 1,62.

En général, la phase supérieure (phase riche en PEG) porte une charge positive tandis que la phase inférieure a une charge négative. Les protéines (enzymes) chargés négativement passent directement dans la phase supérieure. La séparation est alors liée aux propriétés de surface des protéines (Ratanapongleka, 2012).

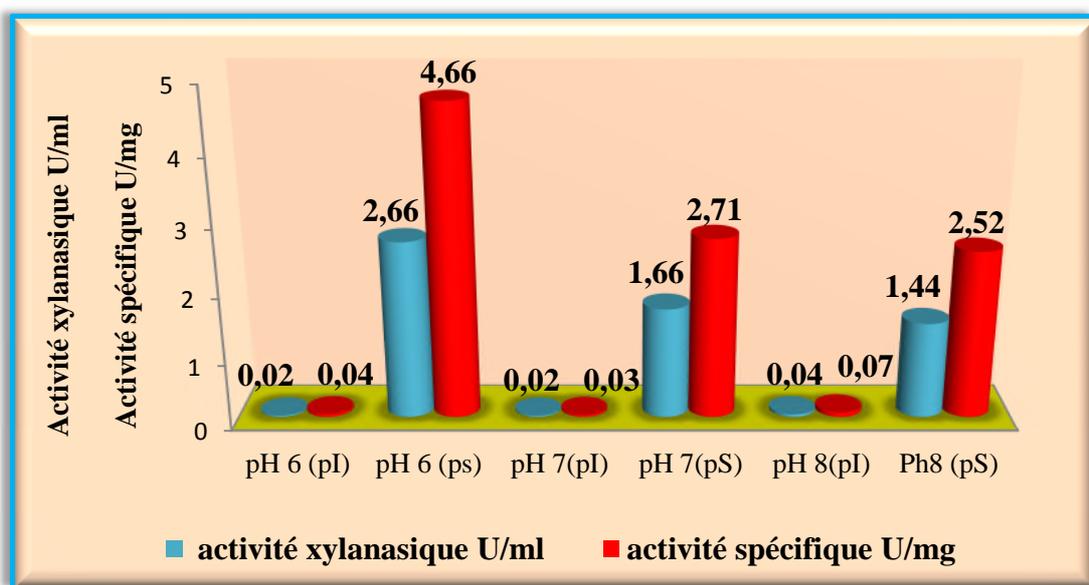
Le tableau ci-dessous présente les différents résultats des différents paramètres après la variation du pH.

**Tableau XV** : Paramètres mesurés dans le SDPA après la variation du pH

SDPA	1 <sup>er</sup> Système		2 <sup>ème</sup> système		3 <sup>ème</sup> Système	
	PS	PI	PS	PI	PS	PI
Phases	PS	PI	PS	PI	PS	PI
Activité de la xylanase en U/ml	2,66	0,02	1,66	0,02	1,44	0,04
Concentration des protéines (mg/ml)	0,52	0,49	0,59	0,57	0,57	0,57
Activité spécifique en U/mg	4,66	0,04	2,71	0,03	2,52	0,07
K	133,33		80		36,11	
R	0,37		0,37		0,61	
Y (%)	98,01		96,78		95,68	

K : coefficient de partage / R : le ratio volumique / Y : Rendement / PS : phase supérieure / PI : phase inférieure

La figure suivante représente la variation de l'activité xylanase et l'activité spécifique après la variation du pH.



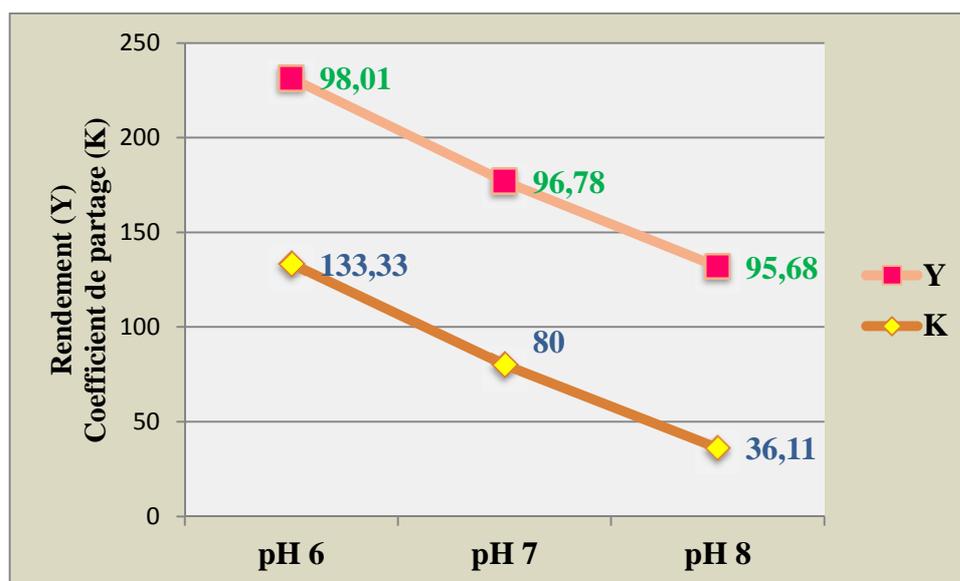
**Fig. 17** : Influence du pH sur les activités spécifique et xylanasiques

