



République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université ABDERRAHMANE MIRA-Béjaïa
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de microbiologie
Option : microbiologie

Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du Diplôme d'Ingénieur d'état en
Génie Biologique

Thème

**Extraction des xylanases à partir de milieux à base
de trois coproduits agricoles par un système à deux
phases aqueuses**

Réalisé par :

M^{lle} .KERDOUCHE Kamelia
M^{lle} .KERNOU Ouardia dite Nouara

Membre du jury :

Présidente : Mme. GHAROUT A. (MAA)
Promotrice : Mme. BOUCHERBA N. (MCB)
Examineur 1: Mr. HEBAL H. (Doctorant)
Examineur 2: Mr. BENSALD K. (MAA)

Promotion 2011-2012



Remerciements

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

*Nos vifs remerciements s'adressent tout d'abord à
notre promotrice madame BOUCHERBA Nawel
pour sa disponibilité, son esprit critique et sa bonne
humeur.*

*Nous tenons à remercier monsieur GAGAOUA pour
son aide précieuse et ses conseils avisés.*

*Nous remercions également les membres du jury :
Mme GHAROUT A., Mr HEBAL H. et Mr
BENSAID K. d'avoir bien voulu prendre le temps
d'évaluer et de juger notre travail.*

*Nous remercions Mme BOULLLA pour son aide et sa
sympathie.*

*Enfin nous remercions toute personne ayant
contribué de près ou de loin à la réalisation de ce
travail.*



Dédicace



Je dédie ce travail aux deux personnes qui me sont les plus chers sur cette terre, mes parents adorés qui m'ont tout donné, qui m'ont préservé du moindre mal, qui ont guidé mes pas, qui m'ont toujours encouragé dans mes études, je leurs doit d'être la personne que je suis devenue, qu'ils puissent trouver ici l'expression de ma profonde gratitude et que dieu me les garde.

A mon très cher frère Lamara et à ma très chère sœur Meliza que j'aime profondément.

A l'homme qui me redonne confiance en moi-même et me soutient à tout épreuve : Mohamed.

A mon binôme et amie avec laquelle j'ai passé des moments inoubliables.

A mes copines de chambre et mes amies avec lesquelles j'ai partagé des instants qui resteront ancrées dans ma mémoire à tout jamais.

Kamelia

Dédicace



Je dédie ce travail à :

- *Mon très cher père pour son soutien, sacrifice, sa patience et son amour.*
- *Ma chère maman, symbole de courage, de volonté qui a consacré toute sa vie pour mon bien être.*
- *Mes chères sœurs Yasmina et Sabah ainsi que mes très chers frères Abdelkader, Abdelghani et Abdelmoumène de m'avoir compris lors de mes moments difficiles.*
- *Mon fiancé Fares que j'aime beaucoup .*
- *Mes oncles et leur femmes, mes tantes, mes cousins.*
- *Toute ma famille, ma belle famille, mes proches, mes amis et sans oublier bien sur ma chère collaboratrice Kamelia.*

Ouardia

Liste des tableaux


Tableau n°	Titre	Page n°
I	Caractéristiques des xylanases microbiennes.	03-04
II	Structure des différents types de xylanes.	08
III	Composition chimique globale des écorces d'oranges séchées (a: en g/g ; b : en g/100g de matière sèche).	10
IV	Composition chimique de l'alfa.	11
V	Composition chimique de <i>Retama raetam</i> .	13
VI	Gamme d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs .	23
VII	Gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines par la macrométhode .	24
VIII	Gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines par la microméthode.	25
IX	Mesure de la biomasse à 600 nm.	28
X	Récapitulatif des activités xylanolytiques.	29
XI	Production de xylanases dans les fermentations en milieu liquide.	30
XII	Récapitulatif des paramètres mesurés après SDPA pour les cultures centrifugées.	33
XIII	Récapitulatif des résultats obtenus après application du SDPA.	34
XIV	Résultats du schéma de purification de la xylanase 4 de <i>Jonesia denitrificans</i> BN13.	36
XV	Résultats des schémas de purification des xylanases du genre <i>Streptomyces</i> .	37


Liste des figures

Figure n°	Titre	Page n°
01	Micrographie électronique de <i>J.denitrificans</i> 55134T Prevot .	07
02	Photographie de l'écorce d'orange (<i>Citrus sinensis</i>).	09
03	Photographie de l'alfa.	10
04	Photographie de <i>Retama raetam</i> .	12
05	Structure du xylane et différents sites de coupures des xylanases.	14
06	Courbe binodiale dans un diagramme de phase.	18
07	Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS.	23
08	Dispositif d'électrophorèse (VELP Scientifica).	26
09	Formation des deux phases .	32
10	Zymogramme en condition dénaturante.	38
11	Zymogramme après application du SDPS sur les xylanases de <i>Bacillus pumilus</i> BM13.	39

Liste des abréviations

- + ADN_r16S : Acide désoxyribonucléique ribosomique 16 Svedberg
- + BSA: Bovin Serum Albumin
- + °C : Degré Celsius
- + Da : Dalton
- + DEAE : Diéthyl-amnio-éthyl
- + DNS : Acide 3,5-Dinitrosalicylique
- + DSMZ : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
- + DTT : Dithiothréitol
- + g/L : Gramme par litre
- + h : Heure
- + Km : constante de Michaelis Menten
- + mL : Millilitre
- + MM7: Milieu Minimal à pH 7
- + mM : Milimolaire
- + mV : Millivolt
- + m /v: masse par volume
- + μ : Micro
- + MM : Masse molaire
- + Min : Minute
- + nm : Nanomètre
- + n°: Numéro
- + PAGE : polyacrylamide gel Electrophoresis
- + SDS: Sodium dodécyl sulphate
- + TEMED : N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine
- + TRIS : Tris-(hydroxyméthyl)-amniométhane
- + U: Unité enzymatique
- + v/v : Volume par Volume
- + V :Volt
- + Vmax : Vitesse maximale
- + 4-O-Me- α -D-Glcp : Acide uronique 4-O-Methyl- α -D-Glucopyranosyl;
- + β -D-Xylp : β -D-Xylanopyranose

 β -D-Glcp : β -D-Glucopyranose

 β -L-Araf : β -L-Arabinofuranose

Sommaire

Introduction

*Synthèse
bibliographique*

*Matériel et
méthodes*

Résultats et discussions

*Conclusion et
perspectives*

*Références
bibliographiques*

Annexes

Sommaire

Introduction.....	01
--------------------------	-----------

Synthèse bibliographique

I-Microorganismes producteurs de xylanases.....	03
II-<i>Jonesia denitrificans</i>.....	05
1-Historique.....	05
2-Classification.....	05
3- Caractères généraux et chimiotaxonomie de <i>Jonesia denitrificans</i>.....	06
III-Hémicelluloses.....	07
1) Coproduits contenant les hémicellulose.....	09
a- Ecorce d'orange.....	09
b- Alfa.....	10
c-Rétames.....	12
IV-Xylanases.....	13
1-Classification.....	14
2- Applications des xylanases.....	15

V-Système à deux phases aqueuses.....	17
➤ Paramètres influençant la répartition des protéines dans un système à deux phases.....	19
➤ Les avantages de l'SDPA.....	19

Matériel et méthodes

A-Matériel.....	20
B-Méthodes	
I-Préparation des substrats.....	21
II- Préparation et ensemencement des milieux de culture.....	21
III-Préparation du système à deux phases aqueuses (SDPA).....	21
IV-Méthodes analytiques.....	22
1/Mesure de la biomasse.....	22
2/Mesure de l'activité xylanasiq.....	23
3/ Dosage des sucres réducteurs.....	23
4/Dosage des protéines totales.....	24
a/La macrométhode.....	24
b/La microméthode.....	24

V-Mesure des différents paramètres

1/Mesure du rendements (%).....	25
2/Coefficient de partage.....	25
3/ Facteur de purification FP.....	25
VI- Zymogramme.....	26
1/Préparation du gel d'électrophorèse.....	26
2/Préparation des échantillons.....	26
3/Réalisation du zymogramme.....	27

Résultats et discussions

I-Mesure de la biomasse et des activités xylanasiques.....	28
II-Préparation du SDPA.....	32
1-Cultures centrifugées avant SDPA.....	32
2-Système à deux phases aqueuses.....	33
III-Zymogramme.....	38
Conclusion et perspectives	40

Références bibliographiques

Annexe I

Annexe II

Annexe III

Introduction

Le recours à la biotechnologie blanche et à l'énergie renouvelable a connu ces dernières décennies des avancées importantes, en tant qu'alternative à la chimie industrielle, il suscite l'intention des industriels et les acteurs du développement durable.

L'hémicellulose constitue, après la cellulose, le second polymère le plus abondant sur terre, avec une représentation de 25% à 35% de la biomasse lignocellulosique, l'hémicellulose est une source importante et renouvelable de biopolymère (**Repin et al., 2003**); Le xylane représente le composé majeur (**De Lemos et al., 2005 ; Colins et al., 2005**).

De part la complexité structurale du xylane, toute une panoplie d'enzymes est nécessaire pour sa dégradation. Il existe des enzymes qui hydrolysent la chaîne principale, incluant les $\beta(1-4)$ xylane hydrolases, alors que les autres clivent les liaisons entre les substituants et les résidus xylozes de la chaîne principale, il s'agit d'enzymes auxiliaires comme les arabinofuranosidases, les α -D-glucuronosidases...etc (**Puls et Schuseil, 1993**).

La plus importante application des xylanases est dans le préblanchiment de la pâte à papier mais aussi dans l'industrie du textile ainsi que dans la production des solvants et des biocarburants notamment le bioéthanol(**Viikari et al., 1986**).

L'utilisation des enzymes à l'échelle industrielle implique le développement de méthodes économiques pour leur séparation, extraction, concentration et purification (**Yasinok et al., 2010**).

La méthode la plus simple pour la séparation des protéines est l'utilisation d'un système à deux phases aqueuses (SDPA), qui fournit un environnement favorable pour les enzymes (**Yasinok et al., 2010**).

Notre présent travail porte sur l'extraction des xylanases produites par la souche *Jonesia denitrificans* BN13 (**Boucherba et al., 2011**), par un système à deux phases aqueuses.

Le coût élevé du xylane pur est une contrainte à l'échelle industrielle d'où la nécessité d'utiliser des substrats bon marché (**Gawande et Kamat, 1999 ; Fan et al., 2002**), notamment des déchets agricoles, ce qui contribue de façon significative à la valorisation de la biomasse et l'atténuation de la pollution de l'environnement.

Pour réaliser ce travail, trois coproduits disponibles en Algérie ont été utilisés à savoir l'écorce d'orange (*Citrus sinensis*), l'alfa (*Stipa tenacissima*) et les rétames (*Retama reatam*) .

Aucun article ne traite l'induction des xylanases sur milieux à base d'alfa et à base des rétames, ce qui met en valeur l'originalité de notre travail.

Notre travail pratique est accompagné d'une synthèse de nos connaissances sur le sujet qui permet de comprendre notre démarche.

La synthèse bibliographique traite tout d'abord l'aspect microbiologique en décrivant l'espèce *Jonesia denitrificans*, un aspect biochimique qui donne des considérations générales sur les substrats hémicellulosiques à savoir les produits commerciaux (purs) et les coproduits agroindustriels; puis les xylanases sont décrites et enfin le système à deux phases aqueuses est expliqué en détail.

I-Microorganismes producteurs de xylanases

Les enzymes xylanolytiques commerciales sont toutes d'origine microbienne, elles peuvent être produites par les bactéries, les levures et les moisissures. Les plus étudiées et les mieux caractérisées sont les xylanases d'origine fongique, parmi lesquelles celles d'*Aspergillus* (Esteban *et al.*, 1982 ; Wong *et al.*, 1986 ; Poutanen, 1988 ; Nakamura *et al.*, 1993 ; Khasin *et al.*, 1993 ; Kimura *et al.*, 1995 ; Shah et Madamwar, 2005 ; Prema et Poorna, 2006 ; Wakiyama *et al.*, 2010 ; Teixeira *et al.*, 2010 ; Khanum et Pal, 2011). Plusieurs espèces de *Trichoderma* produisent également des xylanases (Biely, 1985 ; Tan *et al.*, 1985 ; Hrmova *et al.*, 1986 ; Wood *et al.*, 1986 ; Tenkanen *et al.*, 1992).

Les xylanases bactériennes ont été isolées en particulier à partir du genre *Bacillus* (Okazaki *et al.*, 1985 ; Nanmori *et al.*, 1990 ; Debeire-Gosselin *et al.*, 1992 ; Blanco *et al.*, 1995 ; Bataillon *et al.*, 1998 ; Lama *et al.*, 2004).

Les actinomycètes représentent aussi une importante source d'enzymes xylanolytiques, particulièrement le genre *Streptomyces*, parmi lesquels, *Streptomyces matensis*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces sp.* AMT-3, *Streptomyces sp.* QG113...etc (Beg *et al.*, 2000 ; Nascimento *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2003 ; Ninawe *et al.*, 2008).

Les levures produisent également des xylanases extracellulaires, citons les xylanases de *Cryptococcus* (Biely *et al.*, 1980) et de *Trichosporon cutaneum* SL409 (Liu *et al.*, 1998). Le tableau suivant donne les caractéristiques de quelques xylanases d'origine microbienne.

Tableau I : Caractéristiques des xylanases microbiennes.

