

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
Université Badji Mokhtar Annaba

Badji Mokhtar University
Annaba



جامعة باجي مختار
عنابة



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
Laboratoire de Biochimie et de Microbiologie appliquée

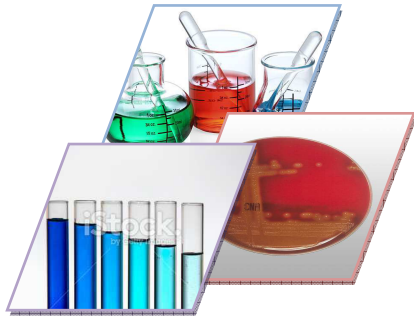
Thèse
Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat LMD (3^{ème} Cycle)
Option : Biochimie Appliquée
Présentée Par
Mme HABERRA SOUMAYA
Intitulée

**Production, optimisation et étude de xylanases chez une
nouvelle souche d'Actinomycète thermophile isolée du
compost de poulet**

Devant le jury :

Président :	Mr : BOUZERNA N	(Prof)	Université Badji Mokhtar - Annaba
Directeur de thèse :	Mr : LADJAMA A	(Prof)	Université Badji Mokhtar - Annaba
Examineur:	Mr: AOUADI S	(Prof)	Université Badji Mokhtar - Annaba
Examinatrice :	Mme : BENDJEDDOU A	(MC A)	Université de Mohammed Chérif Messaadia - Souk Ahras
Examinatrice :	Mme : SOUIKI L	(MC A)	Université 08 Mai 1945 - Guelma

2013-2014



Remerciements

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biochimie et Microbiologie Appliquée, Faculté des Sciences, Université Badji Moukhtar Annaba.

*Au terme de ce travail, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et mon profond respect à mon Directeur de thèse **Pr. Ladjama A**, Professeur à l'université Badji Moukhtar Annaba, pour sa patience, sa rigueur et ses précieux conseils qui m'ont aidée dans la réalisation de ce travail.*

*Je tiens à exprimer ma grande considération et mes sentiments de reconnaissance à **Pr. Bouzerna N**, Professeur à l'université Badji Moukhtar Annaba, qui me fait l'honneur de présider le jury.*

*C'est avec un très grand plaisir que je remercie infiniment **Pr. Aouadi S**, Professeur à l'université Badji Moukhtar Annaba, d'avoir bien voulu juger ce modeste travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma très profonde gratitude.*

*Je voudrai exprimer également ma sincère reconnaissance au **Dr. Bendjeddou A**, Maître de conférences A, à l'université de Souk Ahras, qui m'a fait l'honneur d'examiner mon travail.*

*Mes remerciements s'adressent à **Dr. Swiki L**, Maître de conférences A, à l'université de Guelma, pour l'honneur qu'elle m'a accordé en acceptant d'être examinatrice de ma thèse et de juger ce travail.*

*J'adresse mes remerciements au Professeur **Boudelaa M**, qui a rendu possible la publication de mon article.*

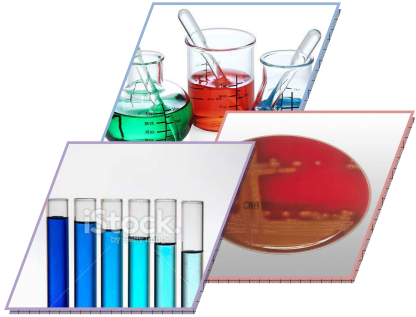
*Un grand Merci à M. **Saoudi B**, pour ses précieux conseils, ses encouragements, son aide et sa gentillesse.*

*Merci également à mon amie M^{lle}. **Habbeche A**, qui m'a toujours soutenue durant mon parcours.*

*Je voudrai remercier M. **Kerouaz B**, de leur soutien, leur aide et de leurs encouragements.*

*Je remercie également toute l'équipe du Laboratoire de Biochimie et Microbiologie Appliquée et particulièrement M. **Tichati L** pour leur disponibilité, leur amabilité ainsi que pour leur aide scientifique.*

Enfin, ma reconnaissance et mes remerciements vont à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Résumés

Résumé

Les enzymes xylanolytiques sont des glycosidases (O-glycosidehydrolases, EC 3.2.1.x) qui hydrolysent les liaisons 1,4-D-xylosidiques dans les régions non substituées des chaînes de xylanes pour aboutir à des unités simples de xyloses nécessaire au métabolisme cellulaire. Ces xylanases sont fréquemment utilisées dans la formulation d'aliments pour les animaux (amélioration de la digestibilité et de la valeur nutritive), en industries des jus de fruits et brassicoles (amélioration de l'extraction ou la filtration). En industrie du papier, ces enzymes améliorent la pureté de la cellulose, par une réduction de 50 % de la quantité de chlore nécessaire au blanchiment du papier et de la quantité d'organochlorés rejetés dans l'environnement.

Ainsi, dans le cadre de la recherche et la production d'enzymes xylanolytiques thermostables chez les microorganismes thermophiles, une nouvelle souche d'Actinomycète thermophile *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 est isolée et identifiée au niveau de notre laboratoire. Les différentes investigations ont montré que cette souche secrète des xylanases extracellulaires dont le niveau d'activité est comparable à d'autres souches connues dans la production de xylanases. L'optimisation de la production de ces xylanases par méthode classique a permis d'augmenter le niveau de production pour atteindre une valeur de 291 %. Par la suite, nous avons procédé à la purification des xylanases pour les caractériser. L'enzyme partiellement purifiée donne deux fractions de taille de 22 KD et 32 KD qui sont au voisinage de la taille recherchée des endoxylanases. L'étude biochimique montre que la xylanase travaille à pH 9 et à température de 75°C en présence de Mn^{2+} . L'étude de la stabilité de xylanase vis à avis du pH et de température élevée montre que la xylanase présente une haute stabilité entre pH 6-9.5 et une bonne thermostabilité à 65 et 70 °C en présence du Mn^{2+} , alors que le Hg^{2+} inhibent totalement l'activité enzymatique. L'attaque de l'enzyme sur son substrat (Xylane) donne uniquement le monomère de xylose. Ces différents résultats obtenus seraient favorables à l'utilisation de cette enzyme dans le secteur agro-alimentaire et l'industrie du papier.

Mots-clés : Xylanases, Thermophile, Thermostable, *Actinomadura*, Son de blé.

Abstract

The xylanolytic enzymes are glycosidases (glycosidehydrolases-O, EC 3.2.1.x) which hydrolyse linkages 1,4-D-xylosidic in the unsubstituted regions of xylan chains to achieve simple xyloses units necessary for cellular metabolism. These xylanases are frequently used in the formulation of foods for animals (improved digestibility and nutritional value) in industries juice and beer (improved extraction or filtration). In the paper industry, these enzymes improve the purity of cellulose, a 50% reduction of the amount of chlorine required for bleaching paper and the amount of organochlorines discharged into the environment.

Thus, in the context of research and the thermostable xylanolytic enzymes production by thermophilic microorganisms, a new thermophilic Actinomycete strain *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 is isolated and identified in our laboratory. Various investigations have shown that this strain secret extracellular xylanases whose level of activity is comparable to other known xylanases production strains. The optimization of the production of these xylanases by conventional method has increased the level of production to reach a value of 291%. Subsequently, we performed the purification of xylanases to characterize them. The partially purified enzyme gave two fractions of size of 22 KD and 32 KD, which are adjacent to the desired size of endoxylanases. Biochemical study shows that the xylanase works at pH 9 and temperature of 75 ° C in the presence of Mn^{2+} . The stability study of the xylanase vis pH and elevated temperature shows that the xylanase has a high stability between pH 6-9.5 and good thermostability at 65 and 70 ° C in the presence of Mn^{2+} , whereas Hg^{2+} inhibit completely the enzymatic activity. The attack of the enzyme on its substrate (Xylan) gives only the monomer of xylose. These results would support the use of this enzyme in the food industry and the paper industry.

Key words: Xylanases; Thermophilic; wheat bran; thermostable; *Actinomadura*.

المخلص

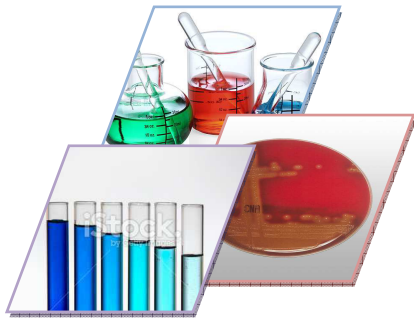
الانزيمات الغزيرانوتوكية هي عبارة عن غليكوزيداز التي تفكك الروابط الغليكوزيدية في المناطق المستبدلة في سلسلة الغزيلان. للحصول على وحدات بسيطة ضرورية لعملية الايض الخلوي. هذا الغزيلانز يستعمل في صياغة الأطعمة للحيوانات (تحسين الهضم والقيمة الغذائية). في صناعة عصير الفواكه والبيرة (تحسين الاستخراج أو الترشيح) و كثيرا ما يستخدم في صناعة الورق. وهذه الإنزيمات تعمل على تحسين نقاوة السليلوز، وذلك بتخفيض 50% من كمية الكلور اللازمة لتبييض الورق وكمية من مركبات الكلور العضوية التي تطرح في البيئة.

في اطار البحث و انتاج انزيمات غزيرانوليتكية مقاومة للحرارة بواسطة كائنات دقيقة محبة للحرارة، سلالة جديدة من الاكتينومييسات المحبة للحرارة الاكتينومديرا كيرائينوليتيكا تم عزلها من سماد الدجاج في المختبر. مختلف التطبيقات أظهرت أن هذه السلالة تنتج الغزيلانز مع مستوى نشاط مماثل لانتاج الغزيلانز من طرف سلالات اخرى. ضبط مختلف شروط النمو لانتاج الغزيلانز بطريقة كلاسيكية سمح بمضاعفة النشاط الى ثلاثة مرات حيث اصبح 35 وحدة دولية / مل (291 % زيادة).

في جزء آخر من العمل، قمنا بتنقية الغزيلانز المرغوب و تحديد خصائصه البيوكيميائية. حيث ان الانزيم المنقي بصفة جزئية اعطي وحدتين بحجم 22 و 32 كيلو دالتون، و هم محاذيتان لحجم الانزيم المرغوب.

دراسة الخصائص البيوكيميائية للغزيلانز المدروس بينت ان هذا الانزيم يعمل في درجة حموضة تصل الى 9، و درجة حرارة تقدر ب 75 درجة مئوية في وجود ال Mn^{2+} . دراسة استقرار الغزيلانز في ضوء درجة الحموضة القلوية و درجة الحرارة المرتفعة بينت ان الغزيلانز يعطي نسبة استقرار عالية في درجة حموضة ما بين 6 و 9، و صمود للحرارة جيد في 65 و 70 درجة مئوية في وجود Mn^{2+} . اما بالنسبة Hg^{2+} فانه يثبط كليا النشاط الانزيمي. تفكيك الانزيم للغزيلان اعطي فقط وحدات بسيطة من الغزيلوز. مختلف هذه النتائج المتحصل عليها تسمح باستخدام هذا الانزيم في مجال صناعة الورق و المواد الغذائية.

الكلمات المفتاحية : الغزيلانز؛ محبة للحرارة؛ الاكتينوماديرا؛ نخالة القمح؛ مقاوم للحرارة.



Sommaire

INTRODUCTION GENERALE.....	01
Partie I : Etude bibliographique.....	04
CHAPITRE I : LES ENZYMES XYLANOLYTIQUES ET LEURS SUBSTRATS.....	04
I-1 LES ENZYMES XYLANOLYTIQUES	04
I-1-1 Les xylanases	04
I-1-2 Les β -xylosidases	05
I-1-3 Les enzymes débranchantes	05
I-1-4 Classification des xylanase	05
I-1-4-1 Famille 10.....	06
I-1-4-2 Famille 11.....	06
I-1-5 Mode d'action des enzymes xylanolytiques	10
I-1-6 Propriétés physicochimique des enzymes xylanases	12
I-1-7 Caractérisations des xylanases thermostables.....	14
I-2 LES SUBSTRATS XYLANES	14
I-2-1 Structure de la paroi végétale.....	14
I-2-1-1 La cellulose	15
I-2-1-2 L'hémicellulose.....	16
I-2-1-3 La pectine.....	17
I-2-2 Structure de xylanes.....	17
I-2-3 Origine et distribution de xylanes	18
CHAPITRE II: LES <i>ACTINOMYCETES</i> THERMOPHILE PRODUCTEURS DES XYLANASES.....	22
II-1 Caractères généraux des Actinomycètes	22
II-2 Les Actinomycètes thermophiles producteurs des xylanases.....	23
II-3 Aspect génétique de la production des xylanases.....	26
CHAPITRE III: APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES DES XYLANASES.....	27
III-1 Industrie de la pâte à papier et de la fabrication du papier	27

III-2 Industrie de l'alimentation animale et ensilage.....	28
III-3 Industrie de la panification.....	28
III-4 l'industrie des jus des fruits.....	28
III-5 Synthèse des alkyl-xylosides	29
III-6 Industrie de la bière.....	29
Partie II : Matériel et méthodes.....	31
I- ISOLEMENT DES SOUCHES D'ACTINOMYCETES.....	31
I-1 Site d'étude	31
I-2 Souche utilisée pour la production d'une activité xylanolytique.....	31
II- RECHERCHE DE L'ACTIVITE XYLANOLYTIQUE.....	31
II-1 Activation de la souche d'Actinomycète sur milieu solide complet (CM).....	31
II-2 Recherche de l'activité xylanolytique sur milieu solide.....	32
II-2-1 Test qualitatif au rouge Congo.....	32
II-3 Production des xylanases en milieu liquide à base de son de blé.....	32
II-4 Recherche de l'activité xylanolytique par la mesure du pouvoir réducteur par la méthode de Nelson –Somogyi	32
II-4-1 Principe de la méthode	32
II-4-2 Recherche de l'activité xylanolytique directement dans le filtrat de culture.....	33
II-4-3 Recherche de l'activité xylanolytique dans le milieu réactionnel.....	33
II-4-4 Mesure des activités enzymatiques.....	34
II-5 Mesure de l'activité spécifique.....	35
II-5-1 Dosage des protéines par la méthode de Bradford.....	35
II-5-1-1 Principe de la méthode.....	35
II-5-1-2 Mode opératoire.....	35
II-5-1-3 Détermination des activités spécifiques.....	35
III- OPTIMISATION DES CONDITIONS DE CULTURES POUR LA PRODUCTION DES XYLANASES	36
III-1 Temps d'incubation.....	36

III-2 Le pH optimum de culture.....	36
III-3 Température optimale de la culture.....	37
III-4 L'effet de source de carbone sur la production des xylanases	37
III-5 L'effet de source d'azote sur la production des xylanases.....	37
III-6 L'effet de source de phosphore inorganique sur la production des xylanases.....	37
III-7 L'effet de certains additifs.....	37
IV- ESSAI DE PURIFICATION ET CARACTERISATION BIOCHIMIQUE PARTIELLE DE XYLANASE.....	38
IV-1 Essai de purification de xylanase de la souche D'Actinomycète Cpt29.....	38
V-1-1 Préparation de l'extrait enzymatique brut.....	38
IV-1-2 Chromatographie échangeuse anionique (Mono-Q Sépharose).....	38
IV-1-3 Chromatographie de filtration moléculaire.....	39
IV-1-3-1 Principe.....	39
IV-1-3-2 Mode opératoire.....	39
IV-2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante PAGE-SDS.....	39
IV-2-1 Principe.....	39
IV-2-2 Mode opératoire.....	39
IV-2-3 Zymogramme.....	40
IV-2-3-1 Principe.....	40
IV-2-3-2 Mode opératoire.....	40
IV-3 Caractérisation biochimique partielle de xylanases.....	40
IV-3-1 L'effet de température sur la xylanases.....	40
IV-3-2 L'effet de thermostabilité sur l'activité de xylanases.....	41
IV-3-3 L'influence de pH sur la xylanases.....	41
IV-3-4 L'effet de certains additifs.....	41
IV-3-5 Identification des produits de dépolymérisation par chromatographie sur couche mince	42
IV-3-5-1 Principe.....	42

IV-3-5-2 Mode opératoire.....	42
Partie III : Résultats et discussion	44
I-Souche d'Actinomycète thermophile Cpt29 utilisée dans la production de xylanases.....	44
II- Culture de la souche et observation macroscopique de la souche sur milieu CM.....	44
III- Mise en évidence de l'activité xylanolytique sur milieu solide par le test au rouge Congo	44
IV- Mise en évidence de l'activité xylanolytique dans le milieu liquide par le test de Nelson-Somogyi.....	46
V- OPTIMISATION DES CONDITIONS DE CULTURES	46
V-1- Temps de culture.....	46
V-2- Détermination du pH optimum.....	48
V-3- Température optimale.....	49
V-4- Source de carbone.....	50
V-5- source d'azote.....	53
V-6- L'effet de certains ions.....	54
V-7- Source de phosphore inorganique.....	55
VI- ESSAI DE PURIFICATION ET CARACTERISATION BIOCHIMIQUE PARTIELLE DE XYLANASES	57
VI-1 Essai de purification de xylanases	57
VI-1-1 Milieu de production.....	57
VI-1-2 Précipitation des xylanases.....	57
VI-1-3 Chromatographie échangeuse anionique sur colonne Mono Q Sépharose.....	59
VI-1-4 Chromatographie de filtration moléculaire.....	60
VI-1-5 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante PAGE-SDS et Zymogramme.....	61
VI-2 Caractérisation biochimique partielle de xylanases	63
VI-2-1 Température optimale de xylanases partiellement purifiée.....	63
VI-2-2 pH optimum de xylanases partiellement purifiée.....	64
VI-2-3 Stabilité de xylanase en fonction de la température.....	65

Sommaire

VI-2-4 Etude de la stabilité vis-à-vis du pH à 4°C.....	66
VI-2-5 Etude de la stabilité à différents pH et à 70°C.....	67
VI-2-6 L'effet de certains additifs.....	68
VI-2-7 Mode d'attaque de la xylanase.....	69
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	72
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	75
ANNEXES.....	87

Liste des abréviations

µl	Microlitre
AGX	Arabino-glucuronoxylanes
AX	Arabinoxylanes
BSA	Bovine Serum Albumin
Cpt	Compost Poulet thermophile
CAZy	Carbohydrate Active enZymes
CBD	Cellulose binding domain
CCM	Chromatographie couche mince
CM	Milieu solide Complet
DO	Densité Optique
DP	Degré de polymérisation
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
Fig	Figure
g	Gramme
GH	Glycoside Hydrolase
GX	Glucuronoxylanes
h	Heure
HCA	Analyse des clusters d'hydrophobicité
HX	Hétéroxylanes
ISP2	International <i>Streptomyces</i> Project
IUPAC	International Union Of pure And Applied Chemistry
J	Jour
KDa	Kilodalton
l	Litre

LMW	Low Molecular Weight
mg	Milligramme
min	Minute
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
MM	Masse molaire
Nm	Nanomètre
P	Poids
PAGE	PolyAcrylamid Gel Electrophoresis
Pb	Paire de bases
pI	pH isoélectrique
q.s.p	quantité suffisante pour
rpm	rotation par minute
RX	Rayon X
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Tab	Tableau
TEMED	N,N,N'N' –Tetraméthylène diamine
UI	Unité International
UV	rayon Ultra Violet
V	Volume

Liste des tableaux

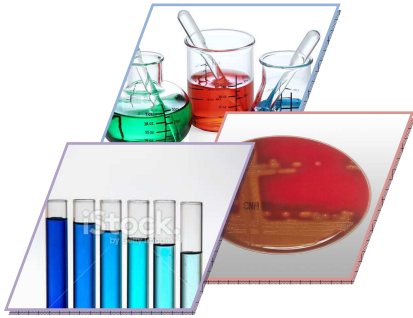
Tableau	Titre	Page
I	Propriété des endo-xylanases des familles 10 et 11.	09
II	Paramètres physico-chimiques de quelques xylanases produites par les microorganismes.	13
III	Distribution et diversité de xylane chez certains végétaux.	21
IV	Répartition des Actinomycètes dans la nature.	24
V	Caractéristiques de quelques bactéries thermophiles productrices de xylanases.	25
VI	Applications actuelles des xylanases dans les industries alimentaires et non- alimentaires.	30
VII	Concentration des xylanases récupérées par deux méthodes de précipitation.	58
VIII	L'effet de certains additifs sur l'extrait enzymatique brut.	68

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Structure des xylanases de la famille 10	07
02	Structure des xylanases de la famille 11	08
03	Mode d'action des enzymes xylanolytiques sur la chaîne principale et les ramifications du xylane.	11
04	Structure de la paroi végétale.	17
05	Structure des hémicelluloses.	17
06	Structure du résidu β -D-xylopyranose.	20
07	Structure de xylane	20
08	Aspect macroscopique de la souche Cpt29 sur milieu CM solide à base de glucose.	45
09	Mise en évidence de l'activité xylanolytique sur milieu Nammori solide par le test au rouge Congo.	45
10	Temps optimal de culture pour la production de xylanases chez la Cpt29.	47
11	pH optimum de culture pour la production de xylanases chez la Cpt29.	48
12	Température optimale de culture de la souche Cpt29.	49
13	L'effet de différentes sources de carbone pour la production de xylanases.	51
14	L'effet de différentes concentrations de source de carbone pour la production de xylanases.	52
15	L'effet de différentes sources d'azote pour la production de xylanases.	53
16	L'effet de différents ions pour la production de xylanases.	54

Liste des tableaux et des figures

17	L'effet des différentes sources de phosphore inorganique pour la production de xylanases.	55
18	L'effet de différentes concentrations de source de phosphore mono-potassique pour la production de xylanases.	56
19	L'effet de différentes concentrations de l'acétone sur l'activité xylanolytique.	58
20	Chromatographie sur colonne mono Q sépharose.	59
21	Chromatographie de filtration moléculaire sur gel G75 séphadex.	60
22	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante PAGE-SDS	62
23	Température optimale de xylanases partiellement purifiée chez la Cpt29	63
24	pH optimum de xylanases partiellement purifiée chez la Cpt29	64
25	Stabilité de l'enzyme brut vis-à-vis de la température.	65
26	Stabilité vis-à-vis du pH à 4°C.	66
27	Stabilité vis-à-vis du pH à 70°C.	67
28	L'effet de différentes concentrations de Mn ²⁺ sur l'activité xylanolytique.	69
29	Mode d'attaque de xylanases sur le xylane.	71



Introduction

La paroi cellulaire des végétaux se compose de plusieurs biopolymères : la cellulose, la pectine, la lignine et l'hémicellulose qui est riche en xylane. Ce dernier est formé de plusieurs unités du xyloses, reliées par des liaisons β -1,4 et qui sont substituées par des résidus d'arabinose et d'acétate (1).

En effet, pour l'hydrolyse complète du xylane l'action combinée d'endo- et d'exoxyanases est recommandée, ces enzymes agissent non seulement sur les liaisons situées au sein de la chaîne principale, mais également libèrent les constituants des chaînes latérales. Ces enzymes hydrolysent également les sucres des ramifications de la chaîne principale du xylane, tels que les α -L-arabinofuranosidases ou xylanes-1,4- β -xylonidases, les α -glucuronidases et les acétyl-estérases. Les xylanases sont classées sur la base de leurs propriétés physicochimiques en deux groupes : celles de faible poids moléculaire (< 30 kDa) et de pI basique et celles de grand poids moléculaire (> 30 kDa) et de pI acide. Cependant, Collins et al. (2) notent que cette classification reste incomplète car de nombreuses exceptions avaient été découvertes et approximativement 30 % des endoxyanases (particulièrement issues des champignons) ne pouvaient pas être classées suivant ce système. Plus tard, un système de classification plus complet a été admis et permettait la classification des xylanases et des glycosidases en général par la comparaison des structures primaires de leurs domaines catalytiques. Ce système regroupe les xylanases en six familles (de A à F). Actuellement, 96 familles de glycosidase ont été identifiées (2). Ainsi, de ce système de classification, les xylanases font partie des familles 10 (autrefois F) et 11 (autrefois G) (3) (4).

Les xylanases (endoxyanases) sont majoritairement retrouvées dans les familles 10 et 11 des glycoside-hydrolases (GH) mais des enzymes ayant des activités xylanases/xylosidases sont aussi retrouvées dans les familles de GH 5, 7, 8, 30 et 43 (2). Les enzymes de la famille GH43 affichent une spécificité pour les substrats contenant de l'arabinose, comme les arabinoxylanes, et ce sont en grande majorité des xylosidases ou arabinofuranosidases. Les xylosidases sont aussi retrouvées dans les familles GH3, 30, 39, 51, 52 et 54, et les arabinofuranosidases dans les familles GH3, 51, 54 et 62. Globalement, un système xylanolytique complet (endo- et exoenzymes, β xylosidase, enzymes débranchantes) est nécessaire pour dégrader la totalité du polymère. Par ailleurs, l'utilisation de mélanges bruts d'hémicellulases de différentes espèces peut tirer profit des synergismes observés entre les multiples xylanases (2)

Une grande variété d'organismes (bactéries, levures, champignons, algues, protozoaires, gastéropodes et arthropodes) produit les enzymes xylanolytiques (5). Dans la classe des Actinomycètes thermophiles, divers espèces sont étudiées et c'est le cas de l'espèce *Actinomadura keratinilytica* Cpt20 (6) isolée dans notre laboratoire et qui produit une endoxylanase thermostable exploitable dans le blanchiment du papier. D'autres souches d'Actinomycètes thermophiles tels que la souche *Thermoactinomyces thalophilus* (7) et certaines bactéries comme *Bacillus subtilis* (8) ont été identifiés comme producteurs de xylanases dépourvues de cellulases « xylanases cellulase free ». Chez les champignons qui sont plus producteurs de xylanases, de nombreuses xylanases ayant des propriétés variables ont été découvertes chez plusieurs espèces, c'est le cas de cinq xylanases purifiées chez *Aspergillus niger* 11 (9), on trouve aussi les espèces *Talaromyces thermophilus* et *Thermomyces lanuginosus* (SSBP) (10) qui poussent à 50°C (11). Ces champignons thermophiles ont acquis récemment de l'importance à cause de la production des xylanases thermostables qui ont plusieurs applications biotechnologiques.

Des travaux de génétique moléculaire ont été également abordés, ainsi, chez *Penicillium canesoens* (12) le gène complet xylA codant pour l'endo- β -1,4- xylanase de *P.* a été cloné et séquencé. Ainsi, la production de xylanases d'un gène de *Bacillus subtilis* cloné dans une souche d'*Escherichia coli* a été étudiée (8). Ces travaux moléculaires ont pour objectifs, d'améliorer soit le niveau d'expression des xylanases soit leurs stabilités vis-à-vis de la température et des pH, avec comme finalité leur utilisation éventuelle dans le domaine d'agro-industries. En effet, Ces enzymes présentent des performances relativement faibles au regard des contraintes liées aux procédés industriels. Ces enzymes ne sont actives que dans des gammes de température ou de pH très réduites. Elles sont inactivées en présence de solvants, ou de concentrations salines inappropriées. Dans ce sens, la recherche d'enzymes issues de micro-organismes thermophiles ou extrémophiles peut apporter une solution à ces différentes contraintes.

Au niveau mondial, le marché des enzymes est estimé à 2,9 milliards de dollars soit une croissance de 3%. L'industrie des détergents utilise massivement des protéases. Les industries alimentaires, textiles, papetières, pharmaceutiques ainsi que les tanneries, la cosmétique, la chimie fine et l'ingénierie moléculaire sont également des utilisateurs importants (13). Les xylanases constituent la proportion commerciale majoritaire des hémicellulases. Elles peuvent être utilisées seules dans une large gamme de procédés industriels, couvrant tous les secteurs du marché des enzymes industrielles.

L'office commercial et des brevets des États-Unis ont dénombré 468 brevets sur les xylanases en 2001 (2). Les xylanases sont fréquemment utilisées dans la formulation d'aliments pour les animaux (amélioration de la digestibilité et de la valeur nutritive), en industries des jus de fruits et brassicoles (amélioration de l'extraction ou la filtration), en amidonnerie (amélioration de l'opération d'extraction), en industrie du papier (amélioration de la pureté de la cellulose, permet une réduction de 50 % de la quantité de chlore nécessaire au blanchiment du papier et de la quantité d'organochlorés rejetés dans l'environnement) (2) (14). Les xylanases sont aussi utilisées en combinaison avec d'autres enzymes, et en particulier avec d'autres hydrolases, mais aussi avec des protéases, oxydases, isomérases et pectinases.

Au niveau de notre laboratoire Biochimie et de Microbiologie Appliquées (L.B.M.A), trois nouvelles souches d'Actinomycètes thermophiles appartenant au genre *Actinomadura* sont isolées du compost de poulet et identifiées par technique moléculaire (ARNr). Ces souches dénommées Cpt 8, Cp20 et Cpt29 ont fait l'objet de plusieurs travaux. Ainsi, la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt20 secrète une endo- β -1-4-xylanase basique et thermostable, qui est purifiée et caractérisée (6). Egalement la même souche secrète des Pectinases et une kératinase (Travail en cours). La souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 dont le gène est déposée dans la banque des gènes avec numéro d'accèsion **KC447297** (accéssible dans la banque des gènes en ligne (15) a également fait l'objet de travaux sur l'optimisation de la production de kératinase (16) et l'étude biochimique de cette même Kératinase (17).

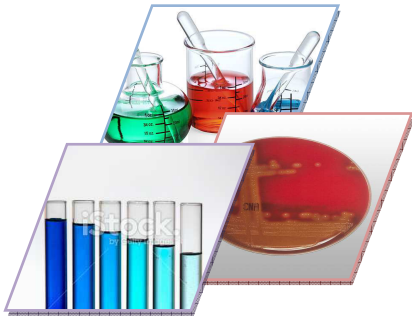
Sur la base de ces éléments, nous nous sommes intéressés à la recherche de xylanases chez la souche d'Actinomycète thermophile *Actinomadura keratinilytica* Cpt29.

Dans ce travail de recherche, nous avons abordé les objectifs suivants :

Objectifs :

-Une étude bibliographique qui cadre le sujet.

-Une partie expérimentale dans laquelle nous avons d'abord procédé à l'optimisation de la production des xylanases chez l'espèce *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 par méthode classique et où nous avons tenté par la suite de purifier cette xylanase et de la caractériser, avec recherche de son mode d'action.



Etude bibliographique

CHAPITRE I : LES ENZYMES XYLANOLYTIQUES ET LEURS SUBSTRATS**I-1 Les enzymes xylanolytiques**

L'hydrolyse des xylanes nécessite l'intervention de systèmes enzymatiques hétérogènes constitués de différents types d'activités xylanolytiques, principalement les endoxylanases, les β -xylosidases et les enzymes débranchantes.

I-1-1 Les xylanases

Les xylanases sont des glycosidases (O-glycoside hydrolases, EC 3.2.1.x) qui catalysent les liaisons 1,4-D-xylosidiques dans les régions non substituées des chaînes de xylanes pour aboutir au xylose (une source de carbone primaire nécessaire au métabolisme cellulaire) **(18)**. Elles constituent un complexe multi-enzymatique qui se trouve en particulier dans les bois **(19)**, comme ils sont aussi secrétées par de nombreux champignons (pathogènes et saprophytes), par des bactéries marines et telluriques ainsi que par les micro-organismes du rumen (protozoaires et bactéries) et les levures **(20)**. On peut distinguer les endo et les exo-xylanases.

- Les endo-D-xylanases, β -D-(1,4) xylane xylanohydrolase (EC 3.2.1.8), dégradent leurs substrats par une attaque intramoléculaire. Les exo-D-xylanases, β -D-(1,4) xylane xylanohydrolase, (EC 3.2.1.37) hydrolysent les polymères de xylose par récurrence à partir de leur extrémité non-réductrice.

Les produits d'hydrolyse reflètent en partie la spécificité de ces hydrolases et permettent ainsi de classer les xylanases selon leur mode d'action en trois groupes :

-Les endo-xylanases ne libèrent pas d'arabinose et hydrolysent les xylanes principalement en xylose, en xylobiose et en oligomères de xylose de degrés de polymérisation supérieure à 2.

-Les endo-xylanases qui libèrent du L-arabinose et hydrolysent les xylanes principalement en xylose et en xylobiose et excessivement en oligomères de xylose.

-Les exo-xylanases dégradent les xylanes et les xylo-oligosaccharides de faible degré de polymérisation en libérant principalement du D-xylose. Les exo-xylanases provoquent une inversion de configuration du D-xylose libéré comme les β -xylosidases.

I-1-2 Les β -xylosidases :

La majorité des enzymes regroupées dans la famille GH43 sont des β -xylosidases (nom systématique : 1,4- β -D-xylanexylohydrolase), (EC 3.2.1.37) qui sont les vrais exoglycosidases. Ces β -xylosidases hydrolysent les xylo-oligosaccharides de faible degré de polymérisation (DP) libérés par les endoxylanases à partir de leur extrémité réductrice et libèrent des monomères de xylose **(21)**.

Il est difficile de distinguer entre les β -xylosidases et les exo-xylanases agissant à l'extrémité de la chaîne polysaccharidique puisqu'elles libèrent le même produit (xylose) **(22)**.

I-1-3 Les enzymes débranchantes :

L'hydrolyse complète du xylane en monomères de xylose requiert en plus des enzymes principales, l'intervention d'autres enzymes débranchantes qui s'attaquent aux branchements greffés sur la chaîne principale. Parmi ces enzymes débranchantes, nous trouvons l' α -L-arabinofuranosidase, l' α -glucuronidase, l'acétyl-xylan estérase et les feruloyl/coumaryl estérases **(21)**.

I-1-4 Classification des xylanases :

Les xylanases ont été classées selon trois modes :

➤ Le premier mode est suggéré par Wong et al **(23)**, il se base sur la différence des poids moléculaire et du point isoélectrique de ces enzymes : cette classification a pu être obtenue rapidement suite aux purifications et aux caractérisations des xylanases tel que les xylanase de la souche *Streptomyces* sp S38 **(24)**. Cependant, notent que cette classification était incomplète **(25)**, de nombreuses exceptions avaient été découvertes et approximativement 30 % des endoxylanases (particulièrement issues des champignons) ne pouvaient pas être classées suivant ce système.

➤ Le deuxième mode se base sur l'homologie de séquence en acides aminés hydrophobes situés au niveau des domaines catalytiques **(10)** qui est aujourd'hui employée et accessible dans la base de données CAZy (Carbohydrate-Active enZyme CAZY) **(26) (27)**. Cette technique dite HCA (Hydrophobic Cluster Analysis) permet de détecter une homologie structurale tridimensionnelle entre deux protéines présentant une similitude en acides aminés inférieur à 20%. Les xylanases sont classées en six familles glycosyl hydrolases : 5, 7, 8, 10, 11 et 43. Les xylanases les plus étudiées appartiennent aux familles F ou 10 et G ou 11.

➤ Le troisième mode se base sur les propriétés cinétiques, la spécificité au substrat et les produits d'hydrolyse libérés. Cette classification suggère que la majorité des xylanases ont une activité endoxylanase. Selon leurs produits d'hydrolyse, on peut trouver des xylanases qui permettent la libération de xylose et de xylobiose en majorité, il y a aussi d'autres xylanases qui libèrent exclusivement des xylotrioses et d'autres oligosaccharides de DP élevé. La différence des produits d'hydrolyse reflète la différence de nombre des sous sites de liaisons des xylopyranoses exposés à la surface de l'enzyme. Ce nombre des sous sites détermine alors la nature des oligosaccharides libérés (28).

I-1-4-1 La famille 10

Les xylanases de cette famille possèdent généralement un haut poids moléculaire et un faible point isoélectrique. Ce domaine constitue un repliement en $(\beta/\alpha)_8$, un mécanisme d'hydrolyse de rétention et un site actif qui se trouve au centre d'une crevasse longue et peu enfoncée, délimitée par les huit boucles $(\beta\alpha)$ à la surface du domaine (Fig. 1) (21).

Ces xylanases libèrent des oligosaccharides de faible degré de polymérisation. Elles peuvent porter un domaine de liaison à la cellulose ou CBD (cellulose binding domain). En effet ces xylanases peuvent agir sur le para-nitro-phényl-xylobiose et aussi sur le para-nitro-phényl-cellobiose mais leur activité catalytique sur le para-nitro-phényl-xylobiose est 50 fois plus élevée, ce qui suggère que les membres de cette famille sont des xylanases dont certaines sont dotées d'une activité cellulase (29) (Tab.I).

On retrouve aussi dans cette famille un sous groupe de xylanases non modulaires de plus petite taille avec un seul domaine catalytique (30). Ces enzymes de petites tailles sont souvent intracellulaires (ou périplasmiques) et très actives sur les xylooligosaccharides, permettant à la bactérie d'internaliser directement les produits d'hydrolyse du xylane, comme suggéré pour les xylanases GH10 de *Prevotella bryantii* (31). Certaines de ces enzymes non modulaires ont aussi des propriétés particulières et originales comme la thermostabilité d'une xylanase périplasmique (Xyn10B) de *Thermotoga maritima* (32).

