

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 présenté en Vue de l'Obtention du Diplôme
de Master en Microbiologie
Option
Biotechnologie Microbienne*

Thème

*Extraction des xylanases de *Jonesia
denitrificans* BN13 par le système
polyéthylène glycol / phosphate
dipotassique*

Réalisé par :

Mlle : OUAZIB Yasmina

Mlle : REHRAH Houria

Membre du jury :

Président: M. GAGAOUA. M (MAB₁, INATAA, Université de Constantine 1).

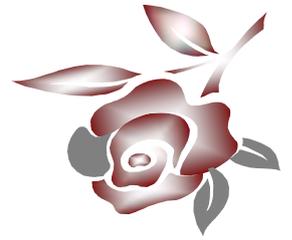
Examinatrice 1: Mme JOUDI O. (MAA, Université A / MIRA de Béjaïa).

Examinatrice 2: Mme BOUDERIES S. (MAA, Université A / MIRA de Béjaïa).

Examineur 3 : M. MESSIS A.Z. (Doctorant, Université A / MIRA de Béjaïa).

Promotrice : Mme BOUCHERBA N. (MCB, Université A / MIRA de Béjaïa).

Promotion : 2012 / 2013



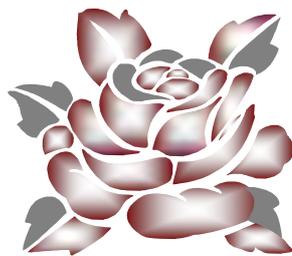
Remerciements

On remercie en premier lieu, le grand dieu pour le courage, la patience et la santé qui nous a donné pour suivre nos études.

Nous tenons à remercier le président M. GAGAOUA M ainsi que les membres de jury Mme JOUDI O., Mme BOUDERIES S et M. MESSIS A.Z. d'avoir bien voulu juger et évaluer notre travail.

Notre profonde gratitude, et nos vifs remerciements vont également s'adresser à notre promotrice Mme BOUCHERBA N pour son temps, sa franchise, son aspect sérieux dans le travail et son bagage de connaissance qu'elle nous a fait partager.

Enfin nous remercions toute personne ayant contribué à l'élaboration de notre travail.



DEDICACES

*Je dédie ce travail premièrement à mes chers parents
qui ont permis de me former et encourager pendant toute ma
formation, je leurs dois beaucoup dans cette vie, que dieu les
protège et les garde en bonne santé.*

*A ma très chère sœur et ma petite perle Radia que j'aime
énormément ainsi que mon adoré frère Ghiles.*

*A mes grands parents et toutes mes tantes Razika, Ghania, et
Zohra avec tous les membres de leurs familles
sans oublier Dada et sa famille.*

*A mon amie et collaboratrice Houria avec laquelle j'ai passé des
bons moments*

*A toutes mes amies et tout mes amis sans exception surtout
Ceux qui sont chers à mon cœur dont je me souviendrai
toujours.*



Yasmina



Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Mes parents adorés qui m'ont préservé du moindre mal, qui ont guidé mes pas, qui m'ont toujours encouragé dans mes études, je leurs doit d'être la personne que je suis devenue, qu'ils puissent trouver ici l'expression de ma profonde gratitude et que Dieu me les garde.

Ma très chère grand-mère Djida mnana que dieu la garde pour longtemps

Mon cher Halim que j'aime énormément

Mon très cher frère Amirouche et ma sœur Rachida.

Toute ma famille, oncles, tantes, cousins et cousines.

Mon amie et binôme Yasmina avec laquelle j'ai passé des moments inoubliables

Mes copines de chambre, Biba, Mima et Moumah

Tous mes amies, Lilia, Navel, Imene, blima, koukouche, Salima et Menad

Toute la promotion de biontechnologie microbienne.

Et a mon âme sœur Salim que j'aime

Profondément

Houria

Liste des tableaux

I.	Composition en xylane de différentes espèces du bois	07
II.	Gamme d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs	21
III.	Gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines par la macrométhode	23
IV.	Gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines par la microméthode	23
V.	Mesure de la biomasse et l'activité xylanolytique	29
VI.	Production de xylanases par le genre <i>Jonesia</i> et <i>Streptomyces</i>	30
VII.	Résumé des volumes des différentes phases obtenues	33
VIII.	Paramètres mesurés après SDPA.....	35
IX.	Exemples d'extraction des xylanases par divers SDPA	37
X.	Paramètres mesurés après application du système PEG 4000 (13%)/K ₂ HPO ₄ (13%), NaCl 0,1M	39
XI.	Comparaison entre les poids moléculaires de la xylanase de <i>Jonesia denitrificans</i> BN13 et ceux de quelques microorganismes	42

Liste des figures

1. Micrographie électronique de <i>Jonesia denitrificans</i>	04
2. Structure du xylane de bouleau.....	06
3. Structure de l'arabinoxylane	07
4. Structure de l'arabinoglucuronoxylane.....	08
5. Structure du polyéthylène glycol.....	12
6. Courbe binodale	16
7. Réaction du DNS avec un sucre réducteur.....	21
8. Schéma général d'une dialyse.....	24
9. Cuve et accessoires du dispositif d'électrophorèse (Mini Protean II, BIORAD)	25
10. Souche de <i>Jonesia denitrificans</i> BN13.	28
11. Colonies de la souche BN13 entourées de zones d'hydrolyse du xylane de bouleau ...	28
12. Courbe d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs	31
13. Courbe d'étalonnage pour la macrométhode	31
14. Courbe d'étalonnage pour la microméthode	32
15. Formation des trois phases.	34
16. Image montrant les phases après optimisation du pH.	38
17. Profil de migration des protéines sur SDS-PAGE et mise en évidence des xylanases par zymogramme.	41
18. Courbe d'étalonnage des marqueurs pour l'estimation du poids moléculaire.	41

Liste des abréviations

- ☞ BSASérum bovin albumin.
- ☞ MgSO₄.....Sulfate de magnesium.
- ☞ PPA.....Acide polyacrylique.
- ☞ U/ml..... Unité par millilitre.
- ☞ rpm Rotation par minute.
- ☞ DNS L'acide 3,5-dinitrosalicylique.
- ☞ KDaKilodaltons.
- ☞ TrisTrizma base.
- ☞ mA..... Milli-ampère.
- ☞ Rf.....Rapport frontal.
- ☞ MM.....Masse molaire.
- ☞ pI..... Point isoélectrique.
- ☞ PEG Polyéthylène glycol.

Sommaire

SOMMAIRE

Introduction	01
---------------------------	-----------

Synthèse bibliographique

I. Microorganismes producteurs de xylanases	03
----------------------------------------------------------	-----------

II. Genre <i>Jonesia</i>	03
---------------------------------------	-----------

Classification	03
----------------------	-----------

II.1. <i>Jonesia denitrificans</i>	03
------------------------------------------	-----------

Caractères généraux	03
---------------------------	-----------

III. Hémicellulose	05
---------------------------------	-----------

III.1. Glucuronoxylane	05
------------------------------	-----------

III.1.1. Xylane de bouleau	05
----------------------------------	-----------

III.2. Arabinoxylanes.....	07
----------------------------	-----------

III.3. Arabinoglucuronoxylanes.....	08
-------------------------------------	-----------

III.4. Homoxylanes	08
--------------------------	-----------

IV. Enzymes xylanolytiques	08
-----------------------------------------	-----------

IV.1. Endoxylanases.....	08
--------------------------	-----------

IV.2. Classification des xylanases	09
------------------------------------------	-----------

IV.3. Production des xylanases	10
--------------------------------------	-----------

V. Système à deux phases aqueuses	10
------------------------------------------------	-----------

V.1. Généralités.....	10
-----------------------	-----------

V.1.1. Polyéthylène glycol	11
----------------------------------	-----------

V.2. Principe de séparation par SDPA	12
--------------------------------------------	-----------

V.3. Paramètres influençant la séparation des biomolécules.....	12
-----------------------------------------------------------------	-----------

V.4. la courbe binodale.....	15
------------------------------	-----------

V.5. Paramètres de partition	17
------------------------------------	-----------

V.6. Avantages et application.....	18
------------------------------------	-----------

Matériel et méthodes

A. Matériel	19
B. Méthodes	19
I. Préparation et ensemencement des milieux de culture	19
II. Préparation du système a deux phases aqueuses	19
III. Méthodes analytiques	20
III.1. Mesure de la biomasse	20
III.2. Mesure de l'activité xylanolytique	20
III.3. Dosage des protéines	22
III.3.1. Macrométhode	22
III.3.2. Microméthode.....	23
IV. Dialyse	23
V. SDS-PAGE et zymogramme	24

Résultats et discussion

I. Préparation des milieux MM7 liquides	28
II. Résultats des méthodes analytiques	30
III. Résultats du système à deux phases aqueuses (SDPA)	32
III.1. Récupération des phases du système à deux phases aqueuses (SDPA)	32
III.2. Optimisation du SDPA	33
III.2.1. Effet de la concentration du PEG 4000 sur la répartition des xylanases	33
III.2.2. Effet du pH sur le partage des xylanases	37
IV. Caractérisation électrophorétique sur SDS-PAGE et réalisation du zymogramme	40
Conclusion et perspectives	43

Introduction

Introduction

Le recours à la biotechnologie blanche et aux ressources renouvelables en tant qu'alternatives à la chimie industrielle intéressent fortement les acteurs du développement durable et de la Chimie verte, la biomasse lignocellulosique possède un grand potentiel comme matière première pour la production durable et alternative d'énergie, biocarburant et les produits chimiques (**Garai et kumar, 2013**).

L'hémicellulose est le deuxième réservoir du carbone organique après la cellulose, il est abondant et renouvelable dans la nature, le majeur constituant est le xylane ; il représente 20 à 35% du poids sec de la paroi cellulaire des plantes (**Mc Cann et Roberts, 1991 ; Collins et al., 2005**).

Le xylane est un polysaccharide hétérogène, composé d'unités β -D-xylopyranosyl, liés par des liaisons $\beta(1,4)$ glycosidiques (**Mc Cann et Roberts, 1991 ; Collins et al., 2005**).

Son hydrolyse complète nécessite l'utilisation d'un complexe enzymatique : les β -(1,4) endoxylanases, les β -xylosidases, les arabinofuranosidases, les α -glucuronidases et enfin les estérases (**Sá-Pereira, 2003**), mais les principales enzymes impliquées dans l'hydrolyse de la chaîne principale sont les deux premières (**Dekker et Richards, 1976 ; Sharma et Bajaj, 2005**).

Dans le domaine de la biotechnologie, il est important de développer des méthodes de purification qui sont à la fois économiques et préservant l'activité biologique (**Assamooi et al., 2009 ; Rodríguez-Durán et al., 2013**).

Le système à deux phases aqueuses (SDPA) a été proposé comme une technique d'extraction, de séparation et de concentration des biomolécules (**Madhusudhan et Raghavarao, 2012**).

Peu d'études sur l'extraction des xylanases par SDPA ont été rapportées (**Yasinok et al., 2010**), c'est pour cette raison qu'on s'est intéressé à l'application de ce système sur le milieu MM7ensemencé avec la souche *Jonesia denitrificans* BN13, cette étude est une poursuite des travaux de **Boucherba (2011)**.

Dans notre présent travail nous avons extrait les xylanases de *Jonesia denitrificans* BN13 en appliquant un système composé de PEG 4000 (13%) / K_2HPO_4 (13%), NaCl 0,1M tout en optimisant deux paramètres : le pH et la concentration du PEG.

La synthèse bibliographique traite tout d'abord, un aspect microbiologique et biochimique concernant le genre *Jonesia*, les xylanases et le système SDPA, cette étude bibliographique sert de support pour la compréhension de la partie pratique réalisé au laboratoire de Microbiologie Appliquée.

Synthèse bibliographique

I. Microorganismes producteurs de xylanases

Plusieurs microorganismes produisent des xylanases citons les bactéries spécialement le genre *Bacillus* (Panbangred et al., 1983 et Lama et al., 2004), les levures et les moisissures (Esteban et al., 1982 Shah et Madamwar, 2005 ; Prema et Poorna, 2006 ; Wakiyama et al., 2010 ; Teixeira et al., 2010 et Pal, 2011).

Les actinomycètes sont des producteurs potentiels de xylanases, notamment le genre *Streptomyces*, le genre *Jonesia* a récemment été décrit comme producteur de xylanase par Boucherba et al (2011).

II. Genre *Jonesia*

- Classification

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

- ✓ Domaine : Bacteria
- ✓ Phylum : Actinobacteria
- ✓ Classe : Actinobacteria
- ✓ Sous classe : Actinobacteridae
- ✓ Ordre : Actinomycetales
- ✓ Sous ordre : Micrococccineae
- ✓ Famille : Jonesiaceae
- ✓ Genre : *Jonesia*
- ✓ Espèce : *Jonesia denitrificans*

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

II.1. *Jonesia denitrificans*

a) Caractères généraux

La souche *Jonesia denitrificans* est une bactérie Gram positif, au rouge de méthyl positif, Voges-proskauer négatif, à catalase positif, à oxydase négatif, les cellules ont la capacité de réaliser la dénitrification, elles se présentent sous forme d'un bâtonnet irrégulier et fin (0,3-

0,5 \times 2-3 μ m), isolées ou montrant des formes en « Y » (Fig. 01), anaérobies facultatives, non sporulées (William et Hessayl, 1994).

Sur une gélose nutritive, elles forment des petites colonies convexes et lisses ayant un diamètre de 0,5 à 1,5 millimètre (24 à 48h à 30°C), grisâtres et translucides à opaques, devenant jaunâtres en 10 à 20 jours (William et Hessayl, 1994).

Les colonies n'apparaissent pas bleues ou bleu-verdâtre sous une lumière transmise oblique, La croissance se produit à des températures de 10 à 40°C avec un optimum à 30°C, et à des concentrations de NaCl de 5% (William et Hessayl, 1994).

La souche est chimioorganotrophe, métabolisme fermentatif, produisant l'acide mais pas de gaz à partir de glucose de D-cellobiose, de l'amidon et la salicine. Elle hydrolyse la cellulose et l'amidon mais pas la gélatine ou la caséine, l'hydrolyse de l'hippurate est faible ou négatif (William et Hessayl, 1994).

L'habitat naturel de *Jonesia denitrificans* n'est pas connu, elle a été isolée pour la première fois à partir du sang cuit de bœuf, elle est pathogène chez le rat. (Prevot, 1961).