Microorganisme	MM(kDa)	Optimum		Stabilité		PI	K _m (mg/ml)	V _{max} (µM/ min /mg)	Référence
		pH	T (°C)	pH	T (°C)				
<i>Acidobacterium capsulatum</i>	41	5	65	3-8	20-50	7,3	3,5	403	Inagaki <i>et al.</i> , 1998
<i>Arthrobacter sp.</i> MTCC 5214	20		100		30 mn à 80		0,9	3571	Khandeparkar <i>et</i> Bhosle, 2006
<i>Bacillus sp.</i> SPS-0	-	6	75	6-9	85	-	-	-	Bataillon <i>et al.</i> , 1998
<i>Enterobacter sp.</i> MTCC 5112	43	9	100		50 jours		3,3	5000	Khandeparkar <i>et</i> Bhosle, 2006
<i>Cellulomonas sp.</i> N.C.I.M. 2353	22- 33-	6,5	55	-	-	8	1,7- 1,5	380-690	Chaudhary <i>et</i> Deobagkar , 1997

	53								
<i>Micrococcus</i> sp. AR-135	56	7.5	55	6.5	40	-	-	-	Gessesse et Mamo,1998
		-9		-10					
<i>Staphylococcus</i> sp. SG-13	60	7,5	50	7,5	50	-	4	90	Gupta et al.,2000
		-		-					
		9,2		9.5					
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp. JW/SL-YS 485	24-180	6,2	80	-	-	4,3	3	-	Shao et al.,1995
						7			
<i>Thermotoga</i> <i>maritima</i> MSB8	40,120	5,4	92-105	-	-	5,6	1,1,-0,29	374,4760	Winterhalter et Liebel, 1995
		6,2							
Moisissures									
<i>Acrophialophora</i> <i>nainiana</i>	17	6	50	5	50	-	0,731-0,343	-	Ximenes et al.,1999
<i>Aspergillus niger</i>	13,5-14,0	5.5	45	5-6	60	9	-	-	Frederick et al.,1985
<i>Thermomyces</i> <i>clypeatus</i>	12	5	50	6,5	-	-	10,4	-	Soren et al., 2010
<i>Cephalosporium</i> sp.	30-70	8	40	8-10	-	-	0.15	-	Bansod et al., 1993
<i>Fusarium oxysporum</i>	20,8-23,5	6	60-55	7-10	30	-	9.5; 8.45, 8.7	0,41,-0,37	Christakopolous et al. , 1996
<i>Geotrichum candidum</i>	60-67	4	50	3-4.5	45	3.4	-	-	Radionova et al. , 2000
<i>Thermomyces</i> <i>lanuginosus</i> THKU-49	24,9	5-7	70	3,5-8	60	-	7,3	-	Khucharoenphaisan et al., 2010
Levure									
<i>Cryptococcus albidus</i>	48	5	25	-	-	-	5,7- 5,3	-	Morosoli et al.,1986
<i>Trichosporon</i> <i>cutaneum</i> SL409	-	6,5	50	4,5	50	-	-	-	Liu et al.,1998
				-					
				8,5					

II-*Jonesia denitrificans*

1-Historique

La souche Prevot 55134^T(DSM20603=ATCC14800 CIP 55.134) est la souche type de l'espèce *Jonesia denitrificans*. Elle a été décrite initialement comme *Listeria denitrificans* (Prevot et al., 1961), bien qu'elle soit morphologiquement différente des autres membres du genre *Listeria*.

Le contenu G+C% ainsi que l'hybridation ADN-ADN (Stuart et Welshimer, 1973) ont permis de l'exclure du genre *Listeria* et de la reclassée dans le genre *Jonesia* (Rocourt et al., 1987).

En se basant sur des études phylogénétiques et notamment sur le séquençage de l'ADN_r16S, *Jonesia denitrificans* a été comptée parmi les membres de *Cellulomonas* et *Promicromonospora* (Stackbrandt et al., 1992) et de ce fait assignée à la famille des Cellulomonadaceae, néanmoins des différences dans la composition en quinones isoprénoïdes ainsi que le G+C% ont été notés.

Des études plus poussées ont toutes fois permis d'exclure *Jonesia* de cette famille d'une part, et d'autre part de l'affilier à une nouvelle famille nommée Jonesiaceae et au sous ordre des Micrococcineae (Stackbrandt et al., 1997).

2-Classification

Selon Fields et al. (2008), la classification de *Jonesia denitrificans* est comme suit :

- ❖ Domaine : Bacteria
- ❖ Phylum : Firmicutes
- ❖ Classe : Actinobacteria
- ❖ Sous classe : Actinobacterideae
- ❖ Ordre : Actinomycetales
- ❖ Sous ordre : Micrococcineae
- ❖ Famille : Jonesiaceae
- ❖ Genre : *Jonesia*
- ❖ Espèce : *Jonesia denitrificans*

3- Caractères généraux et chimiotaxonomie de *Jonesia denitrificans*

Jonesia denitrificans est une bactérie Gram⁺, aéroanaérobie facultative, sous forme de bâtonnet irrégulier fin (0,3-0,5x2-3µm), isolé ou en Y, filamenteuse et coccoïdale dans les vieilles cultures, mobile par une ciliature péritriche et ne sporule pas (**William et Hessayl, 1994**); ayant la capacité de réaliser la dénitrification.

La croissance se fait à des températures de 10°C à 40°C avec un optimum à 30°C; et à des concentrations en NaCl de 5%, l'espèce ne peut pas croître à une concentration de 10% de NaCl.

Elle est chimioorganotrophe, avec un métabolisme fermentaire, fermente le glucose, le cellobiose, la salicine avec production d'acide mais pas de gaz.

Catalase positive, oxydase négative, nitrate réductase positive, rouge de méthyle positif, Voges -Prauskauer négatif.

Elle hydrolyse aussi bien la cellulose et l'amidon mais pas la gélatine ni la caséine (**Prevot, 1960**).

Sur gélose nutritive, elle forme de petites colonies convexes et lisses avec un diamètre de 0,5 à 1,5 mm, grisâtres translucides à opaques qui deviennent jaunâtres en 10 à 20 jours (**William et Hessayl, 1994**).

La paroi cellulaire de la souche Prevot 55134T (Fig. 01) contient la muréine de type A4α, composé de L-Lys-L-Ser-D-Glu seulement, c'est le type A11.48 selon le catalogue DSMZ des souches (http://www.dsmz.de/micro-organismes/main.php?content_id=35). En plus de l'acide muramique et de la glucosamine, la galactosamine est détectable dans l'hydrolysate de la paroi cellulaire de *Jonesia denitrificans*. L'acide 12-méthyl-tétranoïque (C15: 0) et l'acide hexanoïque (C16: 0) constituent les acides gras cellulaires majeurs, et des quantités mineures de l'acide 14-méthyl-hexanoïque (C17: 0) et l'acide tétradécanoïque (C14 : 0) ont également été détectées. Le diphosphatidylglycérol et le phosphatidylinositol ont été identifiés par CCM comme des lipides polaires et la ménaquinone de type MK-9 a été détectée en tant que composant majeur (**Pukall et al., 2009**).

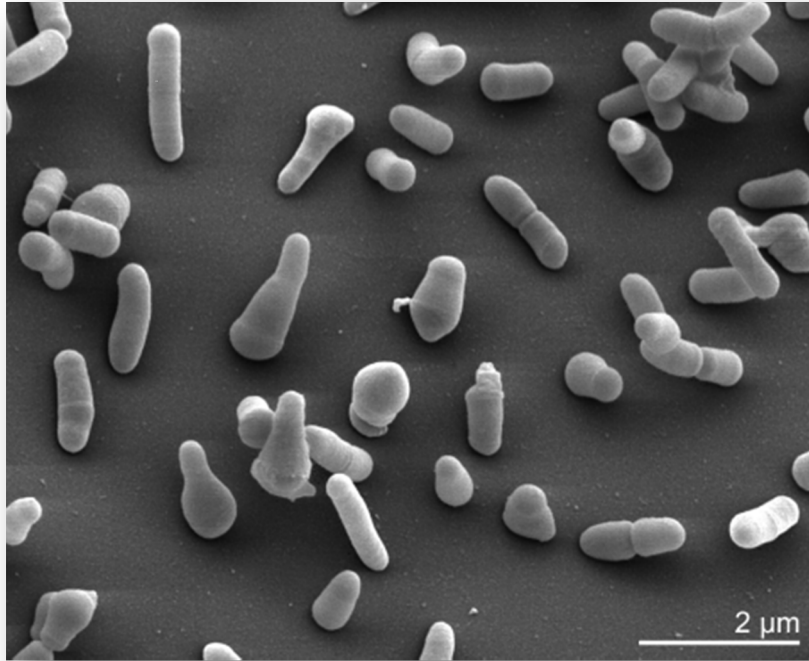


Fig.01: Micrographie électronique de *J. denitrificans* 55134T Prevoit (Pukall et al., 2009).

III-Hémicelluloses

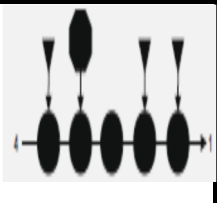
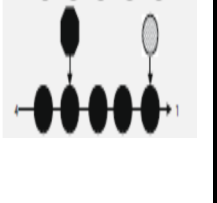
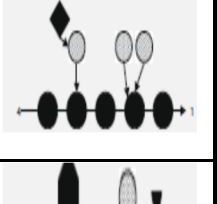
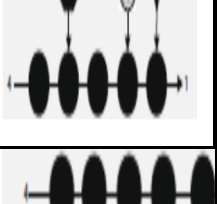
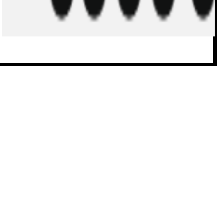
La paroi cellulaire végétale est une matrice extracellulaire composée essentiellement de polysaccharides à 90% (pectine, cellulose et hémicellulose) et de 10% de glycoprotéines, c'est une sorte de charpente procurant à la cellule une forme rigide pour lui éviter de trop grandes déformations et lui confère une éventuelle protection contre les pathogènes (Mc Cann et Roberts, 1991).

L'hémicellulose se localise au niveau de la paroi primaire où elle s'insère avec la cellulose, la pectine et les glycoprotéines, elle se retrouve également dans les parois secondaires, chez les cellules âgées (Mc Cann et Roberts, 1991). C'est un hétéropolysaccharide avec un degré de ramification relativement faible de 80 à 200 (Palqvist et al., 2000; Hamelinck et al., 2005), et selon leur origine, différentes structures peuvent être retrouvées (Tableau II) .

Les xylanes sont les hémicelluloses les plus abondantes dans les parois cellulaires secondaires des végétaux (Saha et al., 2003), ils peuvent constituer plus de 30% de la matière sèche (Joseleau et al., 2002).

Chez les dicotylédones (bois durs et plantes herbacées), ils varient de 20% à 30% et peuvent atteindre 50% dans certains tissus de monocotylédones (Sun et al., 2004).

Tableau II : Structures des différents types de xylanes (Girio et al., 2010).

Type polysaccharidique	Origine biologique	(%)				Degré de polymérisation	Représentation schématique
			Chaîne principale	Chaînes latérales	Liaisons		
Glucuronoxylane	Bois durs	15-30	β -D-Xylp	4-O-Me- α -D-GlcpA Acétyle	α - (1,2)	100-200	
Arabinoglucuronoxylane	Herbes céréales, Bois tendres	5-10	β -D-Xylp	4-O-Me- α -D-GlcpA β -L-Araf	α - (1,2) α - (1,3)	50- 185	
Arabinoxylane	Céréales	0,15-30	β -D-Xylp	α -L-Araf Feruloyle	α - (1,2) α - (1,3)	–	
Glucuronoarabinoxylane	Herbes et céréales	15-30	β -D- Xylp	α -L-Araf 4-O-Me- α -GlcpA Acétyle	α - (1,2) α - (1,3)	–	
Homoxylane	Algues	–	β -D-Xylp	–	–	–	

○ β -L-Araf

■ 4-O-Me- α -D-Glcp

● β -D-Glcp

● β -D-Xylp

▼ Acétyle

◆ Feruloyle

1) Coproduits contenant les hémicelluloses

a- Ecorce d'orange

Dans le secteur de l'agriculture, l'Algérie est un pays producteur d'agrumes, le ministère de l'agriculture s'attend à une production d'un million de tonnes d'agrumes, un chiffre qui dépasse de loin les prévisions escomptées dans les contrats de performance du secteur. La moyenne annuelle de production oscille entre les 300 et 350 milles tonnes (Anonyme 1, 2011), le développement en parallèle d'industrie de jus notamment l'industrie du « pur jus » génère des déchets considérables d'écorce d'orange (Fig.02), d'où l'intérêt de l'utiliser dans diverses industries et notamment comme substrat bon marché dans les milieux de culture.



Fig.02 : Photographie de l'écorce d'orange

La classification de l'oranger selon Pasquier, 1992 est comme suit :

Règne : Végétal

Division: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordre: Sapindales

Famille: Rutaceae

Genre: *Citrus*

Espèce: *Citrus sinensis*.

Le verger agrumicole occupe 50 900 hectares. Ce potentiel est concentré sur 03 wilayas (Mascara, Chlef et Blida).

La composition chimique des écorces d'oranges séchées est représentée dans le tableau III.

Tableau III: Composition chimique globale des écorces d'oranges séchées (a: en g/g ; b : en g/100g de matière sèche) (Kechaoua, 2010)

Composants	Ecorce d'orange
Eau (a)	2,970±0,083
Sucre (b)	46,649±1,859
Protéine (b)	5,855
Cendres (b)	3,313±0,024
Lipides (b)	1,843±0,046
Fibres totales (b)	46,405±0,147

b- Alfa

L'alfa est une plante herbacée vivace qui pousse en touffes d'environ 1m (Fig.03), formant de vastes nappes dans les régions d'aridité moyenne, elle est considérée comme l'un des remparts face à l'avancée du désert grâce à son système racinaire très développé qui permet la fixation et la protection du sol (Zeriahène, 1987).



Fig.03 : Photographie de l'alfa.

La classification de l'alfa est comme suit :

Règne : Végétal

Division: Magnoliophyta

Classe: Liliopsida

Ordre : Cyperales

Famille: Poaceae

Genre: *Stipa*

Espèce: *Stipa tenacissima*.

L'alfa est une graminée typique du bassin méditerranéen (**Laumont et al., 1953**) peuplant essentiellement les hautes plaines steppiques algériennes (**Alcaraz, 1982**).

En Algérie, l'alfa est abondante dans la région oranaise, depuis le littoral jusqu'aux monts des Ksour, sur les hauts plateaux de la région de Ksar Chellala, Djelfa, autour de Boussaada, jusqu'aux montagnes d'Ouled Nail et autour de Laghouat. A l'est, elle se répartit surtout dans les régions ouest et sud de Setif, les Bibans, Boutaleb et Maadi. Elle couvre également une partie importante des versants de montagnes du massif des Aurès.

Mais cette espèce est présente en Espagne orientale et méridionale, au Portugal méridional, aux Baléares, et elle s'étend vers l'est jusqu'en Egypte. Au sud et à l'est, la limite naturelle de l'alfa est déterminée par la sécheresse; en bordure du Sahara, elle est fréquemment localisée sur les bords des oueds temporaires. Au nord et à l'ouest, en revanche, c'est l'humidité croissante du climat qui l'élimine de la flore. L'analyse des matières organiques des fibres d'alfa a donné les proportions de cellulose, d'hémicellulose et de lignine illustrées dans le tableau IV (**Bahloul et al., 2009**).

Tableau IV : Composition chimique de l'alfa (**Bahloul et al., 2009**).

Composant	Proportion (%) (g/100g), de matière sèche
Cellulose	43,81
Hémicellulose	28
Lignine	18,76
Cendre	3,66
Humidité	10,20

c-Rétames

Arbuste saharien de 1 à 3,5 m de hauteur à fleurs blanches de 8-10 mm (Fig.04) gousse non dilatée sur sa nature ventrale contenant une petite graine (**Quezel et Santa, 1962**).



Fig. 04 : Photographie de *Retama raetam*.

Selon Quezel et Santa, 1962, les rétames sont classés dans le taxon suivant :

Règne: Végétal

Embranchement: Spermaphytes

Sous embranchement: Angiospermes

Classe: Dicotylédones

Ordre: Fabales

Super famille: Légumineuses

Famille: Fabacées

Sous famille: Papilionacées

Genre: *Retama*

Espèces: *Retama raetam* .