I-1-4-2 La famille 11

Ce sont les endo-xylanases « cellulases Free ». Elles ont une faible masse moléculaire, et peuvent avoir un point isoélectrique soit alcalin, soit acide. Une des premières structures tridimensionnelle établies d'une xylanase de la famille 11 est celle du champignon *Trichoderma harzianum* (33). Le domaine catalytique de ces enzymes a une structure ouverte de type feuillet β formant deux couches qui entourent le site catalytique (34). L'une des deux couches est prolongée par une longue boucle qui se termine par une isoleucine. La structure

de ce domaine catalytique a été assimilée à une main droite avec sa paume et ses 4 doigts où la boucle représente le pouce **(35) (Fig. 2)**. Les produits d'hydrolyse des xylanases GH11 sont de plus grande taille que ceux des xylanases GH10. En effet, contrairement aux xylanases de la famille GH10, les xylanases GH11 sont plus actives sur les longues chaînes de xylooligosaccharides **(30)**. En ce qui concerne le mécanisme catalytique des xylanases de la famille 11, on trouve que ces xylanases fonctionnent via un mécanisme catalytique de rétention de la configuration anomérique du substrat **(21)**.

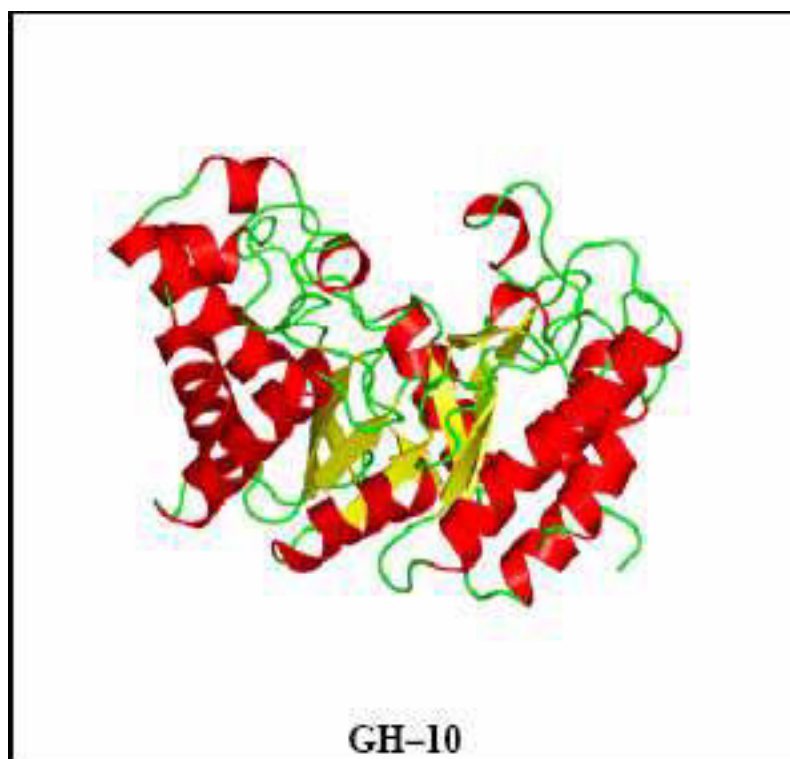


Figure 1: Structure des xykanases de la famille 10 (21).

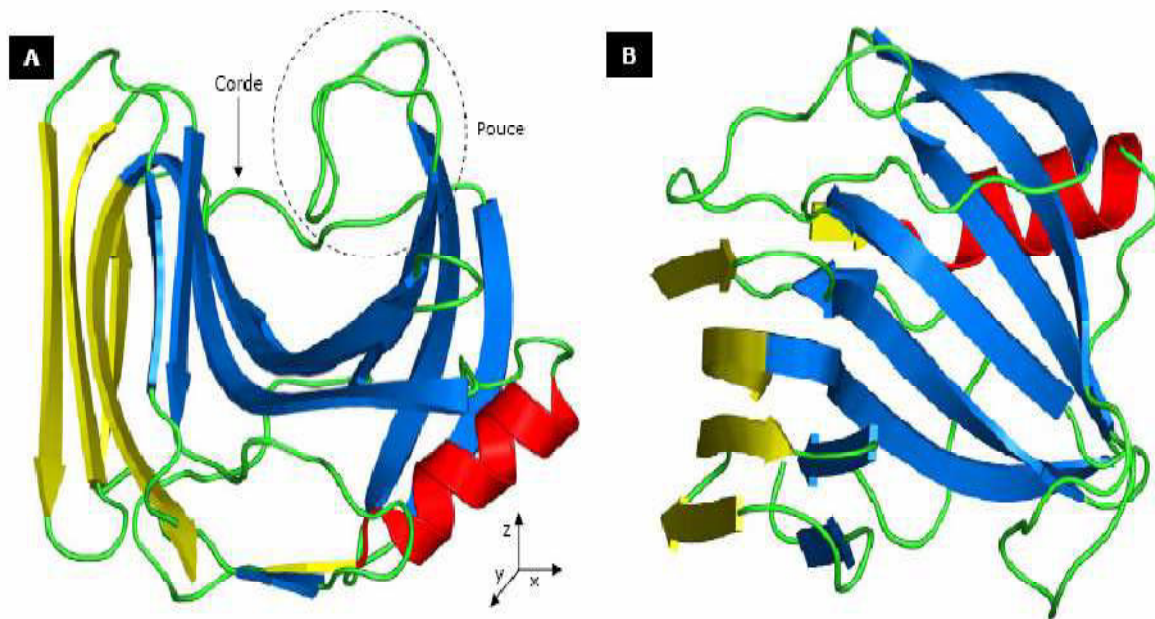


Figure 2: Structure des xylanases de la famille 11 (*Thermobacillus xylanilyticus*).

Les brins β du feuillet A sont indiqués en jaune, ceux du feuillet B en bleu, l'hélice en rouge et les boucle en vert. **A** : vue dans le prolongement de la crevasse catalytique ; **B** : rotation de 90° par rapport à l'axe x (**25**).

Tab. I : Propriété des endo-xylanases des familles 10 et 11 (36).

Propriété des endoxylanases	Famille 10	Famille 11
La masse moléculaire	Habituellement > 30KDa	Habituellement < 30KDa
Le point Isoélectrique	Habituellement < 7	Habituellement > 7
Le repliement de protéine (molécule catalytique)	(α / β) ₈	feuillet β
Site de liaison du substrat	peu profond	clivage profond
Acides aminés catalytiques	2 Acides Glutamique (occasionnellement 1 Glutamate et 1 Aspartate)	2 Acides Glutamique (occasionnellement 1 Glutamate et 1 Aspartate)
Numéro de sous sites	4-5	5-7
Substrat spécifique	Moins spécifique	Plus spécifique
Hétéroxylanes	Active	Active
β -xylosides	active	Inactive
β -cellobiosides	Active	Inactive
β -lactosides	Active	Inactive

I-1-5 Mode d'action des enzymes xylanolytiques :

Compte tenu de leur hétérogénéité et complexité, l'hydrolyse complète des xylandes requiert l'action combinée d'endo- et d'exoenzymes qui non seulement hydrolysent les liaisons au sein de la chaîne principale, mais également libèrent les constituants des chaînes latérales. En effet, les enzymes qui attaquent les liaisons intérieures de type β 1,4-xylosidiques appelées endo- β -1,4-xylanases (EC 3.2.1.8) libèrent des oligomères de petites tailles c'est le cas de l'endo-xylanase de *Bacillus pumilus* (37) qui libère à partir du xylane de mélèze du xylobiose, xylotriose et à un degré moindre du xylo-tétra- et pentose sans apparition de xylose. Ainsi que la xylanase d'*Aspergillus niger* qui dégrade l'arabinoxylane de paille de riz en xylose, arabinose et un mélange d'oligosides mixtes (38).

Les exo-xylanases et les β -xylosidases (EC 3.2.1.37) hydrolysent les petites oligomères libérées par les endoxylanases, en xylose.

Les enzymes accessoires ou enzymes de débranchement éliminant les chaînes latérales sont aussi nécessaires. Ce sont les α -L-arabinofuranosidases ou xylandes-1,4- β -xylanidases (EC 3.2.1.55), les α -glucuronidases, les acétyl estérases, acétyl-xylan estérases et coumarique et férulique estérases (Fig. 3) (20) (21) (18).

Les glycoside-hydrolases fonctionnent selon deux mécanismes de type acide/base, entraînant une rétention ou une inversion de la configuration du carbone anomérique du site d'hydrolyse (30).

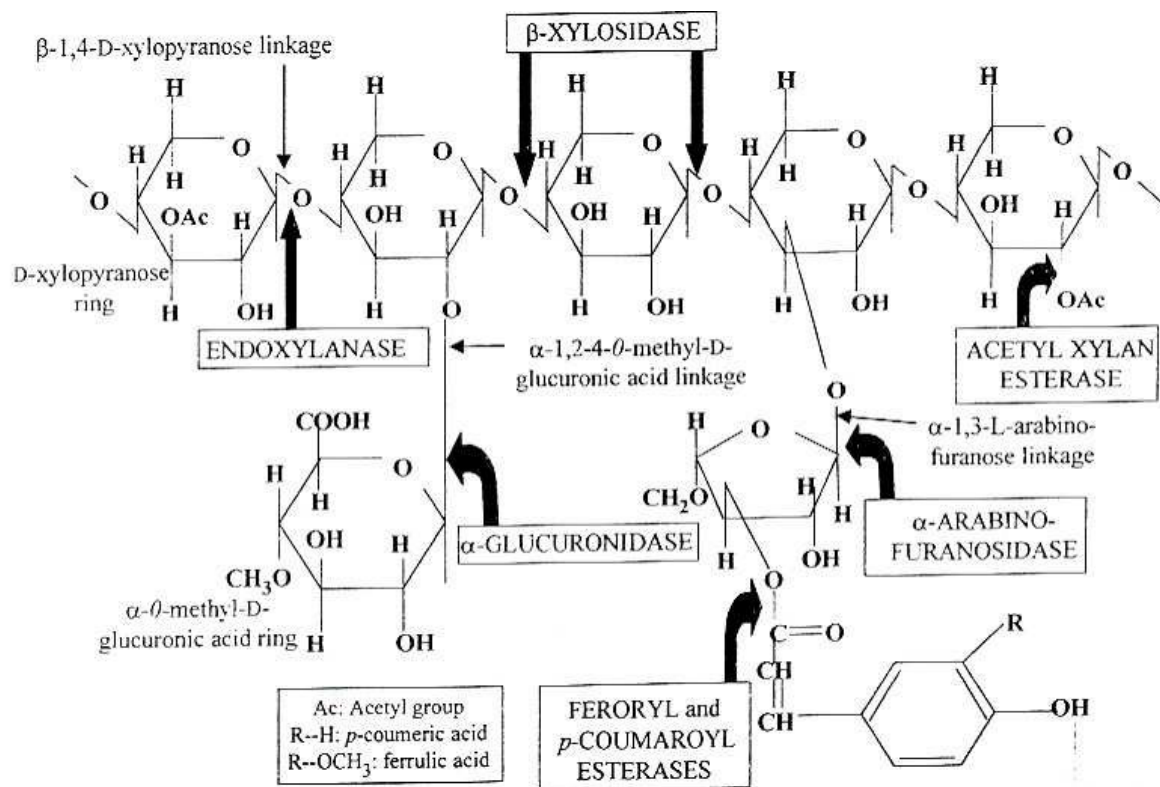


Figure 3: Mode d'action des enzymes xylanolytiques sur la chaîne principale et les ramifications du xylane (39).

I-1-6 Les propriétés physico chimiques des enzymes xylanolytiques :

Les paramètres physico-chimiques de quelques endo-xylanases purifiées à homogénéité sont présentés dans le **tableau II**. Les endo-xylanases sont des protéines monomériques de poids moléculaire compris entre 15000 et 50 000, atteignant exceptionnellement 90 000. La composition en acides aminés des endo-xylanases révèle une forte proportion des résidus acides et aromatiques. Les xylanases ne sont pas des métallo enzymes ; généralement les groupements –SH ne sont pas impliqués dans le maintien de l'activité enzymatique. Par contre, la tyrosine et le tryptophane jouent un rôle dans l'activité catalytique des endo-xylanases. Outre les agents inhibiteurs classiques (Hg^{2+}), certains produits de la réaction tels que le xylose, l'arabinose et le xylotriose peuvent inhiber partiellement l'activité. Certaines endo-xylanases possèdent une fraction glucidique représentant 15 à 30 % de la molécule protéique **(20) (40)**.

Les xylanases de quelques champignons et levures présentent un pH optimum d'action de 4 à 5 alors que les enzymes bactériennes ont une activité maximale à des pH proches de la neutralité (6 à 7) **(Tab. II)**. Les xylanases bactériennes sont généralement plus thermostables que les enzymes fongiques; celles de bactéries thermophiles telles que *Bacillus stearothermophilus* ont des températures optimales d'activité variant de 65 à 80°C. Autre exemple, la xylanase produite par *Clostridium sterconarium* a une température optimale de 70°C et un temps de demi-vie à 80°C de 90 minutes **(20) (40) (41)**.

Récemment, plusieurs xylanases thermophiles provenant des microorganismes fongiques (*Ceratocys tisp paradoxa* et *Talaromyces byssochlamydoïdes*) et bactériens (*Bacillus* et *Actinomycète*) sécrétant des xylanases thermostables ont été identifiées **(42)**. Une xylanase thermophile, c'est le cas de la souche : *Actinomadura* **(43)** reclassée en *Microtetraspora* ayant un pH optimum de 6,0 à 7,0 et une plage de températures de 70 à 80°C. Une autre souche bactérienne *Thermomonospora fusca* **(44)** produit également des xylanases thermostables actives à des températures de 10 à 90 °C sur une plage de pH entre 5 et 10 avec un optimum d'activité entre 6,6 et 9,5. Une xylanase dérivée du genre *Dictyoglomus*, ayant une activité à un pH étendue entre 5,0 et 9,0 et une thermostabilité à des températures s'échelonnant entre 60 et 90°C a été aussi mise en évidence.

Tab. II: Paramètres physico-chimiques de quelques xylanases produites par les microorganismes (45).

Source	Masse moléculaire (kDa)	pI	pH optimum (react tem. °C)	Temp. °C optimal (react pH)
<u>Bactérienne</u>				
	145	-	7.0-8.0 (40)	50
<i>Aeromonas</i> sp.212	37	-	6.0-8.0 (40)	50
	23	-	5.0-7.0 (40)	60
<u>xylanases de <i>Bacillus</i></u>				
<i>Bacillus</i> sp. C-59.2	-	6.3	5.5-9.0 (40)	60 (7.0)
<i>Bacillus</i> sp.C-125	43	-	6.0-10.0 (40)	70 (7.0)
<i>Bacillus</i> sp.NCL87-6-10	10.4	-	8.0-9.0 (50)	60 (8.0)
<i>Bacillus</i> sp.YC-335	40	-	6.0 (40)	55
<i>Bacillus</i> sp.NG.27	-	-	7.0-8.4 (65)	70
<i>Bacillus Circulans</i>	-	-	7.0-8.0	45
<i>Bacillus</i> sp.(V1.4)	-	9.1	6.0-7.0 (55)	55 (7.0)
<i>Bacillus</i> sp.Sam III	-	-	8.0 (60)	60 (8.0)
<u>Actinomycètes</u>				
<i>Noardiopsis dassonvillei</i>	23	4.9	7.0 (50)	60 (7.0)
	37	4.1	7.0 (50)	50 (7.0)
<i>Strptomyces</i> sp.VP.5	-	-	4.8-10.0 (50)	50
<i>S. Viridosporus</i> T7A	59	10.2	7.0-8.0 (60)	65-70 (7.0)
<u>Fongiques</u>				
<i>Cephalosporium</i> sp NCL	28	4.05	6.5-9.0 (40)	40 (7.0-9.0)
<i>Cephalosporium</i> RYM-202	35	6.3	7.5 (50)	50 (7.5)
Enzyme CX-I	24	4.4	8.0 (50)	50 (8.0)
Enzyme CX-II	-	-	6.0-6.5	60 (6.0)
<u>Levures</u>				
<i>Cryptocousalbidus</i>	26	-	5.4	-
<i>Trichosporoncutaneum</i>	45	-	5.0	50

I-1-7 Caractérisations des xylanases thermostables

L'utilisation des enzymes thermophiles est de plus en plus importante à cause de leurs propriétés intéressantes telles que la thermostabilité. On a également observé une multiplicité de xylanases dans quelques *Actinomycètes* thermophiles. Cette diversité diffère dans la stabilité et l'activité catalytique (46).

A l'exception des xylanases hyper thermostables de *Thermotoga* ayant des températures optimales variant selon les espèces, de 80°C chez *Thermotoga thermarum* (47) à 115°C chez *Thermotoga* sp. (EjSS3-B1) (48), la majorité des xylanases ont une température optimale comprise entre 50 et 60°C avec une demi-vie d'environ 1 heure à 55°C (49). Cependant, les xylanases fonctionnant à haute température et thermostables sont plus recherchées pour des applications industrielles surtout dans l'industrie du papier où les conditions opératoires se font à un pH alcalin et à une haute température.

Récemment, des xylanases «cellulases free» ayant des températures optimales supérieures à 65°C ont été identifiés chez certaines bactéries telles que *Thermoactinomyces thalophilus* (7) et *Clostridium abusarum* (CFR-702) (50), et certains champignons du genre *Melanocarpus* (51), *Thermomyces* (10), et *Thermoascus* (52).

La thermostabilité des xylanases est une propriété intrinsèque codée par la séquence génomique (53). En outre, la thermostabilité résulte de plusieurs modifications qui rendent la structure tridimensionnelle plus stable à la dénaturation. (54) telles que : l'augmentation des repliements, l'augmentation des liaisons hydrophobes à l'intérieur de la protéine d'où l'augmentation de l'indice d'hydrophobicité (6).

Il faut noter que, les xylanases de la famille 10 sont plus thermostables que celles de la famille 11 (55). Cependant, les xylanases de cette famille sont plus utilisées dans des processus de blanchiment du papier puisque leurs faibles poids moléculaires facilitent leur diffusion à travers les fibres du papier et donc l'élimination extensive de lignine (18).

I- 2 LE SUBSTRATS XYLANE**I-2-1 Structure de la paroi végétale**

La paroi végétale est une structure extracellulaire organisée et complexe, semi rigide et dynamique qui enveloppe la membrane cytoplasmique des cellules végétales. Parmi des nombreuses fonctions, elle joue un rôle essentiel dans les propriétés mécaniques des organes, participe à la croissance des tissus et assure un rôle de barrière qui permet aux cellules de

résister à la pression osmotique et aux attaques des pathogènes (25). Elle est composée majoritairement de lignocelluloses, assemblage complexe de la cellulose, des lignines et des hémicelluloses. On y rencontre aussi des protéines, des lipides, des pigments et des minéraux. Sa structure observée en microscopie électronique révèle trois niveaux d'organisation (Fig. 4) :

- La lamelle moyenne : couche fine de 0,5 à 2,0 μm d'épaisseur, riche en substances pectique, qui assure la cohésion entre deux cellules contiguës
- La paroi primaire : couche très fine de 0,03 à 1,0 μm d'épaisseur, souple, hydrophile, de faible résistance mécanique, formée au cours de la croissance cellulaire, et en majorité composée de microfibrilles de cellulose englobées dans une matrice amorphe riche en hémicelluloses, pectines et protéines.
- La paroi secondaire : couche épaisse, compacte, rigide et très résistante issue de cellules en fin de croissance. Elle est construite à partir de dépôts de microfibrilles de celluloses en couches orientées perpendiculairement les unes aux autres, d'où la différenciation en trois couches S1, S2 et S3 de la paroi secondaire (56).

I-2-1-1 La cellulose

Directement issue de la photosynthèse, la cellulose est la molécule organique la plus abondante sur terre, elle représente la matière la plus importante de la paroi des cellules végétales. La quantité de cellulose bio-synthétisée par les plantes terrestres est estimée à 100 milliards de tonnes par ans, constituant à elle seule jusqu'à 50% de la matière sèche du tissu végétal (57).

La cellulose est un homopolymère linéaire formé d'unités D-glucopyranose liées entre elles par des liaisons de type glycosidique β -(1 \rightarrow 4). Le cellobiose (dimère de glucose) est le motif répétitif de la cellulose. Cette conformation explique la linéarité de la molécule qui se trouve stabilisée par un réseau de liaisons hydrogène intermoléculaires et intramoléculaires. Le nombre d'unités glucose constituant une chaîne de cellulose, appelé degré de polymérisation DP, dépend de l'origine et du traitement subi par la cellulose au cours de sa purification. Le DP de la cellulose dans les parois secondaires varie entre 13000 et 14000, alors que dans les parois primaires le DP est plus faible et varie entre 2000 et 6000 (58). Les microfibrilles de cellulose correspondent à des assemblages entre les chaînes β -(1 \rightarrow 4) D glucanes par formation de liaisons hydrogènes intermoléculaires. Ce réseau permet de maintenir ensemble les molécules et favorise l'établissement d'un état solide ordonné (25). La structure fibrillaire très condensée de la cellulose explique sa résistance aux attaques

chimiques et enzymatiques, sa grande résistance mécanique à la traction, ainsi que son caractère insoluble dans l'eau. La fraction cellulosique est considérée comme étant le résidu insoluble après l'extraction des autres polysaccharides de la paroi par des agents chélateurs et des bases minérales **(21)**.

I-2-1-2 L'hémicellulose

Les hémicelluloses sont les polysaccharides les plus abondants sur la terre après la cellulose, ils représentent l'essentiel des structures pariétales des végétaux (20 à 30 % de la biomasse lignocellulosique) **(Fig. 5) (20) (25)**.

Le nom d'hémicellulose a été donné en 1891 par Schulze **(21)** pour désigner tous les polysaccharides de plantes que l'on pouvait extraire par des solutions alcalines. En fait, cette définition est imprécise et incomplète car elle regroupe les hémicelluloses avec des polysaccharides comme les arabinanes et les arabinogalactanes de certains conifères. Contrairement aux glucanes où les monomères de glucose sont toujours associés d'une façon répétitive, les hémicelluloses sont des hétéroglycanes qui ont une structure beaucoup plus complexe caractérisée par la présence de plusieurs ramifications ou chaînes latérales fixées sur la chaîne principale. Cette structure ramifiée empêche toute possibilité de rapprochement des chaînes et donc d'arrangement cristallin. En revanche, ces hétéroglycanes ramifiés forment des réseaux tridimensionnels assurant une résistance à la compression **(21)**.

Une autre propriété qui différencie les hémicelluloses de la cellulose est leur solubilité dans les solutions alcalines. Ils doivent cette caractéristique au petit nombre d'oses qui les constituent (inférieur à 200) **(59)**. Ils sont facilement dégradables par les enzymes cellulaires et peuvent constituer des formes de réserves : cas de l'albumen corné de la datte.

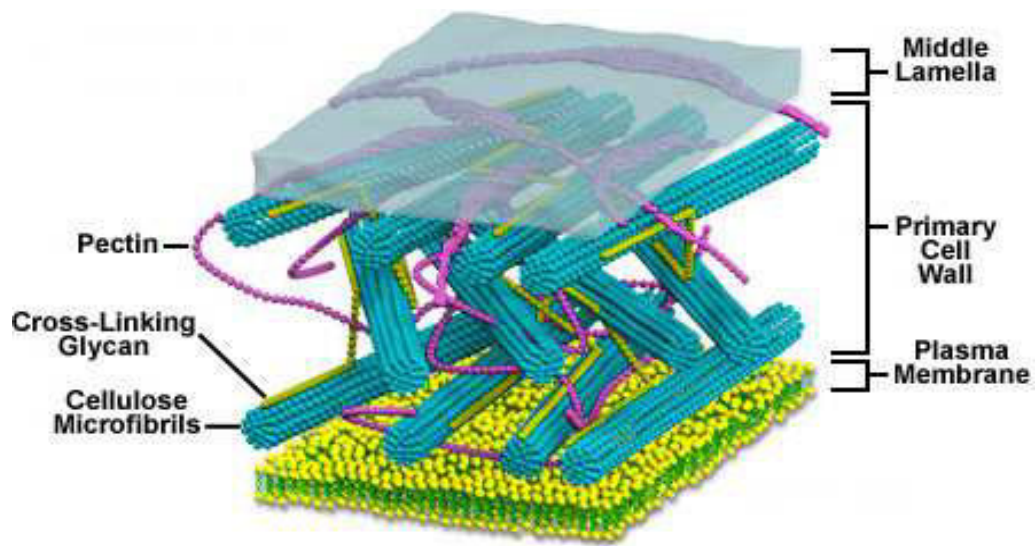


Figure 4 : Structure de la paroi végétale (25).

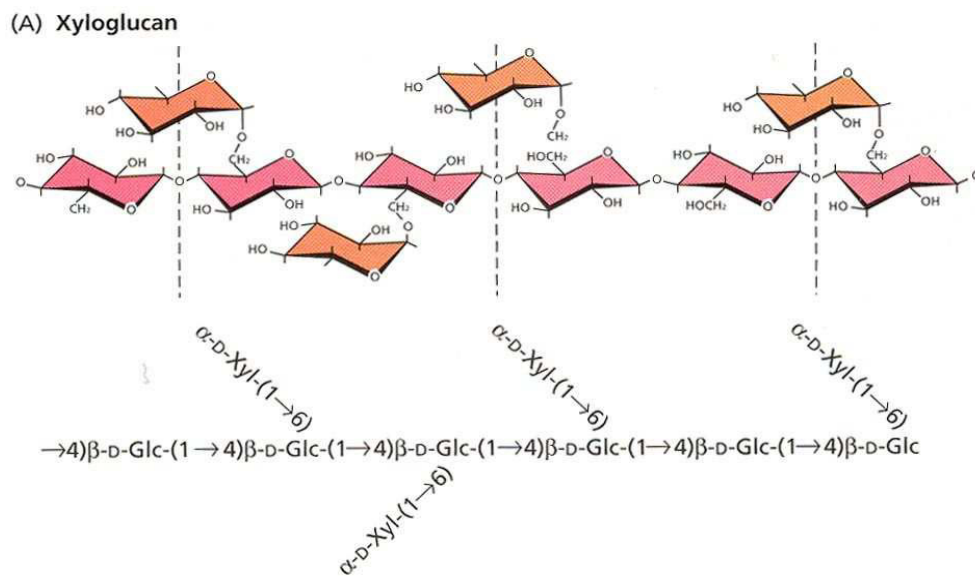


Figure 5 : Structure des hémicelluloses (25).

I-2-1-3 La pectine

Les substances pectiques sont des macromolécules glucidiques largement répandues dans le règne végétal ou elles constituent avec l'hémicellulose et le cellulose l'un des composants majeurs de la paroi des cellules végétales **(60) (61)**.

Elles sont localisées dans la lamelle moyenne et dans la paroi primaire des cellules végétales. Le terme "substances pectiques" est le terme générique pour les macromolécules contenant des acides galacturoniques polymérisés **(62)**.

Les acides polygalacturoniques sont des substances pectiques formées uniquement d'acides galacturoniques liés entre eux par une liaison osidique α (1-4) **(62)**. Les acides pectiques, contiennent en plus de l'acide polygalacturonique, une proportion plus au moins importante d'oses neutres : rhamnose, galactose et arabinose sont les oses les plus couramment rencontrés et la teneur en oses neutres est d'environ 10 à 20 %. Il a été montré que le rhamnose fait partie de la chaîne principale d'où le nom de rhamnogalacturonane. Ce méthyle pentose est lié aux acides galacturoniques par ces carbones 1 et 2. Les autres oses neutres sont liés, soit au C 4 du rhamnose, soit au C 2 et/ou C 3 des acides galacturoniques, formant ainsi des chaînes latérales d'arabinanes, de galactane et/ou d'arabinogalactane. Alors que le xylose, le glucose, le mannose, sont beaucoup moins fréquents **(63) (64)**.

I-2-2 Structure de xylanes

Les xylanes sont les polymères les plus abondants dans les végétaux et particulièrement des bois durs **(18)**. Ils représentent entre 20 à 30 % des parois cellulaires, étant essentiellement des constituants de la paroi secondaire, ils sont associés à la lignine. La solubilité du xylane dépend non seulement de sa masse moléculaire mais aussi de la nature des chaînes latérales. Généralement, ce substrat est plus soluble en milieu alcalin qu'en milieu neutre ou acide **(20)**.

La structure de base des xylanes est un squelette linéaire d'unités de xylose reliées entre elles par des liaisons β -(1-4) et le degré de polymérisation se situe entre 100 à 200 unités de xylose **(Fig. 6) (65)**. Ces liaisons portent la plupart du temps des ramifications monomériques de type D-xylose, L-arabinose, D-mannose, D-glucose, D-galactose et de l'acide glucuronique **(Fig. 7)**. Selon la nature de ces substituants, ces polymères sont appelés arabino-xylanes, galacto-xylanes, glucurono-xylanes.

Souvent, la structure du xylane comporte diverses chaînes latérales telles que les groupements acétyl-arabinofuranosyl et méthyl-glucuronyl sur lesquelles viennent se greffer

des composés aromatiques (acide férulique et acide para-coumarique). Il semblerait que ces derniers soient impliqués dans le couplage de l'hémicellulose à la lignine par l'intermédiaire des ponts éthers **(18)**.

I-2-3 Origine et distribution de xylane

Les sources majeures de xylane sont essentiellement localisées dans le bois des dicotylédones et en excluant les graminées, chez les monocotylédones où les xylanes du type GX et AGX forment entre 25 et 35 % de la biomasse sèche ou encore dans les grains de céréales qui peuvent contenir de 30 à 50% d'AX, de GAX et d'HX **(25)**.

Les sources de xylanes ne manquent donc pas, y compris pour une exploitation et une valorisation à l'échelle industrielle de ces polysaccharides. Les épis de maïs, co-produits de l'industrie de transformation du maïs, sont la source la plus conventionnelle de xylane **(12)**. D'autres sources facilement accessibles et abondantes existent. C'est par exemple le cas des xylanes extraits à partir des résidus générés lors de la production d'huile de tournesol ou d'huile d'olive **(25)**. Le bois et les co-produits de l'industrie forestière (sciures et écorces) sont aussi très riches en xylanes. En particulier, les bois durs, essentiellement de feuillus, présentent des contenus plus homogènes en xylanes **(45)**. On trouve le xylane principalement dans les parois secondaires, il forme une interphase entre la lignine et d'autres polysaccharides **(45) (12)**. La diversité structurale des xylanes est associée à leurs fonctions chez les plantes et peut ainsi expliquer la répartition de certaines classes de xylanes au sein du règne végétal comme illustré dans le **tableau III**. La présence de xylanes peut ainsi être mise en évidence jusqu'aux familles botaniques les plus anciennes.

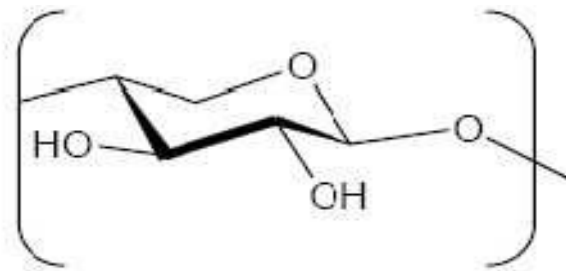


Figure 6: Structure du résidu β -D-xylopyranose.

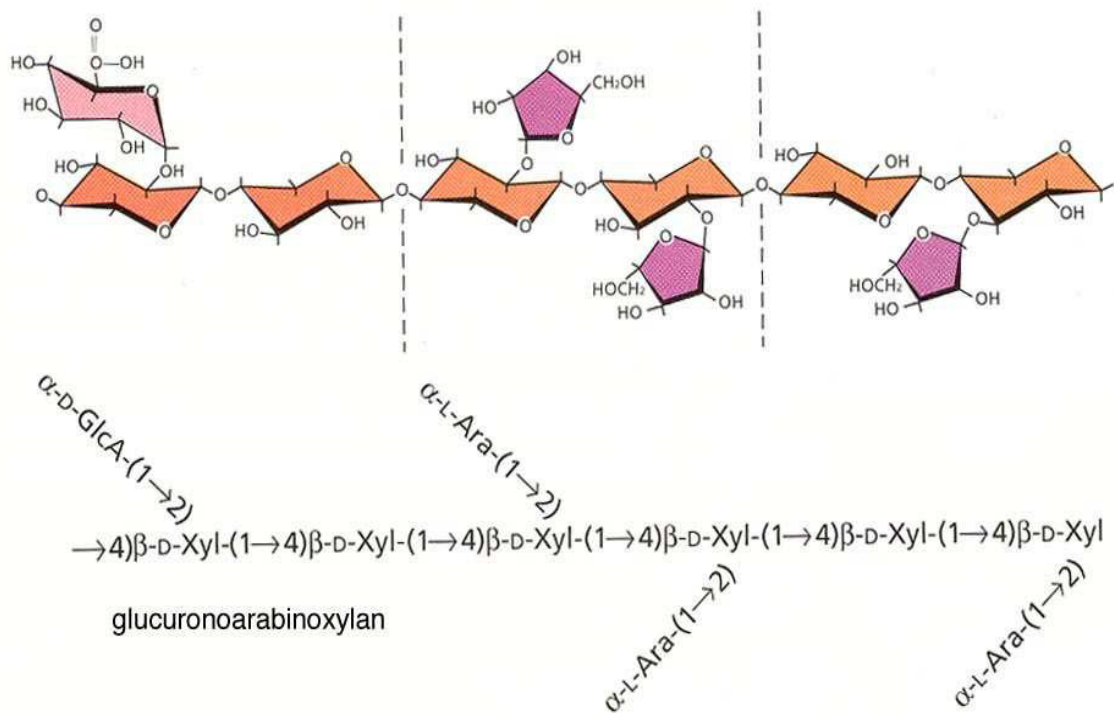


Figure 7 : Structure de xylane.

Tab. III : Distribution et diversité de xylane chez certains végétaux (25).

Végétale	Type de xylane
Algues vertes	Les homoxylanes (X) linéaires de type B (1→3)
Algues rouges	Les homoxylanes mixtes (Xm) B (1→3 et 1→4)
Plantes supérieures	Glucuronoxylane
Bois des dicotylédones	4- <i>O</i> -méthylglucuronoxylane (GX)
Bois de gymnospermes	Arabino(glucurono)xylanes (AGX)
Tissus de graminées et de plantes annuelles	
Grains de céréales :	Arabinoxylanes neutres (AX)
le seigle, l'avoine, le froment	(solubles = ws-AX ou insolubles = wis-
et l'orge	AX dans l'eau)
Les grains de riz, de maïs	Arabinoxylanes (AX)
et sorgho	Arabino(glucurono)xylanes (AGX).
Céréales	Hétéroxylanes

CHAPITRE II: LES ACTINOMYCETES THERMOPHILE PRODUCTEURS DES XYLANASES**II-1 Caractères généraux des Actinomycètes**

Les bactéries thermophiles ont été observées pour la première fois en 1879. Il fallut cependant attendre jusqu'en 1898 avant que ne soient décrits les premiers actinomycètes thermophiles. Les Actinomycètes se caractérisaient alors par la présence d'une vraie ramification, par la formation de spores à l'extrémité des filaments, de même que par l'absence d'organes spéciaux de fructification (66).

Les Actinomycètes, organismes procaryotes, sont classés parmi les bactéries. Ils sont inclus dans l'ordre des *Actinomycetales*. Les Actinomycètes sont donc des bactéries aérobies, à Gram-positif, ayant la capacité de former des spores asexuées (conidiospores ou sporangiospores) et des hyphes ramifiés, habituellement non fragmentés. Comme les autres bactéries à Gram-positif, leur paroi est constituée d'une épaisse couche de peptidoglycane qui joue un important rôle dans le maintien de la rigidité cellulaire ainsi que dans la protection physique de la membrane sous-jacente. Leur croissance, avec un temps de génération moyen de 2 à 3 heures, est plus lente que celle des autres bactéries. Sur les milieux solides, les Actinomycètes forment en une semaine environ des colonies souvent pigmentées (gris, vert, rouge...) provenant de l'accumulation d'hyphes ramifiés à contour lisse ou échancré à aspect compact (67).

En général, les Actinomycètes sont des hétérotrophes, mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimio-autotrophique. Certains ont des exigences nutritionnelles telles que les vitamines et certains acides aminés. Ils colonisent fréquemment les substrats insolubles tel que le charbon par pénétration mécanique de la matrice et peuvent dégrader les protéines, la cellulose et d'autres matières organiques comme paraffine et les résidus des plantes dans le sol (67).

La grande majorité des Actinomycètes peut se développer dans une zone alcaline de pH de 5 à 9.0, avec un maximum autour de la neutralité. Cependant, quelques *Streptomyces* sont acidophiles et croissent à des pH compris entre 3,5 et 6,5 ils ont donc une forte croissance dans les sols acides.

