

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



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

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

Thème
Production et extraction de xylanases par un
système à deux phases aqueuses

Présenté par : M. AZOUG Nassim
M. MANADI Hicham

Devant le jury:

Présidente : M^{me} KHETTAL B. (MCA, Université A.MIRA/ Bejaïa).

Examineurs : M^r LADJOUZI R. (MAA, Université A.MIRA/ Bejaïa).
M^r BETTACHE A. (Doctorant, Université A.MIRA/ Bejaïa).

Promotrice : M^{me} BOUCHERBA N. (MCB, Université A.MIRA/ Bejaïa).

Promotion : 2012- 2013

*Nous remercions DIEU le tout puissant de nous
avoir donné la santé, la force et la volonté
d'accomplir ce travail.*

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

Nous voudrions exprimer nos sincères remerciements :

*Aux membres de jury Mme KHETAL. D'avoir accepté de
présider le jury, et l'examineur M. LADJOUI. ainsi que
l'examineur M. BETTACHE. Pour nous avoir fait
l'honneur d'examiner ce travail.*

*A Mme BOUCHERBA N. qui nous a donné la possibilité
d'effectuer ce travail de fin de cycle. Nous la remercions
vivement pour nous avoir apporté un appui constant et
pour sa disponibilité. Nos sincères remerciements à M.
MESSIS A, M. BETTACHE A et M. GAGAOUA pour leur
aide précieuse et leurs conseils avisés.*

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

*Tout ce qu'on peut faire dans la vie n'est que le reflet de soi même,
apprendre à vivre pour mieux servir*

Je dédie ce modeste travail :

*Aux être les plus chère dans ma vie ; mes très chère parents a qui je dois tous les
bonheurs du monde pour leurs sacrifices et leur patience pour que je soit l'homme
dont les valeurs sont les leurs, je les remercie amplement pour le soutien morale
et financier dans les moments les plus hostiles de ma vie.*

*A mes frères que j'adore et j'estime trop ; Raveh et son épouse et à leur deux
enfant : Lyliane et Dida, farid et son épouse Hanane, Mohamed et son épouse
Chabha et à leur enfant Sissi, et enfin mon âme Salim.*

*A mes sœurs que j'apprécie tellement pour leurs gentillesse : Nassima et son fils
Yanis, Samira et surtout Djidjiga à qui je souhaite une belle réussite dans sa vie.*

*A LA MEMOIRE DE MA GRAND MERE QUE DIEU L'ACEUILLE
DANS SON VASTE PARADIS*

*A tous mes chères amis : Belaïd, ounissa, zahia, samo, mounir, smail, samir,
halim, arezki et les autres.*

A mon binôme et toute sa famille.

Enfin à toute la promotion microbiologie 2012-2013

Nassim

Ce n'est que des lignes à écrire, que des simples paroles à dire pour toi ma chère maman, mon cher papa : je vous remercie énormément de bien d'être toujours à mes coté, de votre soutien sempiternel ; et si j'ai atteint ce stade là c'est grâce à vous mes parents bien aimés.

Je dédie ce travail à mes chers sœurs et frères : Soraya, Wahiba, Farouk et son épouse Lynda, Mourad, Yassin, Abd-Alali et Keir Adin .à toi ma grande mère, à vous mes cousines et cousins.

A toi mon binôme. A tous mes amis (es) : Belaïd, Salim, Ismaïl, Nadjib, Arzki, Samir, Fayçal, Lyes et à toutes la promotion de Biotechnologie microbienne

Je termine en beauté en remerciant mon petit cœur RYM, qui ma toujours encouragé et ma poussé d'aller vers l'avant.

A tous ceux qui ont, de près ou de loin, participé à la réalisation de ce travail.

HICHAM

Tableau I	
Caractéristiques des endoxylanases produites par le genre <i>Streptomyces</i>	5
Tableau II	
Gamme d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs (Bailey et al., 1992).....	18
Tableau III	
Gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines par la macrométhode.....	19
Tableau IV	
Gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines par la microméthode	19
Tableau V	
Préparation des SDPAs.....	20
Tableau VI	
Récapitulatif des résultats de la croissance, activité xylanolytique, concentration des protéines et de l'activité spécifique	27
Tableau VII	
Production de xylanases dans les fermentations en milieu liquide	30
Tableau VIII	
Volumes des phases des différents systèmes.....	33
Tableau IX	
Récapitulatif des résultats obtenus après SDPA (PEG 6000/KH ₂ PO ₄ / NaCl).	35
Tableau X	
Comparaison des résultats de différents travaux effectués sur l'extraction des xylanases par SDPA	43
Tableau XI	
Résultats des poids moléculaires des xylanases révélées par SDS-PAGE.....	46

Fig. 01	
<i>Jonesia denitrificans</i> sous microscope électronique de balayage (résolution 2µm) (Pukall et al., 2009)	2
Fig. 02	
Structure du xylane de bouleau (Herring et al., 2004)	4
Fig. 03	
Structure hypothétique du xylane montrant les différents sites d'attaque des xylanases microbiennes (Beg et al., 2001)	7
Fig. 04	
Courbe binodale (Raja et al., 2011)	11
Fig. 05	
Extraction en batch (Raja et al., 2011)	12
Fig. 06	
Test d'activité xylanolytique (Miller, 1959)	17
Fig. 07	
Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS (Bailey et al., 1992) .	17
Fig. 08	
Cuve et accessoires du dispositif d'électrophorèse (Mini Protean II, Bio Rad)	22
Fig. 09	
Colonies de <i>Jonesia denitrificans</i> BN13 entourées de zones d'hydrolyse du xylane de bouleau (Boucherba, 2011)	25
Fig. 10	
Courbe d'étalonnage des sucres réducteurs	26
Fig. 11	

Droite de dosage des protéines par la macrométhode	26
Fig. 12	
Droite de dosage des protéines par la microméthode	26
Fig. 13	
Cinétique de croissance et de production de xylanases chez <i>Jonesia denitrificans</i> BN13.	28
Fig. 14	
Histogramme représentant la spécificité des xylanases vis-à-vis de 03 substrats : le xylane de bouleau, le xylane d'épeautre et d'avoine et le xylane de hêtre.	31
Fig. 15	
Présentation des phases des différents systèmes	32
Fig. 16	
Effet de la concentration du PEG sur l'activité xylanolytique et sur l'activité spécifique.....	36
Fig. 17	
Effet de la concentration du PEG sur le coefficient de partage et le ratio volumique .	37
Fig. 18	
Influence de la concentration du PEG sur le facteur de purification et la récupération d'enzymes.....	38
Fig. 19	
Influence de la concentration du PEG sur le rendement et le ratio de concentration...	39
Fig. 20	
Effet du pH sur l'activité xylanolytique et sur l'activité spécifique.....	40

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

E.C	Enzyme Commission.
BSA	Sérum bovin albumin.
PAA	Acide polyacrylique.
nm	Nanomètre.
DO	Densité optique.
μmol/ml	Micromoles par millilitre.
U/ml	Unité par millilitre.
rpm	Rotation par minute.
v/v	Volume par volume.
mM	Millimolaire.
m /v	Masse par volume.
DNS	L'acide 3,5-dinitrosalicylique.
mg/ml	Milligramme par millilitre.
kDa	Kilodaltons.
Tris	Tris-(hydroxyméthyl)-amniométhane.
mA	Milli-ampère.
Rf	Rapport frontal.
μm	Micromètre.
MM	Masse molaire.
pI	Point isoélectrique.
PEG	Polyéthylène glycol.
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine.

INTRODUCTION	01
--------------------	----

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Microorganismes producteurs de xylanases	02
1. Genre <i>Jonesia</i>	02
1.1. <i>Jonesia denitrificans</i>	02
II. Xylane de bouleau	03
III. Enzymes xylanolytiques	04
III.1. Enzymes de dégradation de la chaîne principale	04
III.1.1. Endo--1,4-xylanases (EC3.2.1.8)	04
III.1.2. β -xylosidases (EC 3.2.1.37)	06
III.2. Enzymes de dégradation de la chaîne latérale	06
• α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.2.55)	06
• α -D-glucuronosidases (EC 3.2.1.139)	06
• Acétyl estérases (EC 3.1.1.6)	06
• Féruloyl estérases (EC 3.1.12)	06
IV. Classification des xylanases	07
V. Production des endoxylanases par les actinomycètes	08
VI. Applications industriels des xylanases	08
VII. Système a deux phases aqueuses (SDPA)	09
VII.1. Généralités sur le SDPA	09
VII.2. Propriétés de système de phase	10
VII.3. Extraction en batch	12
VIII. Facteurs influençant le partage des biomolécules dans un SDPA	13
1. Poids moléculaire du polymère	13
2. pH	13
3. Présence de sels neutres	14
IX. Applications de SDPA	14
1. La fermentation extractive	14
2. Récupération des Biomolécules de valeur à partir des eaux usées	15

DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE**MATERIEL ET METHODES**

I- Matériel	16
I.1. Appareillages et réactifs chimiques	16
I.2. Matériels biologique	16
II. Méthodes	16
II.1. Repiquage de la souche <i>Jonesia denitrificans</i> BN13	16
II.2. Préparation et ensemencement des milieux MM7 liquide	16
II.3. Méthodes analytiques	16
II.3.1. Mesure de la biomasse	16
II.3.2. Mesure de l'activité xylanolytique	17
II.3.3. Dosage des protéines	19
a- Macrométhode	19
b- Microméthode	19
III- Spécificité des xylanases de <i>Jonesia denitrificans</i> BN13 vis-à-vis de différents substrats	20
IV. Préparation du système à deux phases aqueuses (SDPA)	20
V. Dialyse	20
1. Principe	20
2. Méthodologie	21
VI. Mesure des différents paramètres	21
• Coefficient de partage	21
• Ratio volumique	21
• Mesure de rendement	21

• Facteur de purification	22
• Récupération de l'enzyme.....	22
• Ratio de concentration	22
VII. SDS-PAGE et zymogramme	22

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Repiquage de la souche <i>Jonesia denitrificans</i> BN13	25
II. Résultats des méthodes analytiques	25
III. Cinétique de croissance et production de xylanases	27
IV. Spécificité des xylanases vis-à-vis des différents substrats	31
V. Système à deux phases aqueuses (SDPA)	32
a. Préparation du SDPA	32
b. La séparation des deux phases aqueuses	34
b.1. Effet de la concentration de PEG sur le partitionnement des xylanases	37
b.2. Effet du pH sur le partitionnement des xylanases	39
VI. Mise en évidence des xylanase par SDS-PAGE et zymogramme.	44
CONCLUSION	47

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

RÉSUMÉ

INTRODUCTION

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

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

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

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

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

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

C'est pour ces raisons que nous avons voulu poursuivre les travaux de **Boucherba (2011)**, en essayons de mettre au point le **SDPA** tout en optimisant la concentration du polyéthylène glycol et le pH du système.

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

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

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. MICROORGANISMES PRODUCTEURS DE XYLANASES

Une grande variété de microorganismes (bactéries, levures, moisissures et protozoaires) produisent des enzymes xylanolytiques (**Collins et al., 2005 et Yang et al., 2006**), en effet, les moisissures constituent le groupe le plus intéressant à cause de leur taux de production de xylanase élevé (**Bakri, 2003**).

Les actinomycètes représentent également une importante source d'enzymes xylanolytiques, particulièrement le genre *Streptomyces* par exemple : *Streptomyces actuosus* A-151, *Streptomyces cyaneus* SN32, *Streptomyces* sp. AMT-3, *Streptomyces* sp. QG11.3 (**Wang et al., 2003 ; Ninawe et al., 2008 ; Nascimento et al., 2002 et Beg et al., 2000**).

1. GENRE *Jonesia*

La famille des **Jonesiaceae** comprend jusqu'à présent un seul genre nommé ***Jonesia*** comprenant deux espèces *Jonesia denitrificans* (**Rocourt et al., 1987**) et *Jonesia quinghaiensis* (**Schumann et al., 2004**). Le genre ***Jonesia*** qui appartient aux actinomycètes a été décrit comme producteur de xylanases selon **Boucherba et al., 2011**.

1.1. *Jonesia denitrificans*

Jonesia denitrificans est Gram positif, elle se présente sous forme d'un bâtonnet irrégulier et fin ($0,3-0,5 \times 2-3 \mu m$) (**Fig. 01**), aéroanaérobie facultative, non sporulée. Sur une gélose nutritive, elle forme des petites colonies convexes et lisses ayant un diamètre de 0,5 à 1,5 millimètre (24 à 48 h), grisâtres et translucides à opaques, devenant jaunâtres en 10 à 20 jours. Sa croissance se produit à des températures de 10 à 40°C avec un optimum à 30°C et à des concentrations de 5% de NaCl.

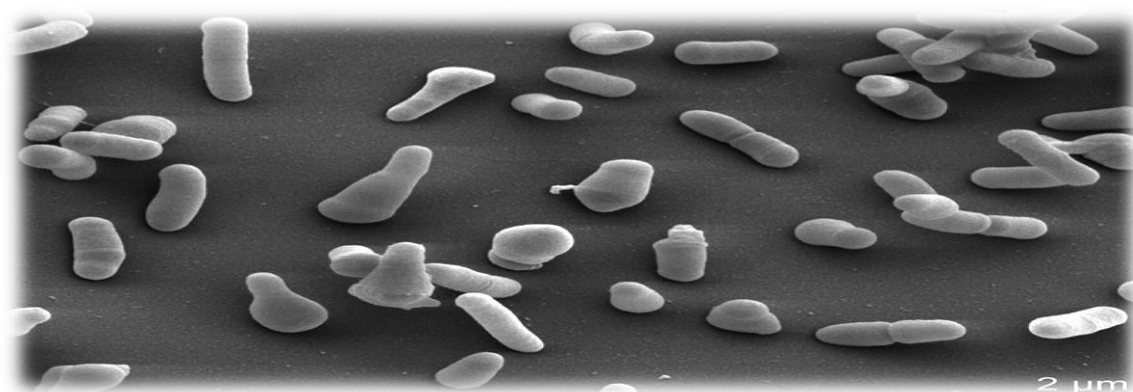


Fig. 01 : *Jonesia denitrificans* sous microscope électronique de balayage (résolution 2μm) (Pukall et al., 2009).

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

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

II. XYLANE DE BOULEAU

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

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

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

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

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

La figure ci-dessous présente la structure du xylane de bouleau.

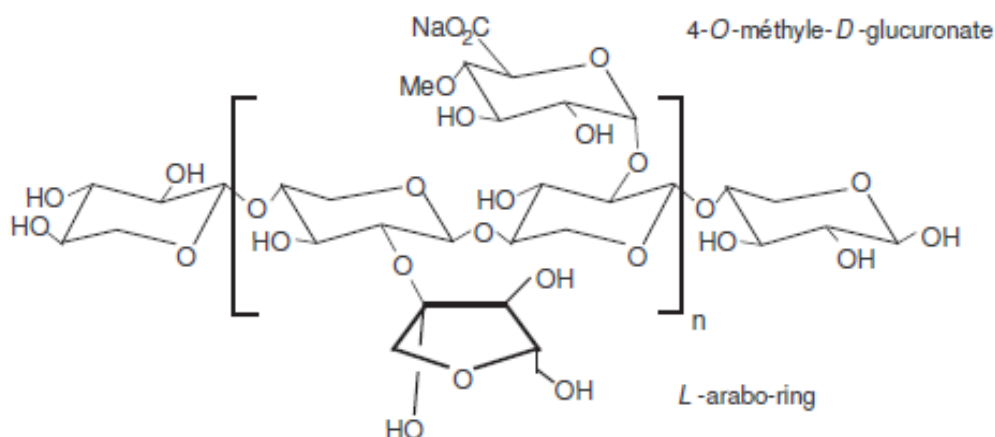


Fig. 02 : Structure du xylane de bouleau (Herring et al., 2004).