Les rétames sont caractérisés par une large distribution géographique, originaires du nord-ouest Africain et probablement des îles Canaries (**Zohary, 1959**).

Retama raetam est localisé dans le sud oranais, sud de Djelfa, Ain Safra, Touggourt, au centre de la Kabylie, à l'est de Biskra (**Ighil, 1962**), également à Ouargla (**Allal-benfakih.I; 2006**), c'est une plante commune des écosystèmes arides qui entourent la méditerranée, cette plante utilise comme stratégie d'acclimatation une dormance partielle pour résister aux longues périodes de sécheresse (**Mittler et al, 2002**).

La composition chimique de *Retama raetam* est montré dans le tableau V.

Tableau V : Composition chimique de *Retama raetam*.(**Mahnane, 2010**).

composé	matière sèche	matière minéral	matière organique	cellulose brute	matière azotée
quantité (%)	93,5	5,16	94,84	27,26	9,62

IV- Xylanases

Probablement le groupe d'hémicellulase le plus largement étudié chez les bactéries et les mycètes (**Maijala, 2000**); se sont des glycosidases ou des glycosides hydrolases EC.3.2.1.X qui hydrolysent le xylane.

On distingue généralement, les enzymes qui coupent les liaisons de la chaîne principale, dont les endo- β -1,4-xylanases, et les enzymes dites débranchantes qui hydrolysent les ramifications du polymère (Fig.05), on citera les α -L-arabinofuranosidases, les α -D-glucuronosidases, les feruloyl esterases, les acétyl esterases.

Les endo- β -1,4-xylanases EC 3.2.1.8, jouent le rôle principal par l'initiation de la conversion du xylane en xylooligosaccharides (**Biely, 1985**), puis les β -xylosidases viennent compléter l'action de celle-ci en dégradant cet oligosaccharide en résidus de xylose (**Ghose et Bisaria, 1987 ; Wong et al.,1988 ; Kluepfel et al., 1990 ; Sigrum et al., 1999 ; Trugilo et al., 2002**).

Les endoxylanases d'origine bactérienne et fongique sont presque toutes des enzymes monomériques ayant une masse moléculaire comprise entre 8,5 et 85 kDa et un point isoélectrique qui varie entre 4,0 et 10,3 et la plupart des enzymes d'origine fongique sont glycosylées (**Corral et Villaseñor-Ortega, 2006**).

Alors que la majorité des endoxylanases produites par les actinomycètes, particulièrement le genre *Streptomyces*, possèdent des poids moléculaires qui varient de 15 à 59 kDa, des activités optimales à des pH variant de 4,0 à 8,6 et des températures qui oscillent autour de 50°C et 80°C (**Corral et Villaseñor-Ortega, 2006**).

Les différents sites de coupure des xylanases sont montrés dans la figure ci-dessous.

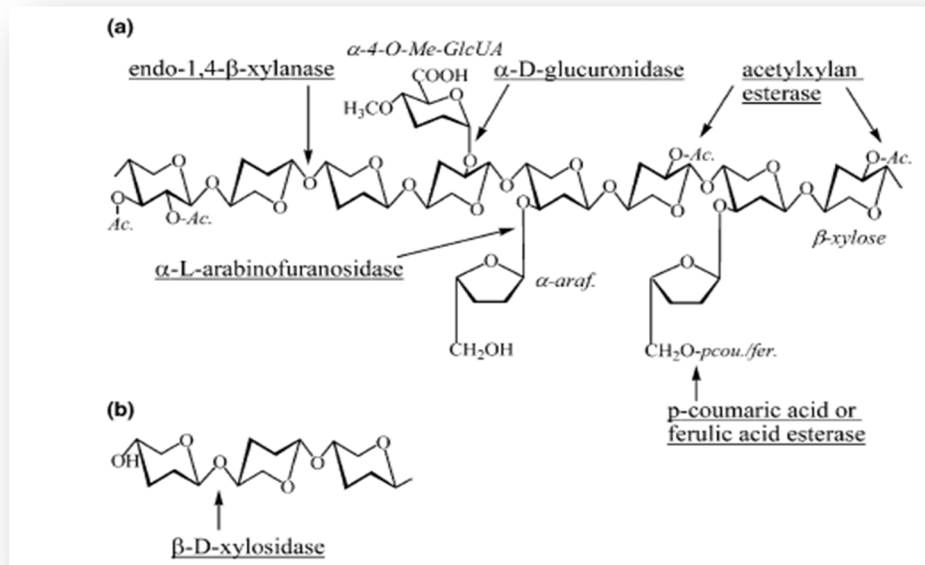


Fig.05: Structure du xylane et les différents sites de coupures des xylanases (Sunna et al.,1998).

(a) sites de coupure du xylane par une enzyme xylanolytique. (b) Hydrolyse du xylo-oligosaccharide par la β-xylosidase.

1-Classification

Face à l'hétérogénéité et la complexité des xylanes, les microorganismes déploient tout un panel de xylanases qui catalysent la réaction en synergie afin d'arriver à l'hydrolyse complète de ces xylanes.

La classification des enzymes se base essentiellement sur leurs propriétés physicochimiques, selon Wong et al. en 1988 on distingue :

- ✚ Les xylanases de faibles PM (< 30kDa) et ayant un pI basique.
- ✚ Les xylanases de PM élevé (> 30kDa) et ayant un pI acide.

De nombreuses xylanases soit 30% d'entre elles, majoritairement d'origine fongique, ne pouvaient y être classées (Sunuar et Antranikian, 1997), c'est pour cela qu'un nouveau système basé sur la comparaison des structures primaires des domaines catalytiques a été proposé (Henrissat et al., 1991 ; Henrissat et Davies, 1997).

En 2005, Collins et al. ont rapporté 96 familles de glycosides hydrolases, les enzymes possédant une activité xylanolytique β (1,4), appartiennent aux familles 5, 8, 10, 11, 16, 26, 43 et 62, les endo- β -1,4-xylane hydrolases appartiennent aux deux familles 10 et 11, les enzymes faisant partie des familles 16 et 62 sont dites bifonctionnelles avec deux domaines catalytiques (Flint et al., 1993 ; Hernandez et al., 2001) et enfin les enzymes de la famille 26 qui sont pourvues d'une activité endo β -1,3- xylanase, actuellement cette classification est disponible dans la banque de donnée CAZY (Henrissat et al., 1991 ; Henrissat et Davies, 1997).

2- Applications des xylanases

Les applications des xylanases dans différentes industries se sont largement diversifiées, les plus répondues sont citées ci-dessous :

➤ Industrie papetière : Le procédé le plus utilisé est le procédé kraft, le prétraitement de la pâte à papier par les xylanases permet une élimination spécifique du xylane, action renforcée et facilitée par la présence d'une laccase, le blanchissement par le procédé chimique n'en sera que plus favorisé et en parallèle, ça permet une réduction considérable d'agents chimiques polluants en particulier le chlore, l'impact sur l'environnement sera amoindri (Ali et Sreerishnan, 2001).

Actuellement plusieurs xylanases produites par divers microorganismes sont employées dans la fabrication du papier, citons la xylanase extraite à partir de *Trichoderma reesei* (Dhiman et al., 2008).

- Industrie du textile: Elles sont souvent utilisées lors de l'étape de dégraissage et de blanchissement afin de remplacer le traitement chimique utilisant des concentrations élevées en hydroxyde de sodium, de solution de peroxyde et d'hypochlorite de sodium, qui endommagent les fibres, alors que les xylanases agissent de manière spécifique sur les impuretés; les fibres deviennent lisses et souples (Dhiman et al., 2008).
- Production d'éthanol: Ce procédé consiste en une bioconversion de la biomasse lignocellulosique en bioéthanol; celui-ci peut être utilisé pour oxygéner le carburant en élevant son contenu en oxygène, permettant ainsi une meilleure oxydation des hydrocarbures et une réduction des gaz à effet de serre dans l'atmosphère (Girio et al., 2010).
- Amélioration de la biodigestibilité, en diminuant la viscosité, et augmentation de la valeur nutritionnelle des aliments destinés à l'alimentation animale (Bedford et Classen, 1992).

- Clarification des jus de fruits et des vins (**Biely, 1985 ; Yusof et Ibrahim, 1994**).
- Amélioration de la macération des parois cellulaires pour la production de protoplastes (**Wong et al., 1988**).
- Amélioration du pain, il est plus volumineux, surtout lorsque les xylanases sont associées aux amylases (**Maat et al., 1992**).
- Le xylose peut être converti biotechnologiquement en xylitol (**Winkelhausen et Kuzmanova, 1998**). Le xylitol ($C_5H_{12}O_5$) est un polyol qui possède des propriétés intéressantes ce qui fait sa haute valeur pour les industries pharmaceutiques, odontologiques et alimentaires.

V-Système à deux phases aqueuses

La récupération et la purification de biomolécules est un processus complexe et coûteux, par conséquent, il n'est pas surprenant qu'il représente près de 60 à 90% du coût total d'un processus biologique (**Kula et al., 1982**).

Les techniques classiques de traitement en aval actuellement utilisées présentent plusieurs inconvénients, le degré de résolution de la centrifugation est faible et la dépense d'énergie y est élevée. L'extraction en utilisant les solvants organiques peut causer d'importantes dénaturations des biomolécules comme les protéines et les acides nucléiques (**Albertsson, 1971**). Les solvants organiques sont généralement coûteux et posent des effets environnementaux potentiellement dangereux.

Les méthodes chromatographiques, bien que très spécifiques, ne peuvent traiter que de petites quantités à la fois et nécessitent un appareillage sophistiqué.

En plus, l'un des défis majeurs dans le secteur de la biotechnologie est la purification à grande échelle d'une protéine désirée à partir d'un milieu de fermentation contenant une grande variété de biomolécules. Une stratégie pour relever ce défi est d'utiliser une solution à deux phases aqueuses comme première étape pour la purification partielle d'enzymes industrielles (**Banik et al., 2003**).

Un système à deux phases aqueuses (SDPA) est formé lorsque de faibles concentrations de deux polymères incompatibles (ou d'un polymère et un sel inorganique) sont mélangés de telle sorte que deux phases non miscibles coexistent. Le partitionnement sélectif des protéines entre deux phases aqueuses est le principe de cette technique (**Albertsson, 1986**), où la phase supérieure est riche en un polymère et la phase lourde (phase inférieure) est riche en un second polymère ou un sel.

L'SDPA décrits par Albertsson en 1950, a été utilisé pour la récupération et la purification des différents bioproduits. Il s'agit notamment de protéines (**Ragahavarao, 1998**), de virus (**Rito-Palomares et al., 2004**), les particules qui ressemblent aux virus (**Gaikaiwari et al., 1996**), l'inclusion des organismes (**Mayerhoff et al., 2004**) et l'ADN plasmidique (**Gautam et al., 2006 ; Vaidya et al., 2006**).

Les SDPA les plus largement étudiés sont ceux formés par le polyéthylène glycol (PEG) et le dextrane. En raison du coût élevé du dextrane, ce système n'est pas intéressant

d'un point de vue économique par rapport à d'autres méthodes de purification, mais d'autres systèmes utilisant des sels au lieu du dextrane ont été considérés (**Albertsson, 1986**).

Plusieurs sels tels que le phosphate de potassium, le phosphate de sodium, le phosphate de citrate, le Chlorure de sodium, Chlorure de potassium, Chlorure d'ammonium peuvent former un SDPA avec divers polymères et particulièrement le PEG (**Hotha et Banik, 1997**).

Un tel système peut être représenté par une courbe binodiale comme le montre la figure ci-dessous :

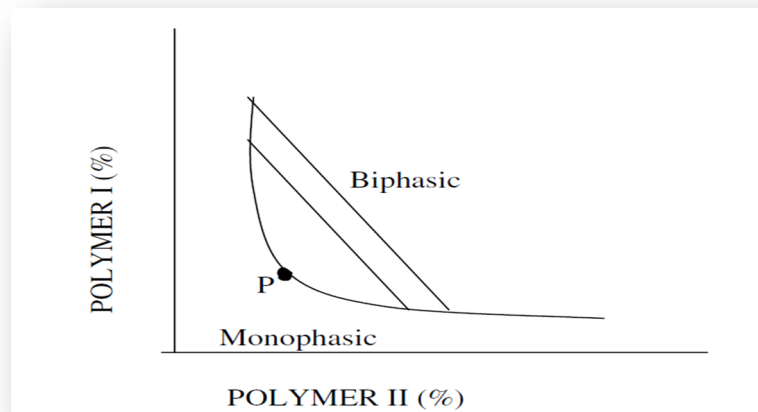


Fig.06 : Courbe binodiale dans un diagramme de phase (**Albertsson, 1971**).

P: point critique

Tous les points situés au-dessus de la courbe binodiale donnent un système hétérogène, alors que tous ceux qui sont en dessous de celle-ci forment un système homogène (**Albertsson, 1971**). Les lignes parallèles représentent les systèmes en phase et enfin, le point P est appelé le point critique (**Albertsson, 1971**).

Un potentiel électrique est créé entre les deux phases quand un sel est inclus dans le système de phase. Une différence de potentiel, même de l'ordre du mV, aura une influence sur la répartition des macromolécules chargées (**Albertsson, 1986**).

Pour l'efficacité de l'SDPA, la sélection du système de phase approprié et les conditions opératoires est très importante (**Madhusudhan et Raghavarao, 2011**), il est donc nécessaire d'assurer que chaque système se situe au-dessus de la courbe binodiale dans le diagramme de phase respectif pour assurer une bonne séparation de phase.

Comme l'SDPA peut éliminer les contaminants tels que les acides nucléiques et les protéines indésirables (**Chiang et al., 2006**), il a été utilisé avec succès pour purifier des enzymes extracellulaires, telles que la xylanase (**Jain et Johri., 1999 ; Antov et al., 2006**), la β -xylosidase (**Pan et al., 2001**), la β -glucosidase (**Johansson et al., 1998**), l'endo polygalacturonase (**Pereira et al., 2003**), l'amyloglucosidase (**Tanuja et al., 1997**), l' α -galactosidase et la β -galactosidase (**Silva et al., 1999 ; Silva et al., 1997**).

Jusqu'à présent, peu d'études sur l'extraction de xylanases par SDPA ont été rapportées, dont quelques-unes ont porté sur le partitionnement des xylanases bactériennes (**Duart et al., 1999 ; Bim et franco, 2000**) et quelques autres concernent le partitionnement des xylanases fongiques (**Costa et al ., 1998 ; Jain et johri, 1999**).

➤ **Paramètres influençant la répartition des protéines dans un système à deux phases aqueuses**

La séparation et la purification des protéines est régie par un certain nombre de paramètres, tels que le pH du système, la température influençant sur la courbe binodiale (**Albertsson, 1986**), le type et la concentration de sel présent dans le système (**Zaslavsky et al., 1985**), la masse moléculaire et la concentration de polymère et les propriétés des protéines tels que la structure, l'hydrophobicité, la masse moléculaire et le pI (**Albertsson , 1986**).