Les Actinomycètes thermophiles actifs à des températures très élevées de 50°C à 90°C, tels que *Thermomonospora fusca* (44) qui croît à des températures de 10 à 90 °C. Une autre

souche d'*Actinomycètes* thermophiles *Actinomadura* (43) reclassée en *Microtetraspora* ayant un pH optimum de 6,0 à 7,0 et une plage de températures de 70 à 80°C.

Les Actinomycètes colonisent une large variété d'habitats naturels. Comme le montre le **tableau IV**, ils sont capables de se développer sur une large gamme de substrats. Certaines espèces d'Actinomycètes semblent préférer certains habitats à d'autres. Par exemple, les *Thermoactinomyces* et les *Faenia* se trouvent dans les composts, les *Actinoplanes* et les *Actinosynnema* se rencontrent dans les sols cultivés et sur les débris végétaux qu'on trouve aux bords des rivières et des lacs (68). Les *Streptomyces*, si nombreux, se rencontrent presque partout (69).

Il a été démontré que les Actinomycètes possèdent une action importante dans la dégradation des polymères de structure relativement complexe, à savoir les hémicelluloses, la pectine, la kératine et la chitine. Ces produits apparaissent naturellement dans les litières en décomposition et dans les sols pour former l'humus. Leurs actions se situent également dans la dégradation des composts et des pollutions dues à l'activité de l'homme (70).

II-2 Les Actinomycètes thermophiles producteurs des xylanases

Les enzymes industrielles sont obtenues par extraction à partir de cellules animales, végétales et microbiennes. Cependant, seules les enzymes microbiennes produites par fermentation ont connu un essor considérable dans les industries agro-alimentaires (71).

Les xylanases sont secrétées par une variété très large de micro-organismes incluant les bactéries et les champignons (thermophiles) en premier lieu, les levures en second lieu. Ces enzymes ont été aussi mises en évidence chez d'autres organismes tels que les graines d'orges germées et chez certains microorganismes du rumen (Protozoaires, bactéries anaérobiques) (71). Les complexes xylanolytiques les plus étudiés (purifiés, caractérisés et utilisés en bio-industrie) proviennent des bactéries (**Tab.V**).

Les bactéries de la famille des Actinomycètes thermophiles tels que *Microbispora*, *Saccharomonospora* (72) retiennent particulièrement notre attention et semblent être d'excellentes candidates productrices des xylanases aux propriétés intéressantes. Ces bactéries ont principalement pour habitat naturel le sol et le compost où elles jouent un rôle important dans la décomposition et la minéralisation des matières organiques (lignine, cellulose...). Grâce à la production de nombreuses enzymes lytiques extracellulaires comme par exemple les amylases, les xylanases et les lipases, les Actinomycètes, source de biomolécules d'intérêt industriel (25). En ce qui concerne l'espèce *Actinomadura*, nous n'avons trouvé au niveau de

la bibliographie les espèces productrices aussi bien de xylanases que d'autres enzymes. Les seuls travaux dont nous disposons sont celles de l'espèce *Actinomadura* sp Cpt20 (6) qui produit une endoxylanase et la souche *Actinomadura atraherbasea* sp qui produit une polyactide (PLA) qui dégrade un polyester aliphatique (73).

Tab. IV: Répartition des Actinomycètes dans la nature (74).

Genre	Habitats
<i>Actinomadura</i>	Sol
<i>Actinoplanes</i>	Sol, eau, litière
<i>Frankia</i>	Nodule de racines
<i>Microbispora</i>	Sol
<i>Micromonospora</i>	Sol, eau
<i>Nocardia</i>	Sol, eau
<i>Rhodococcus</i>	Sol, eau, fumier, litière
<i>Saccharomonospora</i>	Matière en décomposition
<i>Streptomyces</i>	Sol, eau, litière
<i>Streptosporangium</i>	Sol
<i>Thermomonospora</i>	Matière en décomposition et fermentation

Tab.V: Caractéristiques de quelques bactéries thermophiles productrices de xylanases. (*)
Microorganismes cellulases Free (25).

	Micro-organismes	Conditions de cultures	Activité xylanase UI/m l	Références
Bactéries	<i>Bacillus sibtillus</i> (*)		12	
	<i>Bacillus</i> sp.		120	
	<i>Bacillus</i> sp.	50°C; pH 6; 1% Xylane; 1 jour.	11.50	Sa-Pereira et al., 2000
	<i>Bacillus</i> sp. NCL 87-610		93	
	<i>Bacillus circulans</i> AB 16		19.28	
	<i>Bacillus stearothermophilus</i> sp		0.35-0.6	
	<i>Rhodothermusmarinus</i>		1.8-4.03	
Actinomycète	<i>Thermoactinomyces Thalophilus</i>	50°C; pH 8,5; 0,5% Xylane; 4 jours.		Techapun et al. 2002
	<i>Thermomonospora curvata</i>	55°C ; pH 7,5		Stutzenberger et al. 1992
	<i>Thermomonospora chromogena</i> MT814	50°C ; pH 8,0	20-28UI/ml	McCarthy et al. 1985
	<i>Thermomonospora fusca</i> BD 21	50°C ; pH 8,0		Bachmann et al. 1991
	<i>Streptomyces thermoviolaceus</i> OPC-520	50°C ; pH 7,0		Minami et al. 1992
	<i>Actinomadura</i> sp Cpt20	45°C; pH8.5		Taibi et al. 2011

II-3 Aspect génétique de la production des xylanases

Les progrès récents en biologie moléculaire et génie génétique dans les deux dernières décennies, ont ouvert les domaines de l'application du clonage des gènes et la technologie de l'ADN recombinant dans le domaine de l'utilisation commerciale des résidus hémicellulosiques et la production des xylanases ayant des rendements beaucoup plus élevés avec un faible coût.

À cet égard, l'isolement et le clonage du gène xylanase dans les micro-organismes les plus efficaces représente une étape essentielle pour aboutir à des enzymes industrielles plus performantes (39).

Par exemple la production de xylanase d'un gène de *Bacillus subtilis* cloné dans une souche d'*Escherichia coli* a été étudiée. Même si ce gène était exprimé à différentes températures par *E. coli*, il n'y avait pas de sécrétion efficace de xylanases (8). L'apparition de protéine sécrétée était apparemment due à la lyse ou à une fuite des cellules. La recherche d'un meilleur sécréteur microbien de protéines sans cellulase a mené à *Bacillus cereus* No. 518. Un vecteur plasmidique bidirectionnel (pMK3) a été utilisé pour introduire le gène dans cette souche de *B. cereus*. La transformation a été obtenue par électroporation à haut voltage. La production de xylanase par le nouveau clone de *B. cereus* était semblable à celle d'*E. coli* mais la xylanase fût sécrétée normalement.

Il a été démontré que les xylanases produites par *B. cereus* et *E. coli* fonctionnaient de façon identique. Les deux xylanases ont amélioré la délignification de pâtes kraft de bois dur et de bois mou non-blanchies, c'est-à-dire qu'elles ont diminué la quantité de chlore nécessaire pour atteindre un certain degré de blanchiment sans modifier les propriétés physiques des fibres (75).

La production industrielle de xylanases se heurte à la présence simultanée d'activités contaminantes telles que les cellulases, entraînant des surcoûts de purification. D'autre part, l'utilisation de germes génétiquement modifiés peut présenter des problèmes tels que l'instabilité des plasmides portant les gènes codant pour les xylanases (76).

A la connaissance des chercheurs, la meilleure productivité en endoxylanase obtenue par un microorganisme ne produisant pas de cellulase l'a été à partir d'un mutant de *Streptomyces lividans* dépourvu d'activité cellulosique après introduction d'un plasmide porteur des gènes codant pour les xylanases A et B. Des productivités de l'ordre de 6000 à 10.000 U.I. 1/h ont été observées dans les milieux de culture (76).

Ainsi, la résolution de la structure en trois dimensions du domaine catalytique de la xylanase A de *S. lividans* par cristallographie de rayon-X a permis de mettre en évidence le rôle de plusieurs acides aminés, soit dans la catalyse, la liaison ou la spécificité de l'enzyme envers son substrat. Suite à cette analyse, un vaste programme d'ingénierie de la xylanase A, utilisant la mutagenèse dirigée, fut entrepris et est actuellement en cours. Ce programme a pour buts : d'identifier les acides aminés impliqués dans le site actif de l'enzyme et d'établir leurs rôles et fonctions, de modifier par mutagenèse dirigée la xylanase A de manière à produire une enzyme pouvant fonctionner à des températures extrêmes (85-100°C) et à des pH alcalins (9-11), d'établir les règles gouvernant la stabilité des enzymes ayant un motif de repliement de type (alpha/beta)₈ en se servant de la xylanase A comme modèle (77).

CHAPITRE III: APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES DES XYLANASES

Au niveau industriel, les enzymes sont couramment utilisées particulièrement en raison de la spécificité de leur action et des températures relativement économiques auxquelles elles fonctionnent. Ces raisons en font des catalyseurs très compétitifs face aux procédés chimiques industriels classiques. Certaines enzymes sont utilisées sous forme soluble en milieu homogène et administrées en fin de réaction, d'autres sont immobilisées sur des supports insolubles et inertes permettant une réutilisation répétée et la mise en œuvre de réacteur en continu.

Les hydrolases constituent 75% du marché mondial des enzymes, les protéases en tête sont suivies des glycosidases comme les cellulases, les amylases, et les hémicellulases, dont les xylanases représentent la plus forte proportion (21) (25).

III-1 Blanchiment de la pâte à papier

Une étape d'élimination de la lignine de la pâte kraft est primordiale pour avoir une qualité meilleure du papier. Les procédés traditionnels utilisent des agents chlorés et rejettent de grandes quantités de chlorolignines, produits toxiques, cancérigènes et non biodégradables (78). De plus, ces produits peuvent dégrader partiellement la cellulose et diminuer la qualité du papier (40). Les hémicellulases (essentiellement les endoxylanases et les arabinofuranosidases) constituent une alternative au blanchiment chimique et permettraient de diminuer le recours aux agents chlorés (79).

III-2 Industrie de l'alimentation animale et ensilage

Les matières premières riches en parois cellulaires (pailles, fourrages) ne sont que partiellement digérés par les ruminants.

L'addition de xylanases et de cellulases aux fourrages avant ensilage permet une dégradation partielle des polymères (cellulosiques et hémicellulosiques) avec libération de monosaccharides permettant le développement des bactéries lactiques qui font alors baisser le pH à 3 ou 4 (condition permettant une bonne conservation et un bon ensilage).

Par ailleurs les xylanases sont actives à des pH et des températures rencontrées dans les tractus intestinaux **(80)**.

III-3 Industrie de la panification

Les xylanases sont utilisées comme additifs pour améliorer la qualité boulangère des farines. Il est connu que l'addition de xylanase a un effet antiracissant donc elle provoque une meilleure rétention de l'eau.

Les pentosanes ont une forte rétention d'eau au cours de la panification. Ils absorbent le 1/3 d'eau au cours de la phase « dough » (pâte). L'hydrolyse partielle de l'arabinoxylane par les xylanases libère l'eau au bon moment du processus de fabrication du pain, il résulte une amélioration de la structure de la mie avec une augmentation du volume du pain.

Toutefois, vu la forte substitution des arabinoxylanes, la présence d' β -arabinofuranosidases débranchant les arabinoses latéraux faciliterait l'action des xylanases **(81)**.

III-4 Industrie des jus de fruits

L'extraction industrielle d'un jus de fruit passe par une étape préliminaire de broyage, un pressage et un tamisage ou une centrifugation. Les parois cellulaires de tissus constituant les pulpes de fruits sont très riches en substances pectiques (rhamnogalacturonanes, arabinanes et galactanes). Ces parois contiennent aussi de la cellulose et un peu d'hémicelluloses (exemple : xylane des parois cellulaires de poires). Leur hydrolyse facilite la filtration et permet une meilleure clarification des jus.

III-5 Industrie de la bière

Le brassage de la bière est une technologie ancestrale reposant sur la fermentation alcoolique des sucres, essentiellement le maltose, obtenu par dégradation amylolytique de

l'amidon d'orge. L'amidon, réserve glucidique cytoplasmique, doit être libéré de l'enveloppe cellulaire pour être accessible après gélatinisation aux amylases.

Les parois cellulaires de l'albumen de l'orge renferment 70% de β -glucanes mixtes associés à des arabinoxylanes et de la cellulose. La dégradation de ces polymères permet une filtration et une meilleure clarification des bières.

III-6 Synthèse des alkyl-xylosides

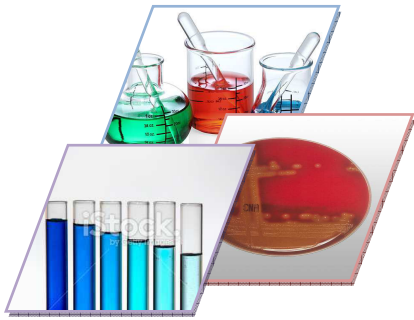
Une des applications des xylanases et de la β -xylosidase est la synthèse d'alkyl-xylosides, des dérivés de xylose ou des polymères et des alcools de xylose par l'hydrolyse ou la transglycosylation dans des milieux aqueux organiques biphasés **(82)**.

L'importance des alkyl-glycosides synthétisés par la β -xylosidase, en général, a été démontrée pour beaucoup d'applications industrielles en tant qu'agents tensio-actifs non ioniques.

Ils sont les candidats les plus prometteurs de nouveaux agents tensio-actifs parce qu'ils sont faits à partir de ressources renouvelables naturelles (hémicelluloses) d'hydrates de carbone et d'alcools gras **(83)**.

Tab. VI : Applications actuelles des xylanases dans les industries alimentaires et non-alimentaires (25).

Marché	Application	Fonction
Alimentation humaine	- Nectars, purées, huiles	- Amélioration de la macération et de la clarification des jus, réduction de la viscosité
	-Panification	- Les xylanases sont utilisées comme additifs pour améliorer la qualité boulangère (l'élasticité et la résistance des farine) et grâce à leur effet antiraccissants, elles permettent une meilleure rétention de l'eau,
	- Jus de fruits	- Surtout dans le secteur de la clarification des jus, leur hydrolyse facilite la filtration et engendre de meilleurs rendements
	-Amidon	- Séparation facilitée de l'amidon et du gluten par réduction de la viscosité
	- La bière	- C'est une technologie ancestrale reposant sur la fermentation alcoolique des sucres, essentiellement le maltose. Ces enzymes assurent donc une filtration et une bonne clarification des bières.
Alimentation animale	Nourriture pour animaux monogastriques et ruminants	- Diminution du contenu en monosaccharides non amidon d'où une baisse de la viscosité et une meilleure disponibilité des protéines et de l'amidon qui accroît la digestibilité et la valeur nutritionnelles des aliments.
Industrie non alimentaire	- Pâtes et papiers	- Blanchiment des pats krafts, séparation des encres, donc réduction de l'utilisation chlorés et alcalins. -Amélioration des procédés mécaniques de pulping qui aboutit a une baisse de consommation en énergie
	-Textiles	- Préparation des fibres par trempage et macération remplaçant les procédés chimiques.
	-Bioconversions	- Traitement des déchets, Production des composés fermentescibles, carburants renouvelables (bioéthanol), chimie fine (tensio-actifs).
	-synthèse des alkyl-xylosides	- Les alkyl-xylosides sont des dérivés du xylose, ils sont les candidats les plus promoteurs de nouveaux agents tensioactifs parce qu'ils sont faits à partir de ressources renouvelables naturelles (hémicelluloses) d'hydrates de carbone et d'alcool gras.



Matériel et méthodes

I- ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE LA SOUCHE D'ACTINOMYCETE**I-1 Prélèvement de l'échantillon :**

Le prélèvement des échantillons a été réalisé à partir de site du Nord-Est Algérien durant l'Hiver (février 2008) par monsieur Saoudi Boudjema. Ce site est situé au niveau de l'Unité de Chaire engraissement Poulet appartenant au Groupe Avicole de l'Est (G.A.E) et la Société des Abattoirs de l'Est (S.A.E) Algérien (Wilaya d' Annaba).

I-2 Souche utilisée pour la production des xylanases :

La souche utilisée dans ce travail de recherche est une Actinomycète thermophile isolée du compost de poulet (**84**). Cette souche n'a pas été identifiée par techniques morphologiques mais par technique moléculaires ARNr 16 S et il s'agit d'une nouvelle souche appartenant au genre *Actinomadura* et dont l'espèce est *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 (**17**). La Cpt 29 est conservée sur milieu ISP₂ de *l'International Streptomyces Project*. Ce milieu est préconisé par Shirling et Gottlieb (**85**) (**86**) (Annexe I). La souche d'Actinomycète Cpt29 servira pour l'optimisation de la production et l'étude biochimique des xylanases.

II- RECHERCHE DE L'ACTIVITE XYLANOLYTIQUE**II-1 Activation de la souche d'Actinomycète sur milieu solide complet (CM) :**

La souche est repiquée sur un milieu solide complet (CM) à base de glucose dérivé de celui de Hopwood. Ce milieu permet dans un premier temps d'activer la souche d'Actinomycète en vue de les repiquer plus tard sur un milieu à base de xylane (**87**) (**88**) (**89**) (Annexe I).

La souche est maintenue donc sur milieu CM (Glucose, Extrait de malt, Extrait de levure). Le pH du milieu est ajusté à 7.2 avant l'addition du glucose et de l'agar à raison de 20g/l. Le milieu est autoclavé à 121°C pendant 16 minutes, puis coulé dans des boîtes de Pétri à raison de 15ml/boîte. Par la suite, la souche estensemencée de manière stérile sur le milieu CM à base de glucose. L'ensemencement est réalisé à l'aide d'une pipette pasteur stérile, par stries d'un fragment du mycélium aérien de chacune des souches pour obtenir un développement typique des colonies filamenteuses. L'incubation se fait à 45°C pendant 7 jours.

II-2 Recherche de l'activité xylanolytique sur milieu solide :

Afin de détecter l'activité xylanolytique directement sur milieu solide, la souche d'Actinomycète Cpt29 a été repiquée sur milieu Nammori à base de xylane **(90)** (Annexe I). A ce milieu, on ajoute 10g de xylane puis le pH du milieu est ajusté à 7 avant l'addition de l'agar à raison de 15g/l. Le tout est autoclavé à 121°C pendant 16 minutes, puis coulé dans des boîtes de pétri à raison de 15ml/boîte. Par la suite, la souche estensemencée de manière stérile sur le milieu Nammori à base de xylane par touches afin d'obtenir des colonies bien séparées. L'incubation se fait à 45°C pendant 4 jours.

➤ Test qualitatif au rouge Congo sur milieu solide

Après 4 jours d'incubation sur milieu Nammori solidifié, les boîtes de pétri sont couvertes avec une solution de rouge Congo à 0.05% pendant 10 minutes **(91) (92)**. Après ce temps, on élimine l'excès de rouge Congo et on effectue plusieurs lavages avec une solution de NaCl 1M. La souche productrice des xylanases est détectée grâce à la zone claire qui apparaît autour de ces colonies.

II-3 Production des xylanases en milieu liquide à base de son de blé :

La production des xylanases par la souche d'Actinomycète nécessite sa culture sur milieu liquide à base de son de blé qui est très riche en xylane. Vu le coût très cher du xylane dans le marché, nous avons essayé un autre milieu liquide contenant le son de blé comme seule source de carbone, ce milieu est celui de Horikoshi **(93)** (Annexe I).

Ce milieu est ajusté à pH 8,5 puis réparti dans des flacons à raison de 50ml/ flacon et stérilisé dans un autoclave à 121°C pendant 16 minutes. Les colonies isolées à partir des boîtes de pétri de la souche Cpt29 sont mises en suspension dans des Erlenmeyers contenant chacun 50ml du milieu Horikoshi liquide. L'ensemble est incubé dans un shaker thermostaté à 45°C sous agitation transversale pendant 24h. Au bout de 24h d'incubation, les cultures sont arrêtées, centrifugées pendant 20min à 10000 tours par minute. Le surnageant est par la suite filtré et utilisé comme solution enzymatique.

II-4 Recherche de l'activité xylanolytique par la mesure du pouvoir réducteur par la méthode de Nelson –Somogyi :**II-4-1 Principe de la méthode :**

La dégradation du xylane par l'action des enzymes provoque l'apparition de groupements réducteurs qui réduisent le sulfate de cuivre en oxyde cuivreux qui réduit à son

tour le réactif arsénomolybdique de Nelson avec formation du complexe arsénomolybdeux molybdique stable de coloration bleue, mesurable au spectrophotomètre à 650nm **(94)** **(95)** **(96)** (Annexe II).

II-4-2 Recherche de l'activité xylanolytique directement dans le filtrat de culture:

➤ **Mode opératoire :**

L'activité xylanolytique a été mesurée directement dans les filtrats de culture par la méthode de Nelson-Somogyi.

Dans un premier temps on réalise une dilution des filtrats de culture au 1/10.

- Filtrat de culture.....0.1ml
- Tampon phosphate de sodium 0.05M de pH 7.....0.9ml

A partir de ce filtrat dilué on réalise la méthode de Nelson Somogyi :

On met dans chaque tube :

- Filtrat de culture0.25 ml
- Réactif Somogyi0.50 ml

Les tubes bouchonnés sont placés au bain-marie bouillant pendant 20 minutes à 100°C. Au bout de ce temps, les tubes sont immédiatement refroidis sous un courant d'eau.

On ajoute ensuite dans chaque tube :

- Réactif Nelson0.25ml
- H₂O distillée3.00ml

Le blanc qui n'est autre que le milieu de culture non ensemencé est traité de la même manière. On observe une coloration bleue dont on mesure l'absorbance au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 650nm.

II-4-3 Recherche de l'activité xylanolytique dans le milieu réactionnel :

On effectue une réaction enzymatique pour la souche Cpt29 et l'activité xylanolytique est détectée par le test de Nelson-Somogyi (coloration métrique).

➤ Mode opératoire :**Milieu réactionnel :**

- Xylane 0.5% dans le tampon phosphate de sodium à 0.05M de pH 7.....1.5ml
- Solution enzymatique (filtrat de culture) 0.5ml

L'incubation du milieu réactionnel se fait au bain-marie à 70°C sous agitation pendant 15min. Parallèlement, les témoins ont été préparés dans les mêmes conditions avec de l'eau distillée à la place de la solution enzymatique.

solutions à doser :

- Milieu réactionnel0.25ml
- Réactif Somogyi0.5ml

Les tubes bouchonnés sont placés au bain-marie bouillant pendant 20 minutes à 100°C. Au bout de ce temps, les tubes sont immédiatement refroidis sous un courant d'eau.

On ajoute ensuite dans chaque tube :

- Réactif Nelson0.25ml
- H₂O distillée3.00ml

Des blancs sont traités de la même façon que les échantillons des milieux réactionnels. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 650nm.

II-4-4 Mesure des activités enzymatiques :

La méthode est basée sur la mesure du pouvoir réducteur aux différents prélèvements, on mesure l'activité en vitesse initiale exprimée en μM de sucres réducteurs par ml et par minute. Le nombre de μM de sucres réducteurs se fait à partir d'une courbe d'étalonnage du xylose à raison de 0,25 g/l (Annexe V).

Selon les recommandations de la commission de la biotechnologie de l'"IUPAC" (International Union Of pure And Applied Chemistry) (97) nous pouvons déterminer l'activité en Unité internationale par ml :

$$\text{Activité en UI/ml} = \frac{\text{Sucres Réducteurs libérés (mg/l)} \times 10}{30 \times 0,15}$$

10 : facteur de dilution

30 : temps d'incubation (30 min)

0,15 : masse molaire du xylose en mg

II-5 Mesure de l'activité spécifique :

II-5-1 Dosage des protéines par la méthode de Bradford :

La teneur en protéines dans les préparations enzymatique brute a été déterminée par la méthode de Bradford. Utilisant le réactif bleu brillant de Coomassie (BBC).

II-5-1-1 Principe de la méthode :

Dans la méthode de Bradford, le bleu de Coomassie (G250) forme avec les protéines un complexe coloré présentant un maximum d'absorption à 595nm. La coloration très sensible peut être effectuée très rapidement et reste stable pendant 30 minutes, si l'on utilise le bleu brillant de Coomassie G250 comme réactif et l'albumine de sérum de bœuf (SAB) à raison de 0.1g/l comme standard (98) (Annexe II).

II-5-1-2 Mode opératoire :

Le dosage des protéines a été effectué dans une fraction aliquote (100µl). Les prises l'échantillon est additionné de la solution de Bradford, l'ensemble est agité et laissé reposer pendant 5 minutes pour stabiliser la coloration. La lecture des absorbances est réalisée à une longueur d'onde de 595nm contre un blanc où l'échantillon est remplacé par de l'eau distillée. A partir de la courbe d'étalonnage et en fonction de la dilution, on détermine la concentration en protéines exprimée en mg/ml de l'échantillon (Annexe V).

II-5-1-3 Détermination des activités spécifiques :

L'activité spécifique de la souche Cpt29 est déterminée à partir de l'activité enzymatique exprimée en µM de sucres réducteurs/ volume / minute, et le taux de protéines. Ainsi l'activité spécifique est le nombre d'unité d'enzyme par unité de masse de protéines, exprimée en mg.

$$AS = \frac{\text{Unité d'activité}}{\text{Taux de protéines}}$$

On exprime l'activité spécifique en unités internationale par mg de protéines : UI/mg de protéines. UI exprime la quantité d'enzyme capable de transformer un μM de sucres réducteurs par minutes.

III- OPTIMISATION DES CONDITIONS DE CULTURES POUR LA PRODUCTION DES XYLANASES

Dans le but d'avoir une meilleure activité enzymatique, nous avons tenté d'optimiser classiquement les conditions de culture de souche d'Actinomycète Cpt29 à savoir : le temps de culture, le pH, la température, source de carbone, source d'azote, source de phosphore et l'effet des ions.

III-1 Temps d'incubation :

La souche d'Actinomycète estensemencée stérilement et incubée dans un shaker à 45°C pendant plusieurs temps 12h, 24h, 48h, 72h et 96h.

Au bout de chaque temps d'incubation, on effectue un prélèvement pour chaque souche qui sera arrêtée et centrifugé à 4°C pendant 15 minutes avec une vitesse 10000 tours par minute. Les surnageants filtrés sont utilisés comme solution enzymatique. Au bout de ce temps, l'activité enzymatique est recherchée par le test de Nelson Somogyi à 650nm.

III-2 Le pH optimum de culture :

Le pH optimum pour la culture de souche Cpt29 a été étudié en variant le pH du milieu de culture d'une unité de 0.5 pour une gamme de pH allant de 5.5 à 11 utilisant les tampons suivants :

-Tampon phosphate potassique 50 mM pH : 5.5, 6, 6.5, 7 et 8

-Tampon glycine-NaOH 50 mM pH : 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5 et 11.

Après incubation à 45 °C pendant 24 h, la culture est arrêtée et centrifugée à 4°C avec une vitesse de 10000 tours par minute pendant 15 minutes puis filtrées. Le filtrat de culture de la souche est utilisé pour détecter l'activité xylanolytique par la mesure du pouvoir réducteur à 650nm par le test de Nelson Somogyi après incubation enzymatique pendant 15 mn.

III-3 Température optimale de culture :

Afin d'étudier la température optimale de culture de la souche Cpt29, nous avons testé une gamme de température allant de 40 à 55°C. Le milieu de culture préparé est ajusté au pH optimum de chaque souche qui est de 8.5. L'incubation se fait toujours pendant 24h pour la Cpt29. Après incubation, la culture est arrêtée puis centrifugée à froid avec une vitesse de 10000 tours par minute pendant 15 minutes. Les surnageants sont filtrés puis utilisés pour mesurer l'activité enzymatique par le test de Nelson Somogyi à 650nm après incubation enzymatique.

III-4 L'effet de source de carbone sur la production des xylanases:

L'effet des sources de carbone dans le milieu de culture a été examiné en utilisant le glucose, le galactose, le lactose, le xylose, l'amidon à une concentration de 0,5 %, son de blé (2%), les coquilles d'arachide (2%) et d'avoine épeautre (1%).

L'effet des différentes concentrations de son de blé sur la production des xylanase a été testé à une gamme de concentration de 0,5 à 4 (g/100 ml) avec intervalles de 0,5. Les surnageants sont filtrés puis utilisés pour mesurer l'activité enzymatique par le test de Nelson Somogyi à 650nm après incubation enzymatique.

III-5 L'effet de source d'azote sur la production des xylanases :

L'effet des différentes sources d'azote (Peptone, extrait de levure, extrait de viande, urée, NaNO₂, KNO₃, Ca(NO₃)₂, NH₄Cl, NH₄NO₃) a également été essayé à une concentration de 0.5%. Le filtrat de culture de la souche est utilisé pour détecter l'activité xylanolytique par la mesure du pouvoir réducteur à 650nm par le test de Nelson Somogyi après incubation enzymatique pendant 15 mn.

III-6 L'effet de source de phosphore inorganique sur la production des xylanases :

Plusieurs sources de phosphore (K₂HPO₄, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NH₄H₂PO₄) ont été étudiées à une concentration de 0.1% afin d'avoir la meilleure qui stimule l'activité xylanolytique. Après 24h d'incubation les cultures sont arrêtées et les surnageants sont filtrés puis utilisés pour mesurer l'activité enzymatique par le test de Nelson Somogyi à 650nm après incubation enzymatique.

III-7 L'effet de certains additifs

Pour étudier l'effet de certains additifs (Na⁺, K⁺, Cu²⁺, Ba²⁺, Ca²⁺, Fe³⁺, Mn²⁺, Mg²⁺) sur l'activité xylanase, nous avons réalisé un dosage avec l'ajout de différents sels à une

concentration de 0.05g/50ml. Les surnageants sont filtrés puis utilisés pour mesurer l'activité enzymatique par le test de Nelson Somogyi à 650nm après incubation enzymatique.

IV- ESSAI DE PURIFICATION ET CARACTERISATION BIOCHIMIQUE PARTIELLE DE XYLANASE

IV-1 Essai de purification de xylanase de la souche d'Actinomycète Cpt29

IV-1-1 Préparation de l'extrait enzymatique brut :

Après culture de la souche Cpt29 à 45°C pendant 24h sur milieu Horikoshi liquide, la culture a été centrifugée pendant 20min à 10000 tours par minute puis filtrée et les protéines totales ont été précipitées par deux méthodes :

- La première méthode avec le sulfate d'ammonium à 80% de saturation. Après décantation pendant toute une nuit à 4°C puis centrifugation à froid pendant 30 minutes avec une vitesse de 10000t /mn, le culot a été récupéré dans un faible volume de tampon phosphate à 0,05M puis dialysé pendant 24 heures contre le même tampon pour éliminer les sels.
- La deuxième méthode par l'utilisation de solvant organique l'acétone à -20°C en utilisant plusieurs taux de concentration de 50 à 90% pour connaître l'état optimal des xylanases de l'extrait enzymatique brut. Après décantation pendant toute une nuit à 4°C puis centrifugation à froid pendant 30 minutes avec une vitesse de 10000t /mn, le culot a été récupéré dans un faible volume de tampon phosphate à 0,05M.

Le dialysat obtenu est conservé (-20 °C) dans des eppendorfs à raison de 0,5ml. Le dialysat (extrait brut) servira pour le fractionnement des xylanases.

IV-1-2 Chromatographie échangeuse anionique (Mono-Q Sépharose)

C'est une méthode de séparation des protéines basée selon leur charge. Le dialysat (extrait brut) à raison de 2ml a été appliquée sur une colonne MonoQ sépharose échangeuse anionique (50 x5 mm). La colonne préalablement équilibrée avec le tampon phosphate 20 mM pH 7.0. L'activité xylanase a été éluée par un gradient NaCl (0-0.5 M) dans le même tampon à un débit de collecte de 1.5 ml/min. Parallèlement, l'éluion de l'enzyme est suivie par l'absorbance à 280 nm et l'activité de l'enzyme est mesurée par la technique de Nelson – somogyi après avoir effectué une réaction enzymatique. La fraction isolée est de nouveau dialysée contre le tampon phosphate 50 mM pH 7.0 et conservée à -20 °C pour d'éventuelles études.

IV-1-3 Chromatographie de filtration moléculaire :**IV-1-3-1 Principe :**

Le principe de la filtration sur gel est basé sur les capacités différentes des molécules à pénétrer dans les pores de la phase stationnaire. Les très grosses molécules ne pénètrent jamais dans le gel et traversent plus rapidement le support chromatographique. Les molécules sont éluées dans l'ordre des masses moléculaires décroissantes.

IV-1-3-2 Mode opératoire :

La colonne (69 x 1,5cm) utilisée pour le fractionnement des xylanases est le séphadex G75, équilibrée par le tampon phosphate 50 mM pH 7.0.

Lyophilisat de 2 ml est déposé au sommet de la colonne. L'éluion est effectuée avec le même tampon phosphate à raison de 120 ml. Des fractions de 2ml /3min d'éluât sont récupérés. Parallèlement, Les fractions enzymatiques de xylanases collectées sont suivies par mesure de l'absorbance à 280 nm et L'activité enzymatique est recherchée dans chaque tube par le test Nelson-somogyi après avoir incubé 0,25ml de chaque tube sur 0,75 ml de xylane dissout dans le tampon phosphate à 0.05M de pH7. Les détails du mode opératoire figure dans l'annexe IV.

IV-2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante PAGE-SDS (Dodécyl sulfate de sodium)**IV-2-1 Principe :**

Les protéines sont séparées en fonction de leur masse moléculaire apparente par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium ou PAGE-SDS selon la méthode décrite par Laemmli (99).

IV-2-2 Mode opératoire :

- Préparation du gel : Le gel (12% d'acrylamide : gamme de séparation 13 – 200 kDa) est utilisé dans cette expérimentation (Tab. a) (Annexe IV).
- Dépôt de l'échantillon : les échantillons d'enzymes sont déposés après l'ajout de bleu dénaturant (1/10 du volume) et dénaturation pendant 3 min à 100°C.
- Migration : La migration verticale est assurée dans le tampon Tris (25mM)-glycine (192mM) contenant 0.1% SDS pendent 4h et arrêter exactement quand le "bleu de bromophénol" atteint le bas du gel.

- La révélation est effectuée par deux méthodes (Annexe IV).

Le détail du mode opératoire figure dans annexe III et IV

IV-2-3 Zymogramme :

IV-2-3-1 Principe :

Cette technique d'électrophorèse permet de mettre en évidence directement l'activité enzymatique sur le gel d'électrophorèse en comparaison avec les bandes de protéines qui apparaissent sur ce même gel.

La séparation électrophorétique des xylanases se fait en fonction de leur masse moléculaire apparente. La dégradation du substrat est ensuite mise en évidence, après coloration du gel au rouge Congo, par l'apparition de bandes. L'intensité de la dégradation est corrélée à la surface de la plage de lyse et donc proportionnelle à la quantité de xylanases présentes. La masse moléculaire de l'enzyme responsable de cette dégradation est évaluée par comparaison avec des protéines témoins, ce qui permet son identification.

IV-2-3-2 Mode opératoire :

- L'extrait enzymatique brut (dialysat) a été analysé par électrophorèse.
- Le xylane (sigma) de Birchwood a été utilisé comme substrat.
- Après l'électrophorèse, le gel a été incubé dans un tampon phosphate 50 Mm pH7 pendant 30 minutes dans un bain de glace, afin d'éliminer l'SDS.
- Ensuite incubé dans un tampon de xylane 1% pendant 10 minutes à 60°C pour la détection de l'activité xylanolytique.
- Enfin pour la révélation, la bande du gel a été submergée dans une solution de rouge Congo 0.1% (p/v) pendant 10 minutes puis lavée avec du NaCl (1M) jusqu'à la visualisation de bande d'enzyme correspondant à son activité.

IV-3 Caractérisation biochimique partielle de xylanase

IV-3-1 L'effet de température sur la xylanase détectée :

La température optimale d'action des xylanases de la Cpt29 a été déterminée en incubant l'enzyme (xylanase) à une gamme de température allant de 30°C à 100°C en absence de leurs substrats spécifiques.

Les xylanases traités à plusieurs températures ont été utilisés pour mesurer l'activité enzymatique par le test de Nelson Somogyi à 650nm après incubation enzymatique en absence et en présence de Mn^{2+} à une concentration de 10Mm.

IV-3-2 L'effet de thermostabilité sur l'activité de xylanase :

Pour étudier la thermostabilité de xylanase, nous avons placé les préparations enzymatiques aux températures suivantes: 65, 70, 75 et 80°C en absence et en présence de Mn^{2+} pendant plusieurs temps (de 1h à 24h). Après chaque intervalle de 1h, nous avons prélevé un volume de 200 μ l d'échantillon afin de déterminer l'activité enzymatique résiduelle par la méthode de Nelson-Somogyi.

IV-3-3 L'effet du pH et la stabilité au pH sur la xylanase :

Le pH optimum de xylanase de la souche d'Actinomycète thermophile Cpt29 a été déterminé suite à l'incubation de l'enzyme avec son substrat spécifique (xylane) préparé auparavant dans la gamme de pH suivants :

- Tampon glycine-HCl 50 mM pH : 2.5, 3 et 3.5.
- Tampon acétate 50 mM pH : 4, 4.5 et 5.
- Tampon phosphate potassique 50 mM pH : 5.5, 6, 6.5, 7et 8
- Tampon glycine-NaOH 50 mM pH : 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5 et 11.