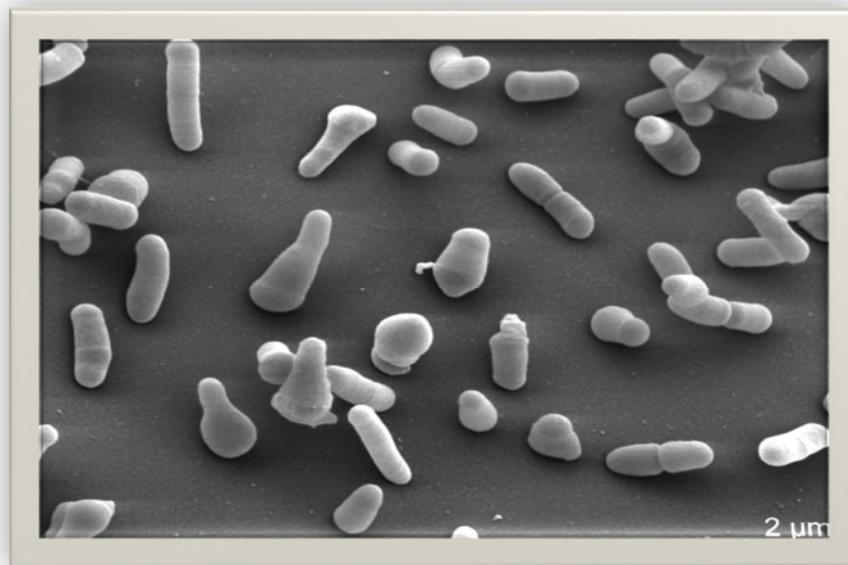


Fig. 01 : Micrographie électronique de *Jonesia denitrificans* (Pukall et al., 2009).

III. Hémicellulose

Dans la paroi cellulaire végétale, les hémicelluloses sont un groupe hétérogène de polymères non cellulotiques associés avec divers composants comme la cellulose, la pectine et la lignine (Mc Cann et Roberts, 1991 ; Wertz, 2011 ; Peng et al., 2012), l'hémicellulose est le second polysaccharide le plus abondant après la cellulose (Paes, 2005 ; Wertz, 2011 ; Deutschmann et Dekker, 2012 et Jayapal et al., 2013).

L'hémicellulose est beaucoup plus complexe que la cellulose (Paes, 2005) mais plus facile à hydrolyser à cause de son faible poids moléculaire et son faible degré de polymérisation qui varie de 80 à 200 (Palqvist et al., 2000 ; Peng et al., 2012).

Cet hétéropolysaccharide comprend différentes unités de sucre, qui sont disposées en pentoses (xylose et arabinose), hexose (glucose, galactose et mannose) et ou des acides uroniques (l'acide galacturonique et l'acide glucuronique) avec de faibles proportions de sucres neutres (O-méthylés) (Mirande, 2009 ; Wertz, 2011 et Peng et al., 2012), la majorité des chaînes d'hémicellulose sont formés par des liaisons β -(1-4) D-xylopyranoside (Decou, 2009).

Le xylane est un groupe complexe d'hémicellulose qui peut être ramifié par de courtes chaînes carbonées et sa variabilité structurale se manifeste par le degré et la nature des substitutions portées par les unités de xylose, on distingue:

III .1. Glucuronoxylanes:

Ils ont un squelette de résidus xylose sur lequel se greffent des résidus d'acides glucuroniques ou son dérivé O-méthylé ; Ces structures sont généralement retrouvées dans les bois durs, parmi les principaux glucuronoxylanes, citons les xylanes de bouleau (Mirande, 2009).

III .1. 1. Xylane de bouleau

Les Xylanes sont non seulement présents dans les plantes (les céréales et les herbes), mais essentiellement dans le bois durs (Moine, 2005 ; Barbat, 2009), qui est un matériau complexe et hétérogène, tant dans son anatomie que dans sa composition chimique (Moine, 2005).

Il existe deux types de bois : les résineux (bois tendre) et feuillus (bois dur) (Moine, 2005 ; Labbé, 2002). La différence majeure entre les feuillus et les résineux se situe au niveau de la longueur de la fibre (Montplaisir, 1991). Les hémicelluloses de feuillus sont

principalement constituées de xylane, dont le Glucuronoxylane est le composant principal (Köhnke, 2010 ; Nocquet, 2012), tel que le bois de bouleau (*Betula pendula et betula lenta*) qui peut contenir jusqu'à 35 % du xylane (Fig. 02) de la totalité d'hémicellulose, la fibre du bois de bouleau possède une longueur de 1,5 mm comparativement à 3,5 mm pour la fibre du sapin (Montplaisir, 1991).

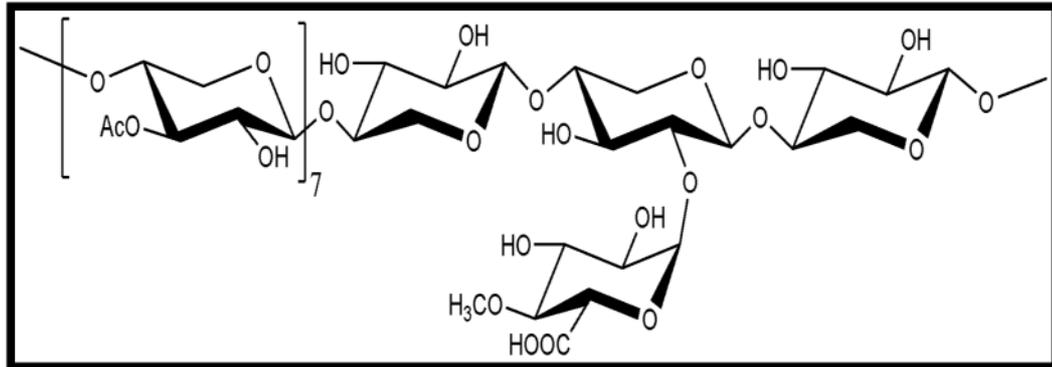


Fig. 02 : Structure du xylane de bouleau (Köhnke, 2010).

Il ya aussi d'autres espèces de feuillus et de résineux qui présentent de faible pourcentage de xylane par rapport au bois de bouleau (Tableau I).

Tableau I: Composition en xylane des différentes espèces du bois (Moine, 2005).

Composition En xylane Du Bois De Feuillus						
Espèce	Aspen (<i>Populus Tremuloides</i>)	Orme (<i>Ulmus Americana</i>)	Erable (<i>Acer Rubrum</i>)	Chêne Rouge (<i>Quercus Falcata</i>)	Hêtre (<i>Fagus Sylvatica</i>)	Bouleau (<i>Betula Papyrifera</i>)
Xylane (%)	24	19	25	-	26	35
Composition En xylane Du Bois De Résineux						
Espèce	Sapin Baumier (<i>Abies Balsamea</i>)	Epinette Blanche (<i>Picea Glauca</i>)	Pin Blanc (<i>Pinus Strobus</i>)	Pruche De l'Est (<i>Tsuga Canadensis</i>)	Cèdre Blanc (<i>Thuja Occidentalis</i>)	
Xylane (%)	9	13	9	7	14	

- : pas de données

III .2. Arabinoxylanes :

Ils ont un squelette de résidus xylose sur lequel se greffent des résidus arabinose, ils sont présents dans les céréales de blé, le riz, le seigle et l'avoine (Fig. 03) (Mirande, 2009).

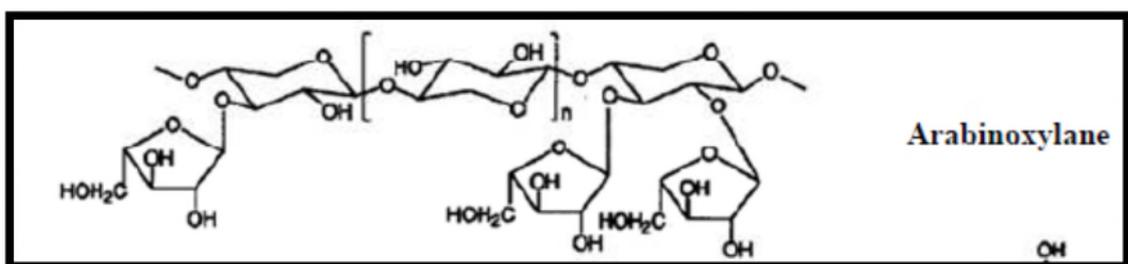


Fig. 03 : Structure de l'arabinoxylane (Mirande, 2009).

III .3. Arabinoglucuronoxylanes :

Ils ont un squelette de résidus xylose sur lequel se greffent des résidus arabinose et acide glucuronique ; on les trouve dans les parois primaires des conifères, des blés, des maïs et des sons de riz (Fig. 04) (Mirande, 2009).

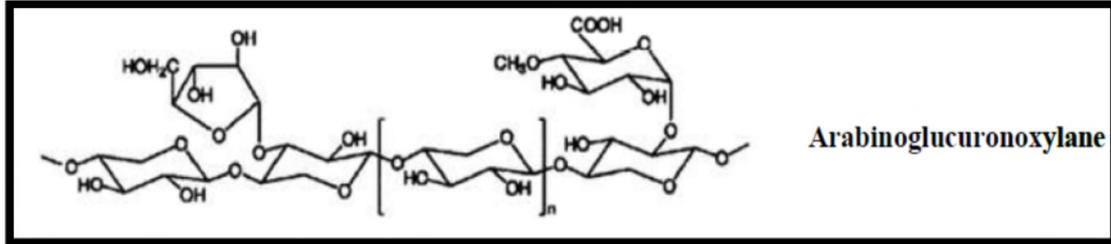


Fig. 04 : Structure de l'arabinoglucuronoxylane (Mirande, 2009).

III .4. Homoxylanes :

Ils sont constitués uniquement de résidus xylose (structure linéaire), ils sont isolés à partir de l'alfa (Chanda et al., 1950) et paille du tabac (Eda et al., 1976).

IV. Enzymes xylanolytiques

Sous le terme d'hémicellulase sont désignées les enzymes qui dégradent les hémicelluloses et en raison de la complexité de ces dernières, les microorganismes ont recours à un véritable arsenal enzymatique qui leur permet de parvenir à une dégradation complète. On distingue généralement plusieurs enzymes appartenant à la classe des hydrolases qui assurent des activités plus ou moins spécifiques pour attaquer le squelette de xylane, il s'agit d'endoxylyanase (EC3.2.1.8) et des β -D-xylosidases (EC 3.2.1.37), et celles qui sont dites débranchantes dont le rôle est d'hydrolyser les ramifications présentes sur la chaîne principale, il s'agit des α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), des α -D-glucuronidases (EC 3.2.1.139) et des acétyls xylane estérases (EC 3.1.1.72) (Sá-Pereira, 2003 ; Decou, 2009 et Wertz, 2011).

1. Endoxylyanases

Les endoxylyanases hydrolysent les liaisons β -(1,4) entre deux résidus β -D-xylopyranoses, conduisant à la formation de xylooligomères (Paes, 2005 ; Decou, 2009), qui vont être hydrolysés par les β -xylosidases en unités xylose simples (wong et al., 1988 ; Wertz, 2011).

La plupart des endoxylanases des actinomycètes, sont produites par le genre *Streptomyces* avec des poids moléculaires compris entre 15 à 59 KDa, elles possèdent des activités optimales à des pH variant de 4 à 8,6 et à des températures allant de 50 à 80°C. (Boucherba, 2011).

2. Classification des xylanases

Face à l'hétérogénéité des xylanes et leurs complexités, les microorganismes qui les dégradent produisent en abondance divers xylanases, cette variété a montré les limites de la classification des enzymes basé sur le substrat (Paes, 2005).

Selon Wong *et al.* (1988), une nouvelle classification de xylanases sur la base de leurs propriétés physico-chimiques a été proposée, on distingue deux groupes :

- Le premier groupe rassemblait les xylanases de faible masse moléculaire (<30 kDa) et de pI basique ;
- Le deuxième groupe rassemblait les xylanases avec une masse moléculaire élevé (>30 kDa) et un pI acide.

Cependant, Collins *et al.* (2005) ont observé que cette classification était incomplète, de nombreuses exceptions avaient été découvertes et presque 30 % des endoxylanases (particulièrement issues des moisissures) ne pouvaient pas être classées suivant ce système.

Plus tard, un système de classification plus complet a été admis et permettait la classification des xylanases et des glycosidases en générale par la comparaison des séquences des domaines catalytiques, ce système regroupait les xylanases en six familles (de A à F) (Juturu et Wu, 2012).

Des enzymes ayant des activités xylanolytiques ont été trouvées dans les familles 5, 7, 8, 10, 11, 16, 26, 43, 52 et 62, mais seules les séquences appartenant aux familles 5, 7, 8, 10, 11 et 43 possèdent des domaines catalytiques avec une activité endo-1,4- β -xylanase dont les plus étudiées se trouvent dans la famille 10 et 11 (Assamooi *et al.*, 2009)

Par contre les familles 16, 52 et 62 apparaissent être en fait des enzymes bifonctionnelles contenant deux domaines catalytiques distincts, quant à la famille 26, elle possède une activité endo- β -1,3-xylanolytique (Paes, 2005 ; Mirande, 2009 et Carvalho *et al.*, 2013).

3. Production des xylanases

La production de xylanases dépend essentiellement du choix de substrat inducteur, du microorganisme et des conditions de fermentation.

L'activité xylanolytique des moisissures est beaucoup plus élevée que celle des bactéries et des levures notamment celles des xylanases extracellulaires produites par *Aspergillus niger*, il produit 15 isoenzymes, alors que *Trichoderma viride* en produit 13 (Biely, 1985 ; Vries, 2001), cependant cette activité est généralement accompagnée d'une activité cellulolytique, La xylanase de *Thermomyces lanuginosus* est une vraie xylanase avec un taux d'activité cellulolytique très faible de 0,01 U/ml (Subramaniyan et Prema, 2002)

L'utilisation des procédés de fermentations en milieu liquide est plus fréquente pour la plupart des xylanases industrielles, mais les forces de cisaillement en fermenteur peuvent perturber la biomasse fongique fragile menant à des faibles productivités de xylanases (Subramaniyan et Prema, 2002).

Boucherba et al. 2011 ont trouvé une activité de 10,80U/ml qui est considérée comme relativement faible par rapport aux activités décrites chez la majorité des souches d'actinomycète (Nascimento et al., 2002 ; Wang et al., 2003).

Cependant, Nascimento et al. (2002) ont rapporté une activité de 10,3U/ml dans une culture de 10 jours de *Streptomyces sp.*AMT-3, Techapun et al.(2002) ont rapporté une activité de 8 U/ml dans une culture de *Streptomyces sp.* Ab 106 (55°C, pH 7,5) contenant le xylane à 1% (m/v) (Farrel et al., 1996 ; Shah et Madamwar, 2005 ; Gupta et al., 2009).

V. Système à deux phases aqueuses

1. Généralités

L'utilisation intensive des enzymes dans les applications industrielles nécessite le développement des méthodes efficaces, économiques et présentant un grand pouvoir de résolution pour leur séparation et purification à grande échelle (Yasinok et al., 2010 ; Coelho et al., 2013).

Le processus en aval, représente généralement 50 à 80% des coûts totaux de la production des enzymes (Rodríguez-Durán et al., 2013).

Les méthodes classiques de purification de biomolécules impliquent plusieurs opérations unitaires, ce qui explique leurs coûts chers (**Raja et al., 2011**). Par exemple, la chromatographie est considérée comme une méthode appropriée pour la purification des enzymes, mais dans l'application industrielle, elle est accompagnée de plusieurs inconvénients : c'est un processus long et onéreux.

