

# THÈSE

Présentée par

**HEBAL Hakim**

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR EN SCIENCES**

Filière : Biologie

Option : Microbiologie

Thème

**Production et purification de xylanases d'une souche bactérienne et leur activité dans les liquides ioniques**

Soutenue le : 22/10/2020

Devant le Jury composé de :

**Nom et Prénom**

**Grade**

<b>Mr KECHA Mouloud</b>	Professeur	Univ. de Bejaia	Président
<b>Mr BENALLAOUA Said</b>	Professeur	Univ. de Bejaia	Rapporteur
<b>Mr RECHRECHE Hocine</b>	Professeur	Univ. de Jijel	Examineur
<b>Mme BOUCHERBA Nawel</b>	Professeur	Univ. de Bejaia	Examineur
<b>Mme NANCIB Aicha</b>	MCA	Univ. de Sétif	Examineur
<b>Mme SOBHI Widad</b>	MCA	Univ. de Sétif	Examineur

**Année Universitaire : 2019-2020**

## **Dédicaces**

*A ma femme Hamzaoui Fahima*

*A mes parents Lakhdar et Akkouche Feroudja, mes sœurs Amel et Fadila et mes frères Foudil et Adnane*

*A mes professeurs Benallaoua Said et Turunen Ossi*

## Remerciements

A travers cette page je tiens à exprimer mes remerciements et ma reconnaissance à toutes les personnes ayant contribué dans la réalisation de ce modeste travail.

Je tiens particulièrement à adresser mes remerciements les plus chaleureux et exprimer toute mon affection au Professeur Said BENALLAOUA qui m'a accueilli dans son équipe au sein du laboratoire Microbiologie Appliquée et accepté de diriger cette thèse. J'apprécie particulièrement son suivi, ses conseils mais également la confiance qu'il a placée en moi et la liberté d'initiative dans la réalisation de ce travail.

Mes vifs remerciements vont également au Professeur TURUNEN Ossi de l'université Eastern Finland pour son aide précieuse, ses orientations et sa contribution dans la réalisation de ce travail. Il m'a accueilli à plusieurs reprises et mis à ma disposition les moyens humains et matériels de son laboratoire

Il m'est agréable d'exprimer mes sincères remerciements et ma considération aux honorables membres du jury

Le Professeur KECHA Mouloud de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia qui me fait l'honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse et d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier également :

Le Professeur RECHRECHE Hocine de l'université Mohamed Seddik BenYahia de Jijel,

Dr NANCIB Aicha, Maitre de conférences A à l'université Ferhat Abbas de Sétif

Dr SOBHI Widad, Maitre de conférences A à l'université Ferhat Abbas de Sétif, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements et ma reconnaissance au Dr BOUCHERBA Nawel, Maitre de conférences A à l'université Abderrahmane Mira de Bejaia, non seulement pour l'honneur qu'elle me fait en examinant ce travail ; mais également pour son aide précieuse. J'ai bénéficié de son expérience et sa compétence dans la thématique et de ses encouragements dans la réalisation de ce travail.

J'adresse également mes chaleureux remerciements aux :

- Professeur Heikki Ojamo de l'université Aalto pour m'avoir accueilli au Department of Biotechnology and Chemical Technology, School of Technology, Finland,
- Professeur Kilpeläinen Ilkka et aux Drs Parviainen Arno et W.T. King Alistair de l'université Helsinki, Finland pour m'avoir fourni en liquides ioniques,
- Drs Anbarasan Sasikala et Li He de l'université Aalto, Finland, pour m'avoir fourni les xylanases hyperthermophiles et leur assistance
- Drs Makkonen Laura et Bankar Sandip de l'université Aalto, Finland pour leur aide dans le docking moléculaire.
- Johanna Aura de l'université Aalto, Finland pour son assistance technique.

Je n'oublierai pas de remercier ma famille et ma femme HAMZAOUI Fahima pour leur aide et encouragement dans la réalisation de ce travail.

## Index des tableaux

Dans le manuscrit

Tableau n°	Titre	Page n°
1	Classification des enzymes xylanolytiques (Shallom et Shoham, 2003).	10
2	Liquides ioniques superbasiqes	33
3	Activité xylanase à pH 7 et 50°C des souche sélectionnées	38
4	Similarité de la séquence du gène ARNr 16S de la bactérie ID 12-972 avec les séquences d'autres taxons.	39
5	Caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches HH2, <i>J. denitrificans</i> Prevot 55134T (Pukall <i>et al.</i> , 2009) et <i>J. denitrificans</i> BN13 (Boucherba <i>et al.</i> , 2011).	43
6	Paramètres cinétiques de TfXYN10A en présence de 5% de LIs	77

Dans l'annexe II

Tableau n°	Titre	Page n°
S1	Résultats de la simulation moléculaire par le programme SwissDock et les activités xylanase dans les liquides ioniques	131

## Index des figures

Dans le manuscrit

Figure n°	Titre	Page n°
1	Structure de la lignocellulose (Wang et Luo 2016).	4
2	Structure de la cellulose (Wahlström, 2014)	5
3	Structure du O-Acetyl4-O-methyl- D-glucuronoxylane du bois dur (Dekker, 1985)	6
4	Structure de l'Arabino-4-O-methylglucuronoxylan des gymnosperms (Dekker 1985)	6
5	Précurseurs de la lignine (Jeffries, 1994).	7
6	Mode d'action des xylanases (Sunna et Antranikian, 1997)	8
7	Structure de (a) la xylanase GH10 de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> (Solomon <i>et al.</i> , 2007) et de (b) la xylanase GH11 de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (Jaeger et Pfaendtner, 2013).	12
8	Mécanismes d'action des glycoside hydrolases. (a) mécanisme par rétention, (b) mécanisme par inversion (Davies et Henrissat, 1995).	14
9	Colonnes de dessalement PD10 Sephadex G-25 (GE Healthcare).	28
10	Tubes concentrateurs vivaspin 20 ml (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Allemagne).	29
11	Système de purification AKTA purifier 100 (GE Healthcare).	30
12	Zones claires autour des colonies sur un milieu solide à base de xylane	37
13	Effet de la température sur la croissance de la souche <i>Jonesia denitrificans</i> ID 12-972	40
14	Effet du pH sur la croissance de la souche <i>Jonesia denitrificans</i> ID 12-972	41
15	Effet de NaCl sur la croissance de la souche <i>Jonesia denitrificans</i> ID 12-972	42
16	Effet de la température sur la production de xylanases par la souche <i>Jonesia denitrificans</i> ID 12-972	44

Figure n°	Titre	Page n°
17	Effet du pH sur la production de xylanases par la souche <i>Jonesia denitrificans</i> ID 12-972	45
18	Effet de NaCl sur la production de xylanases par la souche <i>Jonesia denitrificans</i> ID 12-972	46
19	Effet de KCl sur la production de xylanases par la souche <i>Jonesia denitrificans</i> ID 12-972.	47
20	Effet du xylane de bouleau sur la production des xylanases.	48
21	Effet du xylane de hêtre sur la production des xylanases	49
22	Effet du xylane d'avoine sur la production des xylanases	49
23	Effet des sources de carbones sur la production de xylanases par la souche <i>Jonesia denitrificans</i> ID 12-972	50
24	Effet des sources d'azote sur la production des xylanaes par la souche <i>Jonesia denitrificans</i> ID 12-972	52
25	Effet de la concentration du xylane sur la production des xylanaes par la souche <i>Jonesia denitrificans</i> ID 12-972	53
26	Evolution de la production de xylanases par la souche <i>Jonesia denitrificans</i> ID 12-972 au cours du temps	54
27	Chromatogramme de la chromatographie filtration sur gel des protéines de la souche <i>Jonesia denitrificans</i> ID 12-972	56
28	SDS PAGE du surnageant de la culture (colonnes 2 et 7), de la fraction A (colonnes 3 et 4), de la fraction B (colonne 5 et 6), des protéines standards (colonnes 1 et 8)	57
29	Evolution de la production des xylanases (a) DtXYNB et (b) DtXYNB-DS en fonction du temps	58

Figure n°	Titre	Page n°
30	SDS-PAGE des surnageants et des solutions protéiques obtenues après chromatographie filtration sur gel, (A) de l'enzyme DtXYN11B, (B) de l'enzyme DtXYNB11-DS. Colonne 1 les protéines standards ; colonne 2 le surnageant du milieu de culture ; colonne 3 chromatographie échangeuse de cation ; colonne 5 chromatographie filtration sur gel.	59
31	Effet de la température sur l'activité des xylanases JdXYNA et JdXYNB	60
32	Effet du pH sur l'activité des xylanases JdXYNA et JdXYNB	61
33	Effet des sels sur l'activité des xylanases JdXYNA (a) et JdXYNB (b)	62
34	Effet des sels sur l'activité des xylanases TfxYN10A (a), DtXYN11B (b) et DtXYN11B-DS (c)	64
35	Effet des liquides ioniques à base d'acétate et de propionate sur l'activité des xylanases GH10 TfxYN10A, GH11 DtXYN11B et DtXYN11B-DS	65
36	Effet des liquides ioniques à base d'acétate et de propionate sur l'activité des xylanases JdXYNA et JdXYNB	66
37	Effet des liquides ioniques à base de guaiacolate sur l'activité des xylanases GH10 TfxYN10A, GH11 DtXYN11B et DtXYN11B-DS	67
38	Activité de TfxYN10A dans 1% et 4% xylane en présence des liquide ioniques à base d'acétate propionate	69
39	Activité de TfxYN10A dans 1% et 4% xylane en présence des liquide ioniques à base de guaiacolate	70
40	Activité de TfxYN10A dans 5-30% de liquides ioniques	72

Figure n°	Titre	Page n°
41	Structures des cations et des anions de liquides ioniques	74
42	Comparaison des caractéristiques du site actif de TfXYN10A (A et B) et DtXYN11B (C et D).	79
43	Comparaison des sites de liaison du cation [EMIM] <sup>+</sup> et des molécules de substrat tétramérique à la surface de TfXYN10A et DtXYN11B.	80
44	Docking du cation 1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-enium [DBNH] <sup>+</sup> et de l'anion guaiacolate au site actif de TfXYN10A	81
45	Groupes de liaison de guaiacolate (A), propionate (B), [DBNH] <sup>+</sup> (C), [DBUH] <sup>+</sup> (D) et [TMGH] <sup>+</sup> (E) et la liaison du Xylotétraose (F) à TfXYN10A.	82
46	Docking de l'anion guaiacolate (A), du cation 1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-enium [DBNH] <sup>+</sup> (B) et du cation 1,1,3,3-Tetramethylguanidinium [TMGH] <sup>+</sup> (C) à la xylanase GH11 DtXYN11B	83
47	Occupation du site actif de DtXYN11B par des groupes de cation/anion de liquides ioniques.	83

Dans l'annexe I

Figure n°	Titre	Page n°
S1	Droite d'étalonnage des marqueurs en électrophorèse dénaturante	113
S2	Courbes d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs en absence ou en présence des liquides ioniques	114-117
S3-S14	Evolution de la vitesse de la réaction de TfXYN10A en fonction de la concentration du substrat en absence et en présence de liquide ionique	118-129
S15	Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la macrométhode	130
S16	Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la microméthode	130

## Abréviations

[BMIM]DBP : 1-Butyl-3-methylimidazolium dibutylphosphate

[BMIM]DMP : 1-Butyl-3-methylimidazolium dimethylphosphate

[Chol]AcO : Cholinium acetate

CMC : Carboxymethylcellulose

COVs : composés organiques volatiles

[DMIM]DMP : 1,3-Dimethylimidazolium dimethylphosphate

DNS : 3,5-dinitrosalicylic acid

DSMZ : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

[EMIM]DMP : 1-Ethyl-3-methylimidazolium acetate dimethyl phosphate

KM : constante K de Michaelis

kDa : KiloDalton

LIs : Liquides Ioniques

m/v : masse par volume

[P4444]AcO : Tetrabutylphosphonium acetate

PAGE : Polyacrylamide Gel Electrophoresis

rpm : rotation par minute

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

[TMGH]<sub>n</sub>-PrCOO : 1,1,3,3-Tetramethylguanidinium butyrate

TRIS : Triaminométhane

UI : unité internationale

V<sub>max</sub> : vitesse maximale

v/v : volume par volume

Introduction	01
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	
1- Matières lignocellulosiques	4
1-1. Cellulose	4
1-2. Hémicellulose	5
1-3. Lignine	6
1-4. Enzymes lignocellulosiques	7
2- Xylanases	7
2-1. Généralités	7
2-2. Classification	9
2-3. Structures	11
2-4. Mécanismes d'action	13
2-5. Sources	15
2-6. Applications	15
3- Production des xylanases	17
3-1. Technique de culture	17
3-2. Substrats pour la production de xylanases	18
3-3. Composants de milieu de culture pour la production de xylanases	18
3-4. Paramètres physiques pour la production de xylanases	19
3-5. Approches biotechnologiques pour la production de xylanases	19
4- Prétraitements de la matière lignocellulosique	19
4-1. Traitements conventionnels	19
4-2. Bases structurales de la stabilité des xylanases	20
4-3. Traitement par les liquides ioniques	20
4-4. Effet des liquides ioniques sur les enzymes	21
4-5. Tolérance des xylanases aux liquides ioniques	22

## Chapitre II : Matériel et Méthodes

1- Isolement, sélection et identification d'une souche xylanolytique	24
1-1. Sélection	24
1-2. Identification de la souche sélectionnée	24
1-2.1. Observations microscopiques	24
1-2.2. Tests physiologiques et biochimiques	25
1-2.3. Analyse du gène de l'ARN ribosomal 16S	25
2- Activité enzymatique	26
2-1. Mesure de l'activité	26
2-2. Dosage des protéines	27
2-2.1. Macrométhode	27
2-2.2. Microméthode	27
3- Optimisation de la production de xylanases	27
3-1. Effet de la température	27
3-2. Effet du pH	28
3-3. Effet du NaCl et KCl	28
3-4. Effet du type de xylane	28
3-5. Effet des sources de carbone et d'azote	28
3-6. Effet de la concentration du xylane	28
3-7. Cinétique de la production de xylanases	29
4- Production et purification des enzymes	29
4-1. Sources des xylanases	29
4-2. Production et purification partielle des xylanases de la souche sélectionnée	29
4-3. Production et purification de DtXYN11B et DtXYN11B-DS	32
4-4. Electrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide-SDS	33
5- Caractérisation des xylanases de la souche sélectionnée	34
5-1. Effet de la température et du pH sur l'activité	34
5-2. Effet des sels sur l'activité	34
5-3. Effet des liquides ioniques superbasiques sur l'activité des xylanases	34
6- Etudes de docking moléculaire	36

## Chapitre III : Résultats et discussion

1- Isolement et sélection d'une souche xylanolytique	37
1-1. Protocole de screening	37
1-1.1. Première sélection	37
1-1.2. Seconde sélection	37
1-2. Identification de la souche sélectionnée	38
1-2.1. Analyse de l'ARN16S	38
1-2.2. Caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques	39
1-2.3. Température optimale de croissance	39
1-2.4. pH optimal de croissance	40
1-2.5. Croissance en présence de NaCl	41
2- Optimisation des conditions de culture et de production de xylanases	43
2-1. Effet de la température	43
2-2. Effet du pH	44
2-3. Effet de NaCl et KCl	46
2-4. Effet du type de xylane	47
2-5. Effet des sources de carbone	50
2-6. Effet des sources d'azote	52
2-7. Effet de la concentration de xylane	52
2-8. Cinétique de production des xylanases	53
3- Production, purification et propriétés des enzymes	55
3-1. Purification partielle des xylanases de la souche sélectionnée	55
3-2. Production et purification de DtXYN11B et DtXYN11B-DS	57
3-3. Effet de la température sur l'activité xylanase	60
3-4. Effet du pH sur l'activité xylanase	60
3-5. Effet des sels sur l'activité xylanase	61
3-6. Effet des sels sur l'activité des xylanases hyperthermophiles	63
4- Activité des xylanases dans les liquides ioniques	65
4-1. Activité des xylanases dans 15% de liquides ioniques	65
4-2. Effet de la concentration élevée en substrat sur l'activité de TfXYN10A dans les liquides ioniques	68
4-3. Activité de TfXYN10A dans différentes concentrations de liquides ioniques	71

4-4. Effet des liquides ioniques sur les paramètres cinétiques de TfXYN10A	76
4-5. Liaison des molécules de liquide ionique au site actif	77
Conclusions et perspectives	85
Références bibliographiques	87
Annexe I	
Annexe II	
Annexe III	

# **Introduction**

### Introduction

La valorisation de la biomasse lignocellulosique renouvelable constituant la paroi végétale est une approche globale pour réduire la dépendance vis-à-vis des ressources fossiles (Dittmar, 2014). Les principaux composants de cette biomasse sont la cellulose, l'hémicellulose et la lignine (Kumar *et al.*, 2008). Le traitement enzymatique de ces polymères génère des hexoses et des pentoses (Jia *et al.*, 2015). Elle est à la base de plusieurs processus industriels incluant des matières lignocellulosiques (Bhardwaj *et al.*, 2019).

Le xylane est l'une des principales hémicelluloses et le plus abondant polysaccharide dans la nature après la cellulose. Il est constitué d'une chaîne principale d'unité D-xylopyranoses liées par des liaisons  $\beta$ -1, 4-glycosidiques et de chaînes latérales de L-arabinose ou d'acide glucuronique (Ebringerová et Heinze, 2000). Sa biodégradation requiert l'action de plusieurs enzymes appelées communément xylanases, qui sont d'une extraordinaire variété et complexité (Wong *et al.*, 1988). Ces enzymes sont retrouvées chez plusieurs organismes vivants, mais principalement chez les microorganismes (Bhardwaj *et al.*, 2019).

Les endoxylanases (EC 3.2.1.8) sont parmi les xylanases intervenant dans la dégradation du xylane. Ces enzymes sont des glycoside hydrolases qui catalysent le clivage de la liaison  $\beta$ -1,4-glycosidiques à l'intérieur de la chaîne principale de xylane pour libérer des xylooligosaccharides et du xylose. La plupart des xylanases étudiées appartiennent aux familles des glycoside hydrolases 10 et 11 (Collins *et al.*, 2005).

Les xylanases sont utilisées dans les papeteries, l'industrie alimentaire et les aliments de bétail ainsi que pour l'extraction de certains produits d'intérêt alimentaire ou pharmaceutique (Bhardwaj *et al.*, 2019). Toutefois, leur utilisation avec les cellulases

dans la dégradation des matières lignocellulosique pour la production de bioéthanol est d'un intérêt crucial, vu l'importance économique et vitale de ce biocarburant comme source d'énergie renouvelable (Gray *et al.*, 2006).

Les industries de transformation des matières lignocellulosiques sont caractérisées par la prévalence de conditions extrêmes (hautes températures, pH acides ou basiques, salinité et pression élevées), nécessitant de ce fait des xylanases actives et stables dans ces conditions. Par conséquent, la recherche d'enzymes performantes dans ces conditions hostiles est d'un intérêt considérable ces dernières années (Bhardwaj *et al.*, 2019). Les potentialités de la nature sont inépuisables et les microorganismes xylanolytiques offrent une grande diversité.

La cristallinité élevée de la cellulose et l'association complexe des polymères au sein de la matrice lignocellulosiques limitent la performance des enzymes (Cheng *et al.*, 2011 ; Silveira *et al.*, 2015). Par conséquent, des prétraitements de cette matière sont nécessaires avant de passer au traitement enzymatique. Ces prétraitements font intervenir des acides et des bases forts et à températures élevées. Ces traitements consomment beaucoup d'énergie et forment des produits secondaires indésirables, en plus de la pollution qu'ils génèrent dans l'environnement (Engel *et al.*, 2010).

Comme alternative, les liquides ioniques, qui sont des sels qui existent sous forme liquide en-dessous de 100 °C (Sun *et al.*, 2011), ont montré une capacité à dissoudre la cellulose et à éliminer la lignine tout en préservant l'environnement vu leur pression de vapeur réduite (Mäki-Arvela *et al.*, 2010 ; George *et al.*, 2015). Ils sont thermiquement et chimiquement stables et leurs propriétés (polarité, hydrophobicité) peuvent être ajustées après un choix correct des ions qui les composent. (Anderson *et al.*, 2002).

Les liquides ioniques affectent l'activité et la stabilité des xylanases, et cette incompatibilité conduit à un lavage excessif de la matière lignocellulosique avant le traitement enzymatique (Wang *et al.*, 2011). Bien que la matière lignocellulosique peut être séparée du liquide ionique après précipitation par l'eau, des quantités considérables de liquide ionique persistent et peuvent affecter l'enzyme (Xia *et al.*, 2014).

La recherche de xylanases tolérantes aux liquides ioniques est un enjeu crucial pour espérer l'utilisation des liquides ioniques comme solvant de la matière lignocellulosique. De plus, la compréhension des bases moléculaires de cette tolérance peut aider au développement de nouvelles enzymes hautement tolérantes ou de liquides ioniques compatibles avec les xylanases.

Ce travail vise globalement deux buts, le premier est de rechercher des xylanases susceptibles d'application en industrie, notamment du bioéthanol. Le deuxième consiste à contribuer à asseoir les bases moléculaires de la tolérance des xylanases aux liquides ioniques. Il comporte les étapes suivantes :

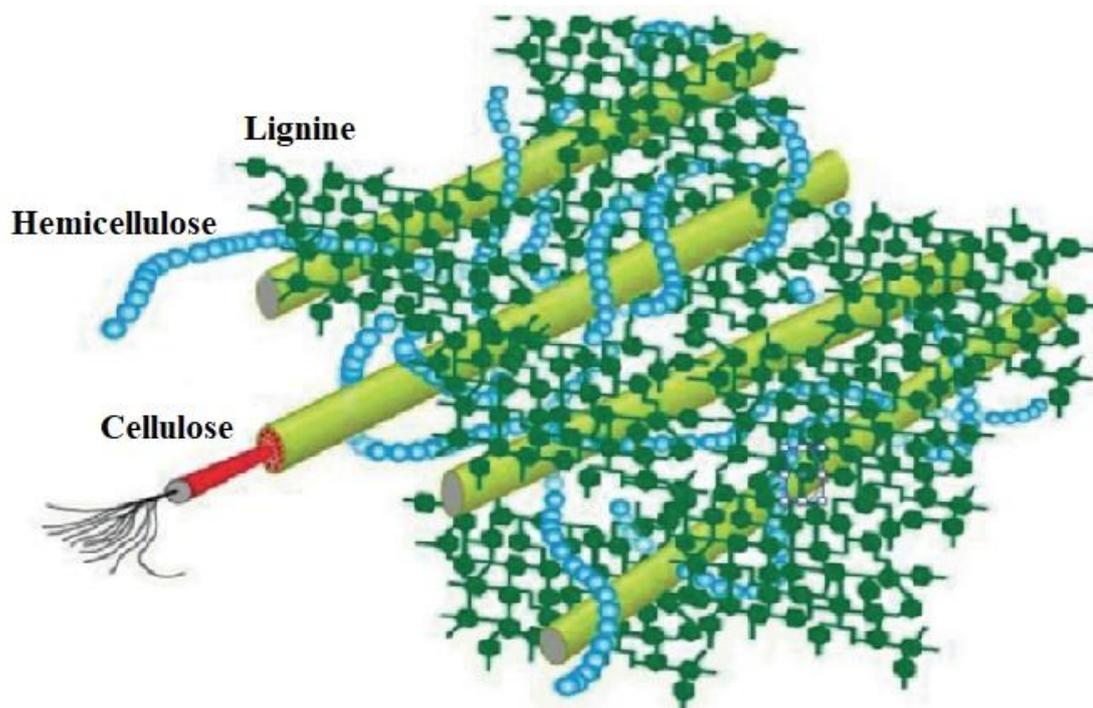
- Isolement et sélection d'une souche xylanolytique
- Optimisation de la production de xylanases avec la souche sélectionnée
- Purification et caractérisation des xylanases
- Etude de l'effet des liquides ioniques sur les xylanases

# **Chapitre 1 :**

## **Synthèse bibliographique**

## 1- Matières lignocellulosiques

La matière lignocellulosique est le constituant principal des parois cellulaires des plantes et elle représente la majeure partie du carbone fixé par photosynthèse (Biely, 1985). Les constituants majeurs de la matière lignocellulosique sont la cellulose (40–50%), l'hémicellulose (25–30%) et la lignine (15–20%) (Gray *et al.* 2006 ; Singla *et al.* 2012). Ces composés forment ensemble un réseau complexe tridimensionnel par l'intermédiaire de liaisons covalentes et non covalentes (Fig. 1) (Sánchez, 2009).

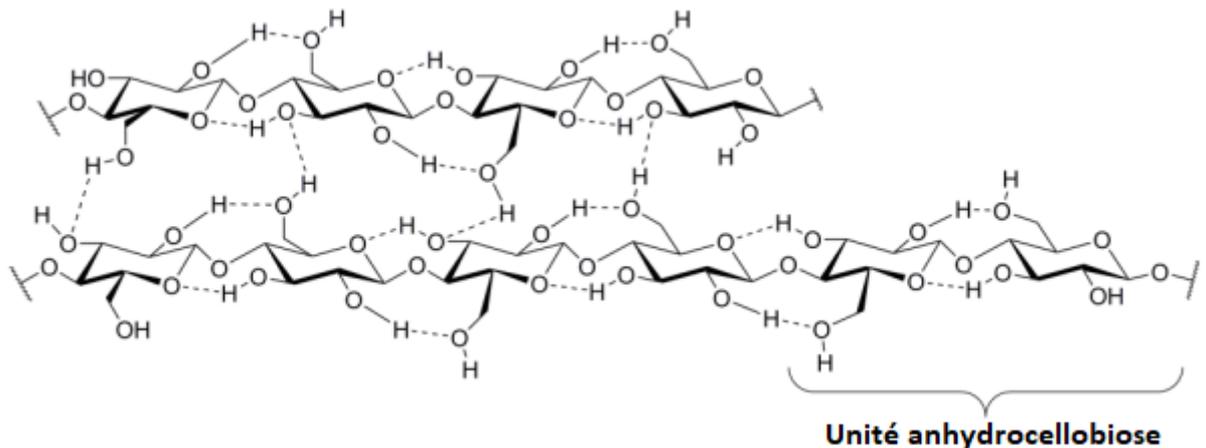


**Figure 1.** Structure de la lignocellulose (Wang et Luo 2016).

### 1-1. Cellulose

La cellulose est le matériel naturel le plus abondant sur terre. Elle est un polymère linéaire d'unités glucopyranose liées entre elles par des liaisons  $\beta$ -1,4-glycosidiques. Le nombre d'unités de glucose dans une molécule de cellulose varie et le degré de polymérisation est entre 300 à 15000 selon la source et le traitement effectué. Chaque unité de glucose est orientée de  $180^\circ$  par rapport à sa voisine et ainsi l'unité répétée dans la chaîne de cellulose est le résidu cellobiose (Fengel et Wegener., 1989).

Dans la nature, les chaînes individuelles de cellulose adhèrent l'une à l'autre par des liaisons hydrogènes intra- et intermoléculaires et des interactions van der Waals pour former les fibres élémentaires (Fig. 2) (Nishiyama *et al.*, 2002 ; Parthasarathi *et al.*, 2011). Les fibres élémentaires sont hautement cristallines et elles s'agrègent encore pour former les microfibrilles. Toutefois, la structure de la cellulose n'est pas uniforme, il y a des régions cristallines et des régions amorphes dans la structure (Cowling, 1975).



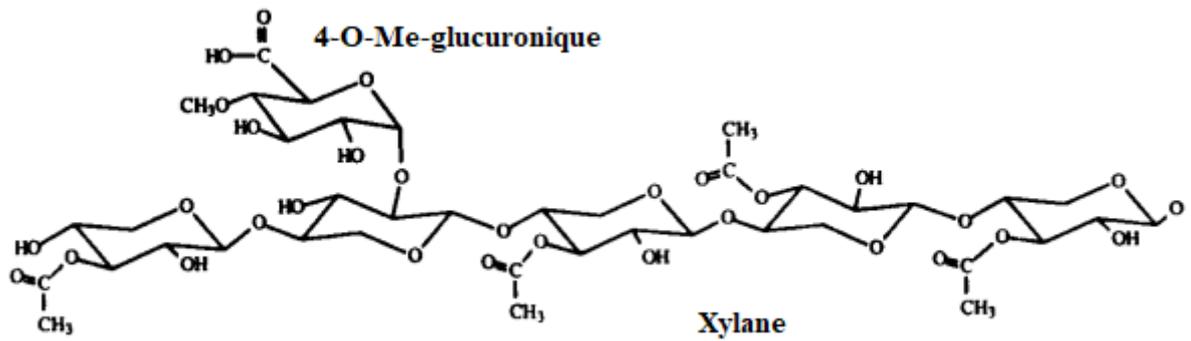
**Figure 2.** Structure de la cellulose (Wahlström, 2014)

## 1-2. Hémicelluloses

Les hémicelluloses sont des hétéropolymères de pentoses (D-xylose et L-arabinose), d'hexoses (D-mannose, D-glucose et D-galactose) et d'acides uroniques. Leur degré de polymérisation varie entre 70 et 200 selon la source (Fengel et Wegener., 1989). Ils sont groupés en xylanes, mannanes et xyloglucanes sur la base du sucre principal de la chaîne. Les xylanes et les mannanes sont les principaux groupes des hémicelluloses (Ebringerová et Heinze, 2000).

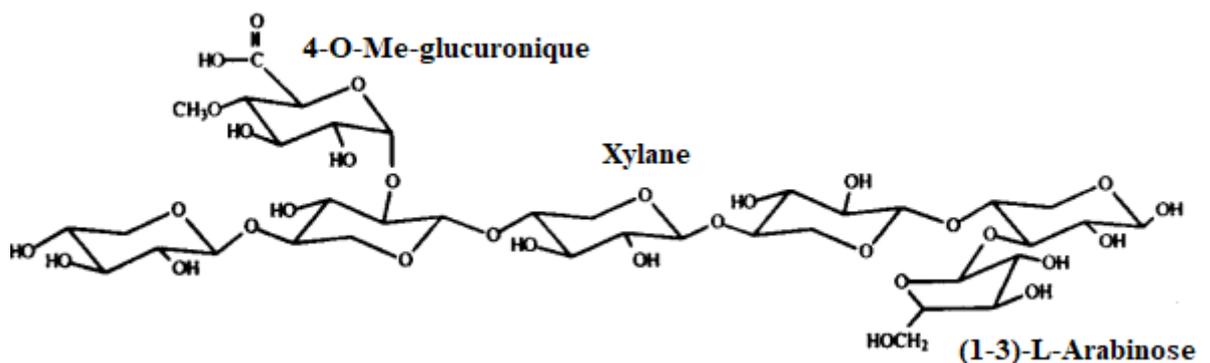
Le xylane est constitué d'une chaîne principale d'unité D-xylopyranoses liées par des liaisons  $\beta$ -1, 4-glycosidiques. A partir de la chaîne principale se ramifient des chaînes latérales de L-arabinose ou d'acide glucuronique (Ebringerová et Heinze, 2000).

Dans le bois dur, le xylane constitue 10-30% du bois. Il est substitué par des résidus d'acide méthylglucuronique à chaque dix unités de xylose et estérifié par des groupements acétyle (3,5-7 groupements acétyle par dix unités xylose) (Fig. 3) (Willför *et al.*, 2005a).



**Figure 3.** Structure du O-Acetyl-4-O-méthyl- D-glucuronoxylane du bois dur (Dekker, 1985).

Dans le bois tendre, le xylane représente 7-15% du bois. Il contient le substituant acide méthylglucuronique à chaque 5-6 résidus xylose et le substituants arabinose à chaque 8 résidus xylose (Fig. 4) (Willför *et al.*, 2005b).



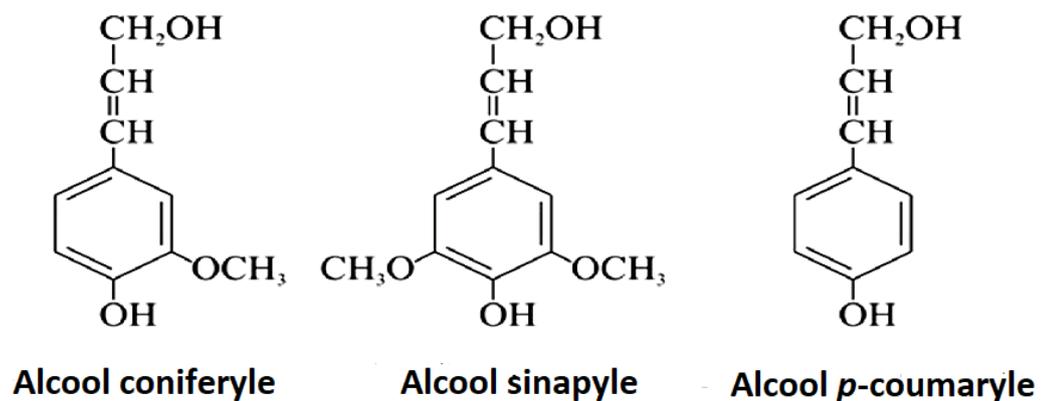
**Figure 4.** Structure de l'Arabino-4-O-méthylglucuronoxylane des gymnospermes (Dekker, 1985)

Chez les graminées, la proportion de xylane varie entre 20 et 50%. La chaîne principale est substituée par l'arabinose et l'acide glucuronique et des chaînes latérales d'oligosaccharides d'arabinose, xylose et galactose. L'acide férulique, de petites quantités d'acide *p*-coumarique et parfois de l'acide sinapinique sont estérifiées à l'arabinose ou aux chaînes d'oligosaccharides (Harris et Trethewey, 2010).