III. ENZYMES XYLANOLYTIQUES

III.1. ENZYMES DE DEGRADATION DE LA CHAÎNE PRINCIPALE

III.1.1. ENDO-B-1,4-XYLANASES (EC 3.2.1.8)

Elles catalysent la rupture de la liaison glycosidique β (1-4) reliant deux résidus xyloses de la chaîne principale des xylanes, ce qui engendre une réduction du degré de polymérisation du substrat. Le xylane n'est pas aléatoirement hydrolysé mais les liaisons sélectionnées pour l'hydrolyse dépendent de la nature du substrat tel que la longueur de la chaîne, le degré de ramification et la présence des substituants (Wong et al., 1988 ; Biely et al., 1997 et Li et al., 2000). En premier lieu, les principaux produits d'hydrolyse sont les oligomères de β -D-xylopyranosyl. A un stade plus tardif, des petites molécules comme les mono-, di- et trisaccharides de β -D-xylopyranosyl sont produites (Polizeli et al., 2005). Bien que les endoenzymes agissent seulement au niveau des séquences ininterrompues, il existe des endoxylanases qui hydrolysent la chaîne principale seulement à proximité d'une région contenant une ramification (Wong et al., 1988 et Biely et al., 1997).

Ces xylanases libèrent le substituant comme produit libre qui peut être nécessaire pour l'orientation du substrat dans le site actif. Certaines endoxylanases hydrolysent la chaîne principale après la libération de l'arabinose, ce qui explique l'existence d'endoxylanases débranchantes qui libèrent l'arabinose et des endoxylanases non

Tableau I : Caractéristiques des endoxylanases produites par le genre *Streptomyces*.

Actinomycètes	MM (KDa)	pH Optimum	T (°C) optimale	Stabilité pH, T(°C)		pI	Références
<i>Streptomyces</i> sp. EC 10	32	7-8	60	-	-	6,8	Lumba et Pennickx, 1992
<i>Streptomyces</i> sp. B-12-2	23,8-40,5	6-7	55-60	-	-	4,8-8,3	Elegir et al., 1994
<i>Streptomyces</i> T7	20	4,5-5,5	60	5	37-50	7,8	Kesker., 1992
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i> OPC-520	33, 54	7	60-70	-	-	4,2, 8	Tsujibo et al. , 1992
<i>Streptomyces chattanoogensis</i> CECT 3336	48	6	50	5-8	40-60	9	Lopez-Fernandez et al., 1998
<i>Streptomyces viridisporus</i> T7A	59	7-8	65-70	5-9	70	10,2-10,5	Magnuson et Crawford , 1997
<i>Streptomyces</i> sp. QG-11-3	-	8,6	60	5,4-9,2	50-75	-	Beg et al., 2000
<i>Streptomyces rameus</i> L2001	21,1	5,3	70	4,3-6,7	50-80	-	Li et al., 2010
<i>Streptomyces</i> sp. 7b	30	6	50	5-8	30-60	-	Bajaj et Singh, 2010
<i>Streptomyces matensis</i>	21,2	7	65	4,5-8	30-55	-	Yan et al., 2009
<i>Streptomyces actuosus</i> A-151	30,45, 26, 20	5-6,4	70 , 70, 70, 60	5-8 , 3-8,5-9, 3-9	30-60	-	Wang et al., 2003

- : non déterminé, MM : masse moléculaire, T : température et pI : point isoélectrique.

débranchantes (**Biely et al., 1997**). Concernant les actinomycètes, la majorité des endoxylanases sont produites par le genre *Streptomyces* (**Tableau I**). Elles possèdent des poids moléculaires qui varient de 15 à 150 KDa, des activités optimales à des pH variant de 4 à 9 et des températures qui oscillent de 50 à 80°C.

III.1.2. β -XYLOSIDASES (EC 3.2.1.37)

Ce sont des exoglycosidases qui hydrolysent les xylo-oligosaccharides à partir de leur extrémité réductrice, l'affinité au substrat diminue avec l'augmentation de la longueur de la chaîne des xylo-oligosaccharides (**Van Doorslaer et al., 1985**). Le substrat préférentiel des β -xylosidases est le xylobiose. Cependant, de rares exemples de β -xylosidases libèrent très lentement du xylose à partir du xylane (**Dekker et Richards, 1976**).

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

III.2. ENZYMES DE DEGRADATION DE LA CHAÎNE LATÉRALE

- α -L-ARABINOFURANOSIDASES (EC 3.2.2.55)

Elles hydrolysent le groupement α -L-arabinofuranosyl des arabinanes, des arabinogalactanes et des arabinoxylanes (**Kaji, 1984**).

- α -D-GLUCURONOSIDASES (EC 3.2.1.139)

Ce sont des exo-enzymes, capables de couper les liaisons α -1,2 entre l'acide glucuronique (ou son dérivé 4-O-méthylé) et le xylose de la chaîne principale qui le porte.

- ACETYL ESTERASES (EC 3.1.1.6)

Elle libèrent des groupements acétyls liés en position C-2 ou C-3 d'un xylose, elles sont efficaces sur des xylo-oligosaccharides, ces enzymes associées à des endoxylanases conduisent à une action synergique (**Blum et al., 1999**).

- FERULOYL ESTERASES (EC 3.1.1.73)

Elles sont capables de libérer l'acide férulique estérifié à l'arabinose. Les féruloylestérases agissent préférentiellement sur des substrats de petite taille (**Mac Kenzie et Bilous 1988**).

La figure N° 03, résume les différents sites d'actions des différentes xylanases.

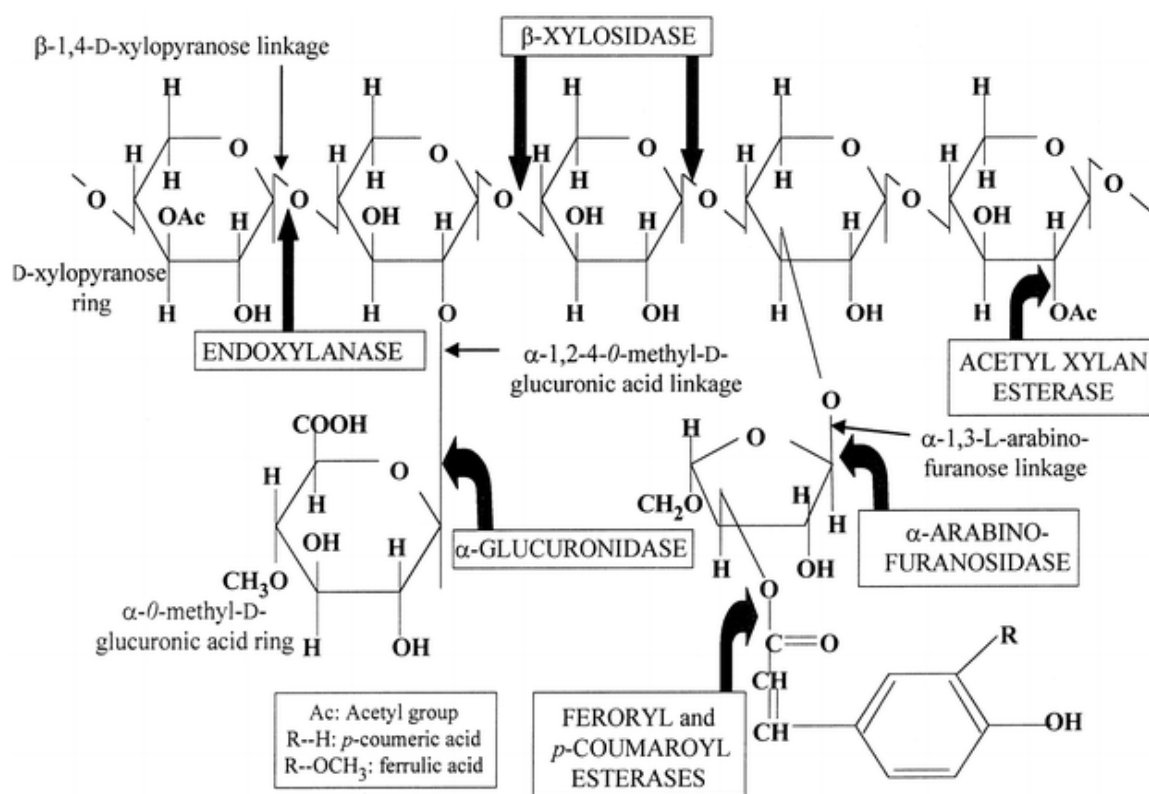


Fig. 03 : Structure hypothétique du xylane montrant les différents sites d'attaque des xylanases microbiennes (**Beg et al., 2001**).

IV. CLASSIFICATION DES XYLANASES

Wong et al., 1988 classaient les xylanases sur la base de leurs propriétés physicochimiques en deux groupes : celles de faible poids moléculaire (< 30 kDa) et de point isoélectrique (pI) basique et celles de grand poids moléculaire (> 30 kDa) et de pI acide. Un système de classification plus complet permettait la classification des xylanases et des glycosidases en général par la comparaison des structures primaires de leurs domaines catalytiques. Ce système regroupait les xylanases en six familles (de A à F), 96 familles de glycosidase ont été identifiées (**Collins et al., 2005**).

De ce système de classification, les xylanases font partie des familles 10 (autrefois F) et 11 (autrefois G). Des enzymes ayant des activités xylanases ont été aussi trouvées dans les familles 5, 7, 8, 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. Certaines séquences rapportées dans les familles 16, 52 et 62 sont des enzymes bifonctionnelles contenant deux domaines catalytiques : le domaine des familles 10 ou 11 aussi bien qu'un deuxième domaine de glycosidases (**Assamoi et al., 2009**).

V. PRODUCTION DES ENDOXYLANASES PAR LES ACTINOMYCETES

Les endoxylanases des actinomycètes sont produites essentiellement par le genre *Streptomyces* : *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 (Ding et al., 2004), *Streptomyces viridosporus* T7A (Timothy et al., 1997), *Streptomyces livdans* 66 (Kluepfel et al., 1990) et *Streptomyces cyaneus* SN32 (Suchita et al., 2007). La production chez les actinomycètes est généralement associée à la croissance. Cependant quelques rares exceptions ont été rapportées, c'est le cas de la souche *Streptomyces sp.* AMT-3 dont la production des xylanases n'est pas associé à la croissance (Lodha et al., 1989).

La production de xylanase par *Jonesia denitrificans* BN13 augmente progressivement pour atteindre une valeur maximale de 10,80 U/ml à 35 h (Boucherba et al., 2011). 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).

VI. APPLICATIONS INDUSTRIELS DES XYLANASES

L'application la plus réponde est la bioconversion du xylane en xylose qui sera fermenté par *Saccharomyces cerevisiae* pour produire du bioéthanol, carburant vert fabriqué à partir de la biomasse végétale, la deuxième application concerne l'industrie papetière, le prétraitement de la pulpe avec la xylanase améliore la viscosité et l'extensibilité.

Les fibres du papier sont plus accessibles pour le blanchissement chimique réduisant ainsi la consommation du chlore et le besoin en d'autres agents chimiques. Par conséquent la pollution de l'environnement par les effluents de l'industrie papetière est considérablement réduite. Un nombre important de firmes Européennes, Américaines et Japonaises utilisent la xylanase dans le blanchissement : Pulpsyme HA, introduite par NOVO NORDISK ; Le Canada est un gros producteur de pulpe blanchie, qui utilise le procédé enzymatique (Dhiman et al., 2008).

En plus des applications citées plus haut, d'autres utilisations existent :

- ✚ La xylanase en association avec l'amylase est capable d'améliorer la qualité et le volume du pain (Maat et al., 1992) ;
- ✚ Les xylanases combinées aux enzymes pectinolytiques sont utilisées pour la clarification des jus, la liquéfaction des fruits, le traitement des fibres comme le lin et le chanvre (Biely, 1985).

- ✚ Le traitement des fourrages avec les xylanases augmente leur digestibilité chez les ruminants (**Gilbert et Hazlewood, 1993**) ;
- ✚ L'incorporation des xylanases dans la ration de nourriture des poulets d'élevage réduit la viscosité intestinale, ce qui améliore le gain de poids et l'efficacité de la conversion des rations alimentaires (**Bedford et Classen, 1992 et Vanparidon et al., 1992**).

VII. SYSTEME A DEUX PHASES AQUEUSES (SDPA)

VII.1. GENERALITES SUR LES SYSTEMES A DEUX PHASES AQUEUSES

Le système à deux phases aqueuses (SDPA), est une méthode d'extraction liquide-liquide qui emploie deux phases aqueuses, il a été introduit par **Albertsson** en **1986**, utilisé pour la séparation et la purification du matériel biologique. La purification recouvre 70% du processus de traitement en aval des biomolécules (**Belter et Cussler, 1988**), d'où la nécessité de recourir à des méthodes simples et à faibles coût pour purifier ces biomolécules. Les méthodes conventionnelles de purification de biomolécules impliquent plusieurs étapes pour une unité d'opération, d'où le coût élevé de celles-ci et la perte, en général, d'une grande quantité de la molécule cible (**Albertsson, 1986**).

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

Le SDPA présente de nombreux avantages :

- ✓ Technique simple (présence de plus de 80% d'eau dans les deux phases) ;
- ✓ Une séparation rapide avec peu de dénaturation (les composants organiques volatils ne sont pas utilisés) ;
- ✓ Le transfert de masse est rapide (tension interfaciale faible) ;
- ✓ La séparation est sélective (un partage selon l'affinité) (**Raja et al., 2011**).

Deux grands types de SDPA sont disponibles ; le système polymère/polymère (par exemple ; polyéthylène glycol/Dextrane) et le système polymère/sel (par exemple ; polyéthylène glycol/phosphate) et lorsque les concentrations limites sont dépassées, deux phases aqueuses non miscibles sont formées. Les concentrations limites dépendent du type des composants qui forment la phase, du pH, de la force ionique et de la température de la solution. Le polyéthylène glycol (PEG) est utilisé comme premier choix dans le SDPA, car il est disponible à faible coût et forme un système à deux phases avec d'autres polymères neutres ainsi qu'avec des sels, il peut significativement améliorer le repliement des protéines pour les réactiver. En raison du coût élevé et de la viscosité élevée du système polymère/polymère, il est préférable d'utiliser le système polymère/sel (**Cleland, 1992**).

VII.2. PROPRIETES DU SYSTEME DE PHASES

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

Dans la figure 04, la courbe binodale (**TCB**) divise la région des concentrations des composants qui forment deux phases aqueuses non miscibles (au-dessus de la courbe) de celle qui forme une seule phase (au-dessous de la courbe). Les trois systèmes X, Y et Z diffèrent dans leurs compositions initiales et dans le ratio volumique, cependant, ils ont tous la même composition dans la phase supérieure (PS) (T_{PEG} , T_{Sel}) et dans la phase inférieure (PI) (B_{PEG} , B_{Sel}) en équilibre, c'est parce qu'ils sont alignés sur la même ligne de jonction (**TB**) ; dont les extrémités déterminent les compositions des phases en équilibre et se situent dans une courbe convexe appelée la courbe binodale.

Cette courbe représente la séparation entre les deux phases non miscibles. Les données binodales sont nécessaires pour la conception de procédés d'extraction par des SDPAs et le développement de modèles qui permettent de prévoir le partitionnement des biomolécules. La longueur de la ligne de jonction (LLJ) présente des unités de pourcentages en masse/masse (% m/m), de même que les concentrations des composants, elle est reliée à la masse des phases par l'équation :

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

Dans laquelle : **V_s** : Volume de la phase supérieure (**s**) ; **ρ_s** : Densité de la phase supérieure ; **V_i** : Volume de la phase inférieure (**i**) ; **ρ_i** : Densité de la phase inférieure ; **XB** et **XT** sont les longueurs des segments de la ligne de jonction.