Il ressort de la figure 17 que l'activité spécifique dans les phases supérieures de tous les SDPA est supérieure à l'activité des phases inférieures qui sont presque indétectable, la

meilleure activité est obtenue à pH 6 avec une valeur de 4,66 U/ mg et elle diminue avec l'augmentation du pH. Parallèlement à l'activité xylanasique qui diminue respectivement de 2,66 U/ml à 1,44 U/ml d'un pH de 6 à 8.

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 les xylanases sont chargées négativement par rapport au pH car on trouve que l'activité spécifique est majoritaire dans les phases supérieures des systèmes de SDPA. Dans le 3<sup>ème</sup> système, le partitionnement des xylanases a changé de comportement par rapport au pH 6 et 7, alors qu'au pH 8, l'activité spécifique dans la phase supérieure diminue à 2,52 U/mg.

Dans la figure 18 une représentation de la variation du rendement et le coefficient de partage en fonction du p H.



**Fig. 18** : Effet du pH sur la variation de coefficient de partage (K) et le rendement (Y)

Lorsque le pH passe de 6 à 8, le coefficient de partage et le rendement diminuent. A pH6, K= 133,33 et décroît à 36,11 à pH 8, on obtient la même chose avec les valeurs du rendement (Y) qui s'amointrit de 98,01% à pH 6 jusqu'à 95,68% à pH 8.

Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Zhang et Liu en 2010, qui ont travaillé sur la purification et l'immobilisation d'une lipase d'un mutant de *trichosporon* avec un SDPA (PEG 4000 12% / K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 13 %) et qui ont trouvé qu'avec l'augmentation du pH de 7,0 à 9,0 le coefficient de partage de la lipase, a diminué de 7,94 à 4,45.

On remarque que le rendement (Y) de purification diminue avec l'augmentation du pH, par contre le ratio volumique (R) est stable à partir d'un pH de 6 à 7 puis augmente jusqu'à 0,61 à pH 8.

La valeur optimale du rendement d'extraction de la xylanase de *Jonesia denitrificans* BN13 est de 98,01% (le 1<sup>er</sup> système de SDPA). Ce résultat nous a permis de choisir le 1<sup>er</sup> système comme meilleur SDPA pour l'extraction de la xylanase.

Les travaux de Ratanapongleka en 2012, qui a étudié l'influence du pH sur la répartition de la laccase, avec un système composé de PEG 4000 à 12% et phosphate à 16% à des pH 6,5, 7,0 et 7,5. Il a trouvé qu'une augmentation du pH dans le système de 6,5 à 7,0 augmente le coefficient de partage de laccase de 8,87 à 88,30 et le rendement de 91,06 à 99,08%, le meilleur rendement est obtenu à pH 7.

En général, pour le système PEG/sel, la protéine chargée négativement préfère la phase riche en PEG tandis que la protéine chargée positivement se distribue en phase riche en sel (Schmidt et al., 1994 et Silva et al., 2000).

La séparation d'une protéine dans un système à deux phases dépend de la charge nette de la biomolécule, ce qui est une fonction de la solution. Les changements de pH peuvent également induire des changements de conformation dans la structure de la protéine, ce qui provoque également un changement dans le partitionnement des protéines (Ratanapongleka, 2010).

Il est important de signaler que les variations des valeurs de pH au cours des extractions peuvent dénaturer les enzymes et diminuer le rendement d'extraction (Pereira da silva, 2000).