### 1-3. Lignine

C'est un polymère aromatique complexe abondant dans la nature. C'est un hétéropolymère tridimensionnel composé d'unités phényle propane méthoxylées, C'est une polymérisation de précurseurs de monolignols qui sont les alcools *p*-coumaryle,

coniferyle et sinapyle (Fig. 5). Dans la biomasse lignocellulosique, la lignine est liée aux polysaccharides soit par des liaisons éther ou des liaisons ester (Fengel et Wegener, 1989).



**Figure 5.** Précurseurs de la lignine (Jeffries, 1994).

#### 1-4. Enzymes lignocellulolytiques

La biomasse lignocellulosique est dégradée et utilisée dans la nature par l'action des microorganismes comme partie du cycle de carbone (Lynd *et al.*, 2002). Les mycètes et les bactéries produisent et synthétisent des enzymes nécessaires à cette dégradation. La cellulose est dégradée par un système d'enzymes appelées cellulases. D'autres études ont montré que les mécanismes oxydatifs participent à cette dégradation. L'hydrolyse de l'hémicellulose requiert les activités de plusieurs enzymes de types xylanases et mannanases. La lignine est modifiée et dégradée par des enzymes telles les laccases, les lignines peroxydases et les manganèse peroxydases (Hatakka, 1994).

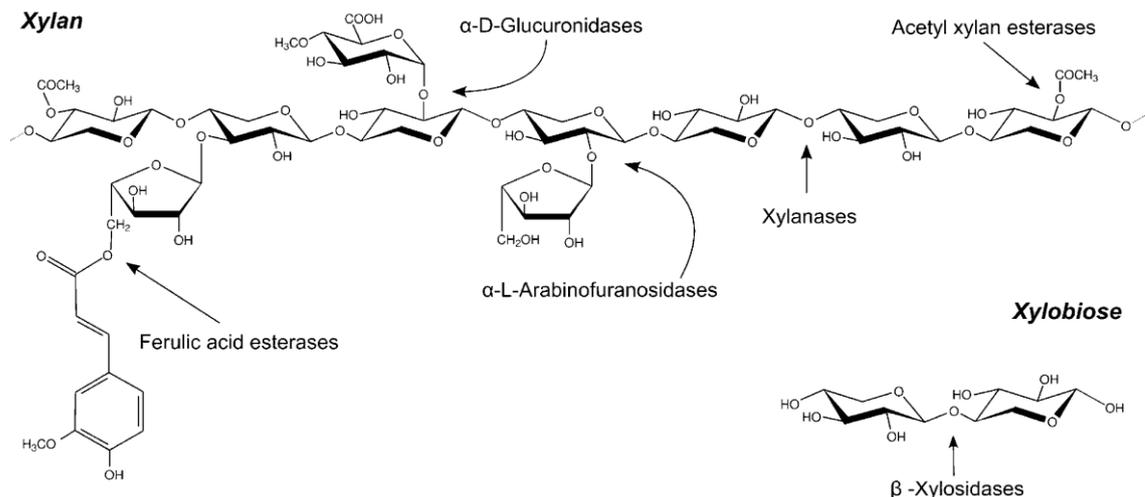
#### 2- Xylanases

##### 2-1. Généralités

Les xylanases sont des glycosides hydrolases (GH). Elles ont été classées dans différentes familles sur la base de similarités dans la conformation et le mécanisme réactionnel (Henrissat, 1991). 133 familles de glycoside hydrolases et 11 familles d'enzymes auxiliaires (AA) ont été identifiées et listées dans le Carbohydrate Active Enzyme database (CAZy) (Lombard *et al.*, 2014).

En raison de l'hétérogénéité et de la complexité de la nature chimique du xylane, sa dégradation complète nécessite l'action d'un complexe de plusieurs enzymes

hydrolytiques avec diverses spécificités et modes d'action (Figure 6). Ces enzymes sont divisées en enzymes de clivage de la chaîne principale, endo-1,4- $\beta$ -xylanases et 1,4- $\beta$ -D-xylosidase, et les enzymes de clivage des chaînes latérales ;  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase,  $\alpha$ -D-Glucuronidase, acide phénolique (acide férulique et *p*-coumarique) estérase et acétyl xylane estérase (Subramanian et Prema, 2002).



**Figure 6.** Mode d'action des xylanases. Ac: groupement acétyle;  $\alpha$ -Araf:  $\alpha$ -arabinofuranosidase;  $\alpha$ -4-O-Me-GlcA: acide  $\alpha$ -4-O-méthylglucuronique (Sunna et Antranikian, 1997).

- **Endo  $\beta$ -1,4 xylanase (EC 3.2.1.8)**

Elles catalysent l'hydrolyse des liaisons  $\beta$ -D-1,4 glycosidiques à l'intérieur du xylane. L'action des endoxylanases sur le xylane conduit à la libération de xylooligosaccharides et du xylose (Fig. 6) (Collins *et al.*, 2005).

- **$\beta$ -xylosidases (EC 3.2.1.37)**

Elles catalysent l'hydrolyse des unités xylose à l'extrémité non-réductrice des fragments xylooligomères (Fig. 6) (Shallom et Shohan, 2003). Différents types de xylosidases ont été caractérisées selon que leur action s'exerce sur le xylobiose, les xylooligosaccharides ou des polysaccharides contenant la xylose comme substituant (Wong *et al.*, 1988).

- **Enzymes de clivage des chaînes latérales**

Certaines de ces enzymes hydrolysent les liaisons glycosidiques au niveau de ces branches et elles incluent les  $\alpha$ -arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) et les  $\alpha$ -glucuronosidases (EC 3.2.1.139). D'autres hydrolysent les liaisons esters, comme les acétyl xylane estérases (EC 3.1.1.72) ainsi que les autres estérases des acides féruliques (EC 3.1.1.73), *p*-cumariques (EC 3.1.1.6) et phénoliques (Fig. 6) (Shallom et Shohan, 2003). L'action de ces enzymes libère le xylane des liaisons l'attachant aux autres hémicelluloses et au complexe lignocellulosique en général (Zilliox et Debeire, 1998).

## 2-2. Classification

Les xylanases sont classées sur la base de leurs propriétés physicochimiques en deux groupes où deux familles : la famille GH 10 (F), de poids moléculaire élevé (> 30 kDa) et point isoélectrique acide et la famille GH11 (G) de poids moléculaire faible (< 30 kDa) et de point isoélectrique basique (Collin *et al.*, 2005). Toutefois, certaines xylanases n'appartiennent pas à ces deux groupes (Collins *et al.* 2002, 2005).

Un système de classification plus complet a permis la classification des xylanases dans plusieurs familles et la plupart dans les familles GH10 (ou F) et GH11 (ou G). Ce système est basé sur les comparaisons de la structure primaire des domaines catalytiques des enzymes et des propriétés mécanistiques telles la cinétique, les propriétés catalytiques, la spécificité de substrat et les produits de la réaction enzymatique (Tab.1) (Henrissat et Coutinho 2001 ; Collins *et al.* 2005).

Les familles majeures de xylanases sont les familles GH 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51 et 62. Les familles GH 5, 7, 8, 10, 11 et 43 ont un seul domaine catalytique distinct alors que les xylanases des familles 16, 51 et 62 possèdent deux domaines catalytiques (Collins *et al.*, 2005). Les enzymes groupées dans les familles GH 9, 12, 26, 30 et 44 ont une activité xylanase secondaire (Bhardwaj *et al.* 2019).

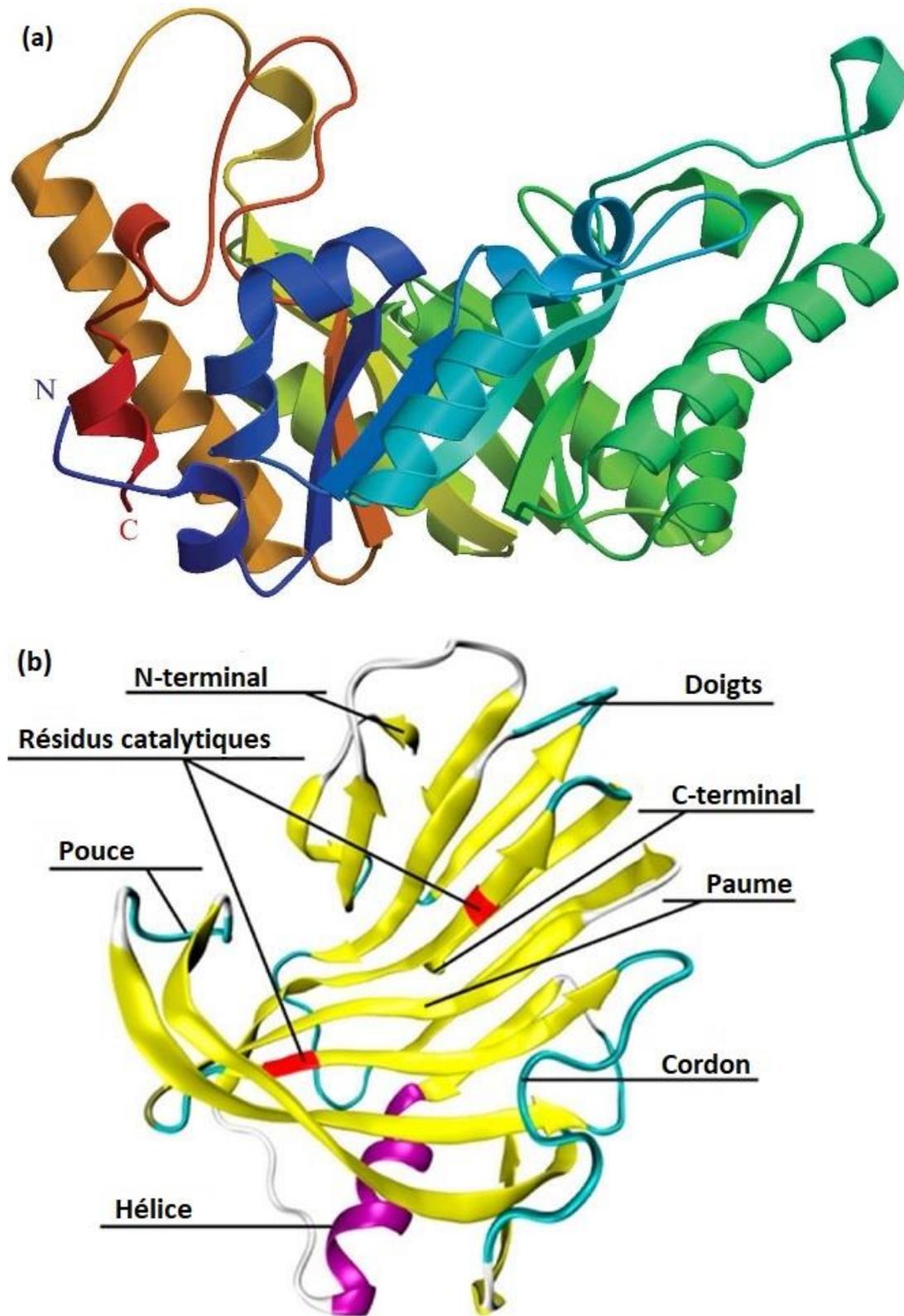
**Tableau 1.** Classification des enzymes xylanolytiques (Shallom et Shoham, 2003).

Enzymes	Substrats	EC	Familles
Endo $\beta$ -1,4-xylanase	$\beta$ -1,4-xylane	3.2.1.8	GH 5 8 10 11 43
Endo- $\beta$ -1,4-xylosidase	$\beta$ -1,4-xylooligomères Xylobiose	3.2.1.37	GH 3 39 43 52 54
$\alpha$ -L-Arabinofuranosidase	$\alpha$ -L-arabinofuranosyl (1-2) ou (1-3) xylooligomères	3.2.1.55	GH 3 43 51 54 62
$\alpha$ -Glucuronisidase	Acide 4-O-méthyl- $\alpha$ - glucuronique (1-2) xylooligomères	3.2.1.139	GH 67
Acétyl xylane estérase	2- ou 3-O-acétyl Xylane	3.1.1.72	CE 1 2 3 4 5 6 7
Acides ferulique et <i>p</i> coumarique estérases		3.1.1.73	CE 1

### 2-3. Structures

Des structures tridimensionnelles ont été décrites pour environ 87 familles de xylanases (Sa-Pereira *et al.*, 2003). Le repliement structural des xylanases de la famille 10 est  $(\alpha/\beta)_8$  barrel (Fig. 7a) et celui des xylanases de la famille 11 est  $\beta$ -jelly roll (Fig. 7b) (Collins *et al.*, 2005). La forme des xylanases de la famille GH11 ressemble à la forme d'une main gauche dans laquelle on peut distinguer un pouce, des doigts, une paume, un cordon et une seule hélice  $\alpha$  (Fig. 7b). Le pouce exerce un profond effet sur la liaison et l'hydrolyse du substrat (Paës *et al.*, 2007 ; Pollet *et al.*, 2009). Les doigts constituent une poche pour la liaison du substrat. La paume est le lieu des résidus catalytiques glutamate et acide glutamique (Macleod *et al.*, 1994). Le cordon régule l'entrée du substrat au site actif et des mutations dans l'hélice  $\alpha$  conduisent à la stabilité thermique de l'enzyme (Turunen *et al.*, 2001).

Des domaines fonctionnels et d'autres non fonctionnels reliés par des régions riches en acides aminés hydroxylés peuvent être distingués dans les structures des xylanases. Les xylanases plus volumineuses tels les enzymes de la famille GH10 contiennent plus de domaines fonctionnels ou non que celle de la famille GH11 (Collins *et al.*, 2005). Parmi ces domaines, ils existent les domaines catalytiques (DC) et les domaines de liaison aux carbohydrates (CBD).



**Figure 7.** (a) Xylanase GH10 de *Geobacillus stearothermophilus* (Solomon *et al.*, 2007) et (b) Xylanase GH11 de *Trichoderma longibrachiatum* (Jaeger et Pfaendtner, 2013).

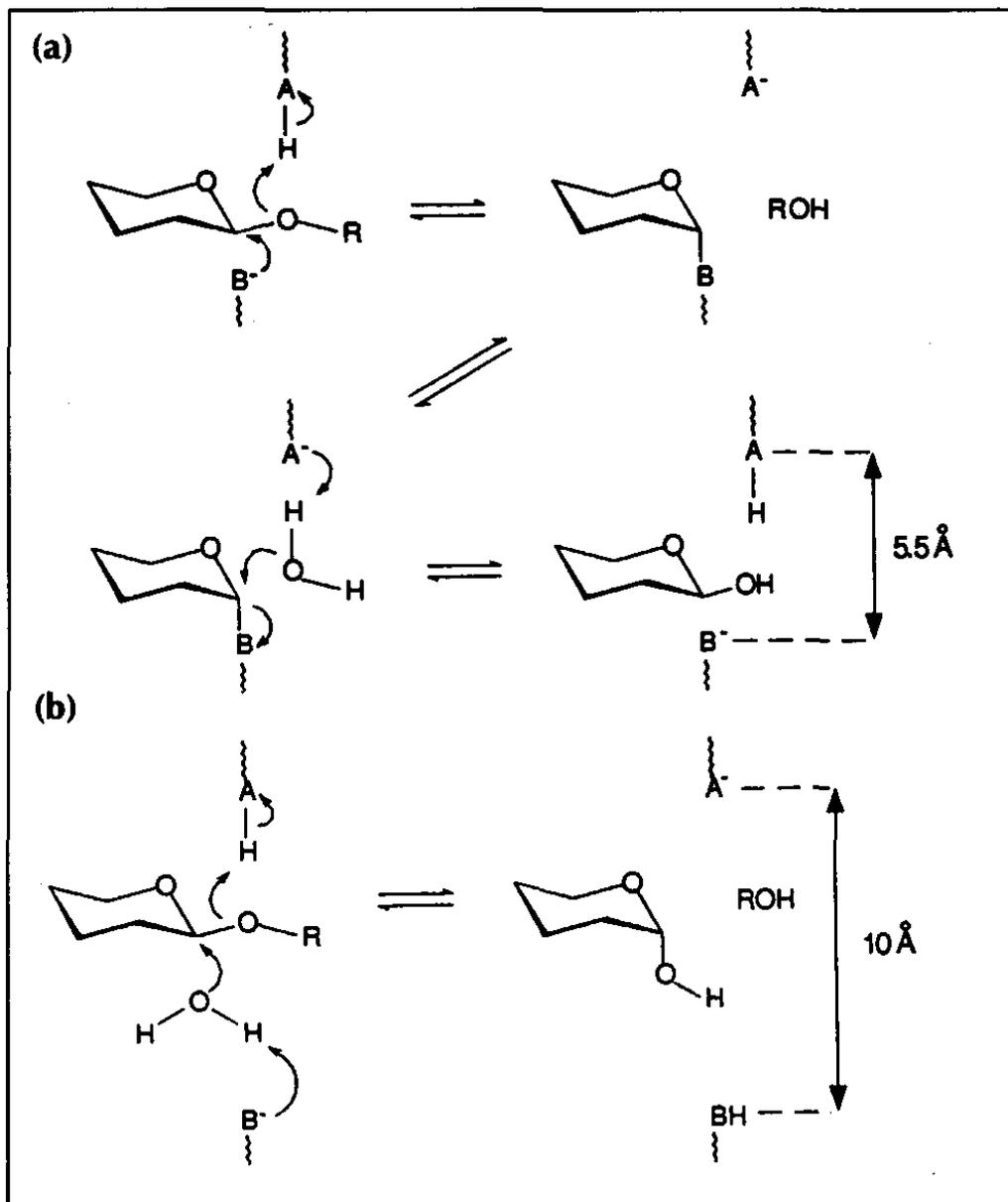
Les familles GH 5, 7, 8, 10, 11 et 43 ont un seul domaine catalytique distinct, alors que les xylanases des familles 16, 51 et 62, deux domaines catalytiques (Collins *et al.*, 2005).

Deux types de domaines de liaison aux carbohydrates (CBM) ont été retrouvés dans les structures des xylanases ; les domaines de liaison aux xylane (XBM) (Black *et al.*, 1995 ; Ali *et al.*, 2001) et les domaines de liaison à la cellulose (CBM). Les XBM augmentent l'activité de l'enzyme dans son attaque du xylane insoluble (Black *et al.*, 1995 ; Ali *et al.*, 2001, Mangala *et al.*, 2003), bien que certains XBMs se lient au xylane soluble (Meissner *et al.*, 2000 ; Kittur *et al.*, 2003). Les domaines de liaison à la cellulose (CBM) confèrent à l'enzyme la capacité de se fixer aux parois végétales (Ali *et al.*, 2001).

### 2-4. Mécanismes d'action

Deux mécanismes d'hydrolyse du xylane à savoir le mécanisme par inversion et le mécanisme par rétention sont connus chez les xylanases (Subramaniyan et Prema 2002 ; Lombard *et al.* 2014).

Le mécanisme par rétention est un mécanisme de déplacement double, dans lequel des résidus glutamates jouent un rôle vital dans la catalyse (Fig. 8a). Il se déroule en deux étapes. Dans la première (premier déplacement), l'action de deux acides carboxyliques présents dans le site actif aboutit à la formation d'un intermédiaire covalent enzyme- $\alpha$ -glycosyle. Ce dernier est formé après protonation du substrat par l'un des résidus acides carboxyliques, qui agit comme catalyseur acide-base, en donnant un proton à l'oxygène lié au carbone C-4 du xylose dans le glycosyle partants, et attaque nucléophile sur le carbone C-1 du xylose dans le glycosyle restant par l'autre résidu carboxylique aboutissant à la formation d'une liaison covalente. Ces deux actions conduisent ensemble à la rupture de la liaison glycosidique et à l'inversion de la configuration  $\beta$  en configuration  $\alpha$ . Dans la deuxième étape (deuxième déplacement), le premier groupe carboxylique arrache un proton à une molécule d'eau et le groupement hydroxyle est transféré au carbone anomérique qui inverse sa configuration de  $\alpha$  à  $\beta$  via un état de transition de l'ion oxocarbonium. Cette étape conduit à l'hydrolyse de la liaison covalente entre l'enzyme et l'intermédiaire (Collins *et al.* 2005 ; Lombard *et al.* 2014). Les enzymes des familles GH 5, 7, 10 et 11 agissent par ce mécanisme (Bhardwaj *et al.*, 2019).



**Figure 8.** Mécanismes d'action des glycoside hydrolases. (a) mécanisme par rétention, (b) mécanisme par inversion (Davies et Henrissat, 1995).

Dans le mécanisme par inversion, la catalyse se déroule en un seul déplacement des substrats et les résidus aspartate et glutamate jouent un rôle clé dans les réactions (Fig. 8b) (Bhardwaj *et al.*, 2019). Un résidu carboxylique transfère un proton au carbone C-4 du groupe de sucres partants, tandis que le groupement hydroxyle de l'eau est transféré au carbone anomérique pour rompre la liaison glycosidique et cause l'inversion de la configuration du carbone anomérique (Collins *et al.*, 2005 ; Lombard *et al.*, 2014).

### 2-5. Sources

Les xylanases sont ubiquitaires, elles sont retrouvées dans une large variété d'organismes vivants tels les bactéries marines, terrestres et du rumen (Chakdar *et al.*, 2016), les mycètes thermophiles et mésophiles (Chadha *et al.*, 2019), les protozoaires (Devillard *et al.*, 1999 ; Béra-Maillet *et al.*, 2005), les crustacés (Izumi *et al.*, 1997), les insectes (Brennan *et al.*, 2004), les algues (Jensen *et al.*, 2018) et les graines des plantes (Bae *et al.*, 2008 ; Sizova *et al.* 2011). Les xylanases des bactéries et des mycètes sont les plus utilisées en industries (Bhardwaj *et al.*, 2019). Chez les moisissures, les xylanases sont fréquemment isolées à partir des genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Trichoderma*. Chez les bactéries, elles sont souvent isolées à partir de *Streptomyces* chez les actinobactéries et les genres *Bacillus* et *Clostridium* chez les autres bactéries (Bhardwaj *et al.*, 2019).

Les microorganismes producteurs de xylanases ont été isolés à partir d'environnements naturels doux ou extrêmes. Ainsi, les lacs d'eau douce et les sols sont des sources de xylanases thermostables (Dhillon *et al.*, 2000), ou alcalinostables (Nakamura *et al.*, 1993). Certaines xylanases thermostables ont été isolées à partir de sources thermales (Morris *et al.*, 1999), de sols géothermaux (Lama *et al.*, 2004) de sédiments d'estuaire (Khandeparkar et Bhosle, 2006) et de composts (George *et al.*, 2001). Certaines xylanases alcalinostables ont été isolées à partir de lacs salés (Mamo *et al.*, 2006) et de sols alcalins (Kohli *et al.*, 2001).

Les matières et les effluents des industries transformant des matières hémicellulosiques sont également des sources de microorganismes xylanolytiques. Ces microorganismes ont été isolés de matières premières (Subramaniyan *et al.*, 1997), de pulpes cellulosiques (Yang *et al.*, 1995), des eaux de lavage (Ratanakhanokchai *et al.*, 1998) et des résidus résultant du traitement de ces pulpes (Adamsen *et al.*, 1995).

### 2-6. Applications

L'hydrolyse enzymatique offre plusieurs avantages dans les traitements physicochimiques : 1) Pas de nécessité d'utiliser des équipements de traitement résistants à la corrosion, 2) génération de peu de déchets, 3) formation de moins de produits secondaires tel le 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) qui peut être nocif pour les traitements

en amont (Binder et Raines, 2010 ; Dadi, *et al.*, 2006). D'autres bénéfiques incluent la possibilité de conversion presque complète du polysaccharide (Wyman *et al.*, 2005).

Les processus industriels impliquant la transformation de matières riches en xylane sont caractérisés par des conditions physicochimiques différentes. Par conséquent, les xylanases appliquées dans ces industries doivent avoir des propriétés physicochimiques adaptées aux conditions industrielles.

En industrie de papeterie, les xylanases contribuent à l'obtention de papier de meilleure qualité en dégradant le xylane contenu dans la pâte à papier lignocellulosique. Cette application nécessite des xylanases actives et stables aux températures et pH élevés (Walia *et al.*, 2017).

En panification, elles peuvent solubiliser l'arabinoxylane dans la pâte et aide ainsi à une distribution uniforme de l'eau et améliore la formation du réseau de gluten (Courtin et Delcour 2002). Ces qualités seront obtenues avec des xylanases psychrophiles ou mésophiles qui exercent leur action au cours du processus de préparation de la pâte ou par des enzymes thermophiles agissant pendant le processus de fermentation (Collins *et al.*, 2002 ; Courtin et Delcour, 2002).

Des xylanases mésophiles, acidophiles, neutrophiles ou alcalinophiles, peuvent également être appliquées dans l'extraction du café, de l'amidon ou des huiles végétales. Elles peuvent être appliquées dans la clarification des jus de fruits bruts. Ces derniers contiennent des polysaccharides tels la cellulose, l'hémicellulose, l'amidon, la pectine et la lignine, qui réduisent la qualité du jus en lui conférant une viscosité élevée ou une couleur brumeuse (Kulkarni *et al.*, 1999).

Ces enzymes peuvent également être utilisées dans l'extraction de certains produits d'intérêt alimentaire ou pharmaceutique. Ainsi, des acides lactiques et acétiques, des arômes ou des sucres peuvent être extraits de certaines matières après dégradation du xylane (Yoon *et al.*, 2006).

Une application récente des xylanases est leur rôle dans le processus de production de bioéthanol à partir de matières lignocellulosiques. La dégradation enzymatique du xylane accélère le processus de fermentation de ces matières en éthanol (Gray *et al.*, 2006).

### 3- Production de xylanases

La production des xylanases par les microorganismes dépend du processus de fermentation utilisé, du choix de substrat, des composés du milieu et des paramètres de culture. Ces facteurs sont déterminés par différents processus d'optimisation (Bhardwaj *et al.*, 2019).

#### 3-1. Technique de culture

Deux techniques sont utilisées : la fermentation submergée où la croissance est le résultat de la dégradation du xylane en solution et la fermentation sur substrat solide où le microorganisme se développe sur le xylane à l'état solide (Motta *et al.*, 2013). Le choix de la technique dépend du type de microorganismes. Les bactéries requièrent une grande quantité d'eau, par conséquent la fermentation submergée est préférée alors que les mycètes qui nécessitent moins d'humidité due à leur structure mycélienne donnent de meilleurs résultats dans une fermentation à l'état solide (Walia *et al.*, 2017). Plusieurs travaux suggèrent que la fermentation submergée utilisant des bactéries et des mycètes est la technique préférée pour la production de xylanases ((Bhardwaj *et al.*, 2019).

La fermentation submergée présente plusieurs avantages notamment un meilleur contrôle des conditions d'aération, de pH, de température, une meilleure consommation du xylane utilisé et un effet synergétique des enzymes xylanolytiques. Par ailleurs ce type de fermentation peut être adaptée à grande échelle (Polizeli *et al.*, 2005). Comme inconvénients, on peut citer les problèmes d'inhibition par les produits de dégradation, la lourdeur des procédés de récupération des xylanases et l'utilisation de grands volumes de milieu de culture (Virupakshi *et al.*, 2005).

Les principaux avantages de la fermentation à l'état solide sont : La simplicité de mise en œuvre, l'utilisation de petits volumes et de quantités réduites de substrats, l'obtention d'un extrait enzymatique hautement concentré et une réduction de l'inhibition par les produits de dégradation et les protéases. Comme inconvénients, cette technique n'est pas adaptée pour tous les microorganismes, elle requiert un contrôle propre de l'aération et de l'humidité d'autres part, le transfert de la technique à l'échelle industrielle est fastidieux (Mienda *et al.*, 2011).

### 3-2. Substrats pour la production de xylanases

Il existe différents types de xylanes commercialisés qui sont extraits de différentes sources végétales (xylane de bouleau, xylane de hêtre, xylane d'avoine...). Cependant, vu leur prix élevé, les scientifiques cherchent à trouver des substrats alternatifs peu onéreux pour la production de xylanases. A cet effet, les déchets agroalimentaires et organiques, domestiques et industriels sont utilisés comme source de carbone pour la production de xylanases. Les résidus agroalimentaires les plus communément utilisés sont le son de blé (Kumar *et al.* 2018), la paille de blé (Yang *et al.*, 2005), la paille de riz (Bhardwaj *et al.* 2017), la bagasse de la canne à sucre (Suleman et Aujla 2016). On peut citer également la noix de coco (Rosmine *et al.* 2019), la coquille d'arachide (Namasivayam *et al.* 2015), la pâte de bois (Kalpana et Rajeswari 2015), la sciure de bois (Sindhu *et al.* 2017), l'épis de maïs et la mélasse, (Bandikari *et al.* 2014).

### 3-3. Composants de milieu de culture pour la production de xylanases

Le xylane est le meilleur inducteur de xylanases (Taibi *et al.*, 2012 ; Guleria *et al.*, 2013 ; Boucherba *et al.*, 2011). Toutefois, le poids moléculaire élevé de ce polysaccharide empêche sa pénétration à l'intérieur de la cellule. Par conséquent, des xylanases constitutives sont produites en petite quantité dans le milieu et dont l'action aboutit à la génération de fragments de faibles poids moléculaires tels le xylobiose, le xylotriose, le xylotétraose et le xylose. Ces derniers induisent à leur tour la production de xylanases (Walia *et al.*, 2017).

La source d'azote affecte le développement du microorganisme et par conséquent la production des xylanases. Le type et la quantité de ce nutriment sont des facteurs importants dans la production (Seyis et Aksoz 2005 ; Naveen *et al.* 2014). D'autres facteurs importants dans la production de xylanases sont les microéléments, les acides aminés et les vitamines (Simair *et al.*, 2010 ; Bibra *et al.*, 2018). L'addition des biosurfactants tel Tween 80 s'est révélée également efficace dans l'augmentation de la production de xylanases (Liu *et al.*, 2006).

### **3-4. Paramètres physiques pour la production de xylanases**

Durant la fermentation submergée, les paramètres physiques à optimiser sont la température, le pH, l'aération, la taille de l'inoculum et le temps d'incubation (Walia *et al.*, 2017). En fermentation solide il faut optimiser la taille des particules de substrat, le prétraitement du substrat, l'humidité, l'activité de l'eau, le type et la taille de l'inoculum (Behera et Ray 2016 ; Behnam *et al.*, 2016 ; Leite *et al.*, 2016).

### **3-5. Approches biotechnologiques pour la production de xylanases**

Les xylanases natives sont généralement produites en faibles quantités et ne possèdent pas toutes les propriétés requises pour des application industrielles (Ahmed *et al.*, 2009). Pour ces raisons, des approches biotechnologiques différentes sont utilisées pour améliorer le rendement de la production et l'introduction de caractéristiques à l'enzyme. Ces approches incluent la mutagenèse physique (Rahim *et al.*, 2009 ; Abdel-Aziz *et al.* 2011) ou chimique (Haq *et al.* 2004, 2008) et la technologie de l'ADN recombinant (Nevalainen et Peterson 2014 ; Verma *et al.*, 2013).

## **4- Prétraitement de la matière lignocellulosique**

### **4-1. Traitements conventionnels**

La biomasse lignocellulosique est très récalcitrante à l'hydrolyse enzymatique en raison de 1) la complexité et la structure serrée des principaux polymères ; cellulose, hemicellulose et lignine ; 2) la cristallinité de la cellulose ; 3) la réduction de la surface de liaison de l'enzyme ; 4) la faible solubilité dans les solvants conventionnels et la présence des inhibiteurs enzymatiques (Chandra *et al.*, 2007). Par conséquent, des prétraitements excessifs du substrat sont nécessaires avant l'hydrolyse enzymatique.