➤ **Les avantages de l'SDPA**

L'SDPA offre de nombreux avantages, particulièrement un faible coût des matières, une faible consommation d'énergie (**Kula et al., 1982**), une biocompatibilité (**Albertsson, 1986**), de meilleurs rendements dans un laps de temps court sans répercussions néfastes sur l'environnement (**Kula et Vernau, 1990**). Un tel système comprend un transfert de masse rapide en raison de faible tension interfaciale. En outre, ce système est facilement mis en place (**Abbot et al., 1990**).

Cette technique s'est révélée être un excellent système de purification de xylanases dans une opération qui se déroule en une seule étape (**Yang et al., 2006**).

A-Matériel

Pour la réalisation de ce travail, le matériel cité ci-dessous a été utilisé :

- Rotavapor (BUCHI Rotavapor R-114) ;
- Vortex (VELP Scientifica) ;
- Balance (Scouttmpro) ;
- Balance (Ae ADAM (AFA-120LC) ;
- Bain marie à 50°C (Mettler) ;
- Bain marie à 100°C (GFL) ;
- Etuve à 37°C (Mettler) ;
- Four Pasteur (Haeraens DVR_Z) ;
- Centrifugeuse (Sigma 2-16K) ;
- Centrifugeuse à 4 °C (mikro120 Hettick Zentrifugen) ;
- pH mètre (HANNA pH210) ;
- Plaque agitatrice (AM4 VELP Scientifica) ;
- Spectrophotomètre (UV^{mini}₁₂₄₀ SHIMADZU) ;
- Micropipette de 10µl,1000µl et 5000µl ;
- Tamis (Retsch^R Test siere, 1500 micron).

Le matériel biologique utilisé était *Jonesia denitrificans* BN13 ayant les caractéristiques suivantes : Couleur de colonies jaunâtres devenant grises après 30 jours et de forme convexe, bacille irrégulier, la croissance se fait de 15°C à 45°C avec un optimum de 37°C, dans un pH de 5 à 12, et à des concentration de 10% de NaCl.

B-Méthodes

I-Préparation des substrats

L'écorce d'orange a été obtenu à partir d'oranges achetées chez les commerçants, les oranges sont lavées, puis le zeste est séché à l'air libre.

L'alfa et les rétames ont été fournis par la directrice du laboratoire d'écologie microbienne, la poudre d'alfa a été obtenue après un broyage manuel suivi d'un tamisage (Retsch^R Test siere 1500 micron), alors que la poudre des rétames a été récupérée après broyage des feuilles, puis tamisage par un tamis (Retsch^R Test siere, 1500 micron).

II- Préparation et ensemencement des milieux de culture

Quatre petites colonies ont été prélevées à partir d'une boîte de Pétri, contenant le milieu MM7 solide (annexe I) et repiquées sur milieu de préculture MM7 liquide, puis le milieu est incubé à 37°C pendant 24h.

Cette préculture sert pour ensemercer à raison de 2% (v/v) trois milieux de culture liquides à base d'écorce d'orange, d'alfa et des rétames (annexe I), répartis dans des erlens d'une contenance de 500 ml ayant un volume utile de 100 ml.

Deux séries de culture (à base d'écorce d'orange, d'alfa et de rétames) ont été lancées, la première a été préalablement centrifugée avant l'application du système à deux phases aqueuses (SDPA), alors que la deuxième série a servi pour l'application direct du système, tous les milieux sont incubés à 37°C, seul le temps d'incubation change.

Le milieu à base d'écorce d'orange est incubé pendant 3 jours, celui de l'alfa pendant 2 jours, alors que la période d'incubation du milieu à base des rétames dure 5 jours.

III-Préparation du système à deux phases aqueuses (SDPA)

Deux études parallèles ont été entreprises.

Dans la première étude, les milieux de culture sont d'abord centrifugés pendant 10 min à 4000 g, puis ils subissent le traitement SDPA.

Dans la deuxième, on applique directement le système :

- Les cultures à base d'écorce d'orange, à base de l'alfa et à base des rétames ont été filtrées sur papier Whatman n° 01 dans le but de se débarrasser des résidus solides en suspension dans les milieux.
- Le filtrat est additionné à 3.5% (m/v) de PEG 4000 (prolabo), 14% (m/v) de KH_2PO_4 / K_2HPO_4 - 9% (m/v) de KI, agité et ajusté à pH 7, puis laisser sous sédimentation dans une ampoule à décanter.
- Les activités enzymatiques ainsi que les protéines totales sont dosées, les rendements, les coefficients de partage et les facteurs de purification sont mesurés.

IV-Méthodes analytiques

1/Mesure de la biomasse

La mesure de la biomasse est effectuée à une longueur d'onde de 600 nm, dans un spectrophotomètre (Shimadzu UVmin-1240V), un témoin est prévu à chaque fois, il s'agit du milieu de culture sans ensemencement.

2/Mesure de l'activité xylanasiq

L'activité xylanasiq est déterminée en présence du xylane de bouleau (Fluka) préparé dans une solution tampon. Le xylane de Bouleau est mis en suspension à raison de 1% (m /v) dans du tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 7). Le mélange réactionnel est composé de 100 μl d'extrait brut auxquels sont ajoutés 900 μl de xylane à 1% à pH 7. Ce mélange est chauffé à 50°C pendant 10 mn (**Wang et al., 2003**).

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

Le témoin correspond à la solution de xylane incubée sans l'extrait brut à 50°C pendant 10 mn, puis on ajoute 1,5 ml de DNS et 0,1 ml de l'extrait brut .

Après refroidissement dans la glace, la lecture des absorbances est effectuée à 540 nm (Shimadzu UVmin-1240V).

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 l'extrait brut 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).

3/ Dosage des sucres réducteurs

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

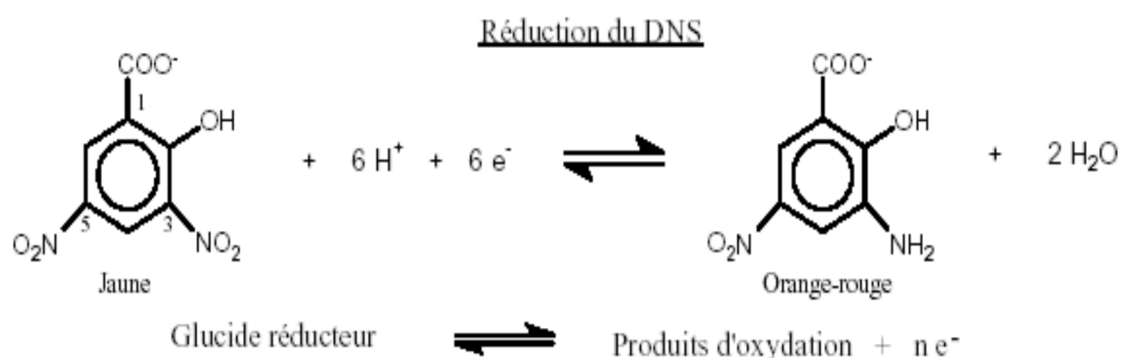


Fig. 07 : Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS (**Bailey et al., 1992**).

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

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

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

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

4/Dosage des protéines totales

Les quantités de protéines sont estimées selon la méthode de **Bradford (1976)** avec le réactif bleu brillant de Coomassie G250 (Fluka) (annexe II).

On utilise deux méthodes simultanément : la macrométhode et la microméthode.

a/La macrométhode

Cette méthode permet de doser des quantités des protéines comprises entre 0,2 et 1mg/ml.

Le dosage consiste en un premier temps, à ajouter 100 µl d'échantillon à 5 ml de solution de bleu de Coomassie. Le mélange après homogénéisation, est ensuite placé 5 minutes à l'obscurité, et l'absorbance est mesurée à 595 nm.

Les concentrations protéiques ont été calculées par interpolation linéaire à partir d'une gamme étalon contenant de la BSA.

Gamme étalon :

Solution mère de BSA 1mg/ml.

Tableau VII: 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 distillée (µl)	100	80	60	40	20	0

b/La microméthode

Cette technique permet de doser des quantités des protéines comprises entre 2 et 10 µg/ml. Le dosage consiste à ajouter 800 µl d'échantillon à 200 µl de solution de bleu de

Coomassie. Le mélange, après homogénéisation, est ensuite placé 5 mn à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 595nm.

Gamme étalon :

Solution mère de BSA à 10µg/ml

Tableau VIII : 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 distillée(µl)	800	640	480	320	160	0

V-Mesure des différents paramètres

1/Mesure du rendements (%)

Le rendement représente l'activité enzymatique, après application du système (SDPA), dans la phase considérée, par rapport à l'activité enzymatique dans l'échantillon avant l'application du système (Hebert E., 1982).

$$R(\%) = \frac{\text{Acti} \acute{o} \text{é} \text{n} \text{z} \text{y} \text{m} \text{a} \text{t} \text{i} \text{q} \text{u} \text{e} \text{ d} \text{e} \text{ l} \text{a} \text{ p} \text{h} \text{a} \text{s} \text{e} \text{ c} \text{o} \text{n} \text{s} \text{i} \text{d} \text{é} \text{e}}{\text{Acti} \acute{o} \text{é} \text{n} \text{z} \text{y} \text{m} \text{a} \text{t} \text{i} \text{q} \text{u} \text{e} \text{ d} \text{e} \text{ l} \text{a} \text{ p} \text{h} \text{a} \text{s} \text{e} \text{ i} \text{n} \text{i} \text{t} \text{i} \text{a} \text{l} \text{e}} \times 100$$

2/ Coefficient de partage (K)

Le coefficient de partage nous indique la répartition de l'activité enzymatique dans la phase supérieure et inférieure (Hebert E., 1982).

$$K = \frac{\text{Acti} \acute{o} \text{é} \text{n} \text{z} \text{y} \text{m} \text{a} \text{t} \text{i} \text{q} \text{u} \text{e} \text{ d} \text{e} \text{ l} \text{a} \text{ p} \text{h} \text{a} \text{s} \text{e} \text{ s} \text{u} \text{p} \text{é} \text{r} \text{i} \text{e} \text{u} \text{r} \text{e}}{\text{Acti} \acute{o} \text{é} \text{n} \text{z} \text{y} \text{m} \text{a} \text{t} \text{i} \text{q} \text{u} \text{e} \text{ d} \text{e} \text{ l} \text{a} \text{ p} \text{h} \text{a} \text{s} \text{e} \text{ i} \text{n} \text{f} \text{é} \text{r} \text{i} \text{e} \text{u} \text{r} \text{e}}$$

3/ Facteur de purification FP

C'est le rapport de l'activité spécifique après SDPA sur cette grandeur avant l'application de ce système (Hebert E., 1982).

$$FP = \frac{\text{Acti} \acute{o} \text{é} \text{s} \text{i} \text{p} \text{é} \text{c} \text{i} \text{f} \text{i} \text{q} \text{u} \text{e} \text{ a} \text{p} \text{r} \text{è} \text{s} \text{ S} \text{D} \text{P} \text{A}}{\text{Acti} \acute{o} \text{é} \text{s} \text{i} \text{p} \text{é} \text{c} \text{i} \text{f} \text{i} \text{q} \text{u} \text{e} \text{ a} \text{v} \text{a} \text{n} \text{t} \text{ S} \text{D} \text{P} \text{A}}$$

VI- Zymogramme

1/Préparation du gel d'électrophorèse

On ajoute le xylane de bouleau à 0,1% (m/v) au gel de séparation (annexe III), ce mélange est versé entre deux plaques mises dans un dispositif qui maintient les deux plaques (Fig. 08), le gel occupe deux tiers de la plaque, après polymérisation, le gel de concentration à 7,5% (annexe II) est coulé au dessus du gel de séparation, le peigne est inséré immédiatement jusqu'à complète polymérisation du gel de concentration.

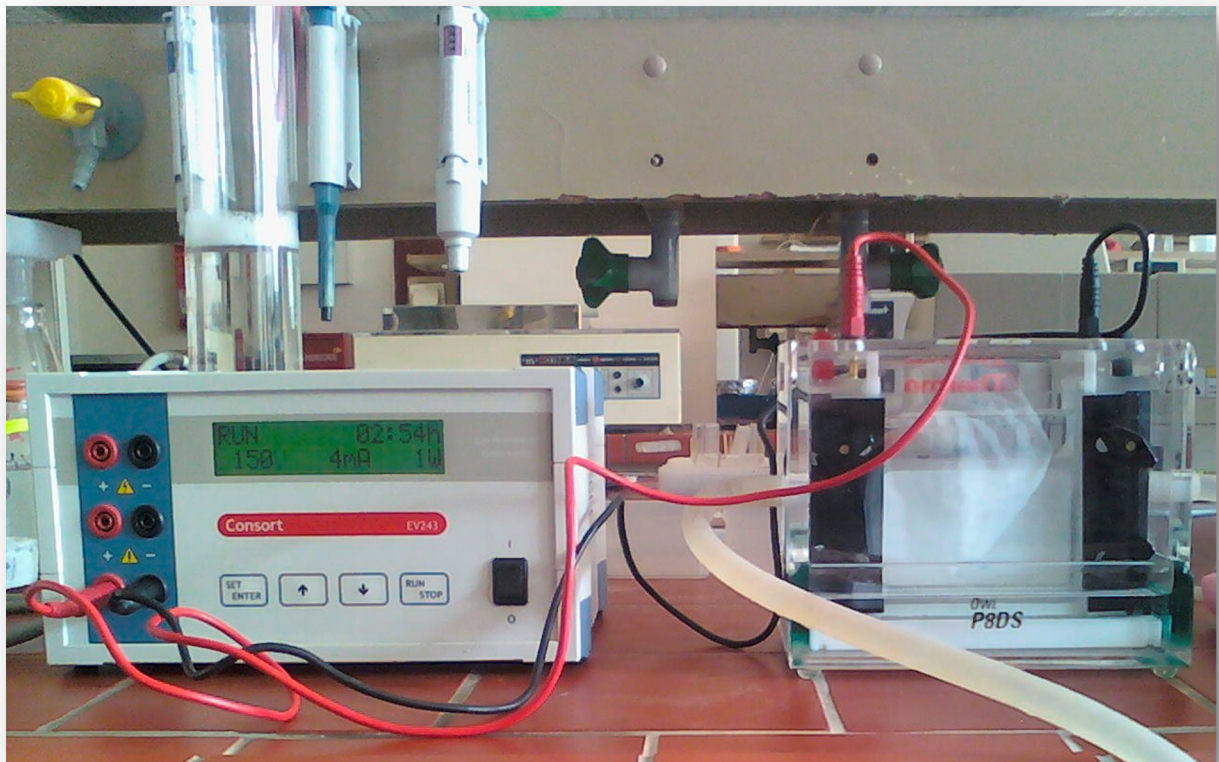


Fig. 08 : Dispositif d'électrophorèse (VELP Scientifica).