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

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

Espèce	Enzyme	Poids moléculaire du PEG	Composition de SDPA	K	Y	Références
<i>Jonesia denitrificans</i> BN13	Xylanase	4000	PEG 12% / K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 14% / NaCl 1,63% / milieu de culture	133,33	98,01	Travail actuel

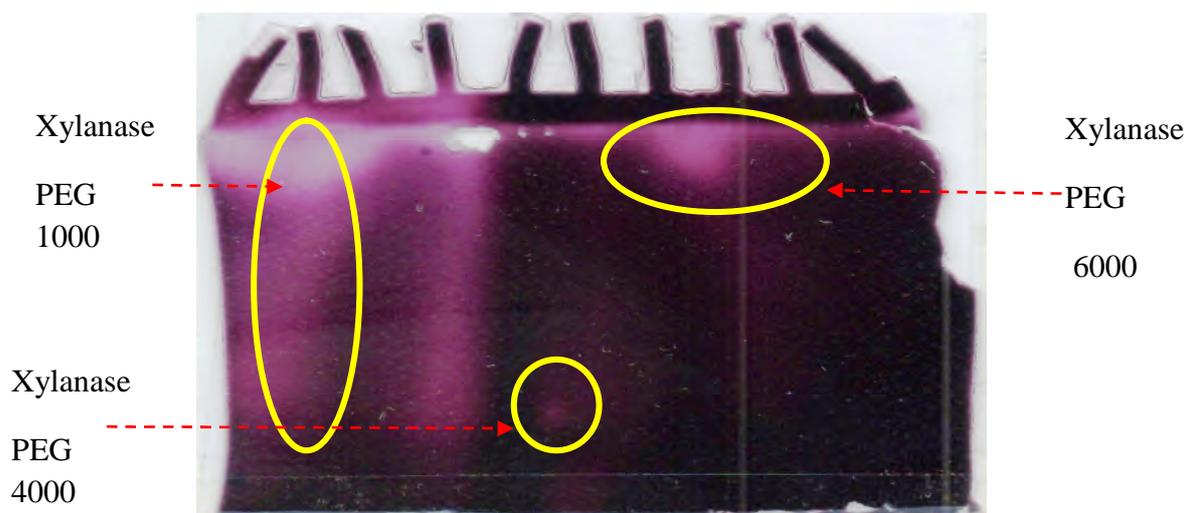
<i>Paecilomyces thermophila</i> J18	Xylanase	4000	47,31% / pH 6 PEG 12,5% / (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à 0,1 M / 50% de la solution d'enzyme à 50% / pH 7,2	231,7	98,7	Yang et al., 2008
<i>Aspergillus candidus</i>	Xylanase	4000	PEG 8,66% / Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 22,4%	8,41	88,1	Garai et Kumar, 2013
<i>Polyporus squamosus</i>	Xylanase	1500	PEG 10% / phosphate d'ammonium 70% / l'extrait brut à 70% / pH 5,1	85,6	97,37	Antov et al., 2005
<i>Trichoderma viride</i>	Xylanase	6000	PEG 12,99% / citrate de sodium 12,09%	47,35	97,03	Li et al., 2011

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

Selon la méthode de Laemmli (1970) une SDS-PAGE a été réalisée, la migration a duré 2h, mais les xylanases de *Jonesia denitrificans* BN13 n'ont pas été révélées par la coloration au bleu de Coomassie malgré que la concentration des protéines était 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 hydrolysent les xylanases, néanmoins on a pu obtenir un zymogramme montrant les activités xylanasiques résiduelles.

La figure 19 montre le profil du zymogramme de la phase supérieure du SDPA à PEG 4000 optimisé en comparaison avec celles des SDPA à PEG 6000 et 1000.



**Fig. 19 :** Zymogramme de la phase supérieure du SDPA à PEG 4000 en comparaison avec les autres SDPA

Concernant la phase supérieure du système à base de PEG 4000, on remarque une faible activité située en bas du gel, c'est probablement la xylanase 6 ayant un point moléculaire de 26 KDA.

Dans la phase du SDPA à PEG 6000, il existe une activité toute en haut du gel, il s'agirait peut être de la xylanase 1 de *Jonesia denitrificans* BN13 ayant un poids moléculaire de 250 KDA selon les travaux de Boucherba et collaborateurs en 2014.