Par conséquent, d'autres méthodes opérationnelles à l'échelle industrielle ont suscité l'attention des chercheurs (**Yavari et al., 2013**).

L'Extraction liquide-liquide employant un système à deux phases aqueuse (SDPA) s'est révélée être une stratégie prometteuse pour la séparation de nombreux produits biologiques, le SDPA a été d'abord mis en place par Albertsson dans les années cinquante.

Le SDPA est formé par un mélange d'un couple de polymères incompatibles (PEG/dextrane, PEG/maltodextrine, etc) ou d'un polymère et un sel (PEG /phosphate, PEG /citrate, PEG /sulfate, etc) à l'état aqueux (**Yücekan et Önal, 2011**)

Les systèmes PEG-dextrane et PEG-sel sont largement utilisés pour la séparation et la purification des biomolécules. Toutefois, le système PEG-sel est le plus utilisé car il a certains avantages par rapport au système PEG-polymères, tels que les faibles coûts et viscosités ainsi que la séparation rapide des phases (**Yücekan et Önal, 2011 ; Madhusudhan et Raghavarao, 2013**).

1.1.Polyéthylène glycol

Le PEG (Fig. 05) est un polymère synthétique linéaire d'unités d'oxyde d'éthylène neutre et fortement hydrophile.

Les chaînes de PEG s'associent avec les molécules d'eau, ce qui engendre une grande solubilité menant à une flexibilité et une mobilité responsables d'une entropie élevée.

D'un autre côté, le PEG possède une partie hydrophobe, sur laquelle les protéines s'adsorbent. (**Brouette, 2012**).

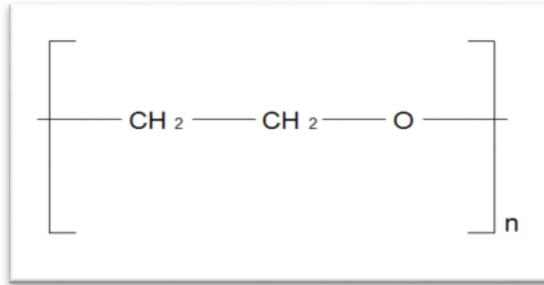


Fig. 05: Structure du polyéthylène glycol.

2. Principe de séparation par SDPA

Ce procédé est basé sur le transfert de masse entre deux phases liquides non miscibles (Coelho et al., 2013), la couche de polymère (PEG) stabilise la protéine à extraire en favorisant une plus grande concentration de celle-ci, ce qui entraîne une extraction efficace, d'où la liaison PEG-protéine qui se fait entre la zone hydrophobe de la protéine exposée au solvant (anonyme, 2009).

Le principe de la séparation est basé sur la distribution sélective d'une substance donnée entre les phases (Kaul, 2000 ; Yücekan et Önal, 2011 et Ramyadevi et al., 2012) qui se distinguent par une limite interfaciale (Ramyadevi et al., 2012).

Le partage des petites particules est unilatérale contrairement à celui des macromolécules qui est variable ce qui rend la prédiction de la partition de ces dernières une tâche difficile (Kaul, 2000), cette répartition est régit en fonction des caractéristiques du système, les propriétés de la substance et de l'interaction entre les deux (Kaul, 2000 ; Yücekan et Önal, 2011, Ramyadevi et al., 2012).

La séparation des phases est produite lorsque la concentration des matériaux du système, augmente au-dessus d'une certaine valeur critique (Madhusudhan et Raghavarao, 2013).

3. Paramètres influençant la séparation des biomolécules

Plusieurs approches ont été explorées afin d'évaluer les paramètres les plus importants déterminant le comportement de partitionnement en utilisant des expressions simplifiées obtenues en regroupant divers facteurs (Raja et al., 2011).

Selon la littérature scientifique, il s'agit du pH, de la température, des propriétés de surface, de la taille et de la concentration des biomolécules (**Kula et al., 1982 ; Ramyadevi et al., 2012 ; Garai et Kumar, 2013 et Rodriguez-Durán et al., 2013**).

○ *Masse moléculaire du polymère*

Le choix du meilleur poids moléculaire du polymère est généralement la première étape dans le SDPA. Il a été démontré que le poids moléculaire du PEG influe sur la partition des protéines par modification de la composition des phases et du nombre d'interactions entre le polymère et les protéines. Ceci est généralement attribué aux interactions hydrophobes entre les chaînes de PEG et de la région hydrophobe de la protéine (**Ramyadevi et al., 2012**).

En règle générale, l'augmentation du poids moléculaire du polymère provoque l'accumulation de la protéine dans la phase opposée (**Banik et al., 2003 ; Ramyadevi et al., 2012**). A haut poids moléculaire, les interactions préférentielles entre le PEG et la protéine diminuent, ce qui conduit à une réduction du coefficient de partage (**Ramyadevi et al., 2012**).

D'autre part, l'augmentation de la longueur de la chaîne a également causé l'augmentation du volume d'exclusion, ce qui réduit l'espace libre disponible pour les biomolécules dans la phase riche en PEG, conduisant à la partition dans la phase inférieure (**Bezerra et al., 2006 ; de Medeiros Silva et al., 2013 ; Garai et Kumar, 2013 et Yavari et al., 2013**).

La Tension interfaciale entre les phases est l'un des facteurs les plus importants qui détermine le comportement de séparation des particules. Le PEG de faible poids moléculaire est bénéfique pour le partitionnement des protéines puisque la rupture d'interaction entre les composants de phase est nécessaire pour faciliter le transfert de protéine d'une phase à une autre (faible tension interfaciale) (**Raja et al., 2011; Ramyadevi et al., 2012**), tandis que le PEG de poids moléculaire élevé est plus susceptible à former des liaisons intramoléculaires qui augmente la tension interfaciale (**Ramyadevi et al., 2012**).

○ *Concentration du polymère*

L'augmentation de la concentration en polymère a pour conséquence une plus grande différence entre les compositions des deux phases (**Banik et al., 2003**), Si la concentration de PEG est élevée, le nombre d'unités de polymère impliqués dans le partitionnement biomoléculaire

également augmente et donc beaucoup de biomolécules partitionnent dans la phase PEG due à l'interaction hydrophobe entre la biomolécule et le PEG (**Raja et al., 2011 ; Yavari et al., 2013**).

○ *Nature du sel*

La contribution d'un anion est plus importante que celle d'un cation dans la détermination de l'efficacité d'un sel particulier. Les anions multivalents comme le PO_4^{2-} et SO_4^{2-} sont les plus efficaces pour induire une séparation de phase avec le PEG (**Kaul, 2000**).

Il a été rapporté que l'augmentation de la concentration de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et de MgSO_4 a montré une augmentation du partitionnement de la protéine vers la phase inférieure riche en sel, Pendant ce temps, l'augmentation de la concentration du K_2HPO_4 améliore le partitionnement de la protéine dans la phase riche en PEG (**de Medeiros Silva et al., 2013**)

○ *Concentration du sel*

La plupart des protéines partitionnent dans la phase qui a une faible concentration en sel, ce qui augmente l'interaction entre la protéine et les molécules de PEG ce qui améliore leur concentration dans la phase riche en PEG (**Yavari et al., 2013**), Si la concentration en sel est élevée, L'effet de relargage et la force ionique augmente dans la phase inférieure et la solubilité des biomolécules diminue (**Garai et Kumar, 2013**), ce qui oblige les biomolécules à passer de la phase riche en sel à la phase riche en PEG (**Garai et Kumar, 2013 ; Raja et al., 2011 ; de Medeiros Silva et al., 2013**).

Les mécanismes par lesquels les sels influent sur la séparation de phase des solutions aqueuses de polymères restent toujours mal compris (**Kaul, 2000**).

○ *Présence de sels neutres*

La présence de sels neutres tels que le NaCl n'affectent pas forcément l'équilibre liquide-liquide du SDPA, mais la concentration en sel supérieure à 1M modifie le diagramme de phase. L'NaCl modifie le coefficient de partage à cause de la distribution différentielle des ions de sel entre les phases. (**Raja et al., 2011**).

○ *Propriétés de surface, la taille et la concentration de la biomolécule*

En général, les protéines de haut poids moléculaire se concentrent dans la phase de PEG à faible masse moléculaire, l'effet entropique peut être la force motrice de cette concentration (**Rodríguez-Durán et al., 2013**), une surface fortement hydrophobe d'une protéine exposée

au solvant est un facteur qui favorise le déplacement vers la phase riche en PEG (**Ramyadevi et al., 2012**), cet effet peut être dû à une interaction entre la partie hydrophobe de la molécule et les chaînes de PEG (**Rodríguez-Durán et al., 2013 ; Yavari et al., 2013**).

○ *pH*

Il a été rapporté que le pH du système est un facteur clé qui modifie la répartition de la protéine cible et la concentration du polymère (**Ramyadevi et al., 2012**).

Le changement du pH influence sur les groupes ionisables qui changent la charge extérieure des molécules (**Banik et al., 2003**), les protéines chargées négativement sont plus susceptibles d'être réparties dans la phase supérieure tandis que celles chargées positivement sont réparties dans la phase inférieure en raison de la force de répulsion causée par les anions de sel une augmentation du coefficient de partage est obtenue, ce qui est dû aux interactions électrostatiques entre les unités de protéines et le PEG (**Raja et al., 2011 ; Ramyadevi et al., 2012 ; de Medeiros Silva et al., 2013 et Yavari et al., 2013**).

○ *Température*

Dans un système de polymère-polymère, une basse température favorise la séparation des phases tandis qu'une température élevée est exigée dans un système de polymère/sel, les propriétés de fixation de l'affinité et des groupes hydrophobes aux biomolécules sont également affectées (**Banik et al., 2003**), avec l'augmentation de la température le PEG devient plus hydrophobe, et les interactions entre les molécules d'eau et le PEG diminuent.

4. La courbe binodale

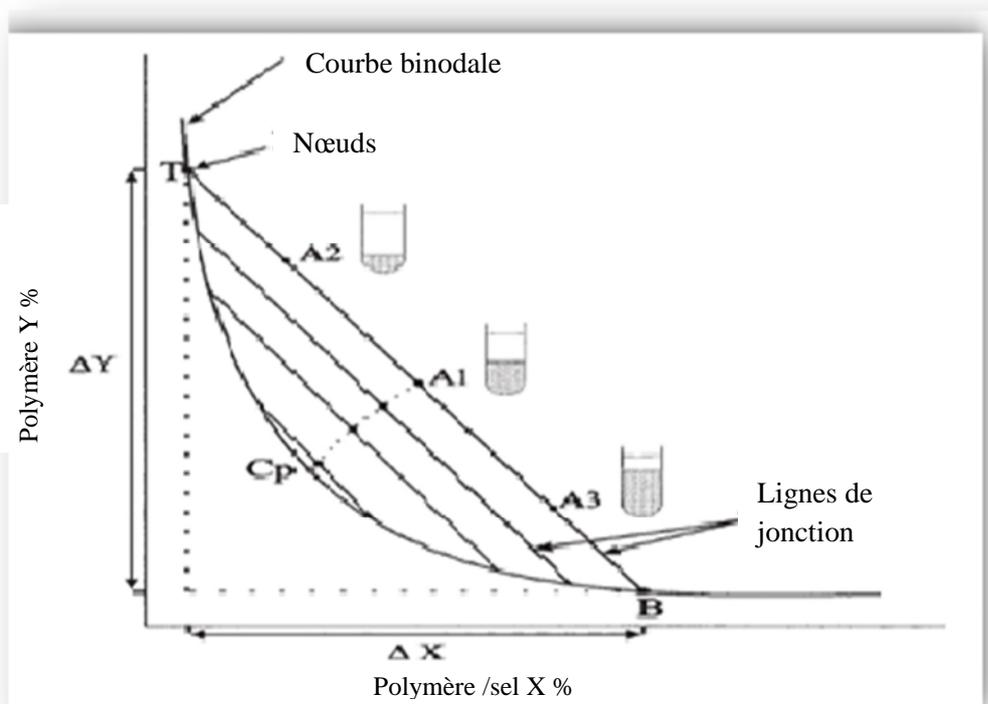
Chaque SDPA est caractérisé par un diagramme de phase (Fig. 06) qui indique la composition à l'équilibre de ce système (**Madhusudhan et Raghavarao, 2013**) et illustre les modèles qui prédisent le partitionnement des biomolécules (**Raja, 2011**) et les teneurs en polymère /sel (**anonyme, 2009**).

Le diagramme de phase fournit des informations sur la concentration des composés nécessaires pour constituer un système à deux phases, la concentration des composants dans les phases supérieures et inférieures et le rapport des volumes des phases (**Raja, 2011**).

Le diagramme présente une courbe binodale, qui divise une région de concentrations de composants qui forment deux phases aqueuses non miscibles (c.à.d. au dessus de la courbe) et ceux qui forment une phase (c.à.d. en dessous de la courbe).

Les coordonnées de tous le système se trouvent sur une ligne de jonction, qui relie deux points sur la courbe binodale qui représentent la concentration finale des composants dans les deux phases : supérieure et inférieure.

Il existe également sur la courbe binodale un point critique; juste au-dessus de ce point la composition et le volume des deux phases sont presque égaux (Kaul, 2000 ; Raja, 2011).



A1, A2, A3: compositions totales des trois systèmes sur la même ligne de jonction.

- T, B : compositions finales de phase supérieure et inférieure respectivement
- Cp : point critique.
- TCB : courbe binodale.
- ΔX , ΔY : différences de concentration des composés X et Y respectivement entre les deux phases.

Fig. 06 : Courbe binodale (Kaul, 2000).

5. Paramètres de partition

○ Détermination du coefficient de partage (**K**):

La distribution relative de l'enzyme dans la solution aqueuse du système à deux phases est caractérisée par le coefficient de partage (**K**), calculée selon l'équation suivante :

$$K = \frac{C_T}{C_B}$$

Où C_T et C_B représente l'activité enzymatique dans la phase supérieure et inférieure respectivement (**Bezerra et al., 2006**).

○ Détermination du facteur de purification :

Le facteur de purification (PF) est défini comme étant le rapport de l'activité spécifique après purification sur l'activité spécifique de l'extrait brut (**Bezerra et al., 2006**).

$$FP = \frac{\text{activité enzymatique spécifique après extraction}}{\text{activité enzymatique spécifique de l'extrait brut}}$$

○ Détermination du rendement (**Y%**):

Le rendement est définie comme étant le rapport de l'activité enzymatique après purification sur l'activité enzymatique de l'extrait brut, multiplié par 100 (**Bezerra et al., 2006**).

$$Y = \frac{\text{activité enzymatique après extraction}}{\text{activité enzymatique de l'extrait brut}} \times 100$$

○ Rapport volumique (**R**)

$$R = \frac{V_T}{V_B}$$

Où V_T et V_B sont le volume de la phase supérieure et inférieure, respectivement (**Bezerra et al., 2006**).

6. Avantages et application

L'Extraction par le SDPA est dans de nombreux cas une meilleure alternative à la technologie existante à l'échelle industrielle, car il contourne les problèmes de centrifugation et filtration liés à la viscosité élevée et à la distribution hétérogène de la taille des particules (Kaul, 2000 ; Loc et al., 2010).