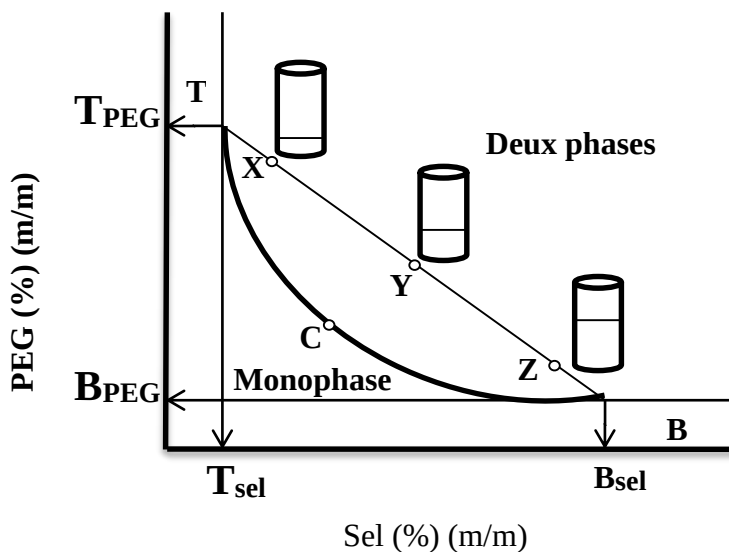
LLJ et la pente de la ligne de jonction (PLJ) peut être liée à la composition de la phase d'équilibre comme suit:

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

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

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

Puisque les lignes de jonction diminuent dans la longueur, donc, elles s'approchent finalement d'un point critique (C) sur la courbe binodale, où le LLJ=0. Au niveau de ce point ; la composition et le volume des deux phases est théoriquement égal (**Raja et al., 2011**).



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

Fig. 04 : Courbe binodale (Raja et al., 2011).

VII.3. EXTRACTION EN BATCH

L'une des procédures les plus simples de cette technique est l'extraction en batch en une seule étape. Le système de phase est préparé et le mélange à séparer est ajouté. Après mélange, la séparation des phases est effectuée soit par décantation ou par centrifugation. Les phases sont séparées et analysées ou utilisées pour récupérer les composants séparés du mélange initial. Comme le montre la **Figure N° 05**, le produit cible doit être concentré dans l'une des phases et les contaminants dans l'autre phase. Dans de nombreux cas, la récupération et la concentration du produit, avec des rendements supérieurs à 90% peuvent être réalisées en utilisant une seule étape d'extraction. Quand une seule étape d'extraction ne donne pas une récupération suffisante, des extractions répétées peuvent être effectuées en cascades. Quand des biomolécules brutes sont ajoutées à ces mélanges, elles se répartissent entre les phases ; en choisissant des conditions appropriées, des fragments de cellules peuvent se limiter à une seule phase et la répartition des biomolécules cibles dans l'autre phase. Le partitionnement des biomolécules entre les phases dépend principalement de la relation d'équilibre du système (**Doran, 2005**). Le coefficient de partage est défini comme suit : $K = C_{AS} / C_{AI}$ (4) où C_{AS} est la concentration à l'équilibre du composant A dans la phase supérieure et C_{AI} est la concentration à l'équilibre de A dans la phase inférieure (**Raja et al., 2011**).

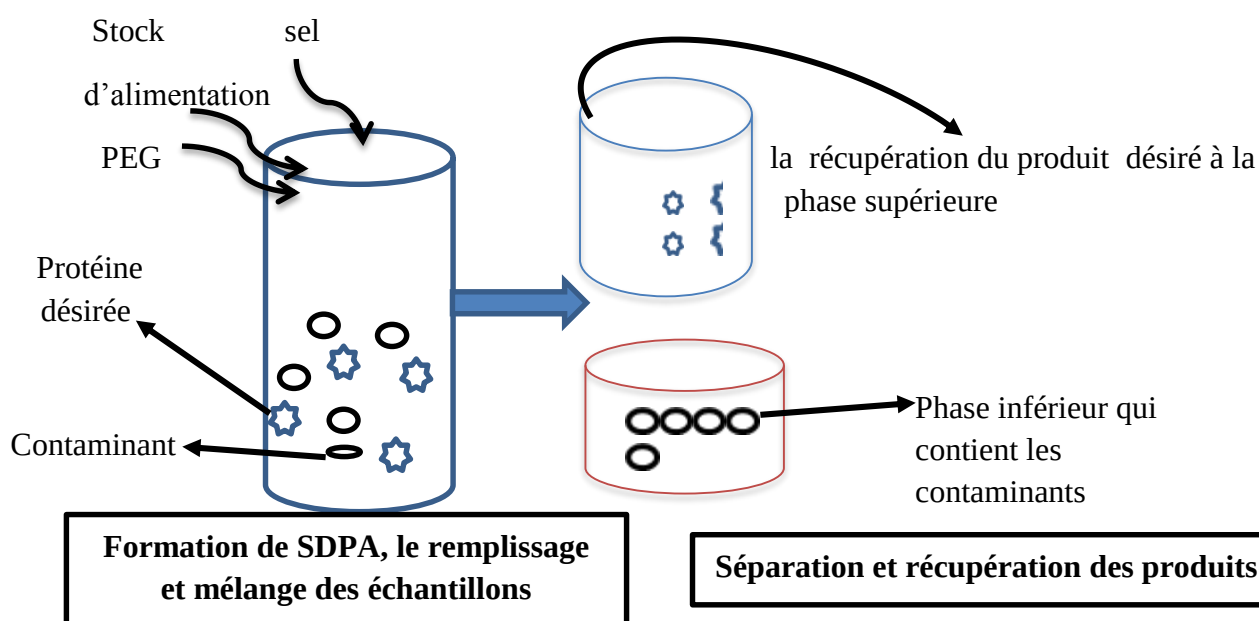


Fig. 05 : Extraction en batch (**Raja et al., 2011**).

VIII. FACTEURS INFLUENÇANT LE PARTAGE DES BIOMOLÉCULES DANS UN SDPA

1. POIDS MOLECULAIRE DU POLYMERE

La masse moléculaire du polymère utilisé influence sur le partitionnement des biomolécules. Plus le poids moléculaire du polymère est élevé, plus la concentration du polymère requise pour la séparation des phases est faible. Avec l'augmentation de la concentration du polymère, il y aura une augmentation de la densité, de l'indice de réfraction et de la viscosité entre les phases. Avec l'augmentation de la masse molaire du PEG, les courbes binodales se décalent vers l'origine (**Babu et al., 2008**).

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

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

- ✓ Si le poids moléculaire du PEG est plus faible, la tension inter-faciale est plus faible entre les deux phases (**Johansson, 1985**) ;
- ✓ Si la concentration en sel est élevée, la force ionique augmente dans la phase inférieure ce qui améliore la partition des biomolécules dans la phase supérieure (**Johansson, 1985**) ;
- ✓ Si la concentration de PEG est élevée, le nombre de motifs polymériques impliqués dans la séparation des biomolécules également augmente, le partitionnement des biomolécules sera dans la phase PEG en raison de l'interaction hydrophobe entre la biomolécule et le **PEG** (**Tello et al., 1994**).

2. pH

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

négativement préfère la phase supérieure et le coefficient de partage augmente (**Asenjo et al., 1994**).

3. PRESENCE DE SELS NEUTRES

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

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

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

IX. APPLICATIONS DU SDPA

1. FERMENTATION EXTRACTIVE

La fermentation extractive a été développée pour éviter l'inhibition du produit final, il s'agit d'une technique qui implique la combinaison du SDPA comme première étape pour la récupération d'un produit à partir du bouillon de fermentation et puisque le produit est retiré en continu, son inhibition peut être évitée (**Raja et al., 2011**).

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

2. RECUPERATION DES COPRODUITS A PARTIR DES EAUX USEES

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

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

La même équipe a étudié la récupération des protéines soluble en utilisant un SDPA composé de PEG/sel du sulfate et elle a conclu que le PEG 6000/sulfate de sodium était mieux que le PEG6000/sulfate d'ammonium. Dans ce cas, ils ont réussi à récupérer 92,75% des protéines solubles à partir des eaux usées.

Rao et Nair (2011) ont utilisé un SDPA composé de PEG/PAA pour récupérer les glycosaminoglycanes (GAG) à partir des eaux usées de tanneries. Ils ont constaté que le système de PEG 4000/PAA (54,7% LLJ, pH 8, 20°C) donnait un taux de récupération de 91,5%.

MATERIEL ET METHODES

I. MATÉRIEL

I.1. APPAREILLAGES ET REACTIFS CHIMIQUES

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

I.2. MATÉRIEL BIOLOGIQUE

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

II. MÉTHODES

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

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

II.2. PRÉPARATION ET ENSEMENCEMENT DES MILIEUX MM7 LIQUIDES

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

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

II.3. MÉTHODES ANALYTIQUES

II.3.1. MESURE DE LA BIOMASSE

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

II.3.2. MESURE DE L'ACTIVITE XYLANASIQUE

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

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

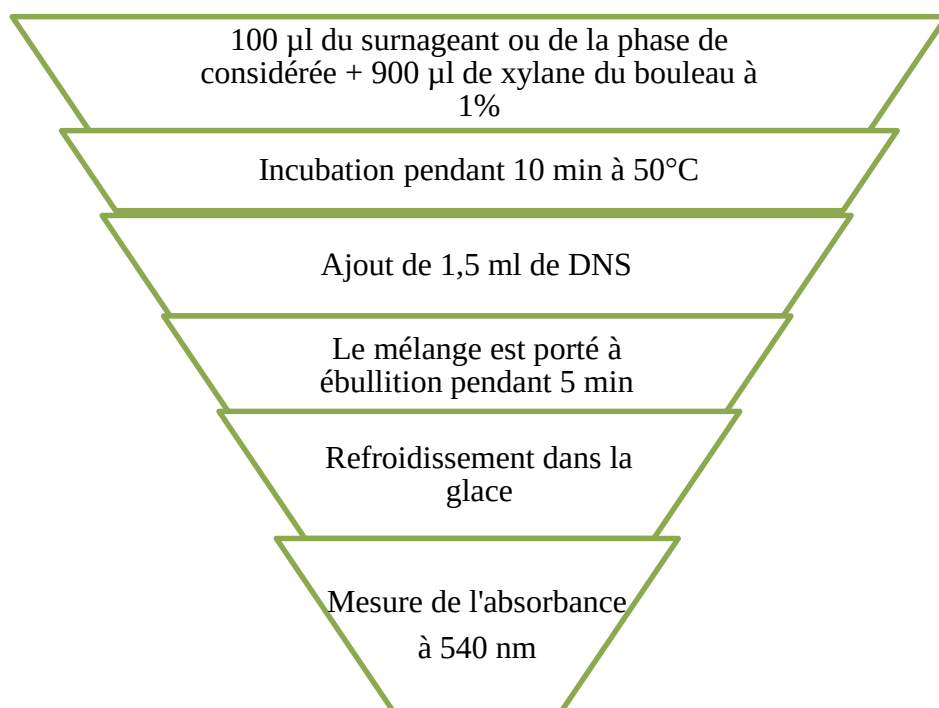


Fig. 06 : Test d'activité xylanase (**Miller, 1959**).

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

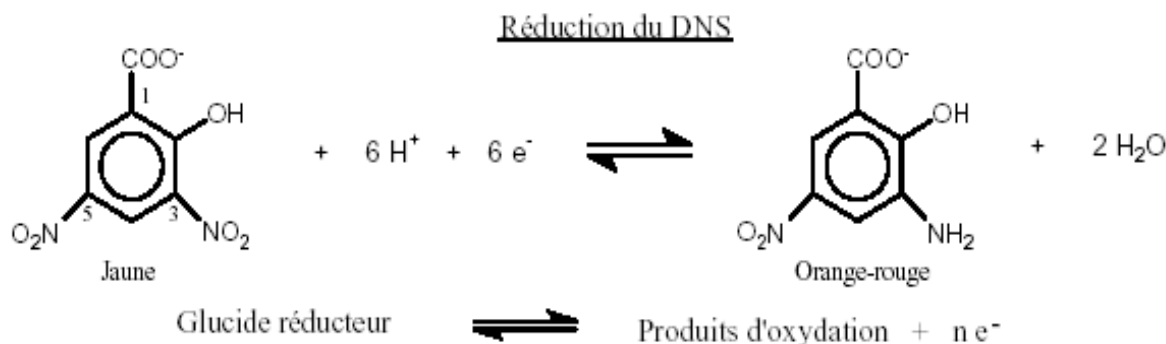


Fig. 07 : Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS (**Bailey et al., 1992**).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

D : facteur de dilution.

t : temps d'incubation (minutes).

II.3.3. DOSAGE DES PROTEINES

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

a- MACROMETHODE

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

Les concentrations protéiques sont calculées à partir de la courbe d'étalonnage utilisant l'albumine de sérum bovin comme standard (**Voir Tableau III**). (**Bradford, 1976**).

Gamme étalon :

Solution mère de BSA à 1mg/ml

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

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

b- MICROMETHODE

Cette technique permet de doser des quantités de protéines comprises entre 2 et 10 µg/ml. Le dosage consiste à ajouter 800µl d'échantillon, dilué 7 fois, à 200µl de réactifs de Bradford. Le mélange, après homogénéisation, est ensuite placé 5 min à l'obscurité, et la densité optique est mesurée à 595 nm (**Voir Tableau IV**). (**Bradford, 1976**).

Gamme étalon : Solution mère de BSA à 10 µg/ml

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

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

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

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

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

Les systèmes SDPAs sont préparés à différentes concentrations de PEG 6000 (Prolabo), 13% KH_2PO_4 (m/v) et 0,1 M NaCl (**Voir Tableau V**) avec 20ml du milieu de culture ensemencé, agité et ajusté à pH 7, puis laisser décanter dans des ampoules à décanter.

Le meilleur SDPA obtenue pour la séparation a été ajusté à différentes valeurs de pH 6 et 8, le système à pH 6 est ajusté par le monophosphate disodique (Na_2HPO_4) et le système à pH 8 est ajusté par le Tris.

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

Tableau V : Préparation des SDPAs.

PEG6000 (m/v)		KH_2PO_4 (m/v)		NaCl (M)	
(%)	Masse (g)	(%)	Masse (g)	(M)	Masse (g)
10	2,338	13	3,049	0,1	0,11
12	2,8	13	3,049	0,1	0,11
13	3,27	13	3,049	0,1	0,11
14	3,5	13	3,049	0,1	0,11
15	3,04	13	3,049	0,1	0,11

V. DIALYSE

1. Principe

La dialyse est une méthode d'échanges entre deux solutions, le liquide à dialyser passe à travers une membrane semi-perméable. Cette dernière est poreuse ce qui permet le passage

des molécules d'eaux et des solutés de petit poids moléculaire. Les solutés de poids moléculaire très élevé (par exemple les protéines) ne peuvent traverser la membrane (**Simon, 2007**).

2. Méthodologie

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

Les étapes de la dialyse sont résumées comme suit :

La phase contenant l'enzyme (11 ml) a été versé dans une membrane préalablement lavée avec de l'eau distillée, les deux bouts de ce boudin sont fermés avec un fil de pêche.

Le boudin est placé dans un bécher contenant 500 ml du liquide de contre dialyse (Tampon phosphate à 50mM à pH 7) sous agitation pendant 1h30.