Les prétraitements conventionnels sont divisés en général en processus physiques, chimiques, biologiques, ou leur combinaison (Chandra *et al.*, 2007). Les prétraitements physiques comprennent différents types de broyage, réduisant la taille des particules et la cristallinité de la cellulose en même temps que l'augmentation de la surface. Les traitements chimiques sont basés sur des traitements par des acides et des bases qui se débarrassent de l'hémicellulose et la lignine. La cristallinité de la cellulose peut être modifiée par traitement avec des solvants gonflants ou dissolvant la cellulose. Les traitements physicochimiques incluent l'explosion à la vapeur ou l'ammoniaque glacé et

la percolation par recyclage de ce dernier. Enfin, les traitements biologiques utilisent les mycètes dégradant typiquement le bois, mais le temps de traitement long (10-14 jours) et la nécessité d'un espace large rendent ce traitement non attractif (Larsen *et al.*, 2012).

Tous les traitements physicochimiques ont pour inconvénients la consommation d'énergie et la formation de produits secondaires indésirables, faits qui les rendent d'un point de vue économique et environnemental non utilisables pour une hydrolyse totale (Engel *et al.*, 2010).

### **4-2. Bases structurales de la stabilité des xylanases**

Les industries de transformation des matières lignocellulosiques sont caractérisées en général par la prévalence de températures élevées et de pH acide ou alcalin. Par conséquent, les xylanases appliquées dans ces industries doivent être hautement actives et stables dans ces conditions (Malhotra et Chapadgaonkar, 2018).

Plusieurs propriétés structurales intrinsèques sont responsables de la grande stabilité thermique de l'enzyme. La présence de ponts disulfures et ioniques, de chaînes hydrophobes latérales, de résidus proline N-terminal rigidifient la structure de la protéine et renforcent sa stabilité aux températures élevées (Turunen *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2015). La présence d'un grand rapport Thr/Ser et un grand nombre de résidus chargés, Arg par exemple, augmente les interactions polaires et améliore la stabilisation de l'hélice alpha et des structures secondaires (Hakulinen *et al.*, 2003). Les xylanases hautement actives aux pH alcalins ou acide présentent un nombre élevé de résidus acides chargés (Mamo *et al.*, 2009 ; Fushinobu *et al.*, 1998).

### **4-3. Traitement par liquides ioniques**

Les liquides ioniques (LIs) sont des sels avec des points de fusion au-dessous de 100°C, typiquement composés d'un grand cation organique et d'un petit anion inorganique (Sun *et al.*, 2011). Ils sont souvent appelés des solvants verts en raison de leur faible pression de vapeur, éliminant ainsi toute émission de composés organiques volatiles (COVs) (van Rantwijk et Sheldon, 2007 ; Yang et Pan, 2005), ainsi que leur très faible toxicité (Patel *et al.*, 2014). En plus, les LIs sont considérés comme étant stables thermiquement et chimiquement, leur polarité et hydrophobicité peuvent être ajustées en choisissant correctement les ions. Ces propriétés leur confèrent une efficacité de solvant pour une large variété de composés (Anderson *et al.*, 2002).

En raison de leurs structures complexes, les LIs sont capables d'interagir avec les solutés via une grande variété d'interactions incluant la liaison hydrogène, les interactions dipolaires et ionique/charge-charge (Anderson *et al.*, 2002).

Les LIs peuvent être acides, basiques ou neutres selon la composition de leurs ions. Les LIs acide-base peuvent être distillés s'il y'a un équilibre entre la forme LI et l'acide et la base conjugués, e.g. dans un liquide ionique avec un anion basique faible et un cation possédant un proton échangeable (MacFarlane *et al.*, 2006).

Certains LIs sont prometteurs dans le prétraitement de la biomasse lignocellulosique en raison de leur capacité à dissoudre ce substrat. Le composé cellulosique peut être précipité de la solution de LI par l'addition d'un anti-solvant, tel l'eau ou l'alcool, et il devient ainsi très sensible à l'hydrolyse enzymatique (Dadi *et al.*, 2006).

Le prétraitement par les LIs augmente la digestibilité des substrats par trois effets : 1) la décrystallisation ou la transformation de la cristallinité de la cellulose (Bian *et al.*, 2014), 2) l'élimination de l'hémicellulose et de la lignine (Hou *et al.*, 2012) et 3) la dépolymérisation partielle de la cellulose (Singh *et al.*, 2009).

La régénération de la cellulose après un traitement par les LIs pour une hydrolyse enzymatique totale nécessite un lavage intensif du substrat. Malgré cela, des quantités résiduelles de liquide ionique persistent dans le substrat ; il a été montré qu'elles causent de sévères inactivation aux cellulases et inhibent la conversion microbienne en amont (Hong *et al.*, 2012 ; Zhao *et al.*, 2009a).

#### **4-4. Effet des liquides ioniques sur les enzymes**

Les LIs hydrophobes stabilisent les enzymes alors que ceux de nature hydrophile sont hautement déstabilisants (Zhao, 2010 ; Gao *et al.*, 2015). Ils affectent l'activité et la stabilité de l'enzyme (Yang, 2009 ; Zhao, 2016). Dans les solutions aqueuses diluées, les LIs hydrophiles deviennent au moins partiellement dissociés et les ions hydratés interagissent individuellement avec l'enzyme (Zhao, 2016).

Différents mécanismes d'inhibition enzymatiques sont observés dans les solutions de LIs : compétitive (Li *et al.*, 2013 ; Anbarasan *et al.*, 2017), incompétitive (Goswami *et al.*, 2016), non-compétitive pure (Carneiro *et al.*, 2009 ; Stevens *et al.*, 2019) et mixte

(Lau *et al.*, 2004). Les LIs déstabilisent les enzymes via la perturbation des structures secondaires de la protéine (Lau *et al.*, 2004 ; Jaeger *et al.*, 2015).

Dans les solutions diluées de LIs, l'effet kosmotrope (les séries de Hofmeister) des ions peut être applicable : les anions kosmotropiques et les cations chaotropiques favorisent l'action de l'enzyme, alors que les anions chaotropiques et les cations kosmotropiques le défavorisent (Zhao, 2016). L'hydrophobicité des ions et la polarisabilité des anions sont parmi les facteurs impliqués dans l'effet kosmotropique sur l'activité et la stabilité des enzymes dans les solutions aqueuses de LIs (Yang, 2009 ; Zhao, 2016 ; Sun *et al.*, 2017 ; Heitz *et al.*, 2018). Toutefois, le fonctionnement de certaines enzymes dans les LIs ne suit pas les séries de Hofmeister (Yang, 2009 ; Zhao ; 2016).

#### **4-5. Tolérance des xylanases aux liquides ioniques**

Les enzymes lignocellulolytiques des procaryotes extrêmophiles présentent une extrême tolérance vis-à-vis de la chaleur, des acides, des bases et des sels (Zhang *et al.*, 2011 ; Ilmberger *et al.*, 2012 ; Li *et al.*, 2018). L'utilisation des enzymes thermophiles a été l'une des stratégies adoptées pour promouvoir la tolérance des enzymes aux LIs (Zhang *et al.*, 2011 ; Ilmberger *et al.*, 2012 ; Rahikainen *et al.*, 2017).

Certaines endoxylanases de microorganismes hyperthermophiles sont tolérantes aux LIs (Chawachart *et al.*, 2014 ; Yu *et al.*, 2016 ; Anbarasan *et al.*, 2017 ; Rahikainen *et al.*, 2017). En général, les xylanases de la famille GH10 sont plus tolérantes au liquide ionique 1-ethyl-3-methylimidazolium acétate ([EMIM]OAc) et d'autres LIs que les xylanases de la famille GH11 (Chawachart *et al.*, 2014 ; Li et Turunen, 2015 ; Yu *et al.*, 2016 ; Rahikainen *et al.*, 2017). Cependant, la stabilité thermique des enzymes thermophiles n'est pas le seul facteur dans la tolérance aux LIs (Li *et al.*, 2013 ; Chawachart *et al.*, 2014 ; Rahikainen *et al.*, 2017). L'inhibition compétitive joue un rôle clé dans l'inhibition des xylanases thermophiles par les LIs (Li *et al.*, 2013 ; Chawachart *et al.*, 2014 ; Anbarasan *et al.*, 2017). Une affinité élevée de l'enzyme pour le substrat contribue à la diminution de cette inhibition (Anbarasan *et al.*, 2017).

L'inactivation de l'endoglucanase thermostable de *Acidothermus cellulolyticus* dans les LIs se déroule en deux étapes. L'inactivation commence par une inhibition compétitive rapide et réversible à toutes les concentrations du LI suivie par une

dénaturation lente et irréversible de la protéine après une longue période d'incubation à des concentrations en LI élevées (> 5%) (Summers *et al.*, 2017). Cette inactivation biphasique a été également observée chez des xylanases (Li *et al.*, 2013 ; Jaeger et Pfaendtner, 2013).

# **Chapitre 2 :**

## **Matériel et Méthodes**

### 1- Isolement, sélection et identification d'une souche xylanolytique

Des échantillons de fiente de volaille sont collectés dans un poulailler de la commune d'Akbou (Béjaia). Dix grammes d'échantillon sont suspendus dans 500 ml d'une solution à 0.85% NaCl. Une série de dilutions jusqu'à  $10^{-6}$  est préparée, puis 0.1 ml de chaque dilution est étalé sur un milieu solide à base de xylane de Viet et al. (1991), modifié, composé (g/l) de : xylane de hêtre 7 g, extrait de levure 2 g, NaCl 5 g, NH<sub>4</sub>Cl 5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g et agar 15 g. Le milieu est ajusté à pH 7. Les milieux sont incubés à 37°C pendant 2 à 5 jours.

#### 1-1. Sélection

Elle s'est effectuée en 2 étapes. Dans une première sélection, des souches xylanolytiques sont sélectionnées sur la base de la formation de zones claires autour des colonies. Elles sont purifiées par repiquages successifs sur le même milieu solide. Les souches pures sont conservées à 4°C en gélose nutritive inclinée.

La seconde sélection est basée sur la mesure de l'activité xylanase dans un milieu liquide. Les souches sélectionnées dans la première étape sont cultivées dans le même milieu liquide à pH 7 et 37°C. Après 2 jours d'incubation, les surnageants de cultures sont récupérés par centrifugation à 10000 rpm pendant 10 min, à 4°C.

#### 1-2. Identification de la souche sélectionnée

Les tests physiologiques et biochimiques sont effectués selon les méthodes conventionnelles d'identification (Renaud *et al.*, 2000).

##### 1-2.1. Observations microscopiques

La culture âgée de 24 h et 48h a fait l'objet d'une coloration de Gram. La mobilité est déterminée par examen microscopique de la souche à l'état frais entre lame et lamelle et par observation de la croissance dans le milieu mannitol mobilité. La coloration des spores est réalisée selon la méthode de Schaeffer et Fulton sur la culture âgée de 24h, 48h et 72h (Renaud *et al.*, 2000).

### 1-2.2. Tests physiologiques et biochimiques

La souche a fait l'objet d'étude des caractères suivants selon les méthodes classiques préconisées (Renaud *et al.*, 2000) :

- Le type respiratoire
- Les voies fermentaires (réaction de Voges-Proskauer et la réaction au rouge de méthyle)
- La production d'indole et de sulfure d'hydrogène
- L'utilisation du citrate
- La croissance à différentes températures (25 à 50°C), différents pH (4 à 12) et différentes concentrations de NaCl (0,5 à 18%) par mesure de l'absorbance à 600 nm.

Les tests biochimiques portent sur la recherche de la catalase, de l'oxydase, de l'uréase, du nitrate réductase et du tryptophane désaminase.

### 1-2.3. Analyse du gène de l'ARN ribosomal 16S

La séquence complète du gène de l'ARNr 16S est déterminée par séquençage de l'ADNr 16S amplifié par PCR. Toutes les étapes ont été réalisées au niveau de DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)

L'extraction de l'ADN génomique est réalisée en utilisant le kit de purification de l'ADN des Gram positif MasterPure™ (Epicentre Biotechnologie) suivant les instructions du fabricant. L'amplification par PCR de l'ADNr 16S et la purification des produits de la PCR sont effectuées comme décrit par Rainey *et al.*, (1996). Les produits de la PCR sont séquencés en utilisant le kit CEQ™DTCS-Quick start (Beckmann Coulter) selon les instructions du protocole. Les séquences ont fait l'objet par la suite d'une électrophorèse en utilisant le système d'analyse génétique CEQ™8000.

Les données de la séquence résultante sont introduites dans l'éditeur d'alignement ae2. La séquence est alignée manuellement et comparée à des séquences de gène d'ARNr 16S représentatifs d'organismes appartenant aux actinobactéries. Pour la comparaison, les séquences sont obtenues à partir des bases de données EMBL, RDP ou DSMZ (Maidak *et al.*, 1999).

## 2- Activité enzymatique

### 2-1. Mesure de l'activité

L'activité xylanase est déterminé dans 2 ml de mélange réactionnel contenant 0.2 ml d'une dilution appropriée de l'enzyme ou du surnageant de la culture de la souche sélectionnée et 1.8 ml d'une solution 1% (p/v) de xylane de hêtre. Le substrat est dissous dans 50 mM de tampon citrate-phosphate à pH 6 pour TfXYN10A et à pH 6.5 pour DtXYNB et DtXYNB-DS (pH optimum des enzymes). Le tampon phosphate de sodium à pH 7 est utilisé pour mesurer l'activité xylanase de la souche sélectionnée. 0.1 mg/ml de BSA sont utilisés comme stabilisateur dans le mélange réactionnel pour prévenir la liaison non spécifique de l'enzyme aux parois du tube. Les mélanges sont incubés à 70°C pour la TfXYN10A, DtXYNB et DtXYNB-DS et à 50°C pour les xylanases de la souche sélectionnée pendant 30 min. La réaction est arrêtée par addition de 3 ml de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) puis portée à ébullition pendant 5 min (Miller, 1959 ; Bailey *et al.*, 1992).

Dans les réactions avec 4% de substrat ou 35% de liquide ionique, l'activité enzymatique est mesurée dans 1ml de mélange réactionnel. La réaction est arrêtée par addition de tampon froid et les sucres réducteurs sont mesurés par la méthode au DNS.

Dans les mélanges témoins, les enzymes ne sont ajoutées qu'après incubation et ajout du DNS. La lecture des absorbances est effectuée à 540 nm, au spectrophotomètre SHIMADZU UVmin-1240V.

La concentration des sucres réducteurs a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage et les activités enzymatiques sont calculées d'après la relation suivante (Baily *et al.*, 1992) :

$$\text{Activité enzymatique (UI)} = \frac{(C_x - C_t) \times D}{V \times t}$$

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

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

D: Facteur de dilution

V: Volume réactionnel

t: Temps d'incubation (minutes)

Une unité (UI ou  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) de l'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer une  $1 \mu\text{mole}$  d'équivalente xylose par minute dans les conditions expérimentales mentionnées ci-dessus.

### **2-2. Dosage des protéines**

La concentration des protéines dans les échantillons est déterminée selon la méthode de Bradford (1976).

#### **2-2.1. Macrométhode**

Elle permet le dosage de concentration de protéines comprise entre 0,1 et 1mg/ml. L'échantillon protéique (100 $\mu\text{l}$ ) est mélangé au réactif de Bradford (5ml), et le mélange est placé pendant 10min à l'obscurité. L'absorbance du mélange est mesurée à 595nm et la concentration des protéines est déterminée par interpolation linéaire sur courbe d'étalonnage réalisé avec l'albumine de sérum bovin (0,1 à 0,5mg/ml) (Fig. S15 de l'annexe I).

#### **2-2.2. Microméthode**

Elle permet la mesure de la concentration de solutions protéiques comprises entre 2 et 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . 800  $\mu\text{l}$  de la solution protéique sont ajoutés à 200  $\mu\text{l}$  de réactif de Bradford et le mélange est laissé 10min à l'abri de la lumière. La concentration des protéines correspondante est estimée par interpolation linéaire sur une courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration, réalisée avec l'albumine de sérum bovin (2 à 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Fig. S16 de l'annexe I).

### **3- Optimisation de la production de xylanases**

La souche sélectionnée a fait l'objet d'une étude de l'influence des conditions environnementales et de la composition du milieu sur la production de xylanases, afin de déterminer les conditions optimales de cette production.

#### **3-1. Effet de la température**

Des flacons contenant 18 ml de milieu liquide à base de xylane de hêtre (pH 7) sontensemencés avec 2 ml d'une préculture de 24h de la souche dans le bouillon nutritif, puis incubés à des températures de 25 à 45°C pendant 48h.

### **3-2. Effet du pH**

La production de xylanases est étudiée à différents pH (5-12), dans le milieu liquide à base de xylane. Les milieux (18 ml) sontensemencés avec 2 ml d'une préculture de 24h de la souche dans le bouillon nutritif puis incubés à 30°C pendant 2 jours.

Tous les milieux de 18 ml dans la suite de l'optimisation sont ajustés à pH 9,5 etensemencés par 2ml d'une préculture de 24h de la souche dans le bouillon nutritif puis incubés à 30°C pendant 2 jours.

### **3-3 Effet du NaCl et KCl**

L'effet des sels est réalisé dans des milieux xylane de hêtre contenant de 0,5 à 15% de NaCl ou de KCl.

### **3-4. Effet du type de xylane**

La souche est cultivée dans les mêmes conditions sur trois milieux contenant différents xylanes, bouleau, hêtre et glumes d'avoine.

### **3-5. Effet des sources de carbone et d'azote**

La production de xylanases est déterminée après croissance de la souche dans des milieux liquides contenant 7 g/l de différentes sources de carbone ou 5 g/l de sources d'azote. Les sources de carbone utilisées sont : les polysaccharides (xylane de hêtre, CMC, amidon et avicel), les déchets agroalimentaires (son de blé, son d'avoine, paille de blé, sciure de bois et déchets de dattes) et les sucres simples (xylose, glucose, galactose et cellobiose). Les sources d'azote utilisées sont : les sources organiques (peptone, extrait de levure, extrait de malt et caséine) et les sources inorganiques ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$  et  $\text{KNO}_3$ ).

### **3-6. Effet de la concentration du xylane**

La production de xylanases est déterminée en milieu liquide contenant le xylane à des concentrations de 5 à 30 g/l.

### 3-7. Cinétique de production des xylanases

La production de xylanases a été déterminée au cours d'une période d'incubation de cinq jours dans le milieu de culture optimisé. Des mesures d'activités enzymatiques sont effectuées sur des échantillons prélevés à 24h d'intervalle.

## 4- Production et purification des enzymes

### 4-1. Sources des xylanases

Les xylanases étudiées sont celles de la famille GH10 XYN10A de *Thermopolyspora flexuosa* (TfXYN10A), les xylanases GH11 XYN11B avec son variant stabilisé XYN11B-DS de *Dictyoglomus thermophilum* (DtXYN11B et DtXYN11B-DS) et les xylanases de la souche sélectionnée. Le variant DtXYN11B-DS a un pont disulfure dans la région N-terminal désigné entre Cys1 et Cys27 (Li *et al.*, 2013). Les xylanases TfXYN10A, DtXYN11B et DtXYN11B-DS sont exprimées à partir d'*E. coli* de façon extracellulaire comme décrit précédemment (Anbarasan *et al.*, 2010 ; Li *et al.*, 2013). TfXYN10A est 80% pure en SDS-PAGE (Anbarasan *et al.*, 2010). La purification de DtXYN11B et DtXYN11B-DS est réalisée comme décrit précédemment (Li *et al.*, 2013).

### 4-2. Production et purification partielle des xylanases de la souche sélectionnée

La souche est cultivée dans 3 litres de milieu optimisé distribué dans trois erlens d'un litre de milieu de culture. Le milieu est inoculé par 5% d'une pré-culture dans le même milieu puis incubé à 30°C pendant 2 jours. La purification partielle des xylanases est réalisée comme suit :

- **Précipitation au sulfate d'ammonium**

La culture est centrifugée à 10000 g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant est précipité avec le sulfate d'ammonium à 80% saturation pendant une nuit. Le précipité est récupéré par centrifugation 10000 g pendant 30 min à 4°C et dissous dans un volume minimal de tampon phosphate de sodium pH 7.

- **Dessalement sur colonne**

La solution protéique est dessalée dans une colonne de dessalement PD10 Sephadex G-25 (GE Healthcare) (Fig. 9), selon le protocole suivant :

- 1. Préparation de la colonne :** la colonne est préparée en enlevant le couvercle supérieur puis en versant la solution de stockage et en coupant son bout inférieur.
- 2. Equilibration de la colonne :** la colonne est remplie avec le tampon phosphate de sodium pH 7 qui pénètre complètement dans le volume (6 ml) de la colonne. L'opération est répétée 4 fois.
- 3. Application de l'échantillon :** un volume maximal de 2.5 ml est ajouté jusqu'à occuper complètement la colonne.
- 4. Elution :** un tube est placé au-dessous de la colonne et l'échantillon est élué avec 3.5 ml du tampon phosphate de sodium



**Figure 9.** Colonnes de dessalement PD10 Sephadex G-25 (GE Healthcare).

Par la suite, la solution éluée est concentrée à 2 ml par ultrafiltration dans un tube concentrateur vivaspin 20 ml de 10,000 Da MWCO (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Allemagne) (Fig. 10). La solution est centrifugée dans le tube à 5000 rpm à 4°C.



**Figure 10.** Tubes concentrateurs vivaspin 20 ml (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Allemagne).

- **Filtration sur gel**

La chromatographie filtration sur gel est effectuée à l'aide du dispositif Äkta purifier 100 (GE Healthcare) (Fig. 11). Deux ml de la solution protéique sont appliqués sur une colonne HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade et séparés avec une vitesse d'écoulement d'un tampon phosphate de sodium (pH 7) de 1 ml/min. Les fractions montrant une activité xylanase sont analysées par SDS-PAGE.



**Figure 11.** Système de purification Äkta purifier 100 (GE Healthcare).

#### **4-3. Production et Purification de DtXYN11B et Dt XYN11B-DS**

Le gène de XYN11B et son mutant portant un codon Cys aux positions 1 et 27 sont synthétisés par DNA2.0 et insérés dans le vecteur d'expression pJexpress 404 d'*E. coli*. La séquence signal de la pectate lyase B (PelB) d'*Erwinia carotovora* est insérée à la séquence codante de l'enzyme du côté N-terminal, afin d'assurer sa sécrétion. Les vecteurs sont par la suite utilisés pour transformer les souches bleues d'*E. coli* XL1 (Li *et al.*, 2013).

Des précultures de souches d'*E. coli* XL1, contenant les gènes de DtXYNB ou DtXYNB-DS, sont préparées dans 50 ml de milieu Luria-Bertani supplémenté avec de l'ampicilline (125µg/ml) et incubé à 37°C avec agitation (250 rpm) jusqu'à l'obtention d'une absorbance de 0.5. Ces pré-cultures sont utilisées pour l'ensemencement de 950 ml du même milieu qui est incubé à 37°C avec agitation (250 rpm) jusqu'à l'obtention de l'absorbance 0.5. A cet instant, IPTG (Isopropyl-1-thio-β-Dgalactopyranoside) est ajouté à la culture à une concentration finale de 1 mM afin d'induire l'expression des enzymes. Avant de procéder à la production des enzymes, des cinétiques de leur expression ont été réalisées.

Les surnageants des cultures sont récupérés par centrifugation (10000g pendant 20 min à 4°C) et la purification des protéines est réalisée selon le protocole décrit par Li *et al.* (2013). La purification est dans le dispositif de filtration Äkta Purifier (GE Healthcare).

- **Chromatographie échangeuse de cation**

Les surnageants sont appliqués à une colonne échangeuse de cation (Hiload 26/10 SP Sepharose haute Performance). Le tampon de liaison est l'acétate de sodium pH 5,5 (10 mM) et le tampon d'élution est le même tampon additionné de 0.3 M de NaCl. Les protéines sont éluées par un gradient continu à un débit de 1ml/min.

- **Concentration**

Les fractions avec des activités xylanases sont mélangées et concentrées à 2 ml par ultrafiltration dans des tubes vivaspin 20 ml de 10000 Da MWCO (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Allemagne).

- **Chromatographie filtration sur gel**

Les fractions (2 ml) sont appliquées à une colonne filtration sur gel (Hiload 16/60 200 Superdex prep grade) et séparées à une vitesse de 1ml/min dans le tampon acétate de sodium pH 5,5 (10 mM).

#### **4-4. Electrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE)**

L'électrophorèse dénaturante est réalisée selon la méthode de Laemmli, (1970). Le surnageant et les fractions protéiques sont mélangées avec le tampon d'échantillon (3 : 1 v/v), chauffées à 95°C pendant 5min, puis centrifugées à 5000 rpm pendant 5 min. Le mélange de marqueurs protéiques BIO-RAD prêt à l'emploi contient 10 protéines de poids moléculaires de 10 à 250 kDa.

Les échantillons et les marqueurs sont déposés à raison de 20µl dans les puits d'un gel de polyacrylamide 12% monté dans une cuve à électrophorèse. La migration est effectuée à 200V et arrêtée dès l'arrivée de la ligne de migration au bas du gel.

Une fois la migration terminée, le gel subit un rinçage à l'eau, une coloration au bleu de Coomassie R250 pendant une heure, un autre rinçage à l'eau, puis une décoloration avec un changement de bain (3 fois) (Annexe III).

Les masses moléculaires des xylanases sont déterminées en utilisant la courbe d'étalonnage  $R_f = f(\log PM)$  (Fig. S1 de l'annexe I). Le rapport frontal est calculé selon la formule suivante :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par la protéine}}{\text{Distance parcourue par la ligne du bleu de bromophénol}}$$

## 5- Caractérisation des xylanases de la souche sélectionnée

### 5-1. Effet de la température et du pH sur l'activité

La température et le pH optimum d'activité sont déterminés en mesurant l'activité aux températures 30-80°C et aux pH 4-11. Différents tampons (0.05 M) sont utilisés : Citrate (pH 4-5), Phosphate (pH 6-7), Tris-HCl (pH 8), Glycine NaOH (pH 9) et le Carbonate-bicarbonate (pH 10-11). L'activité aux différentes températures est mesurée à pH 7, et l'activité aux différents pH à 50°C pendant 30 min.

### 5-2. Effet des sels sur l'activité

L'activité xylanase est mesurée à différentes concentrations de NaCl et de KCl (0 à 5,13M) au pH optimum de l'enzyme à 50°C pendant 30 min. L'influence des sels a été également testée sur l'activité des xylanases TfXYN10A, DtXYN11B et DtXYN11B-DS.

### 5-3. Effet des liquides ioniques superbasiques sur l'activité des Xylanases

Les liquides ioniques (LIs) utilisés dans ce travail sont rapportés dans le tableau 2. Les liquides ioniques à base des cations [DBNH]<sup>+</sup>, [DBUH]<sup>+</sup>, [mDBN]<sup>+</sup> et [TMGH]<sup>+</sup> sont préparés comme décrit précédemment (Parviainen *et al.*, 2013 ; Parviainen *et al.*, 2014). [EMIM]OAc est obtenu de BASF (Ludwigshafen, Germany) avec une pureté ≥ 95%. Pour préparer les liquides ioniques à base de guaiacolate, 1 équivalent de la superbase est mélangé à 1 équivalent de guaiacol dans un flacon rond à température ambiante. Le liquide ionique issu est conservé sous argon à l'abri de la lumière.

**Tableau 2.** Liquides ioniques superbasiqes

Liquide ionique	
[DBNH]OAc	1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-enium acetate
[DBNH]CO <sub>2</sub> Et	1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-enium propionate
[DBUH]OAc	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enium acetate
[DBUH]CO <sub>2</sub> Et	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enium propionate
[EMIM]OAc	1-Ethyl-3-methylimidazolium acetate
[mDBN]Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Methyl-1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-enium dimethyl phosphate
[TMGH]OAc	1,1,3,3-Tetramethylguanidinium acetate
[TMGH]CO <sub>2</sub> Et	1,1,3,3-Tetramethylguanidinium propionate
[DBNH]Guaiacolate	1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-enium guaiacolate
[DBUH]Guaiacolate	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enium guaiacolate
[TMGH]Guaiacolate	1,1,3,3-Tetramethylguanidinium guaiacolate

Les activités enzymatiques sont mesurées en présence de 5, 15, 25 et 35% de liquides ioniques. Les LIs qui ne sont pas liquides à la température ambiante sont dissous dans un bain marie avant leur addition à la solution de substrat. Cette addition conduit à des variations de pH, lequel à été corrigé par addition de solution HCl (1 N) ou NaOH (8 M) avant l'addition de l'enzyme. A concentration élevée, les liquides ioniques à base de guaiacolate forment un précipité brun avec la solution de xylane. C'est pour cette raison qu'ils ne sont testés qu'à la concentration 5%.

Chaque enzyme est diluée pour générer une absorbance autour de 1 à 540 nm dans l'essai au DNS sans liquide ionique. Les activités spécifiques de chaque enzyme dans l'essai final sont 803 U/mg pour TfXYN10A, 2175 U/mg pour DtXYN11B et 848 U/mg pour DtXYN11B-DS.

La présence du liquide ionique dans le mélange réactionnel conduit à une augmentation de l'absorbance des sucres réducteurs. A cet effet, des courbes d'étalonnage sont réalisées en présence des LIs et sont utilisées pour corriger les valeurs d'absorbance (Fig. S2 de l'annexe I).

Les expériences de cinétique enzymatiques sont réalisées pour TfXYN10A en présence et en absence de 5 % de LIs. Les paramètres cinétiques sont déterminés en

utilisant 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 et 20 mg/ml de xylane de hêtre (Figs S3-S14 de l'annexe I). L'activité enzymatique est mesurée à 70°C, pH 6.

Toutes les expériences sont répétées au moins trois fois (trois répétitions pour chaque expérience). Les valeurs cinétiques sont calculées par la fonction analyse de régression hyperboliques du programme Hyper 32.

### 6- Etudes de docking moléculaire

Les cations et les anions des liquides ioniques sont dockés un par un en utilisant le programme SwissDock (Grosdidier *et al.*, 2011) au site actif de la structure modelée de TfXYN10 sur la base des structures PDB 1v6w (Anbarasan *et al.*, 2010) et de DtXYN11B (PDB 1F5J) (McCarthy *et al.*, 2000). Les structures des protéines et des ligands incluent les atomes d'hydrogène (ajoutées dans Swiss-PdbViewer aux protéines). L'énergie des structures des cations est minimisée en utilisant le programme MM2 du ChemBio3D Ultra 12.0 (CambridgeSoft) où leur géométrie (cas de l'anion guaiacolate) est optimisée avant leur docking en utilisant le programme Avogadro (<http://avogadro.cc/>) ; bien que la minimisation préalable de l'énergie des ligands ne soit pas requise dans le programme SwissDock (Lohning *et al.*, 2017). Le mode précis est utilisé dans SwissDock et la flexibilité est permise pour le ligand et non pour les chaînes latérales. Les charges sont assignées aux molécules en utilisant le logarithme MMFF (Merck Molecular Force Field). SwissDock calcule les énergies de liaison obtenues par le programme CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics). Les modes de liaison sont classés sur la base des énergies favorables, incluant l'effet du solvant par l'utilisation du modèle implicite Fast Analytical Continuum Treatment of Solvation (FACTS) (Grosdidier *et al.*, 2011 ; Zoete *et al.*, 2010). Les résultats obtenus sont analysés par le programme UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

Les résultats obtenus sont analysés statistiquement en utilisant l'analyse de la variance et le test de Student au moyen du programme SPSS.

# **Chapitre 3 :**

## **Résultats et discussion**

### 1- Isolement et sélection d'une souche xylanolytique

Une centaine de souches xylanolytiques ont été isolées, sur un milieu solide à base de xylane à pH 7 à partir de fiente de volaille. Le son de blé est l'un des ingrédients incorporés dans l'aliment donné aux volailles. La présence du xylane issu du son de blé dans les fientes de volaille favoriserait la croissance de microorganismes xylanolytiques. La fiente de volaille a été également une source d'isolement de microorganismes xylanolytiques. La souche xylanolytique *Aspergillus fumigatus* RSP-8 (MTCC 12039) a été isolée à partir d'échantillons de sol collectés d'une décharge de fiente de volaille (Ravichandra *et al.*, 2016), les souches *Actinomadura* sp. Cpt20 (Taibi *et al.*, 2012), *Streptomyces thermocoprophilus* (Kim *et al.*, 200) à partir de composts à base de fiente de volaille.

#### 1-1. Protocole de screening

##### 1-1.1. Première sélection

Cette sélection est basée sur la formation de zones claires autour des colonies. En effet, les xylanases sécrétées dans le milieu solide dégradent le xylane qui se traduit par un éclaircissement du milieu autour des colonies. Ainsi, 20 souches montrant des zones claires autour des colonies sont isolées et purifiées par repiquage sur le même milieu (Fig. 12).



**Figure 12.** Zones claires autour des colonies sur un milieu solide à base de xylane.

##### 1-1.2. Seconde sélection

Cette sélection est basée sur la mesure de l'activité des xylanases sécrétées dans un milieu de culture liquide. Une grande production de xylanases se traduit par une grande

activité enzymatique dans le milieu. Les activités xylanase des 20 souches sélectionnées sont rassemblées dans le tableau 3. L'une des souches, la souche HH2, montre une meilleure production de xylanases en milieu liquide (Tab. 3).