Le xylane est solubilisé dans les différents tampons respectivement.

La stabilité au pH a été réalisée à 4°C et à 70°C en utilisant les mêmes tampons. A chaque intervalle de 1h, un volume de 200 μ l de milieu réactionnel est prélevé afin de déterminer l'activité enzymatique résiduelle par le test Nelson-Somogyi.

IV-3-4 L'effet de certains additifs :

L'activité xylanolytique est testée à 70 °C, en présence de 10 mM des additifs (métaux et inhibiteur): Ca^{2+} ($CaCl_2$) ; Mn^{2+} ($MnSO_4$) ; Mg^{2+} ($MgSO_4$) ; Cu^{2+} ($CuSO_4$) ; Zn^{2+} ($ZnSO_4$) ; Co^{2+} ($CoSO_4$) ; Ba^{2+} ($BaCl_2$) ; Fe^{2+} ($FeSO_4$) et Hg^{2+} ($HgSO_4$); Sn^{2+} ($SnCl_2$); Na^+ ($NaCl$) ; SDS; EDTA.

Pour étudier l'effet de certains additifs sur l'activité xylanase, nous avons réalisé le dosage suivant:

- 1.5 ml de tampon phosphate 50 mM pH7 contient le substrat (xylane) 0.5%
- 0.5 ml d'enzyme
- 0,05 ml de la solution mère d'additif à 10 mM

Après incubation de 15 min à 70°C, la réaction est arrêtée par addition de 0.25 ml de solution Somogyi. L'ensemble est mis dans un bain Marie bouillant pendant 20 min. Par la suite, 0.25ml solution Nelson + 3 ml d'eau sont ajoutés et la lecture de la Lire l'absorbance se fait à 650 nm.

IV-3-5 Identification des produits de dépolymérisation par chromatographie sur couche mince :

La production d'enzymes dépolymérisantes par la souche peut être mise en évidence rapidement et directement par la recherche des produits de dépolymérisation par chromatographie sur couche mince (CCM) qui peut être utilisée pour la détection des dépolymérases (100).

IV-3-5-1 Principe:

Le principe de cette chromatographie de partage (liquide – liquide) consiste en une migration différentielle des produits de dépolymérisation selon leur masse moléculaire (70).

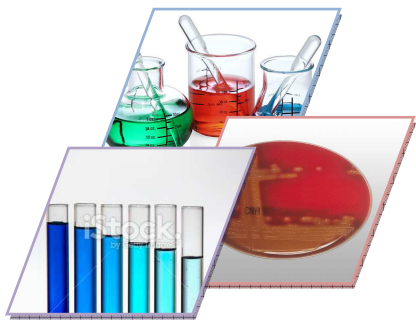
IV-3-5-2 Mode opératoire :

Sur une plaque de gel de silice (Schleicher et Schüll F-1500) de 10 x 10cm, on dépose à l'aide d'un capillaire, un volume approximatif de 20 µl de milieu réactionnel des échantillons, du blanc et un mélange de trois témoins T1 : monomère de xylose, T2 : maltose et T3 : raffinose. La plaque chromatographique est ensuite mise dans la cuve de migration contenant le solvant suivant : n-butanol, Isopropanol, Eau (3, 12, 1.V/V).

Après 4 heures de migration, la plaque de silice est séchée sous hotte, puis pulvérisée avec une solution d'acide sulfurique à 20ml dans l'éthanol à 8 ml. La plaque est enfin chauffée dans une étuve à 100°C pendant 5 à 10 minutes environ. Les produits de dépolymérisation donnent des taches noires sur le chromatogramme selon la réaction furfuralique basée sur la déshydratation des oses en milieu acide fort et à chaud.

Le calcul des RF (rapport frontal) de chacun des solutés permet d'identifier l'oligomère.

$$\text{Rf} = \frac{\text{Distance parcourue par l'oligomère}}{\text{Distance parcourue le solvant}}$$



Résultats et discussion

I-Souche d'Actinomycète thermophile Cpt29 utilisée dans la production de xylanases

Les Actinomycètes est une classe de bactéries très connue dans la production de métabolites secondaires (enzymes, antibiotiques et autres biomolécules). Ces bactéries sont ubiquitaires et se retrouvent dans le sol, l'eau et autres milieux. Dans cette classe, nous avons utilisé une nouvelle souche d'Actinomycète thermophile Cpt29. Cette nouvelle souche est isolée du compost de poulet (Nord-est) au niveau de notre laboratoire et identifiée par technique moléculaire. Il s'agit de l'espèce *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 (17). Cette nouvelle souche thermophile qui se cultive facilement a fait l'objet de notre travail de recherche.

II- Culture de la souche et observation macroscopique de la souche sur milieu CM

Dans le but d'activer la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt29, nous avons cultivé cette souche sur milieu solide complet (CM). Ainsi, après 7 jours d'incubation à 45°C sur ce milieu solide à base de glucose, l'observation macroscopique de la souche montre un bon développement avec des colonies légèrement fragmentées d'Actinomycète thermophile Cpt29 (Fig. 8), qui se traduit par la présence d'un mycélium aérien assez développé, avec la production des pigments responsables de la coloration de la souche. La Cpt29 est active sur le milieu d'enrichissement, et peuvent ainsi être cultivée sur un milieu à base d'une autre source de carbone en l'occurrence le xylane.

III- Mise en évidence de l'activité xylanolytique sur milieu solide par le test au rouge Congo :

Après 4 jours d'incubation à 45°C l'observation macroscopique de la souche sur milieu Nammori à base de xylane a révélé que la souche se cultive facilement sur ce milieu.

Après addition du rouge Congo et lavage avec une solution de NaCl 1M, la souche montre un halo d'hydrolyse autour des colonies (Fig. 9). Ce test prouve que la souche d'Actinomycète thermophile Cpt29 est active sur son substrat (Xylane) par sécrétion de xylanases. Ainsi, les oligomères libérées par cette enzyme ne réagissent pas avec le réactif (rouge Congo) qui se traduit par des zones translucides au tour des colonies. Ce test semi-qualitatif est en effet utilisé dans divers travaux de recherche dans la détection d'activité xylanolytique chez les espèces :*Streptomyces cyaneus* SN32, *S. tendae* SN77, et *S. caelestis* SN83 (101) (93). Toute fois, ce test doit être confirmé par des méthodes de dosages des oligomères libérés.



A- Ensemencement par stries



B- Ensemencement par touche

Figure 8: Aspect macroscopique de la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 sur milieu CM solide à base de glucose.

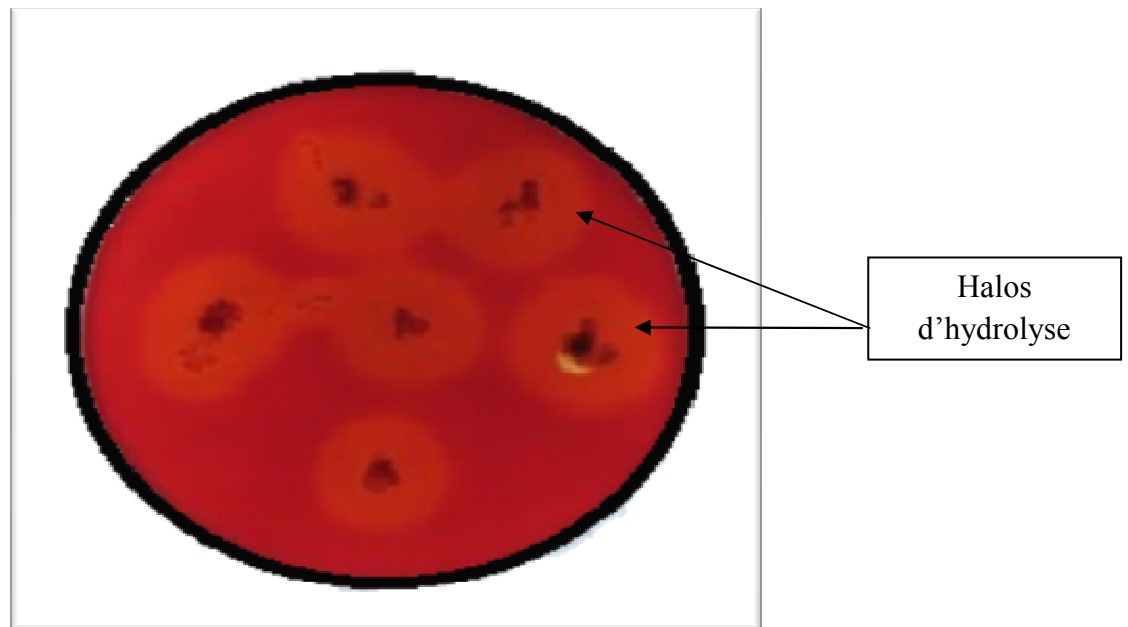


Figure 9: Mise en évidence de l'activité xylanolytique de la Cpt29 sur milieu Nammori solide par le test au rouge Congo.

IV- Mise en évidence de l'activité xylanolytique dans le milieu liquide par le test de Nelson-Somogyi :

Dans le cas de la production de xylanases sur milieu liquide Horikoshi à base de son de blé riche en xylane, nous avons cultivé cette souche à pH 8,5 et température 45 °C pendant 24 h. L'analyse directe du milieu de culture par la recherche de sucres réducteurs donne une activité de 46 UI / ml de filtrat de culture. Ce test confirme que cette souche active sur son substrat et le dégrade en unités simples facilement assimilable par le microorganisme. Par ailleurs, après réaction enzymatique avec le substrat spécifique xylane de Birchwood l'activité xylanolytique donne une valeur de 12UI/ml de milieu réactionnel. On observe que l'activité est diminuée après la réaction enzymatique parce que le filtrat de culture contient des sucres réducteurs libres en plus des sucres réducteurs libérés après la dégradation de xylane par les enzymes xylanolytiques secrétés par la souche d'Actinomycète thermophile la Cpt29

Le résultat obtenu peut être comparable à ceux obtenus chez d'autres espèces d'Actinomycètes telles que *Streptomyces lividans* (102), *Thermomonospora curvata* (103), *Streptomyces halstedii* JM8 (104) qui obtiennent une activité xylanolytique entre 20 et 28UI/ml après la réaction enzymatique alors que la souche *Bacillus sibtillus* (105) donne une activité de 12UI/ml. Au niveau de notre laboratoire une souche *Actinomadura* sp Cpt20 (6) a plutôt montre une activité de l'ordre de 75UI/ml.

V- OPTIMISATION DES CONDITIONS DE CULTURE PAR METHODE CLASSIQUE :

La régulation des gènes inducteurs des enzymes xylanolytiques chez les Actinomycètes est contrôlée par la composition du milieu de croissance (principalement les substrats carbonés et azotés) et les conditions environnementales de la culture (Temps de culture, pH, température) (106). Dans ce contexte et afin de produire une meilleure activité xylanolytique par la souche Cpt29, nous avons étudié l'effet de certains paramètres sur la production enzymatique par méthode classique qui consiste à faire varier chaque paramètre.

V-1 Temps de culture

Après l'incubation de la souche avec son substrat (son de blé) pendant plusieurs temps (Les autres facteurs sont maintenus constants) : 12h, 24h, 48h, 72h et 96h. Les activités xylanolytiques de la souche d'Actinomycète thermophile Cpt29 sont mesurées sur le xylane

(réaction enzymatique) par le test de Nelson Somogyi à différents temps d'incubations et sont représentées par la courbe de la figure 10.

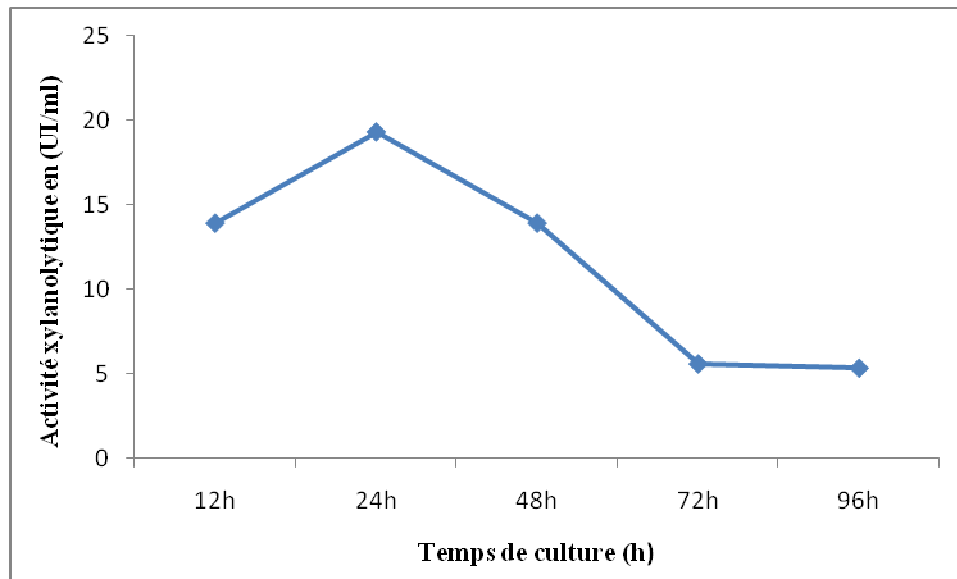


Figure 10: Temps optimal de culture sur la production de xylanases chez la Cpt29.

L'étude de cinétique montre que la souche Cpt 29 présente un maximum d'activité au bout de 24h d'incubation avec une activité de 20UI/ml. Après 48h, l'activité enzymatique diminue jusqu'à 14 UI/ml donc la souche perd 30% de son activité.

Une diminution considérable de 80 % de l'activité de l'enzyme a été observée Après 72h et elle devient stable après 96h de 5UI/ml. Cette diminution d'activité s'explique probablement par l'utilisation (métabolisation) des sucres libérés par la dégradation du son de blé. Ce résultat est observé chez certaines espèces de *Bacillus* tels que la souche *Bacillus coagulans* (107) qui a un optimum d'activité de 24UI/ml au bout de 24h, alors que la plus part des souches de *Streptomyces* ont un optimum d'activité entre 3 et 6 jours d'incubation telle que *Streptomyces actuosus* (108) qui a une activité de 11UI/ml après 4 jours d'incubation, la souche *Streptomyces* sp. Ab106 après 5 jours d'incubation avec une activité de 8UI/ml (109) et la souche *Actinomadura* sp.Cpt20 a un optimum d'activité de 75UI/ml après 3 jours d'incubation (6).

La comparaison de notre souche par rapport aux données bibliographiques montre que la Cpt29 est plus compétitive par rapports aux espèces productrices de xylanases du fait que la production des xylanases est de 24 heures seulement alors que les autres souches se situent entre 3 à 6 jours, d'où l'intérêt d'utiliser cette souche dans la production de xylanases. Par ailleurs, la souche d'Actinomycète thermophile *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 a

également fait l'objet de recherche de protéases et a montré un temps de culture optimum de 7 jours (16).

V-2 Détermination du pH optimum

La variation de l'activité enzymatique en fonction du pH du milieu de culture a été effectuée pour la souche Cpt29 après incubation à 45 °C pendant 24 h, dans des milieux des cultures à différents pH (allant de 5.5 à 11), tout en maintenant les autres paramètres constants.

L'activité xylanolytique de la souche Cpt29 pour cette gamme de pH, a été testée après incubation enzymatique pendant 30mn à 70°C par le test colorimétrique de Nelson-Somogyi. Les mesures des différentes absorbances de la souche à différents pH sont regroupées dans la figure 11.

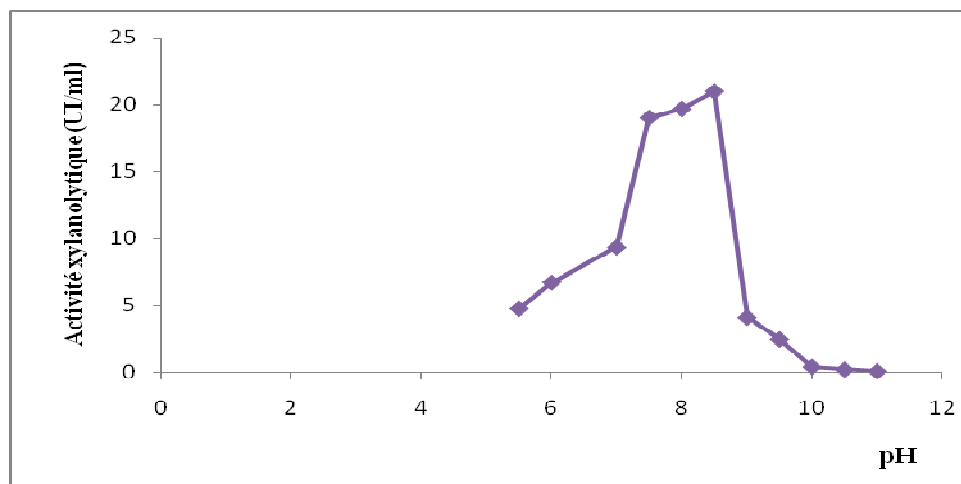


Figure 11: pH optimum de culture sur la production de xylanase chez la Cpt29.

On constate pour la souche Cpt29 que l'activité xylanolytique augmente avec le pH jusqu'à 8.5 où la souche d'Actinomycète thermophile présente un optimum d'activité de 23UI/ml. Au-delà de ce pH l'activité diminue, cependant à pH 10 l'activité est nulle. Ceci montre l'importance des xylanase de la Cpt29 puisqu'elle est capable de fonctionner à des pH basiques allant jusqu'à pH 8,5, cette valeur de pH peut être exploitée dans le domaine du blanchiment de la papeterie.

Ce résultat est similaire à celui obtenu chez plusieurs espèces d'*Actinomycète* tels que *Thermoactinomyces Thalophilus* avec une activité de 24UI/ml à pH 8.5 (7) et *Thermomonospora fusca* BD 25 (44) qui a une activité maximal de 28UI/ml à pH 8.

On trouve aussi la souche *Streptomyces* sp. QG113 (110) qui a un optimum d'activité à pH 8 avec une activité de 7.5UI/ml, alors que la souche *Streptomyces* sp. Ab106 présente une activité de 8UI/ml à pH 7.5 (109). Il existe aussi des souches de *Bacillus* et des certains champignons tels que *Penicillium oxalicum* (111), *Bacillus pumilus* ASH (112) qui présente un optimum d'activité à pH 8.

V-3 Température optimale

Parmi les facteurs importants qui affectent considérablement la production de xylanases on trouve le pH et la température de la culture. Plusieurs travaux de recherche ont montrés que, la culture de plusieurs microorganismes (bactéries et champignons) à un pH ou à une température défavorables, limite l'accessibilité au substrat hémicellulosique, baisse le taux de croissance et la production de xylanases (113) (114).

Afin d'étudier la température optimale de culture de la souche Cpt29, cette dernière a été cultivée à différentes températures allant de 40 à 55°C. Le pH de milieu de culture est ajusté à 8.5 et l'incubation se fait toujours pendant 24h. L'activité xylanolytique de la Cpt29 pour cette gamme de température, a été testée après incubation enzymatique pendant 30 mn à 70°C par le test colorimétrique de Nelson-Somogyi. Les mesures des activités xylanolytiques de la souche Cpt29 à différentes températures sont regroupées sur la figure 12.

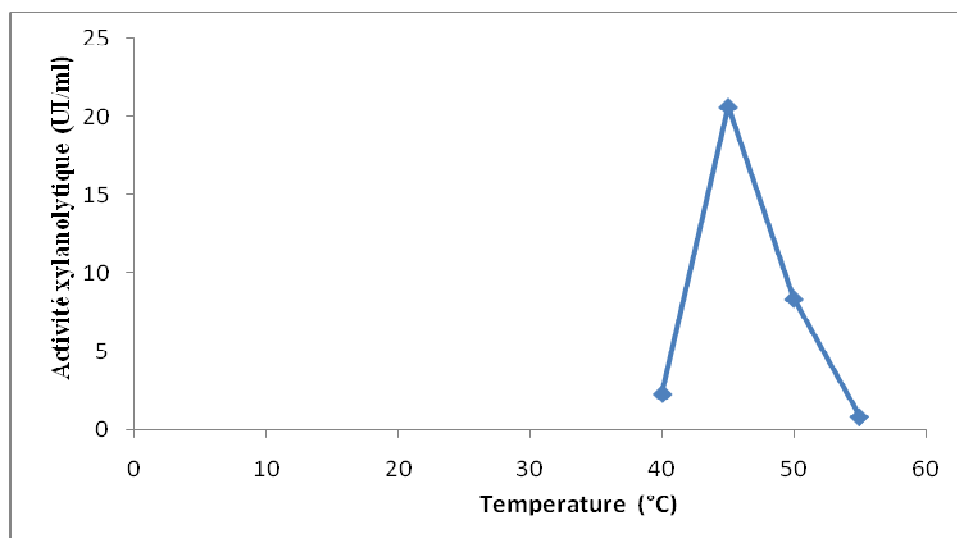


Figure 12: Température optimale de culture de la souche Cpt29.

L'étude de cinétique montre que la souche d'Actinomycète thermophile Cpt29 présente un optimum d'activité à 45°C soit, 23UI/ml. Par ailleurs a une température de 50°C l'activité baisse et donne une valeur de 9UI/ml, celle-ci s'annule presque à 55°C. Ces résultats sont corroborés par des travaux sur d'autres espèces et c'est le cas de plusieurs

autres souches telles que *Thermomyces lanuginosus*, *Thermosculus aurantiacus*, et *Sporotrichum* thermophile qui présentent un optimum d'activité à 45°C (110), également la souche *Bacillus coagulans* a une activité optimale de 24UI/ml à 45°C (107). Par ailleurs, la souche *Streptomyces reticuli* trouve un optimum d'activité à 37°C (115).

Cette xylanase sécrétée par la Cpt29 peut donc être utilisée dans des procédés industriels exigeant l'action de cette enzyme à des températures de 45 à 50°C, à titre d'exemple dans le traitement du papier et la panification.

V-4 Source de carbone

Les substrats carbonés servent à la fois comme source de croissance et d'énergie aux Actinomycètes.

La production de xylanases par la souche d'Actinomycète thermophile Cpt29 a été réalisée en Erlenmeyers. Le milieu de base utilisé est celui de Horikoshi (93). La température optimale est de 45°C, le pH du milieu est ajusté à 8,5 avant stérilisation à l'autoclave à 121°C.

Nous avons testé différentes sources de carbone solubles et insolubles (son de blé 2%; épeautre d'avoine 2%; coques d'arachides 2%; amidon 2%; xylose à 2%; glucose 2%; galactose 2% et lactose 2%). La culture est arrêtée après 24h d'incubation, centrifugés et le surnageant a servi pour évaluer la production des xylanases par la souche Cpt29. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 13.

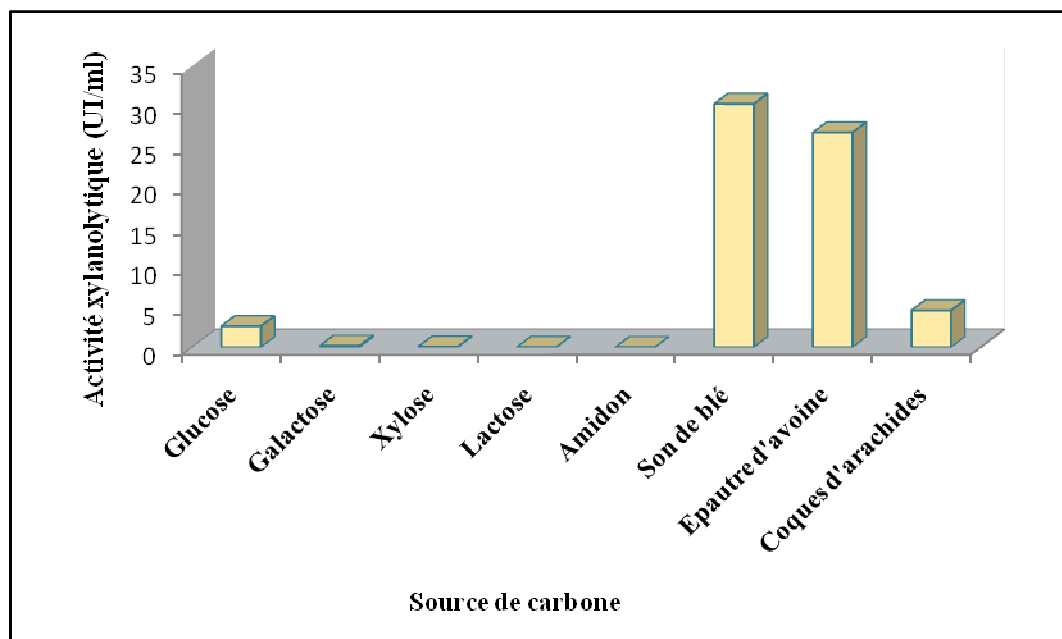


Figure 13: L'effet de différentes sources de carbone sur la production de xylanase chez la Cpt29

D'après cette figure, nous remarquons que l'optimum de production des xylanases est obtenue en présence de son de blé comme source de carbone qui est de l'ordre de 30,31 UI / ml. Le taux de production de l'activité xylanase sur le son de blé est comparable par rapport à la souche *Streptomyces* sp. AMT-3(116) avec une activité de 28UI /ml et relativement faible si on se réfère à d'autres souches telles que *Bacillus pumilus* ASH (112) 128UI/ml. Par ailleurs, des travaux de recherche (117) préconisent l'utilisation de 2% de la paille de blé pour la production d'une xylanase par la souche *Sporotrichum thermophile*. Chez *P. canescens*, les meilleures sources de carbone sont les résidus agricoles tels la farine de soja, la paille de blé (113) (114).

L'activité xylanolytique obtenue en présence du son de blé (30,31 UI / ml) est attribuée à plusieurs facteurs liés généralement à la qualité d'hémicellulose que renferme le son de blé, tel que sa richesse en facteurs nutritifs, et sa meilleure dégradabilité (118). En effet, le développement d'un procédé de production des xylanases basé sur le son de blé comme source de carbone est très attrayant car ces substrats sont bon marché et facilement disponibles. En ce qui concerne l'épeautre d'avoine, cette source de carbone induit la production de xylanases avec une activité de 28 UI /ml qui est relativement élevée et qui peut également être une source de production de xylanases, cependant ce matière reste d'une part peu disponible sur le marché et d'autre part moins utilisée au niveau de la bibliographie.

L'étude également de plusieurs concentrations de son de blé ont été testé à une gamme allant de 0.5 à 4% pour le choix de la concentration optimale qui permet la production la plus importante des xylanases par la souche d'Actinomycète thermophile Cpt29.

La production de xylanases a été observée (Fig. 14) avec l'augmentation de la concentration de son de blé de 0.5 à 3% .tandis que le rendement maximale de xylanases a été obtenue à une concentration de 2% avec une activité de 31UI/ml.

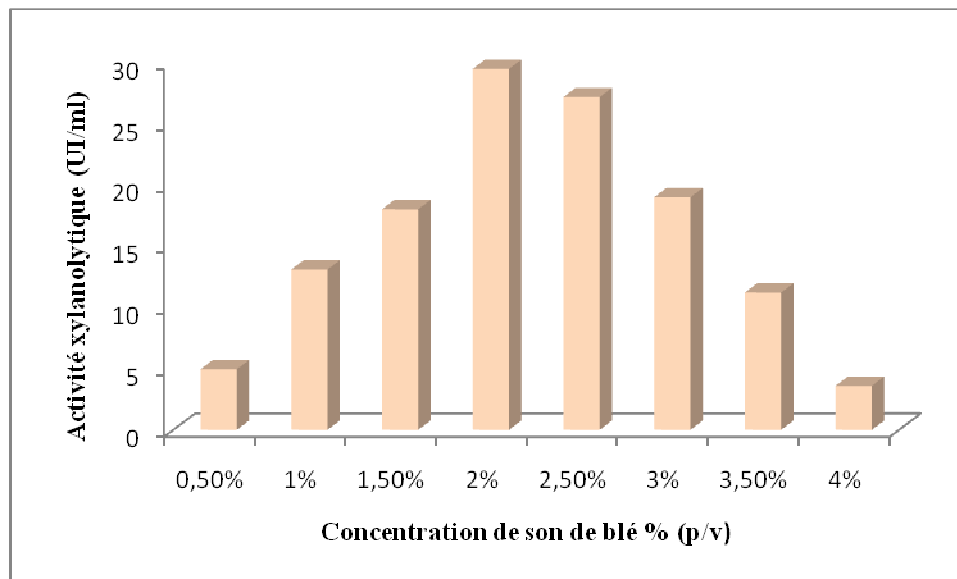


Figure 14: L'effet de différentes concentrations de source de carbone sur la production de xylanases chez la Cpt29

En ce qui concerne l'étude des autres sources de carbone étudié : xylose, lactose, galactose, amidon les résultats obtenus montrent que ces substrats carbonés n'induisent pas la production de xylanases, alors que le glucose et les coques d'arachides induisent très faiblement la synthèse de xylanases avec une activité de 5UI/ml. Cependant, il est possible que la synthèse des xylanases soit réprimée par l'accumulation des produits d'hydrolyse (xylose, xylitol, arabinose, arabitol) lors de culture élevée en xylane ou arabinose (114).

Ces différents travaux de recherche montrent que la souche *Actinomadura keratinilytica* sp Cpt29 est soumise à une induction par le substrat. Ce phénomène est en effet, connu chez les Actinomycètes où la production d'enzymes (Pectinases, xylanases, chitinases, cellulases, protéases et autres) est inductible. Ainsi, les résultats obtenus sont similaires à ceux observés chez souches *Streptomyces* sp. AMT-3 (116).

V-5 source d'azote

Comme la source de carbone, la source d'azote est un facteur très important dans le milieu de croissance ou de production d'enzymes. Il est connu que les proportions relatives des sources de carbone et d'azote doivent être bien ajustées pour avoir une bonne croissance et une production maximale d'enzymes.

Différentes sources d'azotes (organiques et minérales) ont été testées (Fig. 15), avec la même source de carbone (son de blé à 2%) maintenue constante dans les différentes conditions expérimentales.

Le milieu de culture est le milieu de base (Horikoshi), pour chaque essai, seulement la source d'azote varie. Les cultures sont arrêtées après 24h d'incubation et l'activité xylanolytique est mesurée par mesure de pouvoir réducteur par le test de Nelson Somogyi.

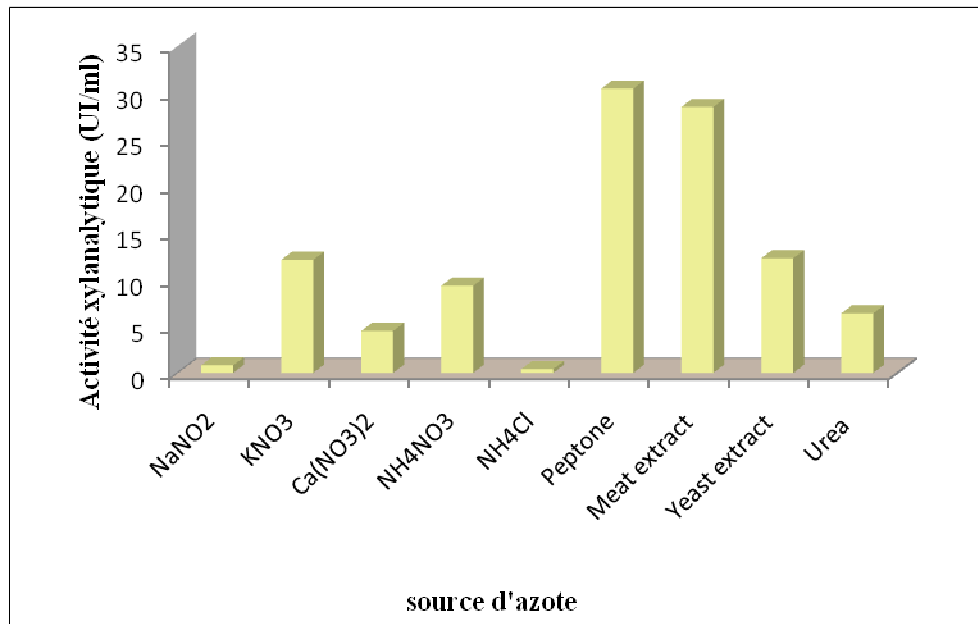


Figure15: L'effet de différentes sources d'azote sur la production de xylanases chez la Cpt29.

L'analyse de la figure 15 montre que la production des enzymes xylanolytiques par la souche d'Actinomycète Cpt29 est mieux induite en présence de sources d'azote organiques. La préférence aux sources d'azote organiques comme le peptone et l'extrait de levure pour la production des xylanases a été décrite chez d'autres souches tels que *Bacillus pumilus* ASH (112), la souche *Actinomadura* sp Cpt20 (6) et généralement par les champignons tels que *P. canescens* (2) (119), contrairement aux sources d'azote minéral (sulfate de sodium, nitrate de sodium) (113) (114).

Le peptone et l'extrait de levure à 0.5% ont fourni le maximum d'activité xylanase 33UI/ml, puis on observe l'extrait de viande et le nitrate de potassium qui donne une faible production de xylanases soit 14UI/ml. En ce qui concerne l'urée à 0.5%, ce substrat reste faiblement assimilable par la souche Cpt29 avec une activité de 9UI/ml. Le même résultat est obtenu chez la souche de *Bacillus* sp. X13 (120) et la souche *Streptomyces* sp. F2621(121).

En présence de nitrite de potassium et le chlorure d'ammonium on observe une absence totale de la production des enzymes xylanolytiques par la souche Cpt29.

V-6 L'effet de certains ions

L'étude de l'effet de certains additifs sur l'activité xylanolytique a été réalisée. Les résultats sont présentés sur la figure 16.

Ces additifs peuvent agir directement sur l'enzyme ou sur son substrat ou encore sur l'interaction de l'enzyme vis à vis du substrat ou indirectement en affectant les conditions physico-chimiques de la réaction enzymatique telles que la force ionique, l'activité de l'eau...

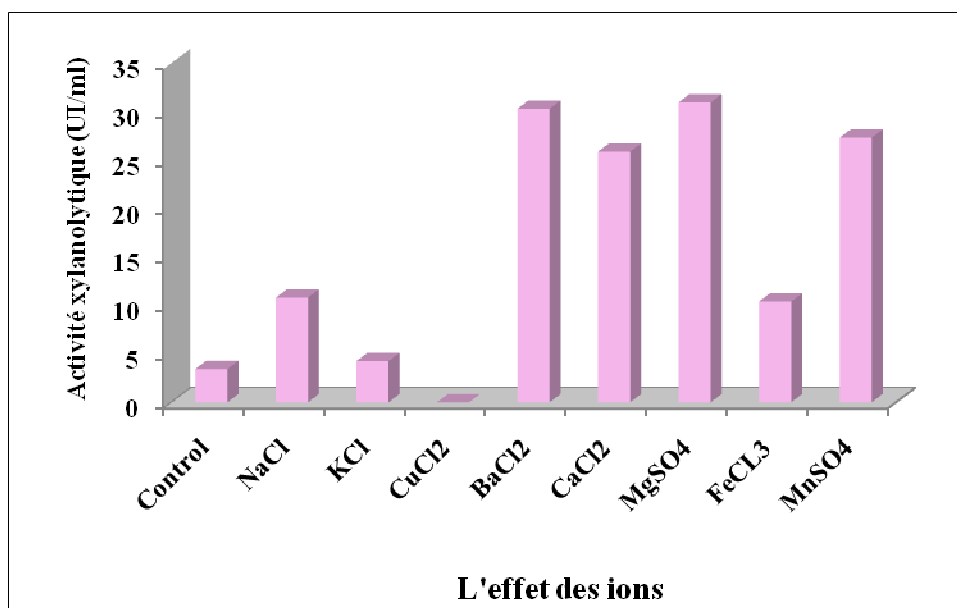


Figure 16: L'effet de différents ions sur la production de xylanases chez la Cpt29.

L'examen de cette figure 16 montre que les quatre additifs ioniques (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+}) améliore l'activité xylanolytique jusqu'à 34UI/ ml. En effet, l'effet bénéfique de ces ions, peut être expliqué par un changement conformationnel de la protéine qui permet une meilleure accessibilité du substrat au site actif ou une stabilisation de la structure de l'enzyme (21). Divers travaux ont montré l'implication de ces ions dans la production de xylanases tel que l'effet bénéfique Mg^{2+} sur la xylanase purifiée de la souche *Streptomyces rameus* L2001 (122).

Ce résultat est similaire à d'autres souches étudiées telles que *Jonesia denitrificans* (105) qui a une activité de 0.4UI/ml, la souche *Bacillus pumilus* ASH (112) et la souche *Streptomyces cyaneus* SN32 (93).

D'autres ions ont montré un effet inhibiteur pour la production des xylanases tels que : Cu^{2+} utilisé à une concentration de 0,01%. Ces résultats concordent bien avec la littérature (93).