Le transfert de masse dans le SDPA est rapide (faible tension interfaciale), il offre une séparation vite et sélective et une bonne qualité du produit (Banik et al., 2003 ; Madhusudhan et Raghavarao, 2012), les deux phases se composent principalement d'eau (80-90% m/m) ce qui fournit un environnement biocompatible pour les protéines (Kammoun et al., 2009 ; Yucekan et Onal, 2011 ; Madhusudhan et Raghavarao, 2012 ; Ramyadevi et al., 2012 et Yavari et al., 2013).

Le SDPA a été utilisée avec succès pour récupérer diverses biomolécules comme les protéines, les enzymes, les acides aminés, les acides nucléiques et les antibiotiques (Kaul, 2000 ; Raja et al., 2011).

Aujourd'hui, le SDPA est surtout utilisé pour les produits biopharmaceutiques de valeur tels que les anticorps monoclonaux, les facteurs de croissance, les hormones pour la concentration et la purification de virus et pour la séparation des protéines membranaires (Kaul, 2000 ; Raja et al., 2011 et Ramyadevi et al., 2012).

Il est aussi utilisé pour l'extraction des ions métalliques (Bulgariu et Bulgariu, 2007), La faible productivité dans les processus biotechnologiques est souvent due à la dégradation ou la toxicité du produit (Kaul, 2000), une fermentation extractive est utilisé pour améliorer la productivités des biomolécules (Kaul, 2000 ; Banik et al., 2003 ; Raja et al., 2011).

En outre, si SDPA est correctement optimisé, il offre une fusion de l'extraction, la concentration et la purification partielle des biomolécules, Cela a une influence sur la réduction du nombre d'étapes de traitement en aval, d'où l'amélioration des rendements, et des coûts du processus) (Raja et al., 2011 ; Madhusudhan et Raghavarao, 2013 ; Yavari et al., 2013).

Matériel et méthodes

A. Matériel

Le matériel utilisé dans le présent travail est cité en Annexe I.

☞ *Matériel biologique*

La souche *Jonesia denitrificans* BN13 est isolée au niveau du sol d'un jardin du village D'Ihadadden de la ville de Bejaïa, elle est caractérisée génotypiquement et phénotypiquement selon les travaux de **Boucherba et al (2011)**.

B. Méthodes

I. Préparation et ensemencement des milieux de culture

La souche *Jonesia denitrificans* BN13 est repiquée sur un milieu minimal solide (MM7, Annexe II) qui est incubé pendant 5 jours à 37 °C, le milieu contient une seule source de carbone qui est le xylane de bouleau.

Après croissance, quatre à cinq colonies sont inoculées dans 20ml du milieu MM7 liquide (MM7 solide sans agar), ce dernier est incubé à 37°C pendant 48h.

Trois Erlenmeyers d'une contenance de 500ml et ayant un volume utile de 100ml du MM7 liquide sont ensemencés avec 2% (v/v) de la préculture, incubés pendant 5jours à 37 °C.

II. Préparation du système a deux phases aqueuses

Le système à deux phases aqueuses (SDPA) choisi pour ce travail est le système polymère-sel.

Cinq systèmes sont réalisés avec des concentrations croissantes de polyéthylène glycol (PEG) 4000 [10% (m/v),12% (m/v),13% (m/v),14% (m/v) et 15% (m/v)], le monophosphate dipotassique (K_2HPO_4)13% (m/v), NaCl 0,1M, ensuite ils sont dissous dans un tampon phosphate potassique (50ml), ces systèmes sont additionnés à 20ml du MM7 liquide, Après agitation, le pH des SDPA est ajusté.

La Séparation complète des phases est obtenue par sédimentation (a l'aide d'une ampoule à décanter).

Les phases sont soigneusement récupérées, par la suite les volumes des phases sont mesurés. Afin de déterminer l'activité enzymatique et les concentrations des protéines dans

chacune des phases, des échantillons sont prélevés, ensuite testés selon les techniques décrites dans la partie « méthodes analytiques ».

Les rendements, les coefficients de partage, les facteurs de purification et les ratios volumiques respectivement sont calculés comme suit :

$$\Rightarrow Y = \frac{\text{activité xy lanolytique de l'interphase}}{\text{activité xy lanolytique avant SDPA}} \times 100$$

$$\Rightarrow K = \frac{C_T}{C_B} \quad \text{Où } C_T \text{ et } C_B \text{ représente l'activité xy lanolytique dans la phase supérieure et inférieure respectivement.}$$

$$\Rightarrow FP = \frac{\text{activité spécifique de l'interphase}}{\text{activité spécifique avant SDPA}}$$

$$\Rightarrow R = \frac{V_T}{V_B} \quad \text{Où } V_T \text{ et } V_B \text{ sont le volume de la phase supérieure et inférieure, respectivement, après la séparation des phases (Bezerra et al., 2006).}$$

Après réalisation des 5 systèmes. Le meilleur système est choisi et l'effet des différentes valeurs de pH (6, 8 et 9) est testé. Le système à pH 6 a été préparé avec le tampon phosphate potassique (50mM), tandis que pour obtenir le pH 8 et 9, le Tris-HCl (50mM) est utilisé.

III. Méthodes analytiques

1. Mesure de la biomasse

Le suivi de la croissance de *Jonesia denitrificans* BN13 est réalisé par mesure de la biomasse à 600nm (SHIMADZU UVmin-1240V) (Boucherba et al., 2011).

2. Mesure de l'activité xy lanolytique

Pour estimer l'activité xy lanolytique, 100µl du surnageant ou des phases de séparation sont mélangés avec 900µl de xylane de bouleau à 1% (m/v) préparé dans du tampon phosphate potassique 50mM pH 7, le mélange est incubé à 50°C dans un bain marie pendant 10min (Wang et al., 2003).

Le dosage de l'activité xy lanolytique est estimé par la détermination de la quantité de sucres réducteurs libérés à partir du xylane. Les sucres ont été quantifiés par la méthode à l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS, Annexe III), selon Miller (1959).

En milieu alcalin et a chaud, l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNS) jaune est réduit par les oses réducteurs en acide 3-amino5-nitrosalicylique rouge orangé (Fig. 07).

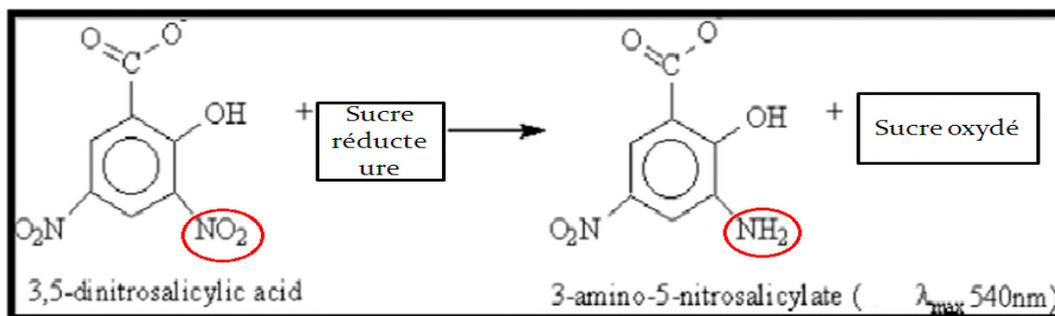


Fig. 07 : Réaction du DNS avec un sucre réducteur (**Barbin, 2006**)

La réaction enzymatique est arrêtée en ajoutant 1,5 ml d'une solution de dinitrosalicylique DNS suivi d'un chauffage à 100°C pendant 5 mn.

En parallèle un témoin qui représente la solution de xylane de bouleau est incubée sans le surnagent ou les phases de séparation à 50°C pendant 10mn, puis additionné avec 1,5 ml du DNS et 100 μ l du surnagent ou les phases de séparation

Après refroidissement, la lecture des absorbances est faite à 540 nm. 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 ; 1,5 (mg / ml) (Tableau II)

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

Tube	1	2	3	4	5	6
Xylose à 1,5 mg/ml (μ l)	0	200	400	600	800	1000
Tampon phosphate potassique (μ l)	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 100µl auxquels 900µl de la solution de xylane de bouleau 1% sont ajoutés puis la réaction est arrêtée par addition de 1,5 ml de la solution DNS, suivi d'un chauffage à 100°C pendant 5min, puis les tubes sont refroidis pour effectuer les lectures d'absorbances à 540nm.

Une unité d'activité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui produit 1µmol de xylose par minute dans des conditions de la réaction cités ci dessus.

L'activité xylanolytique est calculée selon (**Bailey et al., 1992**)

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

Sachant que :

- C_x : concentration des sucres réducteurs du mélange réactionnel (**µmol/ml**)
- C_t : concentration des sucres réducteurs du mélange témoin (**µmol/ml**)
- D : facteur de dilution.
- t : temps d'incubation (**minutes**)

3. Dosage des protéines

La détermination de la teneur totale en protéines est réalisée par la méthode de **Bradford (1976)** en utilisant la solution de Bradford (Annexe III).

Deux méthodes sont utilisées : la macrométhode et la microméthode.

a) Macrométhode

Cette méthode permet de doser les protéines qui ont une masse comprise entre 0,2 et 1mg/ml (**Bradford, 1976**).

Le principe du dosage consiste à ajouter 100µl d'échantillon à 5ml de solution au bleu de Coomassie. Après homogénéisation le mélange est mis en obscurité pendant 5minutes à une température ambiante, la lecture est faite à 595nm.

Les concentrations protéiques sont calculées à partir de la courbe d'étalonnage.

Gamme étalon :

Solution mère de BSA 1mg/ml

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

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

b) Microméthode

Cette technique consiste à doser des quantités des protéines comprises entre 2 et 10 µg /ml. Le principe est d'ajouter 800 µl d'échantillon à 200 µl de solution au bleu de Coomassie. Le mélange, après homogénéisation, est ensuite mis à l'obscurité à une température ambiante, l'absorbance est mesurée à 595nm (**Bradford, 1976**).

Gamme étalon :

Solution mère de BSA a 10 µg/ml.

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

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

IV. Dialyse

Le principe de la dialyse (Fig.08) consiste à dessaler une solution protéique en utilisant la capacité du soluté à franchir les pores d'une membrane semi-perméable appelée membrane de dialyse

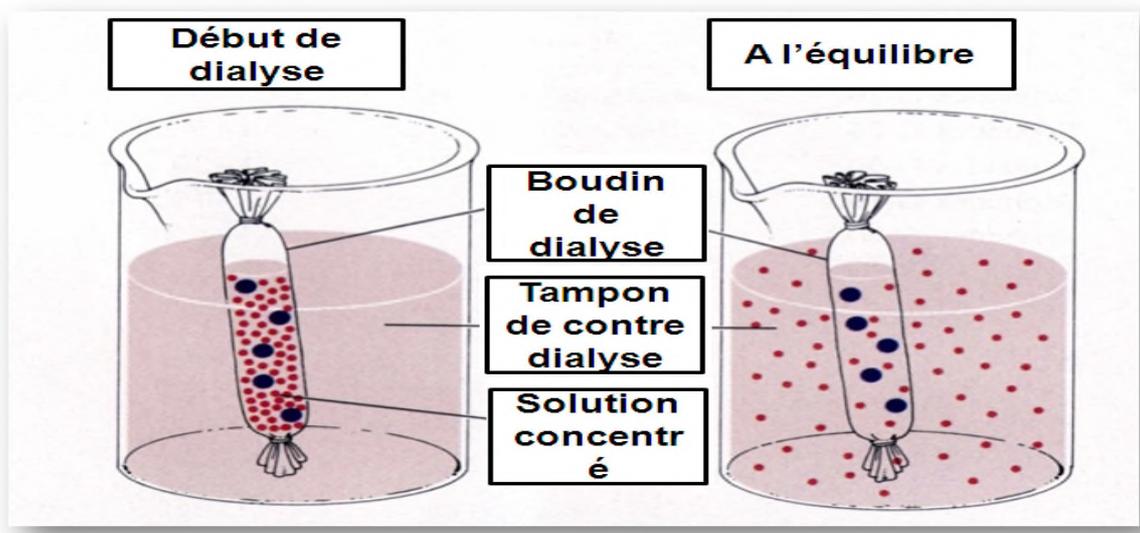


Fig. 08 : Schéma générale d'une dialyse (Rider et opperdoes, 2007)

La phase où on trouve la meilleure activité xylanolytique est soumise à une dialyse afin de se débarrasser des sels.

La membrane de dialyse (SARTORIUS), utilisée possède un seuil de coupure de 10 KDa, cette dernière est préalablement lavé avec de l'eau distillée afin d'éliminer les composés soufrés et les métaux lourds résiduels.

La membrane traitée forme un boudin de dialyse rempli avec 10 ml de la dite phase qui est immergé dans 500 ml du liquide de contre dialyse (tampon phosphate potassique 50mM, pH7).

L'ensemble est mis sous agitation pendant 1h à température ambiante, le dialysat obtenu est conservé au réfrigérateur (4°C).

V. SDS-PAGE et zymogramme

Dans le but de voir le profil des protéines des surnageants de culture et afin de visualiser l'activité xylanolytique dans le gel de séparation, nous avons choisi la technique SDS-PAGE de (Laemmli, 1970) et la technique du zymogramme (Gallardo et al., 2004). Le dispositif d'électrophorèse (Mini Protean II BIORAD) (Fig. 09) utilisé est conçu pour les mini gels, il s'agit d'une cuve et d'une panoplie d'accessoires (peigne, espaceurs et un dispositif pour couler le gel).



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

Une plaque électrophorétique est préparée selon la procédure de (Laemmli, 1970), la moitié du gel sert pour la réalisation de la SDS-PAGE et l'autre moitié est utilisée pour le zymogramme afin de détecter l'activité xylanolytique.

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

La réaction de polymérisation est initiée par addition de 70 μ l de persulfate d'ammonium à 10 % puis accélérée par ajout de 20 μ l de TEMED, le mélange est versé entre deux plaques de verre séparées avec des espaceurs de 1 mm. 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 III), est coulé au dessus du gel de séparation, un peigne est immédiatement inséré, au moment de l'emploi le peigne est retiré et les puits sont lavés avec du tampon d'électrophorèse (Annexe III).

Les échantillons sont préparés de la manière suivante : 150 μ l de l'interphase est mélangé avec 40 μ L du tampon d'échantillon (Annexe III).

Les marqueurs 7 µl (dual color BIORAD) et les dépôts sont de l'ordre de 15µL et utilisés à une concentration de 0,009mg.

Le courant électrique est véhiculé par le tampon d'électrophorèse, la migration se fait à 80 (V) dans le gel de concentration et 150 (V) dans le gel de séparation, 11 milli ampère (mA) pendant 5h jusqu'à ce que le bleu de bromophénol soit à 1 cm du bord inférieur de la plaque (**Laemmli, 1970**).