**Tableau 3.** Activité xylanase à pH 7 et 50°C des souche sélectionnées

Souche	Activité UI/ml
HH1	5,229
<b>HH2</b>	<b>6,396</b>
HH3	1,261
HH4	1,401
HH5	0,456
HH6	5,454
HH7	3,453
HH8	3,563
HH9	5,138
HH10	5,63&
HH11	0,890
HH12	0,512
HH13	0,611
HH14	2,673
HH15	2,397
HH16	0,534
HH17	0,662
HH18	0,612
HH19	1,094
HH20	2,421

## 1-2. Identification de la souche sélectionnée

### 1-2.1. Analyse de l'ARN16S

La comparaison du gène de l'ARN16S effectuée au niveau de l'organisme DSMZ indique que la souche appartient à l'ordre des actinomycetales et représente une des souches de l'espèce *Jonesia denitrificans* (100% de similarité avec la séquence de la

souche *Jonesia denitrificans* DSM 20603T Opéron 1-5). Il lui a été assigné le numéro ID 12-972.

La position phylogénétique de la souche ID 12-972 par rapport aux autres souches est montrée dans le tableau 4. D'autres Actinobactéries ont été isolées également de fiente de volaille, telles la souche *Actinomadura* sp. Cpt20 (Taibi *et al.*, 2012) et la souche *Streptomyces thermocoprophilus* (Kim *et al.*, 200). La nature semi-solide de ce milieu favoriserait la croissance de microorganismes filamenteux tels les Actinobactéries. Les filaments poussent et pénètrent mieux un milieu solide

**Tableau 4.** Similarité de la séquence du gène ARNr 16S de la bactérie ID 12-972 avec les séquences d'autres taxons (DSMZ).

Souche	% de similarité de la séquence du gène ARNr 16S à ID 12-972
<i>Jonesia denitrificans</i> DSM 20603 <sup>T</sup> Opéron 1-5	100.0
<i>Jonesia quinghaiensis</i> DSM 15701 <sup>T</sup>	96.7
<i>Beutenber giacavernae</i> HKI 0122 <sup>T</sup>	92.3
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> DSM 43879 <sup>T</sup>	91.8
<i>Promicromonospora citrea</i> DSM 43110 <sup>T</sup>	91.8
<i>Sanguibacter keddiei</i> ST74 <sup>T</sup>	92.0
<i>Terrabacter tunemscens</i> DSM 20308 <sup>T</sup>	91.3
<i>Kytococcus dentarius</i> DSM 20547 <sup>T</sup>	91.3

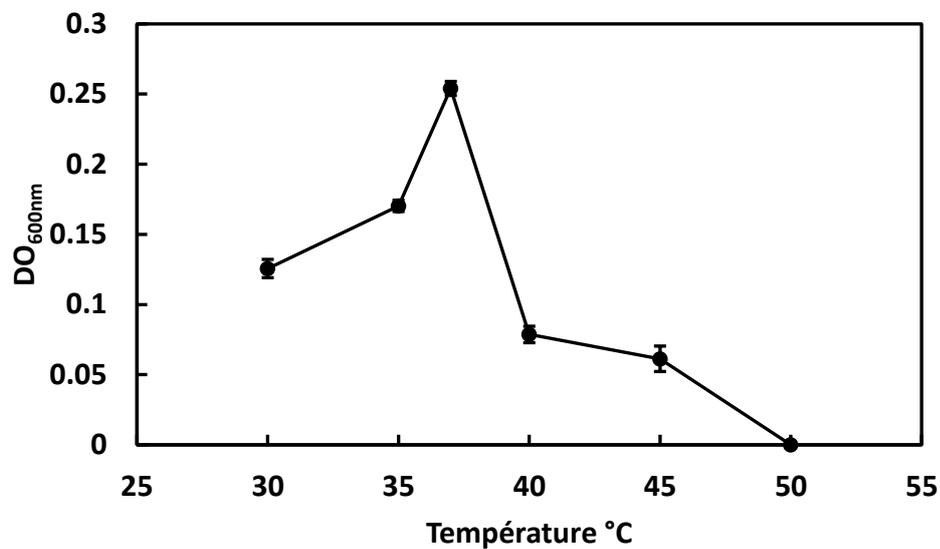
### 1-2.2. Caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques

La souche est à Gram positif, sous forme de bâtonnet irrégulier ou coccoïde, mobile non sporulée et anaérobie facultative. Elle est pourvue de catalase, oxydase, nitrate réductase et uréase et fermente le mannitol. Elle est dépourvue de tryptophane désaminase, rouge méthyle négative, Voges-Proskauer négative, n'utilise pas le citrate, ne produit pas H<sub>2</sub>S et indole.

### 1-2.3. Température optimale de croissance

Les résultats montrent une souche mésophile avec une gamme de températures de 15 à 45°C, avec un optimum à 37°C (Fig. 13). La même température est observée chez la

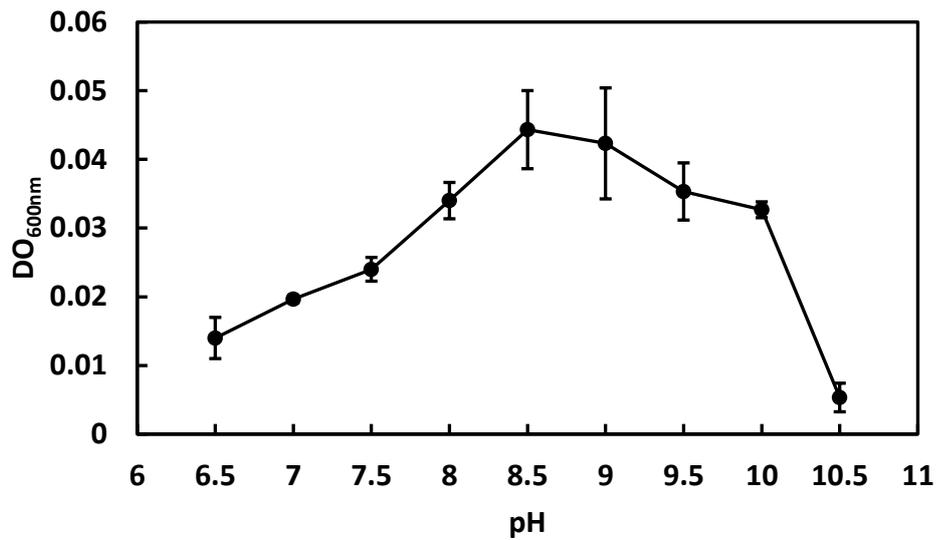
souche *J. denitrificans* BN13 (Boucherba *et al.*, 2011). La souche type *J. denitrificans* Prevot 55134<sup>T</sup> présente un optimum à 30-37°C (Pukall *et al.*, 2009).



**Figure 13.** Effet de la température sur la croissance de la souche *Jonesia denitrificans* ID 12-972. Le milieu est ajusté à pH 7.

#### 1-2.4. pH optimal de croissance

La souche présente un profil alcalophile avec une gamme de pH entre 6,5-10,5, et un optimum aux pH 8,5-9 (Fig. 14). D'autres souches alcalophiles du genre *Jonesia* ont été isolées de différents habitats. La souche alcalophile *Jonesiasp.* YNUCC0043 a été isolée à partir de la liqueur noire d'une station de fabrication du papier (Wenpeng et Lan, 2006), la souche *Jonesia luteola* YIM 93067, pH de croissance à 7-9 à partir d'un lac salé de la province Xinjiang, en Chine (Li *et al.*, 2015), la souche *Jonesia quinghaiensis* DSM 15701T, pH optimal de croissance à pH 7-9, à partir d'un lac alcalin en Chine (Schumann *et al.*, 2004), et la souche *Jonesia sp.* DSM14140 avec un pH optimal de 9, isolée à partir d'un échantillon de boue marine de l'île Rømø au Danemark (Sianidis *et al.*, 2005).

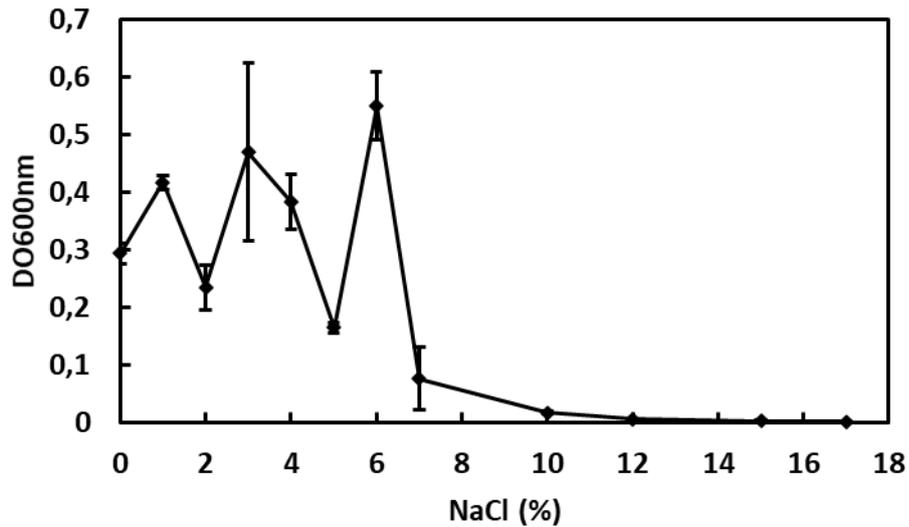


**Figure 14.** Effet du pH sur la croissance de la souche *Jonesia denitrificans* ID 12-972.

Le milieu est incubé à 37°C.

#### 1-2.5. Croissance en présence de NaCl

Dans le bouillon nutritif, la souche se développe en présence de concentrations de NaCl jusqu'à 12% et montre des optima d'activité aux concentrations 1, 3 et 6% (Fig. 15). Ce phénomène peut être expliqué par la modification de la forme de la souche aux différentes concentrations de NaCl donnant lieu à différentes valeurs d'absorbance. Morphologiquement, la souche type de *J. denitrificans* est caractérisée en culture jeune par des formes en bâtonnets irréguliers, en Y et cubiques, et dans les cultures âgées par des formes sphériques (Seeliger et Jones, 1986).



**Figure 15.** Effet du NaCl sur la croissance de la souche *Jonesia denitrificans* ID 12-972. Le milieu est incubé à 37°C et pH 8,5.

La souche se développe bien en présence de 6% de NaCl, elle peut être qualifiée de ce fait comme étant modérément halophile (Delgado-Garcia *et al.*, 2012). La souche type de *J. denitrificans* se développe jusqu'à 5% de NaCl et pas de croissance à 10% NaCl (Seeliger et Jones, 1986). La souche *Jonesia denitrificans* BN13 se développe avec 2 à 12% NaCl (Boucherba *et al.*, 2011), *Jonesia quinghaiensis* DSM 15701<sup>T</sup> avec 2,5 à 7,5 NaCl (Schumann *et al.*, 2004) et *Jonesia luteola* YIM 93067 à 0-8% NaCl (Sianidis *et al.*, 2005).

Les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques de la souche sont comparées dans le tableau 5 aux caractéristiques d'autres souches de *J. denitrificans*.

**Tableau 5.** Caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques de la souche sélectionnée et celles de *J. denitrificans* Prevot 55134T (Pukall *et al.*, 2009) et *J. denitrificans*BN13 (Boucherba *et al.*, 2011).

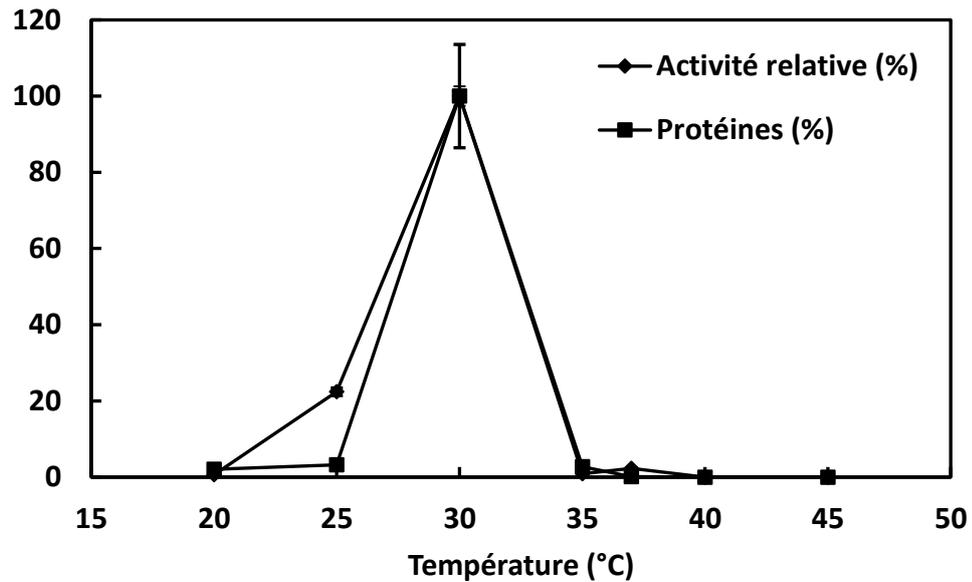
Propriété	Souche sélectionnée	<i>J. denitrificans</i> Prevot 55134 <sup>T</sup>	<i>J. denitrificans</i> BN13
Coloration de Gram	Positive	Positive	Positive
Forme de la cellule	Bâtonnets irréguliers, coccoides	Bâtonnets irréguliers, coccoides	Bâtonnets irréguliers, coccoides
Mobilité	+	+	+
Sporulation	-	-	-
Gamme de température	15-45°C	15-45°C	Mésophile
Température optimale	37°C	37°C	30-37°C
Gamme de pH	6,5-12	5-12	
pH optimal	8,5-9	7	ND
Gamme de salinité	0-15%	0-12%	5%
Salinité optimale	6%	ND	ND
Demande en oxygène	Anaérobie facultatif	Anaérobie facultatif	Anaérobie facultatif
Catalase	+	+	+
Oxidase	+	+	-
Nitrate réductase	+	+	+
Uréase	+	ND	ND
Tryptophane désaminase	-	-	ND
Réaction VP	-	-	ND
Réaction RM	-	+	ND
Utilisation du Citrate	-	ND	ND
Production d'acide	+	-	ND
Indole	-	-	ND
Production de H <sub>2</sub> S	-	-	ND

ND: Non déterminé

## 2- Optimisation des conditions de culture et de production de xylanases

### 2-1. Effet de la température

Les résultats révèlent une croissance et une production d'enzymes xylanolytiques aux températures de 25 à 45°C avec un optimum net à 30°C (Fig. 16).

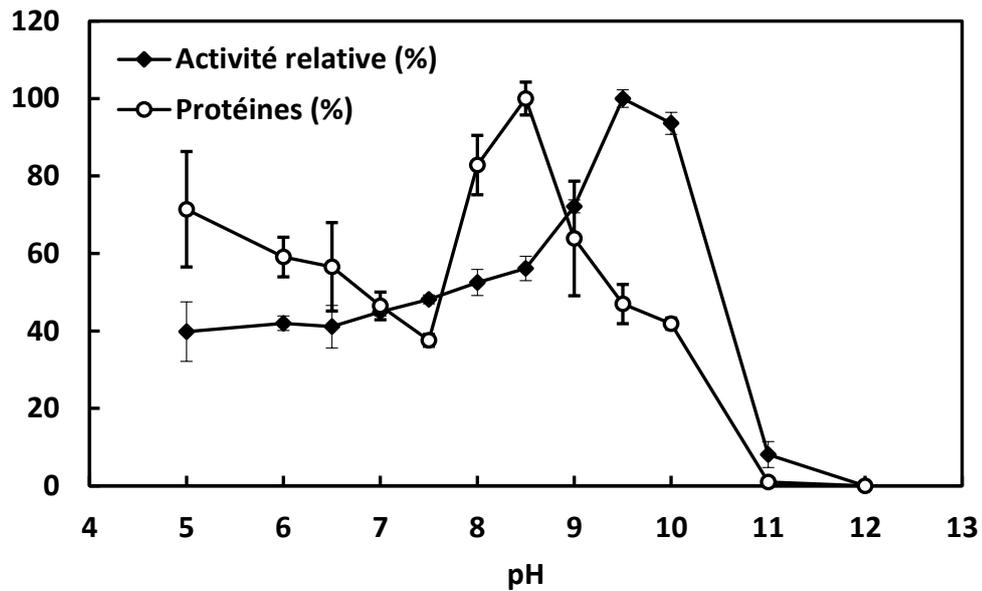


**Figure 16.** Effet de la température sur la production de xylanases par la souche *Jonesia denitrificans* ID 12-972. Le milieu est ajusté à pH 7 et l'activité enzymatique est mesurée à 50°C et pH7.

Cette production coïncide avec le profil de production de protéines, ce qui suggère que la croissance est liée à la production de xylanases. Par contre, chez la souche *Jonesia denitrificans* BN13, la production et la croissance atteignent un maximum à 37°C (Boucherba *et al.*, 2011). Un optimum de production de xylanases à 30°C a été également observé chez d'autres actinobactéries (Thomas *et al.*, 2013 ; Tuncer *et al.*, 2004).

## 2-2. Effet du pH

La souche se développe et produit des enzymes xylanolytiques à tous les pH testés, excepté à pH 12. L'activité enzymatique est constante de pH 4 à 6.5, commence à augmenter à pH 7, pour atteindre un maximum à pH 9.5, puis diminue à pH 11 pour s'annuler à pH 12 (Fig. 17).



**Figure 17.** Effet du pH sur la production de xylanases par la souche *Jonesia denitrificans* ID 12-972. Le milieu est incubé à 30°C et l'activité enzymatique est mesurée à 50°C et pH 7.

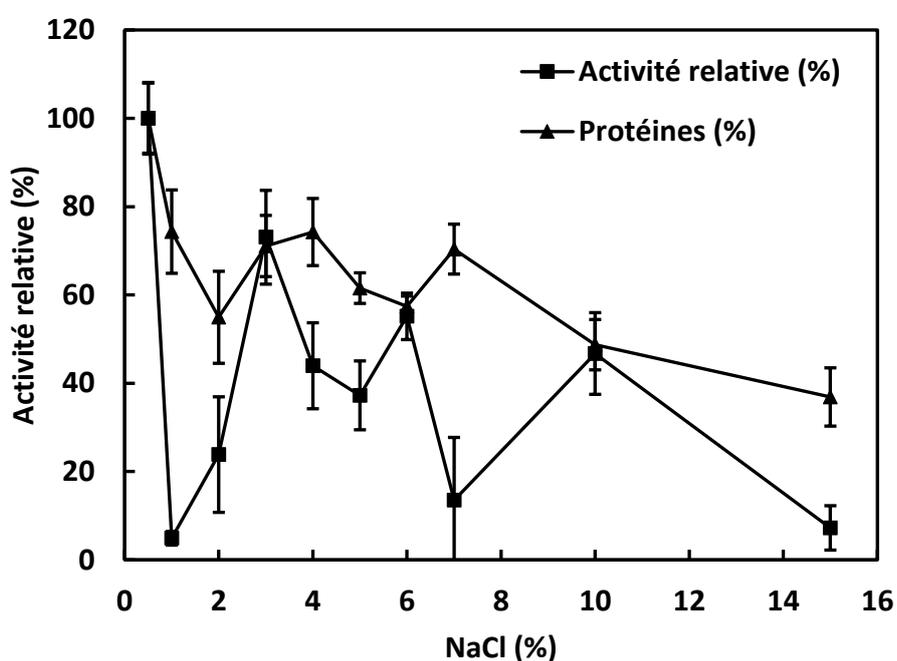
La production de xylanases semble être favorisée aux pH alcalins, alors que la production de ces enzymes chez la souche *Jonesia denitrificans* BN13 est favorable aux pH proches de la neutralité et alcalins (pH 6-9.5) (Boucherba *et al.*, 2011). Une activité élevée aux pH alcalins rend ces enzymes potentiellement applicables dans le blanchiment de la papeterie caractérisé par l'utilisation de pH basiques. Plusieurs espèces d'Actinobactéries présentent une production optimale d'enzymes xylanolytiques aux pH alcalins. C'est le cas de *Thermoactinomyces thalophilus* (pH 8.5) (Kohli *et al.*, 2001), *Thermomonospora fusca* BD25 (pH 8) (Tuncer *et al.*, 1999), et *Streptomyces* sp. QG-11-3 (pH 8) (Beg *et al.*, 2000).

Le profil d'activité ne coïncide pas avec le profil protéique, indiquant que la croissance dans ce cas n'est pas associée à la production d'enzymes xylanolytiques. Le maximum de production de protéines est observé à pH 8,5, alors que l'activité xylanolytique n'y est que de 56%. La production de xylanases est sujette à une répression catabolique et/ou à une inhibition par des produits finaux tels les pentoses et les hexoses (Reis *et al.*, 2003 ; Giridhar et Chandra, 2010). Ainsi il est probable qu'à pH 8,5, la production de ces monosaccharides issus de la dégradation du xylane favoriserait la croissance de la souche mais inhiberait en même temps la production des xylanases, alors

qu'à pH 9,5, la présence du xylose en faible quantité favoriserait l'induction des xylanases.

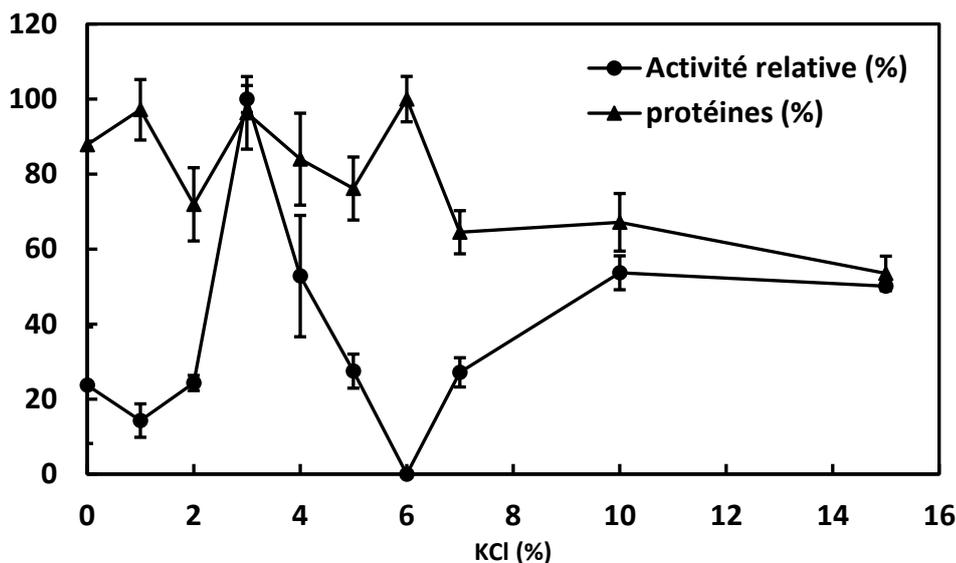
### 2-3. Effet du NaCl et KCl

La souche montre une activité xylanolytique à toutes les concentrations de NaCl utilisées, avec une activité optimale à 0.5%, et montre une activité jusqu'à 15% (Fig. 18). Ces résultats indiquent que la souche est halotolérante. Des pics d'activités sont enregistrés aux concentrations 3, 6 et 10% de NaCl, suggérant la production de différents types de xylanases.



**Figure 18.** Effet du NaCl sur la production de xylanases par la souche *Jonesia denitrificans* ID 12-972. Le milieu est incubé à 30°C et pH 9,5. L'activité enzymatique est mesurée à 50°C et pH 7.

D'autres actinobactéries halotolérantes productrices de xylanases ont été décrites, telles les souches *Thermobifida halotolerans* YIM 90462T (Yang *et al.*, 2008), *Streptomyces viridochromogenes* M11 (Liu *et al.*, 2013) et *Lechevalieria* sp. HJ3 (Zhou *et al.*, 2012). La souche montre une meilleure croissance sur KCl comparée à NaCl et exhibe une production optimale de xylanases à 3% de KCl (Fig. 19).



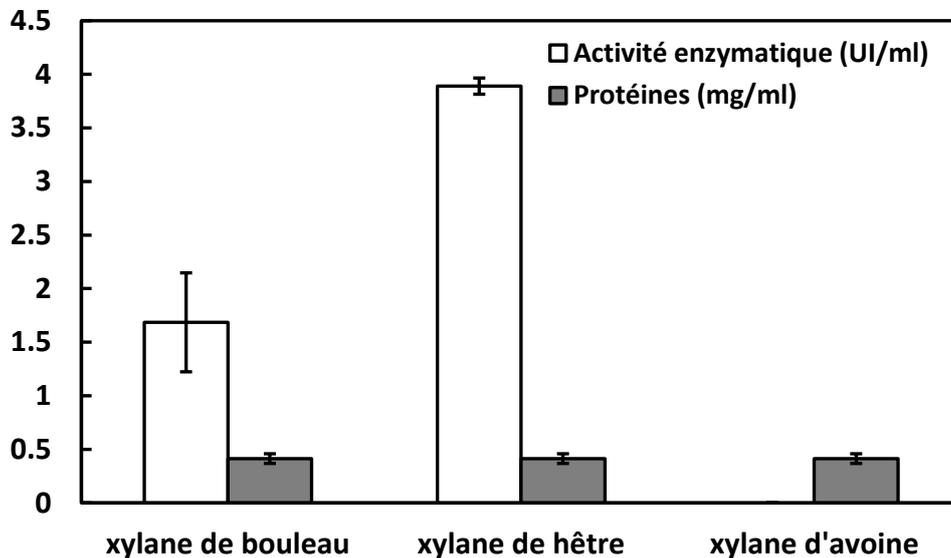
**Figure 19.** Effet du KCl sur la production de xylanases par la souche *Jonesia denitrificans* ID 12-972. Le milieu est incubé à 30°C et pH 9,5. L'activité enzymatique est mesurée à 50°C et pH 7.

#### 2-4. Effet du type de xylane

Les trois types de xylane diffèrent par leur composition, leur structure et leur solubilité. Le xylane d'avoine est de type arabinoxylane, une chaîne de xylane sur laquelle sont fixées des chaînes d'arabinose. C'est un xylane insoluble (Kormelink et Voragen, 1993). Le xylane de hêtre est constitué d'une chaîne d'unités D-xylopyranose liées par des liaisons  $\beta$ -1,4 sur laquelle sont greffés des chaînes latérales de groupements acétyle abondants (60–70% des résidus xylose sont acétylés), et quelques arabinoses (0,9% p/p) et du glucose (1,5% p/p). C'est un xylane qui n'est pas complètement soluble (Teleman *et al.*, 2002). Le xylane de bouleau est constitué de 89,3% xylose, de 1% arabinose, de 1,4% glucose et de 8,3% d'acide anhydrourique, c'est un substrat soluble (Kormelink et Voragen, 1993).

Afin de déterminer quel type de xylane stimule le mieux la production d'enzymes xylanolytiques, la souche *Jonesia denitrificans* ID 12-972 est cultivée en présence de trois types : xylane d'avoine, xylane de hêtre et xylane de bouleau. L'activité enzymatique dans chaque extrait de culture est testée avec ces trois substrats.

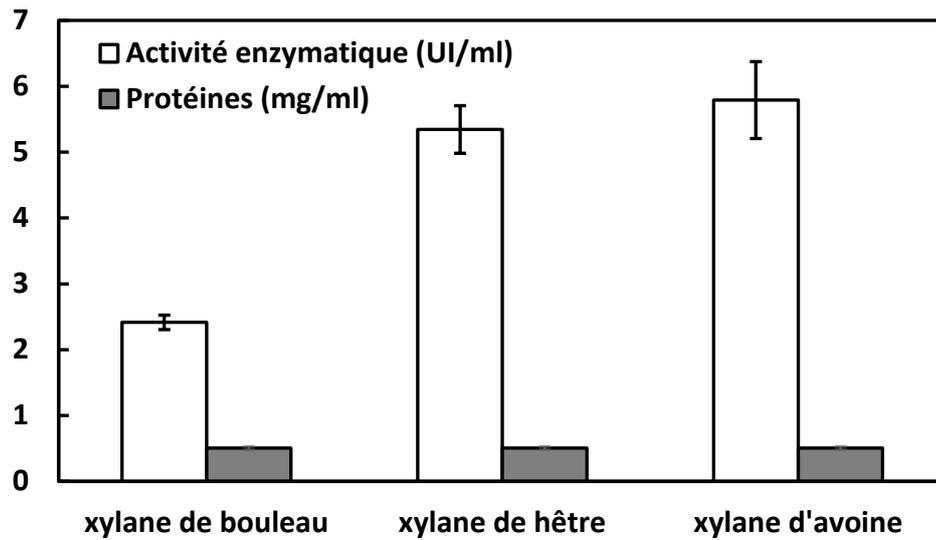
Lorsque la souche se développe en présence de xylane de bouleau, l'activité xylanolytique est meilleure avec le xylane de hêtre comme substrat, puis avec le xylane de bouleau et enfin avec le xylane d'avoine (Fig. 20).



**Figure 20.** Activité xylanase du surnageant de la culture sur le xylane de bouleau mesurée dans trois types de xylane. Le milieu est incubé à 30°C et pH 9,5. L'activité enzymatique est mesurée à 50°C et pH 7.

L'incapacité des xylanases produites dans la culture avec le xylane de bouleau à dégrader le xylane insoluble d'avoine indique que ces enzymes sont spécifiques uniquement du xylane soluble. La dégradation du xylane insoluble nécessite la présence de domaine de liaison au carbohydre CBM (Carbohydrate binding module) dans la structure de la protéine (Shoseyov *et al.*, 2006). Ainsi, il est possible que les xylanases produites sur le xylane de bouleau sont dépourvues de CBM, les rendant incapables de se lier au xylane insoluble.

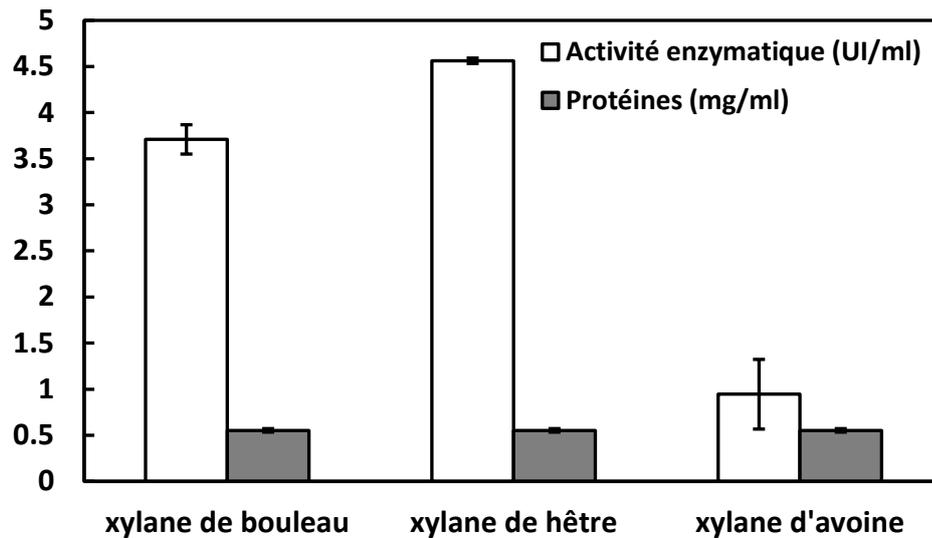
Lorsque la souche est cultivée sur le xylane de hêtre, la meilleure activité est obtenue avec celui-ci, suivie de celle de xylane de bouleau et enfin de celle du xylane de d'avoine (Fig. 21).



**Figure 21.** Activité xylanase du surnageant de la culture sur le xylane de glumes de hêtre mesurée dans trois types de xylane. Le milieu est incubé à 30°C et pH 9,5. L'activité enzymatique est mesurée à 50°C et pH 7.

Ces résultats montrent que les enzymes xylanolytiques produites avec le xylane de hêtre, partiellement soluble sont de deux types : un type qui serait capable de dégrader le xylane insoluble d'avoine et un autre le xylane soluble de bouleau.

Lorsque l'extrait de la culture sur le xylane d'avoine est essayé sur les trois types de xylandes, le xylane de hêtre donne la meilleure activité, suivie du xylane de bouleau et enfin du xylane d'avoine (figure 22).