V-7 Source de phosphore inorganique

Plusieurs sources de phosphore inorganique, ont été testées dans la culture de la Cpt29 pour la production de xylanases en utilisant les mêmes conditions opératoires. Les résultats obtenus sont regroupés dans la figure 17.

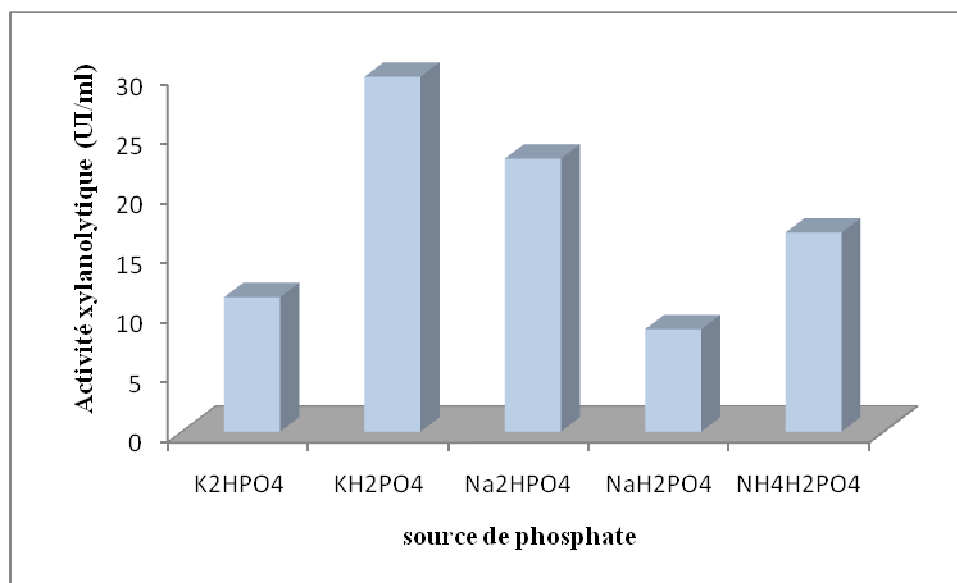


Figure 17: L'effet des différentes sources de phosphore inorganique sur la production de xylanases chez la Cp29.

L'examen de la figure 17 indique que les trois sources de phosphore KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 et le $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ augmentent la production de xylanases avec des activités respectivement de 35 UI/ml, 24UI/ml et 18UI/ml, cependant, la source de phosphore KH_2PO_4 reste la plus élevée. Les deux autres sources K_2HPO_4 et le NaH_2PO_4 ne semblent pas améliorer la production des xylanases.

En effet, les sources de phosphore di-potassique et mono-sodique impliquent une baisse de pH initial et les sources de phosphore mono-potassique et di-sodique à 1% (p / v) augmente le pH initial de la neutralité. En effet, nos études ont montré que, dans l'état de fermentation liquide, le pH neutre initial est très favorable à la synthèse de xylanases par la souche d'Actinomycète thermophile la Cpt29. Une différence du pH initial de la neutralité implique une chute de la production enzymatique (123).

Les résultats obtenus se rapprochent au ceux observés chez l'espèce *Streptomyces cyaneus* SN32 (93) dont l'optimum d'activité est de 460UI/ml avec le phosphate d'ammonium et la souche *Penicillium canescens* (123) à un optimum d'activité avec la source de phosphore di-sodique.

Plusieurs concentrations de source de phosphore mono-potassique ont été testées à une gamme allant de 0.01 à 0.2% pour le choix de la concentration optimale qui permet la production la plus importante des xylanases par la souche d'Actinomycète thermophile Cpt29 (Fig. 18).

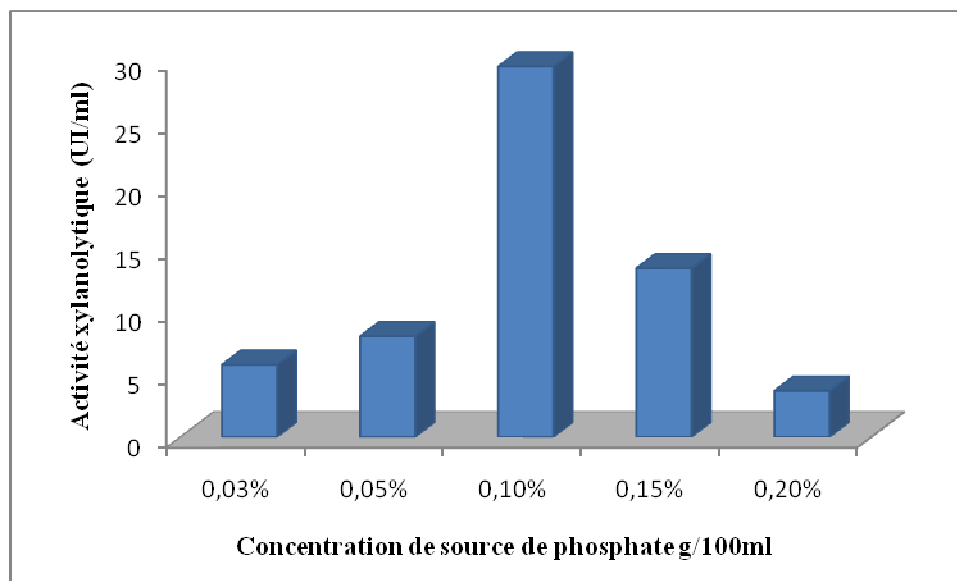


Figure 18: L'effet de différentes concentrations de source de phosphore mono-potassique sur la production de xylanases.

Le rendement maximale de xylanases a été obtenue à une concentration de 0.1% de source de phosphore mono-potassique avec une activité de 34 UI/ml, au delà de cette concentration l'activité diminue jusqu'à 4UI/ml à 0.2%.

En conclusion, on peut dire qu'après optimisation des conditions de culture de cette souche sur un milieu liquide à base de son de blé, nous avons triplé cette activité, on passe de 12 UI/ml à 35 UI/ml soit une augmentation de 291 %. Cette activité reste compétitive par rapport à celles obtenues chez le genre *Bacillus* tel que *Bacillus coagulans* (107) et *Streptomyces* tel que *Streptomyces* sp (110) avec des activités de respectivement de 24.20 UI/ml et 10.30 UI/ml.

VI- ESSAI DE PURIFICATION ET CARACTERISATION BIOCHIMIQUE PARTIELLE DE XYLANASES

VI-1 ESSAI DE PURIFICATION DE XYLANASE

VI-1-1 Milieu de production

Le milieu de production de xylanases optimisé est celui Horikishi avec un temps de production 24 heures et en présence du son de blé à 2% comme unique source de carbone. Le filtrat de culture obtenu est de 600 ml, la mesure de l'activité donne une valeur de 35 UI/ml avec 0.47 mg de protéines. Cette activité est la même obtenu dans l'optimisation.

VI-1-2 Précipitation des xylanases

Il existe plusieurs méthodes de concentration des jus de fermentation. Certaines sont adéquates pour des protéines mais d'autres sont inefficaces et même dénaturantes.

Pour cela, nous avons testé différentes méthodes pour concentrer les protéines du jus de fermentation :

- Précipitation au sulfate d'ammonium à 80%
- Précipitation à l'acétone à froid

Les protéines obtenues après traitement par une des deux méthodes sont reprises dans un minimum de tampon phosphate 50 mM pH 7. Une détermination des différentes activités xylanases et de la concentration en protéines a été réalisée au cours de chaque étape, les résultats obtenus sont présentés sur le tableau VII.

Tab. VII : Concentration des xylanases récupérées par deux méthodes de précipitation.

Méthodes de Concentration	Activité xylanase UI/ml	Protéinesm g/ml	Rendement en activité xylanase (%)	L'activité spécifique UI/mg	L'activité totale UI
Avant concentration	35	0.47	100	74.46	35000
Précipitation au sulfate d'ammonium à 80%	7,58	0.218	12.99	34.77	4548
Précipitation à l'acétone à froid	52.42	0.53	89.8	98.90	31452

La précipitation à l'acétone à froid permet d'obtenir le meilleur rendement en activité xylanase, Ainsi qu'avec l'utilisation de l'acétone en remarque une augmentation de l'activité xylanase. Alors que la concentration au sulfate d'ammonium provoque une diminution remarquable de l'activité xylanases.

La concentration par précipitation à l'acétone a été testée à différents pourcentages de l'acétone de 50% à 90%, une détermination des activités xylanases a été réalisée. Les résultats sont présentés sur la figure 19.

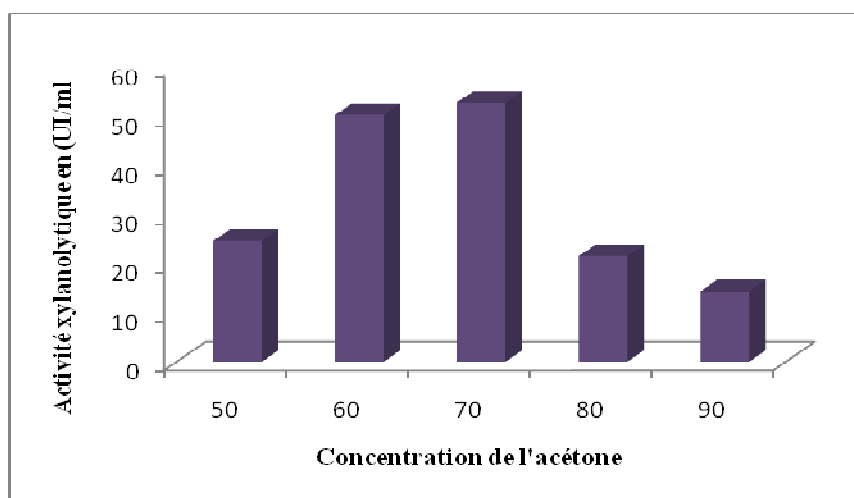


Figure 19: L'effet de différentes concentrations de l'acétone sur l'activité xylanolytique.

L'analyse de la figure 19 montre que la meilleure condition de précipitation des xylanases a été de 70% d'acétone. La concentration d'acétone de 70% est donc utilisée pour la précipitation de la xylanases en vue de préparer l'extrait enzymatique brut qui servira pour la purification et la caractérisation biochimique de xylanases de la souche Cpt29.

Ce résultat est similaire à celui de la souche *Streptomyces* sp. 234P-16 (124) qui trouve que la meilleure condition de précipitation des xylanases à 70% d'acétone avec une activité de 0.23UI/ml.

VI-1-3 Chromatographie échangeuse anionique sur colonne Mono Q Sépharose

Nous avons commencé la purification par une étape de Mono Q Sépharose échangeuse d'anions permettant la fixation des composants chargés négativement en utilisant un tampon d'éluion neutre (tampon phosphate 50 mM, pH 7).

Les protéines sont ainsi séparées sur la colonne Mono Q Sépharose à l'aide d'un gradient en NaCl de 0 à 1 M dans le tampon phosphate 50 mM pH 7 (**Fig. 20**).

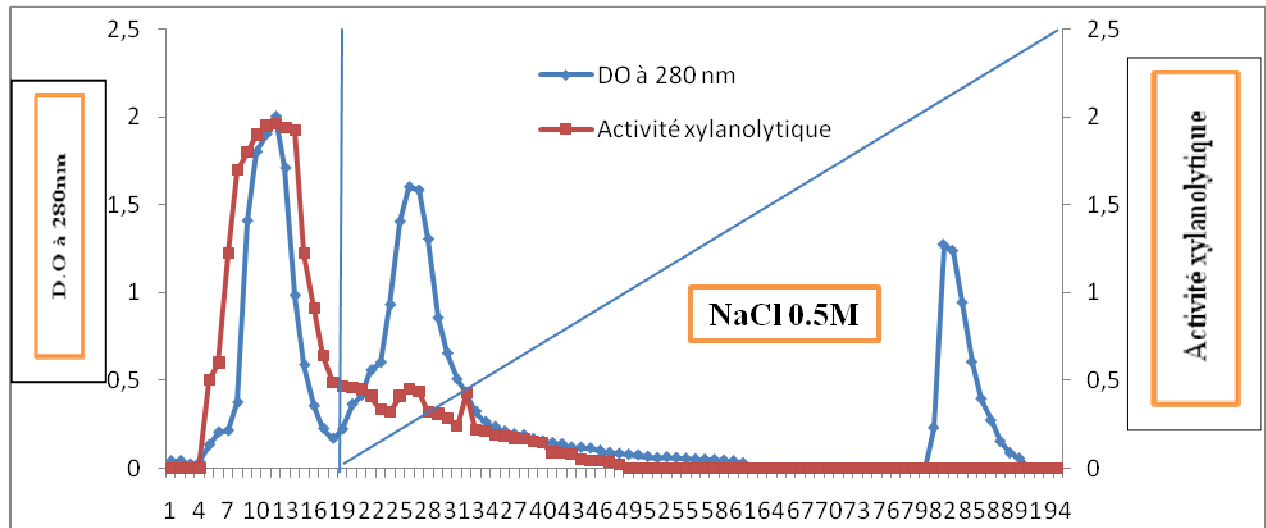


Figure 18: Chromatographie sur colonne mono Q sépharose.

L'examen du chromatogramme fait apparaître 3 pics qui absorbent à 280 nm et un seul pic majoritaire de l'activité xylanolytique qui apparaît avant l'élution et qui n'a pas été fixé par l'échangeur anionique. Ce résultat montre que notre enzyme serait chargée positivement et donc leur pHi est supérieur au pH de la colonne qui correspond à 7.2.

Des travaux de recherche dans ce sens ont apporté des résultats très exploitables et c'est le cas de la souche *Streptomyces thermocarboxydus* MW8 (**125**).

Les fractions de xylanases de 07 jusqu'à 16 sont collectées et concentrées par lyophilisation pour être réinjectée sur une colonne de gel filtration.

VI-1-4 Chromatographie de filtration moléculaire

Le lyophilisat obtenu est de nouveau déposé sur une colonne de gel filtration séphadex G75. L'élution est réalisée à un débit de 0.6 ml/min avec un tampon phosphate 50 mM, pH7 contenant 0.15 M NaCl. Les protéines sont suivies par mesure de l'absorbance à 280 nm (**Fig. 21**) et l'activité est mesurée par le même test. Le résultat obtenu figure sur le chromatogramme (**Fig. 21**). L'analyse du profil chromatographique montre qu'il y a deux pics de protéines et au moins deux activités xylanolytiques étalées dont deux sont éluées au milieu de la colonne correspondant approximativement à une taille de 35 KD ce qui correspond à la taille des endoxylanases étudiées (**36**), toute fois, ce résultat reste à vérifier sur d'autres supports chromatographiques en tenant compte du domaine de fractionnement.

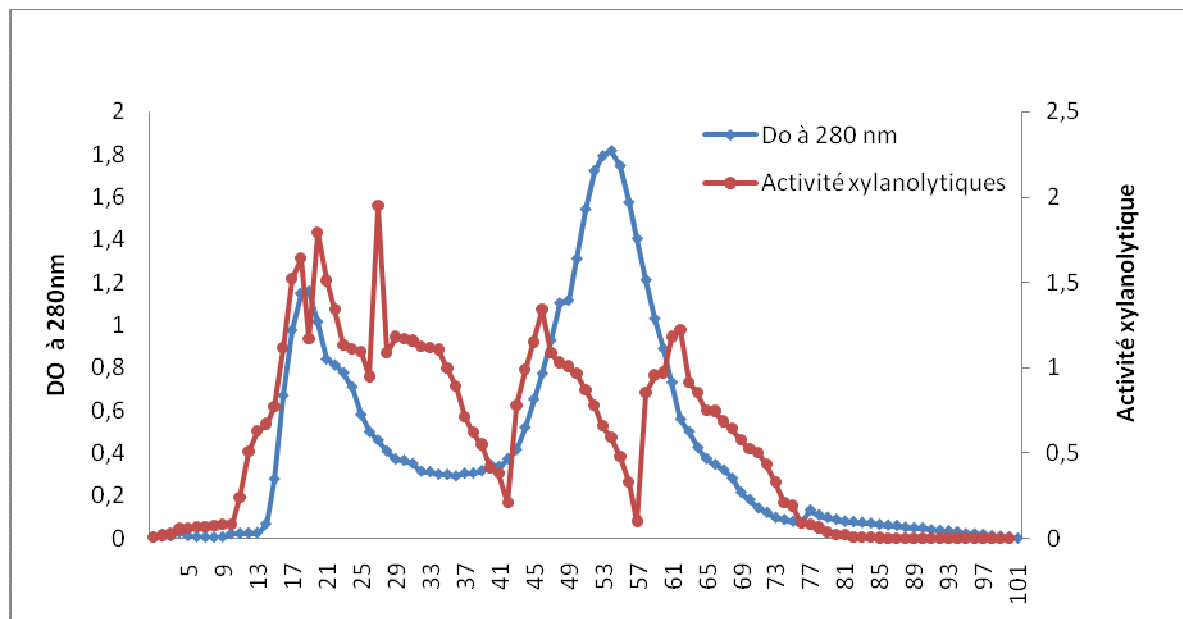


Figure 21: Chromatographie de filtration moléculaire sur gel G75 séphadex.

VI-1-5 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante PAGE-SDS et Zymogramme

Les différentes difficultés de récupération de la xylanase purifiée par chromatographie d'échange d'ions (Mono Q) n'ont pas pu être exploitées en électrophorèse PAGE-SDS et en zymogramme, le filtrat de culture, le dialysat et la fraction purifiée ont donc servi pour la réalisation de l'électrophorèse.

L'examen du diagramme électrophorétique et le zymogramme (**Fig. 22**) montre que :

Les témoins (Marqueurs de taille) font apparaître 8 bandes avec une bonne qualité de séparation et les tailles sont situées entre 14 et 116 KD.

L'analyse de l'extrait de filtrat de culture fait apparaître 7 bandes de protéines alors que le dialysat fait apparaître 3 bandes très bien séparées (coloration au bleu de Coomassie). L'étape de précipitation à l'acétone a donc éliminé 4 bandes de protéines soit 57,14 % de contamination. Par ailleurs, la fraction purifiée par échange d'ions ne fait apparaître aucune bande et cela est lié à la faible quantité de xylanases.

Deux bandes nettes de taille de 22 KD et 32 KD sont au voisinage de la taille recherchée des xylanases qui d'après la littérature, leurs masses moléculaires (endoxyanases) sont situées aux environ 20 à 30 KD (**6**). Des travaux de recherche ont obtenu des xylanases dont les tailles varient entre 29.8 KD pour la xylanase pure de souche *Bacillus* sp. MX47 (**126**),

42 KD de la souche *Remersonia thermophila* (127) et 48KD de la souche *Streptomyces* sp.SWU10 (128).

Ce résultat pourrait être confirmé par un zymogramme, des halos montrant l'activité de la xylanase, ainsi le résultat obtenu (**Fig. 22**) donne un zymogramme non exploitable dans le sens où aucune bande n'a pu être mise en évidence. Ce résultat peut s'expliquer par une faible activité xylanolytique non détectable par cette méthode. Ainsi, la souche *Bacillus* fait apparaître 3 bandes de xylanases brut par zymogramme dont la taille est situé entre 22 et 40KD (129).

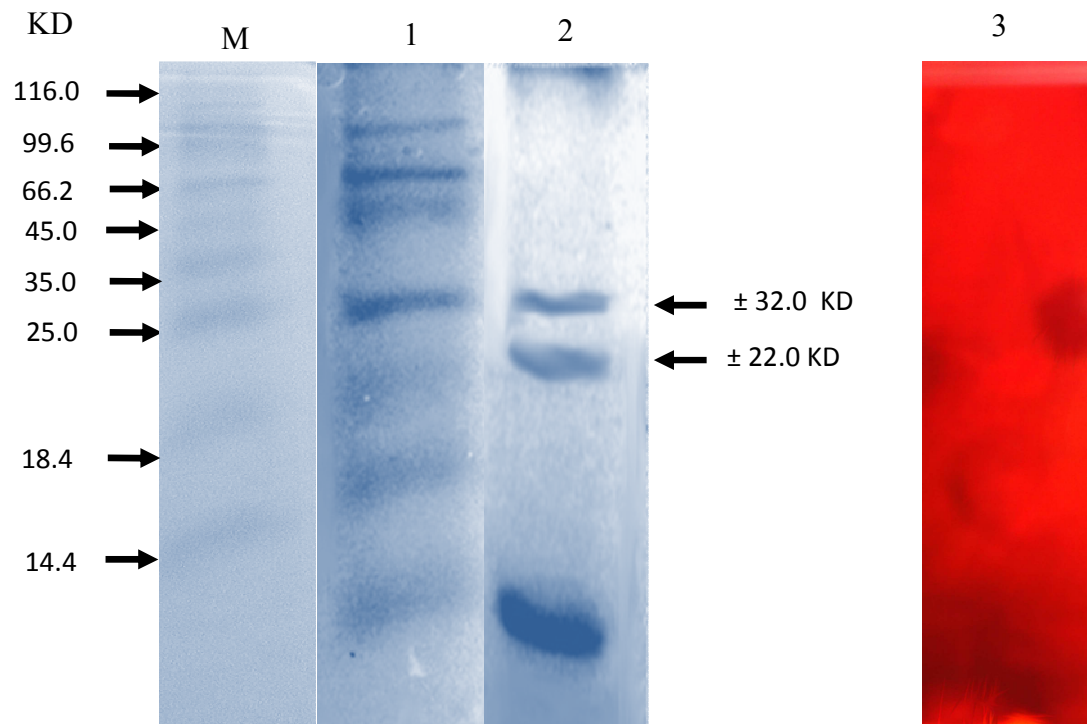


Figure 22: Electrophorèse des protéines sur gel SDS coloré au bleu de Coomassie et zymogramme. Piste M: marqueurs de taille LMW (116.0 : β -galactosidase, 66.2: SAB, 45.0: ovalbumine, 35.0: lactate déshydrogénase, 25.0 KD: Rnase Bsp981, 18.4 : β -lactoglobuline, 14.4 : lysozyme). 1: jus de culture. 2: l'enzyme brut. 3 : zymogramme de l'activité de la xylanase partiellement purifiée.

VI-2 CARACTERISATION BIOCHIMIQUE PARTELLE DE XYLANASE

La caractérisation des xylanases isolées et partiellement purifiées a été effectuée. En effet, des difficultés de récupération de la xylanase par chromatographie et lyophilisation ne nous ont pas permis de caractériser l'enzyme pure. Nous avons opté pour étudier les propriétés de xylanase partiellement purifiées, c'est-à-dire le dialysat. Par ailleurs, nous avons choisi, dans le cadre de ce travail, de nous limiter à l'étude biochimique des enzymes glycoside-hydrolases (GH) impliquées dans l'hydrolyse de la chaîne principale des xylandes. Parmi ces glycoside-hydrolases (GH), nous nous sommes limités aux enzymes les plus fréquentes, c'est-à-dire les endoxylanases des familles GH10 et GH11, et également des β -xylosidases de la famille GH43 sous forme de mélange enzymatique partiellement purifiée.

VI-2-1 Température optimale de xylanases partiellement purifiée

L'activité xylanase a été déterminée à différentes températures (**Fig. 23**).

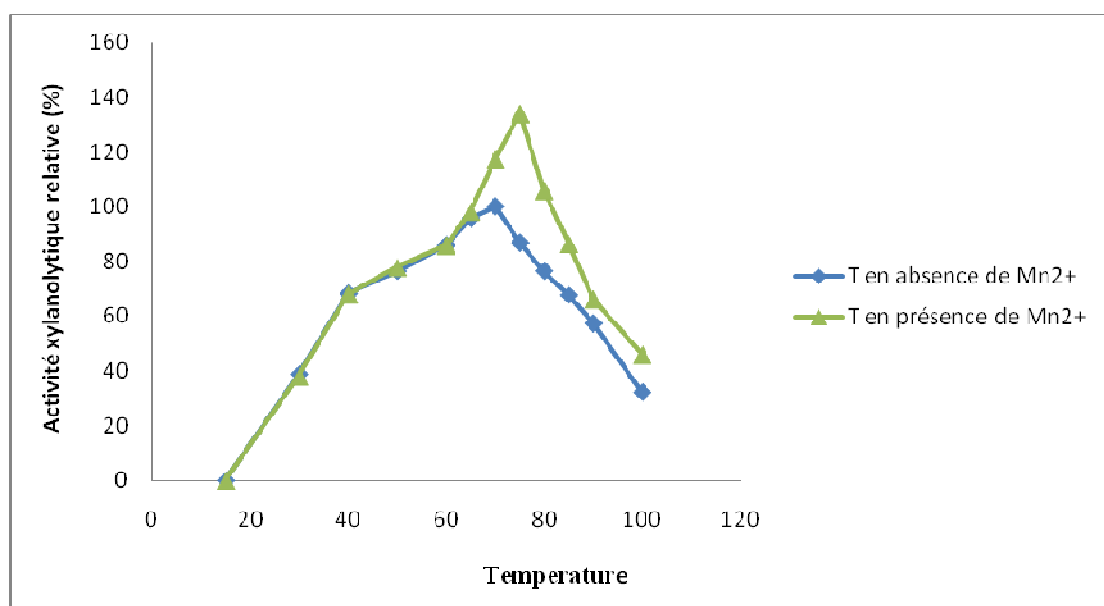


Figure 23: Température optimale de xylanases chez la Cpt29.

La figure 23 montre que l'activité est optimale à 70°C en absence de Mn^{2+} et 75°C en présence de Mn^{2+} de soit une activité relative de 134.04% et ne perd que de 20% de son activité à 80°C. L'activité xylanase relative à 30°C et à 100°C est de 35%. A 90°C, elle est de 57%.

L'activité xylanase dans l'extrait enzymatique brut a été testée chez quelques espèces de *streptomyces*, en trouve que la majorité des souches de *streptomyces* sp. SWU10 on un

optimum d'activité entre 50 et 65°C (128). Alors que la souche *Streptomyces* sp. 234P-16 trouve l'optimum d'activité de 0.5UI/ml à 90°C (124). L'étude d'une endoxylanase totalement purifiée chez une espèce d'*Actinomadura* sp Cpt20 a montré que l'optimum d'activité est obtenu à 80 °C présence Mn^{2+} (6).

VI-2-2 pH optimum de xylanases partiellement purifiée

Les xylanases, agissant à pH neutre et basique, sont très recherchées surtout dans l'industrie du papier et agroalimentaire.

Pour ce faire, nous avons déterminé les activités xylanases à différents pH tout en maintenant les autres paramètres constants.

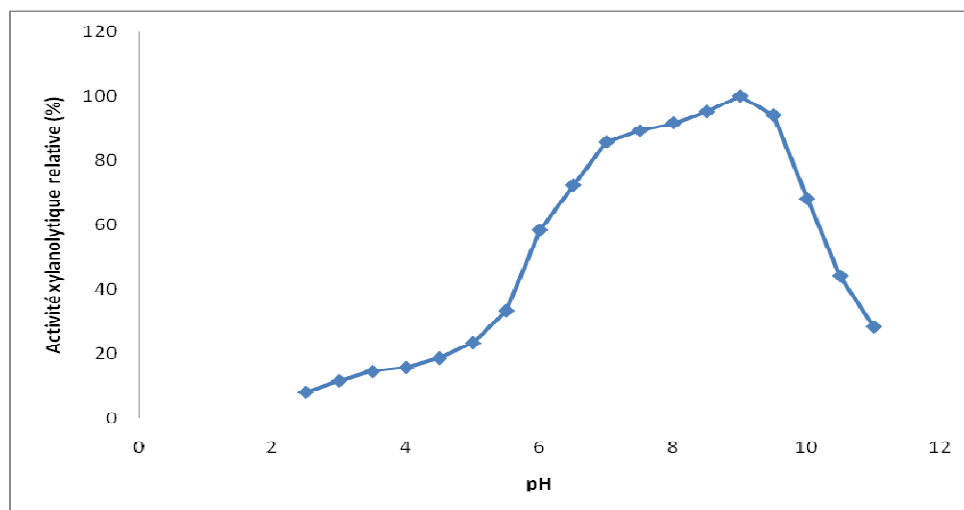


Figure 24: pH optimum de xylanases partiellement purifiée chez la Cpt29.

Cette figure montre que la xylanase de la souche d'Actinomycète thermophile Cpt29 présente un pH optimum de 9. L'enzyme a conservé une activité considérable à un pH supérieur (89,29% et 95,12% à pH 7,5 et 8,5 respectivement).

L'activité xylanase est de 18% à pH 4.5 et à pH 11, 90% à pH 7 et à pH 9.5, cependant, à pH 2 l'activité est presque nulle. Donc le champ d'application de cette enzyme est très large dans le sens où le pH d'action s'étale entre pH 7 et pH 10 et il s'agit d'une xylanase basique. Ces résultats sont en accord avec les xylanases partiellement purifiées déjà étudiées chez des souches de *Streptomyces* tel que la souche *Streptomyces* sp. AMT-3, le pH optimal a été trouvé à 6,0 mais les niveaux d'activité importants ont été détectés à pH compris entre 4,5 et 8,0 (114) et la souche *Bacillus altitudinis* DHN8 qui trouve un optimum d'activité à pH 7 (130). Ceci montre l'importance des xylanases de la Cpt29 puisqu'elle est capable de

fonctionner à des pH basiques allant jusqu'à pH 10 ou elle ne perd que 32% de son activité initiale.

VI-2-3 Stabilité des xylanases en fonction de la température

La stabilité de xylanase vis à vis de la dénaturation thermique a été étudiée en incubant cette enzyme à différentes températures et pendant différents temps. L'activité xylanase résiduelle a été déterminée à pH 8.5 et à 70°C. Les résultats sont présentés sur la figure 25.

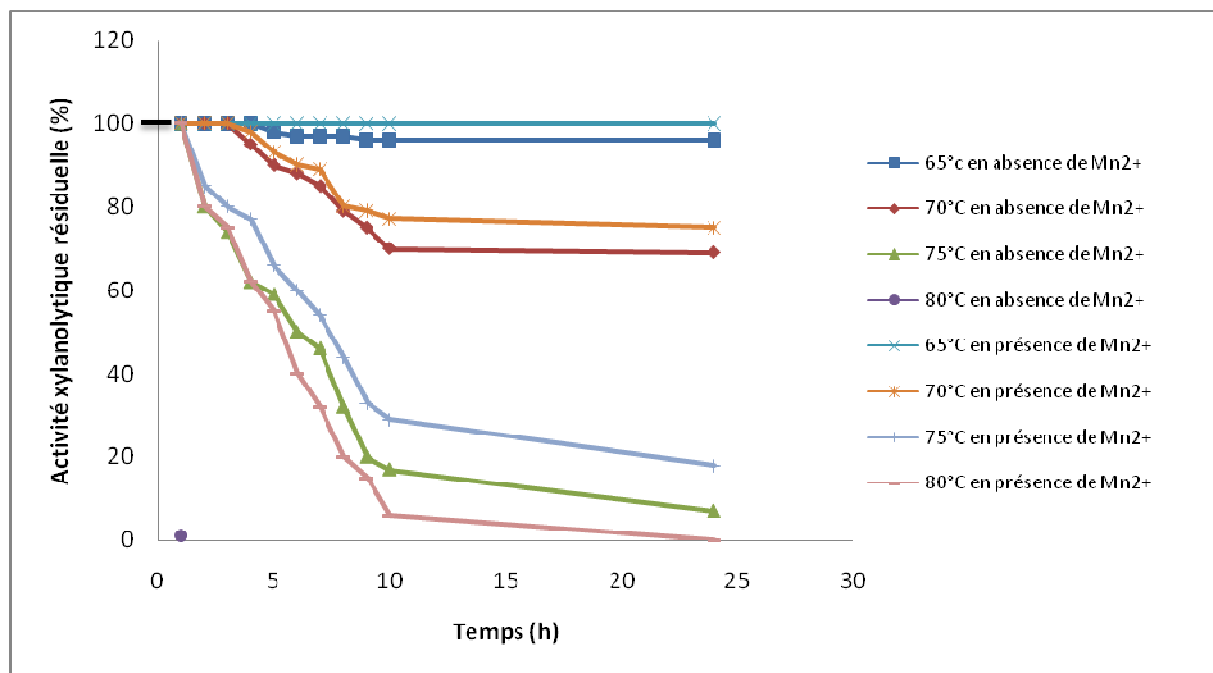


Figure 25: Stabilité de la xylanase vis-à-vis de la température.

L'étude de la thermo stabilité la xylanase est représentée par la figure 25. L'analyse de cette courbe montre que le traitement de l'enzyme avec les différentes températures (65°C, 70°C, 75°C, 80°C) est augmenté par addition de Mn²⁺. Ce métal semble stabiliser la conformation de la xylanase et améliorer son activité. Divers travaux de recherche (6) ont également montré l'effet de ce métal sur la thermostabilité.

L'étude comparative entre les différents traitements montre que la thermostabilité à 65°C est conservée jusqu'à 25 h et plus. Ce résultat pourrait être exploité dans les agro-industries notamment dans le blanchiment du papier. En effet, le procédé conventionnel utilise du chlore et du dioxyde de chlore qui engendre des pollutions de l'environnement, ainsi l'utilisation de xylanases apparait comme une voie prometteuse dans le blanchiment des papiers (14) (40). Ces résultat est similaire aux xylanases étudiées de la souche *T.*

lanuginosus SSBP qui reste stable à 60 et 65°C pendant 2 semaines et 48h respectivement (10), par contre la xylanase de la souche *Streptomyces* sp. AMT-3 était presque totalement inactivée après 4 h d'incubation à 65°C (116), alors que la souche *Actinomadura* sp. Cpt20 (6) et la souche *Bacillus altitudinis* DHN8 (130) qui reste stable à 50 et 55°C. Le traitement à 80 °C en présence Mn^{2+} donne une demi-vie de 6h alors qu'en l'absence du même métal, la demi-vie est de 5h soit un gain de 1h. Ce résultat montre la capacité de la xylanase à résister à cette haute température, d'où l'intérêt d'utiliser cette propriété dans la panification. Des travaux de recherche dans ce sens ont apporté des résultats très exploitables et c'est le cas de la souche *Actinomadura* sp. Cpt20 qui sécrète une endo-xylanase dont la thermostabilité est évaluée à 7h (6).

VI-2-4 Etude de la stabilité vis-à-vis du pH à 4°C

Nous avons étudié la stabilité de xylanase à 4°C et à différents pH de 2.5 à 11. L'incubation se fait en présence du xylane pendant 24h, les activités xylanolytiques sont mesurées par le test de Nelson Somogyi à différents pH. Les résultats obtenus sont représentés par la courbe de la figure 26.

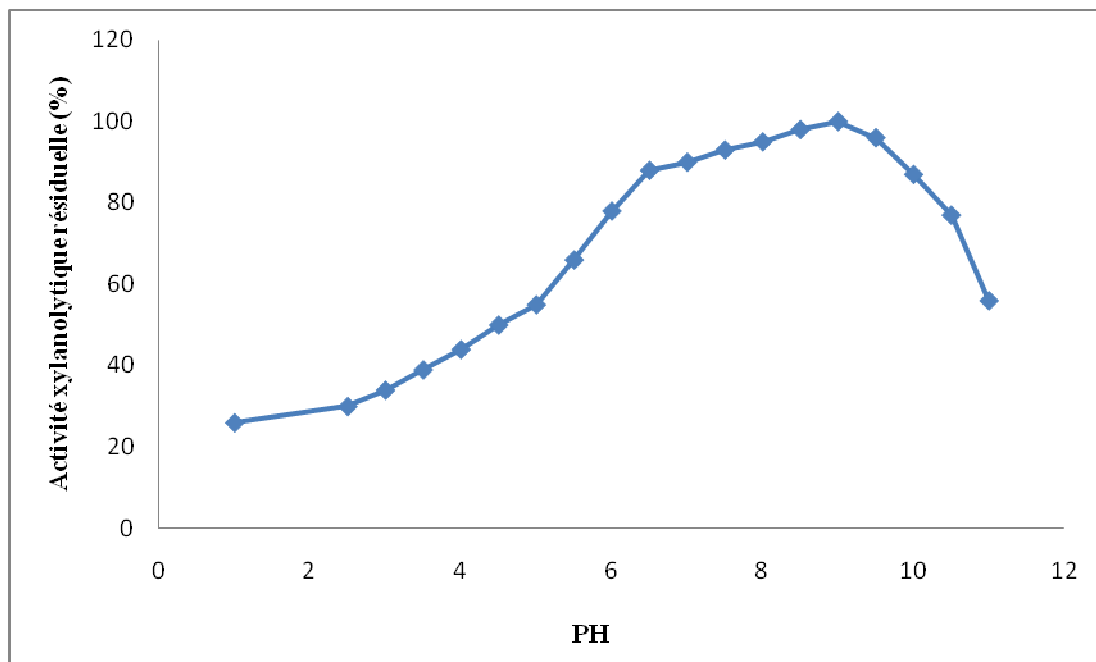


Figure 26: Stabilité vis-à-vis du pH à 4°C.