VI. MESURE DES DIFFERENTS PARAMETRES

• COEFFICIENT DE PARTAGE (K)

Le coefficient de partage de la xylanase est défini comme :

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

Où U_{sup} et U_{inf} sont l'activité enzymatique dans la phase supérieure et inférieure, respectivement d'après (**Li et al., 2011**).

• LE RATIO VOLUMIQUE (R)

Le ratio volumique de phase est défini comme :

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

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

• MESURE DU RENDEMENT (%)

Le rendement de la xylanase en phase supérieure est défini comme

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

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

- **FACTEUR DE PURIFICATION (FP)**

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

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

C'est l'activité enzymatique de la phase considéré / l'activité enzymatique du milieu de culture (Li et al., 2011).

- **RATIO DE CONCENTRATION (RC)**

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

VII. SDS-PAGE ET ZYMOGRAMME

Dans le but de voir le profil des protéines de la phase considérée et afin de visualiser l'activité xylanasiq dans le gel de séparation, nous avons choisi la technique SDS-PAGE de (Laemmli, 1970) et la technique du zymogramme (Gallardo et al., 2004). Le dispositif d'électrophorèse (Mini Protean II BIORAD) (Fig. 08) utilisé est conçu pour les mini gels, il s'agit d'une cuve et d'une panoplie d'accessoires (peigne, espaceurs et un dispositif pour couler le gel).



Fig. 08: Cuve et accessoires du dispositif d'électrophorèse (Mini Protean II, BIORAD).

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

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

La réaction de polymérisation est initiée par addition de 70µl de persulfate d'ammonium à 10% puis accélérée par ajout de 20 µl 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 II)** est coulé au-dessus du gel de séparation, un peigne est immédiatement inséré, au moment de l'emploi le peigne est retiré et les puits sont lavés avec du tampon d'électrophorèse **(Annexe II)**.

L'échantillon et les marqueurs sont préparés de la manière suivante : 150µl de la phase considérée sont mélangés avec 40µL du tampon d'échantillon **(Annexe II)**. Suivi d'un chauffage à 100°C pendant 5 min.

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

Le courant électrique est véhiculé par le tampon d'électrophorèse, la migration se fait à 80 (V) dans le gel de concentration et 150 (V) dans le gel de séparation, 11 milli ampère (mA) pendant 5h jusqu'à ce que le bleu de bromophénol soit à 3 cm du bord inférieur de la plaque.

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

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

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

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

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

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

R_f = distance parcourue par la protéine (cm) / distance de migration du bleu de bromophénol (cm)

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

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

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

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

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

I. REPIQUAGE DE LA SOUCHE *Jonesia denitrificans* BN13

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

La production de xylanases extracellulaires se traduit par la formation de zones claires autour des colonies (**Fig. 09**). Ces zones sont dues à la dégradation du xylane de bouleau par les xylanases.

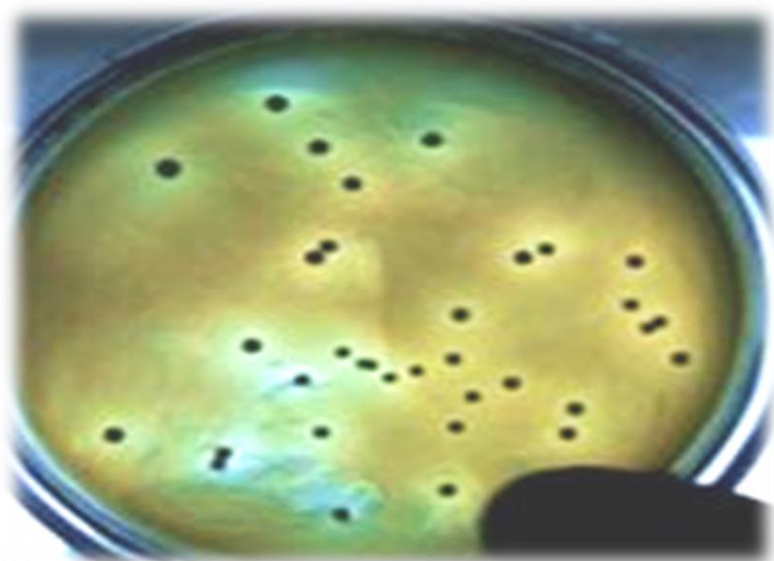


Fig. 09 : Colonies de *Jonesia denitrificans* BN13 entourées de zones d'hydrolyse du xylane de bouleau (**Boucherba, 2011**).

II. RESULTATS DES METHODES ANALYTIQUES

L'activité xylanolytique ainsi que la quantification des protéines sont calculées à partir des courbes d'étalonnages (**Fig. 10, 11 et 12**) illustrées ci-dessous. Ces courbes nous ont permis de calculer la concentration du xylose dans les milieux, ainsi que l'activité de la xylanase et de calculer aussi la concentration des protéines et donc l'activité spécifique.

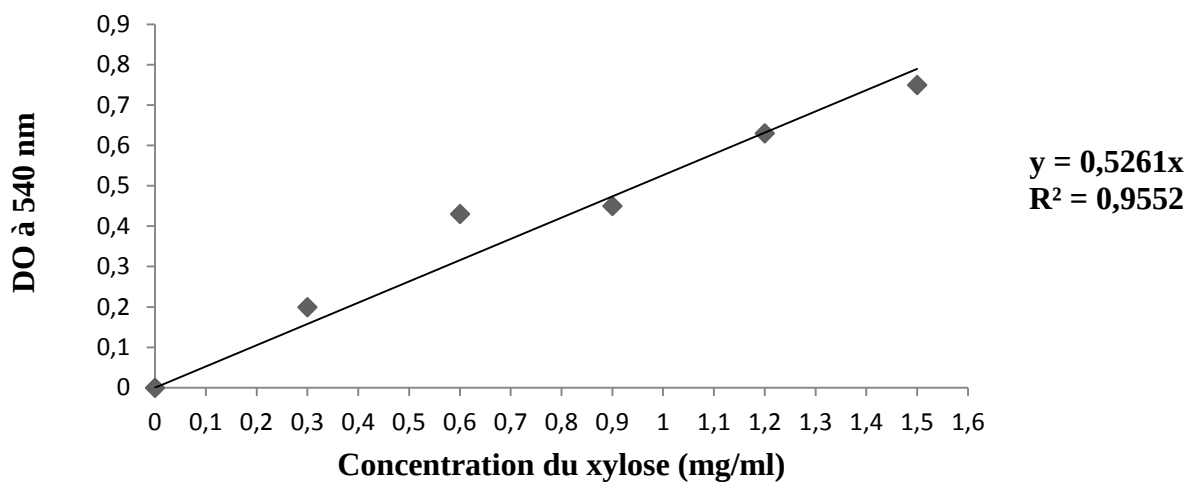


Fig. 10 : Courbe d'étalonnage des sucres réducteurs.

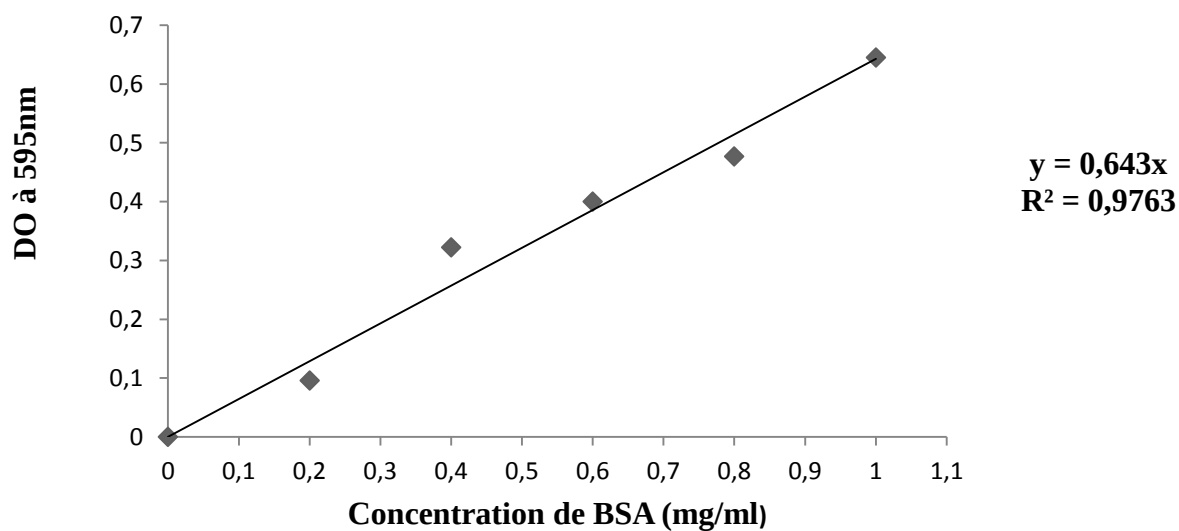


Fig. 11 : Droite de dosage des protéines par la macrométhode.

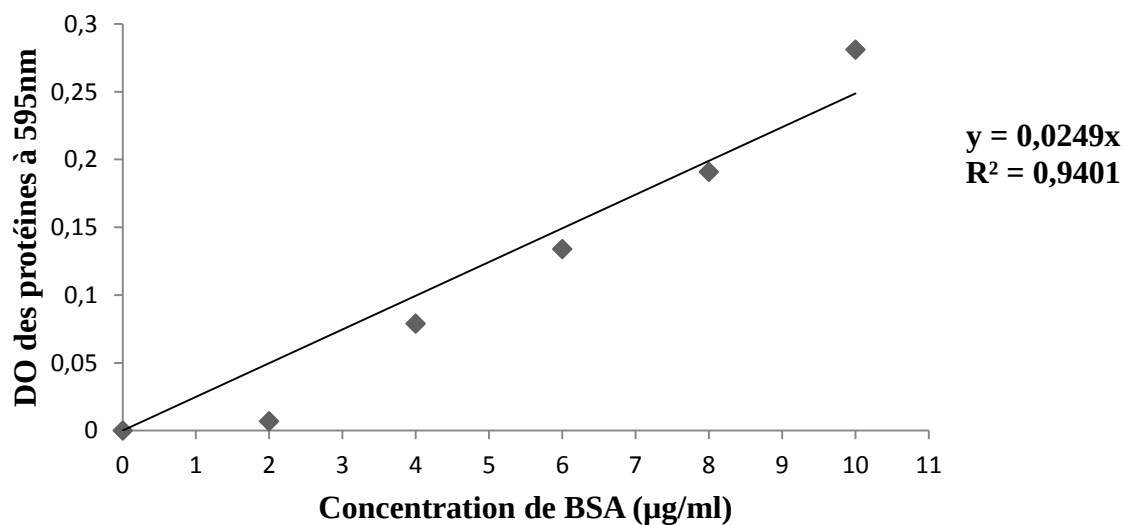


Fig. 12 : Droite de dosage des protéines par la microméthode.

III. CINETIQUE DE CROISSANCE ET PRODUCTION DE XYLANASES

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

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

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

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

avec une absorbance de 1,162 et continue d'augmenter jusqu'à atteindre une valeur de 1,618 au bout du 7^{ème} jour et la fermentation a été arrêtée.

D'après **Boucherba et al., 2011**, la souche *Jonesia denitrificans* BN13, sous des conditions optimales de croissance (agitation à 100 rpm), se développe au bout de 48 heures d'incubation à 37°C.

Le profil de la croissance obtenu dans la figure 13 correspond à la plupart des courbes de croissance des microorganismes avec la présence des différentes phases à commencer par la phase de latence jusqu'à la phase stationnaire (la phase de déclin n'est pas montrée dans la figure). Ce profil correspond à la courbe de la cinétique de croissance de *Jonesia denitrificans* BN13 obtenu par **Boucherba et al., (2011)**.

Les protéines solubles augmentent avec la croissance et présentent une cinétique similaire.

Après centrifugation des milieux MM7 liquidesensemencés, les surnageants obtenus font l'objet d'un test d'activité xylanolytique.

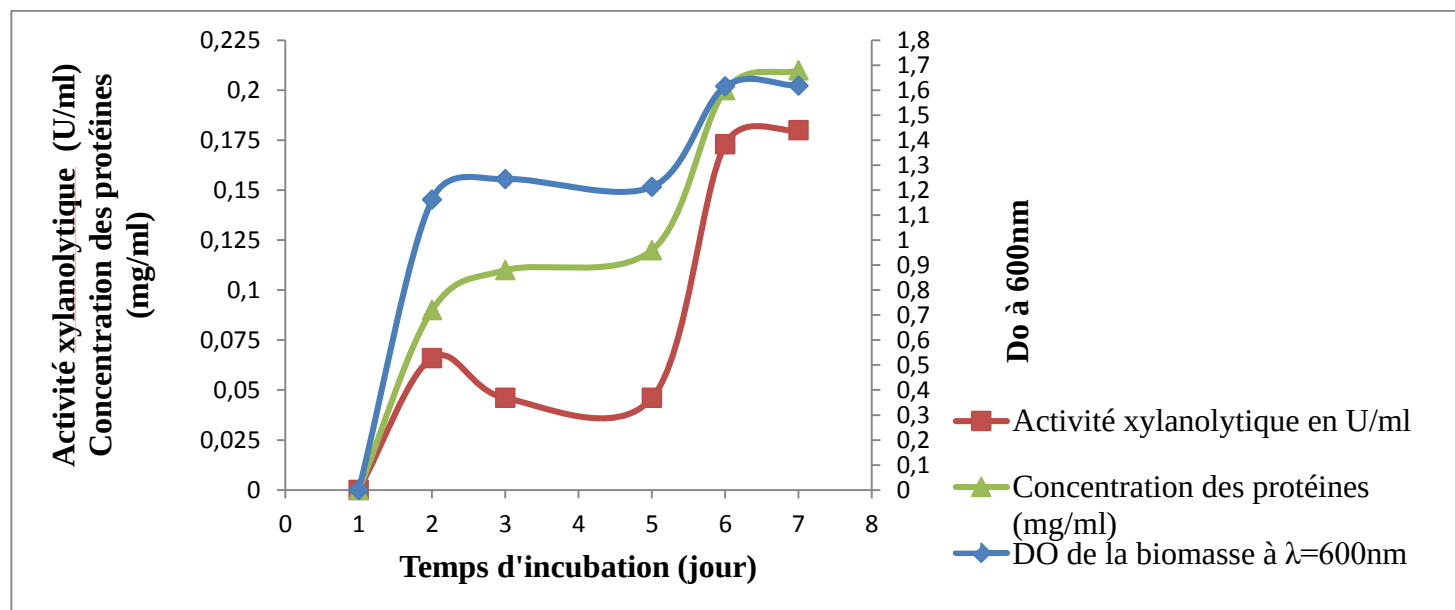


Fig. 13 : Cinétique de croissance et de production de xylanases chez *Jonesia denitrificans* BN13.

La production des xylanases est indiquée par l'activité xylanolytique qui augmente graduellement (avec une diminution légère au 3^{ème} jour), mais continue d'augmenter au 5^{ème}

jour jusqu'au 7^{ème} jour, où elle atteint son maximum (**0,180 U/ml**). Ce résultat concorde avec les résultats des travaux de **Duarte et al. en 1999**.

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

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

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

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

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

Les préparations de xylane peuvent être différentes les unes des autres selon le type et le degré de substitutions qui influence l'activité xylanase mesurée. Le test d'activité, notamment le dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS donne des activités apparentes faibles par rapport à la méthode de Somogyi-Nelson (**Royer et Nakas, 1989**). La comparaison de nos résultats avec les autres travaux doit tenir compte des conditions de travail (présence d'éventuels contaminants) et de la concentration du substrat et si on compare ces résultats avec ceux obtenus par **Boucherba et al., (2011)** sur la même souche, on trouve que l'activité des xylanases du présent travail est beaucoup plus faible, ce résultat peut être expliqué par l'absence d'un Shaker pendant la fermentation mais aussi les repiquages

successifs qui ont conduit peut être à d'éventuelles mutations et ainsi à la diminution de l'activité xylanolytique, ce qui a amené à une diminution du rendement de notre souche.