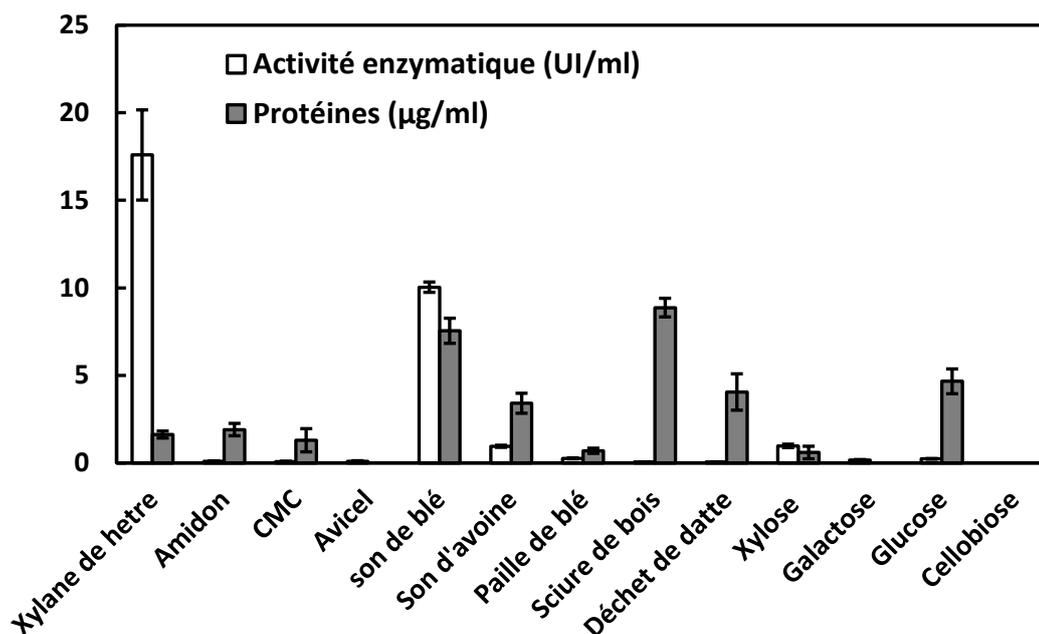
**Figure 22.** Activité xylanase du surnageant de la culture sur le xylane de glume d'avoine mesurée dans trois types de xylane. Le milieu est incubé à 30°C et pH 9,5. L'activité enzymatique est mesurée à 50°C et pH 7.

Ces résultats indiquent que les xylanases produites sur un xylane insoluble sont capable de reconnaître et de dégrader un xylane soluble. D'autres Actinobactéries préfèrent également le xylane de hêtre comme source de production de xylanases, telle la souche *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 (Ding *et al.* 2004)

## 2-5. Effet des sources de carbone

Parmi les sources de carbone testées, le xylane de hêtre s'est révélé être la meilleure source de production des enzymes xylanolytiques (17,64 UI/ml) (Fig. 23).

La souche présente également une bonne production d'enzymes xylanolytiques sur le son de blé (Fig. 23). Le xylane contenu dans ce substrat est de type arabinoxylane, comme celui de l'avoine. Le son de blé a été également rapporté comme une bonne source de production de xylanases avec d'autres souches telles que celles de *Streptomyces* alcalotolérantes (Thomas *et al.*, 2013 ; Bajaj *et al.*, 2010 ; Kumar *et al.* 2012 ; Ninawe et Kuhad, 2005) et la souche halophile *Chromohalobacter* sp. TPSV 101 (Prakash *et al.*, 2009).



**Figure 23 :** Effet des sources de carbone sur la production de xylanases par la souche *Jonesia denitrificans* ID 12-972. Le milieu est incubé à 30°C et pH 9,5. L'activité enzymatique est mesurée à 50°C et pH 7.

Une bonne production de xylanases sur le son de blé peut être due à sa composition ; il contient 54% de carbohydrates (pentoses et hexoses), 14% de protéines, des minéraux, des acides aminés et des vitamines (El-Sharnouby *et al.*, 2012) qui favoriseraient la croissance et la production des xylanases. Une autre raison serait le faible taux de lignine dans ce substrat qui diminuerait l'inhibition des xylanases (Sanghi *et al.*, 2009).

Le prix du substrat est l'un des facteurs les plus importants dans le prix de revient des enzymes industrielles (Gupta *et al.*, 2001). Ainsi, un résidu de l'agriculture tel le son de blé constitue un excellent substrat de faible coût dans la production des xylanases (Heck *et al.*, 2005).

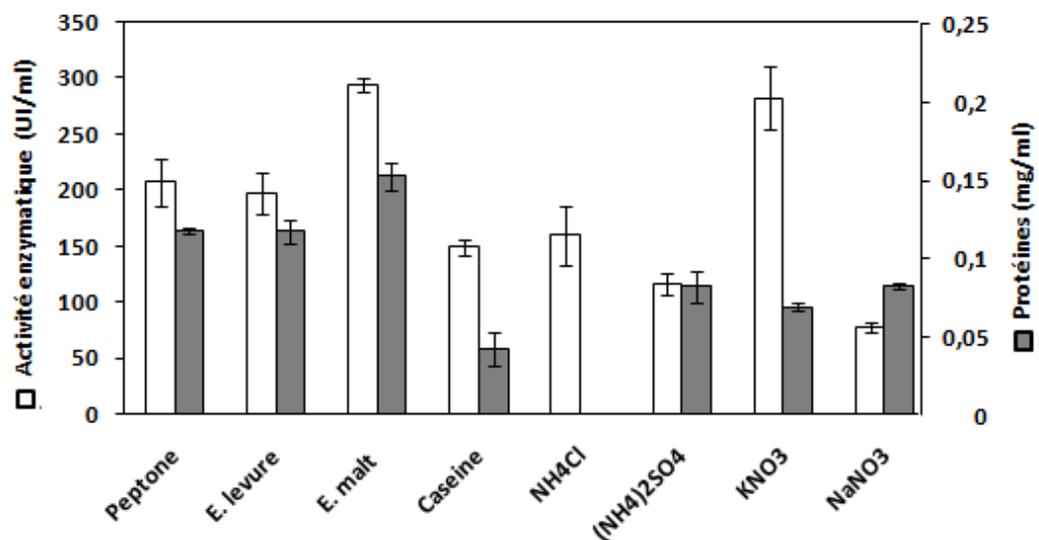
De faibles activités xylanolytiques sont observées en présence des autres sources de carbone, voire nulle avec la cellobiose. Ces résultats indiquent que certaines de ces enzymes seraient constitutives, c'est-à-dire elles sont produites malgré l'absence de leurs substrats. D'après Kulkarni *et al.* (1999), les xylanases seraient produites de façon constitutive à des niveaux basaux pour permettre une provision en fragments de xylane de faibles poids moléculaires qui induiraient par la suite la production de xylanases.

L'absence d'activité en présence de cellobiose indique que ce dernier exercerait une action inhibitrice sur les xylanases.

## 2-6. Effet des sources d'azote

Parmi les sources d'azote organiques testées, l'extrait de malt montre une meilleure production d'enzymes xylanolytiques, suivi par la peptone et l'extrait de levure. Parmi les sources d'azote inorganiques,  $\text{KNO}_3$  est la meilleure source suivie par  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  puis  $\text{NaNO}_3$  (Fig. 24).

En général, les sources organiques favorisent mieux la production de xylanases que les sources inorganiques, ceci a été constaté également chez certaines actinobactéries (Kumar *et al.* 2012 ; Ding *et al.* 2004 ; Ninawe et Kuhad, 2005). La souche est isolée de fiente de volaille riche en matière organique, elle semble adaptée à ce type de milieu.

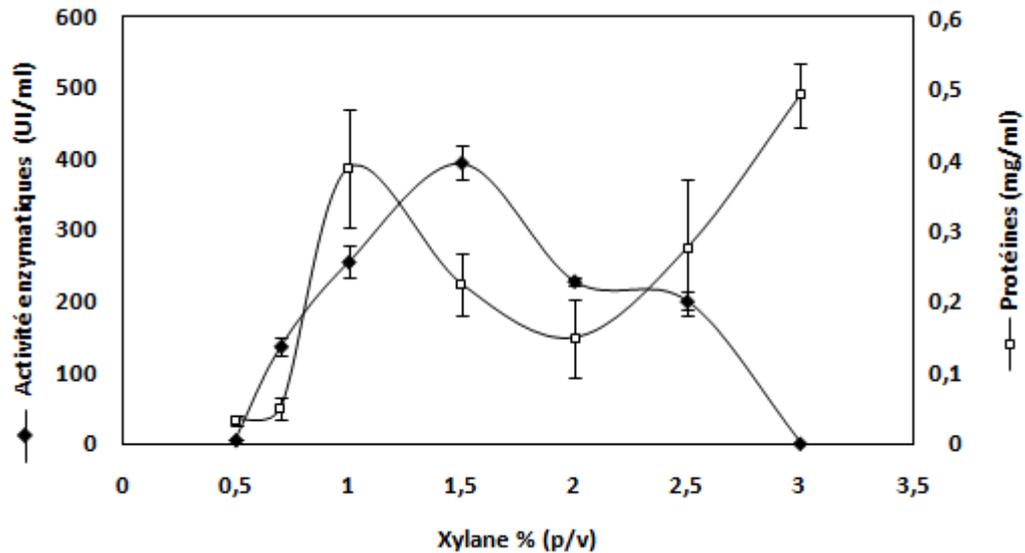


**Figure 24.** Effet des sources d'azote sur la production des xylanases par la souche *Jonesia denitrificans* ID 12-972. Le milieu est incubé à 30°C et pH 9,5. L'activité enzymatique est mesurée à 50°C et pH 7.

## 2-7. Effet de la concentration de xylane

La souche présente une meilleure production de xylanases à 15 mg/ml de xylane de hêtre, alors que les meilleures productions de protéines sont observées aux concentrations de 10 et 30 mg/ml (Fig. 25). La réduction de la production de xylanases à des

concentrations élevées de xylanes peut être expliquée par l'accumulation de sucres réducteurs et de substances toxiques tels les furfurals, issus de la dégradation du xylane, et qui exerceraient un effet inhibiteur (Gomes *et al.*, 1994).



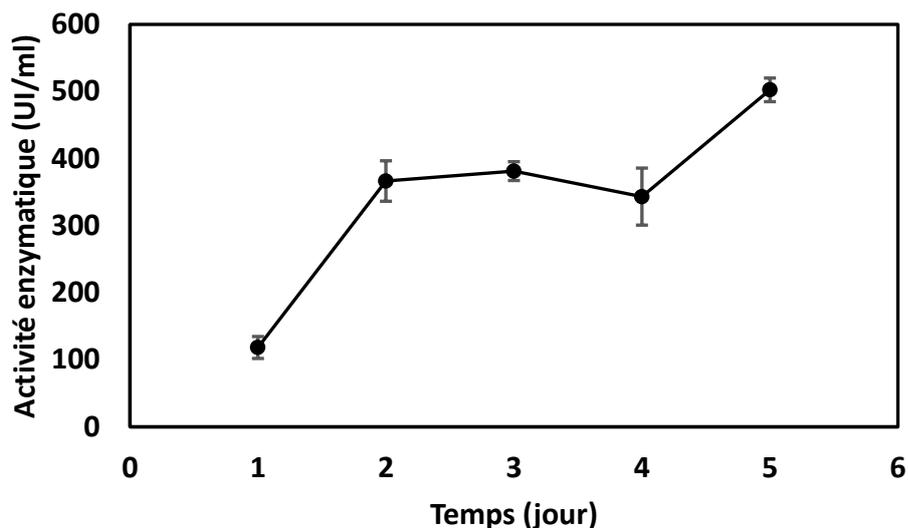
**Figure 25.** Effet de la concentration du xylane de hêtre sur la production de xylanases par la souche *Jonesia denitrificans* ID 12-972. Le milieu est incubé à 30°C et pH 9,5.

L'activité enzymatique est mesurée à 50°C et pH 7.

## 2-8. Cinétique de production des xylanases

La cinétique de production des enzymes xylanolytiques pendant 5 jours d'incubation est révélée dans la Figure 26. Elle montre que l'activité enzymatique augmente jusqu'au deuxième jour, puis stabilise jusqu'au quatrième jour, et augmente de nouveau le cinquième jour (Fig. 26).

Deux niveaux d'activité xylanases ont été également observés chez la souche *Streptomyces* sp. I3 (Brito-Cunha *et al.* 2013). Cette dernière a montré deux pics d'activité xylanase après 12 jours d'incubation ; un pic au deuxième jour et un autre au douzième. Les auteurs ont expliqué ce phénomène par l'induction de différentes xylanases. Les produits des xylanases du premier pic seraient responsables de l'induction des xylanases du deuxième pic.



**Figure 26.** Evolution de la production de xylanases par la souche *Jonesia denitrificans* ID 12-972 au cours du temps. Le milieu est incubé à 30°C et pH 9,5. L'activité xylanase est mesurée à 50°C et pH 7.

C'est le cas également de la souche *Streptomyces* sp. F2621, qui après une production de xylanases associées à la croissance, présentait une nouvelle augmentation de la production à la fin de la phase stationnaire (Tuncer *et al.*, 2004). L'augmentation de la production à partir du quatrième jour après une période de stabilité peut être également expliquée par le fait que les produits des xylanases du premier pic seraient responsables de l'induction des xylanases du deuxième pic.

Le profil d'activité après 3 jours d'incubation est similaire à celui obtenu avec *J. denitrificans* BN13 cultivée sur le xylane de bouleau (Boucherba *et al.*, 2011). Toutefois, le taux de production de xylanases par notre souche est supérieur au taux de production par *J. denitrificans* BN13, 118 U/ml après 24h d'incubation par notre souche contre 10,8 U/ml après 35h d'incubation par la souche *J. denitrificans* BN13 (Boucherba *et al.*, 2011). Ces auteurs ont trouvé que la production de xylanases par *J. denitrificans* BN13 est partiellement associée à la croissance. Bien que la production de xylanases chez les Actinobactéries est souvent associée à la croissance cellulaire, certains cas ont montré que la production enzymatique et la croissance ne sont pas toujours liées (Nascimento *et al.* 2002 ; Ding *et al.*, 2004).

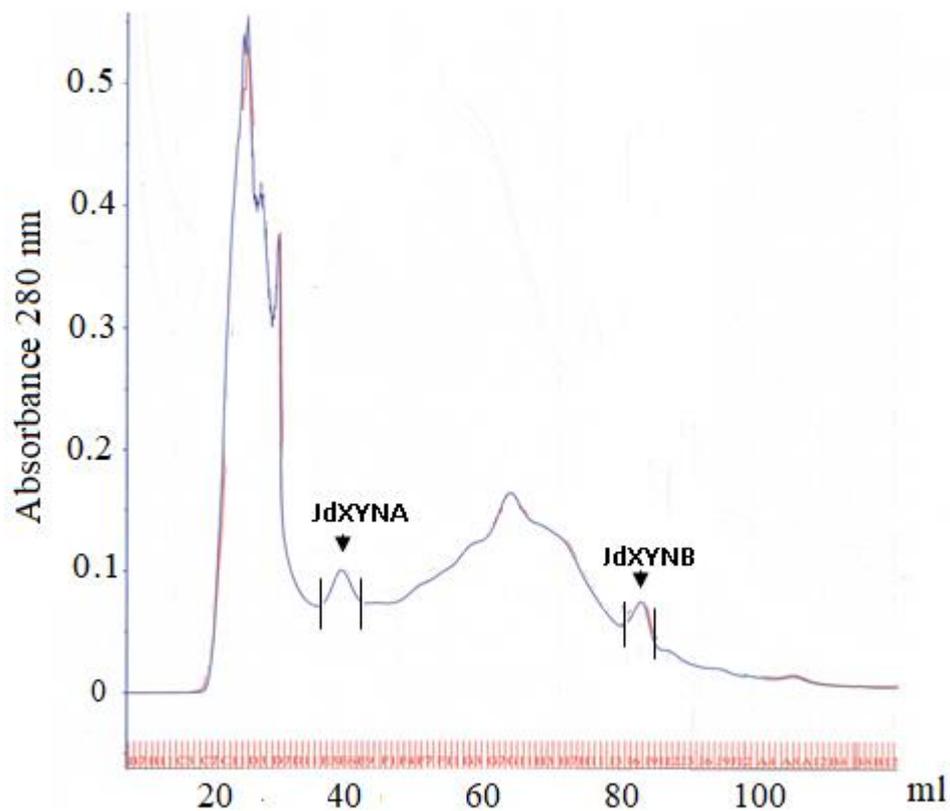
Une production élevée de xylanases (502 UI/ml) est obtenue après 5 jours d'incubation. Elle est nettement supérieure à celles obtenues par certaines Actinobactéries

décrites ; parmi lesquelles on peut citer : *Streptomyces malaysiensis* AMT-3 qui produit 116 U/ml après 6 jours d'incubation et 1% de xylane de larix (Nascimento *et al.* 2003) et *Streptomyces viridochromogenes* M11 qui excrète 56 U/ml après 8 jours d'incubation et 1% de xylane de hêtre (Liu *et al.*, 2013). Une production de 647 U/ml est rapportée chez la souche *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 après 7 jours d'incubation et 1,5 % de xylane de hêtre (Ding *et al.*, 2004).

### **3- Production, purification et propriétés des enzymes**

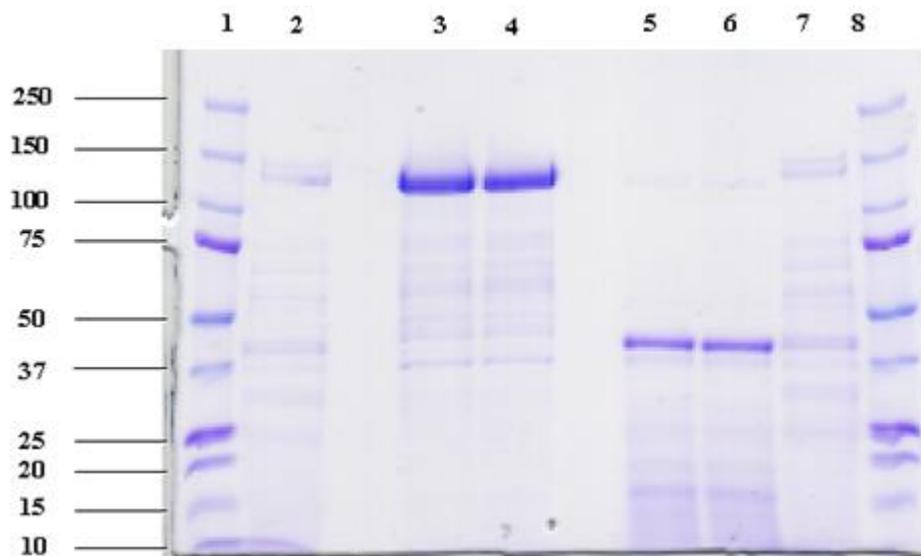
#### **3-1. Purification partielle des xylanases de la souche sélectionnée**

La purification partielle des xylanases a révélé deux fractions actives (Fig.27). Sur le gel SDS PAGE, la fraction A montre la présence d'une large bande avec un poids moléculaire de 130 kDa, alors que la fraction B révèle la présence de deux bandes, une large avec un poids moléculaire de 45 kDa, et une étroite avec un poids moléculaire de 130 kDa (Fig. 28). Après comparaison avec le zymogramme effectué sur le surnageant de la culture de *J. Denitrificans* BN13 (Boucherba et al, 2014), ces larges bandes correspondent à des xylanases. Les xylanases des fractions A et B sont nommées respectivement JdXYNA et JdXYNB



**Figure 27.** Chromatographie filtration sur gel des protéines de la souche *Jonesia denitrificans* ID 12-972. Colonne HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade, tampon phosphate pH 7, débit 1ml/min

Boucherbaet *al*, 2014, ont montré que l'extrait xylanolytique brut de *J. denitrificans* BN-13 contient jusqu'à 6 xylanases, avec un poids moléculaire allant de 26 à 250 kDa (Boucherba *et al.*, 2014), alors que deux xylanases uniquement sont détectées pour la souche *J. denitrificans* ID 12-972. Cette différence peut être expliquée par la perte des autres xylanases au cours de la purification.

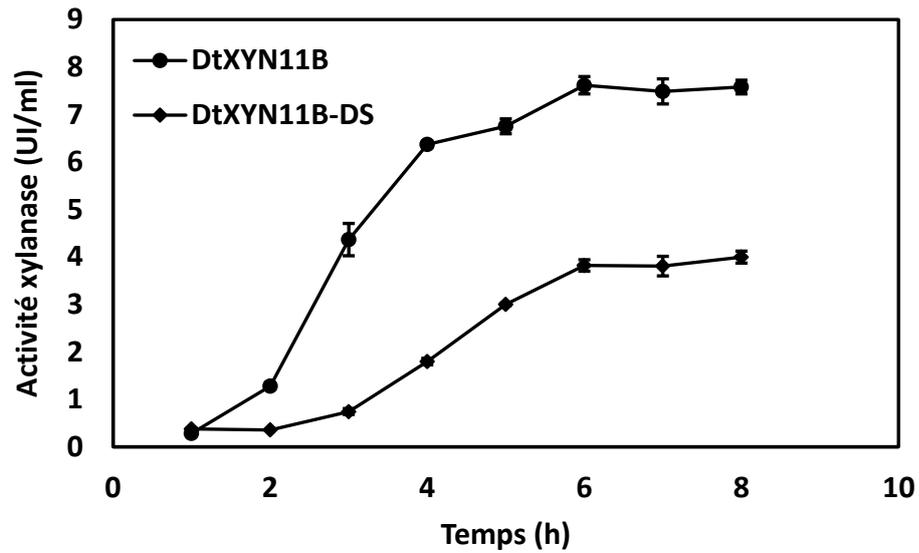


**Figure 28:** SDS PAGE du surnageant de culture (colonnes 2 et 7), de la fraction A (colonnes 3 et 4), de la fraction B (colonne 5 et 6) et des protéines standards (colonnes 1 et 8).

Des xylanases multiples ont été également rapportées chez certaines Actinobactéries (Boucherba *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2003), et chez des souches halophiles et halotolérantes (Wejse *et al.*, 2003 ; Winterhalter et Liebl, 1995). Cette multiplicité de xylanases peut être le résultat de modifications post-sécréctionnelles par la digestion protéolytique (Biely, 1985). Elle reflète également la présence de toute une machinerie enzymatique requise pour la dégradation du xylane (Poosarla et Chandra, 2014). Les xylanases produites par un microorganisme ont des poids moléculaires variés. Cette différence de poids moléculaire permet au microorganisme de s'adapter aux architectures variables de la paroi cellulaire, atteignant ainsi les structures les plus profondes pour une dégradation efficace des substrats lignocellulosiques (Beg *et al.*, 2000).

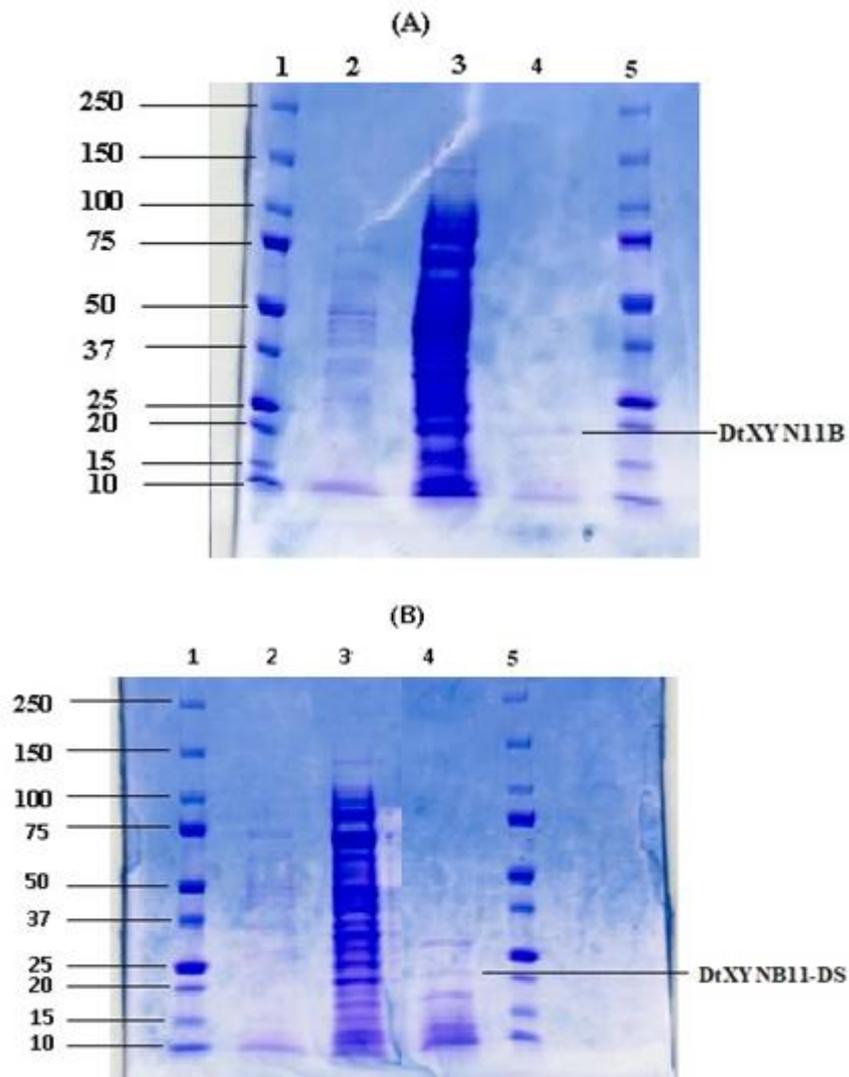
### 3-2. Production et purification de DtXYN11B et DtXYN11B-DS

La cinétique de production des deux xylanases montre que l'expression des deux enzymes augmente durant les premières heures, atteint un maximum à 6 heures d'incubation, puis se stabilise (Fig. 29). Cependant, l'expression de la xylanase DtXYN11B est meilleure que celle de la xylanase DtXYN11B-DS.



**Figure 29.** Cinétique de production des xylanases (a) DtXYN11B et (b) DtXYN11B-DS

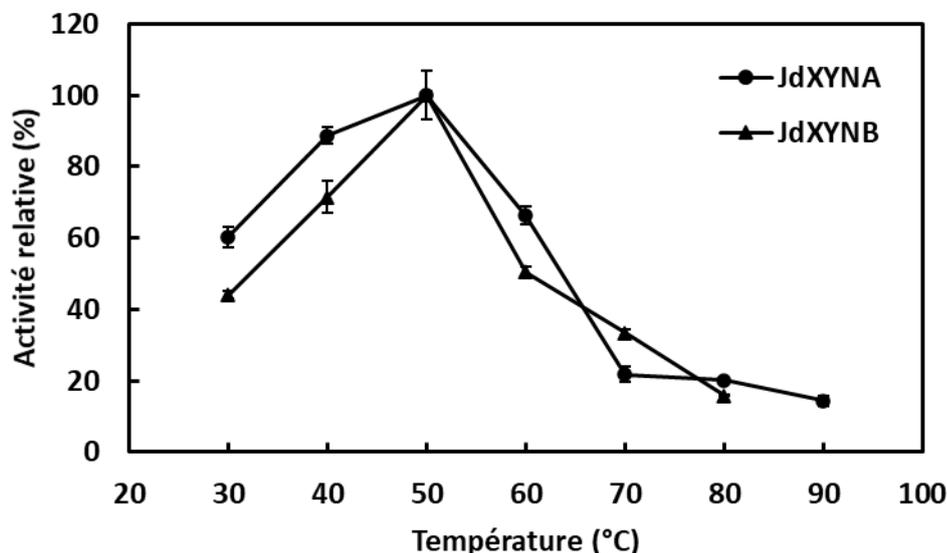
Les extraits enzymatiques obtenus après purification semblent d'une grande pureté (80%). Les poids moléculaires des principales bandes de protéines obtenues sur les gels d'électrophorèse dénaturante (Fig. 30 A et B) sont estimés à 19 kDa et 21 kDa, valeurs qui correspondent respectivement aux poids moléculaires des xylanases DtXYN11B et DtXYNB11-DS estimés auparavant par Li *et al.*, (2013).



**Figure 30.** SDS-PAGE des surnageants et des solutions protéiques obtenus par chromatographie filtration sur gel de DtXYN11B (A) et de DtXYNB11-DS.(B). Colonne 1 et 5 les protéines standards ; colonne 2 le surnageant du milieu de culture ; colonne 3 chromatographie échangeuse de cations ; Colonne 4 chromatographie filtration sur gel.

### 3-3. Effet de la température sur l'activité xylanase

Les deux xylanases de *J. denitrificans* ID 12-972 montrent un optimum d'activité à 50°C (Fig. 31). Toutefois, JdXYNA semble mieux thermoactive que JdXYNB.



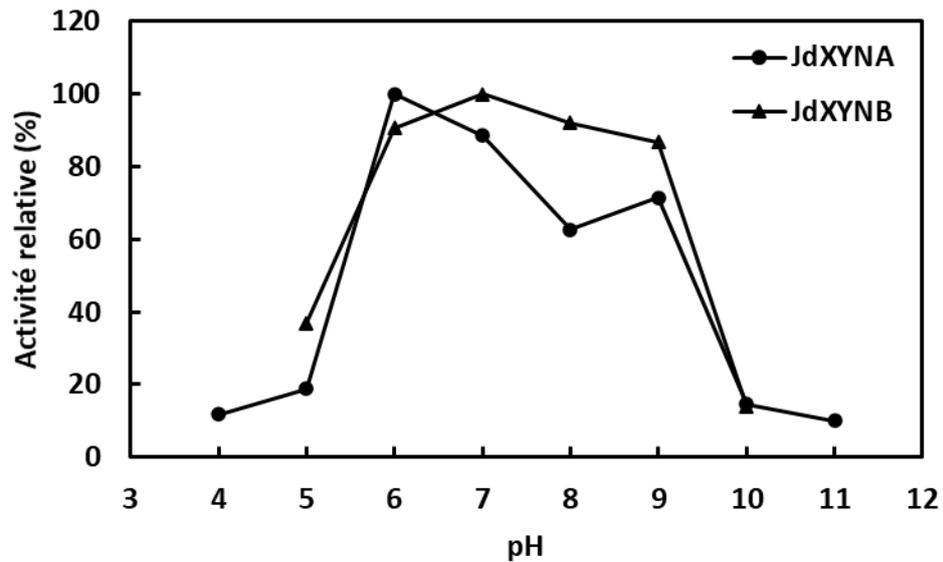
**Figure 31.** Effet de la température sur l'activité des xylanases JdXYNA et JdXYNB.

L'activité xylanase est mesurée en présence de xylane de hêtre à pH 7.

Les xylanases isolées d'actinomycètes mésophiles ont des optimums d'activité entre 50 et 70°C (Liu *et al.*, 2013 ; Zhou *et al.*, 2012 ; Boucherba *et al.*, 2014 ; Maheswari et Chandra, 2000). La xylanase de la famille 11 de *Streptomonospora* sp. YIM 90494 présente un optimum d'activité à 55°C et de très faibles activités à 75 et 85°C (Ren *et al.*, 2013). La xylanase de la souche *Amycolatopsis* sp. GDS a un optimum à 50°C, avec des activités élevées à 70 et 80°C (Kshirsagar *et al.*, 2016). La xylanase de famille 11 de la souche *Streptomyces* sp. 7b montre une activité maximale à 50°C (Bajaj *et al.*, 2010).

### 3-4. Effet du pH sur l'activité xylanase

Les xylanases JdXYNA et JdXYNB montrent des activités élevées entre pH 6 et 9 (Fig. 32). Elles révèlent respectivement des activités optimales à pH 6 et 7 (Fig. 32).

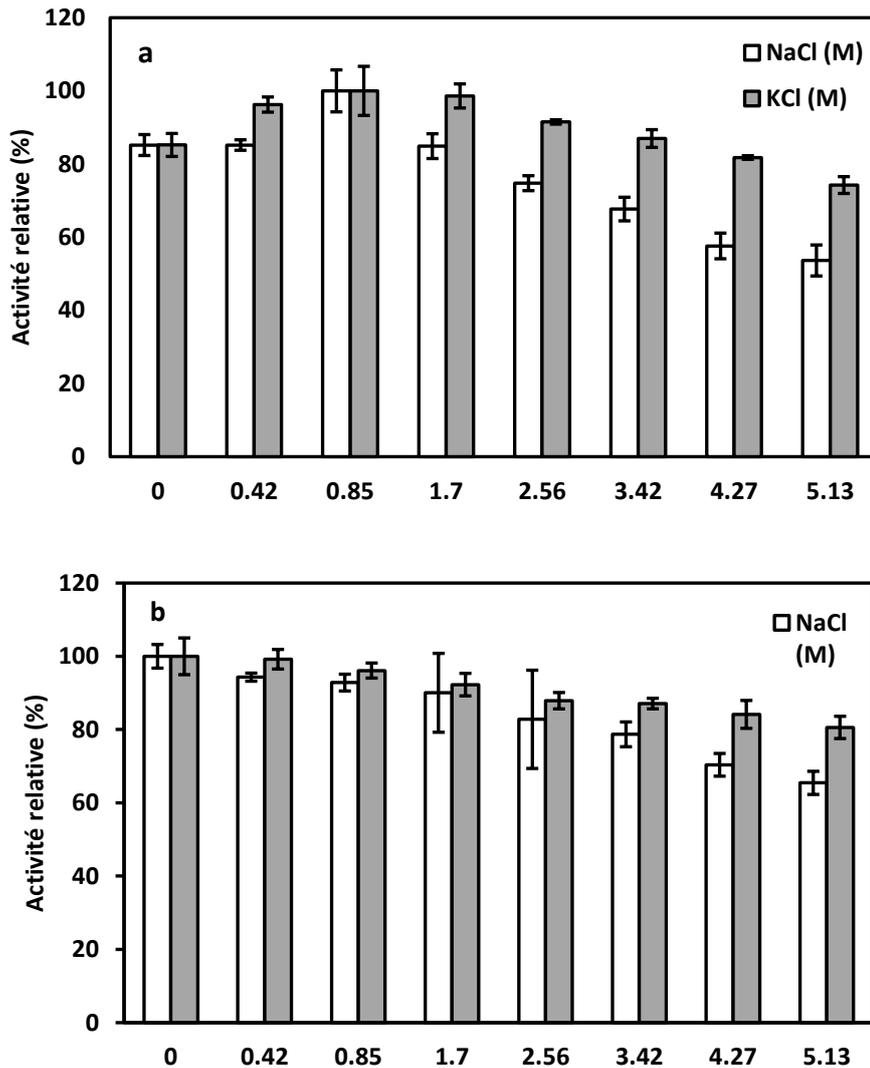


**Figure 32.** Effet du pH sur l'activité des xylanases JdXYNA et JdXYNB. L'activité xylanase est mesurée en présence de xylane de hêtre à 50°C.