La xylanase est stable à des pH allant de 6.0 à 9.5. Cette stabilité a été aussi observée chez la majorité des souches de *streptomyces* où leurs xylanases (extrait brut) ne sont stables qu'à des pH entre 6.0 et 9.0 telle que les xylanases de la souche *Streptomyces* sp. SWU10 (128) et la souche *Streptomyces* S. *Cyaneus* SN32 qui reste stable à pH de 4 à 9.5 avec un

optimum d'activité à pH 6 (93), cependant, les xylanases de la souche *T. lanuginosus* SSBP reste stable à pH de 5.0 à 9.0. Alors que la souche *Bacillus* sp. X13 est stable pH entre 3.5 et 10 (10). Par ailleurs, des travaux sur la xylanase pure de la souche *Streptomyces thermocarboxydus* MW8 (125) montre que l'intervalle de stabilisation de cette souche à une gamme de pH allant de 5 à 9.

La xylanases de la souche d'Actinomycète thermophile la Cpt29 est moins stable à des pH acide qu'à des pH basique.

VI-2-5 Etude de la stabilité à différents pH et à 70°C

Nous avons étudié l'effet de la variation du pH (7, 8, 9 et 10) sur la thermostabilité de l'enzyme à 70°C (Fig. 27) et ceci afin de déterminer la stabilité aux pH extrêmes et à haute température.

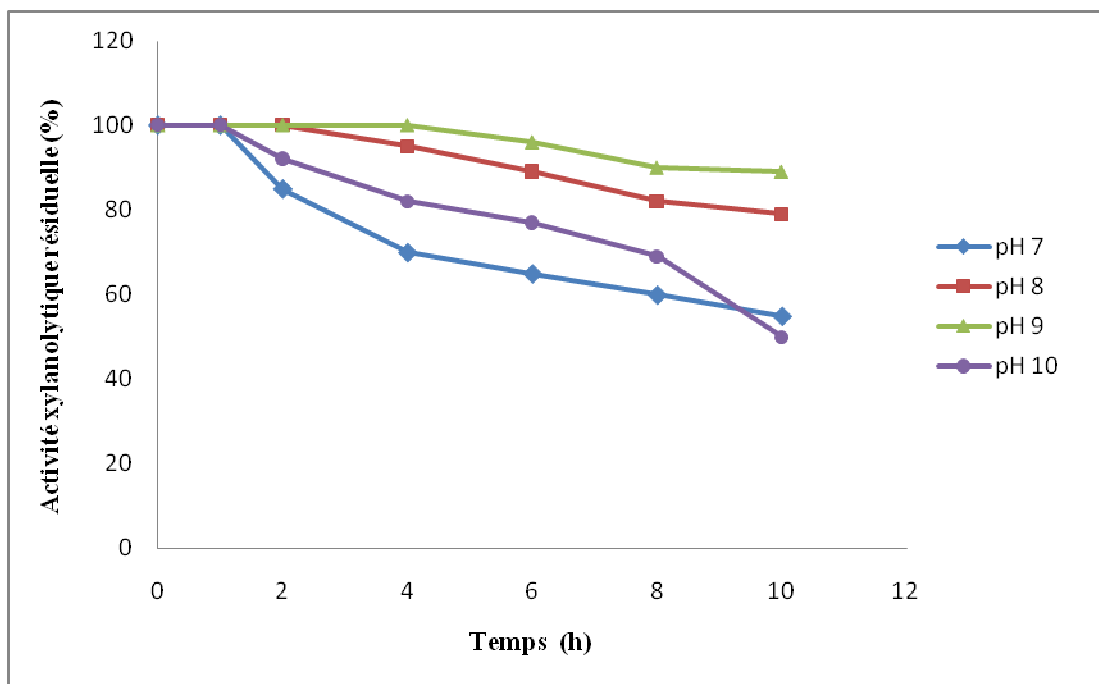


Figure 27: Stabilité vis-à-vis du pH à 70°C.

Sur la courbe, nous remarquons que la xylanase est stable à pH 8 et 9 jusqu'à 10h et perd seulement 20% de son activité à pH10. Nous pouvons conclure que notre xylanase est plus stable à pH basique. Cette propriété est souvent recherchée dans le blanchiment du papier et la digestibilité des aliments pour le bétail. Ce résultat corrobore à ceux obtenus chez l'espèce *Streptomyces* sp S38 (127) (131) (2).

VI-2-6 L'effet de certains additifs

Certains ions métalliques et agents chimiques peuvent avoir un effet positif ou négatif sur l'activité xylanolytique et représenté dans le tableau VIII.

L'examen du tableau, montre que certains ions ont un effet bénéfique comme Mn^{2+} , Na^+ et Sn^{2+} . Cet effet bénéfique peut être expliqué par un changement conformationnel de la protéine qui permet une meilleure accessibilité du substrat au site actif ou une stabilisation de la structure de l'enzyme (21), ces résultats sont similaires à celle de la souche *Remersonia thermophila* (127). Certains ions restent sans effet comme le cas du Mg^{2+} et Ba^{2+} (21).

D'autres ions ont un effet inhibiteur xylanase tels que les ions Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} . Cette inhibition par les ions Hg^{2+} suggère qu'il y a un résidu important de cystéine ou de tryptophane dans ou près de l'emplacement du site actif de l'enzyme. Hg^{2+} qui est un inhibiteur fort de la plupart des xylanases comprenant celles du *Remersonia thermophila* avec une activité relative de 2% (127) et *Streptomyces* sp. SWU10 de 3% (132).

Tab. VIII: L'effet de certains additifs sur la xylanase.

Additifs (10mM)	Concentration (mM)	Activité xylanolytique relative (%)
Contrôle	10	100
Fe ²⁺	10	87
Sn ²⁺	10	103
Ba ²⁺	10	92
Cu ²⁺	10	70
Zn ²⁺	10	75
Na ⁺	10	101
Ca ²⁺	10	92
Mg ²⁺	10	84
Mn ²⁺	10	132
Hg ²⁺	10	5
SDS	10	24
EDTA	10	81
Urée	10	52

Le SDS, puissant agent dénaturant des protéines, possède une action inhibitrice sur l'activité de la xylanase, cependant la présence d'urée provoque une inhibition remarquable de l'activité xylanase 52%, cette inhibition souligne que l'enzyme se compose d'acide aminé hydrophobe (133). L'activité des xylanases était légèrement réduite de 85% en présence d'agent chélateur EDTA (113).

Plusieurs concentrations de Mn^{2+} ont été testées de 1 à 100 mM, une détermination des activités xylanases a été réalisée. Les résultats sont présentés sur la figure 28.

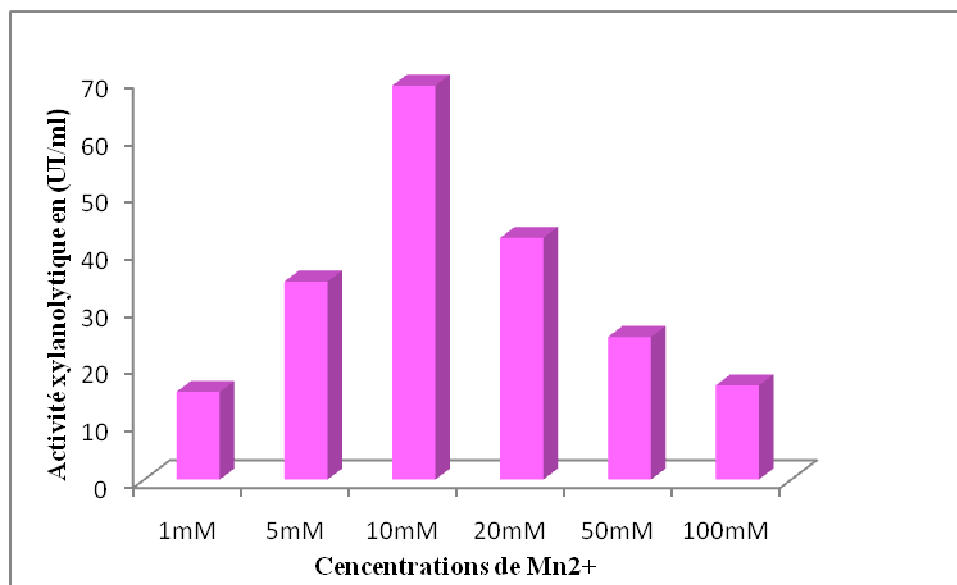


Figure 28: L'effet de différentes concentrations de Mn^{2+} sur l'activité xylanolytique.

La figure montre que la concentration optimale de Mn^{2+} est de 10 mM avec une activité de 68.95 UI/ml. Cette valeur est comparable à une xylanase de la souche *Actinomadura. sp. Cpt20* (6).

Ces propriétés placent cette enzyme comme prometteur pour des applications biotechnologiques en particulier la production de bioéthanol.

VI-2-7 Mode d'attaque de la xylanase

Les produits de dépolymérisation du xylane sont suivis par une cinétique d'attaque apparus au cours du temps par la xylanase ont été examinés par chromatographie sur couche mince (CCM), après révélation à l'acide sulfurique et chauffage à 100°C.

Les produits de dépolymérisation recherchés pendant plusieurs temps : début de la réaction (R_0), 30 mn, 2 heures, 4 heures et 24 heures sont représentés sur la figure 29. Un mélange de

3 témoins (M_T) allant du monomère au trimère a été utilisé et qui tient lieu de référence avec respectivement pour T_1 : monomère de xylose, T_2 : maltose et T_3 : raffinose. Nous avons également utilisé un blanc contenant l'enzyme dénaturé (B).

L'examen du chromatogramme, montre qu'au début de l'hydrolyse, aucun produit n'est apparu, alors qu'après 2 heures d'incubation, l'attaque de la xylanase conduit à une très faible quantité du monomère qui correspond au xylose selon le calcul du rapport frontale de l'ordre de 0.72 pour le monomère xylose et pour le produit de dépolymérisation. Ce monomère est l'unique produit observé au bout de 24 heures d'incubation avec une intensité plus importante. Par ailleurs aucune tache intermédiaire n'a été observée au cours de la cinétique de dégradation du polymère.

Pour notre part, nous avons utilisé une xylanase partiellement purifiée obtenue après culture de la souche sur un substrat complexe (son de blé). Ce résultat suggère qu'il y a probablement deux xylanases: une endo et d'exoxygénase ou une β -xylosidase. En revanche, au niveau du profil électrophorétique obtenu, nous avons observé deux bandes majoritaires dont la taille est proche à celles des xylanases, ce résultat est en faveur d'un mélange de xylanases. Les endoenzymes coupent au hasard à l'intérieur de la chaîne et les exoenzymes attaquent les petites unités pour libérer le xylose facilement métabolisable par le micro-organisme. En effet, les xylanases (endoxylanases) sont majoritairement retrouvées dans les familles 10 et 11 des glycoside-hydrolases (GH) mais des enzymes ayant des activités β -xylosidases sont aussi retrouvées dans les familles de GH 5, 7, 8, 30 et 43 (2).

Ce mode d'attaque est connu chez les xylanases issues de divers microorganismes tels que les bactéries dont les plus connus sont : *Streptomyces* sp, *Streptomyces halstedii* JM8 (104), *Streptomyces reticuli* (115), *Bacillus* sp. X13 (120) et *Enterobacter* sp (134). Divers travaux de recherche ont purifié une endoxygénase chez la souche *Bacillus* sp. MX47 (126) ont montré que cette enzyme attaque le xylane et libère des oligomères de différentes tailles (dimère, trimère et tétramère), cependant le xylose n'apparaît pas en fin de réaction ce qui n'est pas en faveur une exoxygénase ou une β -xylosidase non présente dans l'extrait enzymatique. Les mêmes résultats sont obtenus chez la souche *Penicillium occitanis* (135) et la souche *Remersonia thermophila* (127).

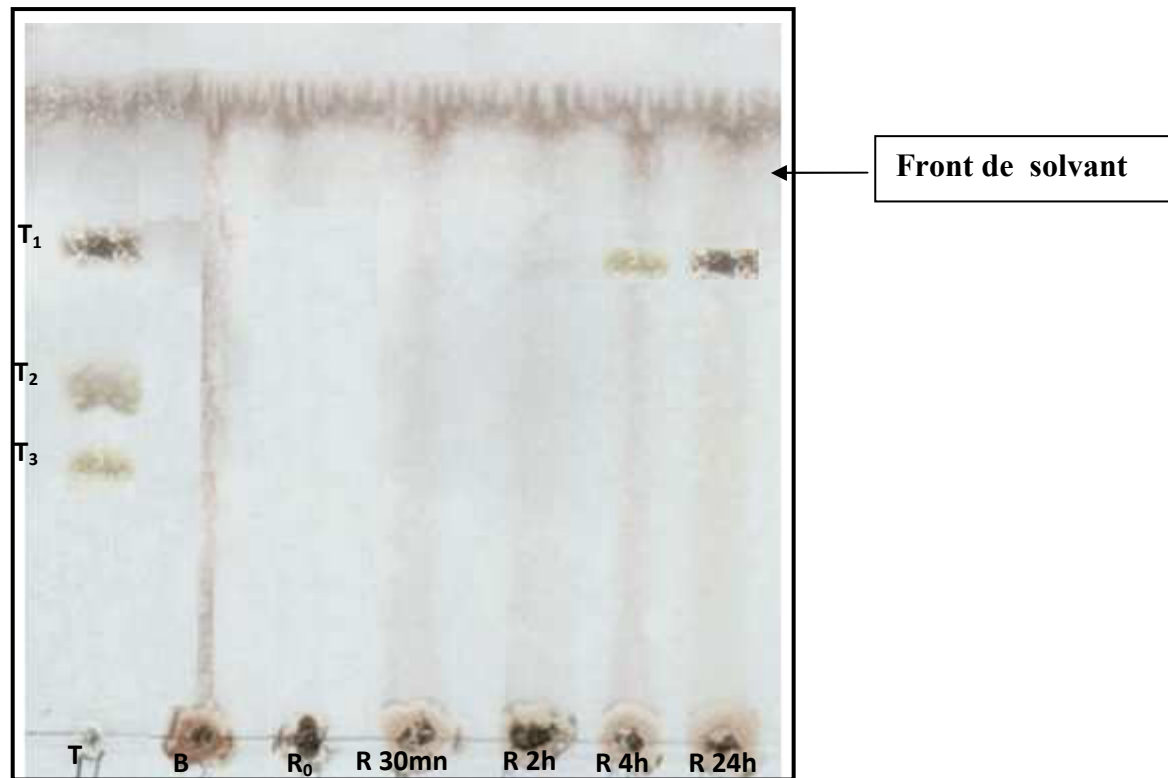


Figure 29: Cinétiques d'hydrolyse de xylane par les enzymes xylanolytiques.

T₁ : Monomère de xylose

B : Blanc

T₂ : Maltose

R₀ : La réaction au temps 0

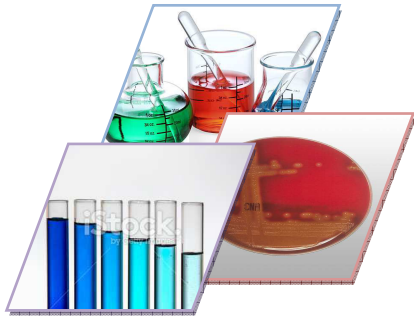
T₃ : Raffinose

R 30mn : La réaction après 30mn

R2h : La réaction après 2h de temps

R4h : La réaction après 4h de temps

R24h : La réaction après 24h



Conclusion et perspectives

Une grande variété d'enzymes xylanolytiques sont produites par les microorganismes (bactéries et champignons). Les endo et les exo-xylanases permettent la coupure des liaisons glycosidiques β ,1-4 liant les résidus xylose de la chaîne principale des xylanes, libérant ainsi des xylooligosaccharides. Les β -xylosidases hydrolysent les xylo-oligosaccharides de faible degré de polymérisation à partir de leur extrémité non réductrice. Les arabinofuranosidases et les glucuronidases libèrent les chaînes latérales de la chaîne principale en hydrolysant les liaisons entre le xylose et l'arabinose et le xylose et l'acide glucuronique, respectivement. Enfin les acides féruliques estérases et les xylane-acétyle estérases permettent de libérer les groupements acides féruliques et acétyl. Ces xylanases peuvent être utilisées dans une large gamme de procédés industriels (blanchiment des papiers par élimination des lignines) et biomédical (test pour dépister une malabsorption du D Xylose, ce qui permet de faire un diagnostic différentiel entre pathologie de l'intestin grêle et atteinte pancréatique).

Ce travail de recherche original sur la production des xylanases vise donc à isoler des microorganismes thermophiles à partir du milieu naturel et cela pour produire des enzymes (xylanases) thermostables ayant des applications dans l'industrie et le biomédical. Ainsi, Des travaux de recherches antérieurs effectués dans notre Laboratoire de recherche de Biochimie et Microbiologie Appliquée (L.B.M.A) ont permis d'isoler une souche d'Actinomycète thermophile à partir du compost de poulet. Cette souche a été identifiée par technique moléculaires ARNr 16 S et il s'agit d'une nouvelle souche appartenant au genre *Actinomadura* et dont l'espèce est *Actinomadura keratinilytica* Cpt 29. Cette même souche a fait l'objet de travaux de recherche montrant une activité protéolytique très importante.

Nous avons donc envisagé d'utiliser cette souche pour la production, la purification et la caractérisation biochimique de xylanases.

Les différentes investigations effectuées dans cette thèse sont exploitables dans le domaine de l'agro-alimentaire. Ainsi, la production de xylanases par la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt 29 a été effectuée par culture de la Cpt29 sur milieu solide (Nammori) à base de xylane et milieu liquide (Horikoshi) à base de son de blé et 45 °C. Ces deux milieux ont donné un rendement de 12 UI /ml comparables à d'autres travaux de recherche. La teneur en xylane du son de blé a provoqué donc une bonne induction de la synthèse de xylanases par la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt 29.

L'étude de l'optimisation de la production des xylanases par méthode classique a permis d'élucider les facteurs (temps de culture, température, pH, sources de carbone, sources d'azote, sources de phosphore et l'effet certains ions) intervenants dans cette production. Ainsi, les résultats obtenus ont montré que : l'optimum d'activité xylanolytique est atteint au bout d'un temps de culture de 24h, à un pH optimum de 8.5 et une température optimale de 45°C.

Par ailleurs, l'utilisation du son de blé comme seule source de carbone dans le milieu induit la plus forte production de xylanase (30.31UI/ml) avec une concentration de 2%. Cette étude préliminaire permet de conclure que : Parmi toutes les sources organiques et inorganiques d'azote testées dans l'étude, le peptone constitue la meilleure source d'azote pour la stimulation de la production des xylanases par la souche Cpt29. La présence de $MgSO_4$ et le KH_2PO_4 dans le milieu, augmente l'activité xylanolytique jusqu'à 35 UI/ml. L'optimisation a ainsi entraîné une augmentation de l'activité xylanolytique de 291 %. D'autre part, le milieu optimisé est composé de substrat naturel (son de blé) qui représente un bon marché pouvant entraîner une réduction considérable dans le coût de production. En effet, divers travaux de recherche montrent que la régulation des gènes inducteurs des enzymes xylanolytiques des *Penicillia* est contrôlée par la composition du milieu de culture (principalement les substrats carbonés et azotés) et les conditions environnementales de culture (pH, température, teneur en eau) A titre d'exemple, le xylane et le glucose respectivement sont connus comme un excellent inducteur et un puissant répresseur de la synthèse des endo- β -1,4-xylanases chez les champignons. Cependant, ces substrats purs ne peuvent être utilisés qu'à très petite échelle compte tenu de leur prix d'achat élevé.

En ce qui concerne la purification de cette xylanase, l'enzyme de la Cpt29 a été partiellement purifiée suite à une série de méthodes chromatographiques incluant une étape de précipitation à l'acétone à 70%, une chromatographie échangeuse d'anions (Mono Q-sépharose) et une filtration sur gel de séphadex G75. L'analyse de la xylanase partiellement purifiée, donne deux fractions de taille de 22 KD et 32 KD qui sont au voisinage de la taille recherchée des endoxylanases, cependant, divers travaux de recherche ont purifié des xylanases dont la taille varie entre 29 et 40KD. Nos tests basés sur la lecture du zymogramme n'ont pas confirmé l'activité de ces deux bandes protéiques.

La caractérisation biochimique de l'enzyme partiellement purifiée, nous a permis de conclure que les optima de pH et de température de la xylanase sont respectivement de 9 et 70 °C en présence de Mn^{2+} . L'enzyme est stable pendant 24 h à 65°C et 70°C et elle à un temps

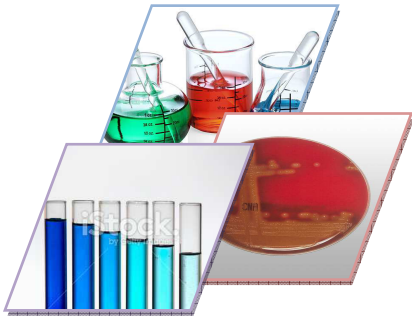
de demi-vie de 6h à 80°C. La xylanase est stable pendant 10 h à des pH de 8,0 et 9,0. Cette enzyme est activée en présence de certains ions tels que Mn^{2+} , Sn^{2+} et Na^+ alors que Zn^{2+} , Cu^{2+} et Hg^{2+} ont un effet inhibiteur. Les résultats obtenus sont similaires à celle de la souche *Actinomadura* sp Cpt20 isolé dans notre laboratoire et dont la thermostabilité est évaluée à 7h. Par ailleurs d'autres souches étudiées *Streptomyces* sp SWU10 et *Streptomyces thermocarboxydus* MW8 montrent également des propriétés biochimiques très intéressantes.

Nous pouvons donc dire que les différentes propriétés obtenues sont comparables à d'autres résultats d'où la possibilité d'utiliser cette enzyme dans divers domaines tels que : papeterie, alimentation animale ou la panification.

Concernant le mode d'attaque de cette xylanase sur le xylane, nous avons élucidé le mode d'action, ainsi, l'attaque de xylanase sur son substrat (Xylane) donne uniquement le monomère de xylose entre un temps de 30 minutes, 2h, 4 h et 24 h. Ce résultat est en faveur d'un mélange d'enzyme contenant une endo xylanase et une exoxyylanase, ainsi, l'endoxyylanase attaque la chaîne au hasard à l'intérieur pour donner des oligomères de tailles relativement élevés qui à leur tour seront dégradés par une exo-xylanases pour donner le xylose comme produit final. L'analyse bibliographique montre que les travaux réalisés sur les souches *Bacillus* sp. MX47 et *Penicillium occitanis* libère plutôt du dimère, trimère et tétramère alors que le xylose n'apparaît pas dans la réaction. Le résultat obtenu est proclamé en faveur d'une xylosidase présente dans les xylanases partiellement purifiées mais que nous n'avons pas isolée et purifiée d'où l'intérêt de rechercher cette enzyme.

A la lumière de ces résultats, en perspective, nous pourrions proposer d'autres travaux de recherche complémentaires tels que :

- Purification totale de l'enzyme pour mieux élucider le mode d'action de cette xylanase.
- Rechercher la β -xylosidase qui semble être présente dans l'extrait enzymatique.
- Recherche du gène impliqué dans l'expression de cette enzyme avec clonage, ce qui permet d'une part d'obtenir des quantités de xylanases et d'autre part de faciliter la purification.
- L'immobilisation de xylanase pour l'amélioration de la thermo-stabilité.
- Applications industrielles de xylanase dans le domaine de blanchiment de papier.



Références bibliographiques

1. Millward-Sadler S. J., Poole D.M., Henrissat B., Hazelwood G.P., Clarke J.H. and Gilbert H. J. (1994). Evidence for a general role for high-affinity non-catalytic cellulose binding domains in microbial plant cell wall hydrolases. *Mol. Microbiol.* 11, 375-382.
2. Collins T., Gerday C., Feller G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 3-23.
3. Henrissat B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *J. Biochem.* 280, 309-316.
4. Henrissat B. et Davies G.J. (1997). Structural and sequences-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Biol.* 7, 637-644.
5. Yang S.Q., Yan Q.J., Jiang Z.Q., Li L.T., Tian H.M., 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.
6. Taibi Z., Saoudi B., Boudelaa M., Trigui H., Belghith H., Gergouri A., Ladjama A. (2011). Purification and biochemical characterization of highly thermostable xylanase from *Actinomadura* sp. Strain Cpt20 isolated from poultry compost. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 011.9457.
7. Kohli U., Nigam P., Singh D., Chaudharu K. (2001). Thermostable alkalophilic and cellulase-free xylanase production by *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C. *Enzyme Microbiol. Technol.* 28, 606-610.
8. Sa-Pereira P., Mesquita A., Duarte J.C., Barros M.R.A., Costa-Ferreira M. (2002). Rapid production of thermostable cellulase-free xylanase by a strain of *Bacillus subtilis* and its properties. *Enzyme Microbiol. Technol.* 30, 924-933.
9. Ronald P., De Vries, Visser J., Leo H. de Graaff. (1999). CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. *Res. Microbiol.* 150, 281-285.
10. Singh S., Pillay B., Prior BAT. (2000). Thermal stability of β -xylanase produced by different *thermomyces lanuginosus* strains. *Enzymes Microbiol. Technol.* 20, 502-508.
11. Maheshwari R., Bharadwaj G., Mahalingeshwara K. (2000). Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 64, 461-488.

12. Assamoi A. A., Destain J., Thonart P. (2009). Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. *Biotchnol. Agron. Soc. Environ.* 13, (2), 281 -294.
13. Applications industrielles des xylanases (page consultée le 12 Avril 2014) [en ligne] Adresse URL : <http://www.universalis.fr>
14. Bhat M.K. (2000). Cellulases and related enzymes en biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 18, 355-383.
15. Numéro d'accèsion dans la banque des gènes (page consultée le 12 novembre 2013) [en ligne] Adresse URL : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
16. Habbeche A., Haberra S., Saoudi B., Kerouaz B., Ladjama A. (2013). Keratinase production from a thermophilic Actinomycete strain Cpt29 newly isolated from poultry compost. *Minerva Biotechnologica.* 25, (3), 151-9.
17. Habbeche A., Saoudi B., Jaoudi B., Haberra S., Kerouaz B., Boudelaa M., Badis A., Ladjama A. (2014). Purification and biochemical characterization of a detergent-stable Keratinase from a newly thermophilic Actinomycete *Actinomadura kiratinilytica* strain Cpt29 isolated from poutry compost. *J. Biosci. Bioeng.* 117, (4), 413-21.
18. Gerois J., Gianotta F., De Buyl E., Garnier B., Frère J-M. (2000). Purification and properties of three endo β -1-4 xylanases produces by *Streptomyces* sp. strain S38. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 178-186.
19. Larreta-Garde V. (1997) .Enzymes en Agroalimentaire. Lavoisier .p.p.179-361.
20. Mouranche A., Costes C. (1985). Les Hémicellulases. Dans: Hydrolases et dépolymérasés, enzymes d'intérêt industriel. Eds. Gauthier-Villars, Paris, p.p. 165-197.
21. Guerfali M. (2011). Hémicellulases d'un champignon thermophile : Production, Purification, Caractérisation Biochimique et Applications .Thèse de doctorat. Université de Sfax .p.p.273.
22. Kizawa H., Shinnoyama H., yasni T. (1991). The synthesis new Xylosyloligosaccharides by transxylosylation with *Aspegillus niger* β -Xylosidase. *Agric. Biol. Chem.* 671 – 678.
23. Wong K.K.Y., Tan L.U.L., Saddler J.N. (1988). Multiplicity of β -(1-4) xylanases in micro organisms function and application. *Microbiol. Rev.* 52, 305-317.

24. Georis J., Giannotta F., Buyl E. D., Granier B., Frere J.M. (2000). Purification and properties of three endo-b-1,4-xylanases produced by *Streptomyces* sp. strain S38 which differ in their ability to enhance the bleaching of kraft pulps. *Enzyme and Microbial Technology*. 26, 178–186.
25. Gaberiel P. (2005). Etude Structure /fonction d'hemicellulases thermostables : la xylanase GH-II et l'arbinofuranosidase GH-51 de *Thermobacillus xylanilyticus* . Thèse de Doctorat. Université de Reims Champagne- Ardenenne Inra umr fare 614 .p.p.350.
26. Henrissat B. et Bairoch A. (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *J. Biochem*. 293, 781–788.
27. Classification des xylanases (page consultée le 18 janvier 2014)) [en ligne] Adresse URL : <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/>
28. Jeffries Thomas W. (1996). Biochemistry and genetics of microbial xylanases. *Institute for Microbiol and Biochemical Technology*.
29. White A., Withers S.G., Gilkes N.R., Rose D.R. (1994). Crystal structure of the catalytic domain of the beta-1-4-glucanase Cex from *Cellulomonas fimi*. *Biochemistry*. 12546-12552.
30. Mirande C. (2009). Dégradation des fibres pariétales et système xylanolytique de *Bacteroides xylanisolvens* XB1AT et *Roseburia intestinalis* XB6B4, espèces bactériennes du microbiote intestinal humain. Thèse de Doctotart. Université Blaise Pascal Clermont-Ferrand. p.p.251.
31. Miyazaki K., Martin J.C., Marinsek-Logar R., Flint H.J. (1997). Degradation and utilisation of xylans by the rumen anaerobe *Prevotella bryantii*. (formerly *P. ruminicola subsp. brevis*). *Anaerobe*. 3, 373-381.
32. Liebl W., Winterhalter C., Baumeister W., Armbrrecht M., Valdez M. (2008). Xylanase attachment to the cell wall of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *J. Bacteriol*. 190, 1350-1358.
33. Campbel R.L., Rose D.R., Wakarchuk W.W., To R., Sung W.S., Yaguchi M. (1993). A comparison of the structure of the 20kd xylanases from *Trichoderma harzianum* and *Bacillus circulans*, Proceedings of the *Trichoderma reesei* cellulases and other hydrolases. *Espoo Finland*. 63-72.
34. Withers S.G. et Aebersold R. (1995). Approches to labeling and identification of active-site residues in glycosidases. *Prot. Sci*. 361-372.

35. Törrönen. R.L., Gonzalez .R., Kalkkinen., Harkki A. and Kubicek .C.P. (1992). Characterization of both enzymes and genes. *Biotchnology*. 1461-1465.
36. Biely. P. (2003). Diversity of Microbial Endo- β -1,4-Xylanases in Application of enzymes to lignocellulosics. Acs symposium series 855. *Eds. American Chemical Society*.361-374.
37. Ko E.P., Akatsuka H., Moriyama H., Shinmyo A., Haya Y., Katsube Y., Urabe I., Okada H. (1992). Site-directed mutagenesis at aspartate and glutamate residues of xylanase from *Bacillus punilus*. *J.Biochem*. 288, 117-121.
38. Biely P., Puls J., Schneider H. (1985). Acetyl xylan esterases in fungal xylanolytic systems. *FEBS. Lett*. 186, 80-84.
39. Beg Q. K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G. S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications. *Springer-Verlag*.326-338.
40. Subramaniyan S., Prema P. (2002). Biotechnology of microbial xylanase: enzymology ,molecular biology and application. *Biochimical processing division*. 33-46.
41. Roy M., Belaluddin M. (2004). Production and characterization of alkaline xylanases form *Bacillus* sp. Isolated from an alkaline Sod Lake. University of Rajshahi. Bengladesh. 777-781.
42. Mc Carthy A. J., Cross T. (1981). A note on a selective isolation medium for the thermophilic Actinomycète *Thermomonospora Chromogena*. *Journal of Applied Bacteriology*. 299-302.
43. Ara I., Matsumoto A., Abdul Bakir M., Kudo T., Omura S., Takahashi Y. (2008). *Actinomadura bangladeshensis* sp. nov. and *Actinomadura chokoriensis* sp. nov. *J. Syst. Evol. Microiol*. 1653-1959.
44. Tuncer M. (1999). Characterization of endoxylanase activity from *Thermomonospora fusca* BD25. *Mersin University .Turkey*. 737-725.
45. Srinivasan M. C., Meenakshi V. R. (2008). Microbiol xylanase for paper industry. *Biochemecal sciences division .India*. 12-13.
46. Mahesawari M.U. et Chandra T.S. (2000). Production and potential applications of xylanase from a new strain of *Streptomyces cuspidosporus*. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 16, 257-263.
47. Sunna A., Moracci M., Rossi M., Antranikian G. (1996). Glycosyl hydrolases from hyperthermophiles. *Extremophiles*. 1, 2-13.

48. Simpson H., Haufler U. and Daniel K. (1991). An extremely thermostable xylanase from the thermophilic *Eubacterium thermotoga*. *J. Biochem.* 277, 177-185.
49. Jacques G., Frederic D.L., Joste L.B., Vivraine B., Bart D., Fabrizio G., Benoit G. and Jean marie F. (2000). An additionnal aromatic interaction improves the thermostability of mesophilic family 11 xylanase: structural basis and molecular study. *Protein. Sci.* 9, 466-475.
50. Rani D.S. et Nand K. (2000). Production of thermostable cellulase-free xylanase by *Clostridium absonum* CFR-702. *Process Biochem.* 36, 355-362.
51. Jain A., Garg S.K., Johri B.N. (1998). Properties of thermostable xylanase produced by *Melanocoprus albomyces* II S- 68 in solid-state fermentation. *Bioresource Technol.* 64, 225-228.
52. Kalogeris E., Christakopoulos P., Kekos D., Macris B.J. (1999). Studies on the solid- production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*, characterization of two enzymes. *J. Biotechnol.* 60, 155-163.
53. Saul D.G., Williams L.C., Reeves R.A., Gibbs M.D., Bergquist P.L. (1995). Sequence and expression of a xylanase gene from hyperthermophile *Thermotoga* sp. strain FJ SS3-B1 and characterization of the recombinant enzyme and its activity on kraft pulp. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4110-4113.
54. Hongpattarakere T. (2002). Hyperthermostable cellulolytic enzymes and their biotechnological application. *J. Sci. Technol.* 24, (3), 481-491.
55. Derewenda U., Swensen L., Green R., Wei Y.Y., Morosoli R., Shareck F., Klupefel D., Derwenda Z.S. (1994). Grystal structure at 2.6 angstrom resolution of the *Streptomyces lividance* xylanase A, a member of the F family of beta-1-4 D-glucanases. *J. Biol. Chem.* 269, 20811-20814.
56. Barakat A. (2007). Etude de la lignification de parois végétales de graminées par assemblages modèles: Réactivité, organisation et structure supramoléculaire. Thèse de doctorat. Université de Reims. p.p. 220.
57. Baquey C., Chauveaux D., Poustis J. (1992). La cellulose: un vieux matériau pour le développement de biomatériaux innovants. *Science Technique Technologie.* 20, 3-28.
58. Beguin P., Cornet P., Miller J. (1983). Identification of the endoglucanase encoded by the cell B gene of *Clostridium thermocellum*. *Biochimie.* 65, 495-500.

59. Kolpak F.J. et Blackwell J. (1976). Determination of the structure of cellulose II. *Macromolecules*. 9, 273–278.
60. Chamier A.C. et Dixon P.A. (1982). Pectines in leaf degradation by aquatic Hyphomycetes. *J. Microbiol.* 128, 2469-2483.
61. Albersheim P. et Killias U. (1962). Studies relating to the purification and properties of pectin transeliminins. *Archives of biochemistry and biophysics* .97, 107-115.
62. Bonnin E., Renard C., Thibault J.F., Ducro P. (1997). Les enzymes de dégradation des parois végétales : Mode d'action et utilisations alimentaire. Dans *Enzymes en agroalimentaire. Larrata- Garde.V. Tech and documentation.* Lavoisier. 168-200.
63. Thibault J.F. et Petit R. (1979). Les substances pectiques: Généralités et domaine d'application dans les industries alimentaires. *Industries Alimentaires et Agricoles*.12, 1231-1240.
64. Baron A. et Thibault J.F. (1985). Les enzymes pectolytiques dans : hydrolases et dépolymérasés, enzymes d'intérêt industriel. *A. Moranche, C. Costes. eds. Gauthier-Villars.* Paris. 143-164.
65. Beguin P. et Aubert J.P. (1992). La dégradation de la cellulose par les microorganismes. *Annales de l'institut Pasteur/Actualités*. 3, 91-115.
66. Harvey I. (1999). Sélection de tests discriminants pour l'identification rapide des *Actinomycètes* thermophiles impliqués dans l'alvéolite allergique extrinsèque. Université de Laval. p.p.127
67. Kitouni M. (2007). Isolement de bactéries Actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de doctorat. Université Mentouri Constantine. p.p.205.
68. Lacey J. (1997). *Actinomycètes* in composts. *Ann. Agric. Environ. Med.* 4, 113-121.
69. Lachevalier M.P., De Bievre C., Lachevalier H.A. (1977). Chemotaxonomy of aerobic *Actinomycètes*: Phospholipid Composition. *Bioch. Syst. Ecol.* 5, 249-260.
70. Taibi Z. (1999). Isolment et caractérisation d'une activite polygalacturonase chez cinq souches locales de champignons. Thèse de Magister. Université Badji Mokhtar. Annaba. p.p.103.