Cependant la phase supérieure du système PEG 1000 à 8,33%, montre un profil de zymogramme dans lequel l'activité est apparente dans le dépôt et dans tout le gel, ce qui veut dire qu'on a affaire à plusieurs xylanases (isoenzymes) probablement six isoenzymes ayant des points moléculaires de ; 250 ; 150 ; 69,64 ; 42,40 et 26 KDA selon les travaux de Boucherba et collaborateurs en 2014.

En conclusion on peut dire que le système à PEG 6000 optimisé a permis la répartition d'au moins une xylanase dans la phase supérieure.

**Conclusion**

## Conclusion

La souche *Jonesia denitrificans* a été cultivé dans un milieu à base de xylane de bouleau, l'activité xylanasiq ue était de 0,51 U/ml, les xylanases produites par la souche possèdent une spécificité vis-à-vis du xylane d'épeautre et d'avoine (0,55 U/ml).

L'extraction et la répartition des xylanases a été optimisée, le meilleur SDPA est composé PEG 4000 à 12%,  $K_2HPO_4$  à 14 %, NaCl à 1,63 % à pH 6, le rendement optimum était de 98,01 % et le coefficient de partage a atteint 133,33.

Le zymogramme révèle la présence d'au moins une xylanase détecté en bas du gel.

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

- ✓ Utiliser des déchets agricoles comme source de carbone (écorce d'orange et le noyau de dattes), car le xylane de bouleau et le xylane d'épeautre et d'avoine sont coûteux.
- ✓ Utiliser une étuve agitatrice (shaker) car l'agitation augmente la production de xylanase selon Boucherba (2011).
- ✓ Optimisation des SDPAs, pour l'utilisation à l'échelle industrielle en jouent sur les différents facteurs ; tel que le poids moléculaires de PEG, la concentration de  $K_2HPO_4$ , le volume du milieuensemencé et la température du SDPA.

# Références bibliographiques

## 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.
- Albertsson PA, Johansson G et Tjerneld F. (1990). Aqueous two-phase separations. In: Asenjo JA, Sep Process Biotechnol. Marcel Dekker, New York, 1990.
- Andersson E et Hahn-Hagerdal. (1990). Enzyme Microb Technol. 12, 242.
- Antov MG, Draginja MP, Milica G et Dasic A. (2005). Aqueous two-phase partitioning of xylanase produced by solid-state cultivation of *Polyporus squamosus*. Process Biochem. 41, 232–235.

### B

- Bailey MJ, Biely P et Poutanen K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. J Biotechnol. 23, 257-270.
- Barry VC et Dillon T. (1940). Occurrence of xylans in marine algae. Nature. 146-620.
- Beg QK, Bhushan B, Kapoor M et Hoondal GS. (2000). Effect of amino acids on production of xylanase and pectinase from a *Streptomyces* sp. QG-11-3. World J Microbiol Biotechnol. 16, 211-213.
- Benavides J et Rito-Palomares M. (2008). Practical Experiences from the Development of Aqueous Two-Phase Processes for the Recovery of High Value Biological Products. J Chem Technol Biot. 83, 133-142.
- Biely P, Puls J et Schneider H. (1985). Acetyl xylanesterases in fungal cellulolytic systems. FEBS Lett. 186, 80-84.
- Bonnin E, Renard C, Thibault JF et Ducroo P. (1997). Les enzymes de dégradation des parois végétales : mode d'action et utilisations alimentaires. In : Larreta-Garde

## Références bibliographiques

- V. (Ed), Enzymes en agroalimentaire. Techniques et documentation Lavoisier, Paris. 169-197.
- Boucherba N, Benallaoua S, Copinet E, Hebal H et Duchiron F. (2011). Production and partial characterization of xylanase produced by *Jonesia denitrificans* isolated in Algerian soil. *Process biochem.* 46 (2), 519-525.
  - Boucherba N. (2011). Production, purification et caractérisation d'une xylanase produite par *Jonesia denitrificans* BN13. Thèse de Doctorat en science biologique. Université d'Abd-Arraheman MIRA de Béjaïa, Faculté des sciences et de la vie, 108P.
  - Boucherba N. (2014). Purification and characterization of the xylanase produced by *Jonesia denitrificans* BN 13. *Appl Biochem Biotechnol.* 172, 2694-2705.
  - Boussarsar H. (2008). Application de traitements thermique et enzymatique de solubilisation et saccharification de la fraction hémicellulosique en vue de la valorisation de la bagasse de canne à sucre. Thèse de doctorat de Chimie Physique Industrielle Chimie Physique Industrielle - Génie biologique. Université de Reims champagne- ardenne, 153P.
  - Bradford MM. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principale of protein-Dye Binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254.