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

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

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

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

La masse moléculaire de la xylanase est déterminée en utilisant la courbe d'étalonnage

$$\text{Log } PM = f(Rf)$$

Rf = Rapport frontal qui est calculé selon la formule suivante :

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

Le deuxième gel destiné pour la réalisation du zymogramme, subit les traitements suivants :

- Immersion dans une solution de Triton X-100 à 2.5% (m/v) pendant 30mn ;
- le gel est débarrassé du Triton X-100 par rinçage à l'eau distillée puis une incubation dans du tampon phosphate 50mM à pH 7 à 50°C pendant 20mn ;
- Coloration au rouge de congo (0,1%) pendant 15 mn ;
- Lavage avec une solution de NaCl à 1M ;
- immersion dans de l'acide acétique à 0,5% (m/v) pour stopper la réaction et augmenter le contraste (**Gallardo et al., 2004**).(Page 27 matériels et méthodes)

Résultats et discussion

Résultats et discussions

I. Préparation des milieux MM7 liquides

Après l'ensemencement du milieu MM7 solide à base de xylane de bouleau avec la souche *Jonesia denitrificans* BN13 et son incubation à 37 °C, la souche se développe au bout de 5 jours (Fig. 10), la production de xylanases extracellulaires se traduit dans le milieu par la formation de zones claires autour des colonies (Fig. 11) (**Boucherba, 2011**).

la souche *Jonesia denitrificans* BN13 se développe au bout de 48h d'incubation à 37°C selon les travaux de (**Boucherba et al., 2011**), dans notre cas la souche se développe au bout de 5 jours, cela peut être expliqué par le fait qu'elle soit conservée pendant 6 mois à 4 °C ce qui nécessite un temps d'adaptation, l'absence de zones claires autour des colonies est du probablement à une perte partielle de l'activité xylanolytique.

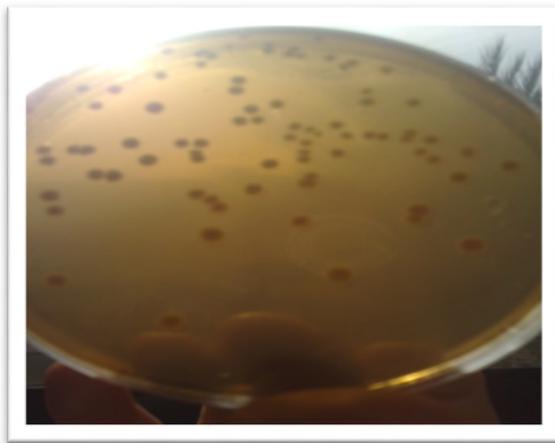


Fig. 10: Colonies de la souche de *Jonesia denitrificans* BN13 (présent travail).

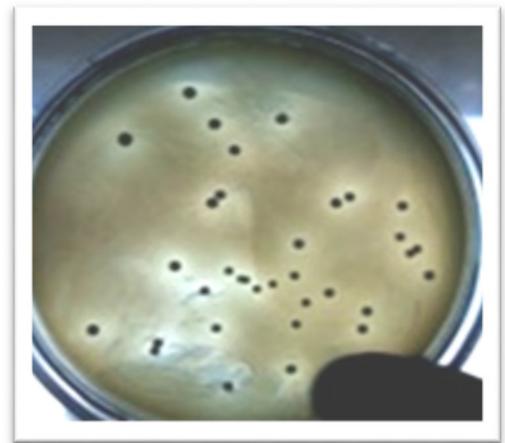


Fig. 11: Colonies de la souche *Jonesia denitrificans* BN13 entourées de zones d'hydrolyse du xylane de bouleau. (**Boucherba, 2011**).

La mesure de la biomasse est effectuée à 600nm tandis que le profil de production de la xylanase est effectué à 540nm.

Les résultats obtenus sont donnés dans le Tableau V

Tableau V: Mesure de la biomasse et l'activité xylanolytique.

Paramètres	Temps d'incubation 37°C	1 jour	2 jours	5 jours	6 jours
	DO (600nm)		0,942	1,984	2,520
Activité xylanolytique (U/ml)		0,016	0,155	0,699	0,220

Une augmentation de la biomasse est observée en fonction du temps, après 5 jours on obtient une biomasse maximale de 2,520 qui correspond à une activité xylanolytique de 0,699U/ml, cette dernière est faible par rapport aux activités obtenues par **Boucherba et al. en 2011**, cela peut être expliqué par l'absence d'un incubateur agitateur (shaker), vu que l'activité xylanolytique est optimale à une agitation de 100 rpm (**Boucherba et al., 2011**).

la valeur de l'activité est très faible en comparaison avec la plupart des travaux décrits chez les souches d'actinomycètes (**Wang et al., 2003**).

L'activité xylanolytique détectée chez *Bacillus sp.* MK001 est égale à 1190U/ml (**Kapour et al., 2008**), *Trichoderma reesei* a montré une activité de 257 U/ml (**He et al., 2010**) et **Hmida-Sayari et al. (2012)** ont testé la production d'une xylanase chez *Aspergillus niger* US368 qui a donné une activité 14,5U/ml, cependant une activité de **0,39 U/ml** a été rapportée chez *Aspergillus terreus* et *Rhizopus oryzae* (**Geweely et al., 2011 ; Bakir et al., 2001**) comparaison au actinomycètes (Tableau VI).

Tableau VI : Production de xylanase par le genre *Jonesia* et *Streptomyces*

Microorganismes	Substrats	Conditions de culture	Activités (U/ml)	Références
<i>Jonesia denitrificans</i> <i>BN13</i>	Xylane de bouleau, 7 g/l	300 ml dans des erlens de 500ml sans agitation, 37 °C, pH 7, 5 jours	0,7	Le présent travail
<i>Jonesia denitrificans</i> <i>BN13</i>	Xylane de bouleau, 7 g/l	fermenteur de 4 L , 37 °C, pH 7, 2 jours	10,80	Boucherba et al., 2011
<i>Streptomyces</i> sp. <i>AMT-3</i>	Xylane de bouleau, 10 g/l	Erlen sous agitation, 30 °C, pH 7.0, 10 jours	10,30	Nascimento et al., 2002
<i>Streptomyces</i> sp. <i>QG113</i>	Xylane de bouleau, 10 g/l	Erlen sous agitation, 37°C, pH 8, 5 jours	7,50	Beg et al., 2000
<i>Streptomyces</i> sp. <i>Ab106</i>	xylane, 10 g/l	fermentation de 4L , 55 °C, pH 7,5, 5 jours	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>Streptomyces malaysiensis</i>	Xylane de bouleau, 10 g/l	Erlen sous agitation, 30 °C, pH 7, 6 jours	11,90	Nascimento et al., 2002

II. Résultats des méthodes analytiques

La courbe d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs est montrée dans la Figure 11.

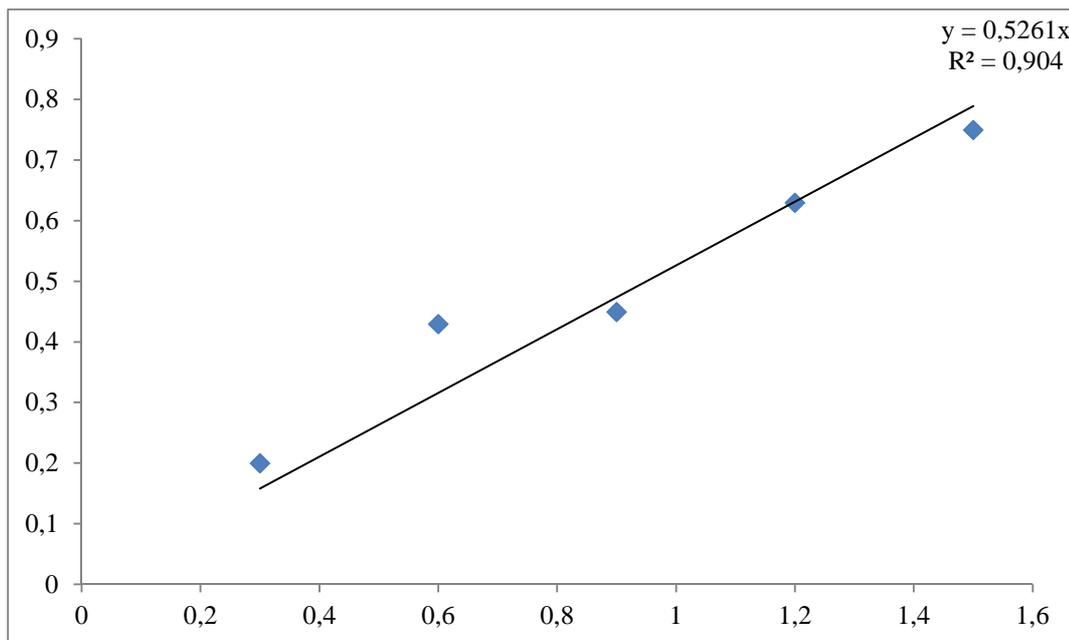


Fig. 12 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs.

La détermination de la concentration des protéines est effectuée par deux courbes d'étalonnage, la première est indiquée dans la Figure n° 13 et la deuxième est indiquée dans la Figure n° 14.

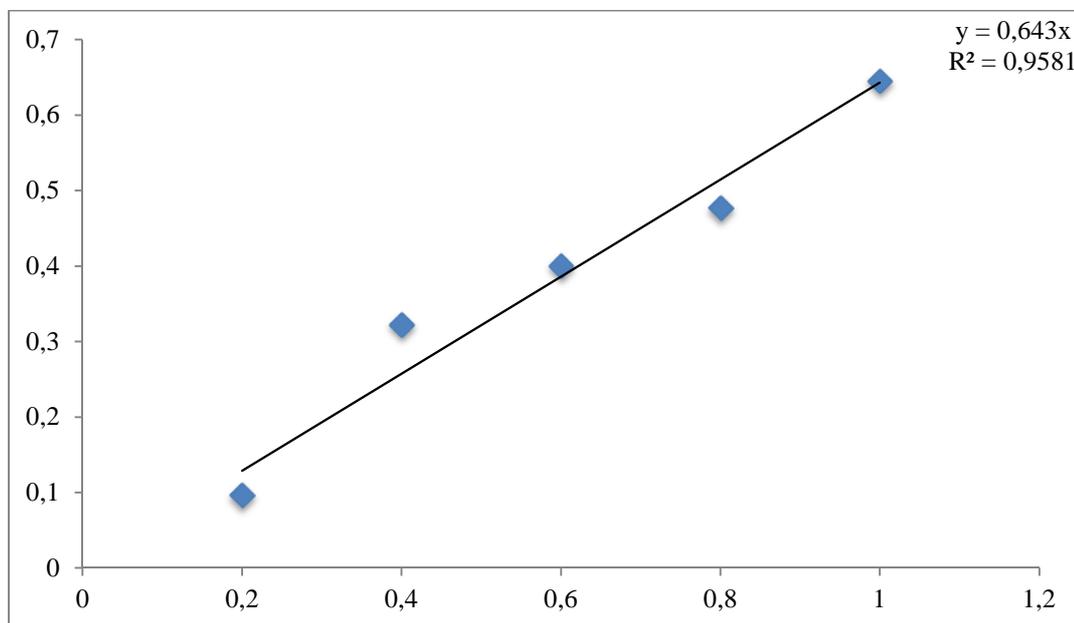


Fig. 13 : Courbe d'étalonnage pour la macrométhode

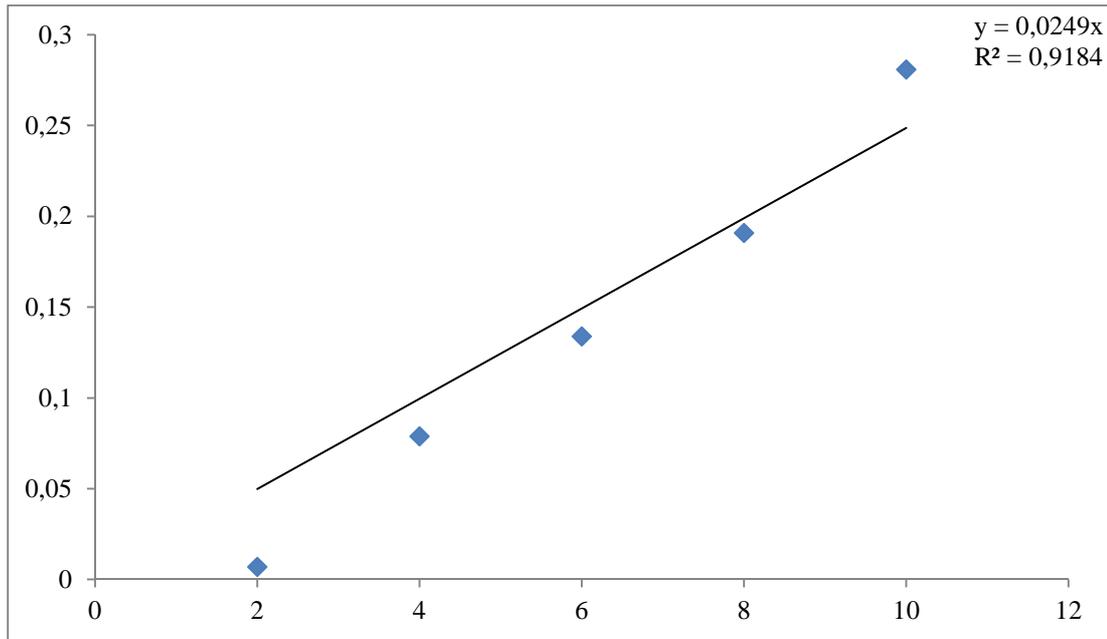


Fig. 14 : Courbe d'étalonnage pour la microméthode

III. Résultats du système à deux phases aqueuses (SDPA)

1. Récupération des phases du système à deux phases aqueuses (SDPA)

Après l'application du SDPA pendant 1h, trois phases sont obtenues : la phase supérieure (PS), l'interphase (IP) et la phase inférieure (PI), le Tableau VII indique les volumes récupérés à partir de chaque phase.

On constate qu'à partir de 20 ml du milieu de culture, un volume de 5,5ml est obtenu dans l'interphase du système PEG 4000 (14%) / K_2HPO_4 ; ce qui veut dire qu'on a concentré le milieu 3,63 fois, cette concentration peut être obtenue au laboratoire en utilisant la technique d'ultrafiltration sur membrane, cette dernière est difficilement transposable à l'échelle industrielle, vu qu'elle présente plusieurs inconvénients citons :

- Problème de colmatage et de la mauvaise distribution des pores au niveau de la membrane ;
- Technique coûteuse ;
- Nécessité du nettoyage des membranes et parfois leurs remplacement par des membranes neuves.

Le SDPA est par contre facilement applicable à l'échelle industrielle vu qu'il permet une concentration du milieu de culture en une seule étape, il permet aussi une séparation rapide avec peu de dénaturation (les solvants organiques ne sont pas utilisés).