2/Préparation des échantillons

75 μ l d'échantillon sont mélangées avec 25 μ l du tampon d'échantillon (annexe III), Puis chauffé à 100°C pendant 5 min.

3/Réalisation du zymogramme

Tout d'abord le peigne est retiré du gel et les plaques sont mises dans la cuve d'électrophorèse, le compartiment intérieur et extérieur sont remplis avec du tampon de migration (annexe II).

Les milieux de culture ayant fait l'objet d'une application direct du SDPA ont servi d'échantillons pour la réalisation du zymogramme.

Dans les puits, on dépose 20µl de l'échantillon préalablement concentré (X10) au rotavapeur (BUCHI Rotavapor R-114); la migration s'est faite à 100 V pendant 20 mn et à 150 V pendant 1h30; lorsque le bleu de bromophénol est à 1cm du bord inférieur de la plaque, la migration est arrêtée, le gel est rincé à l'eau distillée et subit les traitements suivants:

- Immersion dans une solution de triton X-100 à 2,5% (m /v) pendant 30 mn ;
- Le gel est débarrassé du triton X-100 par rinçage à l'eau distillée puis incubé dans du tampon phosphate 50mM, pH 7 à 50°C pendant 20mn sous agitation;
- Coloration au rouge Congo (0,1%) (m/v) pendant 15 mn ;
- Lavage avec une solution de NaCl à 1M ;
- Immersion dans de l'acide acétique 0,5% (m /v) pour stopper la réaction et augmenter le contraste (**Gallardo et al., 2004**).

Résultats et discussions

I- Mesure de la biomasse et des activités xylanasiques

Après ensemencement des milieux de culture à base d'écorce d'orange, d'alfa et de Rétames et leur incubation à 37°C pendant 3, 2 et 5 jours respectivement, on observe un trouble, ce qui indique la croissance de la souche *Jonesia denitrificans* BN13 sur ces milieux.

La biomasse a été mesurée à 600nm pour chacun des milieux et les résultats obtenus sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau IX: Mesure de la biomasse à 600 nm.

DO	Avant ensemencement	Après ensemencement	après soustraction
Milieu à base des coproduits			
Ecorce d'orange	0,265	1,730	1,465
Alfa	0,526	2,011	1,485
Rétames	0,600	1,835	1,235

Les résultats montrent qu'il y a effectivement une croissance dans les trois milieux, cependant la souche a bien poussé sur le milieu à base d'alfa, ce qui veut dire que la souche *Jonesia denitrificans* BN13 possède la machinerie enzymatique nécessaire pour l'utilisation de ce coproduit et sachant qu'il est ligneux (18,76%) cela suggère que la souche possède au moins une laccase.

Deux séries d'ensemencement de chaque milieu de culture à base de chacun des trois coproduits ont été réalisées, après fermentation, le surnageant de culture de chaque milieu fait l'objet d'une mesure de l'activité xylanolytique selon la méthode de **Baily et al., 1992**; les résultats obtenus sont représentés dans le tableau X :

Tableau X : Récapitulatif des activités xylanolytiques.

Milieux à base de coproduits	Activité (U/ml)
Ecorce d'orange (série 1)	0,662
Ecorce d'orange (série2)	0,336
Alfa (série 1)	0,711
Alfa (série 2)	0,44
Rétames (série 1)	0,853
Rétames (série 2)	0,45

Les activités obtenues sont considérées comme étant faibles par rapport aux activités décrites chez la majorité des souches d'actinomycète (**Wang et al., 2003**).

Plusieurs travaux ont testé la production de xylanases sur milieu à base de xylane pur tel que le xylane de bouleau, le xylane d'épeautre et d'avoine, **Nascimento et al., (2002)** ont rapporté une activité de 10,3 U/ml dans une culture de *Streptomyces sp.* AMT-3 incubée pendant 10 jours, (Tableau XI) ; **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).

Néanmoins une activité de 0,39U/ml a été rapportée chez la moisissure *Aspergillus terreus* cultivé dans 1% de xylane de bouleau (**Geweely et al., 2011**).

La comparaison de nos résultats avec les autres travaux doit tenir compte de la nature du substrat et de sa pureté ainsi que de sa concentration, en plus des contaminants, cela pourrait expliquer en partie ces faibles activités obtenues.

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 production de xylanases par divers microorganismes dans des milieux liquides ont été testée (tableau XI).

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

Microorganismes	Substrats	Conditions de culture	Activités (U/ml)	Références
<i>Jonesia denitrificans BN13</i>	Xylane de bouleau, 7 g/l	41 fermenteur, 37 °C, pH 7, 2 jours	10,80	Boucherba et al., 2011
<i>Streptomyces sp. Ab106</i>	xylane, 10 g/l	41 fermentation, 55 °C, pH 7,5, 5 jours	8	Techapun et al., 2002
<i>Penicillium oxalicum</i>	Son de blé, 5%	45°C, pH 8 pendant 6jours	3,89U/ml	Muthezhilan et al., 2007
<i>Streptomyces actuosus</i>	Son de riz, 50 g/l	37 °C, pH 5, 4 jours	11,60	Wang et al., 2003
<i>Fusarium solani F7</i>	Paille de blé 30 g/l	Erlen sous agitation, pH 5.5, 30 °C, 10 jours	78,32	Gupta et al., 2009
<i>Bacillus pumilus</i>	Son de blé, 10 g/l	Erlen sous agitation, 35°C, pH 9, 3 jours	430	Prema et Asha Poorna, 2006
<i>Thermobifida fusca</i>	Son de blé 20 g/l	Erlen sous agitation 50 °C, pH 9.0, 3jours	6,68	Liu et al., 2007
<i>Coriolus versicolor</i>	Pulpe de tomate	Erlen sous agitation, 25 °C, 14 jours	2,56	Freixo et al., 2008
<i>Jonesia denitrificans BN13</i>	Ecorce d'orange 5%	Erlens sous agitation 37°C, 5jours, pH 7	8,4	Boucherba, 2011

La production de xylanases par *Jonesia denitrificans* BN13 a été testée par fermentation dans des milieux liquides à base d'écorce d'orange; 8,4 U/ml sont mesurées au bout du 5^{ème} jour d'incubation (**Boucherba, 2011**).

L'activité enzymatique que nous avons obtenu dans le milieu à base d'écorce d'orange reste toujours faible comparé à l'étude citée précédemment, la variété de l'orange, la concentration d'écorce d'orange utilisée (1% au lieu de 5%) (**Boucherba, 2011**), l'absence d'agitation (Shaker), la présence probable de résidus de pesticides, mais aussi l'écorce d'orange utilisé dans les études antérieures était en poudre et par conséquent le substrat était plus accessible aux cellules.

Un certain nombre de travaux concernant l'utilisation des déchets agricoles et industriels ont été rapportés.

Seyis et Akso (2005) ont testé la production de xylanase dans une culture de *Trichoderma harzianum* 1073 D3, sur des substrats à base d'écorce d'orange et de citron; les résultats ont révélé une meilleure activité avec l'écorce de citron.

Dans une étude effectuée avec *Streptomyces actuosus* A-151, l'addition d'écorce d'orange dans le milieu de culture stimule la production des xylanases (**Wang et al., 2003**).

Cependant, **Knob et al. (2008)** ont montré que l'activité n'était pas significative avec une culture de *Penicillium sclerotium* ayant comme substrat l'écorce d'orange.

Une activité xylanasique relativement faible a été détectée chez *Aspergillus carneus*, *Cochliobolus sativus*, *Bacillus subtilis* et *Sclerotinia sclerotiorum* S2M34 en utilisant l'écorce d'orange comme substrat (**Saleem et al., 2002 ; Fang et al., 2007 ; Ellouze et al., 2008 ; Bakri et al., 2008**).

Des divergences d'activité subsistent aussi entre deux milieux de culture à base du même substrat (série 1 et série 2), car il faut prendre en considération la variété de l'écorce d'orange, et la qualité de l'alfa qui était vraiment de qualité inférieure de même pour les rétames qui avaient un taux d'humidité plus élevé comparé aux premières cultures.

II-Préparation du SDPA

Le système contenant 3,5% (m/v) de PEG 4000 (Prolabo), 14% de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -9% KI (m/v) est préparé dans les milieux de culture cités précédemment, après agitation et décantation dans une ampoule à décanter (Fig.09), deux phases se forment. Ce résultat concorde avec les résultats obtenus par **Yasinok et al., 2010**.



Fig. 09: Formation des deux phases .

L'SDPA a été appliqué ainsi qu'un deuxième système qui consiste à centrifuger les cultures pour éliminer les cellules avant l'application de l'SDPA .

1-Cultures centrifugées avant SDPA

Les milieux de fermentation sont centrifugés à 4000 g pendant 10 mn afin d'éliminer les cellules, puis ils font l'objet de l'application du système à deux phases.

Les différents paramètres mesurés sont résumés dans le tableau XIII :

Tableau XIII : Récapitulatif des paramètres mesurés après SDPA pour les milieux de culture centrifugés.

	Paramètres Echantillons	Activité (U/ml)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Coefficient de partage (K)	Facteur de purification (FP)
Milieu à base d'écorce d'orange	surnageant	0,662	0,171	100		1
	phase supérieure	0,45	0,3	67,97	2,52	1,75
	phase inférieure	0,178	0,178	26,88		
Milieu à base d'alfa	surnagent	0,711	0,11	100		1
	phase supérieure	0,393	0,32	55,27	1,25	2,87
	phase inférieure	0,313	0,08	44,73		
Milieu à base de Réta mes	surnagent	0,853	0,114	100		1
	phase supérieure	0,593	0,059	69,51	2,23	1,93
	phase inférieure	0,266	0,032	30,49		

Dans le milieu à base d'écorce d'orange l'activité xylanase est répartie majoritairement dans la phase supérieure, dans le milieu à base d'alfa l'activité est répartie quasiment de façon équivalente entre les deux phases aqueuses, alors que dans le milieu à base de réta mes 69,51% de l'activité est retrouvée dans la phase supérieure.

Les coefficients de partage concordent avec les travaux rapportés par **Kulkarni et al., 1999** ; **Jain et Johri 1999**, qui ont réalisé la séparation des xylanases dans la phase supérieure avec un maximum de coefficient de partage de 1,2; 3,6. Cependant **Bim et al., 2000** ont rapporté un coefficient de partage de 46,9, les cellules ont été séparées avant l'application du SDPA.

2-Système à deux phases aqueuses

Les activités catalytiques, les activités spécifiques, les rendements de l'activité enzymatique, le coefficient de partage et le facteur de purification ont été calculés pour les

phases supérieures et inférieures et ce par rapport au surnageant de culture après l'application du SDPA, les résultats obtenus sont résumés dans le tableau IX :

Tableau XII: Récapitulatif des résultats obtenues après application du SDPA .

	Paramètres Echantillons	Activité (U/ml)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Coefficient de partage (K)	Facteur de purification (FP)
Milieu à base d'écorce d'orange	surnagent	0,336	0,24	100		1
	phase supérieure	0,242	0,334	72,18	2,75	1,38
	phase inférieure	0,088	0,1	26,2		
Milieu à base d'alfa	surnagent	0,44	0,3275	100		1
	phase supérieure	0,169	0,046	38,40	0,67	1,78
	phase inférieure	0,253	0,077	57,5		
Milieu à base des Rétames	surnagent	0,45	0,121	100		1
	phase supérieure	0,1	0,1	17,8	0,27	1,63
	phase inférieure	0,37	0,195	82,22		

Concernant l'écorce d'orange, l'activité enzymatique est retrouvée majoritairement dans la phase supérieure (72%), à l'opposé, l'activité enzymatique des deux autres milieux à base de l'alfa et des rétames se retrouvent dans la phase inférieure avec un rendement plutôt élevé de 82% pour le milieu à base des rétames et un rendement plus faible pour le milieu à base d'alfa (57,5%), les facteurs de purification sont relativement faibles, la xylanase produite par *Bacillus pumilus* a été extraite à partir du milieu de fermentation en utilisant l'SDPA, le système contenait 22% de PEG-6000, 10% K_2HPO_4 et 12% NaCl, les résultats affichent un facteur de purification de 33 et un rendement de 98% de l'activité enzymatique. La plupart de l'activité xylanasiq ue purifiée a été recueillie dans la phase supérieure, où trois principales

isoenzymes sont détectées ayant des PM. de 22,6, 32,6 et 74,2 kDa sur gel d'électrophorèse dénaturante (SDS-PAGE) (**Bim et al., 2000**).

Paecilomyce thermophila J18, isolée par yang et al. en 2006, produit de grandes quantités de xylanase thermostable, lorsqu'elle est cultivée en fermentation solide. La xylanase a été purifiée jusqu'à l'homogénéité en utilisant l'SDPA en une seule étape, le système optimal pour l'extraction de la xylanase a été réalisé à pH 7,2 contenant 12,5% (m/m) de PEG-4000 et 25% (m/m) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, avec un coefficient de partage de 231,7, un facteur de purification de 5,54 et un rendement de 98,7% dans la phase supérieure.

Les xylanases alcalines de *Bacillus Pumilus* ont été extraites par un SDPA composé de 16% de PEG-6000 et le sel de phosphate de 8%. Un facteur de purification de 57 et un rendement de 41% ont été obtenus dans la phase inférieure de ce système, qui ne contenait que deux bandes de protéines principales (**Duarte et al., 1999**).

L'extraction de xylanases produites par *Bacillus pumilus* directement à partir du milieu de culture contenant les cellules microbiennes est réalisée par un système composé de 3,5% de PEG, 14% de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ et 9% de KI (**Yasinok et al., 2010**).

Les résultats indiquent 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 recueillies à l'interface ou dans la phase inférieure (**Yasinok et al., 2010**).

Les coefficients de partage pour les milieux de culture à base d'alfa et de Retama sont bas du fait de la répartition des xylanases dans la phase inférieure (**Madhusudhan et al., 2011**), donc le protocole de purification pourra contenir qu'une étape de centrifugation pour éliminer les cellules et une étape de dialyse pour se débarrasser des sels.

Li et al., 2011 ont rapporté un coefficient de partage de 47,3 et un rendement de 97,03% dans la phase supérieure, d'un système composé de 12,99% de PEG et 12,09% de citrate de sodium appliqué à l'espèce *Trichoderma viride*.

Le pI de nos xylanases est inconnu, hors c'est un paramètre essentiel pour la séparation; les fonctions chargées positivement piègent les protéines dans la phase inférieure, tandis que les protéines chargées négativement sont dirigées vers la phase supérieure (**Yang et al., 2008**), si notre xylanase est chargée négativement par rapport au pH du système, elle aura plutôt tendance à se répartir dans la phase supérieure et vice versa.