### C

- Choudhury B, Chauhan S, Singh SN et Ghosh P. (2006). Application of xylanase enzyme of *Bacillus coagulans* as a prebleaching agent on non-woody pulps. *Process Biochem.* 41, 226–231.
- Cleland JL, Builde SE, Swartz JR, Winkler M, Chang JY et Wang DI. (1992). Polyethylene glycol enhanced protein refolding. *Nature Biotechnol.* 10 (9), 1013-1019.
- Collins T, Gerday C et Feller G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev.* 29, 3-23.
- Coughlan MP. (1992). Towards and understanding of the mechanism of action of main chain cleaving xylanases. In : *Xylans and xylanases* Visser. J (Eds), Elsevier, Amsterdam.

## Références bibliographiques

### D

- Dekker RFH et Richards GN. (1976). Hemicellulases, their occurrence, purification, properties and mode of action. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 32, 277-352.
- Duarte N. (2005). Extraction à deux phases aqueuses à l'aide d'alcools polyéthoxyles en vue de l'élimination de polluants organiques et d'ions métalliques. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse.

### E

- Engel S, Barak Z, Chipman DM et Merchuk JC. (2000). Purification of acetohydroxy acid synthase by separation in an aqueous two-phase system. *J Chromatogr B.* 743(1-2), 281-286.

### 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. *Curr microbiol.* 48, 276-279.
- Garai D et Kumar V. (2013). Corrigendum to 'Aqueous two phase extraction of alkaline fungal xylanase in PEG/phosphate system: Optimization by Box–Behnken design approach. *Bicatal Agric Biotechnol.* 2, 125–131.
- Goja AM, Yang H, Cui M et Li C. (2013). Aqueous Two-Phase Extraction Advances for Bioseparation. *J Bioprocess Biotech.* 4, 140.
- Gu Z et CE Glatz. (2007). Aqueous Two-Phase Extraction for Protein Recovery from Corn Extracts. *J Chromatogr B.* 845, 38-50.

### H

- Hachem F, Andrews BA et Asenjo JA. (1996). Hydrophobic Partitioning of Proteins in Aqueous Two-Phase Systems. *Enzyme Microb Tech.* 19, 507-517.
- Hatti-Kaul R. (1999). *Methods in Biotechnology: Aqueous twophase systems: Methods and Protocols.* Humana Press Inc. Totowa NJ.

## Références bibliographiques

- He GQ, Zhang XY, Tang XJ, Chen QH et Ruan H. (2005). Partitioning and purification of extracellular  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase in aqueous two-phase systems. J Zhejiang Univer Sci. 6 B (8), 825-831.
- Hemavathi AB, Raghavarao KSMS. (2011) Differential Partitioning of B-Galactosidase and B-Glucosidase using Aqueous Two Phase Extraction. Process Biochem. 46, 649-655.
- Hrmova M, Biely P et Vrsanska M 1986 Specificity of cellulase and béta-xylanase induction in *Trichoderma reesei* QM 9414. Arch Microbiol. 144, 307-311.

### K

- Karkas T, Önal S. (2012) Characteristics of Invertase Partitioned in Polyethylene Glycol / Magnesium Sulfate Aqueous Two-Phase System. J Biochem Eng. 60, 142-150.
- Kato Y et Nevins DJ. (1985). Isolation and identification of O-(5-O-feruloyl- $\alpha$ -larabinofuranosyl), (1-->3)-O-B-d-xylopyranosyl, (1-->4)-d-xylopyranose as a component of Zea shoot cell-walls. Carbohydrate Research. 137-139.
- Ketnawa, S, Rawdkuen, S et Chaiwut P. (2010). Two phase partitioning and collagen hydrolysis of bromelain from pineapple peel Nang Lae cultivar. Biochem Enginer Journal. 52(2-3), 205-211.