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

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

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

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

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

Les résultats de la spécificité des xylanases vis-à-vis des différents substrats sont représentés dans la figure 14 ci-dessous.

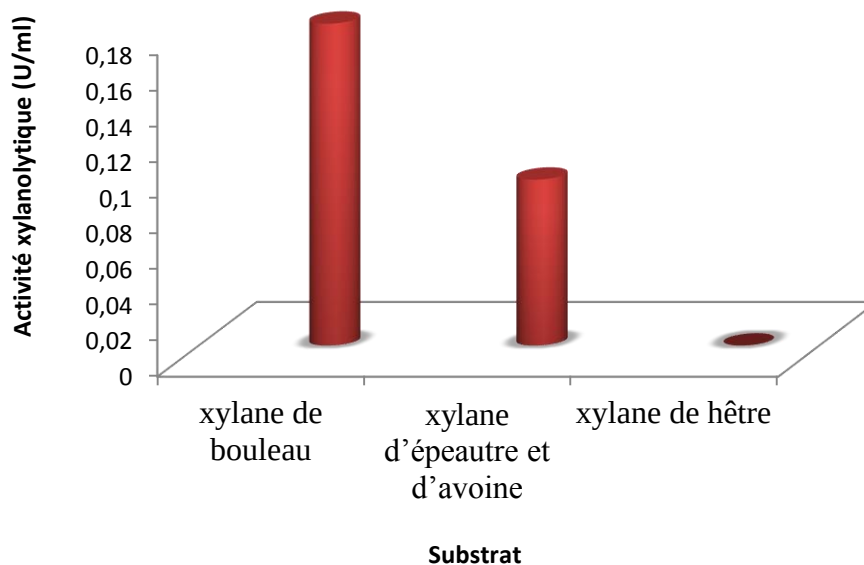


Fig. 14 : Histogramme représentant la spécificité des xylanases vis-à-vis de 03 substrats : le xylane de bouleau, le xylane d'épeautre et d'avoine et le xylane de hêtre.

Les xylanases de *Jonesia denitrificans* BN13 ne dégradent que le xylane de bouleau et le xylane d'épeautre et d'avoine parmi les trois substrats testés, mais avec une activité plus élevée pour le xylane de bouleau (**0,18 U/ml**), et moindre pour le xylane d'épeautre et d'avoine (**0,093 U/ml**). Aucune activité n'a été détectée vis-à-vis du xylane de hêtre, ce qui est probablement dû au fait que le substrat contient des groupements latéraux qui empêchent l'accès de la xylanase aux liaisons B 1-4 de la chaîne principale du xylane.

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

Après décantation du mélange (20 ml du milieu MM7 liquideensemencé/SDPA), deux phases sont obtenues : la phase supérieure (PS) et la phase inférieure (PI), comme l'indique la **figure 15** ci-dessous.

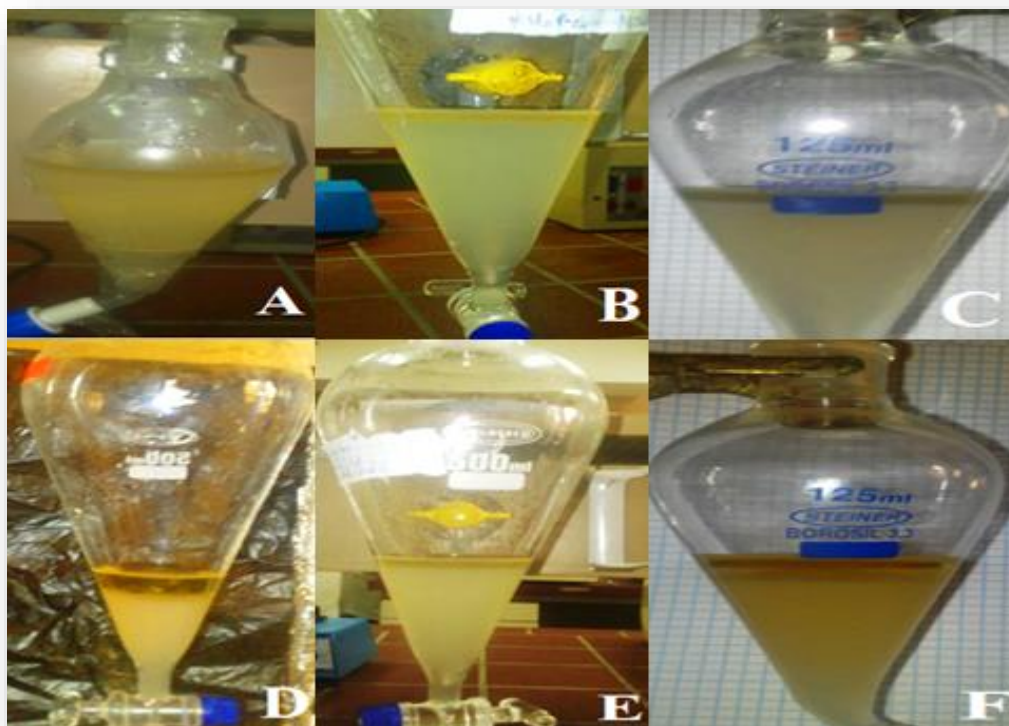


Fig. 15 : Présentation des phases des différents systèmes.

(A) : 12% PEG/13% KH_2PO_4 / 0,1 M NaCl, à pH 7.

(B) : 13% PEG/13% KH_2PO_4 / 0,1 M NaCl, à pH 7.

(C) : 14% PEG/13% KH_2PO_4 / 0,1 M NaCl, à pH 7.

(D) : 15% PEG/13% KH_2PO_4 / 0,1 M NaCl, à pH 6.

(E) : 15% PEG/13% KH_2PO_4 / 0,1 M NaCl, à pH 7.

(F) : 15% PEG/13% KH_2PO_4 / 0,1 M NaCl, à pH 8.

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

Tableau VIII : Volumes des phases des différents systèmes.

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

A partir de ce tableau, on constate que le volume initial du milieu de culture qui était de 20 ml est réduit à 8 ml dans la phase supérieure du 2^{ème} système (PEG 12%/13% KH_2PO_4 /0,1M NaCl à pH 7), soit une concentration de 2,5 fois, ce qui peut être obtenu par une ultrafiltration sur membrane, qui est une technique coûteuse à l'échelle industrielle et qui présente de nombreux inconvénients citons ; le colmatage et la mauvaise répartition des pores de membrane ce qui induit généralement à des pertes de xylanases contrairement au SDPA qui concentre toutes les xylanases présentes dans le système.

Dans le 6^{ème} système (PEG 15%/ 13% KH_2PO_4 /0,1M de NaCl à pH 6), le volume initial du milieu de culture est concentré 2,85 fois.

La séparation de phases n'est pas observée dans le 1^{er} système (10% PEG/13% KH_2PO_4 /0,1M NaCl à pH 7), ceci est dû au fait que la concentration du PEG nécessaire pour la séparation n'est pas atteinte et qui en retour dépend de la concentration du sel (KH_2PO_4) dans le système. Ce résultat est expliqué à partir de la courbe binodale qui divise le graphe en deux régions où on a une seule phase dans la région inférieure et deux phases dans la région supérieure. Donc, on peut dire que la concentration de 10% du PEG n'est pas suffisante pour atteindre la région supérieure de la courbe binodale. De ce fait sa concentration dépend de la concentration du sel, ces deux paramètres permettent une meilleure séparation des phases, une concentration faible du sel est nécessaire lorsqu'une concentration élevée du PEG est utilisée (Ratanapongleka, 2010).

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

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

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

b. LA SEPARATION DES DEUX PHASES AQUEUSES

Le partitionnement des xylanases dans les différentes phases sous différentes conditions est étudié.

Le tableau ci-dessous donne l'ensemble des résultats obtenus à savoir l'activité xylanolytique (A_x), l'activité spécifique (A_{sx}), le facteur de purification (FP), la récupération de l'enzyme (RE), le coefficient de partage (K), le ratio volumique (R), le rendement (Y) et le ratio de concentration (RC).

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

L'addition des sels dans le SDPA peut avoir une influence significative dans le partitionnement des molécules chargée tel que les protéines (**Albertson, 1986**). Cela n'a pas été démontré dans notre étude.

L'ajout de NaCl dans le système améliore la purification et la récupération de l'enzyme.

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

Tableau IX : Récapitulatif des résultats obtenus après SDPA (PEG 6000/KH₂PO₄/ NaCl).

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

1^{er} système : 10% PEG/13% KH₂PO₄/ 0,1 M NaCl, à pH 7.

2^{ème} système : 12% PEG/13% KH₂PO₄/ 0,1 M NaCl, à pH 7.

3^{ème} système : 13% PEG/13% KH₂PO₄/ 0,1 M NaCl, à pH 7.

4^{ème} système : 14% PEG/13% KH₂PO₄/ 0,1 M NaCl, à pH 7.

5^{ème} système : 15% PEG/13% KH₂PO₄/ 0,1 M NaCl, à pH 7.

6^{ème} système : 15% PEG/13% KH₂PO₄/ 0,1 M NaCl, à pH 6.

7^{ème} système : 15% PEG/13% KH₂PO₄/ 0,1 M NaCl, à pH 8.

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

L'activité spécifique (A_{SX}) nous informe sur la pureté des xylanases. Les activités xylanolytiques dans les phases inférieures ont des valeurs faibles par rapport aux phases supérieures, mais les activités spécifiques dans ces phases sont importantes par rapport aux phases supérieures. Par conséquent ; sur l'ensemble des protéines présentes dans les phases inférieures, les xylanases sont les plus dominantes sauf pour la phase inférieure du 5^{ème} système où $A_{SX} = 0.27$ U/mg. Dans ce dernier, la répartition de l'enzyme s'est penchée vers la phase supérieure avec $A_{SX} = 5.04$ U/mg. Dans les phases inférieures l'activité spécifique augmente avec l'augmentation de la concentration du PEG (sauf 5^{ème} système), elle est proportionnelle à l'activité des xylanases de *Jonesia denitrificans* BN13 (**Fig. 16**).

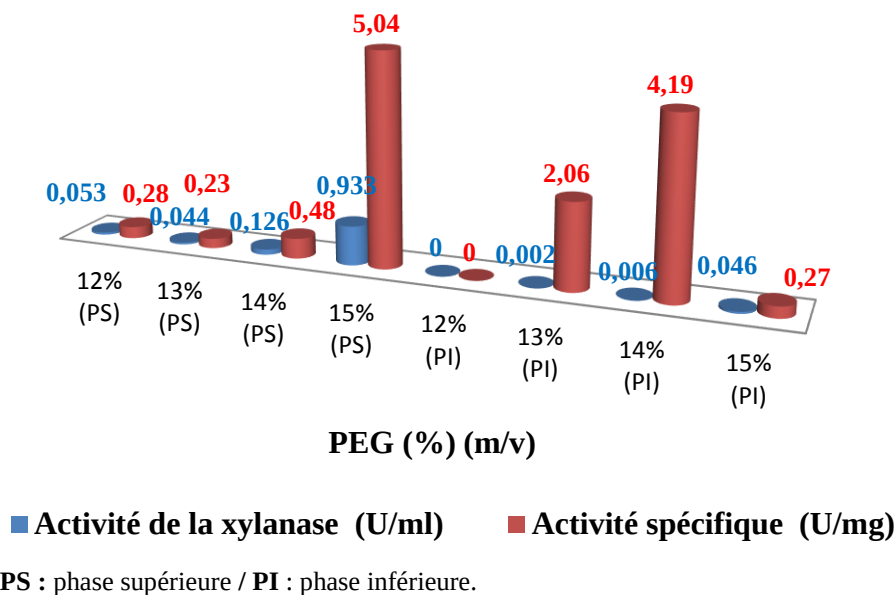


Fig. 16 : Effet de la concentration du PEG sur l'activité xylanolytique et sur l'activité spécifique.

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

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

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

Le PEG 6000 est utilisé en combinaison avec 13% KH_2PO_4 à pH7 pour étudier l'effet de sa concentration (10-15%) sur l'extraction des xylanases.

Dans les SDPAs, contenant 13% KH_2PO_4 et des différentes concentrations (m/v) du PEG 6000, l'augmentation de la concentration du PEG conduit à une diminution des coefficients de partage, comme montré dans la (Fig. 17), Cela concorde avec les travaux rapporté par (Draginja et al., 2008).

Les conditions les plus favorables pour la distribution des xylanases de *Jonesia denitrificans* BN13 dans la phase supérieure sont atteintes dans un système contenant 15% PEG et 13% KH_2PO_4 , ou (K) et (Y) sont de 20,28 et 78,5%, respectivement.

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

Contrairement au coefficient de partage qui diminue avec l'augmentation de la concentration du PEG qui nous renseigne sur la répartition des xylanases dans les phases des systèmes (Fig. 17).

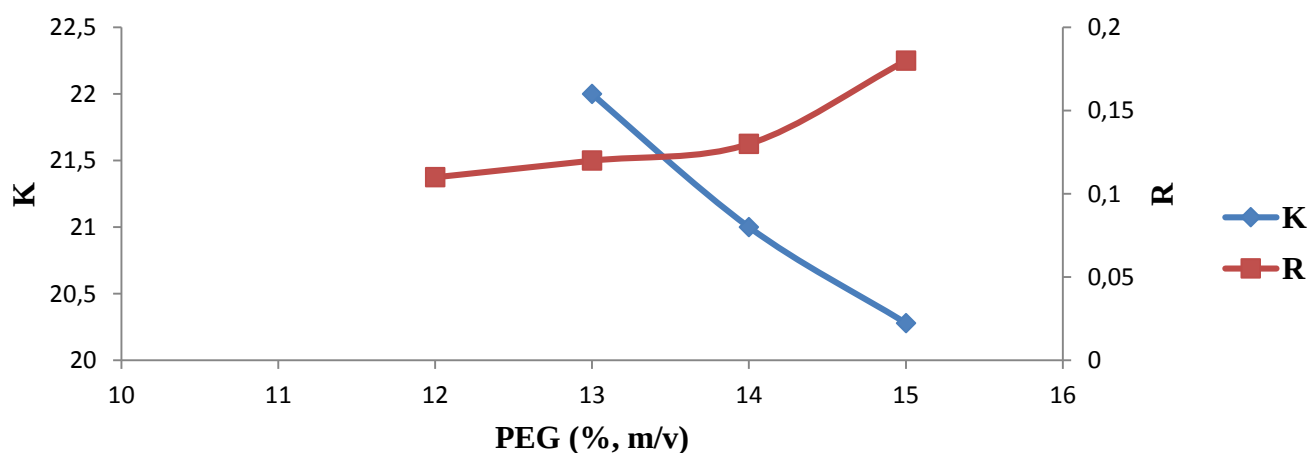
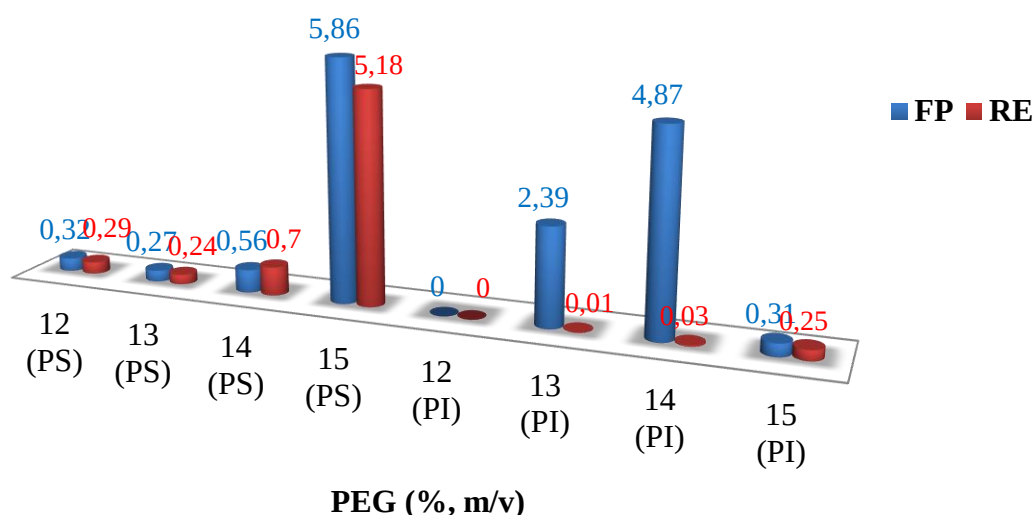


Fig. 17 : Effet de la concentration du PEG sur le coefficient de partage et le ratio volumique.