Les facteurs de purification et les rendements obtenus sont en dessous des résultats escomptés car nous avons directement appliqué un modèle qui a été déjà optimisé pour une autre souche et dans un milieu complètement différent, et ce afin d'évaluer son efficacité dans l'extraction des xylanases produites par *Jonesia denitrificans* BN13, de plus la construction de la courbe binodiale est une étape cruciale qui détermine une bonne séparation.

Les résultats pour le SDPA après récupération des cellules sont inférieurs à ceux retrouvés pour les cultures ayant fait l'objet de le SDPA en présence des cellules, particulièrement pour les rendements de récupération de l'activité enzymatique, ce qui confirme que la présence des cellules facilite et favorise la séparation.

Dans le protocole de purification réalisé sur la xylanase de *Jonesia denitrificans* BN 13 (Boucherba, 2011), un facteur de purification de 19 a été réalisé en deux étapes (Tableau XIV), alors que celui que nous avons réalisé avec le SDPA est quasiment équivalent à celui de l'ultrafiltration.

Tableau XIV : Résultats du schéma de purification de la xylanase de *Jonesia denitrificans* BN13 (Boucherba, 2011).

Etape de purification	Volume (ml)	Activité volumique totale (U)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
Surnageant de culture	1000	8340	1700	5	100	1
Ultrafiltration	60	5389	600	h9	65	1,8
Chromatographie échangeuse d'anions (DEAE)	60	627,2	8,1	77	7,5	15

Les tableaux ci-dessous comparent les différences obtenues entre les schémas de purification réalisés sur différentes souches xylanolytiques avec les résultats obtenus en appliquant l'SDPA comme première étape de purification.

Les facteurs de purification obtenus pour différentes souches appartenant au genre *Streptomyces*, sont indiqués dans le tableau XV.

Tableau XV: Résultats des schémas de purification des xylanases du genre *Streptomyces*.

Souche	Nombre d'étapes de purification	Activité spécifique finale	Rendement	Facteur de purification	Références bibliographiques
<i>Streptomyces viridosporus</i> T7A	3	38,67	NI	439	Timothy et al., 1997
<i>Streptomyces rameus</i> L2001	3	3236,6	21,7	13,3	Li et al., 2010
<i>Streptomyces cyaneus</i>	2	893,56	43,63	2,254	Ninawe et al., 2007
<i>Streptomyces</i> B-12-2	4	0,22	55	NI	Elegir et al., 1994
<i>Streptomyces</i> S-38	3	580	1,3	232	Georis et al., 2000

NI : non indiqué

III-Zymogramme

Les figures ci-dessous montrent le résultat du zymogramme obtenu pour les différents échantillons des milieux à base d'écorce d'orange, d'alfa et des rétames.

Le profil montre l'existence d'une activité xylanasiq assignée probablement à des xylanases de faibles poids moléculaires.

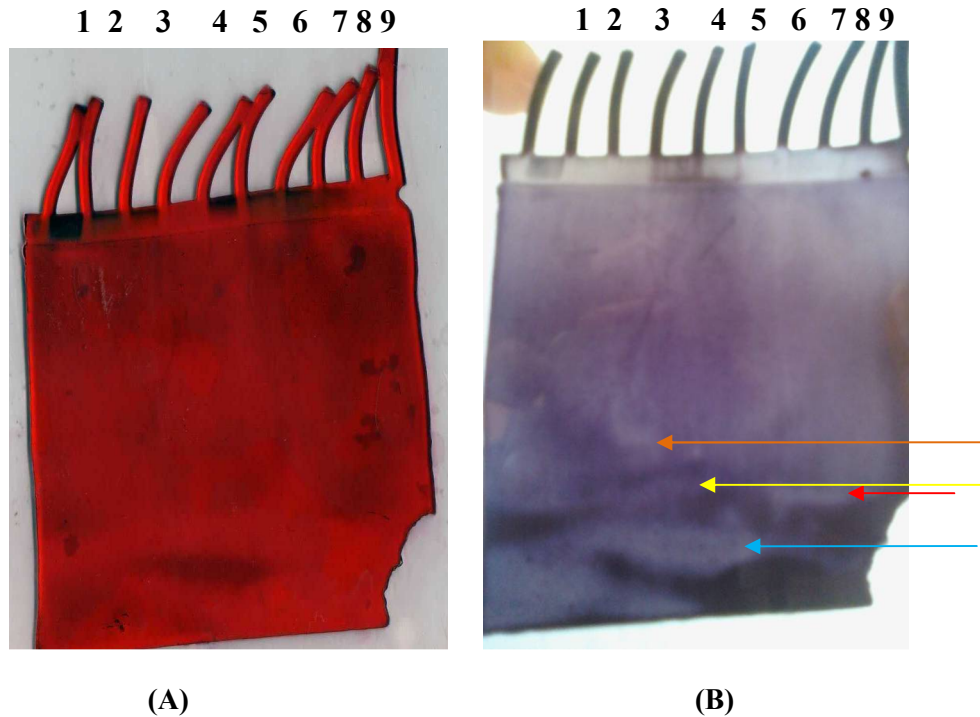


Fig.10 : Zymogramme en condition dénaturante.

A : Gel après coloration au rouge Congo, **B** : Gel après traitement à l'acide acétique

—→ Xyl 1 —→ Xyl 2 —→ Xyl3 —→ Xyl4

1: Surnageant de culture (SC) d'écorce d'orange, **2** : Phase inférieure(PI) d'écorce d'orange, **3** : Phases supérieure (PS) d'écorce d'orange, **4** : SC d'alfa , **5** : PI d'alfa , **6** : PS d'alfa , **7** : SC des rétames, **8** : PI des rétames, **9** : PS des rétames.

Pour le milieu à base d'écorce d'orange, le surnageant contient deux types de xylanases (Xyl 1et Xyl 4) traduit par la présence de deux bandes claires dues à la dégradation du xylane de bouleau, la phase inférieure contient un seul type de xylanase (Xyl 1), alors que dans la phase supérieure les deux xylanases sont détectées.

En ce qui concerne le milieu à base d'alfa, deux bandes (Xyl 1 et Xyl 3) sont observées dans les trois échantillons ce qui est en accord avec les rendements calculés.

Par contre dans le milieu à base des rétames, les deux bandes retrouvées dans le surnageant de culture sont également détectées dans la phases inférieure (Xyl 1 et Xyl 2), un seul type de xylanase est observé dans la phase supérieure (Xyl 1).

Dans les milieux à base des trois coproduits utilisés, une même enzyme se répartit partiellement dans les phases supérieures et inférieures.

Il est évident que les xylanases de faibles PM sont nécessaires pour l'hydrolyse des coproduits, vu que celles-ci peuvent accéder facilement au substrat qui est le xylane, contrairement aux xylanes purs qui fait intervenir des xylanases ayant un PM supérieur ou égal à 30 kDA.

Néanmoins ce zymogramme doit être refait plusieurs fois pour s'assurer de la reproductibilité des résultats, à titre de comparaison, les travaux réalisés par Yasinok et *al.*, 2010 sur l'extraction des xylanases alcalines produites par la souche *Bacillus Pumilus* BM13, par un système à deux phases aqueuses composé de 3,5% de PEG 4000, le phosphate de potassium 14%, 9% KI à un pH 9,0 (Fig.11).



Fig. 11: Zymogramme après application du SDPS sur les xylanases de *Bacillus pumilus* BM13 (Yasinok et *al.*,2010).

1 : Extrait brut , 2 : Phase inférieure , 3 : Phase supérieure,

Le but de ce travail était dans un premier temps de produire des xylanases par *Jonesia denitrificans* BN13 dans des milieux à base de coproduits disponibles en Algérie, la souche se développe bien sur les milieux à base d'écorce d'orange, d'alfa et des rétames.

La biomasse sur le milieu à base d'alfa était de 1,485, ce qui veut dire que la souche possède la machinerie enzymatique nécessaire pour la dégradation de ce coproduit particulièrement ligneux, la présence d'une laccase est fort probable.

La deuxième partie de notre travail consistait à appliquer l'SDPA pour l'extraction des xylanases et comme première étape de purification, le système composé de 3,5% de PEG 4000, 14% $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ - 9% KI, a fourni de meilleurs résultats sans aucune étape de récupération des cellules; dans le milieu à base d'écorce d'orange, 72,18% de l'activité enzymatique étaient retrouvées dans la phase supérieure avec un facteur de purification de 1,38, en ce qui concerne le milieu à base d'alfa le partage était quasiment équivalent entre les deux phases avec un rendement de 57,5% dans la phase inférieure et un facteur de purification de 1,78, en revanche dans le milieu à base des rétames, un rendement de 82% a été réalisé dans la phase inférieure et un facteur de purification de 1,63 a été mesuré.

Les résultats du zymogramme confirme la présence d'activité xylanasiqne et révèle l'existence de quatre types de xylanases différentes nommées : Xyl1, Xyl2, Xyl3 et Xyl4.

Il serait intéressant de reprendre le même travail mais en tenant compte des améliorations citées ci-dessous :

- ✚ Utiliser une étuve agitatrice (Shaker), car l'agitation augmente la production xylanasiqne ;
- ✚ Pour l'SDPA, il est intéressant de l'optimiser en faisant varier les différentes concentrations de PEG, de sel et de KI ;
- ✚ Utiliser différents systèmes à deux phases aqueuses tel que : PEG-Sulfate d'ammonium, PEG- K_2HPO_4 - NaCl, PEG-sels de potassium-NaCl... etc;
- ✚ Suivre la production de cellulases, de laccases et de xylanases simultanément et appliquer le système adéquat pour les récupérer.

A

Abbot N.L., Blankschtein D. et Hatton T.A. (1990). On protein partitioning in aqueous polymer systems. *Bioseparation* 20, 421–423.

Albertsson P.A. (1971). *Partition of Cell Particles and Macromolecules*. 2nd edn. New York: Wiley-Interscience, ISBN 0471020478.

Albertsson P.A. (1986). *Partition of cell particles and macromolecules. Separation and purification of biomolecules, cell organelles, membranes and cells in aqueous polymer two-phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology.* (3rd ed.), 0471828203 Wiley-Interscience, New York .

Alcaraz C. (1982). *La végétation de l'Ouest algérien.* Thèse de doctorat d'État, université de Perpignan. p130.

Allal-benfakih I. (2006). *Recherche quantitatives sur le criquet migrateur Locusta migratoria (Orth.Oedipodinae) dans le Sahara algérien. Perspectives de lutte biologique à l'aide de microorganismes pathogènes et de peptides synthétiques .*thèse de doctorat.Université de Limoges. Laboratoire UMR INRA 1061. Institut National Agronomique d'El Harrach.p27.

Anonyme 1. (2011), données et statistiques du ministère de l'agriculture. www.minagri.dz.

B

Bahloul O., Bourzam1A. et Bahloul A. Utilisation des fibres végétales dans le renforcement de mortiers de ciment (cas de l'alfa). *In* SBEIDCO – 1st International Conference on Sustainable Built Environment Infrastructures in Developing Countries, 2009 Octobre 12-14, ENSET Oran (Algérie). p415.

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

Bakir U., Yavascaoglu S., Guvenc F. et Ersayin A. (2001). An endo- β -1,4-xylanase from *hizopusoryzae* : production , partial purification and biochemical characterization. *Enzyme Microb. Technol.* 29, 328-34.

Bakri Y., Jawhar M. et Arabi M.I.E. (2008). Improvement of xylanase production by *Cochliobolus sativus* in submerged culture. *Food Technol. Biotechnol.* 46 (1), 116-118.

Banik R.M. (1997). Aqueous two-phase system for enzyme purification from microorganisms. *Tren. in Microb. Exploit.* 1, 234–240.

Banik R.M, Santhiagu A., Kanari B., Sabarinath C. et Upadhyay S.N. (2003). Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two-phase systems. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 337–348.

Bansod S.M., Choudhary M.D., Srinivasan M.C. et Rele M.V. (1993) .Xylanase active at high pH from an alkalotolerant *Cephalosporium* species. *Biotechnol.Lett.* 15, 965-970.

Bataillon M., Nunes Cardinali A.P. et Duchiron F. (1998). Production of xylanases from a newly isolated alkalophilic thermophilic *Bacillus sp.* *Biotechnol. Lett.* 20, 1065-1071.

Bedford M.R. et Classen H.L. (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, Vansomeren MAK, Voragen AGJ (eds) *Xylans and xylanases*, Elsevier, Amsterdam, 361-370.

Beg Q.K., Kapoor M., Mahajan L. et Hoondal G.S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications. *Appl.Microbiol. and Biotechnol.* 56, 326-338.

Biely P., Markovic O. et Mislovicova D. (1985). Sensitive.detection of endo-1,4-beta-glucanases and endo-1,4-beta-xylanases in gels. *Anal. Biochem.* 144,147–151.

Biely P., Puls J. et Schneider H. (1985). Acetyl xylan esterases in fungal cellulolytic systems. F.F.B.S Lett. 186, 80-84.

Bim M.A. et Franco T.T. (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.

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

Boucherba N. (2011). Production , purification et caractérisation d'une endoxylanase produite par une souche de *Jonesia denitrificans* BN13. Thèse de doctorat. Université Abderrahmane Mira, Faculté des sciences de nature et de la vie, 133p.

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

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

C

Chaudhary P. et Deobagkar D. (1997). Purification and characterization of xylanase from *Cellulomonas* sp. N.C.I.M. 2353. Biotechnol. Appl. Biochem. 25, 127-133.

Chiang B.H. et Su C.K.(2006). Partitioning and purification of lysozyme from chicken egg white using aqueous two-phase system. Proces. Biochem. 4, 257–26.

Christakopoulos P., Nerinckx W., Kekos D., Marcis B. et Claeysens M. (1996). Purification and characterization of two low molecular mass alkaline xylanases from *Fusarium oxysporum* F3. J. Biotechnol. 51, 181-189.

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

Corrall O. L. et Villasenor-Ortega F. (2006). Xylanases Advances in Agri Food Biotechnol. : 305-322, ISBN : 81-7736-269-0, editors : Ramon Gerardo Guervara- Gonzalez and Irineo Torres-Pacheco.

D

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

De Lemos E., Gouders T., Lamotte- Brasseur J., Rigali S. et Frere J.M. (2005). Improving the alkalophilic performances of the Xyl11 xylanase from *Streptomyces* sp.S38: structural comparison and mutational analysis. Protein Sci, 1, 292-302.

Dhiman S.S, Sharma J. et Battan B.(2008). Industriell applications and future prospects of microbial xylanases. Biores. 3(4), 1377-1402.

Duarte M.C.T., Portugal E.P., Ponezi A.N., Bim M.A., Tagilari C.V. et Franco T.T. (1999). Production and purification of alkaline xylanases. Biores. Technol. 68, 49-53

E

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

Esteban R., Villanueva J.R. et Villa T.G. (1994). β -D-xylanases of *Bacillus circulans* WL-12. Can. J. Microbiol. 28, 733-739.