### L

- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 (5259), 680-685.
- Li K, Azadi P, Collins R, Tolan JS et Eriksson KL. (2000). Relationship between activities of xylanases and xylan structures, Enzyme Microb Technol. 27,89-94.
- Lie Xin, Zhina Lian, Bo Dong, Yong Xu, Qiang Yong et Shiyuan Yu. (2011). Extractive bioconversion of xylan for production of xylobiose and xylotriose using a PEG6000/sodium citrate aqueous two-phase system. Korean J Chem Eng. 28 (9), 1897-1901.

## Références bibliographiques

### M

- Mehrnoush A, Mustafa S, Sarker MI et Yazid AMM. (2012). Optimization of Serine Protease Purification from Mango (*Mangifera Indica* cv. Chokanan) Peel in Polyethylene Glycol/Dextran Aqueous Two Phase System. *Int J Mol Sci.* 13, 3636-3649.
- Mehrnoush A, Mustafa S, Yazid AMM. (2011). 'Heat-Treatment Aqueous Two Phase System' for Purification of Serine Protease from Kesinai (*Streblus Asper*) Leaves. *Molecules.* 16, 10202-10213.
- Mehrnoush A, Shuhaimi M, Abdul M et Mohd Y. (2011). Heat-Treatment Aqueous Two Phase System for Purification of Serine Protease from Kesinai (*Streblus asper*) Leaves. *Molecules.* 16, 10202-102130.
- Miller GL. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.* 31, 87-95.
- Mirande C. (2009). Dégradation des fibres pariétales et système xylanolytique de *Bacteroides xyloisolvans* 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.

### N

- Naganagouda K et Mulimani VH. (2008). Aqueous two phase extraction (ATPE): an attractive and economically viable technology for downstream processing of *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -galactosidase. *Process Biochem.* 43(11), 1293-1299.
- Nishitani K et Nevins DJ. (1991). Glucuronoxylan xylanohydrolase a unique xylanase with the requirement for appendant glucuronosyl units. *J Biol Chem.* 266(10), 6539-6543.
- Nitsawang S, Hatti-Kaul R et Kanasawud P. (2006). Purification of Papain from *Carica Papaya* Latex: Aqueous Two-Phase Extraction versus Two-Step Salt Precipitation. *Enzyme Microb Tech.* 39, 1103-1107.

## Références bibliographiques

### O

- Ouazib Y et Rehrah H. (2013). Extraction des xylanase de *Jonesia denitrificans* BN13 par le système polyéthylène glycol/ phosphate dipotassique. Mémoire de master 2 en biotechnologie Microbienne. Université Abderrahmane MIRA de Béjaia. 44P.

### P

- Panbangred W, Shinmyo A, Kinoshita S et Okada H. (1983). Purification and properties of endoxylanase produced by *Bacillus pumilus*. Agricultural and Biological Chemistry. 47,957.
- Pereira da Silva D, Pontes MZR, De Souza MA, Vitolo M, De Almeida Silva JB et Adalberto PJ. (2002). Influence of pH on the partition of glucose-6-phosphate dehydrogenase and hexokinase in aqueous two-phase system. Braz J Microbiol. 33,196-201.
- Poutanen K. An alpha-L-arabinosidase of *Trichoderma reesei*. J Biotechnol. 7, 271-282.
- 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 sci. 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, 7-16.
- Ratanapongleka K. (2010). Recovery of Biological Products in Aqueous Two Phase Systems. Int J Chem Eng Applications. 1(2), 191-198.
- Ratanapongleka K. (2012). Partitioning behavior of laccase from *Lentinus polychrous* Lev in aqueous two phase systems. Songklanakarin J Sci Technol. 34 (1), 69-76.
- Royer JC et Nakas JP. (1989). Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum*. Enzyme Microb. 11, 405–10.

## Références bibliographiques

- Ruiz-Arribas A, Fernández-Ábalos JM, Sánchez P, Garda AL et Santamaría RI. (1995). Over production, purification, and biochemical characterization of a xylanase (Xys1) from *Streptomyces halstedii* JM8. *Appl environ microbiol.* 61 (6), 2414-2419.