Dans toutes les phases du système, les valeurs du FP et le RE augmentent avec l'augmentation de la concentration du PEG ; pour le 5^{ème} système, les valeurs de FP et de RE de la phase supérieure sont élevées par rapport à la phase inférieure et les autres systèmes, donc la quantité d'enzyme pure dans cette phase est la plus élevée (**Fig. 18**).



PS : phase supérieure / PI : phase inférieure

Fig. 18 : Influence de la concentration du PEG sur le facteur de purification et la récupération d'enzymes.

On remarque dans la (**Fig. 19**) que le ratio de concentration (**RC**) diminue avec l'augmentation de la concentration du PEG, par contre, le rendement de purification (**Y**) augmente avec l'augmentation de la concentration du PEG où il atteint son maximum dans le 5^{ème} système (78,5%), ce paramètre nous renseigne sur la quantité des xylanases purifiées.

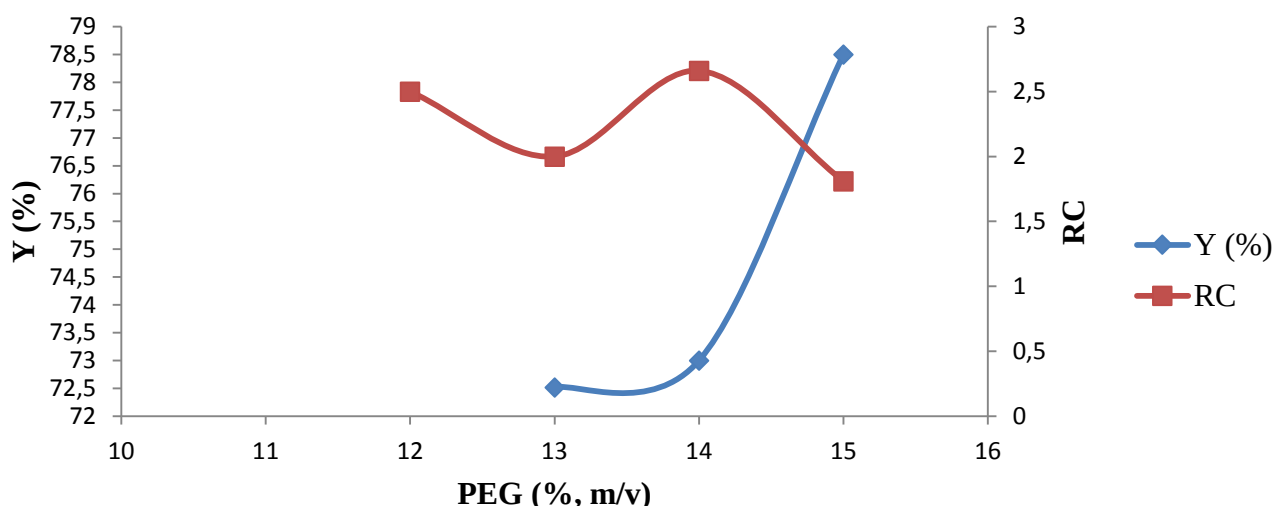


Fig. 19 : Influence de la concentration du PEG sur le rendement et le ratio de concentration.

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

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

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

A pH 6, le partitionnement des xylanases a changé de comportement par rapport au pH 7, alors qu'au pH 8, l'activité des xylanases a diminué ($A_x=0,173$ pour PS et 0,026 pour PI) dans les deux phases, alors que le comportement de répartition est resté le même que celui du 5^{ème} système (**Fig. 20**).

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

D'après **Yang et al., 2008**, les protéines chargées positivement se répartissent dans la phase inférieure pendant que celles chargées négativement se dirigent vers la phase

supérieure. Le partitionnement des protéines totales de l'enzyme dans les phases du système dépendent de leur pI.

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

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

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

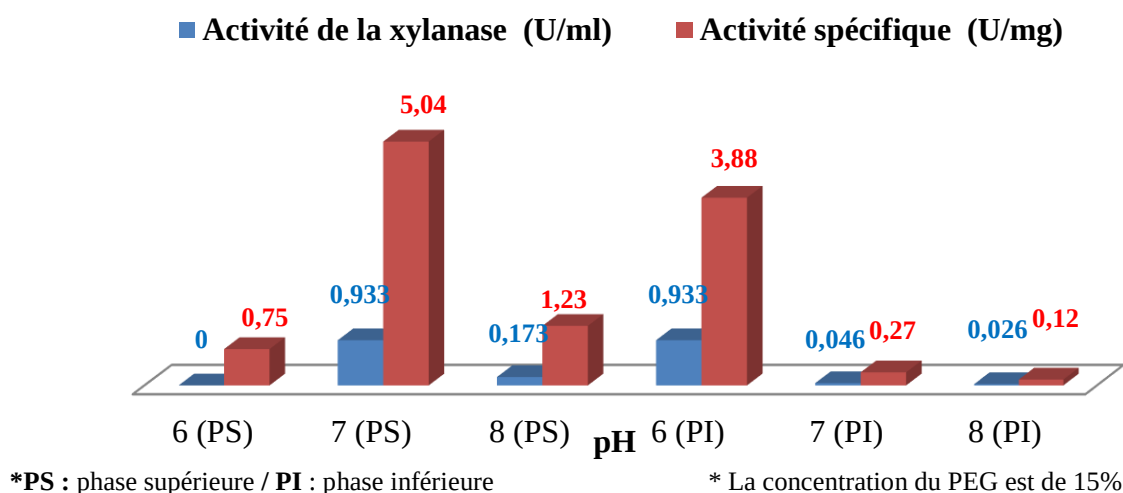
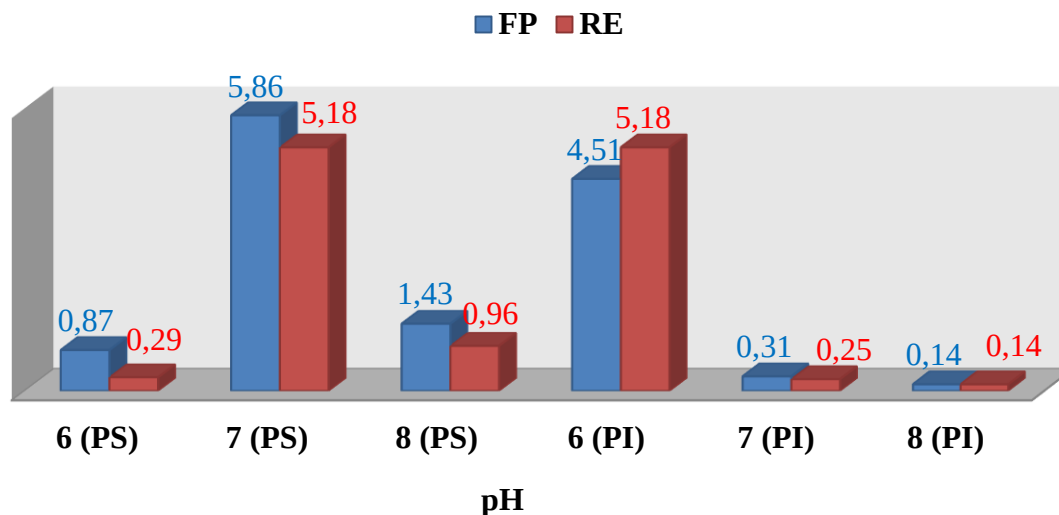


Fig. 20 : Effet du pH sur l'activité xylanolytique et sur l'activité spécifique.

Le facteur de purification et la récupération de l'enzyme diminuent avec la variation du pH par rapport au pH neutre (pH 7), que ça soit pour un pH acide (pH 6) ou pour un pH basique (pH 8). (**Fig. 21**).

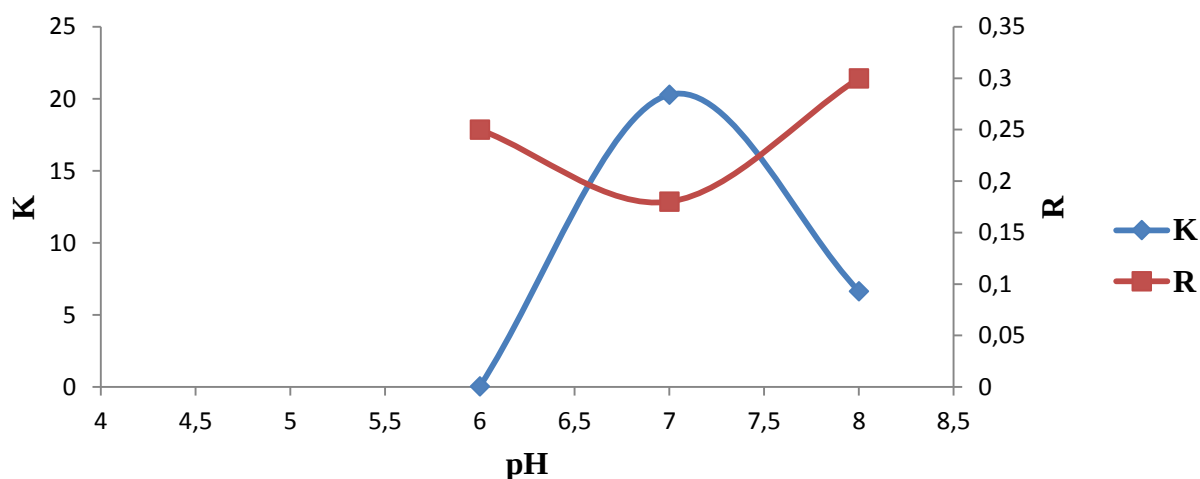


*PS : phase supérieure / PI : phase inférieure

*la concentration du PEG est de 15%.

Fig. 21 : Influence du pH sur le facteur de purification et la récupération d'enzyme.

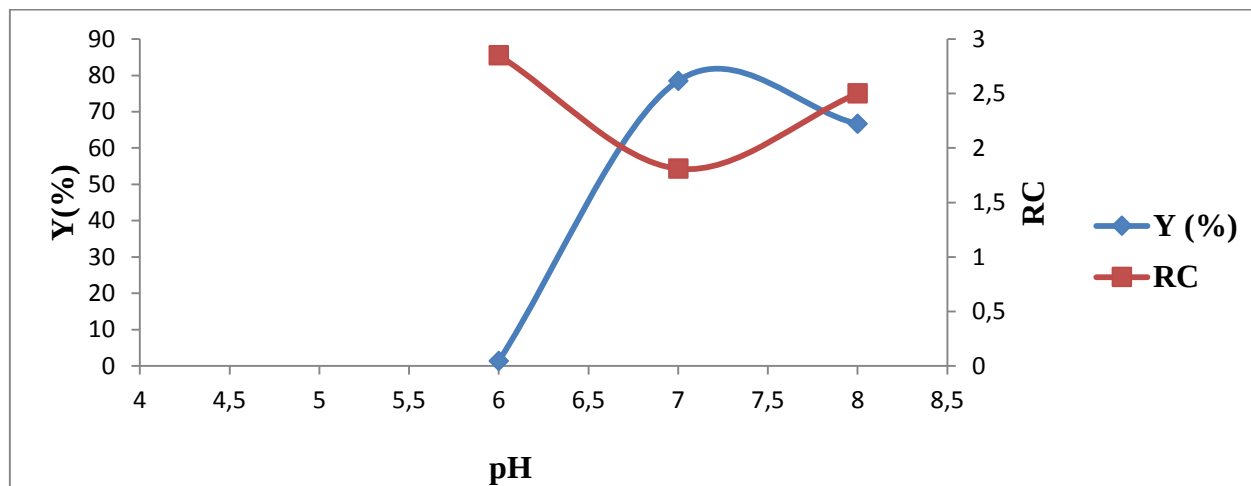
On remarque que le coefficient de partage diminue avec la variation de pH, par contre, le ratio volumique augmente, par rapport au pH neutre (pH 7) (**Fig. 22**).



*la concentration du PEG est de 15%.

Fig. 22 : Influence de pH sur le coefficient de partage et le ratio volumique.

On remarque que le rendement de purification diminue avec la variation de pH, par contre, le ratio de concentration augmente, par rapport au pH neutre (pH 7), ce résultat est confirmé par **Yasinok et al., (2010)**, qui ont trouvé une augmentation du pH, engendre une diminution de la récupération de l'enzyme. (**Fig. 23**).



*la concentration du PEG est de 15%.

Fig. 23 : Effet de pH sur le rendement et le ratio de concentration.

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

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

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

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

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

La masse moléculaire de la xylanase est déterminée par calcul à partir de la courbe d'étalonnage préétablie avec des marqueurs protéiques de masse moléculaire connue (**Fig. 24**).