F

Fang H.Y., Chang S.M., Hsieh M.C. et Fang T.J. (2007). Production, optimization growth conditions and properties of the xylanase from *Aspergillus carneus* M34. J. Molecul. Cataly. B. Enzymatic. 49, 36-42.

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

Frederick M.M., Kiang C., Frederick J.R. et Reilly P.J. (1985). Purification and characterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger*. I. Two isozymes active on xylan backbones near branch points. Biotechnol. Bioeng. 27, 525-532.

Freixo M.D.R., Karmali A., Fraza C. et Arteiro J.M. (2008). Production of laccase and xylanase from *Coriolus versicolor* grown on tomato pomace and their chromatographic behaviour on immobilized metal chelates. Process Biochem. 43, 1265-74.

G

Gaikaiwari R., Shendye A., Kulkarni N. et Rao M. (1996). Two-phase separation of xylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* using a poly(ethylene glycol)-K₂HPO₄ system. Biotechnol. Appl. Biochem. 23, 237-241.

Gallardo O., Diaz P. et Pastor F.I. (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 Microbiol. 48, 276-279.

Gautam S. et Simon L. (2006). Partitioning of β -glucosidase from *Trichoderma reesei* in poly (ethylene glycol) and potassium phosphate aqueous two-phase systems: influence of pH and temperature. *Biochem. Eng. J.* 30, 104–108.

Gawande P. et Kamat M.Y. (1999). Purification of *Aspergillus* sp. Xylanase by precipitation with an anionic polymer Eudrajit S100. *Process Biochem.* 34, 577-580.

Georis J., Giannotta F., De Buyl E. , Granier B. et Frère J.M.(2000). Purification and properties of three endo- β -1,4-xylanases produced by *Streptomyces* sp. strain S38 which differ in their ability to enhance the bleaching of kraft pulps. *Enzyme and Microbiol. Technol.* 24,178–186

Gessesse A. et Mamo G. (1998). Purification and characterization of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Micrococcus* sp. AR-135. *J. Ind. Microbiol Biotechnol.* 20, 210-214.

Geweely et Neveen S. (2011). Purification And Characterization Of Acido-Thermophilic Xylanase From *AspergillusTerrus*. Biological Science department (Microbiology), Australian J.of Basic and Applied Sci. 5(10), 214-219.

Ghosh M. et Nanda G. (1994). Purification and some properties of xylanase from *Aspergillus sydowii* MG 49. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4620-4623.

Girio F.M., Fonseca C., Carvalheiro F., Duarte L.C., Marques S. et Bogel-Lukasik R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol. *Biores. Technol.* 101(13), 4775–4800

Gupta S., Bhushan B. et Hoondai GS. (2000). Isolation, purification and characterization of xylanase from *Staphylococcus* sp. SG-13 and its application in biobleaching of kraft pulp. *J. Appl. Microbiol.* 88, 325-334.

Gupta V.K., Gaur R., Gautam N., Kumar P., Yadav I.J. et Darmwal N.S. (2009). Optimization of xylanase production from *Fusarium solani* F7. *Amer. J. Food Technol. World.* 4(1), 20-29.

H

Henrissat B. (1991). A classification of glycosyl hydrolase based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280 supp 1: 309-316.

Henrissat B. et Davies G.J. (1997). Structural and sequences based classification of glycoside hydrolases, *Curr.Opin.Stru.Biol.*7, 637-644.

Hernandez A., Copa-patino J.L. et Soliveri J. (2001). Xln from *S.chattanoogensius* UAH23 encodes a putative enzym with separate xylanase and arabinofuranosidase catalytic domains, *DNA seq.*12,167-177.

Hotha, S. et Banik, R.M. (1997). Production of alkaline protease by *Bacillus thuringiensis* H 14 in aqueous two-phase systems. *J. of Chemical Technol. and Biotechnol.* 69, 5–10.

Hrmova M., Vrsanka M. et Petrakova E., (1984). Induction of cellulase and xylan-degrading enzyme complex in yeast *Trichosporon cutaneum*. *Arch. Microboil.*161, 371-376.

I

Ighil Hariz Z. (1962). Etude du comportement physiologique, biochimique et structurale du *Retama retam* vis à vis du NaCl.Thèse de Magister, Université d'Oran Algérie, 120 p.

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

J

Jain et Johri B.N. (1999). Partitioning of an extracellular xylanase produced by a thermophilic fungus *Melanocarpus albomyces* IIS-68 in an aqueous two-phase system. *Bioresour Technol.* 67, 205–207.

Johansson G. et Reczey K. (1998). Concentration and purification of β -glucosidase from *Aspergillus niger* by using aqueous two-phase partitioning. *J. Chromatogr B.* 711,161–172.

Joseleau J.P., Comtat J. et Ruel. K. (1992). Chemical structure of xylans and their interactions in the plant cell walls. In: Visser J, Beldman G, vanSomeren MAK, Voragen AGJ (eds) Xylans and xylanases. Elsevier, Amsterdam, pp 1-15.

K

Kechaoua N.(2010). Valorisation des ressources naturelles et des sous produits agricoles.1GP3A, 17-18 Juin, Quebec. pp11.

Khandeparkar R.D.S. et Bhosle N.B. (2006). Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 when grown in solid-state fermentation. Enzyme Microbial. Technol. 39, 732-742.

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

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

Khucharoenphaisan K., Tokuyama S. et Kitpreechavanich V. (2010). Purification and characterization of a high-thermostable B-xylanase from newly isolated *Thermomyces lanuginosus* THKU-49. Mycosci. 51, 405-410.

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

Kluepfel D., Vats-Mehta S., Aumont F., Shareck F. et Morosoli S. (1986). Purification and characterization of a new xylanase (xylanase B) produced by *Streptomyces lividans* 66. Appl. Biochem. and Biotechnol. 72(1), 629-639.

Knob A. et Carmona E.C. (2008). Xylanase production by *Penicillium sclerotiorum* and its characterization. *World Appl. Sci. J.* 4 (2), 277-283.

Kulkarni N., Shendye A. et Rao M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol.* 23, 411-456.

Kula M.R., Kroner K.H. et Hustedt H. (1982). Purification of enzymes by liquid–liquid extraction. In *Advances in Biochemical Engineering*, ed. Fiechter, vol. 24. pp. 74–118. Springer-Verlag. ISBN-0-387-11018-6.

Kulkarni N., Vaidya A. et Rao M. (1999). Extractive cultivation of recombinant *Escherichia coli* using aqueous two-phase system for production and separation of extracellular xylanase. *Biochem. and Bioph. Research Communic.* 225, 274–278.

ℒ

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.

Laumont P. et Berbigier A. (1953). L'alfa et l'expérimentation alfatière en Algérie. *Bull Soc Agriculteurs d'Algérie* (551), 1-20.

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

Li X., Lian Z., Dong D.O., Yong X., Qiang Y. 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 W., Zhu W., Lu Y., Kong Y. et Ma G. (1998). Production, partial purification and characterization of xylanase from *Trichosporon cutaneum* SL409. *Process Biochem.* 33, 331-332.

M

Maat J., Roza M., Verbakel J., Stam H., Dasilva M.J.S., Egmond M.R., Hagemans M., Vangarcom R.F.M., Hessing J.G.M. et Vanrotterdam C. (1992). « Xylanases and their application in bakery » *In*. Visser J, Beldman G, Someren MAK and Vorgen AG (eds.), xylan and xylanases, Elsevier, Amsterdam, pp 349-360.

Madhusudhan M.C. et Raghavarao K.S.M.S. (2011). Aqueous two phase extraction of invertase from baker's yeast: Effect of process parameters on partitioning. *Process Biochemistry.* 46, 2014–2020.

Mahnane Wahiba. (2010). Appréciation de la diversité génétique du genre *Retama* par les marqueurs biochimiques. Thèse de magistère. Université Mentouri Constantine. 48p

Maruyama K., Goto C., Numata M., Suzuki T., Nakagawa Y., Hoshino T. et Uchiyama T.. (1996). O-acetylated xyloglucan in extracellular polysaccharides from cell suspension cultures of *Mentha*. *Phytochemistry.* 41 (5), 1309-1314.

Mayerhoff Z.D.V.L., Roberto I.C, Franco T.T.(2004). Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems. *Biochem. Eng. J.* 18, 217–22.

Mc Cann M.C. et Roberts K. (1991). Architecture of the primary cell wall. *In*: C. W. Lloyd (ed.), the cytoskeletal basis of plant growth and form, Academic Press, New York, N. Y. pp 109-111.

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

Mittler R. (2002). Living under a dormant canopy : a molecular acclimation mechanism of the desert plant *Retama raetam*. the plant J. Blackwell Sci. Ltd. **25**(4), 407- 416.

Muthezhilan R., Ashok R. et Jayalakshmi S. (2007). Production and optimization of thermostable alkaline xylanase by *Penicillium oxalicum* in solid state fermentation. Afric. Microbiol. Res. 12, 20-28.

N

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

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

Nascimento R.P., Coelho R.R.R., Marques S., Alves L., Girio F.M. et Bon E.P.S. (2002). Production and partial characterization of xylanase from *Streptomyces sp.* Strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. Enzyme Microbial. Technol.

Ninawe S., Kapoor M. et Kuhad R.C. (1993). Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. Biores Technol.doi: 10.1016/J.biortech.2007.02.016.

O

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

P

Palmvist E. et Hahn-Hägerdal B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates: inhibitors and mechanisms of inhibition. Biores. Technol. 74, 25-53.

Pereira M., Wu Y.T., Venancio A. et Teixeira J. (2003). Aqueous two-phase extraction using thermoseparating polymer: a new system for the separation of endo-polygalacturonase. *Biochem. Eng. J.* 15,131–138.

Poutanen K. (1988). An alpha-L-arabinosidase of *Trichoderma reesei*. *J. Biotechnol.* 7, 217-282.

Prema P. et Asha Poorna C. (2006). Production and partial characterization of endoxylanase by *Bacillus pumilus* using agro industrial residues. *Biochem Engin J.* 32, 106–12.

Prevot S.(1961). Traité de bactériologie systématique. Ed: Dounod. Paris.

Pukall R., Gabriele G.S., Lapidus A., Nolan M., Rio T.G.D., Lucas S., Chen F., Tice H., Pitluck S., Cheng F.J., Copeland A., Saunders E., Brettin T, Detter C.J. et B. ruce D. (2009). Complete genome sequence of *Jonesia denitrificans* type strain (Prevot 55134^T). *Stand Genomic Sci.* doi :10.4056/sigs. 41646.

Puls J. et Schuseil J. (1993). Chemistry of hemicelluloses: Relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. *In hemicellulose and hemicellulases*, M.coughlan and G.Hazlewood, Editors. London. 1-27.

Q

Quezel et Santa. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie. Tome I.p156-162.

R

Radionova N.A., Dubovaya N.V., Eneiskaya E.V., Matrinovich L.I., Gracheva I.M. et Bezborodov A.M. (2000). Purification and characterization of endo-(β -1-4) -xylanase from *Geotrichum candidum* 3C. *Appl. Biochem. Microbiol.* 36, 460-465.

Rito-Palomares M. (2004). Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products.*J. Chromatogr. B.* 807, 3-11.

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

Royer J.C. et Nakas J.P. (1985). Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum*. Enzyme Microb. 11, 405–410.

S

Seyis I. et Aksoz N. (1985). Xylanase production from *Trichoderma hazianum* 1073 D3 with alternative carbon and nitrogen sources. Food Technol. Biotechnol. 43 (1), 37-40.

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

Shao W., DeBlois S. et Wiegel J. (1995). A high molecular weight, cell-associated xylanase isolated from exponentially growing *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SL-YS485. Appl. Environ Microbiol. 61, 937-940.

Silva M.E., Pellogia, Piza C., Toledo F.A. et Franco T.T. (1997). Purification of three different microbial β -galactosidases by partitioning in aqueous two-phase systems. Cien. Technolog. de Alimen.17 (3), 219-223.

Silva M.E., Franco T.T. (1999). Purification of microbial β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* by bioaffinity partitioning. Revist. de Microbiol. 30, 324-331.

Stachebrandt E. et Prauser H. (1992). The family cellulomonadaceae. In : the procaryotes, 2nd edition, Springer Verlag . 2 : 1323-1345.

Stachebrandt E., Rainey F.A. et Ward-Rainey N.L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. Int. Syst. Bacteriol. 47, 479-491.

Stuart S.E. et Welshimer H.J. (1973). Intrageneric relatedness of *Listeria pirie*. Int. J. Syst Bacteriol. 23 , 8-14.

Sun N., Rahman M., Qin Y., Maxim M.L., Rodriguez H. et Rogers R.D. (2009). Complete dissolution and partial delignification of wood in the ionic liquid 1-ethyle-3-methylimidazolium acetate. Green Chem. 11 (5), 646-655.

Sunna A. et Antranikian G. (1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. Crit. Rev. Biotechnol. 17, 39–67.

Sunna A. et Antranikian G. (1997). Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria. Biochem J. 267(1), 39-67.

T

Tan L.U.L., Wong K.K.Y., Yu E.K.C. et Saddler J.N. (1985). Purification and characterization of two D-xylanases from *Trichoderma harzianum*. Enzyme Microb. Technol. 7, 425-430

Techapun C., Charoenrat T., Poosaran N., Watanabe M. et Sasaki K. (2002). Thermostable and alkaline-tolerant cellulase-free xylanase produced by thermotolerant *Streptomyces sp.* Ab106. J Biosci Bioeng. 93, 431–3.

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

Tenkanen H., Puls J. et Poutanen K. (1992). Two major xylanases of *Trichoderma reesei*. Enzyme Microb. Technol. 14,566-574.

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

V

Vaidya B.K, Suthar H.K, Kasture S., Nene S. (2006). Purification of potato polyphenol oxidase (PPO) by partitioning in aqueous two-phase system Biochem. Eng. J., 28, 161–166.

Viikari L., Ranva M., Kantelinen A., Sandquist J. et Linko M. (1986). Bleaching with enzymes. Third international conference in biotechnol in pulp pap indus. 16-19 Tune, Stockholm, 67-69.

W

Wang S.L., Yen Y.H., Shin I.L., Chang A.C., Chang W.T. et Wu W.C. (2003). Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. Enzyme Microb. Technol. 33,917–25.

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

Winterhalter C. et Liebel W. (1995). Two extremely thermostable xylanases of the hyperthermo philic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. Appl. Environ. Microbiol. 61, 1810-1815.

Wong K.K.Y. et Saddler J.N. (1993). Hemicellulose and hemicellulases: applications of hemicellulases in the food, feed and pulp and paper industries .Portland Press,London, 127-143.-

Wong K.K.Y., Tan L.U.L. et Saddler J.N.(1988).Multiplicity of β -1,4 xylanase in microorganisms: function and application.Microb.Res.52, 305-317.

X

Ximenes F.A., Sousa M.V., Puls J., Silva Jr F.G. et Filho E.X.F. (1999). Purification and characterization of a low-molecular weight xylanase produced by *Acrophialophora nainiana*. *Curr Microbiol.* 38,18-21.