71. Fontly G. et Forano E. (1999). Ecologie de la dégradation et de la fermentation des polyholosides constitutifs des parois végétales dans la rumeur. *Cahiers d'agricultures*. 21-35.
72. Kulkarni N., Shendye A., Rao M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 411-456.
73. Sukhkhum S., Tamura T., Tokuyama S., Kitpreechavanich V. Production and characterization of PLA-degrading enzyme produced by a novel *Actinomadura atrahebacea* sp. Nov.
74. Goodfellow M. et Williams S.T. (1983). Ecology of Actinomycètes. *Ann. Rev. Microbiol.* 37, 189-216.
75. Tremblay L., Archibald F. (1993). Production of a cloned xylanase in *Bacillus cereus* and its performance in kraft pulp prebleaching. *Revue canadienne de microbiologie*.
76. Aspect génétique de la production des xylanases (page consultée le 28 Avril 2013) [en ligne] Adresse URL : <http://www.sumobrain.com/>
77. Stabilisation des xylanases génétiquement modifiée (page consultée le 06 avril 2013) [en ligne] Adresse URL : <http://www.iaf.inrs.ca/iaf/>
78. Ali M. et Sreekrishnan T.R. (2001). Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents. *a review, Adv. Environ. Res.* 5, 175-196.
79. Viikari L., Ranua M., Kantelinen A., Sundquist J., Linko M. (1986). Bleaching with enzymes, proceeding of the 3rd international conference on biotechnology pulp and paper industry. *Stockholm. Sweden.* 67-69.
80. Application industrielle des xylanases dans l'alimentation animale et ensilage (page consultée le 15 mars 2014) [en ligne] Adresse URL : <http://www.belgobiotech.be/code/page48>
81. Application industrielle des xylanases dans panification (page consultée le 18 mars 2014) [en ligne] Adresse URL : <http://www.nakamura.bio.titech.ac.jp/xyn/xyn.html>
82. Matsumura D., Sakiyama K., Toshima K. (1999). Preparation of octyl β -D-xylobioside and xyloside by xylanase-catalyzed direct transglycosylation reaction of xylan and octanol. *Biotechnol. Lett.* 21, 17-22.
83. Kaeltzow D. et Urfer A. (1984). Preparation and properties of pure alkyl glucosides, maltosides and maltotriosides. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 61, 1651-1655.

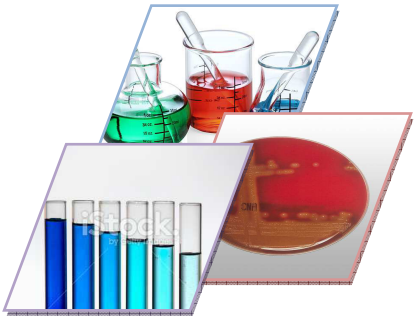
84. Ghanam M. (2009). Production des pectinases chez des microorganismes : mise en évidence d'une activité pectate lyase thermostable chez une souche d'Actinomycète thermophile isolée du compost de poulet. Thèse de Magister. Université Badji Mokhtar. Annaba. p.p 146.
85. Shirling, E.B. et Gottlieb D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacterio.* 116, 313–340.
86. Shirling E.B. et Gottlieb D. (1969). Cooperative description of typecultures of *Streptomyces*. IV. Species descriptions from the second, third and fourth studies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 19, 391-512.
87. Kazuo M., Ai O., Akio T., Kouzou H., Makiko K., Toshikatsu O. (2004). Low-molecular-weight pectate lyase from *Streptomyces thermocarboxydus*. *Journal of Applied Glycoscience.* 51, 1-7.
88. Kim B., AlTai A.M., Kim S.B., Somasundaram P., Goodfellow M. (2000). *Streptomyces thermocoprophilus* sp.nov, a cellulase-free endoxylanase-producing streptomycete. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 505– 509.
89. Liao C. H. (1989). Analysis of pectate lyases produced by soft rot bacteria associated with spoilage of vegetables. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1677-1683.
90. Nommori T., Watanabe T., Shinke R., Kawamura Y. (1990). Purification and properties of thermstable xylanase and β -xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain. *J. Bacteriol. Biotechnol.* 879-881.
91. Sazci A., Radford A., Erenler K. (1986). Detection of cellulolytic fungi by using Congo red as an indicator: a comparative study with the dinitrosalicylic acid reagent method. *Journal of Applied Bacteriology.* 559-562.
92. Ronald M. et Peter J. (1981). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the Bovine Rumen. *Applied and environmental microbiology.* 777-780.
93. Ninawe S. et Kuhad R.C. (2005). Use of xylan-rich cost effective agro-residues in the production of xylanase by *Streptomyces cyaneus* SN32. *Journal of applied microbiology.* 1141-1148.
94. Nelson N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153, 375-380.
95. Somogyi M. (1945). A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* 160, 61-73.

96. Collmer A., Ried J.L., Mount M.S. (1988). Assay methods for pectic enzymes. *Methods in Enzymology*. 161, 329-335.
97. Wood T.M. et Bhat K.M. (1988). Methods for measuring cellulase activities. *Methods in enzymology. International Union of pure and Applied Chemistry*. 87-100.
98. Bradford M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 92, 248-254.
99. Laemmli U.K. et Favre M. (1973). Maturation of the head of bacteriophage T4.I.DNA packaging events. *J. Mol. Biol.* 80, 575-599.
100. Vernin G. (1970). La chromatographie en couche mince. Techniques et applications en chimie organique. *Ed. Dunod*. 178.
101. Suchita N., Rup L., Kuhad R.C. (2006). Isolation of Three Xylanase-Producing Strains of *Actinomycetes* and Their Identification Using Molecular Methods. *Current microbiology*. 53, 178–182.
102. Morosoli R., Bertrand J.L., Mondou F., Shareck F., Kluepfel D. (1986). Purification and properties of a xylanase from *Streptomyces lividans*. *J. Biochem.* 239, 587-592.
103. Stutzenberger F.J. et Bodinel A.B. (1992). Xylanase production by *Thermomonospora curvata*. *Journal of Applied Bacteriology*. 72, 504-511.
104. Alberto R.A., Fernandez-Abalos J. M., Sanchez P., Garda A.L., Ramon I.S.A. (1995). Purification and Biochemical Characterization of a Xylanase (Xys1) from *Streptomyces halstedii* JM8. *Applied and Environmental Microbiology*. 2414-2419.
105. Boucherba N., Benallaoua S., Copinet E., Hebal., Francis D. (2011). Production and partial characterization of xylanase produced by *Jonesia denitrificans* isolated in Algerian soil. *Process Biochemistry*. 46, 519-525.
106. Chavez R., Bull P., Ey Zaguirre J. (2006). The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *J. Biotechnol.* 1, 64-66.
107. Choudhury B., Chauhan S., Singh S.N., Ghosh P. (2006). Production of xylanase of *Bacillus coagulans* and its bleaching potential. *World. J. Microb. Biotech.* 22, 283-8.

108. Wang S.L., Yen Y.H., Shin I.L., Chang A.C., Chang W.T., Wu W.C. (2003). Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. *Enzyme Microb. Technol.* 33, 917-25.
109. Techapun C., Charoenrat T., Poosaran N., Watanabe M., Sasaki K. (2002). Thermostable and alkaline-tolerant cellulase-free xylanase produced by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106. *J. Biosci. Bioeng.* 93, 431-3.
110. Beg Q.K., Bhushan B., Kapoor M., Hoondal G.S. (2000). Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces* sp. QG-11-3 and its application in biobleaching of eucalyptus Kraft pulp. *Enzyme Microb. Technol.* 27, 459-66.
111. Muthezhilan R., Ashok R., Jayalakshmi. (2007). Production and optimisation of thermostable alkaline xylanase by *Penicillium oxalicum* in solid state fermentation. *African J. of Microbial. Research.* 20-28.
112. Bindu B., Jitender S., Saurabh S.D., Ramesh C.K. (2007). Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. *Enzyme and Microbial. Technology.* 41,733-739.
113. Gaspar A., Cosson T., Roques C., Thonart P. (1997). Study on the production of a xylanolytic complex from *Penicillium canescens* 10-10c. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 67, 45-58.
114. Bakri Y., Jacques P., Thonart P. (2003). Xylanase production by *Penicillium canescens* 10-10c in solid state fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 108, 737-748.
115. Schlochtermeyer A., Niemeyer F., Schrempf Hi. (1992). Biochemical and Electron Microscopic Studies of the *Streptomyces reticuli* Cellulase (Avicelase) in Its Mycelium-Associated and Extracellular Forms. *Applied and Environmental Microbiology.* 3240-3248.
116. Nascimento R.P., Coelho R.R.R., Marques S., Alves L., G'irio F.M., Bon E.P.S., Amaral-Collaco M.T. (2002). Production and partial characterisation of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme and Microbial Technology.* 31, 549-555.
117. Topakas E., Katapodis P., Kekos P., Macris B.J., Christakopoulos P. (2003). Production and partial characterization of xylanase by *Sporotrichum thermophile* under solid-state fermentation. *World. J. Microbial. Biotechnol.* 19, 195-198.

118. Gomes J., Purkarthofer H., Hyn M., Kapplmüller J., Sinner M., Steiner W. (1993). Production of a high level of cellulase-free xylanase by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* in laboratory and pilot scale using lignocellulosic materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39, 700-707.
119. Haltrich D. (1997). Production of fungal xylanases. *Bioresour. Technol.* 58, 137-161.
120. Aygan A. et Arıkan B. (2009). Production and characterization of multifunctional endoxylanase by *Bacillus* sp. X13. *Turk J Biol.* 33, 231-237.
121. Tuncer M., Kuru A., Isikli M., Sahin N., Celenk F.G. (2004). Optimization of extracellular endoxylanase, endoglucanase and peroxidase production by *Streptomyces* sp. F2621 isolated in Turkey. *Journal of Applied Microbiology.* 97, 783-791.
122. Xiuting L., Yuanli S., Baoguo S., Huanlu S., Yunping Z., Yuegang L., Hongxia S. (2010). Purification and characterization of a cellulase-free, thermostable xylanase from *Streptomyces rameus* L2001 and its biobleaching effect on wheat straw pulp. *Biochemical Engineering Journal.* 52, 71-78.
123. Assamoi A.A., Delvigne F., Aldric J.M., Destain J., Thonart P. (2008). Improvement of xylanase production by *Penicillium canescens* 10-10c in solid-state fermentation. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12, (2), 111-118.
124. Meryandini A., Hendarwin T., Fahrurrozi, Akhdiya A., Saprudin D., Lestari Y. (2009). Characterization and Purification a Specific Xylanase Showing Arabinofuranosidase Activity from *Streptomyces* sp. 234P-16. *Biodiversitas.* 9, (3), 115-119
125. Won J.C., Ju H.L., Da Y.P., Jae S.P., Soon K.H. (2013). Production and characterization of a thermostable endo-type xylanase produced by a newly-isolated *Streptomyces thermocarboxydus* subspecies MW8 strain from Jeju Island. *Process Biochemistry.* 48, 1736-1743.
126. Chi W.J., Park D.Y., Chang Y.K., Hong S.K. (2012). A novel alkaliphilic xylanase from the newly isolated mesophilic *Bacillus* sp. MX47: Production, purification and characterization. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168, 899-909.
127. Mc Phillips K., Waters D.M., Parlet C., Walsh D.J., Arendt E.K., Murray P.G. (2014). Purification and Characterization of a β -1,4-Xylanase from *Remersonia thermophila* CBS 540.69 and Its Application in Bread Making. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172,1747-1762.

128. Warin D., Yuichi N., Naoki H., Tatsuji S., Wasana S. (2011). Purification, characterization and gene cloning of two forms of a thermostable endo-xylanase from *Streptomyces* sp. SWU10. *Process Biochemistry*. 46, 2255-2262.
129. Avcioglu B., Eyupoglu B., Bakir U. (2005). Production and characterization of xylanases of a *Bacillus* strain isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 21, 65-68.
130. Dharmesh N., Adhyaru., Nikhil S., Bhatt., Modi H.A. (2014). Enhanced production of cellulase-free, thermo-alkali-solvent-stable xylanase from *Bacillus altitudinis* DHN8, its characterization and application in sorghum straw saccharification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 3, 182-190.
131. Georis J., Giannotta F., Lamotte-Brasseur J., Devreese B., Van Beeumen J., Granier B., Frere J.M. (1999). Sequence, over production and purification of the family 11 endo-beta-1,4-xylanase encoded by the xyl1 gene of *Streptomyces* sp. S38. *Gene*. 237, 123-133.
132. Sukhumsirichart W., Deesukon W., Kawakami T., Matsumoto S., Seesom W., Sakamoto T. (2014). Expression and Characterization of Recombinant GH11 Xylanase from Thermotolerant *Streptomyces* sp. SWU10. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172, 436-446.
133. Burhan A., Nisa U., Gokhan C. (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process. Biochem.* 38, 1397-1403.
134. Khandeparkar R. et Bhosle N.B. Purification and characterization of thermoalkalophilic xylanase isolated from the *Enterobacter* sp MTCC 5112. *National Institute of Oceanography*.
135. Driss D., Bhiri F., Siela M., Ghorbel R., Chaabouni S.E. (2012). Purification and Properties of a Thermostable Xylanase GH 11 from *Penicillium occitanis* Pol6. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168, 851-863.



Annexes

ANNEXE I

I-MILIEUX DE CULTURE**I-1 Composition de milieu utilisé pour la conservation de la souche d'Actinomycète thermophile CPt29**

Ce milieu est préconisé par Shirling et Gottlieb de *l'International Streptomyces Project* ou *ISP* (Shirling E.B et Gottlieb D).

La composition de milieu ISP2 est :

- Extrait de levure.....4g
- Extrait de malt10g
- Glucose4g
- H₂O distillée.....1000ml

I-2 Composition de milieu utilisé pour l'activation de la souche d'Actinomycète thermophile CPt29

La composition de milieu CM est :

- Extrait de levure.....4g
- Extrait de malt10g
- Glucose5g
- H₂O distillée.....1000ml

I-3 Milieu solide à base de xylane pour la production des xylanases

Ce milieu est le milieu Nammori solide à base de xylane de composition :

- Extrait de levure.....1g
- KH₂PO₄.....4g
- NaCl.....2g
- MgSO₄(7 H₂O)1g

- MnSO_40.05g
- $\text{FeSO}_4 (7 \text{ H}_2\text{O})$ 0.05g
- CaCl_22g
- NH_4Cl2g
- H_2O distillée.....1000ml

I-4 Milieu de culture liquide à base de son de blé pour la production des xylanases

Le milieu de culture utilisé est très riche en xylane, ce milieu est celui de Horikoshi de composition (35):

- Peptone5g
- Extrait de levure.....5g
- KH_2PO_41g
- $\text{MgSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$0.1g
- Son de blé.....20g
- H_2O q.s.p.....1000ml

Tous les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage pendant 20 minutes à 121°C.

ANNEXE II

II-PREPARATION DES REACTIFS

II-1 Préparation des réactifs de Nelson-Somogyi

Réactif de Somogyi : Le réactif de Somogyi est préparé à partir de deux solution (A) et (B) :

Solution A : dans une fiole jaugée de 1 litre, on dissout :

- Carbonate de Na anhydre (NaCO_3).....25g
- Tartrate double de sodium et potassium25g
- Carbonate acide de Na anhydre (NaHCO_3).....20g
- Sulfate de Na anhydre (Na_2SO_4)200g
- H_2O q.s.p1000ml

Solution B :

On dissout 15g de CuSO_4 dans 100ml d'eau distillée, puis on ajoute 1à 2 gouttes d'acide sulfurique concentré.

Le réactif Somogyi est obtenue en additionnant extemporanément 25 parties de la solution (A) et une partie de la solution (B). La solution finale de coloration bleue est gardée pendant 48h à 37°C puis filtrée et conservée à l'abri de la lumière.

Réactif de Nelson :

25g de molybdate d'ammonium H_2O sont dissouts à chaud dans 400ml d'eau distillée. Après refroidissement, on ajoute 25ml d' H_2SO_4 concentré et 3g d'arséniate de Na- $7\text{H}_2\text{O}$ dissouts dans 25ml d'eau distillée. L'ensemble est décanté pendant un temps de 48h à 37°C. La solution finale est filtrée et conservée à l'abri de la lumière.

Le réactif de Nelson doit avoir une coloration jaune dorée. Si avec le temps la coloration devient verdâtre. On peut ajouter quelques gouttes d'une solution de permanganate de potassium (KMnO_4) à 0.05N jusqu'à l'obtention de la couleur initiale.

II-2 Détermination des activités enzymatiques :

La détermination de l'activité enzymatique de la souche CPt29 se fait en vitesse initial de la réaction. Pour cela, on réalise une cinétique enzymatique pour cette souche.

II-2-1 Cinétique de dépolymérisation du xylane :

La cinétique enzymatique a été établie en incubant à 70°C, 0.5ml de l'extrait enzymatique brut sur 1.5 ml de Xylane à 0.5% dans le tampon phosphate de sodium à 0.05M de pH 7 à différents temps d'incubation : 30mn, 2 heures, 4 heures et 24 heures. A chaque prélèvement, la réaction est bloquée en la chauffant à 100°C pendant 30 minutes. L'activité enzymatique est ensuite mesurée par le test de Nelson-somogyi à une longueur d'onde de 650nm contre un blanc contenant l'eau distillée traité dans les mêmes conditions.

II-3 Réalisation de la gamme d'étalonnage du xylose pour le dosage des sucres réducteurs :

A partir d'une solution mère contenant 0,25g de xylose dans un litre d'eau distillée, on réalise une gamme d'étalonnage allant de 0 à 250µg (Tab. a).

La mesure du pouvoir réducteur par la méthode de Nelson-somogyi à 650nm a été effectuée sur 0.25ml de chaque dilution.

Tab. a : Gamme d'étalonnage du xylose.

	SM	D_{1/2}	D_{1/4}	D_{1/8}	D_{1/16}	D_{1/32}	B
Solution de xylose en ml	1	0.5	0.25	0.125	0.062	0.031	0
H₂O distillée	0	0.5	0.750	0.875	0.937	0.968	1
Concentration du xylose en mg/ml	0.25	0.125	0.0625	0.0312	0.0156	0.0078	0

II-4 Préparation du réactif de Bradford :

Dans une fiole jaugée de 1 litre, on dissout :

- Bleu de Comassie G250.....100mg
- Ethanol 95%50ml

Agitation pendant 2 heures puis, on ajoute :

- Acide orthophosphorique.....100ml
- H₂O distillée q.s.p.....1000ml

II-4-1 Réalisation de la gamme d'étalonnage du sérum albumine bovine (SAB) :

A partir d'une solution mère contenant 0.1 mg/ml de sérum albumine bovine (SAB), une série de dilution décimale est réalisée (Tab. b).

Tab. b : Gamme d'étalonnage du sérum albumine bovine (SAB).

Tubes	1	2	3	4	5	6
SAB (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

ANNEXE III

III- TAMPONS ET SOLUTIONS

- ❖ Tampon phosphate de sodium 50Mn pH7
- ❖ Tampon phosphate de sodium 20Mn pH7
- ❖ Tampon glycine-HCl 50 mM pH : 2.5, 3 et 3.5.
- ❖ Tampon acétate 50 mM pH : 4, 4.5 et 5.
- ❖ Tampon phosphate potassique 50 mM pH : 5.5, 6, 6.5, 7 et 8
- ❖ Tampon glycine-NaOH 50 mM pH : 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5 et 11.
- ❖ Solution NaCL 1M
- ❖ Solution NaCL 0.5M
- ❖ Solution de Rouge Congo : 0,05 % dans l'eau
- ❖ Solution de xylane 0.5% dans le Tampon phosphate de sodium 50Mn pH7

❖ **Solution : Acrylamide – Bisacrylamide :**

- Acrylamide 30g
- Bisacrylamide 0.8g
- H₂O q.s.p 100ml

Filtrer et stocker à 4°C à l'abri de la lumière.

❖ **Solution : tampon gel de séparation : Tris HCl 1.5M, pH = 8.8**

- Tris base 36.3g
- HCl 1N 48ml
- H₂O q.s.p 100ml

Filtrer et stocker à 4°C.

❖ **Solution : tampon gel de concentration : Tris HCl 1.5M, pH = 6.8**

- Tris base 6g
- HCl 1N 48ml

– H2O q.s.p 100ml

Filtrer et stocker à 4°C.

❖ **Solution : tampon de migration :** (Tris 0.25M, Glycine 1.92M, pH=8.3) *5

– Tris base 15.1g

– Glycine 72g

_ SDS 0.1%.....5g

– H2O q.s.p 1000ml

Conservation à 4°C.

❖ **Solution de persulfate d’ammonium :**

Dissoudre 10g de persulfate dans 100ml d’eau distillée. Cette solution doit se préparer juste au moment de l’emploi.

❖ **Solution : tampon de lyse (tampon d’échantillon) :**

– Tris base (0.5M) pH6.8..... 2.13ml

– SDS 1g

– Glycérol 10 %..... 5ml

– Bleu de bromophénol 20mg

– β mércaptoéthanol 2.56ml

– H2O q.s.p..... 10m

❖ **Solution de coloration :**

-Acide acétique..... 10ml

-Ethanol absolue.....45ml

-H2O 45ml

-BBC (G250).....0.25g

❖ **Solution de décoloration :**

-Acide acétique..... 10ml

-Ethanol absolue.....45ml

-H2O 45ml

ANNEXE IV

IV PREPARATION DES GELS

IV-1 Préparation de la colonne de gel filtration :

Cette chromatographie a été réalisée sur colonne (69 x 1,5cm) de séphadex G75. Le support a un domaine de fractionnement de 4000-100000. 9,4g de ce gel qui se présente sous forme de poudre sont mis à gonfler pendant 24h heures dans 160ml de tampon phosphate 0,05 M à pH 7 à 4° C puis à dégazer pour éliminer les bulles d'air. Une fois préparé, le gel est coulé délicatement sur la paroi de la colonne puis est lavé avec 360 ml avec le même tampon pour équilibrer la colonne.

IV-2 Préparation et migration du gel pour l'électrophorèse PAGE SDS

Tab. a: Composition du gel de polyacrylamide 12%.

Composition du gel polyacrylamide (12%)		
Composants	Gel de séparation	Gel de concentration
H ₂ O SDS	3.3 ml	3.4ml
1.5M Tris-HCl pH 8.3 SDS	2.5 ml	830µl
30% Acrylamide	4 ml	630 µl
10% APS	100 µl	50 µl
SDS	100 µl	50 µl
TEMED	15 µl	10 µl
VOLUME TOTAL	10 l	5Ml

-Couler le gel de séparation entre les deux plaques de verre immédiatement après l'ajout de l'APS et le TEMED.

- Ajouter de l'éthanol à la surface du gel puis le laisser polymériser durant 30 minutes.

-Ajouter le gel de concentration, après avoir éliminé l'éthanol grâce à un buvardage d'un papier absorbant, ajuster le peigne et laisser polymériser.

-Démouler le peigne quand le gel est polymérisé et fixer l'ensemble à l'appareil.

-Déposer les échantillons de protéines après ajout de bleu dénaturant (1/10 du volume) et dénaturation pendant 3 min à 100°C.

-Il faut de plus s'assurer que toutes les protéines aient le même point de départ pour la migration, c'est pourquoi nous avons démarré la migration dans un gel de concentration.

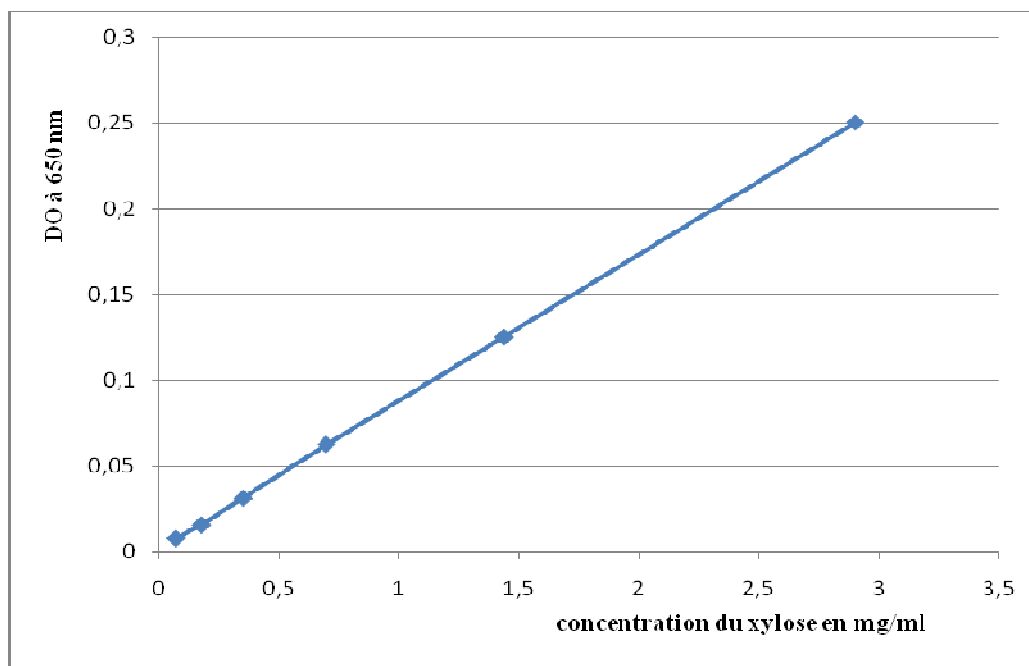
-La migration est assurée dans le tampon Tris (25mM)-glycine (192mM) contenant 0.1% SDS à ampérage constant (entre 30 et 50 mA) et arrêter exactement quand le "bleu de bromophénol" atteint le bas du gel.

-La révélation est effectuée par deux méthodes :

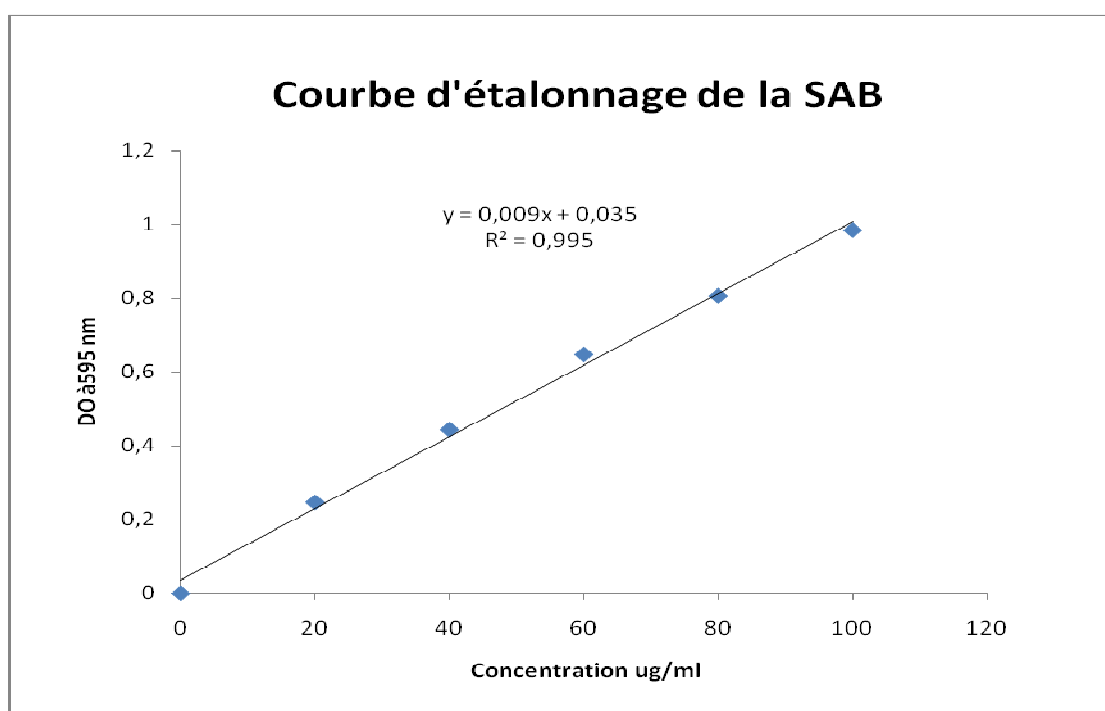
- Imprégnation pendant une nuit dans une solution du colorant constituée de bleu de Coomassie 0.25% dans un mélange éthanol-eau-acide acétique glacial. La décoloration est réalisée dans un solvant composé de : éthanol-eau-acide acétique jusqu'à décoloration complète du gel, les bandes correspondants aux protéines restent colorées en bleu.
- Ou par imprégnation dans une solution de nitrate d'argent à 0.1% pendant 30 minute puis rinçage avec l'eau distillée ensuite développé avec une solution de 3% de Na_2CO_3 contenant 0.02% de formaldéhyde enfin stopper avec 1% d'acide acétique et lavage avec l'eau distillée.

ANNEXE V

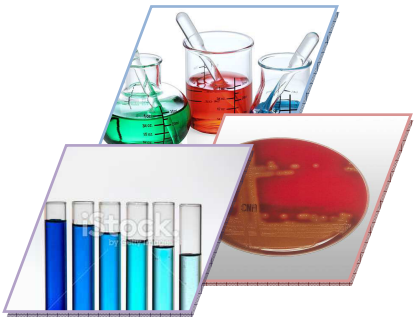
V- COURBES D'ETALONNAGES



Courbe d'étalonnage du xylose - Relation entre l'absorbance mesuré à 650nm et la concentration en xylose 0,25g/l



Courbe d'étalonnage de la SAB – relation entre l'absorbance mesurée à 595nm et la concentration en protéines en $\mu\text{g} / \text{ml}$.



Publication

Optimization of Xylanase Production by a Newly Thermophilic Actinomycete Strain Cpt29 Isolated from Poultry Compost

Soumaya Haberra

*Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology, Faculty of Sciences
Badji Mokhtar Annaba University. P.O. Box 12, 23000, Annaba, Algeria
E-mail: soumaya.haberra@yahoo.fr
Tel: +213 661455697; Fax: +213 38 87 53 99*

Amina Habbeche

*Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology, Faculty of Sciences
Badji Mokhtar Annaba University, P.O. Box 12, 23000, Annaba, Algeria*

Boudjemaa Saoudi

*Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology, Faculty of Sciences
Badji Mokhtar Annaba University, P.O. Box 12, 23000, Annaba, Algeria*

Bilal Kerouaz

*Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology, Faculty of Sciences
Badji Mokhtar Annaba University, P.O. Box 12, 23000, Annaba, Algeria*

Soraya Slimani

*Laboratory of Plant Biology and Environment, Faculty of Sciences
Badji Mokhtar Annaba University, P.O. Box 12, 23000, Annaba, Algeria*

Mokhtar Boudelaa

*Laboratory of Plant Biology and Environment, Faculty of Sciences
Badji Mokhtar Annaba University. P.O. Box 12, 23000, Annaba, Algeria*

Ali Ladjama

*Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology, Faculty of Sciences
Badji Mokhtar Annaba University. P.O. Box 12, 23000, Annaba, Algeria
E-mail: Ladjama_a@yahoo.fr*

Abstract

From 3 strains isolated from poultry compost (East of Algeria), one strain of thermophilic *Actinomycete* was screened and studied for their ability to producing thermostable xylanase based on the diameter of the clear zone formation in birchwood xylan agar plates. This strain was identified as an *Actinomadura* sp Cpt29, than optimized for xylanase enzyme production in liquid state fermentation. Consequently, for commercial applications, it is advisable to develop processes starting from inexpensive substrates. The presence of wheat bran as a carbon source in the medium induced the highest production of xylanase (30.31IU/ml). This result is particularly valuable because the other substrates are more expensive. Among all the organic and inorganic sources of nitrogen tested in the study, peptone was found to be the best in stimulating xylanase production by this strain.

Optimum pH and temperature for xylanase production were found to be 8.5 and 45°C respectively after 24H of incubation. After optimization of various production parameters, an increase of nearly 2-fold in xylanase production was achieved.

Thus the present study proved that the thermophilic Actinomycete strain *Actinomadura* sp Cpt29 used is highly potential and useful for industrial production.

Keywords: Xylanases; Thermostable; Thermophilic Actinomycetes; Optimization; Compost.

1. Introduction

Xylan is one of the major polymeric constituents of hemicelluloses in plant cell walls, and is the second most prevalent biomass after cellulose in nature (Polizeli et al., 2005). It is a heteropolysaccharide with a linear backbone chain of 1,4-linked β -D-xylopyranose units. The xylan from hardwoods, softwoods, and grasses is a heterogeneous polysaccharide that can be substituted by various residues of *o*-acetyl, arabinosyl, and methylglucuronosyl (Wong et al., 1988). In nature, the complete hydrolysis of xylan requires the synergistic action of different xylanolytic enzymes, including endoxylanase, β -xylosidase, and accessory enzymes, such as α -arabinofuranosidase, acetyl esterase, and α -glucuronidase. Among these, endo- β -1,4-xylanase (β -1,4-D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.8) is particularly important to catalyze the hydrolysis of long-chain xylan into short xylooligosaccharides, which are further hydrolyzed to D-xylose by β -1,4-xylosidases (β -D-xyloside xylohydrolase; EC 3.2.1.37) (Collins et al., 2005 ; Terrasan et al., 2010).

The sequences of several xylanases have been studied and their catalytic domains appear to have originated from two separate progenitor sequences. The latter allowed for the grouping of xylanases into two major families of glycosyl hydrolases, namely family 10 (formerly family F) and family 11 (formerly family G) (Henrissat, 1991). Family 10 has a high molecular mass (>30 kDa) and low isoelectric point (pI) whereas family 11 has a low molecular mass (<30 kDa) and high pI.

So far, several xylanases have been isolated from different microorganisms, including bacteria (actinomycetes, eubacteria and archaea), fungi, and yeasts (Sunna et al., 1997; Liu et al., 2011). Various Xylan-degrading thermotolerant actinomycetes, such as *Actinomadura* (Sriyapai et al., 2011; Ethier et al., 1994), *Nonomuraea* (Leskinen et al., 2005), *Microtetraspora* (Berens et al., 1996), *Streptomyces* (Zhou et al., 2010; Ninawe et al., 2008) and *Thermomonospora* (George et al., 2001; Blanco et al., 1997) have been purified and characterized. Recent research seem, however, to have paid special attention to xylanases from microbial origins particularly because of the promising potential they offer for a wide range of applications and processes in the food, animal feed, textile, paper and pulp industries (Beg et al., 2001; Guerfali et al., 2010). In fact, in order for a xylanase to achieve actual industrial application, it should ideally fulfill a number of specific requirements that are highly desired in the marketplace. Some of these are characteristics that pertain to operational standards, such as alkaline pH, high thermostability, high specific activity, and strong resistance to metal cations and chemicals. Other specifications relate to cost effectiveness, eco-friendliness, and ease of use.

Despite the large flow of data on xylanases, however, only few reports have so far dealt with the isolation of xylanases from *Actinomadura*. Only few studies have, for instance, reported on the purification and characterization of xylanases from *Actinomadura* sp. (Taibi et al., 2012, Sriyapai et al., 2011; Ethier et al., 1994). This is, in fact, particularly due to the relatively poor levels of stability and catalytic activity obtained with the xylanases so far investigated with regards to the specific conditions they are required to fulfill to gain admission for industrial applications, namely elevated temperature and pH alkalinity values.

In view of the scant information available on xylanolytically active *Actinomadura* strains from natural habitats and considering the new promising opportunities that the discovery and characterization of such biocatalysts might bring for the current industrial systems and processes. This

preliminary research aims for optimization of xylanase production from a thermophilic actinomycete strain witch isolated from chicken compost at our laboratory. The enzyme can be to explore in potential as a biobleaching agent.

2. Materials and Methods

2.1. Substrates and Chemicals

Unless specified, all substrates and chemicals were of analytical grade and purchased from Sigma-Aldrich.

2.2. Screening of Thermophilic Xylanase-Producing *Actinomycetes*

In order to search thermostable xylanolytic activities, we have chosen as a sample, the poultry compost collected from a site located in the region of Annaba (East of Algeria).

2.2.1. Qualitative Test

The thermophilic isolates of *Actinomycetes* were tested for their capabilities to produce xylanase by growing them on Nammori solid medium (Nanmori et al.,1990) containing : birchwood xylan [1% weight per volume], yeast extract (0,1% w/v), KH_2PO_4 (0,4% w/v), NaCl (0,2 w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 w/v), MnSO_4 (0.005 w/v), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.005 w/v), CaCl_2 (0,2 w/v), NH_4Cl 0,2 (w/v), Agar (1,5% w/v) at 45°C for 48 hours. The plates were then stained with Congo red solution composed of 0.5% (w/v) Congo red and 5% (v/v) ethanol in distilled water for 15 minutes and destained with 1M NaCl. The xylanase producing micro-organisms were selected by observing yellow zones around the colonies against the red background (Ninawe et al., 2006).