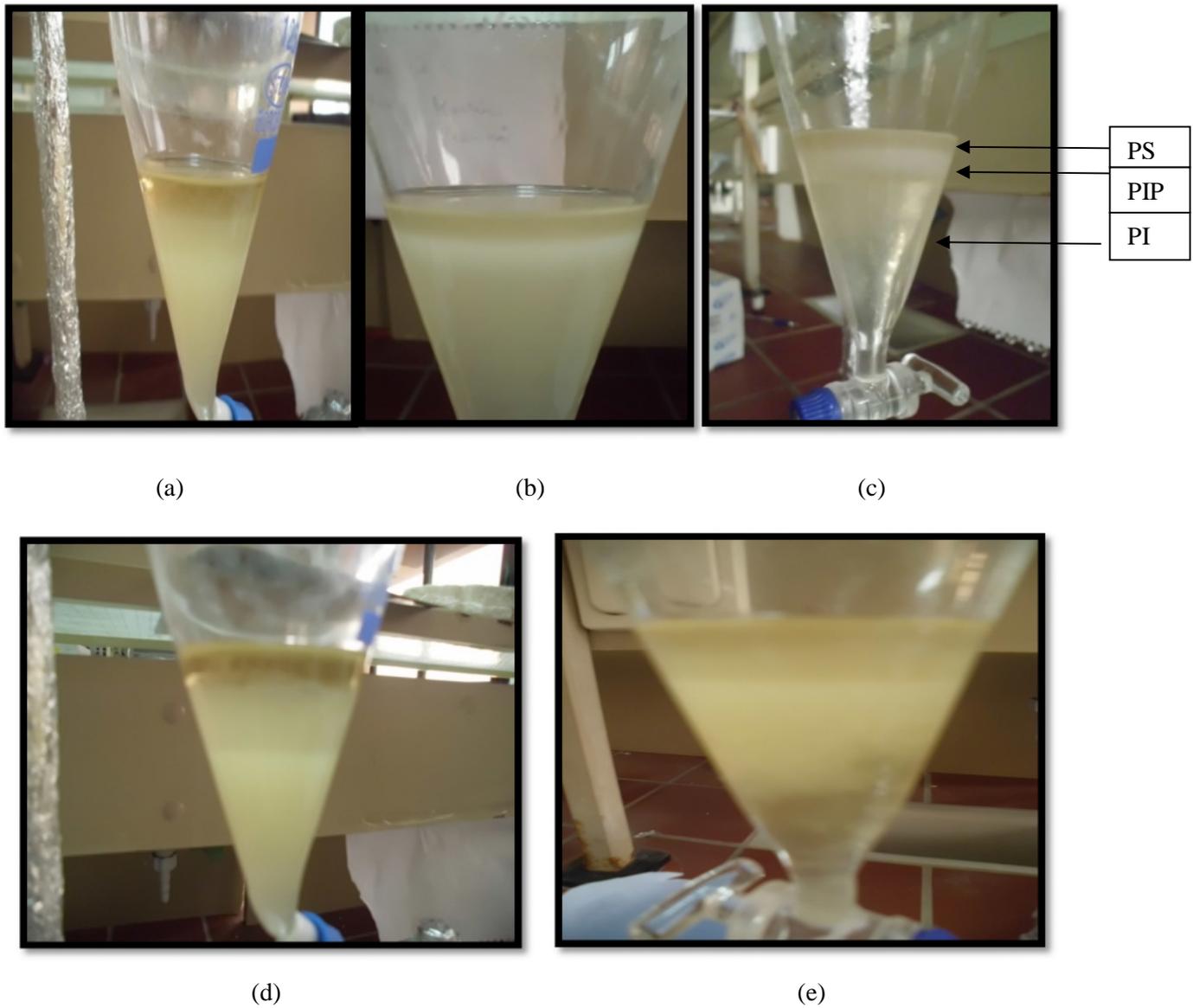
Tableau VII : Résumé des volumes des différentes phases obtenues.

PEG 4000 (%, m/v)	Phase supérieure (ml)	Interphase (ml)	Phase inférieure (ml)	Facteur de concentration (Volume initiale/volume d'entrephase).
10	4	7	13	2,85
12	7,5	12	49	1,66
13	6	10	43	2
14	8,5	5,5	36,5	3,63
15	9	7	38	2,85

2. Optimisation du SDPA

a) Effet de la concentration du PEG 4000 sur la répartition des xylanases

Après la réalisation des 5 systèmes avec des concentrations du PEG 4000 allant de 10 à 15%. Il ya eu formation de trois phases bien distinctes, la phase supérieure, l'interphase et la phase inférieure. (**Fig. 14**) ces résultats concordent avec les travaux **Kaul (2000)**.



PS : Phase supérieur, PIP : Interphase, PI : Phase inférieur

- a) PEG 4000 (10%) / K_2HPO_4 (13%), NaCl 0,1M.
- b) PEG 4000 (12%) / K_2HPO_4 (13%), NaCl 0,1M
- c) PEG 4000 (13%) / K_2HPO_4 (13%), NaCl 0,1M
- d) PEG 4000 (14%) / K_2HPO_4 (13%), NaCl 0,1M
- e) PEG 4000 (15%) / K_2HPO_4 (13%), NaCl 0,1M

Fig. 15 : Formation de trois phases.

Le calcul des différents paramètres après SDPA est montré dans le Tableau VIII.

Tableau VIII : Paramètres mesurés après SDPA.

Paramètres Systèmes	Phases	Activité xylanolytique U/ml	Activité spécifique U/mg	FP	Y %	K	R
S1	Supérieure	0,025	0,077	0,100	29,32	1,55	0,411
	Interphase	0,205	0,980	1,340			
	Inferieure	0,107	0,690	0,940			
S2	Supérieure	0,005	0,027	0,030	13,30	1,50	0,212
	Interphase	0,093	0,540	0,730			
	Inferieure	0,057	0,375	0,510			
S3	Supérieure	0,226	0,933	1,270	60,22	1,65	0,204
	Interphase	0,421	2,014	2,750			
	Inferieur	0,029	0,174	0,230			
S4	Supérieure	0,096	0,300	0,410	27,32	1,95	0,122
	Interphase	0,191	1,079	1,470			
	Inferieure	0,103	0,616	0,840			
S5	Supérieure	0,0031	0,140	0,190	47,21	4,64	0,106
	Interphase	0,330	1,918	2,620			
	Inferieure	0,040	0,253	0,340			

FP : facteur de purification, Y : rendement, K : coefficient de partage, R : rapport volumique.

S1: PEG 4000 (10%) / K₂HPO₄ (13%), NaCl 0,1 M à pH 7

S1: PEG 4000 (12%) / K₂HPO₄ (13%), NaCl 0,1 M à pH 7

S1: PEG 4000 (13%) / K₂HPO₄ (13%), NaCl 0,1 M à pH 7

S1: PEG 4000 (14%) / K₂HPO₄ (13%), NaCl 0,1 M à pH 7

S1: PEG 4000 (15%) / K₂HPO₄ (13%), NaCl 0,1 M à pH 7

Dans notre étude le PEG 4000 (13%) / K_2HPO_4 (13%), NaCl (0.1M) est le meilleur système affichant une activité xylanolytique de 0,421 U/ml, une activité spécifique de 2,014 U/mg et un rendement de 60,22 %.

Yang et al. En 2008 ont rapporté approximativement les mêmes résultats en utilisant le système PEG 4000 à 12.5 % / $(NH_4)_2SO_4$ à 25 %.

Selon les résultats mentionnés dans le tableau VIII si dessus, on remarque que dans tous les systèmes, la meilleure activité xylanolytique est toujours retrouvée dans l'interphase ou les xylanases sont concentrées, avec des rendements plus au moins élevés, ce qui en accord avec les travaux de **Johansson et Hartman (1976)** ; et **Kula et al. (1982)** et **Kaul (2000)**.

Les xylanases sont généralement partitionnés dans la phase supérieure bien que dans un certains nombres de cas, un dépôt partiel de l'enzyme a été observé à l'interphase (**Yasinok et al., 2010**).

Les études de Duarte et collaborateurs menées en 1999 ont prouvé l'existence des xylanases dans la phase inférieure du SDPA avec un FP de 33, appliqué pour le milieuensemencé par *Bacillus pumilus*.

D'autre part **Antov et al. (2006)** ont obtenu un rendement de 85,6 % dans la phase supérieure du SDPA appliqué pour le milieuensemencé par *Polyparus squamasus*.

On remarque aussi qu'en augmentant la concentration du PEG 4000, le coefficient de partage augmente, contrairement au rapport volumique qui diminue.

Cependant, l'équipe de Kulkarni et collaborateurs (1999) ont trouvé qu'une augmentation du PEG 6000 dans une gamme de 6 à 20% engendre la diminution du coefficient de partage.

Concernant le rapport volumique, il augmente avec l'augmentation de la concentration du PEG (**Yang et al., 2008** ; **Garai et Kumar, 2013**)

Le Tableau VIII présente quelques exemples d'extraction des xylanases en utilisant le SDPA.

Tableau IX : Exemples d'extraction des xylanases par divers SDPA

Souches	ATPS	K	FP	R(%)	pH	Références
<i>Bacillus pumilus</i> SBM13	PEG 4000 (60%) / KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (40%)	-	-	70	7,5	Yasinok et al., 2010
<i>Aspergillus candidus</i>	PEG 4000 (8,66 %) / NaH ₂ PO ₄ (22,4%)	8,41	-	88,1	-	Garai et Kumar., 2013
<i>Paecilomyces thermophila</i> J18	PEG 4000 (12,5%) / (NH ₄) ₂ SO ₄ (25%)	-	5,54	98,7	7,2	Yang et al., 2008.
<i>Bacillus pumilus</i>	PEG 4000 (16%) / K ₂ HPO ₄ (10%)	36,6	-	-	-	Bim et Franco., 2000(13)
<i>Polyporus squamosus</i>	PEG 4000 (10%) / (NH ₄) ₂ SO ₄ (20%)	11,26	4,58	79,76	4,2	Antov et al., 2006(2006poly)

-: Donnée inconnue.

b) Effet du pH sur le partage des xylanases

Le système PEG 4000 (13%) / K₂HPO₄ (13%), NaCl 0,1M est optimisé en variant les valeurs du pH.

Il y a eu formation de deux phases à pH 6 et 8, tandis qu'à pH 9, il y a eu formation de deux phases et une interphase (Fig. 15).



(a)

(b)

(c)

- a) PEG 4000 (13%) / K_2HPO_4 (13%), NaCl 0,1 M à pH 6
- b) PEG 4000 (13%) / K_2HPO_4 (13%), NaCl 0,1 M à pH 8
- c) PEG 4000 (13%) / K_2HPO_4 (13%), NaCl 0,1 M à pH 9

Fig. 16: Image montrant les phases après optimisation du pH.

Les différents paramètres du PEG 4000 (13%) / K_2HPO_4 (13%), NaCl 0,1M à différents pH sont ensuite calculés (Tableau IX).

Tableau X: Paramètres mesurés après application du système PEG 4000 (13%)/K₂HPO₄ (13%), NaCl 0,1M.

Système PEG 13%/K ₂ HPO ₄ (13%), NaCl 0,1M	Phases	Activité de la xylanase en U/ml	Activité spécifique en U/mg	Rendement Y %
PH 6	Supérieure	0,077	0,50	18,16
	Inferieure	0,127	0,486	
PH 7	Supérieure	0,226	0,933	60,22
	Interphase	0,421	2,014	
	Inferieur	0,029	0,174	
PH 8	Supérieure	0,011	0,032	13,59
	Inferieur	0,095	0,384	
PH 9	Supérieure	0,091	0,279	13,01
	Interphase	0,088	0,488	
	Inferieur	0,038	0,255	

Selon les résultats du Tableau IX, l'activité xylanolytique à pH 6 est meilleure dans la phase inferieure tandis qu'à pH 9, elle est principalement détectée dans la phase supérieure.

Selon (**Ramyadevi et al., 2012**), les enzymes sont chargées négativement dans un milieu basique donc elles sont plus susceptibles d'être concentrées dans la phase supérieure ce qui explique la meilleur activité xylanolytique (0.091U/ml) du système PEG 4000 (13%) / K₂HPO₄ (13%), NaCl 0,1M à pH 9 dans la phase supérieure, tandis que dans un milieu acide les enzymes sont chargées positivement ce qui entraine leurs précipitations vers la phase inferieure comme le cas du système PEG 4000 (13%) / K₂HPO₄ (13%), NaCl 0,1M à pH 6 dont l'activité xylanolytique est de 0,127 U/ml.

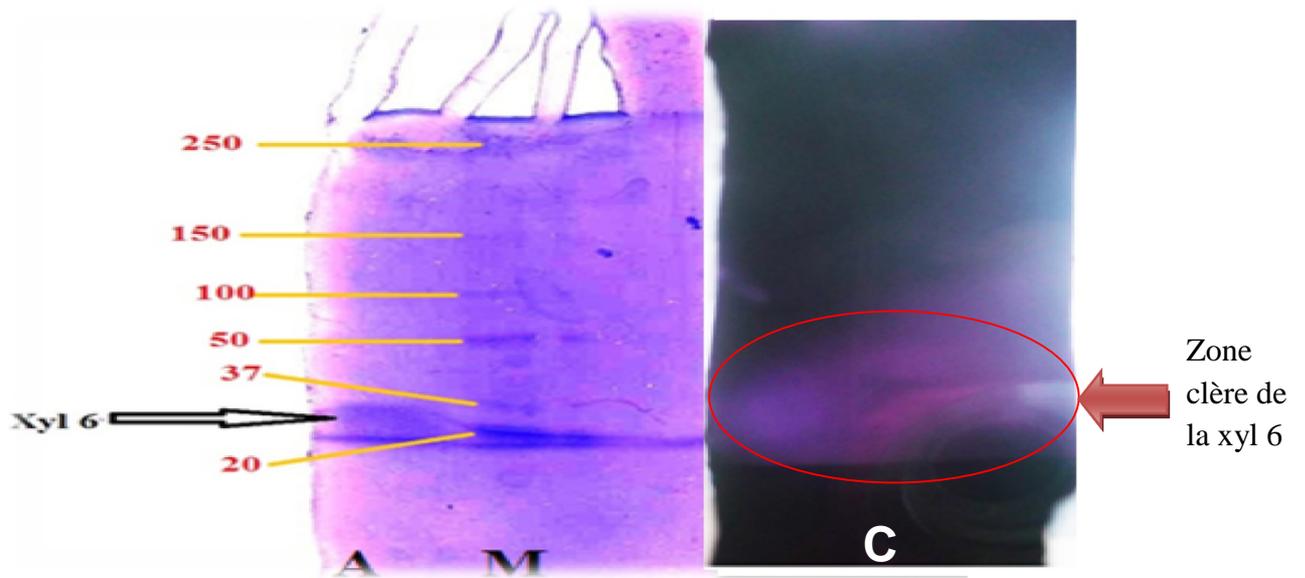
Garai et kumar (2013) ont augmenté le pH du système de 6 à 7, ils ont observé que l'activité enzymatique augmente de 0,127 à 0,421 U/ml, et à partir d'un pH de 7 jusqu'à 9, ils ont remarqué que l'activité enzymatique diminue jusqu'à 0,091U/ml.