Plusieurs xylanases d'actinomycètes décrites ont révélées des optima d'activité à pH 6 (Liu *et al.*, 2013 ; Adigüzel et Tunçer, 2016 ; Bajaj et Singh, 2010 ; Nascimento *et al.*, 2002). Une préférence au pH alcalins a été rapporté également chez d'autres xylanases de souches halophiles et halotolérantes (Ren *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2012 ; Zhou *et al.*, 2012 ; Kshirsagar *et al.*, 2016).

### 3-5. Effet des sels sur l'activité xylanase

En général, les xylanases JdXYNA et JdXYNB montrent une bonne tolérance aux sels testés. Elles révèlent respectivement jusqu'à 53,64% et 65,44% d'activité en présence de 5,13 M de NaCl et 74,26% et 80,6% en présence de 5,13 M de KCl (Fig. 33). JdXYNA exhibe un optimum à 0,85 M de NaCl et à 0,42-1,7 M de KCl (Fig. 33a). Elle est de ce fait une enzyme modérément halophile. JdXYNB est plus active aux faibles concentrations (Fig. 33b), mais elle est plus tolérante à ces deux sels que JdXYNA.



**Figure 33.** Effet des sels sur l'activité des xylanases JdXYNA (a) et JdXYNB (b).

L'activité xylanase est mesurée en présence de xylane de hêtre aux pH 6 et 7 respectivement et à 50°C.

Zhang *et al.* (2012), suggère qu'à des concentrations élevées en sels, le maintien d'une charge négative à la surface de la protéine au pH alcalins est important pour l'action enzymatique. Une halotolérance et une alcalophilie présentes ensemble dans la même enzyme suggère un lien entre ces deux propriétés.

Ces deux xylanases sont plus halotolérantes que d'autres xylanases d'actinomycètes mésophiles. La xylanase de la souche *Streptomyces* sp. AOA40L reste très active jusqu'à 10% (1,7 M) de NaCl (80% d'activité), avec un optimum à 5% (0,85 M) de NaCl (Adigüzel et Tunçer, 2016). La xylanase de *Lechevalieria* sp. HJ3 retient plus de 55% de son activité aux concentrations de 0.2-2 M NaCl et 26 % à 4 M NaCl

(Zhou *et al.*, 2012), la xylanase de la souche *Amycolatopsis* sp. GDS exhibe 60% d'activité après 1h d'incubation à 2.5 M NaCl et moins de 30% à 4M NaCl (Kshirsagar *et al.*, 2016).

La xylanase JdXYNA est stimulée en présence de 0.85 M de KCl (Fig. 33a). Les xylanases de *Streptomonospora* sp. YIM 90494 (Ren *et al.*, 2013) et *Thermobifida halotolerans* YIM 90462T (Zhang *et al.*, 2012) sont stimulées par 10 mM de KCl, mais les xylanases d'autres actinomycètes sont inhibées par la même concentration (Liu *et al.*, 2013 ; Boucherba *et al.*, 2014).

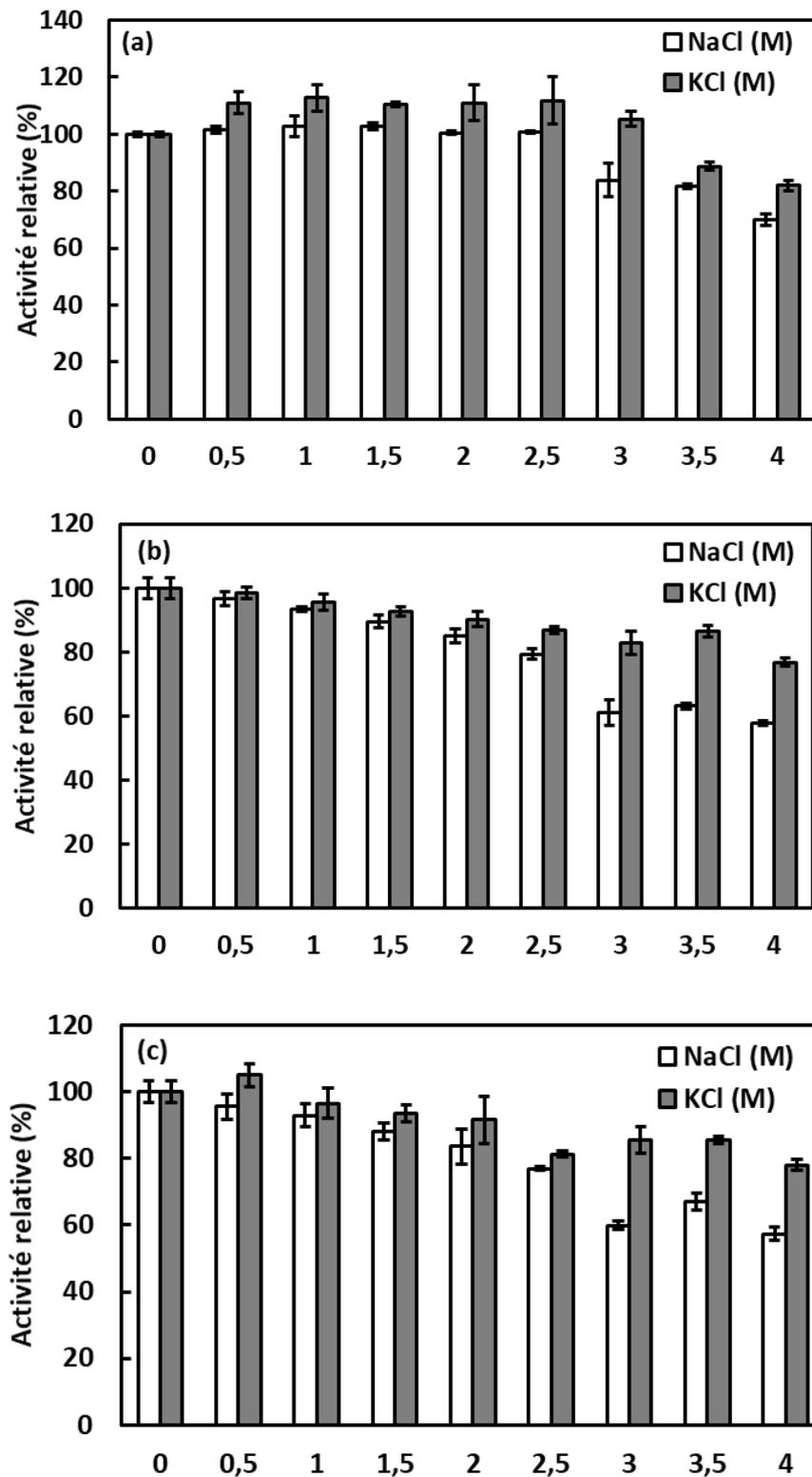
### 3-6. Effet des sels sur l'activité des xylanases hyperthermophiles

Les deux xylanases d'organismes thermophiles sont également hautement tolérantes aux concentrations élevées de NaCl. (Fig. 34). Toutefois la xylanase TfXYN10A de la famille GH10 est plus tolérante (71,93% à 4 M NaCl) (Fig. 34a) que les xylanases DtXYN11B et DtXYN11B-DS de la famille GH11 (57% et à 4 M NaCl) (Figs. 34b et c). Elle présente un optimum d'activité de 0 à 2,5 M NaCl. Toutes les enzymes tolèrent mieux KCl que NaCl.

D'autres xylanases halotolérantes ont été isolées de microorganismes thermophiles (Yu *et al.* 2016 ; Winterhalter et Liebel, 1995 ; Teo *et al.*, 2019). L'halotolérance de TfXYN10A est comparable à celle de la xylanase GH10 TmXYN10B de *Thermotogamaritima* MSB8 (100% de son activité à 2 M NaCl) (Yu et al. 2016). Elle est supérieure à celle de deux xylanases GH10, XynA et XynB, isolées de *Thermotoga maritima* MSB8. Ces deux enzymes maintiennent, respectivement 49 et 65%, de leurs activités maximales à 2% NaCl (Winterhalter et Liebel, 1995), comparé à 94% d'activité pour TfXYN10A. Toutefois, TfXYN10A est moins halotolérante que la xylanase GH10 XynRA2 de *Roseithermus sacchariphilus* RA qui retient 94% de son activité à 4% NaCl (Teo *et al.*, 2019) et la xylanase XynFCB de *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1 qui montre un optimum d'activité à 12,5% (2,1 M) de NaCl (Hung *et al.*, 2011).

Les enzymes halophiles sont caractérisées par une surface comportant un nombre important d'acides aminés acides chargés négativement et peu d'acides aminés basiques et hydrophobes (Paul *et al.*, 2008 ; Hutcheon *et al.*, 2005 ; Fukuchi *et al.*, 2003). La charge négative des acides aminés acides contribue à l'halotolérance en maintenant la protéine soluble en milieu très salin. Ceci est possible soit en formant un réseau ionique hydraté avec les cations ou en prévenant l'agrégation de la protéine via des répulsions

électrostatiques des charges en surface (Ebel *et al.*, 1999 ; Mevarech *et al.*, 2000 ; Ebel *et al.*, 2002 ; Tadeo *et al.*, 2009).

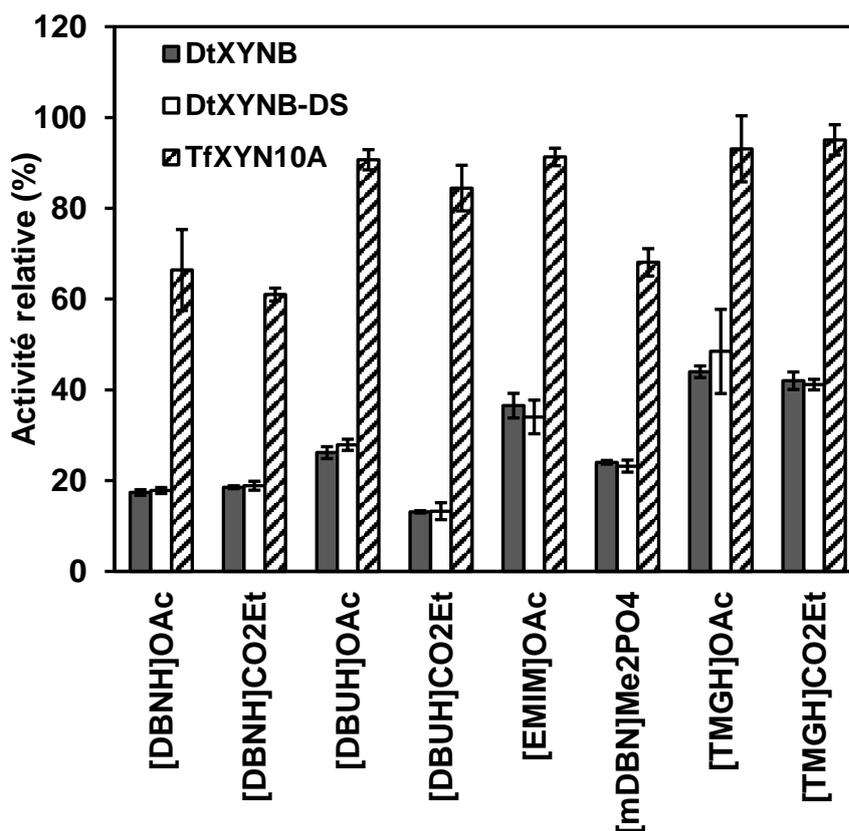


**Figure 34.** Effet des sels sur l'activité des xylanases TfXYN10A à pH 6 (a), DtXYN11B (b) et DtXYN11B-DS (c) à pH 6,5 et 70°C en présence du xylane de hêtre.

#### 4- Activité des xylanases dans les liquides ioniques

##### 4-1. Activité des xylanases dans 15% de liquides ioniques

Les activités des xylanases sont étudiées dans une nouvelle série de liquides ioniques (LIs) superbasiqes. Les enzymes sont d'abord testées dans 15% (v/v) de LIs à base d'acétate-propionate et [mDBN]Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fig. 35 et 36) et dans 5% (v/v) de LIs à base de guaiacolate (Fig. 37).

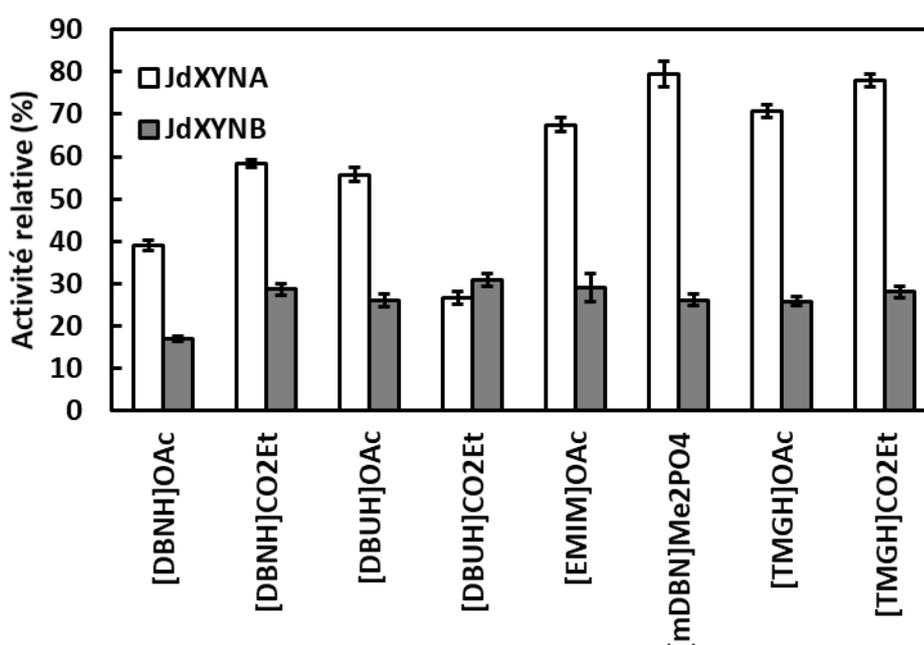


**Figure 35.** Effet des liquides ioniques à base d'acétate et de propionate sur l'activité des xylanases GH10 TfXYN10A, GH11 DtXYN11B et DtXYN11B-DS. L'activité xylanase est mesurée en présence de xylane de hêtre à pH 6 et 70°C. L'activité enzymatique en absence de liquides ioniques est 100%.

La xylanase GH10 TfXYN10A montre une grande tolérance à la plupart des LIs à 15% de concentration (Fig. 35). Par contre presque tous les LIs affectent l'activité des xylanases GH11 DtXYN11B et DtXYN11B-DS (Fig. 35). Une tolérance similaire est observée avec DtXYN11B et son variant stabilisé DtXYN11B-DS, montrant ainsi que la stabilité thermique de DtXYN11B-DS n'offre aucun bénéfice additionnel à l'enzyme.

Les liquides ioniques [EMIM]OAc et [TMGH]OAc sont les mieux tolérés par TfXYN10A (Fig. 35), alors que [TMGH]OAc, [TMGH]CO<sub>2</sub>Et et [EMIM]OAc sont mieux tolérés par DtXYN11B (Fig. 35). [TMGH]OAc est un liquide ionique potentiellement distillable (Parviainen *et al.*, 2013), rendant son utilisation pratique plus prometteuse.

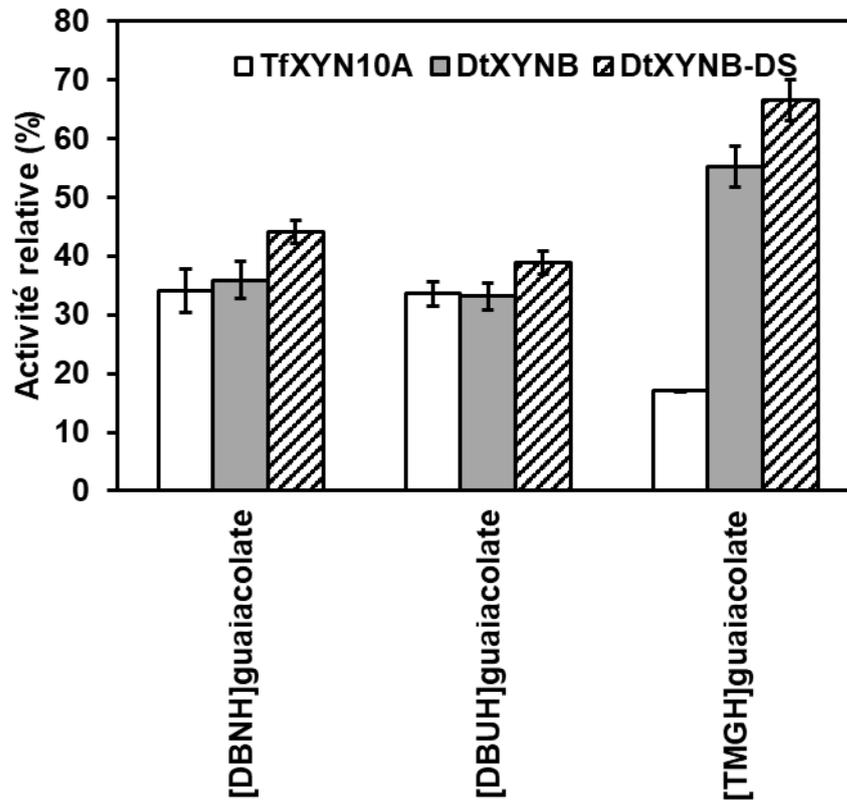
La xylanase JdXYNA est la deuxième enzyme la plus tolérante aux LIs (Fig. 36). Cette tolérance comparée à celle des xylanases hyperthermophiles DtXYN11B et DtXYN11B-DS (Fig. 35 et 36), montre que la thermostabilité n'est pas le seul facteur qui intervient dans la tolérance aux LIs.



**Figure 36.** Effet des liquides ioniques à base d'acétate et de propionate sur l'activité des xylanases JdXYNA et JdXYNB. L'activité xylanase est mesurée en présence de xylane de hêtre à 50°C et à pH 6 et 7 respectivement. L'activité enzymatique en absence de liquides ioniques est 100%.

La xylanase JdXYNA tolère mieux les LIs à base de [TMGH]<sup>+</sup>, [mDBN]<sup>+</sup> et [EMIM]<sup>+</sup> que les LIs à base de [DBNH]<sup>+</sup> et [DBUH]<sup>+</sup> (Fig. 36). La xylanase JdXYNB tolère moins les LIs à base de [TMGH]<sup>+</sup> et [EMIM]<sup>+</sup> si on la compare aux xylanases GH11 hyperthermophile DtXYN11B et DtXYN11B-DS. Par contre, elle présente une tolérance supérieure ou comparable aux LIs à base de [DBNH]<sup>+</sup>, [DBUH]<sup>+</sup> et [mDBN]<sup>+</sup> (Figs. 35 et 36).

DtXYN11B et DtXYN11B-DS tolèrent mieux les LIs à base du cation [TMGH]<sup>+</sup> (Fig. 35 et 37). Elles tolèrent [TMGH]guaicolate mieux que TfXYN10A (Fig. 37). Il se trouve également que le variant DtXYN11B-DS est plus tolérant aux LIs à base de guaicolate que DtXYN11B (Fig. 37). JdXYNA et JdXYNB sont complètement désactivées par ces LIs.



**Figure 37.** Effet des liquides ioniques à base de guaicolate sur l'activité des xylanases GH10 TfXYN10A à pH 6, GH11 DtXYN11B et DtXYN11B-DS à pH 6,5. L'activité xylanase est mesurée en présence du xylane de hêtre à 70°C. L'activité enzymatique en absence de liquides ioniques est 100%.

Plusieurs auteurs ont suggéré l'existence d'un lien entre la thermophilie ainsi que l'halotolérance et la tolérance aux LIs (Pottkamper *et al.*, 2009 ; Zhang *et al.*, 2011 ; Ilmberger *et al.*, 2012 ; Yu *et al.*, 2016). DtXYN11B-DS est plus thermophile et thermostable que DtXYN11B (Li *et al.*, 2013) et cette thermostabilité additionnelle pourrait compter dans la grande tolérance aux LIs à base de guaicolate. JdXYNA est plus thermophile que JdXYNB et elle est plus tolérante aux LIs à base de propionate-acétate. Ces deux enzymes sont complètement inhibées par LIs à base de guaicolate. Ces faits suggèrent également l'importance de la thermostabilité de l'enzyme dans la tolérance aux

LIs. Toutefois, DtXYN11B est plus inhibée par les LIs à base de propionate-acétate malgré sa thermostabilité élevée, ce qui montre que cette propriété n'est pas le seul facteur impliqué dans la tolérance aux LIs.

JdXYNB montre une halotolérance comparable à celle de TfXYN10A et supérieure à celle de JdXYNA, mais elle est drastiquement inhibée par les LIs à base de propionate-acétate. Ces faits suggèrent que la propriété halotolérance ne garantit pas à elle seule la tolérance aux LIs.

Il a été montré que TfXYN10A comme étant l'enzyme la plus tolérante aux LIs parmi d'autres xylanases GH10 et GH11 (incluant DtXYN11B). Elle garde 100% de son activité en présence de 15% de sept LIs (DMIM]DBP, [Chol]AcO, [BMIM]DMP, [TMGH]n-PrCOO, [P4444]AcO et [EMIM]DMP) (Rahikainen *et al.*, 2017). DtXYN11B retient en moyenne 49% de son activité dans cette série de LIs dont 90% avec [Chol]OAc (Rahikainen *et al.*, 2017).

Deux LIs semblent présenter une faible inhibition sur DtXYN11B : [TMGH]OAc dans cette étude et choline acétate [Chol]OAc dans l'étude de Rahikainen *et al.* (2017). Cependant, le cation [TMGH]<sup>+</sup> exerce une forte inhibition lorsqu'il est associé à une grosse molécule, c'est le cas de [TMGH]guaiacolate dans notre étude et [TMGH]n-PrCOO (butyrate) dans l'étude de Rahikainen *et al.* (2017). Tous ces résultats indiquent que l'effet du cation est ajusté selon les propriétés de l'anion.

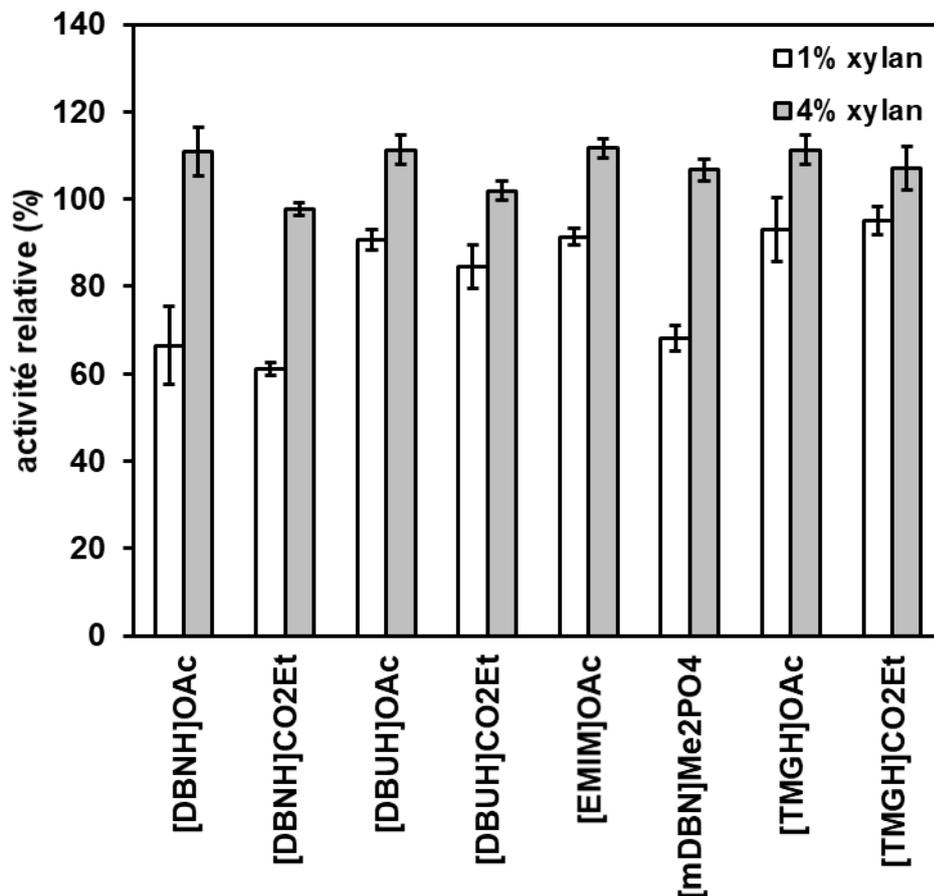
Avec sa plus grande tolérance aux LIs, TfXYN10A a été choisie pour étudier les mécanismes de cette tolérance.

### **4-2. Effet de la concentration élevée en substrat sur l'activité de TfXYN10A dans les liquides ioniques**

Puisque certains LIs sont connus pour l'inhibition compétitive qu'ils exercent sur les xylanases (Anbarasan *et al.*, 2017 ; Li *et al.*, 2013 ; Chawachart *et al.*, 2014 ; Yu *et al.*, 2016), une activité plus élevée devrait être obtenue lorsqu'une plus grande concentration de substrat est utilisée en présence des LIs. Le substrat à concentration élevée entre en compétition sur le site actif avec les molécules de liquide ionique.

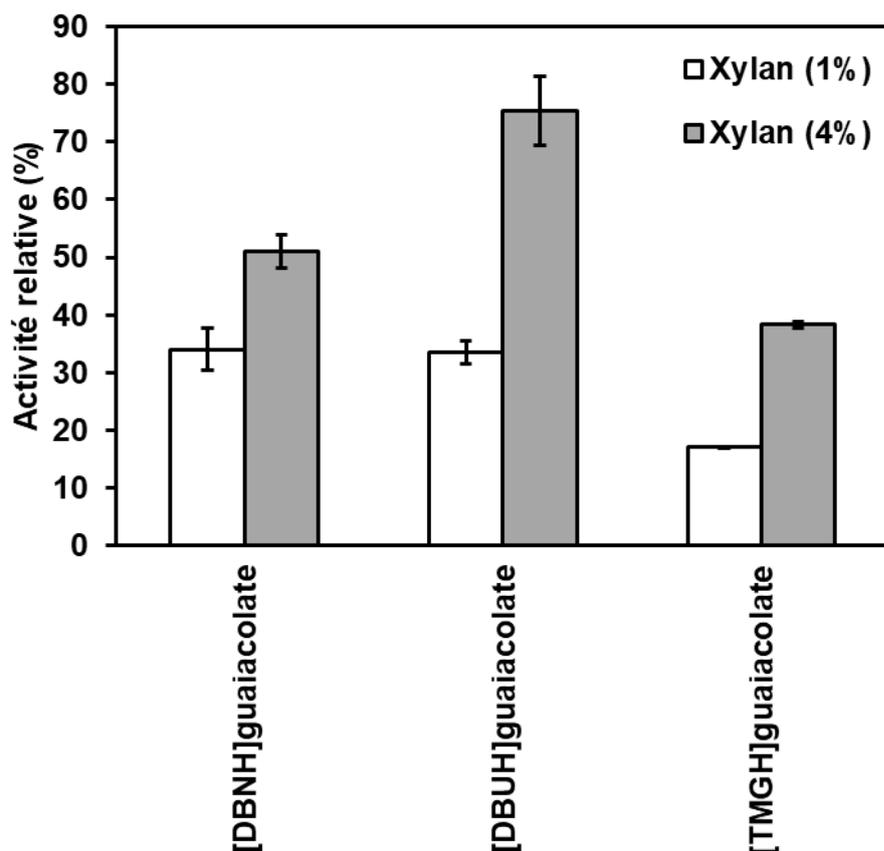
Ainsi, les activités de TfXYN10A sont comparées dans 1% et 4% de concentration de substrat, en présence de 15% de LIs à base d'acétate-propionate et [mDBNH]MePO<sub>4</sub>

(Fig. 38) et 5% de LIs à base de guaiacolate (Fig. 39). Les résultats montrent que l'activité de l'enzyme est plus élevée dans le substrat à 4% que dans celui à 1%, avec tous les LIs.



**Figure 38.** Activité de TfxYN10A dans 1% et 4% xylane de hêtre en présence de 15% de liquides ioniques à base d'acétate propionate. L'activité xylanase est mesurée à 70°C et pH 6. L'activité enzymatique en absence de liquides ioniques est 100%

Cependant, avec les LIs à base de guaiacolate, avec 4% de substrat, le recouvrement de l'activité est plus faible comparé à celle obtenue en absence de LIs (Fig. 39). Ceci indique que l'inhibition s'exerce sur l'enzyme même en présence d'une concentration élevée en substrat. La cause de cette forte inhibition peut être attribuée à la dénaturation de l'enzyme en présence de l'ion guaiacolate. L'activité augmente avec 4 % de substrat dans la plupart des cas en présence des LIs à base de guaiacolates (Fig. 39).



**Figure 39.** Activité de TfxYN10A dans 1 et 4% de xylane de hêtre en présence des liquides ioniques à base de guaiacolate. L'activité xylanase est mesurée à 70°C et pH 6. L'activité enzymatique en absence de liquides ioniques est 100%.

Les xylanases TfxYN10A, DtXYN11B et DtXYN11B-DS sont des enzymes hautement thermostables et très actives au-dessus de 70°C (Anbarasan *et al.*, 2017 ; Li *et al.*, 2013). Elles ne sont probablement pas dénaturées par de faibles concentrations de LIs à 70°C. Ainsi dans 35% de [EMIM]OAc, l'enzyme TfxYN10A présente une température optimale de 70°C (Anbarasan *et al.*, 2017), alors que dans 20% de [EMIM]OAc, l'enzyme DtXYN11B révèle une activité maximale à 75–80°C (Li *et al.*, 2013). Le recouvrement de l'activité après augmentation de la concentration en substrat suggère que l'inhibition compétitive est le principal facteur dans l'inhibition de ces enzymes par les LIs à base d'acétate-propionate et [mDBNH]MePO<sub>4</sub> à 15%. D'autres travaux ont étudié l'activité et la stabilité thermique de ces mêmes xylanases (Anbarasan *et al.*, 2017 ; Li *et al.*, 2013) ou d'autres xylanases thermostables (Chawachart *et al.*, 2014 ; Yu *et al.*, 2016) en présence de solutions diluées de [EMIM]OAc, [EMIM]DMP and [DBNH]OAc (5–35%). Il en ressort de tous ces travaux que ces enzymes perdent plus

d'activité que de stabilité ce qui conforte l'hypothèse de l'inhibition compétitive qui joue un rôle clé dans la perte d'activité.

Le Guaiacol est un résidu phénolique de la dégradation de la lignine au cours du traitement de la biomasse lignocellulosique (Du *et al.*, 2010). Il exerce un effet inhibiteur sur la xylanase d'*Aspergillus japonicus* (Sharma *et al.*, 1985) et la cellulase de *Trichoderma reesei* (Qin *et al.*, 2016). A 5% de LIs à base de guaiacolate, le variant le plus thermostable DtXYN11B-DS montre plus de tolérance à ces LIs que DtXYN11B. L'activité enzymatique n'est pas complètement recouverte avec ces LIs malgré la présence d'une concentration élevée en substrat. Ces deux faits suggèrent que le pont disulfure N-terminal, qui augmente la stabilité enzymatique de DtXYN11B-DS, protège contre l'effet des LIs à base de guaiacolate. Ainsi, au contraire des autres LIs, ceux à base de guaiacolate pourraient causer la dénaturation de la protéine. En se basant sur l'étude spectroscopique de la fluorescence à l'état stationnaire (tryptophane), il a été suggéré que l'effet inhibiteur des composés phénoliques, tel que des LIs à base de guaiacolate, sur une xylanase GH11 thermostable est attribué à des altérations structurales de la protéine (Boukari *et al.*, 2011). Il est ainsi possible que la dénaturation protéique soit retardée par le pont disulfure dans la région N-terminale de DtXYN11B-DS, d'où débute la dénaturation des xylanases GH11 (Purmonen *et al.*, 2007). Toutefois, d'autres expériences sont requises pour confirmer cette hypothèse de la dénaturation protéique.