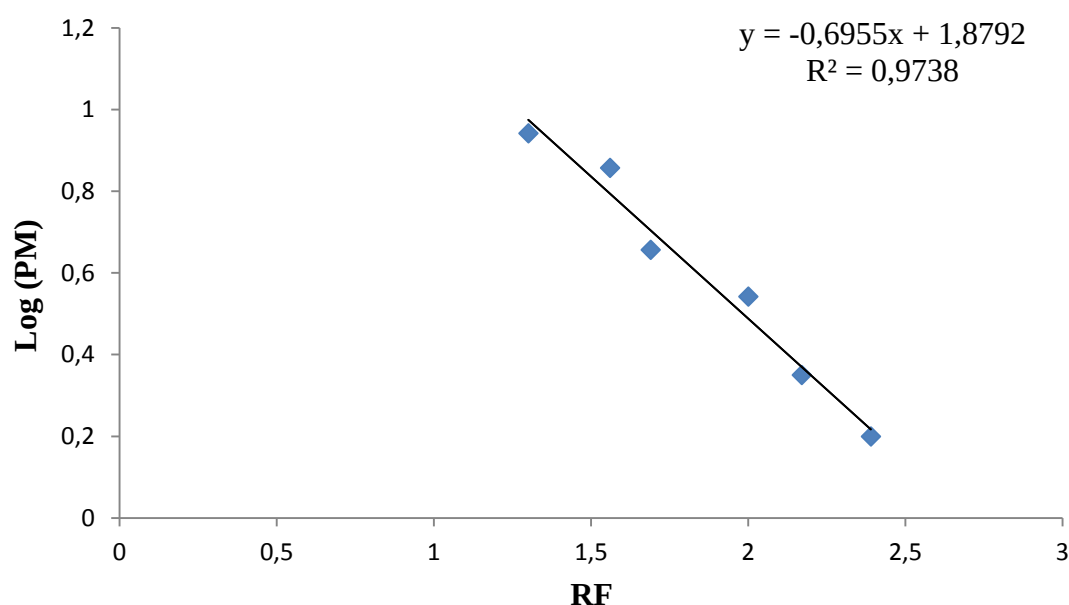
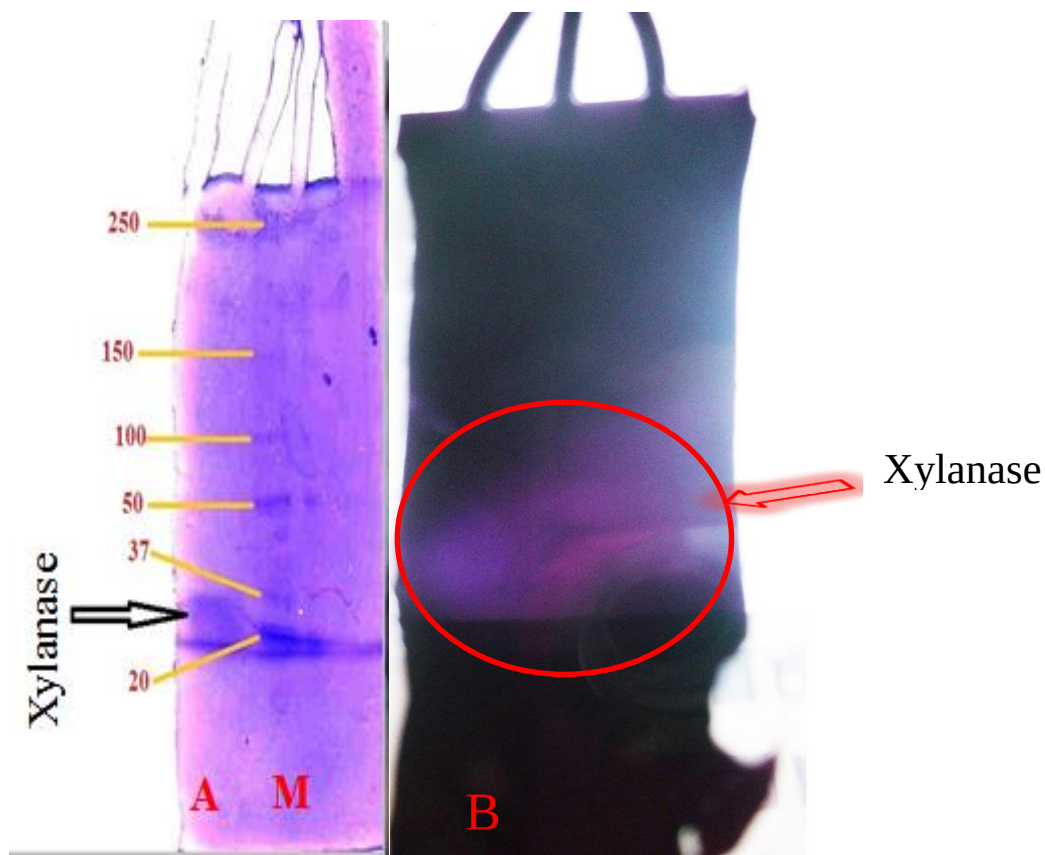


Fig. 24 : Courbe d'étalonnage des marqueurs pour l'estimation du poids moléculaire.

L'analyse du zymogramme sur gel de polyacrylamide en présence de SDS contenant le xylane de bouleau à 0,1 % (m/v) est réalisé pour mettre en évidence l'activité des xylanases. La xylanase produite par *Jonesia denitrificans* BN13 a montré une bande relativement claire sur fond opaque sur le gel du zymogramme (**Fig. 25**), indiquant que cette dernière est une xylanase et non pas une autre enzyme.



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

Fig.25 : SDS-PAGE et zymogramme de la xylanase de *Jonesia denitrificans* BN13.

Une seule bande protéique est obtenue (**Fig. 24**) et selon la courbe d'étalonnage des marqueurs protéiques (**Fig. 23**), la xylanase possède un poids moléculaire de **26,85 KDa**, les résultats de **Boucherba, 2011** révèle qu'il s'agit de la **xylanase 6** qui est une xylanase minoritaire retrouvée dans le surnageant de culture de *Jonesia denitrificans* BN13.

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

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

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

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans le but d'extraire des xylanases produites par la souche *Jonesia denitrificans* BN13 isolée et caractérisée par **Boucherba et al., 2011**, nous avons procédé à une extraction par un système à deux phases aqueuses (**SDPA**) composé de PEG6000/ KH_2PO_4 / NaCl.

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

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

Les résultats révèlent aussi que le système composé de 15% de PEG 6000, 13% de KH_2PO_4 , 0,1M de NaCl et à pH 7 est le meilleur système car c'est une première étape de purification ne nécessitant pas de centrifugation pour la récupération des cellules, ce système optimisé nous a permis d'obtenir un rendement (**Y**) de **78,5%**, un facteur de purification (**FP**) de **5,86** et un ratio de concentration de **1,81**.

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

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

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

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

- Suivre la production de cellulases, de laccases et de xylanases simultanément et appliquer le système adéquat pour les récupérer.
- Optimisation des SDPAs, pour l'utilisation à l'échelle industrielle en jouant sur les différents facteurs qui influencent sur la répartition, tels que le poids moléculaire de PEG, la concentration de KH_2PO_4 , changement du type du sel.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- ✚ **Albertsson PA.** (1986). Partitioning of Cell Particles and Macro-molecules. Wiley–Interscience. New York, p 8-38.
- ✚ **Annamalai N, Thavasi R, Jayalakshmi S et Balasubramanian T.** (2009). Thermostable and alkaline tolerant xylanase production by *Bacillus subtilis* isolated from marine environment. Ind J Biotechnol. **13**, 291–7.
- ✚ **Antov MG, Draginja MP, Milica G et Dasic.** (2005). Aqueous two-phase partitioning of xylanase produced by solid-state cultivation of *Polyporus squamosus*. Process Biochemistry. **41**, 232–235.
- ✚ **Asenjo JA, Schmidt AS, Hachem F et Andrews BA.** (1994). Peptide fusion tags with tryptophan and charged residues for control of protein partitioning in PEG–potassium phosphate aqueous two-phase systems J. Chromatogr., **A668**, 47–54.
- ✚ **Assamoi AA, Jacqueline D et Philippe T.** (2009). Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. Biotechnol. Agron Soc Environ. **13**(2), 281-294.

B

- ✚ **Babu BR, Rastogi NK et Raghavarao KSMS.** (2008). Liquide-liquide extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase systems. Chem Eng Process.**47**, 83–89.
- ✚ **Bailey MJ, Biely P et Poutanen K.** (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. J Biotechnol. **23**, 257-270.
- ✚ **Bajaj BK et Singh NP.** (2010). Production of xylanase from alkalitolerant *Streptomyces* sp. 7b under solid-state fermentation, its Purification, and characterization. Appl Biochem Biotechnol.**162**, 1804-1818.
- ✚ **Bakri Y.** (2003). Optimisation de la production de xylanases par *Penicillium canescens* 10-10c.Thèse de doctorat: faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux, Belgique.

- ✚ **Bedford MR et Classen HL.** (1992). The influence of dietary xylanase on intestinal viscosity and molecular weight distribution of carbohydrates in rye-fed broiler chick. In: Visser J, Beldman G, vanSomerén MAK, Voragen AGJ (eds) *Xylans and xylanases*, Elsevier, Amsterdam, pp 361-370.

- ✚ **Beg QK, Bhushan B, KapoorM et Hoondal GS.** (2000). Effect of amino acids on production of xylanase and pectinase from a *Streptomyces* sp. QG-11-3. *World J Microbiol Biotechnol.***16**, 211-213.

- ✚ **Beg QK, Bhushan B, KapoorM et Hoondal GS.** (2000). Enhanced production of a in biobleaching of eucalyptus Kraft pulp. *Enzyme Microb Technol.***27**, 459- 466.

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

- ✚ **Bell FW.** (1991). Critical silvics of conifer crop species and selected competitive vegetation in northwestern Ontario. NWFTDU Tech. Rep. No **19**, 177 p.

- ✚ **Belter PA et Cussler EL.** (1988). *Bioseparations*. Wiley Interscience. New York, p.5.

- ✚ **Benamrouche-Stitou S.** (2002). *Biochimie et histologie de la dégradation enzymatique du son de blé par une endoxylanase*. PhD Reims, Université Champagne-Ardenne, France.

- ✚ **Berlo MV, Luyben KChM et LAM.** (1998). Wielen, Polyethylene glycol-salt aqueous two-phase systems with easily recyclable volatile salts. *J. Chromatogr B.***711**, 61–68.

- ✚ **Biely P, Puls J et Schneider H.** (1985). Acetyl xylanesterases in fungal cellulolytic systems. FEBS Lett. **186**, 80-84.

- ✚ **Biely P, Vrsanska M, Tenkanen M et Kluepfel D.** (1997). Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. Journal of Biotechnology. **57**, 151-166.

- ✚ **Blum J, Avnir D et Schumann H.** (1999). Sol-gel encapsulated transition-metal catalysts. Chem tech. **29**(2), 32-38.

- ✚ **Boucherba N.** (2011). Production, purification et caractérisation d'une xylanase produite par *Jonesia denitrificans* BN13. Thèse de doctorat en science biologique. Université d'Abd-Arrahman MIRA de Béjaïa, Faculté des sciences et de la vie, 108.

- ✚ **Boucherba N, Benallaoua S, Copinet E, Hebal H et Duchiron F.** (2011). Production and partial characterization of xylanase produced by *Jonesia denitrificans* BN13 isolated in Algerian soil. Process Biochem. **46**, 519- 525.

- ✚ **Bradford MM.** (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye Binding. Anal Biochem **72**, 248-254.

C

- ✚ **Chavez-Santoscoy A, Benavides J, Vermaas W et Ri-to-Palomares M.** (2010). Application of aqueous two-phase systems for the potential extractive fermentation of cyanobacterial product. Chem Eng Technol **33**, 177–182.

- ✚ **Choudhury B, Sunita Chauhan, Singh SN et Ghosh P.** (2006). Application of xylanase enzyme of *Bacillus coagulans* as a prebleaching agent on non-woody pulps. *Process Biochemistry*. **41**, 226–231.

- ✚ **Cleland JL. Hedgepeth C et Wang DI.** (1992). Polyethylene glycol enhanced refolding of bovine carbonic anhydrase B. Reaction stoichiometry and refolding model. *J Biol Chem* **267**, 13327-13334.

- ✚ **Collins T, Gerday C et Feller G.** (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev*. **29** (1), 3–23.

- ✚ **Coughlan MP.** (1992). Enzymic hydrolysis of cellulose: an overview. *Bioresource Technology*, **39** (2), 107-115.

D

- ✚ **Dekker RFH et Richards GN.** (1976). Hemicellulases, their occurrence, purification, properties and mode of action. *Adv Carbohydr Chem Biochem*. **32**, 277-352.

- ✚ **Dhiman SS, Sharma J et Battan B.** (2008). Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: A review. *BioResources*. **3** (4), 1377-1402.

- ✚ **Ding CH, Jiang ZQ, Li XT, Li LT et Kusakabe I.** (2004). High activity xylanase production by *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. *World J Microb Biotech*. **20** (1), 7–10.

- ✚ **Doran PM.** (2005). *Bioprocess Engineering Principles*, Academic press, California.

- ✚ **Draginja Pericin, Ljiljana Radulovic et Svetlana Trivicet Etelka Dimic.** (2008). Evaluation of solubility of pumpkin seed globulins by response surface method. *Journal of Food Engineering*. **84** (4), 591–594.
- ✚ **Duarte MCT, Portugal EP, Ponezi AN, Bim MA, Tagilari CV et Franco TT.** (1999). Production and purification of alkaline xylanases. *Bioresource Technol.* **68** (1), 49–53.

E

- ✚ **Elegir G, Szakacs G et Jeffries TW.** (1994). Purification, characterization and substrate specificities of multiple xylanases from *Streptomyces* sp. strain B-12-2. *Appl Environ Microbiol.* **60** (7), 2609-2615.

F

- ✚ **Farrel RL, Biely P et McKay DL.** (1996). Production of hemicellulase by the fungus *Penicillium kloeckeri* in biotechnology in the pulp and paper industry. Vienna: Facultas-Universitätsverlag, 485–489.
- ✚ **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 et Pastor FI.** (2004). Cloning and characterization of xylanase A from the strain *Bacillus* sp. BP-7: comparaison with alkaline pi-low molecular weight xylanases of family 11. *Current Microbiology*. **48**, 276-279.

- ✚ **Garai D et Kumar V.** (2013). Aqueous two phase extraction of alkaline fungal xylanases in PEG/ phosphate system: Optimization by Box–Behnken design approach. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 2. 125–131.
- ✚ **Gautam S et simon L.** (2006). Partitioning of β -glucosidase from *Trichoderma reesei* in polyethylene glycol and potassium phosphate aqueous Two-Phase Systems: influence of pH and temperature. *Biochem. Eng. J.* **30**, 104-108.
- ✚ **Geweely et Neveen.** (2011). Purification and characterization of acido-thermophilic xylanase from *Aspergillus terreus*. Biological science department (Microbiology), Australian J. of basic and applied Sci. **5** (10), 214-219.
- ✚ **Gilbert HJ et Hazlewood GP.** (1993). Bacterial cellulases and xylanases. *J Gen Microbiol.* **139**, 187-194.
- ✚ **Gorbacheva IV et Rodionova NA.** (1977). Action pattern of endo- β -1,4-xylanase from *Aspergillus niger* on xylan and xylooligosaccharides. *Biochim Biophys Acta* **484**, 94-102.
- ✚ **Graikaiwari R, Shendye A, Kulkurani N et Rao M.** (1996). Two phase separation of xylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* using a polyethylene glycol- K_2HPO_4 system. *Biotech and Appl biochem* **23**, 237-241.
- ✚ **Gupta VK, Gaur R, Gautam N, Kumar P, Yadav IJ et Darmwal NS.** (2009). Optimization of xylanase production from *Fusarium solani* F7. *Amer J Food Technol World.* **4** (1), 20-29.

H

- ✚ **Hatti-Kaul R.** (2000). *Methods in Biotechnology, Aqueous Two-Phase Systems. Methods and Protocols*, Humana Press, New Jersey.
- ✚ **Herring AM, McKinnon JT, Gneshin KW, PavelkaR, Petrick DE, McCloskey BD et Filley J.** (2004). Detection of reactive intermediates from and characterization of biomass char by laser pyrolysis molecular beam mass spectroscopy. *Fuel.* **83**, 1483-1494.

J

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

K

- ✚ **Kaji A.** (1984). L-Arabinosidases. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Volume **42**, Pages 383-394.
- ✚ **Karels TJ et Boonstra R.** (2003). Reducing solar heat gain during winter: the role of white bark innorthern deciduous trees. Arctic **56**, 168-174.
- ✚ **Kesker SS.** (1992). High activity xylanase from thermotolerant *Streptomyces* T7, cultural conditions and enzyme properties. Biotechnol Lett. **14** (6), 481-486.
- ✚ **Khasin A, Alchanati I et Shoham Y.** (1993). Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. Appl Environ Microbiol. **59**, 1725-1730.
- ✚ **Kluepfel D, Vats-Mehta S, Aumont F, Shareck F et Morosoli R.** (1990). Purification and caracterisation of a new xylanase (xylanases B) produced by *Streptomyces lividans* 66. Biochem. Journal. **267**, 45-50.
- ✚ **Kohler S.** (2009). Pyrolyse rapide de biomasses et de leurs constituants. Application à l'établissement de lois prévisionnelles. Thèse de doctorat de génie des procédés. Institut national polytechnique de Lorraine, 233p.