Selon (**Kaul, 2000**), l'augmentation du pH induit à un changement de la répartition des composés du SDPA ce qui explique que le système à pH 8 est peut être considéré comme un mauvais mélange à cause de la formation de deux phases au lieu de trois.

Le rendement le plus élevé reste toujours celui du système PEG 4000 (13%) / K₂HPO₄ (13%), NaCl 0,1M à pH 7.

IV. Caractérisation électrophorétique sur SDS-PAGE et réalisation du zymogramme

Après extraction par SDPA, le profil des migrations sur SDS-PAGE montre l'existence d'une seule bande protéique ayant un poids moléculaire de 26,85 KDa (Fig. 17 ; Fig. 18), le zymogramme révèle qu'il s'agit d'une xylanase qui en réalité correspond à la xylanase 6 retrouvée dans le surnageant de culture de *Jonesia denitrificans* BN13 selon les travaux de **Boucherba (2011)** (Fig. 16).



A : Profil de migration des protéines de l'interphase

M : Marqueur protéique (dual color BIORAD)

C : Zymogramme.

Fig.17: Profil de migration des protéines sur SDS-PAGE et mise en évidence des xylanases par zymogramme.

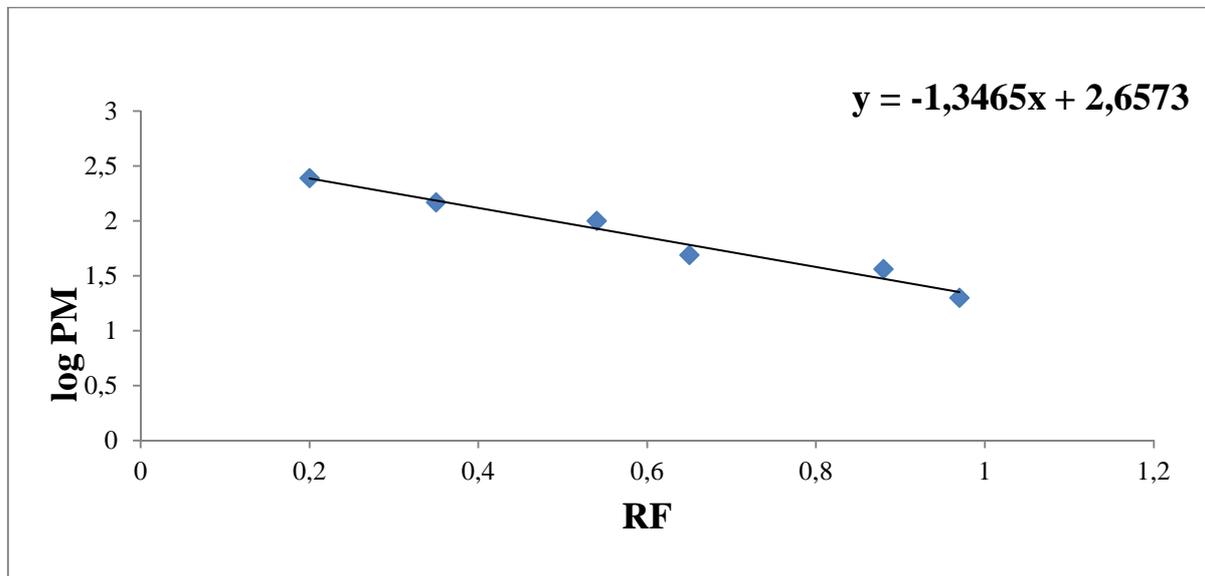


Fig.18 : Courbe d'étalonnage des marqueurs pour l'estimation du poids moléculaire.

La xylanase purifié dans cette étude appartient aux xylanases de faible poids moléculaire (<30KDa).

Le Tableau XI illustre une comparaison entre les xylanases produites par *Jonesia denitrificans* BN13 et celles produites par d'autres souches.

Tableau XI: Comparaison entre les poids moléculaires de la xylanase de *Jonesia denitrificans* BN13 et ceux de quelques microorganismes.

Souche	PM (KDa)	SDPA	Références
<i>Jonesia denitrificans</i> BN13	26,85	PEG 4000 (13%)/ K ₂ HPO ₄ (13%), NaCl 0,1M	Présent travail
<i>Bacillus pumilus</i> SB-M13	24,8	PEG 4000, phosphate de potassium	Yasinok et al., 2010
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	11	PEG 6000, phosphate de potassium	Teotia et al., 2001
<i>Aspergillus niger</i>	24	PEG 6000, phosphate de potassium	Teotia et al., 2001
<i>Trichoderma reesei</i>	21	PEG 6000, phosphate de potassium	Teotia et al., 2001
<i>Paecilomyces thermophila</i> J18	26	PEG 4000,(NH ₄) ₂ SO ₄	Yang et al., 2008

Conclusion et perspectives

Conclusion

Dans notre travail, la production des xylanases par *Jonesia denitrificans* BN13 dans un milieu MM7 liquide à base de xylane de bouleau est suivie à une température de 37°C et à pH 7, la meilleure activité xylanolytique est de 0,699 U/ml.

L'extraction des xylanases est obtenue dans l'interphase du système optimisé, il s'agit du PEG 4000 (13%) (m/ v) /K₂HPO₄ (13%), NaCl 0,1M à pH 7.

L'analyse du profil de migration des protéines sur SDS-PAGE et l'analyse du zymogramme révèle la présence d'une xylanase possédant un poids moléculaire de 26,85 KDa.

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

- Utiliser des déchets agricoles comme source de carbone, car le xylane de bouleau et le xylane d'épeautre et d'avoine, qui sont communément utilisés comme substrats pour la production des xylanases, sont coûteux. L'utilisation efficace de tels coproduits déchets agricoles résout des problèmes tant sur le plan économique et environnemental (ce travail a été entamé dans cette étude mais malheureusement les problèmes de contaminations par des champignons ont entravé sa réalisation).
- Utiliser une étuve agitatrice (Shaker) car l'agitation augmente la production des xylanases selon **Boucherba, (2011)**.
- Suivre la production de cellulases, de laccases et de xylanases simultanément et appliquer le système adéquat pour les récupérer.
- Optimisation du SDPA, pour une utilisation à l'échelle industrielle en jouant sur les différents facteurs qui influencent sur la répartition, tels que le poids moléculaire du PEG, la concentration de K₂HPO₄ et le changement du type de sel.

Bibliographie

Bibliographie

A

Ahmad Mansoor Z. (2012). Xylan as Strength Enhancing Additive. Thèse de master. Institut royal de la technologie de Stockholm Suède, 28p.

Antov MG, Pericin DM et Dasic MG. (2006). Aqueous Two phase partitioning of xylanase produced by solide-state cultivation of *polyporus squamosus*. Process Biochemistry. 41, 232–235.

Assamoi AA, Destain J et Thonart P. (2009). Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1, 4-xylanases de moisissures: le cas de *Penicillium canescens*. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement Biotechnology Agronomy, Society and Environment. 13(2), 281-294.

B

Bailey MJ, Biely P et Poutanen K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. J Biotechnol. 23, 257-270.

Bakir U, Yavascaoglu S, Guvenc F et Ersayin A. (2001). An endo- β -1, 4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization. Enzyme and Microbial Technology. 29(6), 328-334.

Banik RM, Santhiagu A, Kanari B, Sabarinath C et Upadhyay SN. (2003). Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two-phase systems. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 19(4), 337-348.

Barbat A. (2009). Extraction, caractérisation chimique et valorisation biologique de glucuronoxylanes de bois de châtaignier: développement de nouveaux procédés de délignification. Thèse de doctorat. Université de Limoges, Faculté des sciences et techniques. 216p.

Barbin P. (2006). Contrôle et éléments de maîtrise de la contamination par la levure *Brettanomyces* au cours du procédé de vinification en rouge. Thèse en Génie des Procédés et

de l'Environnement. Faculté des sciences de Transferts, Dynamique des Fluides, Energétique et Procédés, 257p.

Bataillon M, Cardinali APN et Duchiron F. (1998). Production of xylanases from a newly isolated alkalophilic thermophilic *Bacillus sp.* Biotechnol Lett. 20, 1067-1071.

Beg QK, Bhushan B, Kapoor M et Hoondal GS. (2000). Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from a *Streptomyces sp.* QG-11-3. J Ind Microbiol Biotechnol. 24, 396-402.

Bezerra RP, Borba FKSL, Moreira KA, Lima-Filho JL, Porto ALF et Chaves AC. (2006). Extraction of amylase from fermentation broth in poly (ethylene glycol) salt aqueous two-phase system. Brazilian Archives of Biology and Technology. 49(4), 547-555.

Bim MA et Franco TT. (2000). Extraction in aqueous two-phase systems of alkaline xylanase produced by *Bacillus pumilus* and its application in kraft pulp bleaching. Journal of Chromatography B. 743,349–356.

Blanco A, Vidal T, Colon JF et Pastor FIJ. (1995). Purification and properties of xylanase a from alkali-tolerant *Bacillus sp.* Strain BP-23. Appl Environ Microbiol. 61,4468-4470.

Boucherba N. (2011). Production, purification et caractérisation d'une endoxylanase produite par une souche de *Jonesia denitrificans BNI3*. Thèse de doctorat. Université Abderrahmane Mira, Faculté des sciences de la nature et de la vie, 133p.

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, 519- 525.

Bradford MM. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. biochem. 72,248-254.

Bulgariu L et Bulgariu D. (2007). The extraction of Zn (II) in aqueous PEG (1550)-(NH₄)₂SO₄ two-phase system using Cl⁻ ions as extracting agent. Journal of the Serbian Chemical Society. 72(3), 289-297.

C

Carvalho AFA, Neto O, Silva DD et Pastore GM. (2013). Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Research International*. 51(1), 75-85.

Christakopoulos P, Mamma D, Nerinckx W, Kekos D, Macris B, et Claeysens M. (1996). Production and partial characterization of xylanase from *Fusarium oxysporum*. *Bioresource technology*. 58(2), 115-119.

Coelho DF, Silveira E, Junior AP et Tambourgi EB. (2013). Bromelain purification through unconventional aqueous two-phase system (PEG/ammonium sulphate). *Bioprocess and biosystems engineering*. 36(2), 185-192.

Collins T, Gerday C et Feller G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev*. 29, 3–23.

D

Debeire-Gosselin M, Loonis M, Samain E, Debeire P. (1992). Purification and properties of 22 kDa endoxylanase excreted by a new strain of thermophilic *Bacillus*. In: *Xylan and Xylanases*. (Visser J., Beldman G., Kusters-van Someren M.A. and Voragen, A.G.J., Eds). Elsevier Science Publishers. 463-466.

De Carvalho Peixoto-Nogueira S, Michelin M, Betini JHA, Jorge JA, Terenzi HF et deMoraes MDLT. (2009). Production of xylanase by *Aspergilli* using alternative carbon sources: application of the crude extract on cellulose pulp biobleaching. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 36(1), 149-155.

Decou R. (2009). Contribution à l'étude du rôle des xylandes et des xyloglucanes fucosylés au cours de la formation du bois. Application à la formation du bois de tension chez le peuplier. Thèse de doctorat. Université de Limoges, Faculté des sciences et techniques, 378p.

De Medeiros Silva GM, Viana Marques DDA, Porto TS, Teixeira JAC, Pessoa-Júnior A et Porto ALF. (2013). Extraction of fibrinolytic proteases from *Streptomyces sp.*

DPUA1576 using PEG-phosphate aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria*. 339, 52-57.

Deutschmann R et Dekker RF. (2012). From plant biomass to bio-based chemicals: Latest developments in xylan research. *Biotechnology advances*. 30, 1627-1640.

Duart MCT, Portugal EP, Ponezi AN, Bim MA, Tagilari CV et Franco TT. (1999). Production and purification of alkaline xylanases. *Techno*. 68, 49-53.

E

Esteban R, Villanueva JR et Villa TG. (1982). β -D-xylanases of *Bacillus circulans* WL-12. *Canadian Journal of Microbiology*. 28, 733-739.

F

Field D, Garrity G, Gray T, Morrison N, Selengut J, Sterk P, Tatusova T, Thomson N, Allen MJ et Angiuoli SV. (2008). Towards a richer description of our complete collection of genomes and metagenomes : the “Minimum Information about a Genome Sequence” (MIGS) specification. *Nat Biotechnol*. 26, 541-547.

G

Gallardo O, Diaz P, Pastor FI. (2004). Cloning and characterization of xylanase A from the strain *Bacillus sp.* BP-7: comparaison with alkaline pi-low molecular weight xylanases of family 11. *Current Microbiology*. 48, 276-279.

Garai D et Kumar V. (2013). A Box–Behnken design approach for the production of xylanase by *Aspergillus candidus* under solid state fermentation and its application in saccharification of agro residues and *Parthenium hysterophorus* L. *Industrial Crops and Products*. 44, 352– 363.

Genestie B. (2006). Optimisation de la production d’arabinoxyloligosaccharides d’intérêt biologique à partir de sons de céréales: approches méthodologiques. Thèse de doctorat. Université de Limoges, Faculté des sciences et techniques, 277p.

Geweely N S. (2011). Purification and characterization of acido-thermophilic xylanase from *Aspergillus terreus*. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 5(10), 214-219.

H

Hatti-Kaul R. (2000). Aqueous two-phase systems. Humana Press, pp. 1-10.

He J, Chen DYB et Zhang K. (2010). Optimization of the *Trichoderma reesei* endo-1, 4-beta-xylanase production by recombinant *Pichia pastoris*. Biochemical Engineering Journal. 52(1), 1-6.

Hmida-Sayari, A, Taktek S, Elgharbi F et Bejar S. (2012). Biochemical characterization, cloning and molecular modeling of a detergent and organic solvent-stable family 11 xylanase from the newly isolated *Aspergillus niger* US368 strain. Process Biochemistry. 47, 1839–1847

J

Jayapal N, Samanta AK, Kolte AP, Senani S, Sridhar M, Suresh KP et Sampath KT. (2013). Value addition to sugarcane bagasse: Xylan extraction and its process optimization for xylooligosaccharides production. Industrial Crops and Products. 42, 14-24.

Johansson G et Hartman A. (1976). A Quantitative Model for Partition in Aqueous Multiphase Systems. European Journal of Biochemistry. 63(1), 1-8.

Joshi C et Khare SK. (2011). Utilization of deoiled *Jatropha curcas* seed cake for production of xylanase from thermophilic *Scytalidium thermophilum*. Bioresource technology. 102(2), 1722-1726.

K

Kammoun R, Chouayekh H, Abid H, Naili B et Bejar S. (2009). Purification of CBS 819.72 α -amylase by aqueous two-phase systems: Modelling using Response Surface Methodology. Biochemical Engineering Journal. 46(3), 306-312.

Kapoor M, Nair LM et Kuhad RC. (2008). Cost-effective xylanase production from free and immobilized *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in saccharification of *Prosopis juliflora*. *Biochemical Engineering Journal*. 38(1), 88-97.

Khanum F et Pal A. (2011). Purification of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 : individual and interactive effect of temperature and pH on stability. *Process Biochem*. 46,879-887.