### S

- Sá-Pereira P, Paveia H et Costa-Ferreira M. (2003). Aires-Barros MRA. New Look at Xylanases. *Molecu Biotechnol.* 24, 257-281.
- Shallom D et Shoham Y. (2003). Microbial hemicellulases. *Curr Opin Microbiol.* 6, 219-228.
- Scheller HV et Ulvskov P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology.* 61, 263.
- Schmidt AS, Ventom AM et Asenjo JA. (1994). Partitioning and purification of [alpha]-amylase in aqueous two-phase systems. *Enzyme microb tech.* 16, 131-142.
- Shleser R, (1994). Ethanol production in Hawaii. State of Hawaii, Energy Division, Department of Business, Economic Development and Tourism. Honolulu HI USA. 62pp.
- Silva ME et Franco TT (2000). Purification of soybean peroxidase (*Glycine max*) by metal affinity partitioning in aqueous two-phase systems. *J Chromatogr B.* 743, 287-294.
- Srinivas ND, Rashmi KR et Raghavarao KSMS. (1999). Extraction and purification of a plant peroxidase by aqueous twophase extraction coupled with gel filtration. *Process Biochem.* 35, 43-48.
- Srinivas ND, Barhate RS et Raghavarao KSMS. (2002). Aqueous two-phase extraction in combination with ultrafiltration for downstream processing of *Ipomoea peroxidase*. *J food eng.* 54(1), 1-6.
- Sun RC, Lawther JM et Banks WB. (1996). *Carbohydr Polym* 29 325. *Tech Ass Paper Pulp Ind.* 43 (2), 209A-218A.

## Références bibliographiques

### T

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

### W

- Wang SL, Yen YH, Shin IL, Chang AC, Chang WT et Wu WC. (2003). Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. *Enzymre Microb Technol.* 33, 917–925.
- White BA, Mackie RI et Doerner KC. (1993). Enzymatic hydrolysis of forage cell walls. In: Forage cell wall structure and digestibility (Jung HG, Buxton DR, Hafield RD et Ralph J. (Eds), pp 455-484.
- 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

- Yücekan I et Önal S. (2011). Partitioning of invertase from tomato in polyethylene glycol/sodium sulfate aqueous two-phase systems. *Process Biochem.* 46(1), 226-232.
- Yang S, Huang Z, Jiang Z et Li L. (2008). Partition and purification of a thermostable xylanase produced by *Paecilomyces thermophila* in solid-state fermentation using aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry.* 43(1), 56-61.

### Z

- Zhang M, Hub P, Liang Q, Yang H, Liu Q, Wang Y et Luo G. (2007). Direct process integration of extraction and expanded bed adsorption in the recovery of crocetin derivatives from *Fructus gardenia*. *J Chromatogr B.* 858, 220-226.

## Références bibliographiques

- Zhang Y et Liu J. (2010). Purification and InSitu Immobilization of Lipase From of a Mutant of *Trichosporon Laibacchi* using Aqueous Two-Phase Systems. J Chromatogr B. 878 ,909-912.

# Annexes

## ANNEXE I

### I. Matériel utilisé

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

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

### II. Produits utilisés

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

## ANNEXE I

### III. Préparation du milieu MM7 liquide

Composition du milieu :

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

- ✓ Agitation et chauffage à 100°C jusqu'à la dissolution totale des ingrédients ;
- ✓ Le milieu est ajusté à pH 7 avec une solution basique à base de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (viet et *al.*, 1990), avec agitation en permanence sur une plaque agitatrice ;
- ✓ Autoclavage pendant à 120°C pendant 20 minutes;

### IV. Milieu MM7 solide

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

## ANNEXE II

### Annexe II

#### 1. Préparation d'acide dinitrosalicilique

Solution à base d'acide dinitrosalicilique (DNS)

Réactif	Quantité
Acide dinitrosalicilique	10 g
NaOH	16 g
Tartrate de potassium sodique	300g
Eau distillée	1000 ml

#### 2. Préparation du réactif Bradford

Solution de bleu de Coomassie G250 pour le dosage des protéines

Réactif	Quantité
Bleu de Coomassie G250	10 mg
Ethanol 99,5%	5 ml
Acide phosphorique 85%	10ml
Eau distillée	100ml

« Protocole SDS-PAGE » (Laemmli, 1970)

#### 3. Solution de solubilisation des protéines (tampon échantillon)

Tampon de solubilisation: pH 6,8

Produit	Concentration pourcentage	Quantité (g)
Tris-HCl	312,5 mM	1,892
EDTA	0.4 mM	0,007
SDS	7.5 %	3,75
Glycérol	25 %	12,5
$\beta$ -mercaptoéthanol	/	0.025
Bleu de bromophénol	0.05%	800 $\mu$ l