Y

Yang S.Q., Yan Q.J., Jiang Z.Q., Li L.T., Tian H.M. et Wang Y.Z. (2006). High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. *Bioresour Technol.* 97, 1794–1800.

Yasinok E.A., Biran S., Kocabas A. et Bakir U. (2010). Xylanase from a soil isolate, *Bacillus pumilus* BM13: gene isolation, enzyme production, purification, characterization and one-step separation by aqueous-two-phase system. *World J. Microbial. Biotechnol.* 26, 1641-1652

Z

Zaslavsky B.Y. (1995). Aqueous Two-phase Partitioning: Physical Chemistry and Bioanalytical Applications Marcel Dekker, *J. of Chromatog.* B.95, 35-43.

Zeriahène N. (1987). Etude du système racinaire de l'alfa en relation avec l'adaptation au xérophytisme. Thèse de magister, Institut des sciences de la nature, Oran. 113p.

Zohary. (1962). Plant life of Palestine, Israel, and Jordan, Michael Zohary. Ronald New York Science. 163, 523p.

Milieu de culture

Milieu MM7 liquide

Extrait de levure (Mikrobiologie).....	2 g
NaCl (Biochem).....	2,5 g
Na ₂ HPO ₄ (VWR PROLABO).....	30 g
KH ₂ PO ₄ (cheminova).....	15 g
NH ₄ Cl (Cheminova).....	5g
MgSO ₄ ,7H ₂ O (Biochem).....	0,25g
Xylane de bouleau (Fluka).....	7g
Eau distillées.....	qsp.....1000 ml

Milieus de culture à base des coproduits

Ecorce d'orange :

Extrait de levure (Mikrobiologie).....	2 g
NaCl (Biochem).....	2,5 g
Na ₂ HPO ₄ (VWR PROLABO).....	30 g
KH ₂ PO ₄ (cheminova).....	15 g
NH ₄ Cl (Cheminova).....	5g
MgSO ₄ ,7H ₂ O (Biochem).....	0,25g
Ecorce d'orange.....	10g
Eau distillée.....	qsp.....1000 ml

Alfa:

Extrait de levure (Mikrobiologie).....	2g
NaCl (Biochem).....	2,5 g

Na ₂ HPO ₄ (VWR PROLABO).....	30g
KH ₂ PO ₄ (cheminova).....	15g
NH ₄ Cl (Cheminova).....	5g
MgSO ₄ ,7H ₂ O (Biochem).....	0,25g
L'alfa.....	10g
Eau distillée.....qsp.....	1000 ml

Rétames :

Extrait de levure (Mikrobiologie).....	2 g
NaCl (Biochem).....	2,5 g
Na ₂ HPO ₄ (VWR PROLABO).....	30 g
KH ₂ PO ₄ (cheminova).....	15 g
NH ₄ Cl (Cheminova).....	5g
MgSO ₄ ,7H ₂ O (Biochem).....	0,25g
Retama.....	10 g
Eau distillée.....qsp.....	1000 ml

Tous les milieux de culture préparés ont été agités, réchauffés, et autoclavés à 120°C /20min.

Préparation des réactions chimiques

A-Dosage des sucres réducteurs

Solution à base d'acide dinitrosalicylique (DNS) :

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

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

B-dosage des protéines

Solution de bleu de Coomassie :

Bleu de Coomassie G250.....	10mg
Ethanol 95°	5ml
Acide phosphorique.....	10ml
Eau distillée.....	qsp.....100ml

C-Préparation des solutions d'électrophorèse dénaturante SDS-PAGE

a/-Préparation des tampons

1-Tampon de séparation

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

Ajuster le pH à 8,8 avec HCl concentré.

2-Tampon de concentration :

Tris-HCl.....12,114g

SDS.....0,8g

β -mercaptoéthanol400 μ l

Eau pureqsp..200ml

Ajuster le pH à 6,8.

3-Tampon de migration :

Tris1,06g

Glycine.....5,04g

β -mercaptoéthanol.....20 μ l

Persulfate d'ammonium.....0,35g

Eau distillée.....qsp...350ml

Ajuster le pH à 8,3.

4-Tampon d'échantillon :

Tris-HCl.....1,892g

EDTA.....0,007g

Dithiothréitol.....1,16g

SDS.....3,75g

Bleu de bromophénol.....0,025g

Glycérol.....12,5g

Eau pure.....qsp...50ml

Ajuster le pH à 6,8 avec du HCl concentré.

Aliquote 1 ml à -20°C.

d-Préparation des gels de séparation et de concentration :

• **Gel de séparation à 12 % :**

Solution d'acrylamide.....2,5ml
Tampon de séparation5,2ml
TEMED.....20µl
Persulfate d'ammonium.....70µl
Xylane de bouleau.....0,8ml
Eau pure.....qsp...12,5ml.

• **Gel de concentration 7,5%:**

Solution d'acrylamide.....2,5ml
Tampon de concentration.....2,5ml
TEMED.....10µl
Persulfate d'ammonium.....100µl
Eau pure.....qsp.....10ml

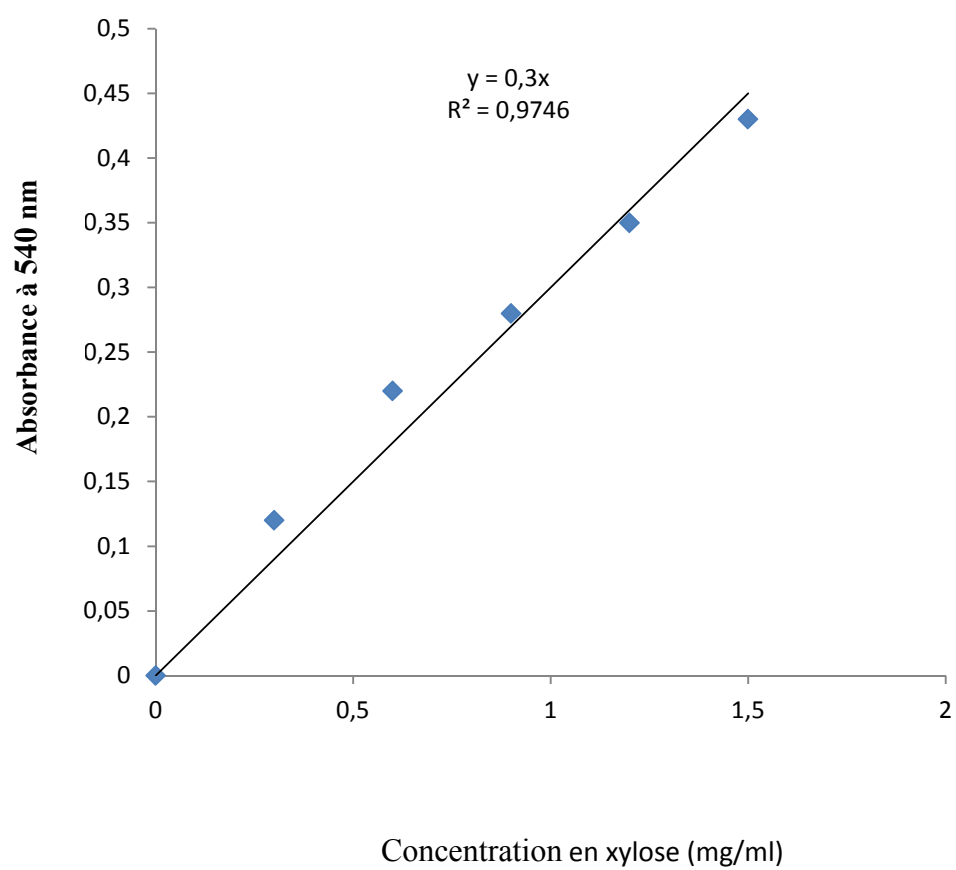


Fig.01: Droite d'étalonnage pour le dosage du xylose.

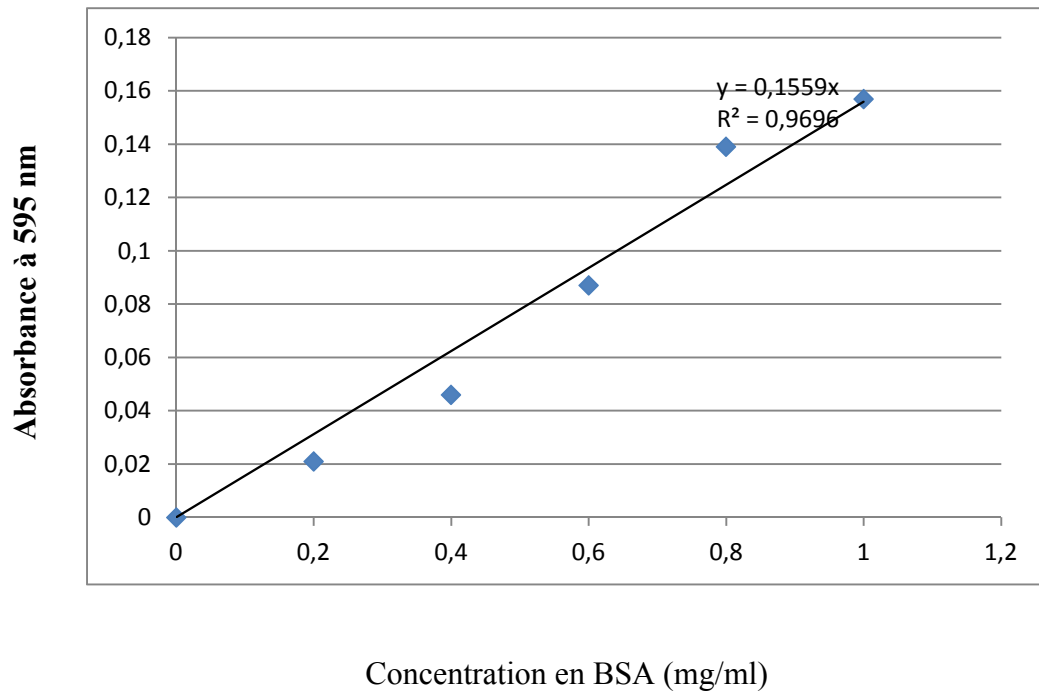


Fig.02 : Courbe d'étalonnage pour la microméthode.

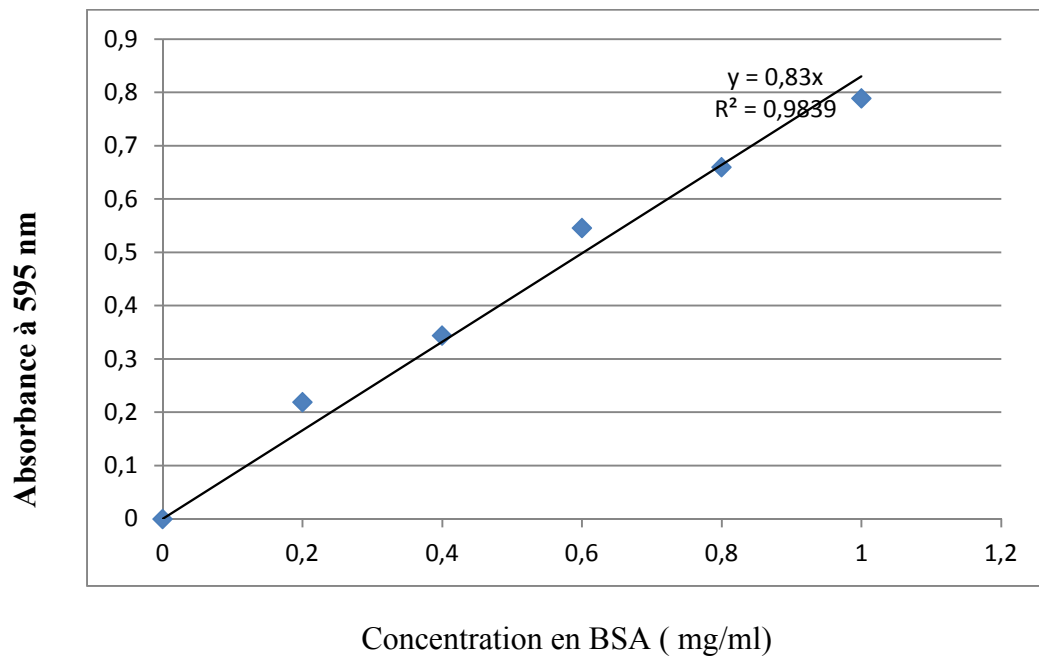


Fig.03: Courbe d'étalonnage pour la macrométhode.

Résumé :

Jonesia denitrificans BN13 se développe bien sur milieux à base de coproduits agricoles : l'écorce d'orange, l'alfa et les rétames ; les activités enzymatiques respectives de chacun des trois substrats étaient de 0,662 ; 0,711 et 0,835U/ml.

Les xylanases , ont été extraites pour la première fois par un système à deux phases aqueuses (SDPA) composé de 3,5% de PEG, 14% $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ - 9% de KI.

Le partitionnement sélectif des protéines entre les deux phases aqueuses est le principe de cette technique ; le système a fourni de meilleurs résultats en présence des cellules; pour le milieu de culture à base d'écorce d'orange, 72% de l'activité enzymatique est retrouvée dans la phase supérieure avec un coefficient de répartition de 2,75 et un facteur de purification de 1,38, dans le milieu à base d'alfa, 57,5% de l'activité enzymatique est localisée dans la phase inférieure, avec un coefficient de partage de 0,67 et un facteur de purification de 1,78, dans le milieu à base des rétames, un rendement de 82% est retrouvé dans la phase inférieure et un facteur de purification de 1,63 est mesuré.

L'analyse du zymogramme confirme la présence de xylanases dans les trois milieux de culture.

Mots clés : Système à deux phases aqueuses, xylanases, *Jonesia denitrificans* BN13, *Citrus sinencis* *Stipa tenacissima*, *Retama Raetam*.

Summary:

Jonesia denitrificans BN13 Grow well on agricultural products: orange peel, alfa and Retama; enzyme activities of each of the three substrates were 0.662, 0.711 and 0.835 U / ml.

The xylanases were extracted for the first time by an aqueous two-phase system (ATPS) composed of 3.5% PEG 4000, 14% $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ - 9% KI. The selective partitioning of proteins between two aqueous phases is the principle of this technique, the system provided better results in the presence of cells in the culture medium made of orange peel, 72% of the activity is found in the upper phase with a distribution coefficient of 2.75 and a purification factor of 1.38, in the medium based on the alfa, 57,5% of the activity is located in the bottom phase, with a coefficient of 0.67 and a purification factor of 1.78 in the medium based of the Retama , a yield of 82% is located in the lower phase and a purification factor of 1.63 is measured.

The zymogram analysis confirmed the presence of xylanases in the three culture media.

Keys words: Aqueous two phases system, Xylanases, *Jonesia denitrificans* BN13, *Citrus sinencis*, *Stipa tenacissima*, *Retama Raetam*.