Khasin A, Alchanati I, Shoham Y. (1993). Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Appl Environ Microbiol*. 59, 1725-1730.

Kimura I, Sasahar H et Tajima S. (1995). Purification and characterization of two xylanases and an arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae*. *J Ferment Bioeng*. 80,334-339.

Köhnke T. (2010). Adsorption of xylans on cellulosic fibres, Influence of xylan composition on adsorption characteristics and kraft pulp properties. Thèse de doctorat. Université de technologie göteborg suède, 66p.

Kula MR, Kroner KH et Hustedt H. (1982). Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. In *Reaction Engineering*, pp.73-118.

Kulkarni N, Vaidya A et Raol M. (1999). Extractive Cultivation of Recombinant *Escherichia coli* Using Aqueous Two Phase Systems for Production and Separation of Extracellular Xylanase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 255, 274–278.

Kumar Bajaj B et Manhas K. (2012). Production and characterization of xylanase from *Bacillus licheniformis* P11 (C) with potential for fruit juice and bakery industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 1, 330-337.

L

Labbé N. (2002). Mise au point d'une nouvelle méthode de dosage de l'eau dans le bois et caractérisation des composés organiques du pin maritime par résonance magnétique nucléaire domaine Temps. Thèse De Doctorat En Science Du Bois. Université Bordeaux I, 220p.

Lama L, Calandrelli V, Gambacorta A et Nicolaus B. (2004). Purification and characterization of thermostable xylanase and B-xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarctius*. *Research microbial*. 155, 283-289.

Li Y, Liu Z, Zhao H, Xu Y et Cui F. (2007). Statistical optimization of xylanase production from new isolated *Penicillium oxalicum* ZH-30 in submerged fermentation. *Biochemical engineering journal*. 34 (1), 82-86.

M

Madhusudhan MC et Raghavarao KSMS. (2013). Aqueous Two-Phase Extraction for the Recovery of Beet Pigments and Enzymes. In *Red Beet Biotechnology* Springer US, pp. 393-408.

Michelin M, Maria de Lourdes TM, Ruzene DS, Silva DP, Ruiz HA, Vicente A et Teixeira JA. (2012). Production of xylanase and β -xylosidase from autohydrolysis liquor of corncob using two fungal strains. *Bioprocess and biosystems engineering*. 35(7), 1185-1192.

Michelin M, Peixoto-Nogueira SC, Betini JHA, da Silva TM, Jorge JA, Terenzi HF et Polizeli MLTM. (2010). Production and properties of xylanases from *Aspergillus terricola* Marchal and *Aspergillus ochraceus* and their use in cellulose pulp bleaching. *Bioprocess and biosystems engineering*. 33(7), 813-821.

Miller GL. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar *Anal.Chem.*31, pp.426-428.

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. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II, 250p.

Moine C. (2005). Extraction, caractérisation structurale et Valorisation d'une famille d'hémicelluloses du bois. Obtention de matériaux plastiques par modification des xylandes. Thèse de doctorat. Université de Limoges, Faculté des sciences et techniques, 240p.

Montplaisir D. (1991). Cuisson au sulfite semi-alkalin de bouleau blanc: cinétique, mécanisme de réaction et propriétés papetières. Thèse de doctorat. Université du Québec à Trois-Rivières, 113p.

N

Nakamura S, Wakabayashi K, Nakai R, Aono R et Horikoshi K. (1993). Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus sp.* Strain 41M-1. *Appl Environ Microbiol.* 59, 2311-2316.

Nanmori T, Watanabe T, Shinke R, Kohno A et Kawamura Y. (1990). Purification and properties of thermostable xylanase and β -xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain. *J Bacteriol.* 172 (12), 6669-6672.

Nascimento RP, Coelho RRR, Marques S, Alves L, Girio FM, Bon EPS et Amaral-Collaco, MT. (2002). Production and partial characterisation of xylanase from *Streptomyces sp.* strain AMT-3 isolated from *Brazilian cerrado* soil. *Enzyme and Microbial Technology.* 31(4), 549-555.

Nocquet T. (2012). Torréfaction du bois et ses constituants: Expériences et modélisations des rendements en matières volatiles. Thèses de doctorat en génie des procédés et de l'environnement. Université de Toulouse, 205p.

O

Okazaki W, Akiba T, Horikoshi K et Akahoshi R. (1985). Purification and characterization of xylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus spp.* *Agric Biol Chem.* 49,2033-2039.

Opperdoes F et Rider M. (2007). Techniques de purification des protéines. *Biochimie générale BCHM 1215.* 46p.

P

Nbangred W, Fukusaki E, Epifanio EC, Shinmyo A et Okada H. (1985). Expression of a xylanase gene of *Bacillus pumilus* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Applied microbiology and biotechnology.* 22(4), 259-264.

Peng F, Peng P, Xu F et Sun RC. (2012). Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnology advances*. 30(4), 879-903.

Poorna CA et Prema P. (2006). Production and partial characterization of endoxylanase by *Bacillus pumilus* using agro industrial residues. *Biochemical Engineering Journal*. 32(2), 106-112.

Poutanen K et Sundberg M. (1988). An acetyl esterase of *Trichoderma reesei* and its role in the hydrolysis of acetyl xylans. *Applied microbiology and biotechnology*. 28(4-5), 419-424.

Prevot L. (1961). Vitesses radiales et éléments orbitaux de zeta1 Ursae Majoris. *Journal des observateurs*. 44, 83.

Pukall R, Gabriele GS, Lapidus A, Nolan M, Rio TGD, Lucas S, Chen F, Tice H, Pitluck S, Cheng FJ, Copeland A, Saunders E, Brettin T, Detter CJ, Bruce D. (2009). Complete genome sequence of *Jonesia denitrificans* type strain (Prevot 55134^T). *Stand Genomic Sci*, doi. 10, 4056-41646.

R

Raja S, Murty VR, Thivaharan V, Rajasekar V et Ramesh V. (2011). Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules—a review. *Science and Technology*. 1(1), 7-16.

Ramyadevi D, Subathira A et Saravanan S. (2012). Phase compositions of aqueous two-phase systems formed by poly (ethylene glycol) and maltodextrin at different temperatures. *International Journal of Chemical Sciences and Applications*.3 (2), 289-292.

Rocourt J, Wehmeyer U et Stackebrandt E. (1987). Transfer of *Listeria denitrificans* to a new genus, *Jonesia* gen. nov, as *Jonesia denitrificans* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 37,266–270.

Rodríguez-Durán LV, Spelzini D, Boeris V, Aguilar CN et Picó GA. (2013). Partition in aqueous two-phase system: its application in downstream processing of tannase from *Aspergillus niger* . *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 101, 392-397.

S

Sá-Pereira P, Paveia H, Costa-Ferreira M et Aires-Barros MR. (2003). A new look at xylanases. *Molecular biotechnology*. 24(3), 257-281.

Schulze E. (1891). Information regarding chemical composition of plant cell membrane. *Ber Dtsch Chem Ges*. 24, 2277-2287.

Schumann PCuiX, Stackebrandt E, Kroppenstedt RMXuL et Jiang C. (2004). *Jonesia quinghaiensis* sp. nov, a new member of the suborder micrococcineae. *Internat J System Evol Microbiol*. 54, 2181-2184.

Shah AR, Madamwar D. (2005). Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. *Process Biochem*. 40, 1763–71.

Sharma P, Bajaj BK. (2005). Production and partial characterization of alkalitolerant xylanase from an alkali-tolerant xylanase from an alkalophilic *Streptomyces* sp. CD3. *J Scient Indust Resear*. 64, 688-97.

Subramaniyan S et Prema P. (2002). Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Critical Reviews in Biotechnology*. 22(1), 33-64.

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 Bioeng*. 93, 431–3.

Teixeira RSS, Gonc F, Siqueira A, de Souza MV, Filho EXF, Elba Pinto et da Silva Bon. (2010). Purification and characterization studies of a thermostable b-xylanase from *Aspergillus awamori*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 37, 1041–1051.

Teotia S, Lata R et Gupta MN. (2001). Free Polymeric Bioligands in Aqueous Two-Phase Affinity Extractions of Microbial Xylanases and Pullulanase. *Protein Expression and Purification*. 22, 484–488.

W

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

Wang SL, Yen YH, Shih IL, Chang AC, Chang WT, Wu WC et Chai YD. (2003). Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. *Enzyme and microbial technology.* 33(7), 917-925.

Wang SL, YenYH,Shin IL, Chang AC, Chang WT, Wu WC et Chai YD. (1986). Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. *Enzyme Microb Technol.* 33, 917–925.

Wong KKY, Tan LU et Saddler JN. (1988). Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiological Reviews.* 52(3), 305-317.

Y

Yasinok AE, Biran S, Kocabas A et Bakir U. (2010). Xylanase from a soil isolate, *Bacillus pumilus*: gene isolation, enzyme production, purification, characterization and one-step separation by aqueous-two-phase system. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 26(9), 1641-1652.

Yang S, Huang Z, Jiang Z, 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.* 43,56–61

Yang SQ, Yan QJ, Jiang ZQ, Li LT, Tian HM et Wang YZ. (2006). High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces themophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. *Bioresource technology.* 97(15), 1794-1800.

Yavari M, Pazuki G, Vossoughi M, Mirkhani S et Seifkordi A. (2013). Partitioning of alkaline protease from *Bacillus licheniformis* (ATCC 21424) using PEG—K₂HPO₄ aqueous two-phase system. *Fluid phase equilibria.* 337, 1-5.

Annexes

Appareillage

- Etuve à 37°C (Memmert) ;
- Spectrophotomètre (SHIMADZU UV min-1240V) ;
- Balance (Scouttm pro) ;
- Balance (Ae ADAM AFA-120LC) ;
- Bain marie (Memmert) ;
- Bain marie (GFL) ;
- Centrifugeuse (Sigma 2-16K) ;
- pH mètre (HANN pH210) ;
- Dispositif d'électrophorèse (protean II, BIORAD)

Les milieux de cultures**❖ milieu MM7 solide :**

Xylane de bouleau (fluka).....	0,7g
Extrait de levure (mikrobiologie).....	0,2g
NaCl (biochem).....	0,25g
NH ₄ Cl (cheminova).....	0,5g
KH ₂ PO ₄ (cheminova).....	1,5g
Na ₂ HPO ₄ (VWR PROLABO).....	3g
MgSO ₄ , 7H ₂ O (biochem).....	0,025g
Agar.....	1,5g
L'eau distilléeqsp.....	100ml

❖ milieu MM7 liquide

Xylane de bouleau (fluka).....	7g
Extrait de levure (mikrobiologie).....	2g
NaCl (biochem).....	2,5g
NH ₄ Cl (cheminova).....	5g
KH ₂ PO ₄ (cheminova).....	5g
Na ₂ HPO ₄ (VWR PROLABO).....	30g
MgSO ₄ , 7H ₂ O (biochem).....	0,25g
L'eau distilléeqsp.....	1000ml

Tout les milieux de culture ont été agité, réchauffé, ajusté (pH 7), autoclavé à 120°C, en suite refroidi.

Préparation des réactions chimiques

❖ Dosage des sucres réducteurs

Solution d'acide dinitrosalicylique (DNS)

DNS.....	10g
Soude.....	16g
Tartrate de potassium sodique.....	300g
Eau distillée.....qsp.....	1000ml

La solution est préparée dans l'obscurité puis filtrée et conservée dans des flacons couverts d'aluminium

❖ Dosage des protéines

Solution de bleu de Coomassie :

Bleu de coomassie G250.....	10mg
Ethanol.....	5ml
Acide phosphorique (85%).....	10ml
Eau distillée.....qsp.....	100ml

❖ Préparation des solutions d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

1. Préparation des tampons

a) Tampon de séparation

Tris-HCl.....	72,7g
SDS.....	1,6g
β -mercaptoéthanol.....	0,8g
Eau distillée.....qsp.....	200ml

Ajuster le pH à 8,8 avec HCl concentré

b) Tampon de concentration

Tris-HCl.....	12,114g
SDS	0,8g
β -mercaptoéthanol.....	400 μ l
Eau pure.....	qsp.....200ml

Ajuster le pH à 6,8

c) Tampon de migration

Tris.....	1,06g
Glycine.....	5,04g
β -mercaptoéthanol.....	175 μ l
SDS.....	0,35g
Eau distillée.....	qsp.....350mL

Ajuster le pH à 8,3

d) Tampon d'échantillon

Tris-HCl.....	1,892g
EDTA.....	0,007g
β -mercaptoéthanol	0,4ml
SDS.....	1,16g
Bleu de bromophénol.....	0,025g
Glycérol.....	12,5g
Eau pure.....	qsp.....50ml

Ajuster le pH à 6,8 avec du HCl concentré

e) Solution de fixation

Acide acétique.....	5%
Alcool (éthanol).....	30%

f) Solution de coloration

Acide acétique.....	10%
Alcool (ethanol).....	40%
Bleu de coomassie R250.....	2,9mM

2. Préparation des gels de séparation et de concentration

a) Gel de séparation :

Solution d'acrylamide/Bisacrylamide (29 :1).....	2,5ml
Tampon de séparation.....	5,2ml
TEMED.....	20µl
Persulfate d'ammonium.....	70µl
xylane de bouleau.....	0,8ml
Eau pure.....qsp.....	12,5ml

b) Gel de concentration 7,5% :

Solution d'acrylamide/Bisacrylamide (29 :1).....	2,5ml
Tampon de concentration.....	2,5ml
TEMED.....	10µl
Persulfate d'ammonium.....	100µl
Eau pure.....qsp.....	10ml

Résumé

L'objectif du présent travail est d'extraire les xylanases produites par la souche *Jonesia denitrificans* BN13 en utilisant le système à deux phases aqueuses, le meilleur système obtenu est celui contenant 13% (m/v) de PEG 4000, 13% (m/v) de K_2HPO_4 et 0,1M de NaCl à pH 7, dans l'interphase du système, le coefficient de partage est de 1,65, le facteur de purification obtenu est de 2,75 et le rendement est de 60,22%.

L'analyse du profil de migration des protéines de l'interphase sur SDS-PAGE confirme la présence d'une seule bande protéique ayant une masse moléculaire de 26,85KDa et le profil du zymogramme révèle qu'il s'agit bien d'une xylanase.

Mots Clés : système à deux phases aqueuses, PEG4000, xylanase, *Jonesia denitrificans* BN13, xylane de bouleau.

Abstract

The aim of the present work is the extraction of *Jonesia denitrificans* BN13 xylanases using the aqueous two phases system (ATPS). The best one is composed by 13% PEG 4000 / 13% K_2HPO_4 / 0.1 M NaCl, pH 7, the yield is about 60.22% of the xylanolytic activity which is found in the interphase, the partition coefficient (K) is 1.65 and a purification factor is 2.750, these xylanases were analysed by SDS-PAGE and Zymogram, one xylanase with molecular weight of 26.85KD is obtained.

Keys words: ATPS, PEG 4000, xylanase, *Jonesia denitrificans*, birchwood xylan.