Volume : 50mL

#### 4. Solutions tampons utilisées pour l'électrophorèse

4.1. Tampon de migration : pH 8,3

## ANNEXE II

Produit	Concentration/pourcentage	Quantité
Tris	0,025 M	1,06 g
Glycine	0,192 M	5,04 g
MCE	0,05 %	175 µL
SDS	0,1 %	0,35 g

Volume : 350 mL

### 4.2. Solution de fixation et de décoloration 2,3.

Produit	Quantité
Acide acétique	5 %
Alcool (éthanol)	30 %

Volume : 300 mL

### Solution de coloration.

Produit	Quantité
Acide acétique	10 %
Alcool (éthanol)	40 %
Bleu de coomassie R250	2,9 mM

Volume : 200 mL

## 5. Solution pour les gels d'électrophorèse

### 5.1. Tampon Résolving (séparation): pH 8,8

Produit	Concentration/pourcentage	Quantité
Tris-HCL	3 M	36,35 g
SDS	0,8 %	0,8 g
Mercaptoéthanol (MCE)	0,4 %	400 µl

Volume : 100mL

### 5.2. Tampon Stacking (concentration) : pH 6,8

Produit	Concentration/pourcentage	Quantité
Tris-HCL	0,5M	6,054 g
SDS	0,4 %	0,4 g
MCE	0,2 %	200 µl

Volume : 100mL

### 5.3. Solution d'acrylamide

Produit	Pourcentage	quantité (g)
Acrylamide	30%	15
Bis acrylamide	0,8%	0,4

## ANNEXE II

### 6. Gels d'électrophorèse

#### 6.1 Gel de séparation à 12%

Réactif	Volume
Solution d'acrylamide	2,5ml
Tampon de séparation (Résolving)	5,2ml
TEMED	20 $\mu$ l
Persulfate d'ammonium(APS)	100 $\mu$ l
Eau distillée	4,4ml

#### 6.2. Gel de concentration à 7,5%

Réactif	Volume
Solution d'acrylamide	2,5ml
Tampon de concentration (Staking)	2,5ml
TEMED	10 $\mu$ l
Persulfate d'ammonium (APS)	100 $\mu$ l
Eau distillée	4900 $\mu$ l

### 7. Solutions pour le zymogramme

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

Produit	Quantité
Triton X-100	2,5 g
Eau distillée	100 ml

#### 7.2. Solution de rouge de Congo à 0,1% (m/v)

Produit	Quantité
Rouge de Congo	0,1 g
Eau distillée	100 ml



## Résumé

Dans le présent travail, un système à deux phases aqueuse (SDPA), composée de polyéthylène glycol 4000 et de  $K_2HPO_4$  et de NaCl a été utilisé pour l'extraction des xylanases produite par *Jonesia denitrificans* BN13. La variation des paramètres du système tels que la concentration de PEG et le NaCl, le pH du système, et le partitionnement de la xylanase a été étudié.

La production des xylanases dans un milieu à base de xylane de bouleau était de 0,51U/ ml, présente une spécificité vis-à-vis du xylane d'épeautre et d'avoine.

Le meilleure SDPA pour l'extraction des xylanases de *Jonesia denitrificans* est un système composé de PEG 4000 12%,  $K_2HPO_4$  14%, NaCl 1,63% à pH 6, avec ce système on obtient un coefficient de partage de 133,33 et un rendement de 98,01%.

**Mots-clés :** *Jonesia denitrificans* BN13, Xylanase, Xylane d'épeautre et d'avoine, SDPA, Polyéthylène glycol, Extraction.

## Abstract

In this present work, a system of two aqueous phases (ATPS) composed of polyethylene glycol 4000,  $K_2HPO_4$  and NaCl was used for extraction of xylanase produced by *Jonesia denitrificans* BN13. Changes in the parameters of the system such as: the concentration of PEG and the NaCl, and pH of system, and the partitioning of xylanase was studied.

The production of xylanases in a medium containing birchwood xylan was 0,51U/ml, the xylanase has a specificity against oat spelt xylan .

The best ATPS for the extraction of the xylanase *Jonesia Denitrificans* was a system composed of PEG 4000 12%,  $K_2HPO_4$  14%, NaCl 1,63% and pH 6, the partition coefficient and the yield were : 133,33, 98,01% respectively.

**Key-words:** *Jonesia denitrificans* BN 13, Xylanase, Oat spelt xylan, ATPS, Extraction.