### **4-3. Activité de TfxYN10A dans différentes concentrations de liquides ioniques**

L'activité de TfxYN10A a été étudiée dans différentes concentrations de LIs à base d'acétate-propionate et [mDBN]Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fig. 40). A 5%, les LIs sont bien tolérés, [DBNH]CO<sub>2</sub>Et et [mDBN]Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> augmentent même légèrement l'activité enzymatique (Fig. 40).

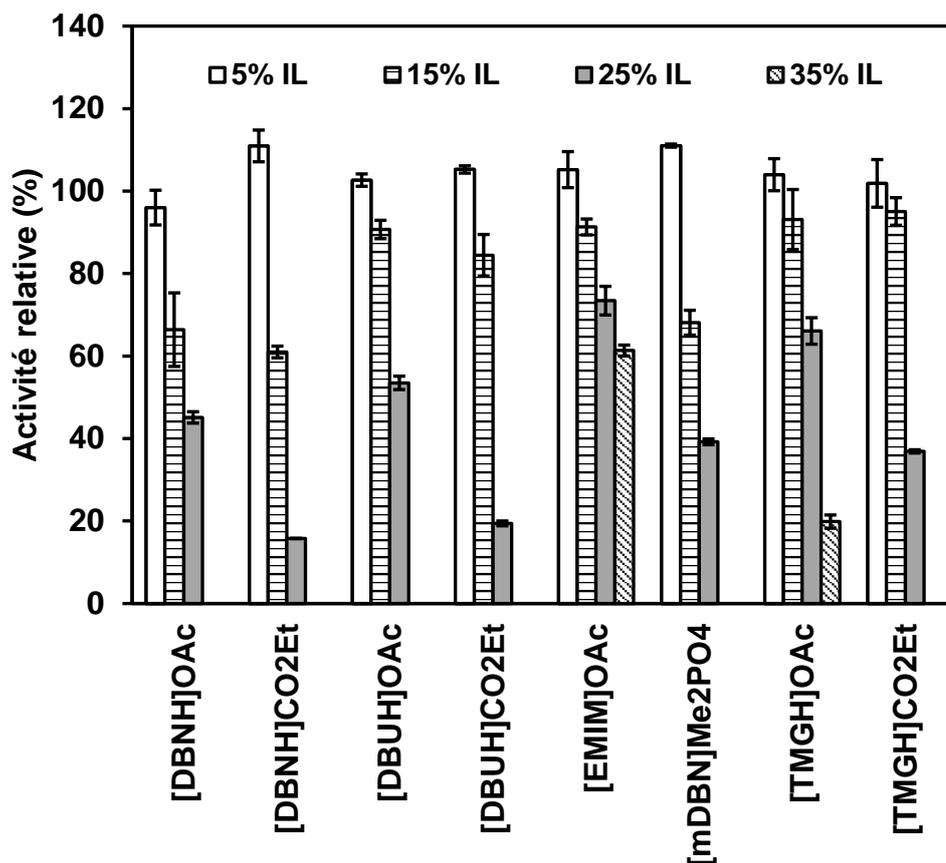


Figure 40. Activité de TfXYN10A dans 5-30% de liquides ioniques. L'activité xylanase est mesurée à 70°C et pH 7 en présence de xylanae de hêtre. L'activité enzymatique en absence de liquides ioniques est 100%

Thomas *et al.*, (2011) ont rapporté une légère augmentation de l'activité chez la xylanase E2 dans [EMIM]Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à toutes les concentration utilisées (5, 10, 15, 20% v/v). Aux concentrations 25-35%, on constate que l'activité enzymatique est beaucoup mieux préservée en présence de [EMIM]OAc. [TMGH]OAc est le second liquide ionique le mieux toléré par l'enzyme. A 35% de LIs, [EMIM]OAc présente une meilleure activité (60%) suivie de [TMGH]OAc (20%). Tous les autres LIs inactivent l'enzyme à la concentration 35%.

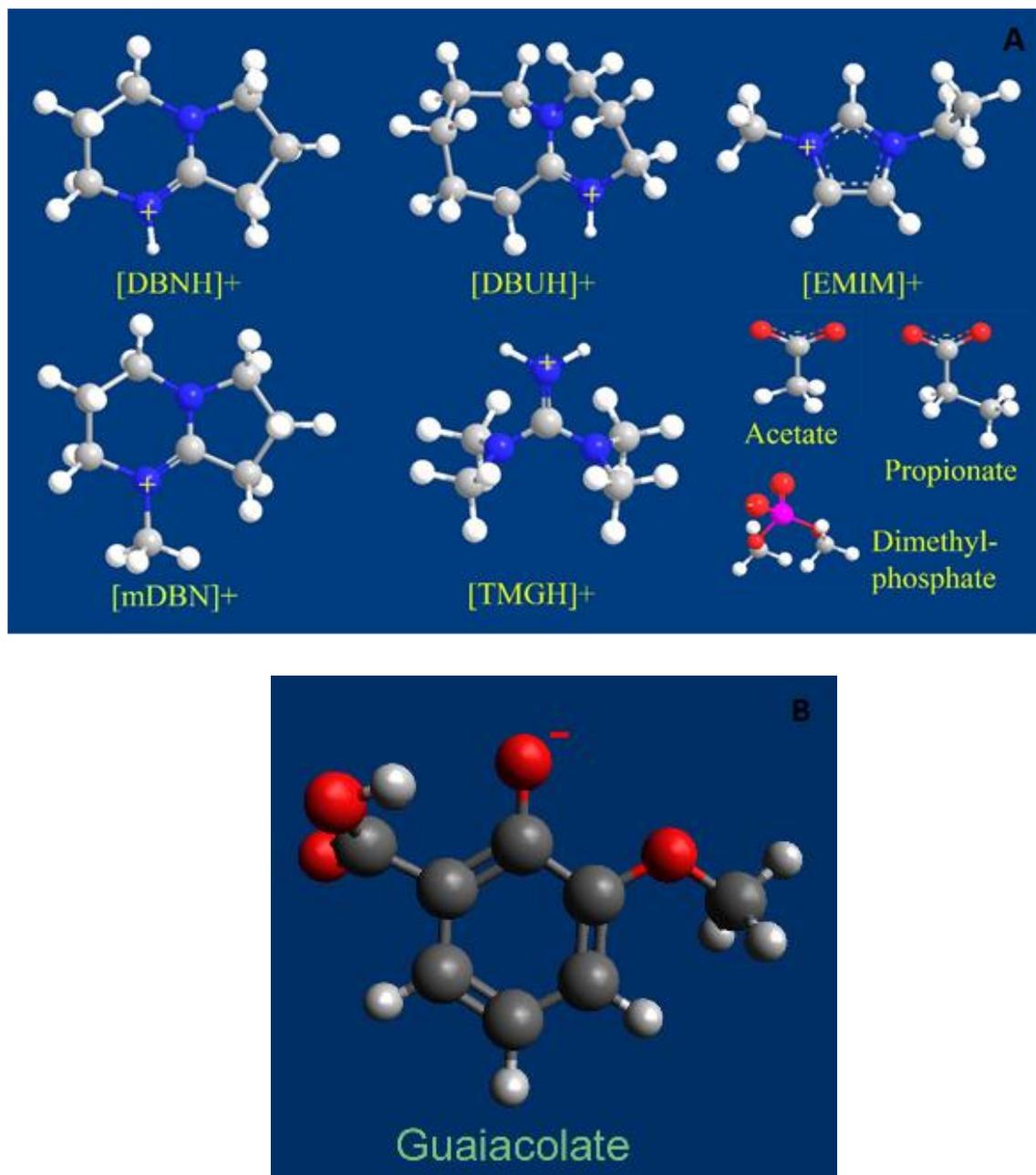
En utilisant une série de LIs basée sur différents cations et anions, il est possible de comparer le rôle de chaque ion dans l'inhibition. Avec 25% de LIs, la diminution de l'activité suit le même ordre que le cation soit conjugué à l'acétate ou au propionate : [EMIM] > [TMGH] > [DBUH] > [DBNH]. L'ordre [EMIM]OAc > [TMGH]OAc est conservé à 35%. Toutefois, cet ordre n'est observé que pour les LIs à base de propionate

à 15%, (Fig. 40). Cet ordre n'est pas observé à 5% ce qui indique qu'une concentration suffisante de LIs est nécessaire pour obtenir un ordre clair d'inhibition.

A 25%, les LIs à base de propionate exercent plus d'inhibition sur l'enzyme que ceux d'acétate. Aucune différence n'est observée entre ces deux ions aux concentrations 5% et 15% (Fig. 40). A 5%, l'inhibition générée par l'ion guaiacolate est plus accentuée lorsqu'il est associé avec les cations [DBNH]<sup>+</sup>, [DBUH]<sup>+</sup> et [TMGH]<sup>+</sup>, alors qu'avec l'acétate et le propionate, ces cations sont mieux tolérés par TfXYN10A (Fig. 40). Une inhibition de plus de 60% est observée avec les guaiacolates (Fig. 37).

Plusieurs propriétés des ions de LIs jouent un rôle clé dans l'inhibition des enzymes en solutions diluées. Elles incluent l'hydrophobicité, la polarisabilité et la taille de l'ion (Zhao, 2016 ; Yang, 2009 ; Heitz *et al.*, 2018 ; Sun *et al.*, 2017). Le degré d'inhibition de TfXYN10A révèle que les cations sans cycle ou avec une structure cyclique ([EMIM]<sup>+</sup> et [TMGH]<sup>+</sup>) sont les plus tolérés par l'enzyme, alors que les cations avec deux cycles ([DBNH]<sup>+</sup>, [mDBN]<sup>+</sup> et [DBUH]<sup>+</sup>) sont les inhibiteurs les plus forts (Fig. 41A).

Les cations de LIs les plus tolérés sont ceux à faible atome de C et H hydrophobes, ([EMIM]<sup>+</sup> 17 ; [TMGH]<sup>+</sup> 17), et ceux à nombre d'atomes élevés sont les moins tolérés ([DBNH]<sup>+</sup> 19 ; [DBUH]<sup>+</sup> 25 et [mDBN]<sup>+</sup> 23). Plusieurs études ont montré que les cations ayant une grande surface hydrophobe inhibent fortement les enzymes (Rahikainen *et al.*, 2017 ; Sun *et al.*, 2017 ; Heitz *et al.*, 2018). Cependant, dans cette étude l'hydrophobicité des cations ne correspond pas complètement à l'ordre d'inhibition de TfXYN10A, suggérant que d'autres facteurs y seraient impliqués.



**Figure 41.** Structures des cations et des anions de liquides ioniques. A) Les structures sont minimisées par le programme MM2 et créées par le programme ChemBio3D 12.0 (CambridgeSoft). B) la structure de guaiacolate est créée après optimisation géométrique par le programme Avogadro (<https://avogadro.cc/>).

Les cations utilisés sont une série d'ions superbasiqes avec des basicités variables : [mDBN]<sup>+</sup> > [EMIM]<sup>+</sup> > [DBUH]<sup>+</sup> > [DBNH]<sup>+</sup> > [TMGH]<sup>+</sup> (du plus au moins basique) (Parviainen *et al.*, 2013). [DBNH]<sup>+</sup> et [DBUH]<sup>+</sup>, cations les plus acides, affectent plus l'enzyme, mais [mDBN]<sup>+</sup>, cation plus basique, n'est également pas toléré.

Par conséquent, des propriétés autres que l'acidité-basicité du cation semblent dominer l'inhibition enzymatique.

Il n'y a pas de corrélation entre l'inhibition de l'enzyme et le rapport de la surface totale sur le volume (ST/V) formés par les atomes polaires et non polaires du cation. Les valeurs du ST/V des cations sont : [DBNH]<sup>+</sup> 1.01; [DBUH]<sup>+</sup> 0.96; [EMIM]<sup>+</sup> 1.11; [mDBN]<sup>+</sup> 1.00 and [TMGH]<sup>+</sup> 1.02 (Parviainen *et al.*, 2013).

La diminution de l'activité enzymatique en présence de propionate comparé à l'acétate à la concentration 25% peut être attribuée à l'augmentation de l'hydrophobicité due à la longueur de la chaîne alkyl de l'anion (Fig. 41A).

Un autre facteur pouvant contribuer à l'inhibition, est la polarisabilité de l'anion. Les anions sont plus polarisables que les cations avec la même densité de charge (Yang, 2009). Les valeurs expérimentales de la polarisabilité électronique obtenue par des mesures diélectriques sur des molécules gazeuses montrent que l'acide propionique est plus polarisable (6.96 Å<sup>3</sup>) que l'acide acétique (5.15 Å<sup>3</sup>) (Gussonia *et al.*, 1998). Par conséquent, l'inhibition de TfXYN10A par les anions semble suivre leur degré de polarisabilité. L'inhibition d'une tyrosinase dans les LIs a été lié à l'augmentation de l'hydrophobicité et la polarisabilité de l'anion (Heitz *et al.*, 2018).

Les LIs à base de propionate sont moins visqueux que ceux à base d'acétate (Parviainen *et al.*, 2013), ce qui peut favoriser l'inhibition enzymatique. Xu (2017) a constaté une diminution de la viscosité avec l'augmentation de la température due à l'affaiblissement de l'interaction entre le cation et l'anion.

Dans les solutions diluées de LIs, les anions kosmotropiques favorisent le fonctionnement de l'enzyme, alors que les anions chaotropiques le défavorisent (Zhao, 2016). Le propionate est plus kosmotropique que l'acétate (Donald et Jenkins, 1995), mais il est plus inhibiteur pour l'enzyme, ce qui indique que l'inhibition ne peut pas être expliquée seulement par l'effet kosmotropique des anions. Ce résultat est en accord avec des études précédentes montrant que l'effet de l'anion ne suit pas toujours les séquences de Hofmeister (Yang, 2009).

Dans les LIs à 5%, la taille et l'hydrophobicité élevée due au cycle benzène (Fig. 41B) ainsi qu'une polarisabilité élevée (12.07 Å<sup>3</sup> à l'état solide) (Gussonia *et al.*, 1998)

du guaiacolate seraient les causes principales de l'inhibition enzymatique de cet anion si on le compare aux ions acétate et propionate.

Il semble qu'une hydrophobicité élevée de l'anion diminue la concentration de liquide ionique nécessaire à l'inactivation de l'enzyme. Selon Zhao (2016), dans les solutions de LIs diluées, les ions kosmotropiques portant les liaisons H de grande basicité (acétate et propionate) tendent à interagir fortement avec les molécules d'eau et deviennent moins inhibiteurs. Plus l'anion devient hydrophobe, moins il est hydraté et tend à interagir avec l'enzyme. Cette interaction peut être accentuée avec l'augmentation de la polarisabilité et pourrait conduire à l'inactivation de l'enzyme à faible concentration.

#### 4-4. Effet des liquides ioniques sur les paramètres cinétiques de TFXYN10A

Le modèle cinétique en état stationnaire de Michaelis Menten décrit la cinétique de la réaction d'une enzyme avec un seul site actif. Dans ce modèle,  $K_M$  est la concentration du substrat correspondant à la moitié de la Vitesse maximale ( $V_{max}$ ) et reflète l'affinité de l'enzyme pour le substrat, alors que  $V_{max}$  est la vitesse de la réaction en présence d'un excès de substrat. Ainsi, l'effet d'un liquide ionique sur  $K_M$  et  $V_{max}$  traduit respectivement son effet sur la liaison du substrat au site actif et sur la vitesse catalytique.

Les cinétiques de la réaction de TFXYN10A en présence et en absence de 5% de LIs sont rapportées sur les Figures S2 à S13 (annexe I). Les valeurs des paramètres cinétiques sont données dans le tableau 6.

Tous les LIs augmentent le  $K_M$ , mais elle est plus élevée en présence de ceux à base de guaiacolate, 11.335 mg/ml avec [TMGH] guaiacolate. Le  $V_{max}$  est sensiblement le même en présence ou en absence de la plupart des LIs à base d'acétate-propionate, excepté [DBNH]CO<sub>2</sub>Et. [DBNH]CO<sub>2</sub>Et et [mDBN]Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> qui l'augmentent légèrement. Ceci peut expliquer la légère augmentation d'activité observée à 5% de liquide ionique. La caractéristique commune entre ces LIs est la présence de la structure DBN dans le cation. [DBNH]CO<sub>2</sub>Et qui révèle le  $V_{max}$  le plus élevé, exerce, néanmoins, une forte inhibition à des concentrations élevées en liquide ionique (Fig. 40).

**Tableau 6.** Paramètres cinétiques de TfXYN10A en présence de 5% de LIs

Liquide ionique	$V_{\max}$ relative	$K_M$ (mg/mL)	$V_{\max}/K_M$ relative
No IL	$1.000 \pm 0.022$	$0.506 \pm 0.048$	$1.986 \pm 0.197$
[DBNH]OAc	$1.002 \pm 0.016$	$0.651 \pm 0.044$	$1.544 \pm 0.094$
[DBNH]CO <sub>2</sub> Et	$1.267 \pm 0.011$	$0.650 \pm 0.023$	$1.951 \pm 0.076$
[DBUH]OAc	$1.051 \pm 0.010$	$0.735 \pm 0.025$	$1.431 \pm 0.048$
[DBUH]CO <sub>2</sub> Et	$1.072 \pm 0.015$	$0.641 \pm 0.021$	$1.672 \pm 0.057$
[EMIM]OAc	$1.076 \pm 0.023$	$0.729 \pm 0.060$	$1.480 \pm 0.121$
[mDBN]Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	$1.138 \pm 0.000$	$0.657 \pm 0.001$	$1.732 \pm 0.003$
[TMGH]OAc	$1.037 \pm 0.052$	$0.625 \pm 0.088$	$1.673 \pm 0.181$
[TMGH]CO <sub>2</sub> Et	$1.034 \pm 0.026$	$0.695 \pm 0.050$	$1.492 \pm 0.072$
[DBNH]guaiacolate	$0.357 \pm 0,025$	$1.284 \pm 0.217$	$0.281 \pm 0.027$
[DBUH]guaiacolate	$0.475 \pm 0.020$	$2.928 \pm 0.472$	$0.164 \pm 0.023$
[TMGH]guaiacolate	$0.324 \pm 0.003$	$11.335 \pm 0.346$	$0.028 \pm 0.000$

La très faible augmentation du  $K_M$  en présence de la plupart des LIs à 5% indique que TfXYN10A possède une aptitude élevée à préserver son activité. Les liquides ioniques à base d'acétate-propionate et [mDBNH]MePO<sub>4</sub> ne montrent aucun ordre dans leur effet sur les paramètres cinétiques (Tableau 6). Cependant, le remplacement des anions par le guaiacolate révèle une différence significative dans les paramètres cinétiques notamment les  $K_M$ . Les LIs à base de guaiacolate diminuent clairement  $V_{\max}$  lequel combiné à une augmentation du  $K_M$ , peut expliquer les faibles activités observées en présence de ces LIs.

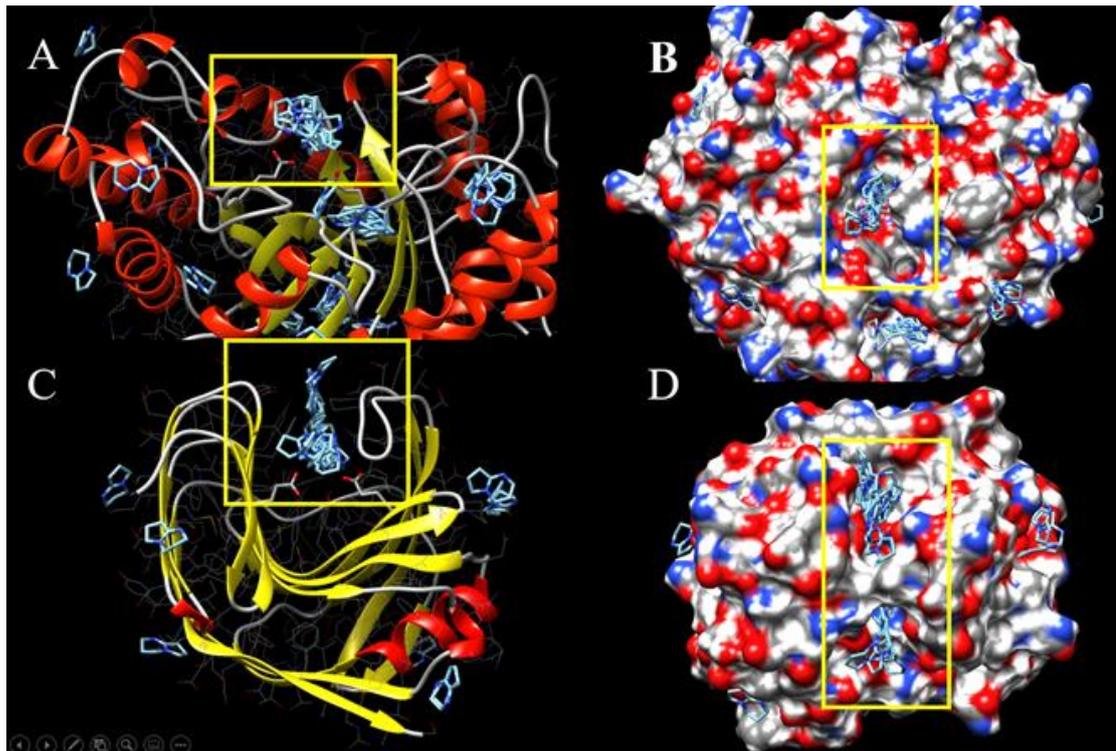
#### 4-5. Liaison des molécules de liquide ionique au site actif

Le programme SwissDock est utilisé dans le docking des cations [DBNH]<sup>+</sup>, [DBUH]<sup>+</sup>, [EMIM]<sup>+</sup>, [mDBN]<sup>+</sup> et [TMGH]<sup>+</sup> ainsi que des anions acétate, propionate et

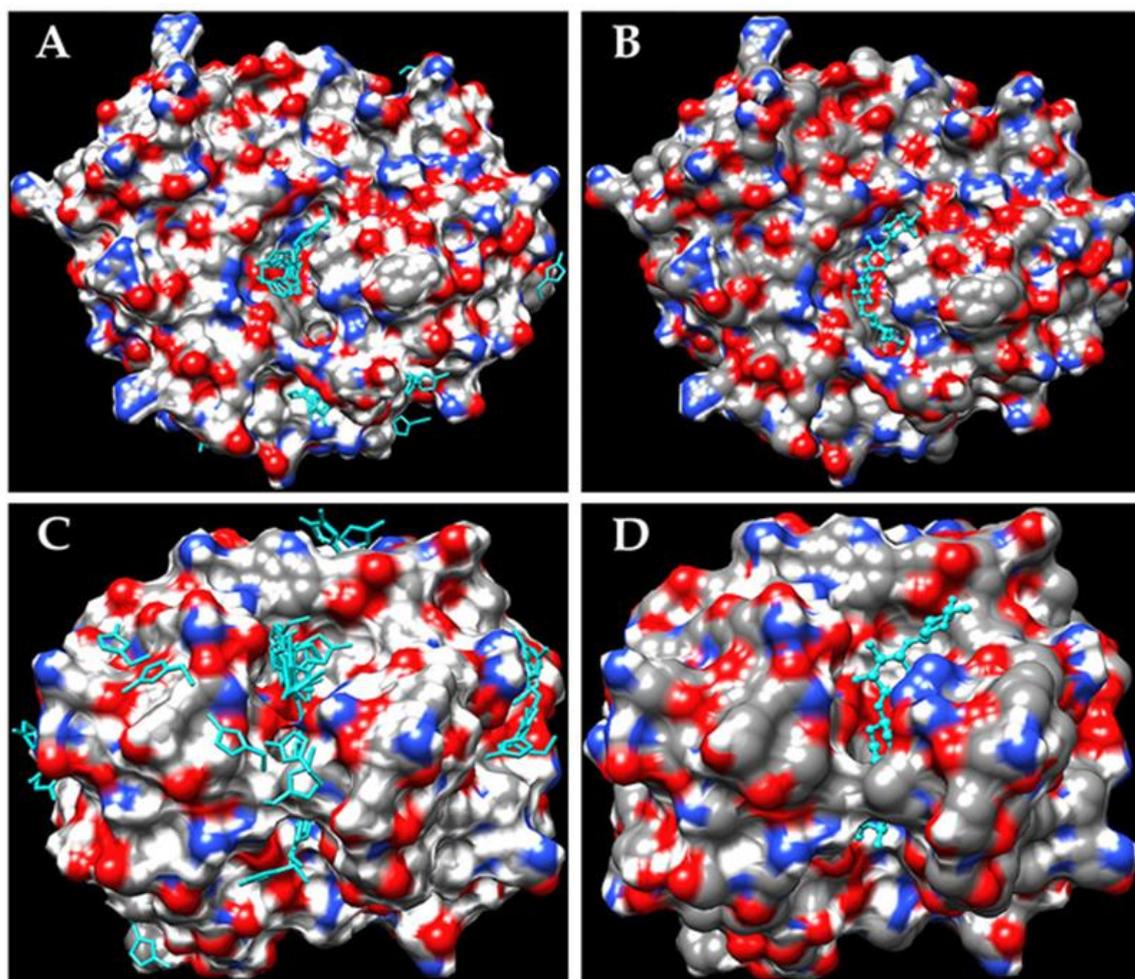
guaiacolate dans les structures de TfXYN10A et DtXYN11B. Ceci permet d'obtenir des informations préliminaires sur la façon par laquelle les molécules des LIs pourraient se lier au site actif. Elle permet également d'expliquer comment cette liaison aux 250-256 postures, assemblées en groupes, peut être corrélée à l'activité enzymatique obtenue dans les solutions de LIs.

4 à 13 groupes de liaison de cations sur un total de 35-50 pour TfXYN10A, et 20 à 33 sur un total de 34-39 groupes pour DtXYN11B sont liés au site actif (Tableau S1 de l'annexe II). Chaque groupe représente le chevauchement de plusieurs postures de liaison, mais certains montrent un chevauchement plus élevé. Le nombre de groupes de cations liés au site actif semble être corrélé avec l'inhibition enzymatique (Tableau S1 de l'annexe II). Le nombre élevé de groupes de cations liés à DtXYN11B est corrélé également avec la forte inhibition de cette enzyme, comme observé précédemment avec le cation [EMIM]<sup>+</sup> (Chawachart *et al.*, 2014).

Dans le docking de [EMIM]<sup>+</sup> au site actif des xylanases TasXyn10A et DtXYN11B, Chawachart *et al.*, (2014) ont observé que la surface de la liaison potentielle du cation est plus réduite chez TasXyn10A que chez DtXYN11B. Cette surface est également réduite chez TfXYN10A pour la liaison de tous les cations étudiés comparée à celle chez DtXYN11B. Ceci traduit la plus forte inhibition de DtXYN11B par les différents LIs (Figs. 42 et 43). En se basant sur la structure des protéines, Chawachart *et al.* (2014) ont fourni une explication pour la différence d'inhibition par les LIs entre les xylanases GH10 et GH11. Ils ont proposé que le site actif étroit et profond des xylanases GH11 permet la liaison transitoire d'une grande quantité de cations [EMIM]<sup>+</sup>, alors que dans le site actif plus ouvert des xylanases GH10, la liaison des cations [EMIM]<sup>+</sup> est distribué en zones restreintes.



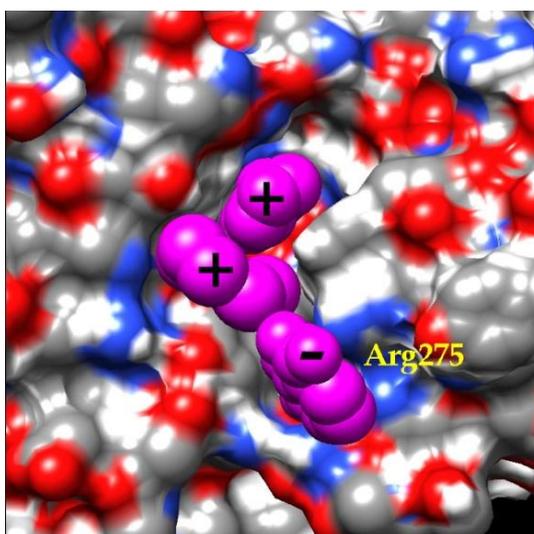
**Figure 42.** Comparaison des caractéristiques du site actif de TfXYN10A (A et B) et DtXYN11B (C et D). La simulation montre la différence de liaison des cations aux sites actifs des deux enzymes. Les images moléculaires sont créées par le programme UCSF Chimera.



**Figure 43.** Comparaison des sites de liaison du cation  $[EMIM]^+$  et des molécules de substrat tétramérique à la surface de TfXYN10A et DtXYN11B. La simulation montre la localisation des cations dans le site actif de TfXYN10A (A) et DtXYN11B (C) dans la même zone de liaison du substrat et la liaison du xylo-tetraose à TfXYN10A (B) et DtXYN11B (D). Xylo-tetraose est docké à la structure modelée de TfXYN10A et à la structure GH11 1XYP puis transféré à la structure 1M4W de DtXYN11B. Les ligands sont montrés en cyan, les atomes d'azote en bleu et les atomes d'oxygène en rouge. Les images moléculaires sont créées par le programme UCSF Chimera.

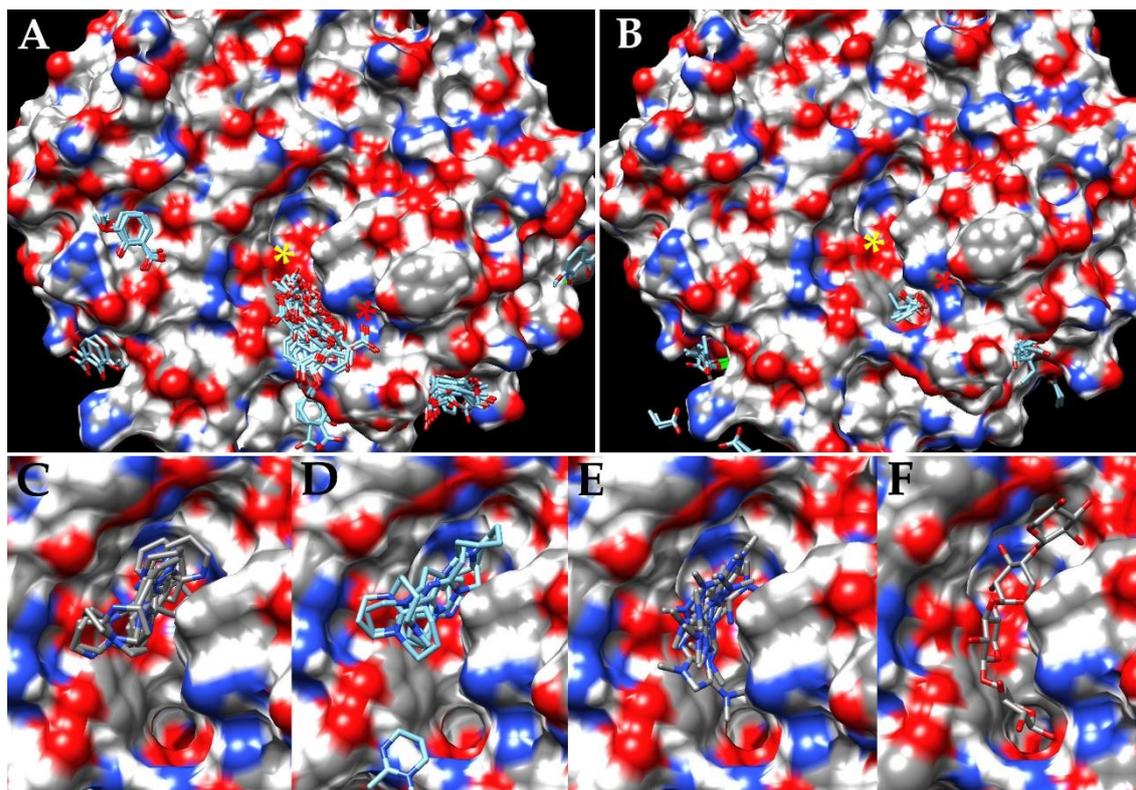
Fondamentalement, peu de cations (1 à 4) sont capables de se lier simultanément aux sites actifs en se basant sur l'espace disponible et la taille des cations (Fig. 44). Dans la simulation de Jaeger et Pfaendtner (2013), deux ou trois cations  $[EMIM]^+$  occupent préférentiellement un espace très proche du site de liaison du substrat chez la xylanase GH11 de *Trichoderma longibrachiatum*. L'énergie de liaisons la plus élevée de tous les cations dans le site actif est localisée au-dessus des résidus catalytiques, indiquant la plus grande capacité de liaison du site de liaison au substrat. Par exemple, dans la posture du

cation [DBNH]<sup>+</sup>, dont l'énergie de liaison est la plus élevée (cation du haut sur la figure 44), l'atome d'azote du cycle est plaqué contre le résidu catalytique Glu128 tandis que la partie hydrophobe de ce cycle est plaquée contre les cycles aromatiques de Trp85, Tyr172 et Trp274 à la surface du site actif (non montré).