$\mathcal{L}$

- ✚ **Laemmli UK.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227** (5259), 680-685.

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

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

- ✚ **Li KC, Azadi P, Collins R, Tolan J, Kim JS et Eriksson KEL.** (2000). Relationships between activities of xylanases and xylan structures. *Enzyme Microb Technol.* **27** (2), 89–94.

- ✚ **Li X, She Y, Sun B, Song H, Zhu Y, Lv Y et Song H.** (2010). Purification and characterization of a cellulose-free, thermostable xylanase from *Streptomyces rameus* L2001 and its biobleaching effect on wheat straw pulp. *World J Microbiol Biotechnol.* **52**, 71-78.

- ✚ **Li X, Zhina Lian, Bo Dong, Yong Xu, Qiang Yong et Shiyuan Yu.** (2011). Extractive bioconversion of xylan for production of xylobiose and xylotriose using a PEG6000/sodium citrate aqueous two-phase system. *Korean J. Chem. Eng.* **28** (9), 1897-1901.

- ✚ **Liu WH, Yang SF et Yang CH.** (2006). Production of xylooligosaccharides from xylans.

- ✚ **Lodha SJ, Korus RA et Crawford DL.** (1989). Production of major extracellular enzymes during lignocelluloses degradation by two *Streptomyces* in agitated submerged culture. *Appl Enviro Microbiol*; **55**, 1165-8.

- ✚ **Lopez-Fernandez C, Rodriguez J, Ball AS, Lopa-Patino JL, Periz-Lebic MI et Arias ME.** (1998). Application of the affinity binding of xylanases to oat-spelt xylan in the purification of endoxylanase CM-2 from *Streptomyces chattanoogensis* CECT 3336. *Appl Microbiol Biotechnol.***50**, 284-287.

- ✚ **Lumba FL et Penninckx MJ.** (1992). Characterization of multiple forms of β -xylanase produced by a *Streptomyces* sp. growing on lignocellulose. *Appl Microbiol Biotechnol.* **36**,733-738.

M

- ✚ **Maat J, Roza M, Verbakel J, Stam H, Dasilva MJS, Egmond MR, Hagemams M, Vangarcom RFM, Hessing JGM et Vanrotterdam C.** (1992). "Xylanases and their application in bakery, xylan and xylanases, Elsevier, Amsterdam, 349-360.

- ✚ **Mac Kenzi CR et BilousD.** (1988). Ferulic acid esterase activity from *schisophyllum commune*, *Appl Environ Microbiol* **54**, 1170-1173.

- ✚ **Magnuson TS et Crawford DL.** (1997). Purification and characterization of an alkaline xylanase from *Streptomyces viridosporus* T7A. *Enzyme Microb Technol.* **21**, 160-164.

- ✚ **Mayerhoff, ZD, Roberto, IC et Franco TT.** (2004). Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems. *Biochemical engineering journal*, **18**(3), 217-223.

- ✚ **Miller GL.** (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.***31**, 87-95.

N

- ✚ **Naganagouda K et Mulimani VH.** (2008). Aqueous two-phase systems extraction (ATPE): an attractive and economically viable technology for downstream processing of *Aspergillus oryzae* α -galactosidase. *Process Biochem.***43**, 1293-1299.

- ✚ **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.

- ✚ **Ninawe S, KapoorM et Kuhad RC.**2008. Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. *Biores Technol.* doi: 10.1016/j.biortech.02.016.

- ✚ **Nitsawang S et Hatti-Kaul RP.** (2006). Purification of papain from *Carica papaya* latex: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. *Enzyme and Microbial technology*, **39** (5), 1103-1107.

P

- ✚ **Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA et Amorim DS.** (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* **67** (5), 577–591.

- ✚ **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 et Bruce D** .(2009). Complete genome sequence of *Jonesia denitrificans* type strain (Prevot 55134^T). *Standards genomic Sciences.* **1**(3), 262.

- ✚ **Puls J. (1993).** Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. Hemicellulose and hemicellulases.

R

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

S

- ✚ **Safford LO, Bjorkbom JC et Zasada, JC. (1990).** *Betula papyrifera* Marsh. paper birch. Burns, Russell M.; Honkala, Barbara H., tech. coords. Silvics of North America. **2**, 158-171.
- ✚ **Saravanan S, Reena JA, Rao JR, Murugesan TetNair BU. (2006).** Phase Equilibrium Compositions, Densities, and Viscosities of Aqueous Two-Phase Poly(ethylene glycol) + Poly(acrylic acid) System at Various Temperatures. J. Chem. Eng. Data **51**, 1246-1249.

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

- ✚ **Schumann P, Cui X, Stackebrandt E, Kroppenstedt RM, Xu L et Jiang C.** (2004). *Jonesiaquinghaiensis* sp. nov., a new member of the suborder micrococccineae. *Internat J System Evol Microbiol.* **54**, 2181-2184.

- ✚ **Shah KB, Jain U, Belusko RJ, Kumar P, Foy BK, Montoya A et Rao TLK.** (1991). Subclavian artery laceration and acute hemothorax on attempted internal jugular vein cannulation. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia.* **5**(6), 608-610.

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

- ✚ **Simon P.** (2007). Grands principes de la dialyse. L'insuffisance rénale, Pages 57-63.

- ✚ **Suchita N, KapoorM et Kubad RC.** (2007). Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN3. *Bioresour Technol.* **99**, 1–5.

T

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

- ✚ **Tello PG, Camacho F et Blazquez G.** (1994). Density and Viscosity of Concentrated Aqueous Solutions of Polyethylene Glycol *J. Chem. Eng. Data* **39**, 611–614.

- ✚ **Timothy S, Magnuson D et Crawford L.** (1997). Purification and characterization of alkaline xylanase from *Streptomyces viridosporus* T7A. *Enzyme Microb Technol.* **21**, 160–4.

- ✚ **Tsujibo H, Miyamoto K, Kuda T, Minami K, Sakamoto T, Hasegawa T et Inamori Y.** (1992). Purification, properties and partial amino acid sequences of thermostable xylanases from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. Appl Environ Microbiol. **58**, 371-375.

V

- ✚ **Vaidya BK, Suthar HK, Kasture S et Nene S.** (2006). Purification of potato polyphenol oxidase (PPO) by partitioning aqueous two phase system. Biochem. Eng. J. **28**, 161-166.
- ✚ **Van Doorslaer E, Kesters-Hilderson et De Bruyne CK.** (1985). Hydrolysis of beta-D-xylooligosaccharides by beta-D-xylosidase from *Bacillus pumillus*. Carbohydrate Research. **140**, 342-346.
- ✚ **Vanparidon PA, Booman JCP, Selten GCM, Geerse C, Barug D, de Bot PHM et Hemke G.** (1992). Application of fungal endoxylanase in poultry diets Xylans and xylanases. Elsevier, Amsterdam, pp 371-378.

W

- ✚ **Walter H et Johansson GT.** (1994). Methods in enzymology: Aqueous two-phase systems. Academic press, San Diego, CA.
- ✚ **Wang SL, Yen YH, Shin IL, Chang AC, Chang WT, Wu WC et Chai YD.** (2003). Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. Enzyme Microb Technol. **33**, 917-25.
- ✚ **Wong KKY, Tan LUL et Saddler JN.** (1988). Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. Microbiol Rev **52**(3), 305-317.

γ

- ✚ **Yan Q, Hao S, Jiang Z., Zhai Q et Chen W.** (2009). Properties of a xylanase from *Streptomyces matensis* being suitable for xylooligosaccharides production. Journal of molecular catalysis B: enzymatic. **58**, 72-77.

- ✚ **Yang S, Huang Z, Jiang Z et Li L.** (2008). Partition and purification of a thermostable xylanase produced by *Paecilomyces thermophilain* solid state fermentation using aqueous two-phase systems. Process Biochem.**43**(1), 56–61.

- ✚ **Yasinok AE, Suzan Biran, Aytac Kocabas et Bakir U.** (2010). Xylanase from a soil isolate, *Bacillus pumilus*: gene isolation, enzyme production, purification, characterization and one-step separation by aqueous-two-phase system. World J Microbiol Biotechnol. **26**, 1641–1652.

 Z

- ✚ **Zhang YHP, Himmel ME et Mielenz JR.** (2006). Outlook for cellulose improvement: screening and selection strategies. Biotech Adv. **24**, 452-481.

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

ANNEXES

I. MATERIEL UTILISE

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

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

II. PRODUITS UTILISES

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

III. PREPARATION DU MILIEU MM7 LIQUIDE

Composition du milieu :

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

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

IV. MILIEU MM7 SOLIDE

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

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

Acide dinitrosalicylique.....10g

Soude.....16g

Tartrate de potassium sodique.....300g

Eau distillée.....qsp...1l

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

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

Bleu de Coomassie G25010mg

Éthanol 99,5%5ml

Acide phosphorique 85%10ml

Eau distillée.....qsp.. 100ml

3. Tampon Tris-Hcl à 50Mm à pH 8,5

Tris.....6,057g

Eau distillée.....qsp... 1L

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

4. Gel de séparation à 12%

Solution d'acrylamide.....2,5ml

Tampon de séparation.....5,2ml

TEMED.....20µL

Persulfate d'ammonium (APS)70µL

Xylane de bouleau.....0,8ml

Eau distillée.....qsp.....12,5ml

5. Gel de concentration à 7,5%

Solution d'acrylamide.....2,5ml

Tampon de concentration.....2,5ml

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

6. Tampon de séparation à pH 8,8

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

7. Tampon de concentration

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

8. Tampon de migration (X10) à pH 8,3

Tris (0,025M)..... 3,028g
Glycine (0,192M).....14,41g
Mercaptoéthanol (0,05%).....500 μ L
SDS (0,1%).....1g
Eau distillée..... qsp1000ml
Ajuster le pH à 8,3

9. Tampon échantillon à pH 6,8

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

Eau distillée.....4ml

Ajuster le pH à 6,75 avec du HCl concentré

Glycérol.....4ml

β -mercaptoéthanol à 14,3M...2ml

Bleu de bromophénol.....0,1 mg

10. Solution de fixation et de décoloration

Alcool (éthanol)30%

Acide acétique.....5%

11. Solution de coloration

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

Alcool (éthanol)40%

Acide acétique.....10%

12. Tampon Triton X-100 à 2,5% (m/v)

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

Eau distillée.....qsp... 100ml

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

Rouge de Congo.....0.1g

Eau distillée.....qsp... 100ml

RÉSUMÉ

Le but de cette étude est l'extraction des xylanases produites par *Jonesia denitrificans* BN13 par un système à deux phases aqueuses (SDPA), composé de 15% de PEG/13% de KH_2PO_4 /0,1M de NaCl, à pH 7, avec un rendement de 78,5% de l'activité xylanolytique qui est retrouvée dans la phase supérieure, un coefficient de partage (K) de 20,28 et un facteur de purification (FP) de 5,86. Les xylanases produites ont été analysées par électrophorèse dénaturante et par zymogramme. Une seule xylanase de 26,85 kDa est obtenue.

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

SUMMARY

The scope of this study is the extraction of *Jonesia denitrificans* BN13 xylanase by the aqueous two phases system (ATPS), comprised by 15% PEG/13 % KH_2PO_4 / 0.1 M NaCl, pH 7, the yield is about 78.5 % of the xylanolytic activity which is found in the top phase, the partition coefficient (K) 20.28 and a purification factor (PF) of 5.86. The xylanases produced were analyzed by denaturing electrophoresis and zymogram. One xylanase with molecular weight of 26.85 kDa was obtained.

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

Tableau I : Caractéristiques des endoxylanases produites par le genre *Streptomyces*.

Actinomycètes	MM (KDa)	pH Optimum	T (°C) optimale	Stabilité pH, T(°C)		pI	Références
<i>Streptomyces</i> sp. EC 10	32	7-8	60	-	-	6,8	Lumba et Pennickx, 1992
<i>Streptomyces</i> sp. B-12-2	23,8-40.5	6-7	55-60	-	-	4,8-8,3	Elegir et al., 1994
<i>Streptomyces</i> T7	20	4,5-5,5	60	5	37-50	7,8	Kesker., 1992
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i> OPC-520	33, 54	7	60-70	-	-	4,2, 8	Tsujibo et al. , 1992
<i>Streptomyces chattanoogensis</i> CECT 3336	48	6	50	5-8	40-60	9	Lopez-Fernandez et al., 1998
<i>Streptomyces viridisporus</i> T7A	59	7-8	65-70	5-9	70	10,2-10,5	Magnuson et Crawford , 1997
<i>Streptomyces</i> sp. QG-11-3	-	8,6	60	5.4-9.2	50-75	-	Beg et al., 2000
<i>Streptomyces rameus</i> L2001	21,1	5,3	70	4,3-6,7	50-80	-	Li et al., 2010
<i>Streptomyces</i> sp. 7b	30	6	50	5-8	30-60	-	Bajaj et Singh, 2010
<i>Streptomyces matensis</i>	21,2	7	65	4,5-8	30-55	-	Yan et al., 2009
<i>Streptomyces actuosus</i> A-151	30,45, 26, 20	5-6,4	70 , 70, 70, 60	5-8 , 3-8,5-9, 3-9	30-60	-	Wang et al., 2003

- : non déterminé, MM : masse moléculaire, T : température et pI : point isoélectrique

Tableau IX : Récapitulatif des résultats obtenus après SDPA (PEG 6000/KH₂PO₄/ NaCl).

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

1^{er} système : 10% PEG/13% KH₂PO₄/ 0,1 M NaCl, à pH 7 ; 2^{ème} système : 12% PEG/13% KH₂PO₄/ 0,1 M NaCl, à pH 7 ; 3^{ème} système : 13% PEG/13% KH₂PO₄/ 0,1 M NaCl, à pH 7 ; 4^{ème} système : 14% PEG/13% KH₂PO₄/ 0,1 M NaCl, à pH 7 ; 5^{ème} système : 15% PEG/13% KH₂PO₄/ 0,1 M NaCl, à pH 7 ; 6^{ème} système : 15% PEG/13% KH₂PO₄/ 0,1 M NaCl, à pH 6 ; 7^{ème} système : 15% PEG/13% KH₂PO₄/ 0,1 M NaCl, à pH 8.

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

Espèce	Enzyme	Poid moléculaire du PEG	Composition de SDPA	K	R	Y	FP	Références
<i>Jonesia denitrificans</i> BN13	Xylanase	6000	15% PEG/ KH_2PO_4 / 0,1 M + 20ml de la solution d'enzyme à pH 7	20,28	0,18	78,5	5,86	Travail actuel
<i>Paecilomyces thermophila</i> J18	Xylanase	4000	12,5% PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / 0,1 M + 50% de la solution d'enzyme à pH 7,2	231,7	0,33±0,0014	98,7	5,54	Yang et al., 2008
<i>Bacillus pumilus</i> SB-M13	Xylanase	4000	3,5% PEG/ 14% KH_2PO_4 / 9% KI à pH 9	/	/	70	7	Yasinok et al., 2010
<i>Aspergillus candidus</i>	Xylanase	4000	8,66% PEG/ 22,4% $\text{Na H}_2\text{PO}_4$	8,41	/	88,1	3	Garai et Kumar, 2013
<i>Polyporus squamosus</i>	Xylanase	1500	10% PEG/ 70% phosphate d'ammonium 70% l'enzyme brut à pH 5,1	85,6	/	97,37	4,8	Antov et al., 2005
<i>Trichoderma viride</i>	Xylanase	6000	12,99% PEG/ 12,09 citrate de sodium	47,35	0,69	97,03	/	Li et al., 2011
<i>Bacillus pumilus</i>	Xylanase	6000	22% PEG/ K_2HPO_4 / 12% NaCl	46,9	/	98	33	Bim et Franco, 2000