2.2.2. Quantitative Test

The xylanase-positive isolates were further evaluated for xylanase production by growing in modified ISP₂ liquid medium containing birchwood xylan [0.4% weight per volume (w/v)], malt extract (1.0% w/v), yeast extract (0.4% w/v), (pH 7.0) at 45°C for 168 hours under shaking conditions (200 rpm). After required incubation, the fermented broth was centrifuged at 10 000 ×g for 15min than filtered to obtain cell-free crude enzyme extract.

2.2.3. Selected Strain

The strain selected in this work is *Actinomadura* sp Cpt29 witch isolated and identified in our laboratory (Habbeche et al., 2013)

2.3. Xylanase Activity Assays

Xylanase activity was determined by measuring the release of reducing sugars from birchwood xylan as given by Nelson-Somogyi method (Nelson, 1994; Somogy, 1945) using xylose as a standard. One unit of xylanase was defined as amount of enzyme required to release 1μmol of xylose in 1 min under the assay conditions.

2.4. Optimization of Cultural Conditions

Production of xylanolytic enzymes is dependent upon various parameters like pH, temperature, time of incubation, carbon, nitrogen and phosphate source and the additive salts to the medium.

The production of xylanase by *Actinomadura* sp Cpt29 using optimized medium has been enhanced through optimization of different parameters. The optimization of composition of medium and cultural conditions of the select strain was carried out based on stepwise modification of the governing parameters for xylanase production in Horikoshi liquid medium (Shirling and Gottlieb,

1996) containing wheat bran [2% weight per volume (w/v)], peptone (0.5% w/v), yeast extract (0.5% w/v), KH_2PO_4 (0.1% w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.01% w/v); (pH 7.0).

The effect of pH was observed by changing the pH from 5,5 to 11 in the production medium. The effect of cultivation temperature on the enzyme production was examined at different temperature starting from 40 to 55°C with 5°C intervals. The effect of incubation period was evaluated by 24 h interval by checking the enzyme activity. The effect of supplementation of additional carbon sources to wheat bran was examined using glucose, galactose, lactose, xylose, starch at a concentration of 0,5%, wheat bran (2%), Peanut shells (2%) and Oat spelt (1%).

The effect of different concentration of wheat bran on xylanase production was tested at a range of concentration from 0, 5 to 4 (g/100ml) with 0, 5 intervals. Different nitrogen sources (0,075g N-equivalent per 50ml of medium) like were peptone, urea, yeast extract, meat extract, ammonium sulphate, ammonium nitrate, Potassium nitrate, sodium nitrite, sodium nitrate, calcium nitrate and ammonium chloride were also tried. The optimization of additive salts was carried out by adding of different salts at a concentration of 0.05g/50ml: Potassium chloride, Calcium chloride, Magnesium sulphate, Copper chloride, Barium chloride, Ferric chloride, sodium chloride, Manganese sulphate. Different phosphate sources (1, 0 %w/v) like KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 were studied for their effect on xylanase production.

2.5. Thin Layer Chromatography of Xylan Degradation Products

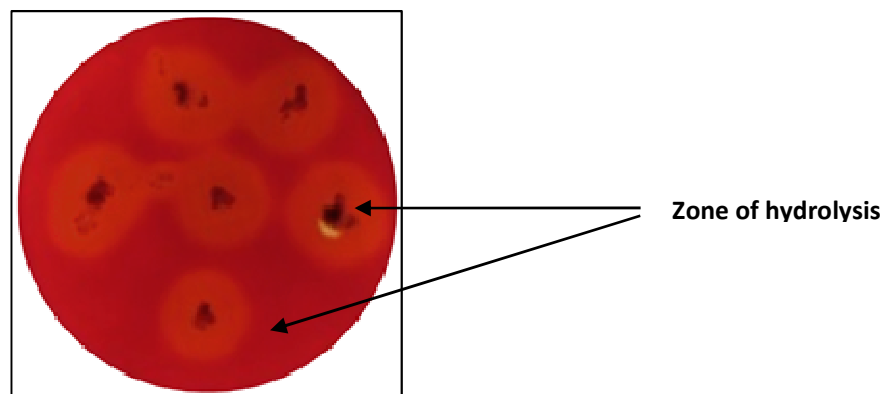
The sugars released by enzymatic hydrolysis of xylan were separated by ascending TLC on a plate of silica gel (Schleicher and Schull F-1500) to 10 x 10cm in the solvent system formic n-butanol, isopropanol, water (3, 12, 1.V / V).

Chromatograms, developed twice, were sprayed with a solution of sulfuric acid 20 ml in ethanol 8 ml and heated at 100°C for 5 rains to locate sugars stained brown (hexose) or pink (pentose). Samples and mixtures of sugar standards were applied in 5µl amounts and Rf values relative to o-glucose determined. The products of degradation by *T. fusca* (Sambrook et al., 1989) MT816 and *T. curvata* MTS15 (Ninawe et Kuhad, 2005) enzyme preparations incubated with oat spelt xylan for 24 h were analysed similarly.

3. Results and Discussions

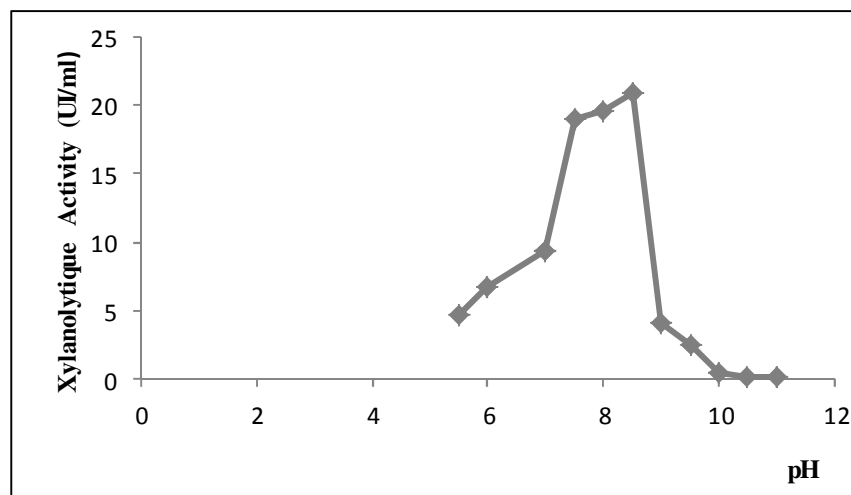
3.1. Screening of Thermophilic Xylan-Degrading Actinomycetes

The colonies of *Actinomycetes* were recovered from different Petri dishes. *Actinomycetes* were recognized by their morphological characteristics. The strains had a filamentous, sometimes fragmented, appearance; the colonies appeared colored or colorless, adhering to the medium and the present anaerian and vegetative mycelium, where as some of them showed a mycelium of the substrate only (Habbeche et al., 2013). The ratio of the diameter of the clear zone, after Congo red staining, and that of the colony served as an index for the selection of strains with high xylanase production (**Fig.1**). The isolates Cpt8, Cpt20 and Cpt29 exhibited a ratio higher than 2, with the highest ratio being 4. Among them, strain Cpt29 displayed the highest extracellular xylanase activity (about 30 U.ml⁻¹) after 24 h incubation in an optimized medium, and was, therefore, retained for all subsequent studies.

Figure 1: Plate assay showing zone of hydrolysis of xylan by a xylanase produced by Cpt29.

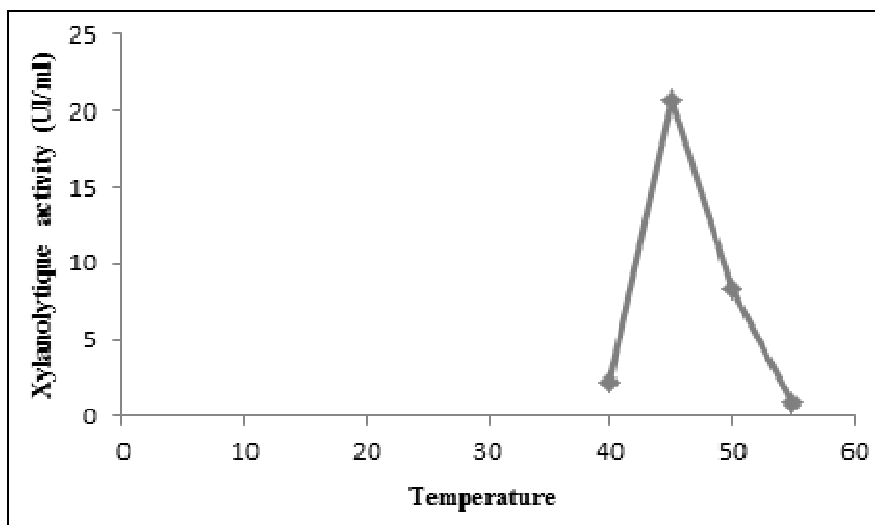
3.2. Optimisation of Cultural Conditions

The optimum pH with high xylanase production was found to be pH 8,5 ($20,97\text{IU}\cdot\text{ml}^{-1}$) (**Fig. 2**). The xylanase has pH optima around 8 but the activity at pH value of 7-9 makes it suitable for bio-bleaching applications (Dhiman et al., 2008). Xylanase production under alkaline conditions has been reported in many species of Bacteria as *Bacillus pumilus* (Battan et al., 2007) and some fungi such as *Penicillium oxalicum* (Muthezhilan et al., 2007).

Figure 2: PH optima for crude xylanase from Cpt29.

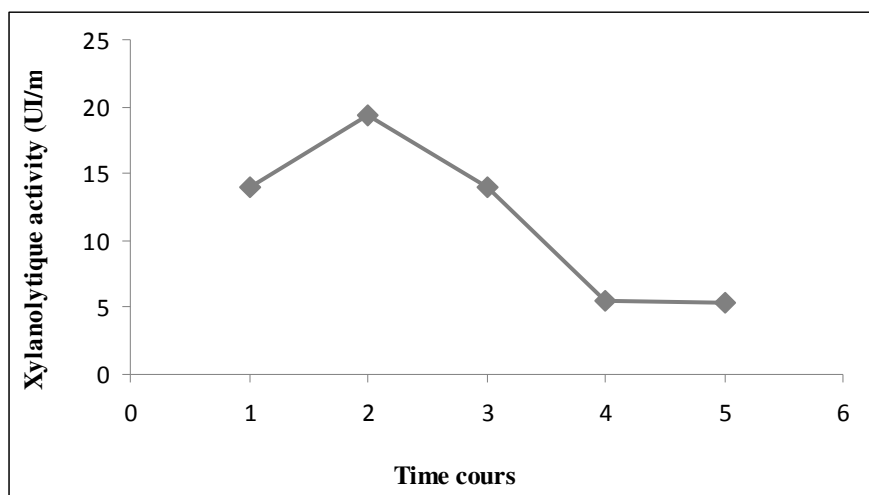
Temperature varying from 40 to 55°C was examined for the detection of optimum temperature required for the production of enzyme, and the results showed optimum to be 45°C ($20,64\text{IU}\cdot\text{ml}^{-1}$) (**Fig.3**). At 50°C, a significant decline in xylanase activity was observed. The optimum temperature for xylanase production by *Actinomadura* sp Cpt29 was similar to some thermophilic bacteria and fungi, such as *Streptomyces cyaneus* SN32 (Ninawe and Kuhad, 2005), *Thermomyces lanuginosus* (Purkarthofer et al., 1993), *Thermoascus aurantiacus* (Kalogeris et al., 1998) and *Penicillium oxalicum* (Muthezhilan et al., 2007). The preference of higher temperature for xylanase production qualified it as a thermotolerant xylanase producing microorganism. Alkalotolerant and thermotolerant microorganisms have great deal in industrial applications and have attracted the attention of researchers engaged in different fields.

Figure 3: Temperature optima for crude xylanase from Cpt29.



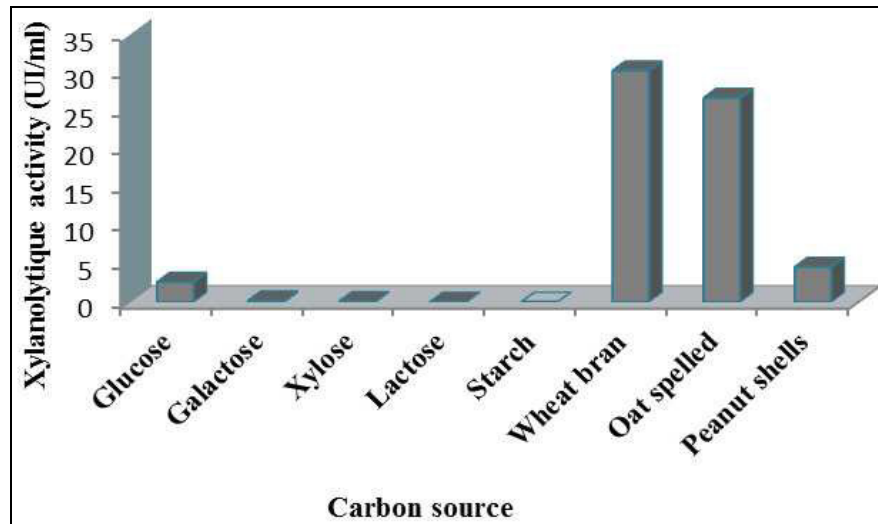
The time course of xylanase production was investigated and maximum production was observed after 24h (19,33IU.ml⁻¹) (**Fig.4**). Further incubation after this did not show any increase in the level of enzyme production which may probably due to proteolysis.

Figure 4: Time course of xylanase production by Cpt29.



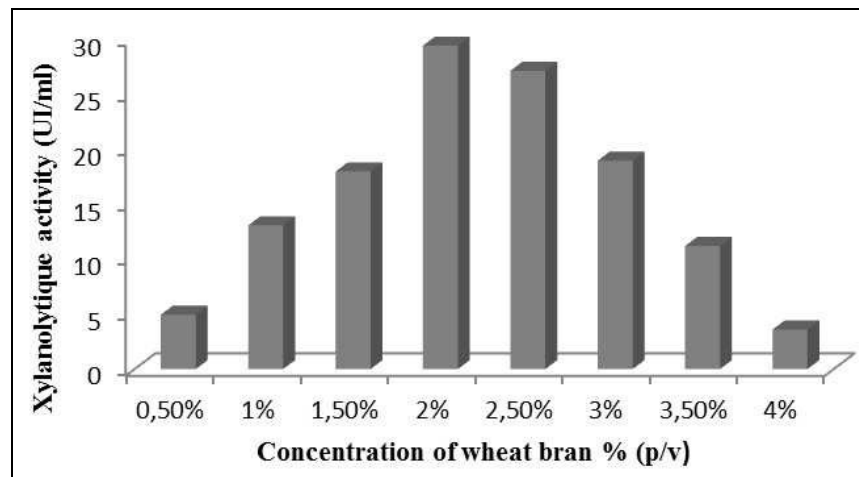
Various synthetic and natural carbon sources were used to assess their suitability to promote xylanase yield from *Actinomadura* sp Cpt29. Results shown in **figure 5** indicated that among various carbon sources, wheat bran induced the highest level of xylanase production (30,31IU.ml⁻¹) followed by oat spelt xylan (15,32IU.ml⁻¹). Wheat bran is an inexpensive by product, which contains high amount of xylan. Therefore, it is one of the most popular components of complex media for xylanase production.

Figure 5: Effect of different carbon sources in Horikoshi medium (devoid of glucose) on xylanase production from Cpt29.



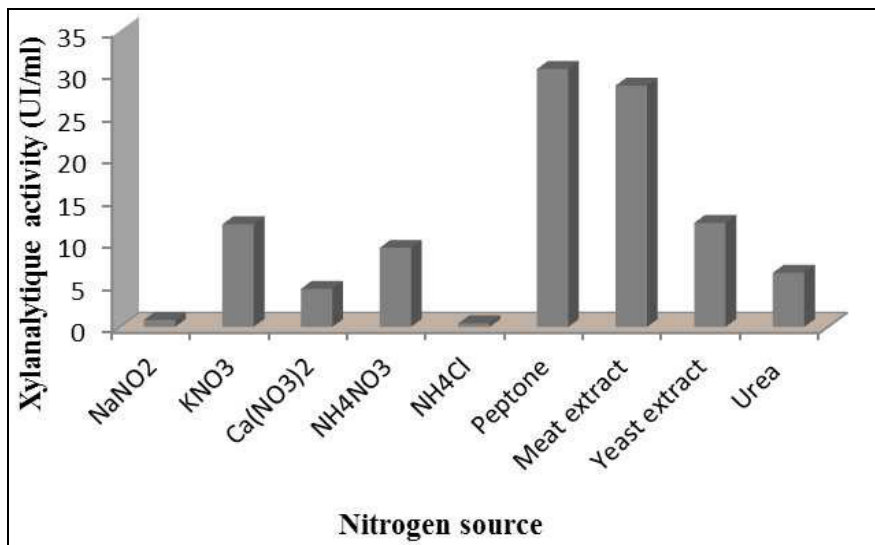
The effect of different levels of best inducers. Wheat bran on xylanase production by *Actinomadura* sp Cpt29 was also studied. The maximum xylanase production was found at 2% (w/v) (Fig. 6).

Figure 6: Effect of different concentration of carbon sources in Horikoshi medium (devoid of glucose) on xylanase production from Cpt29.



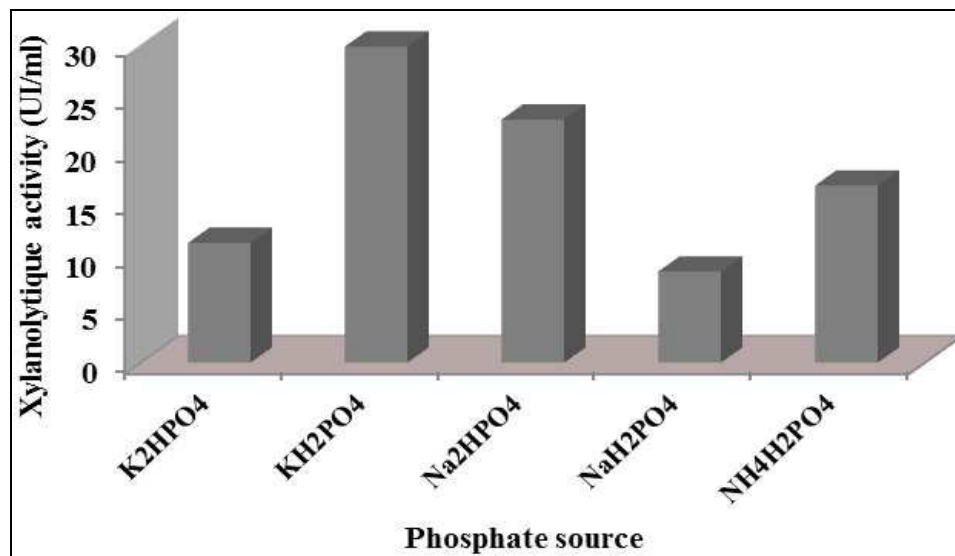
Different nitrogen sources were studied for their effect on xylanase production by *Actinomadura* sp Cpt29. the results are depicted in **figure 7**. Among all the organic sources tested, peptone was found to be the best inducer with wich enzyme production of $30,47\text{IU}\cdot\text{ml}^{-1}$ was achieved. Among the inorganic sources, ammonium sulphate induces maximum xylanase production ($12,85\text{IU}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Figure7: Effect of different nitrogen sources in Horikoshi medium (devoid of glucose) on xylanase production from Cpt29.



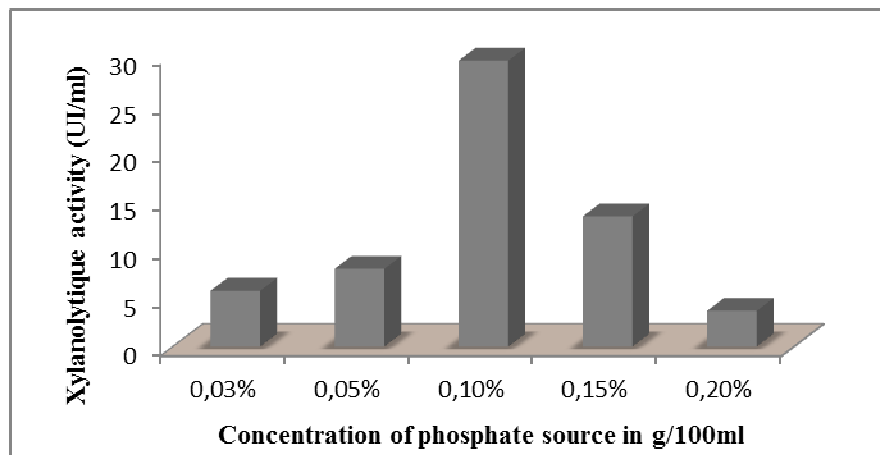
Different phosphate sources were studied for their effect on xylanase production by *Actinomadura* sp Cpt29. the results are depicted in **figure 8**.

Figure 8: Effect of different phosphate sources in Horikoshi medium (devoid of glucose) on xylanase production from Cpt29.



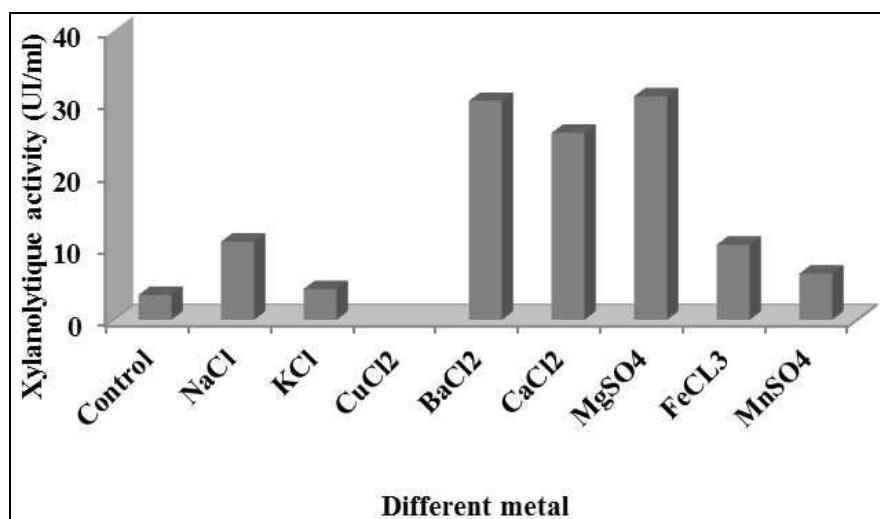
The effect of different concentration of best inducers phosphate source KH₂PO₄ on xylanase production by *Actinomadura* sp Cpt29 was carried out. The maximum xylanase production was found at 0, 1% (w/v) (**Fig. 9**).

Figure 9: Effect of different concentration of KH_2PO_4 in Horikoshi medium (devoid of glucose) on xylanase production from Cpt29.



The effect of supplementation of different metal chlorides and other chemicals in the production medium (optimized during the previous studies) on xylanase production by *Actinomadura* sp Cpt29 was studied (**Fig. 10**). The presence of MgSO_4 in the medium increased the production of xylanase marginally ($30,96\text{IU}\cdot\text{ml}^{-1}$). These results indicated 2,21-fold increase in xylanase production by *Actinomadura* sp Cpt29 under optimized conditions against unoptimized growth conditions. However, several other strains of *Streptomyces* and *Actinomadura* present a xylanase activity between 4 to $12\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Holtz et al., 1991) *sp.GRE7* (Kiddinamoorthy et al., 2008), and from *Streptomyces thermonitrificans NTU-88* (Cheng et al., 2009).

Figure 10: Effect of supplementation of different metal chlorides and other chemicals in Horikoshi medium (devoid of glucose) on xylanase production from Cpt29.



3.3. Detection of the Hydrolysis Products by TLC

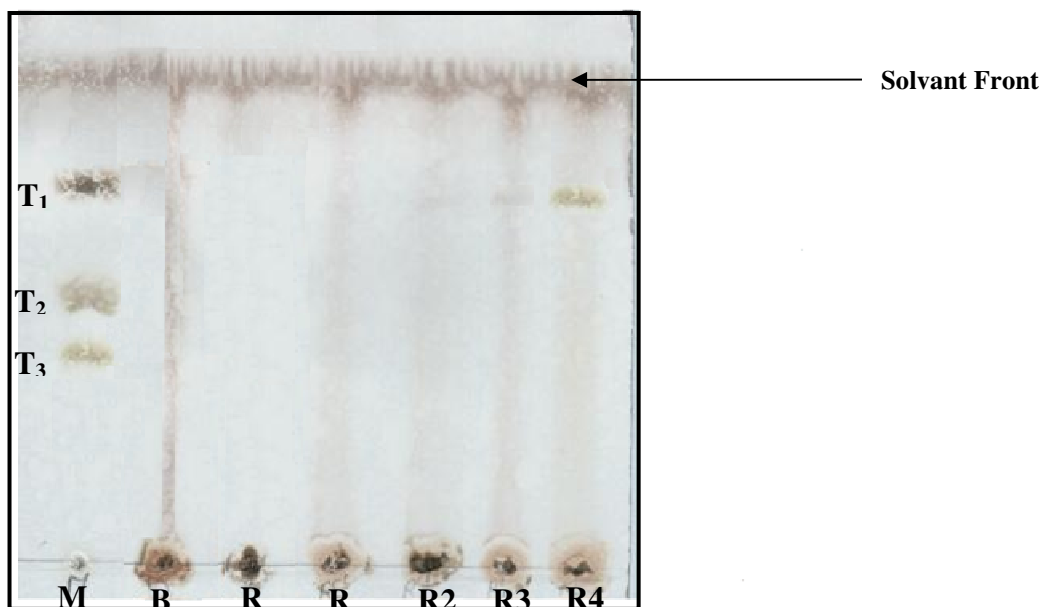
Depolymerization products sought during several stages: beginning of the reaction (R0), 30 minutes, 2 hours, 4 hours and 24 hours are shown in **Figure 11**. A mixture of 3 witnesses (MT) from monomer to trimer and was used in lieu of reference respectively for T1: xylose monomer, T2: T3 and maltose: raffinose. We also used a blank containing the denatured enzyme (B).

Examination of chromatogram shows at the beginning of the hydrolysis, no product appeared, then after 2 hours of incubation, the crude preparation led to the monomer corresponding to xylose. This is the only product observed after 24 hours of incubation with greater intensity. Furthermore, no intermediate spot was observed in the kinetics of polymer degradation.

For our part, we used a crude enzyme extract (dialysate) obtained after culturing the strain on a complex substrate (wheat bran) which suggests that the crude enzyme extract is a mixture of endo and exoxylanase and of β -xylosidases. Indeed, endoenzymes cut randomly within the chain and exoenzymes attack small units to liberate xylose easily metabolized by the microorganism. This attack is known in xylanases from various microorganisms such as bacteria, the most common are: *Streptomyces* sp., *Streptomyces halstedii* JM8 (Stutzenberge et Bodinel, 1992), *Streptomyces reticuli* (Alberto et al., 1995), *Bacillus* sp. X13 (Andre et al., 1992).

Figure11: Mode of action of the crude enzyme extract on xylan.

T1: xylose monomer **T2:** Maltose **T3:** Raffinose
R1: Enzymatique reaction 30mn **R2:** Enzymatique reaction 1h
R3 : Enzymatique reaction 2h **R4 :** Enzymatique reaction 24h



4. Conclusion

The thermostability and alkaline stability are prerequisite characteristics for the successful application of xylanases in the pulp and paper industry. This would alleviate the problems associated with having a xylan barrier on the surface of lignin containing pulp during the subsequent steps in chemical bleaching. Although several studies have reported on xylanase production by various microorganisms, scant attention was given for the synthesis of this enzyme through *Actinomadura* sp. The findings presented in the current study clearly demonstrated that the *Actinomadura* sp. strain Cpt29 produces xylanase with negligible cellulase, which is active over a wide range of pH and temperature. Moreover, the xylanase production yield achieved with this strain was higher than those obtained with other xylanases from other actinomycetes. Overall, the findings indicate that the organism presented in the current work, as well as its xylanase, are endowed with a number of properties and attributes that are highly valued in a wide array of industrial applications and processes particularly those involved in the use of biobleaching agents in the pulp and paper industries.

Acknowledgments

This work was funded by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research Under project number PNR. The authors wish to express their gratitude to Mr Lazher Tichati for their constructive discussions and valuable help during the preparation of this work. The authors wish also to express their gratitude and dedicated this work to the memory of our colleague Mrs Zina Taibi, who passed away on July 20th, 2011, for her fruitful discussion and valuable help during the preparation of this work.

References

- [1] Alberto R.A., Fernandez-Abalos J.M., Sanchez P., Garda A.L, and Ramon I.S.A., 1995. Purification and Biochemical Characterization of a Xylanase (Xys1) from *Streptomyces halstedii* JM8. Applied and Environmental Microbiology, pp. 2414–2419.
- [2] Andre Schlochtermeyer., Frank Niemeyer., and Hildgund Schrempf., 1992. Biochemical and Electron Microscopic Studies of the Streptomyces reticuli Cellulase (Avicelase) in Its Mycelium-Associated and Extracellular Forms. Applied and Environmental Microbiology, pp. 3240–3248.
- [3] Battan B., Sharma J., Dhimana S.S., Kuhad R.C., 2007. Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. Enzyme and Microbial Technology., 41, 733–739.
- [4] Beg Q.K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G.S., 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Appl Microbiol Biotechnol., 56, 326-38.
- [5] Ben Romdhane I.B., Achouri I.M., Belghith H., 2010. Improvement of highly thermostable xylanases production by *Talaromyces thermophilus* for the agro-industrials residue hydrolysis. Appl Biochem Biotechnol., 162, 1635-46.
- [6] Berens S., Kaspari H., Klemme J.H., 1996. Purification and characterization of two different xylanases from the thermophilic actinomycete *Microtetraspora flexuosa* SIIX. Antonie Van Leeuwenhoek., 69, 235-41.
- [7] Blanco J., Coque J.J., Velasco J., Martin J.F., 1997. Cloning, expression in *Streptomyces lividans* and biochemical characterization of a thermostable endo-beta-1,4-xylanase of *Thermomonospora alba* ULJB1 with cellulose-binding ability. Appl Microbiol Biotechnol., 48, 208-17.
- [8] Boonmak C., Limtong S., Jindamorakot S., Am-In S., Yongmanitchai W., Suzuki K.I., Nakase T., Kawasaki H., 2010. *Candida xylanilytica* sp. Nov a xylan degrading yeast species isolated from Thailand. Int J Syst Evol Microbiol., DOI, 10.1099/ij.s.0.021873-0
- [9] Cheng H.L., Tsai C.Y., Chen H.J., Yang S.S., Chen Y.C., 2009. The identification, purification and characterization of STXF10 expressed in *Streptomyces thermonitrificans* NTU-88. Appl Microbiol Biotechnol., 82, 681-689.
- [10] Chen X., Xu S., Zhu M., Cui L., Zhu H., Liang Y., Zhang Z., 2010. Site-directed mutagenesis of an *Aspergillus niger* xylanase B and its expression purification and enzymatic characterization in *Pichia pastoris*. Process Biochem., 45, 75-80.
- [11] Collins T., Gerday C., Feller G., 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. FEMS Microbiol Rev., 29, 3-23.
- [12] Dhiman S.S., Sharma J., Battan B., 2008. Industrial Applications and future prospects of microbial xylanases. A review. Bio Resources., 3(4), 1377-1402.
- [13] Ethier J.F., Harpin S., Girard C., Beaulieu C., Déry C.V, Brzezinski R., 1994. Cloning of two xylanase genes from the newly isolated actinomycete *Actinomadura* sp. strain FC7 and characterization of the gene products. Can J Microbiol., 40, 362-8.

- [14] George S.P., Ahmad A., Rao M.B., 2001. A novel thermostable xylanase from *Thermomonospora* sp. influence of additives on thermostability. *Bioresour Technol.*, 78., 221-4.
- [15] Guerfali M., Chaabouni M., Gargouri A., Belghith H., 2010. Improvement of alpha-L: -arabinofuranosidase production by *Talaromyces thermophilus* and agro-industrial residues saccharification. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 85, 1361-72.
- [16] Habbeche A., Habbera S., Saoudi B., Kerouaz B., Ladjama A., 2013. Keratinases production from thermophilic actinomycete strain Cpt29 newly isolated from poultry compost. *Minerva Biotechnologica.*, 25(3), 151-9.
- [17] Henrissat B., 1991 A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.*, 280, (Pt 2),309-16.
- [18] Holtz C., Kaspari H., Klemme J.H., 1991. Production and properties of xylanases from thermophilic actinomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 59, 1-7.
- [19] Kalogeris E., Christakopoulos P., Kekos D., Macris B.J., 1998. Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: Characterization of two isozymes. *J Biotechnol.*, 60, 155-163.
- [20] Kiddinamoorthy J., Anceno A.J., Haki G.D., Rakshit S. K., Production, purification and characterization of *Bacillus* sp. *GRE7* xylanase and its application in eucalyptus Kraft pulpbiobleaching. *World J Microbiol. Biotechnol.*, 24, 605–612.
- [21] Leskinen S., Mantyla A., Fagerstrom R., Vehmaanpera J., Lantto R., Paloheimo M., Suominen P., 2005 Thermostable xylanases, Xyn10A and Xyn11A, from the actinomycete *Nonomuraea flexuosa*: isolation of the genes and characterization of recombinant Xyn11A polypeptides produced in *Trichoderma reesei*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 67, 495-05.
- [22] Liu L., Cheng J., Chen H., Li X., Wang S., Song A., Wang M., Wang B., Shen J., 2011. Directed evolution of a mesophilic fungal xylanase by fusion of a thermophilic bacterial carbohydrate-binding module. *Process Biochem.*, 46, 395-8.
- [23] Maalej I., Belhaj I., Masmoudi N.F., Belghith H., 2009. Highly thermostable xylanase of the thermophilic Fungus *Talaromyces thermophilus*: purification and characterization. *Appl Biochem Biotechnol.*, 158, 200-12.
- [24] Muthezhilan R., Ashok R., Jayalakshmi S., 2007. Production and optimization of thermostable alkaline xylanase by *Penicillium oxalicum* in solid state fermentation. *African Journal of Microbiology Research.*, 20 – 28.
- [25] Nanmori T., Watanabe T., Shinke R., Kohno A., Kawamura Y., 1990. Purification and properties of thermostable xylanase and beta-xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain. *J Bacteriol.*, 172, 6669-72.
- [26] Nelson N., A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol Chem.*, 153, 375-380.
- [27] Ninawe S., Lal R., Kuhad R.C., 2006. Isolation of Three Xylanase-Producing Strains of Actinomycetes and Their Identification Using Molecular Methods. *Current Microbiology.*, 53, 178-182.
- [28] Ninawe S., Kapoor M., Kuhad R.C., 2008 Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. *Bioresour Technol.*, 99, 1252-8.
- [29] Ninawe S., Kuhad R.C., 2005. Use of xylan-rich cost effective agro-residues in the production of xylanase by *Streptomyces cyaneus* SN32. *Journal of Applied microbiology.*, 99, 1141-1148.
- [30] Polizeli M.L., Rizzatti A.C., Monti R., Terenzi H.F., Jorge J.A., Amorim D.S., 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 67, 577-91.
- [31] Purkarthofer H., Sinner M., Steiner W., 1993. Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: optimization of production in submerged and solid-state culture. *Enzyme Microbiol Technol.*, 15, 677-682.

- [32] Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T., 1989. Molecular cloning: A laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- [33] Shirling E.B., & Gottlieb., D., 1996. Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int J Syst Bacteriol., 16, 313–340.
- [34] Somogyi M., 1945. A new reagent for the determination of sugars. J Biol Chem., 160, 61-73.
- [35] Sriyapai T., Somyoonsap P., Matsui K., Kawai F., Chansiri K., 2011 Cloning of a thermostable xylanase from *Actinomadura* sp S14 and its expression in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. J Biosci Bioeng DOI 10, 1016/j.jbiosc,12.024
- [36] Stutzenberger F.J., and Bodinel A.B., 1992. Xylanase production by *Thermomonospora curvata*. Journal of Applied Bacteriology., 72, pp. 504-511.
- [37] Sunna A., Antranikian G., 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. Crit Rev Biotechnol., 17, 39-67.
- [38] Taibi Z., Saoudi B., Boudelaa M., Trigui H., Belghith H., Gargouri A., Ladjama A., 2012. Purification and biochemical characterization of highly thermostable xylanase from *Actinomadura* sp strain Cpt20 isolated from poultry compost. Applied Biochem Biotechnol., 166, 663-679.
- [39] Terrasan C.R., Temer B., Duarte M.C., Carmona E.C., 2010. Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. Bioresour Technol., 101, 4139-43.
- [40] Wong K.K.Y., Tan L.U.L., Saddler J.N., 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: Functions and applications. Microbiol Rev., 52, 305-17.
- [41] Zhou J., Shi P., Zhang R., Huang H., Meng K., Yang P., Yao B., 2010. Symbiotic *Streptomyces* sp. TN119 GH 11 xylanase: A new pH-stable, protease- and SDS-resistant xylanase. J Ind Microbiol Biotechnol., DOI, 10.1007/s10295-010-0795-5.