**Figure 44.** Docking du cation 1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-enium [DBNH]<sup>+</sup> et de l'anion guaiacolate au site actif de TfxYN10A.

Jaeger et Pfaendtner (2013) ont observé chez la xylanase GH11 une interaction spécifique entre les résidus de surfaces lysine et arginine chargés positivement et l'atome d'oxygène chargé négativement des anions acétate et sulfate d'éthyle des LIs. Le docking des anions à TfxYN10A révèle que le site majeur de liaison est situé à l'autre extrémité du site actif loin du site de liaison des cations (Figs. 44 et 45). 15 groupes de postures de guaiacolate se lient aux sites actifs sur un total de 39 groupes (Tableau S1 de l'annexe II), mais deux groupes seulement d'acétate ou de propionate. Au niveau du site de liaison l'anion guaiacolate est plaqué contre le résidu Arg275 chargé positivement (Figs 44 et 45). Les postures d'acétate et de propionate sont proches de Arg275 (Fig. 45B pour propionate).

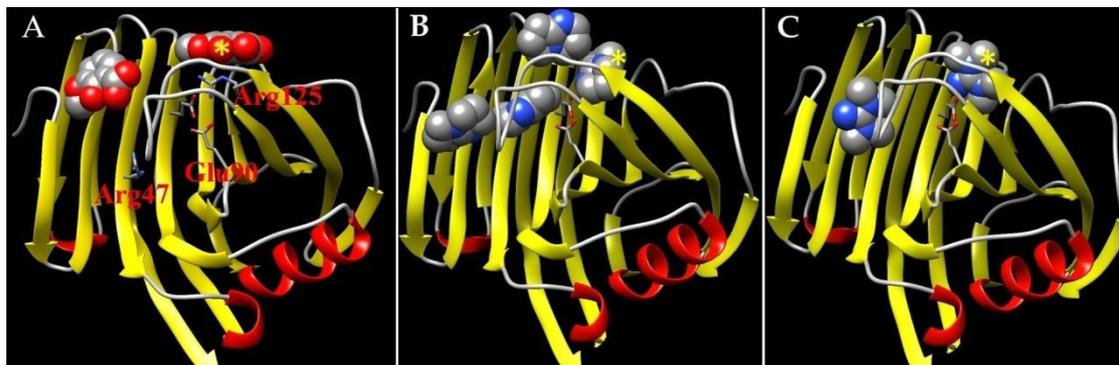


**Figure 45.** Groupes de liaison de guaiacolate (A), propionate (B),  $[\text{DBNH}]^+$  (C),  $[\text{DBUH}]^+$  (D) et  $[\text{TMGH}]^+$  (E) et la liaison du Xylotétraose (F) à TfXYN10A. La structure du site actif est sous la forme d'une demi-lune. L'étoile jaune sur A et B montre la place des résidus catalytiques, et l'étoile rouge, la place du résidu Arg275. Une seule pose représentative des poses de liaison est montrée pour chaque groupe. Les atomes d'azote sont montrés en bleu et les atomes d'oxygène en rouge. Les images moléculaires sont créées par le programme UCSF Chimera.

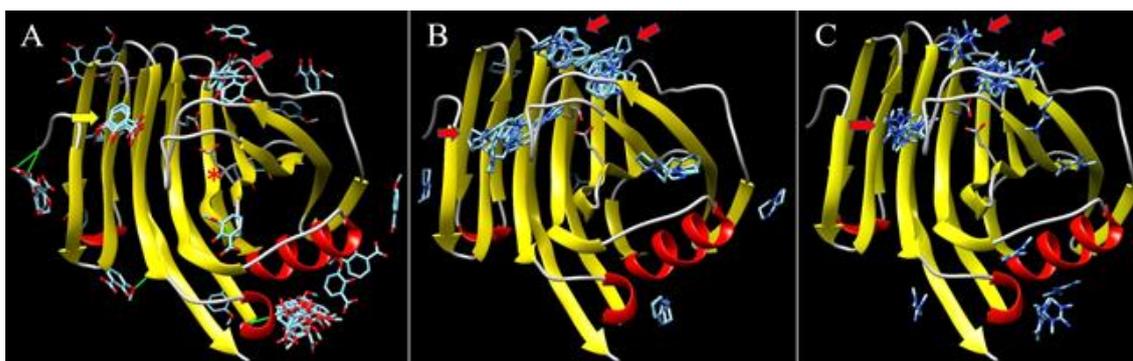
Chez TfXYN10A, en se basant sur la taille du site actif et des molécules de LIs, ainsi que les positions des sites potentiels de liaison des cations et des anions, on estime que l'espace du site actif pourra abriter par exemple deux cations  $[\text{DBNH}]^+$  et un anion guaiacolate. Le cation  $[\text{DBNH}]^+$  ne se lie pas au site de liaison du guaiacolate (Fig. 45), laissant probablement un espace suffisant pour la liaison de ce dernier.

Le docking dans le site actif de DtXYN11B de deux cations et un guaiacolate est montré sur la figure 46, et de groupes d'ions sur la figure 47. Chez cette enzyme, le site actif contient quelques postures pour le guaiacolate (5 groupes), mais peu de traces d'acétate et de propionate à des positions distancées (non montré). Les résultats du

docking montrent que chez DtXYN11B, les sites de liaison du cation et de l'anion se chevauchent contrairement à TfXYN10A (Fig. 46).



**Figure 46.** Docking de l'anion guaiacolate (A), du cation 1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-enium [DBNH]<sup>+</sup> (B) et du cation 1,1,3,3-Tetramethylguanidinium [TMGH]<sup>+</sup> (C) à la xylanase GH11 DtXYN11B.



**Figure 47.** Occupation du site actif de DtXYN11B par des groupes de cation/anion de liquides ioniques. A) DtXYN11B avec des groupes d'anion guaiacolate, B) DtXYN11B avec des groupes de cations [DBNH]<sup>+</sup> et C) DtXYNB avec les groupes de cation [TMGH]<sup>+</sup>. Les flèches montrent la liaison des groupes d'ions au site actif. La région des résidus catalytiques est montrée par une étoile rouge en A. Les images moléculaires sont créées par le programme UCSF Chimera.

Le site actif de la xylanase GH10 TfXYN10A possède des sites de liaison séparés pour le cation et l'anion (Fig. 44). Il est probable que ; conjuguée à une grande surface de liaison hydrophobe du guaiacolate et du cation, l'interaction de charge entre l'anion et le cation contribue à l'effet synergétique de ces ions dans leur liaison au site actif, inhibant ainsi plus fortement l'activité enzymatique. Cet effet est réduit pour l'acétate et le

propionate en raison de leur faible liaison au site actif (Tableau S1 de l'annexe II). Ceci est en accord avec la simulation de Jaeger et Pfaendtner (2013) où aucun cation acétate n'a été cinétiquement attaché au site actif d'une xylanase GH11 en présence de [EMIM]OAc. Chez GH11 DtXYN11B, le cation et l'anion semblent attachés à la même zone (Fig. 46). Cette différence des interactions combinées du cation et de l'anion avec l'enzyme peut expliquer la différence d'inhibition de ces deux enzymes.

Les deux cycles dans le cation et le cycle guaiacolate forment ensemble une large surface hydrophobe. Le site actif des glycosyl hydrolases contient des surfaces hydrophobes qui lient les parties hydrophobes des chaînes de carbohydrates. Ces surfaces formeraient également des interactions fortes avec les parties hydrophobes des cations et des anions de LIs.

Les énergies de liaison des cations ne sont pas corrélées aux activités enzymatiques (Tableau S1 de l'annexe II), alors que le niveau énergétique de liaison de guaiacolate au site actif reflète l'ampleur de l'inhibition contrairement à ceux de l'acétate et du propionate. Le taux d'inhibition le plus élevé est enregistrée avec le guaiacolate (énergie de liaison -7.65 kcal/mol pour TfXYN10A et -6.20 kcal/mol pour DtXYN11B), et la plus faible inhibition avec le propionate (-6.50 kcal/mol) et acétate (-6.48 kcal/mol) (l'acétate et le propionate sont testés uniquement sur TfXYN10A). Les énergies de liaison des cations sont toutes situées dans l'intervalle de -6.4 – -7.0 kcal/mol pour les deux enzymes, indiquant que la liaison du guaiacolate à TfXYN10A pourrait être la plus forte parmi ces molécules de liquides ioniques. Cette forte liaison du guaiacolate à TfXYN10A, pourrait expliquer pourquoi l'inhibition par cet anion est plus importante chez TfXYN10A que chez DtXYN11B.

# **Conclusions et perspectives**

### Conclusions et perspectives

L'isolement d'une souche xylanolytique à partir d'un compost à base de fiente de volaille conforte le caractère ubiquitaire des microorganismes xylanolytiques et de l'importance des xylanases dans le recyclage d'une grande partie du carbone de la biomasse cellulosique.

La souche sélectionnée appartient à l'espèce *Jonesia denitrificans*, une actinobactérie mésophile du sol, isolée d'un compost de fiente de poulet. Elle est alcalophile et capable de croître jusqu'à 12% de NaCl.

L'optimisation de la production de xylanases par cette souche a permis d'obtenir une activité enzymatique de 502 U/ml dans le milieu composé de (g.l<sup>-1</sup>) : xylane de hêtre 150g, extrait de malt 5g, NaCl 5g, KCl 30g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5g, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.2 g, ajusté à pH 9,5 et incubé à 30 °C.

La purification partielle a abouti à deux xylanases de poids moléculaires 130 et 45kDa. La multiplicité des xylanases dans cette souche témoigne de son rôle important comme agent de dégradation du xylane.

Les deux xylanases possèdent des propriétés physicochimiques les rendant susceptibles d'application dans les différentes industries de traitement des matières lignocellulosiques. En effet, avec des activités élevées à 50 °C et à des pH neutre ou basiques, elles peuvent servir dans la production du bioéthanol et du papier. Leur halotolérance élevée les rendent susceptibles d'application dans la dégradation de la biomasse algale.

L'introduction des liquides ioniques comme agents de prétraitements de la matière lignocellulosique avant l'hydrolyse enzymatique peut remplacer les prétraitements physicochimiques en raison de leurs avantages sur ces derniers. En effet, en plus d'être moins polluants, ces substances réduisent plus efficacement la cristallinité de la cellulose et éliminent la lignine. Les conditions de traitement sont également moins consommatrices d'énergie. Toutefois, rares sont les xylanases tolérantes aux liquides ioniques, et la compréhension des mécanismes de cette inhibition est d'une grande importance.

La thermostabilité et l'halotolérance ont été liées à la tolérance aux liquides. Toutefois, aucune de ces propriétés ne peuvent expliquer à elle seule cette tolérance. En effet, la tolérance aux liquides ioniques semble être un phénomène complexe faisant intervenir plusieurs facteurs liés à l'enzyme, au liquide ionique et à leur interaction.

Parmi les xylanases testées, la xylanase GH10 hyperthermostable TfXYN10A est la xylanase la plus tolérante aux liquides ioniques à base d'acétate-propionate. Elle est suivie par la xylanase de poids moléculaire élevé de la souche sélectionnée, et dont l'halotolérance élevée serait l'un des facteurs contribuant à cette tolérance. La thermostabilité additionnelle de la xylanase GH11 DtXYN11B-DS semble être le facteur déterminant dans la tolérance aux liquides ioniques à base de guaiacolate.

Un site actif plus large, une surface de liaison au substrat dans le site actif moins hydrophobe et moins d'interactions entre l'enzyme et les ions du liquide ionique semblent jouer un rôle déterminant dans la tolérance aux liquides ioniques. Les cations et les anions du liquide ionique contribuent ensemble à l'inhibition de l'enzyme en entrant en compétition avec le substrat dans l'occupation du site actif. Ces principes peuvent être utilisés pour assoir les conditions du processus de traitement dans les liquides ioniques, en construisant des xylanases tolérantes aux liquides ioniques ou des liquides ioniques compatibles avec les xylanases.

Les résultats de cette étude ouvrent la voie à plusieurs perspectives, parmi lesquelles :

- Production de xylanases par la souche sélectionnée avec un résidu agroalimentaire tel que le son de blé.
- Recherche d'autres glycoside hydrolases potentiellement produites par cette souche.
- Clonage des gènes des xylanases dans *Escherichia coli* ou *Pichia pastoris* en vue d'obtention de quantités élevées de ces enzymes.
- Détermination d'autres propriétés des xylanases telles leurs stabilités aux températures, pH et sels.
- Essai d'hydrolyse enzymatique d'un déchet lignocellulosique après traitement par les liquides ioniques en utilisant les xylanases les plus tolérantes (TfXYN10A et JdXYNA).

# **Références bibliographiques**

- Abdel-Aziz M.S., Talkhan F.N, Fadel M., AbouZied A.A. AbdeRazik A.S. (2011). Improvement of xylanase production from *Streptomyces pseudogriseolus* via UV mutagenesis. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 5:1045–1050.
- Adamsen A.K., Lindhagen J., Ahring B.K. (1995). Optimization of extracellular xylanase production by *Dictyoglomus* sp. B1 in continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 327–332.
- Adigüzel A.O., Tunçer M. (2016). Production, characterization and application of a xylanase from *Streptomyces* sp. AOA40 in Fruit Juice and Bakery Industries, *Food Biotechnol.* 30: 189–218.
- Ahmed S., Riaz S., Jamil A. (2009). Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84: 19–35.
- Ali M.K., Hayashi H., Karita S., Goto M., Kimura T., Sakka K., Ohmiya K. (2001). Importance of the Carbohydrate-Binding Module of *Clostridium stercorearium* Xyn10B to xylan hydrolysis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 41–47.
- Anbarasan S., Janis J., Paloheimo M., Laitaoja M., Vuolanto M. Karimaki J., Vainiotalo P., Leisola M. Turunen O. (2010). Effect of glycosylation and additional domains on the thermostability of a family 10 xylanase produced by *Thermopolyspora flexuosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 : 356–360.
- Anbarasan S., Wahlström R., Hummel M., Ojamo H., Sixta H., Turunen O. (2017). High stability and low competitive inhibition of thermophilic *Thermopolyspora flexuosa* GH10 xylanase in biomass-dissolving ionic liquids, *Appl. Microb. Biotechnol.* 101 1487–1498.
- Anderson J.L., Ding J., Welton T., Armstrong D.W. (2002). Characterizing ionic liquids on the basis of multiple solvation interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 14247–14254.
- Bae HJ., Kim H.J., Kim Y.S. (2008). Production of a recombinant xylanase in plants and its potential for pulp biobleaching applications. *Bioresour. Technol.* 99:3513–3519.
- Bailey M. J., Biely P. Poutanen K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.* 23: 257–270.

- Bajaj B.K. Singh N.P. (2010). Production of xylanase from an alkalitolerant *Streptomyces* sp. 7b under solid-state fermentation, its purification, and characterization. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162: 1804–1818.
- Bandikari R., Poondla V., Obulam V.S.R. (2014). Enhanced production of xylanase by solid state fermentation using *Trichoderma koeningi* isolate: effect of pretreated agro-residues. *3 Biotech.* 4: 655–664.
- 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: 459–466.
- Behera S.S., Ray R.C. (2016). Solid state fermentation for production of microbial cellulases: recent advances and improvement strategies. *Int. J. Biol. Macromol.* 86: 656–669.
- Behnam S., Karimi K., Khanahmadi M., Salimian Z. (2016). Optimization of xylanase production by *Mucor indicus*, *Mucor hiemalis*, and *Rhizopus oryzae* through solid state fermentation. *Biol. J. Microorg.* 4: 1–11.
- Béra-Maillet C., Devillard E., Cezette M., Jouany JP., Forano E. (2005). Xylanases and carboxymethylcellulases of the rumen protozoa *Polyplastron multivesiculatum*, *Eudiplodinium maggii* and *Entodinium* sp. *FEMS Microbiol. Lett.* 244: 149–156.
- Bhardwaj N., Chanda K., Kumar B. Prasad H., Sharma G.D., Verma P. (2017). Statistical optimization of nutritional and physical parameters for xylanase production from newly isolated *Aspergillus oryzae* LC1 and its application in the hydrolysis of lignocellulosic agro-residues. *BioResources* 12:8519–8538.
- Bhardwaj N., Kumar B., Verma P. (2019). A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. *Bioresour. Bioprocess.* 6:40.
- Bian J., Peng F., Peng X., Xiao X., Peng P., Xu F., Sun R. (2014). Effect of [Emim]Ac pretreatment on the structure and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse cellulose. *Carbohydr. Polym.* 100: 211–217.

- Bibra M., Kunreddy V., Sani R. (2018). Thermostable xylanase production by *Geobacillus* sp. strain DUSELR13, and its application in ethanol production with lignocellulosic biomass. *Microorganisms*. 6: 93.
- Biely P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* 3: 286-290.
- Binder J.B., Raines R.T.D. (2010). Fermentable sugars by chemical hydrolysis of biomass. *PNAS*. 107: 4516–4521.
- Brito-Cunha C.C.d.Q., de Campos I.T.N., de Faria P.P., Bataus L.A.M. (2013). Screening and xylanase production by *Streptomyces* sp. grown on lignocellulosic wastes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 170: 598–608.
- Black G.W., Hazlewood G.P., Millward-Sadler S.J., Laurie J.I., Gilbert H.J. (1995). A modular xylanase containing a novel non-catalytic xylan-specific binding domain. *Biochem. J.* 307: 191–195.
- Boucherba N., Benallaoua S., Copinet E., Hebal H., Francis D. (2011). Production and partial characterization of xylanase produced by *Jonesia denitrificans* isolated in Algerian soil. *Process Biochem.* 46: 519–525.
- Boucherba N., Gagaoua M., Copinet E., Bettache A., Duchiron F., Benallaoua S. (2014). Purification and Characterization of the Xylanase Produced by *Jonesia denitrificans* BN-13. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172 : 2694–2705.
- Boukari I., O'Donohue M., Rémond C., Chabbert B. (2011). Probing a family GH11 endo- $\beta$ -1,4-xylanase inhibition mechanism by phenolic compounds: Role of functional phenolic groups, *J. Mol. Cat. B: Enzy.* 72: 130–138.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brennan Y., Callen W.N., Christoffersen L., Dupree P., Goubet F., Healey S., Hernández M., Keller M., Li K., Palackal N., Sittenfeld A., Tamayo G., Wells S., Hazlewood G.P., Mathur E.J., Short J.M., Robertson D.E., Steer B.A. (2004). Unusual microbial xylanases from insect guts. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3609–3617.

- Carneiro A.P., Rodriguez O., Mota F.L., Tavares A.P.M., Macedo E.A. (2009). Kinetic and stability study of the peroxidase inhibition in ionic liquids, *Ind. Eng. Chem. Res.* 48: 10810–10815.
- Chadha B.S., Kaur B., Basotra N., Tsang A., Pandey A. (2019). Thermostable xylanases from thermophilic fungi and bacteria: Current perspective. *Bioresour. Technol.* 277: 195–203.
- Chakdar H., Kumar M., Pandiyan K. Singh A., Nanjappan K., Kashyap P.L., Srivastava A.K. (2016). Bacterial xylanases: biology to biotechnology. *3 Biotech* 6: 1–15.
- Chandra R.P., Bura R., Mabee W.E., Berlin A., Pan X., Saddler J.N. (2007). Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 108: 67–93.
- Chawachart N., Anbarasan S., Turunen S., L H.i, Khanongnuch C., Hummel M., Sixta H., Granstrom T., Lumyong S., Turunen O. (2014). Thermal behaviour and tolerance to ionic liquid [emim] OAc in GH10 xylanase from *Thermoascus aurantiacus* SL16W. *Extremophiles.* 18: 1023–1034.
- Chen C.C, Ko T.P, Huang J.W, Guo R.T. (2015). Heat- and alkaline-stable xylanases: application, protein structure and engineering. *Chem. Bio. Eng Rev.* 2: 95–106.
- Cheng G., Varanasi P., Li C., Liu H., Melnichenko Y.B., Simmons B.A., Kent M.S., Singh S. (2011). Transition of cellulose crystalline structure and surface morphology of biomass as a function of ionic liquid pretreatment and its relation to enzymatic hydrolysis, *Biomacromolecules.* 12: 933–941.
- Collins T., Meuwis M.A., Stals I. Claeysens M., Feller G., Gerday C. (2002). A novel family 8 xylanase, functional and physicochemical characterization. *J. Biol. Chem.* 277:35133–35139.
- Collins T., Gerday C., Feller G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 3–23.
- Courtin C.M., Delcour J.A. (2002). Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making. *J. Cereal. Sci.* 35: 225–243.

- Cowling E.B. (1975). Physical and chemical constraints in the hydrolysis of cellulose and lignocellulosic materials. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 163–181.
- Dadi A.P., Varanasi S., Schall C.A. (2006). Enhancement of cellulose saccharification kinetics using an ionic liquid pretreatment step. *Biotechnol. Bioeng.* 95: 904–910.
- Davies G., Henrissat B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure.* 3: 853-859.
- Delgado-García M., Valdivia-Urdiales B., Aguilar-González C.N., Contreras-Esquivel J.C., Rodríguez-Herrera R. (2012). Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries. *J. Sci. Food Agric.* 92: 2575–2580.
- Dekker R.F. (1985). Biodegradation of the hemicelluloses. In: Higuchi (ed) *Biosynthesis and Biodegradation of wood components* (pp 505–532). Academic press. New York.
- Devillard E., Newbold C.J., Scott K.P. Forano E., Wallace R.J., Jouany J.P., Flint H.J. (1999). A xylanase produced by the rumen anaerobic protozoan *Polyplastron multivesiculatum* shows close sequence similarity to family 11 xylanases from Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 181: 145–152.
- Dhillon A., Gupta J.K., Jauhari B.M., Khanna S. (2000). A cellulase-poor, thermostable, alkalitolerant xylanase produced by *Bacillus circulans* AB 16 grown on rice straw and its application in biobleaching of eucalyptus pulp. *Biores. Technol.* 73: 273–277.
- Ding C.H. Jiang Z.Q. Li X.T. Li L.T., Kusakabe I. (2004). High activity xylanase production by *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 7–10.
- Dittmar M. (2014). Development towards sustainability: How to judge past and proposed policies? *Sci. Total Environ.* 472: 282–288.
- Donald H., Jenkins B. (1995). Viscosity *B* coefficients of ions in solution, *Chem. Rev.* 95: 2695–2724.
- Du B., Sharma L.N., Becker C., Chen S.F., Mowery R.A., van Walsum G.P., Chambliss C.K. (2010). Effect of varying feedstock-pretreatment chemistry combinations on

- the formation and accumulation of potentially inhibitory degradation products in biomass hydrolysates, *Biotechnol. Bioeng.* 107: 430–40.
- Ebel C., Faou P., Kernel B., Zaccari G. (1999). Relative role of anions and cations in the stabilization of halophilic malate dehydrogenase. *Biochemistry.* 38: 9039–9047.
- Ebel C., Costenaro L., Pascu M., Faou P., Kernel B., Proust-De Martin F., Zaccari G. (2002). Solvent interactions of halophilic malate dehydrogenase. *Biochemistry.* 41: 13234–13244.
- El-Sharnouby G.A., Aleid S.M., Al-Otaibi M.M. (2012). Nutritional quality of biscuit supplemented with wheat bran and date palm fruits (*Phoenix dactylifera* L.). *Food. Nutr. Sci.* 3:322–328.
- Engel P., Mladenov R., Wulfhorst H., Jager G., Spiess A.C. (2010). Point by point analysis: how ionic liquid affects the enzymatic hydrolysis of native and modified cellulose. *Green Chem.* 12: 1959–1966.
- Ebringerová A., Heinze T., (2000). Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties, 1: Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromol. Rapid. Comm.* 21: 542–556.
- Fengel D., Wegener G., (1989). *Wood: chemistry, ultrastructure and reactions.* Walter de Gruyter & Co, Berlin.
- Fushinobu S., Ito K., Konno M., Wakagi T., Matsuzawa H. (1998). Crystallographic and mutational analyses of an extremely acidophilic and acid-stable xylanase: biased distribution of acidic residues and importance of Asp37 for catalysis at low pH. *Protein Eng.* 11: 1121–1128.
- Fukuchi S., Yoshimune K., Wakayama M., Moriguchi M., Nishikawa K. (2003). Unique amino acid composition of proteins in halophilic bacteria. *J. Mol. Biol.* 327: 347–357.
- Gao W.W., Zhang F.X., Zhang G.X., Zhou C.H. (2015). Key factors affecting the activity and stability of enzymes in ionic liquids and novel applications in biocatalysis, *Biochem. Eng. J.* 99: 67–84.

- George S.P., Ahmad A., Rao M.B. (2001). A novel thermostable xylanase from *Thermomonospora* sp.: influence of additives on thermostability. *Bioresour. Technol.* 78: 221–224.
- George A., Brandt A., Tran K., Zahari S.M.N.S., Klein-Marcuschamer D., Sun N., Sathitsuksanoh N., Shi J., Stavila V., Parthasarathi R., Singh S., Holmes B.M., Welton T., Simmons B.A., Hallett J.P. (2015). Design of low-cost ionic liquids for lignocellulosic biomass pretreatment. *Green Chem.* 17: 1728–1734.
- Giridhar P.V., Chandra T.S. (2010). Production of novel halo-alkali-thermo-stable xylanase by a newly isolated moderately halophilic and alkali-tolerant *Gracilibacillus* sp TSCPVG. *Process Biochem.* 45: 1730–1737.
- Gomes D.J., Gomes J., Steiner W. (1994). Factors influencing the induction of endo-xylanase by *Thermoascus aurantiacus*. *J. Biotechnol.* 33: 87–94.
- Goswami S., Gupta N., Datta S., (2016). Using the  $\beta$ -glucosidase catalyzed reaction product glucose to improve the ionic liquid tolerance of  $\beta$ -glucosidases, *Biotechnol. Biof.* 9: 1–12.
- Gray KA., Zhao L., Emptage M. (2006). *Bioethanol. Curr. Opin. Chem. Biol.* 10: 141–146.
- Grosdidier A., Zoete V., Michielin O. (2011). SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nuc. Acid Res.* 39: 270–277.
- Guleria S., Walia A., Chauhan A., Shirkot C.K. (2013). Optimization of cultural conditions for cellulase-free xylanase production by mutant strain of alkalophilic *Cellulosimicrobium* sp. CKMX1 in submerged fermentation. *Appl. Biol. Res.* 15: 137–144.
- Gupta S., Kuhad R.C., Bhushan B., Hoondal, G.S. (2001). Improved xylanase production from a haloalkalophilic *Staphylococcus* sp. SG-13 using inexpensive agricultural residues. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 5–8.
- Gussonia M., Ruib M., Zerbi G. (1998). Electronic and relaxation contribution to linear molecular polarizability. An analysis of the experimental values, *J. Mol. Struct.* 447 163–215.

- Hakulinen N., Turunen O., Jänis J. Leisola M., Rouvinen J. (2003). Three-dimensional structures of thermophilic  $\beta$ -1,4-xylanases from *Chaetomium thermophilum* and *Nonomuraea flexuosa*: comparison of twelve xylanases in relation to their thermal stability. *Eur J Biochem* 270: 1399–1412.
- Haq I., Tasneem M., Raana K., Khan A., Mukhtar H., Javed M. (2004) Optimization of cultural conditions for the production of xylanase by chemically mutated strain of *Aspergillus niger* GCBCX-20. *Int. J. Agric. Biol.* 6: 1115–1118.
- Haq I., Hussain R., Hameed U., Javad M. (2008). Selection of *Aspergillus niger* mutant using antimetabolite 2-deoxy d-glucose after N-methyl N-nito N-nitroso guanidine (MNNG) treatment. *Pak. J. Bot.* 40: 2613–2623.
- Harris P., Trethewey J.K. (2010). The distribution of ester-linked ferulic acid in the cell walls of angiosperms. *Phytochem. Rev.* 9: 19–33.
- Hatakka A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi –Production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 125–135.
- Heck J.X., Flores S.H., Hertz P.F. and Ayub M.A.Z. (2005). Optimization of cellulase-free xylanase activity produced by *Bacillus coagulans* BL69 in solid-state cultivation. *Process Biochem.* 40: 107–112.
- Heitz M.P., Rupp J.W., Horn K.W. (2018). Biocatalytic activity of mushroom tyrosinase in ionic liquids: specific ion effects and the Hofmeister series, *Insights Enzyme Res.* 2: 1–12.
- Henrissat B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280: 309–316.
- Henrissat B., Coutinho P.M. (2001). Classification of glycoside hydrolases and glycosyltransferases from hyperthermophiles. *Methods in enzymology*. Elsevier, New York, pp 183–201.
- Hong F., Guo X., Zhang S., Han S., Yang G., Jönsson L.J. (2012). Bacterial cellulose production from cotton-based waste textiles: Enzymatic saccharification enhanced by ionic liquid pretreatment. *Bioresour. Technol.* 104: 503–508.

- Hou X., Smith T.J., Li N., Zong M. (2012). Novel renewable ionic liquids as highly effective solvents for pretreatment of rice straw biomass by selective removal of lignin. *Biotechnol. Bioeng.* 109: 2484–2493.
- Hutcheon G.W., Vasisht N., Bolhuis A. (2005). Characterization of a highly stable  $\alpha$ -amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*. *Extremophiles.* 9: 487–495.
- Hung K.S., Liu S.M., Fang T.Y., Tzou W.S., Lin F.P., Sun K.H., Tang S.J. (2011). Characterization of a salt-tolerant xylanase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1. *Biotechnol. Lett.* 33: 1441–1447.
- Ilmberger N., Meske D., Juergensen J., Schulte M., Barthen P., Rabausch U., Angelov A., Mientus M., Liebl W., Schmitz R.A., Streit W.R. (2012). Metagenomic cellulases highly tolerant towards the presence of ionic liquids — linking thermostability and halotolerance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95: 135–146.
- Izumi Y., Koga T., Matsumoto T., Kato T. (1997). Purification and some properties of endo-1,4-beta-d-xylanase from a fresh-water mollusc, *Pomacea insularis* (de Ordigny). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61: 615–620.
- Jaeger V., Burney P., Pfaendtner J. (2015). Comparison of three ionic liquid-tolerant cellulases by molecular dynamics. *Biophys. J.* 108: 880–892.
- Jaeger V., Pfaendtner J. (2013). Structure, dynamics and activity of xylanase solvated in binary mixtures of ionic liquid and water. *ACS Chem. Biol.* 117: 2662–2670.
- Jeffries T.W. (1994). Biodegradation of lignin and hemicelluloses. C. Ratledge (ed.), *Biochemistry of Microbial Degradation*, 233–277. Kluwer Academic Publishers.
- Jensen J.K., Busse-Wicher M., Poulsen C.P., Fangel J.U., Smith P.J., Yang J.Y., Peña M.J., Dinesen M.H., Martens H.J., Melkonian M., Wong G.K.S., Moremen K.W., Wilkerson C.G., Scheller H.V., Dupree P., Ulvskov P., Urbanowicz B.R., Harholt J. (2018). Identification of an algal xylan synthase indicates that there is functional orthology between algal and plant cell wall biosynthesis. *New Phytol.* 218: 1049–1060.

- Jia L., Gonçalves G.A.L., Takasugi Y., Mori Y., Noda S., Tanaka T., Ichinose H., Kamiya N. (2015). Effect of pretreatment methods on the synergism of cellulase and xylanase during the hydrolysis of bagasse, *Bioresour. Technol.* 185: 158–164.
- Kalpna V.N., Rajeswari V.D. (2015). Production of xylanase from various lignocellulosic waste materials by *Streptomyces* sp. and its potential role in deinking of newsprint. *Asian J. Biochem.* 10: 222–229.
- Khandeparkar R.D.S., Bhosle N.B. (2006). Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 when grown in solid-state. *Enzyme Microb. Technol.* 39: 732–742.
- Kim B., al-Tai A.M., Kim S.B., Somasundaram P., Goodfellow M. (2000). *Streptomyces thermocoprophilus* sp. nov., a cellulase-free endo-xylanase-producing streptomycete. *Inter. J. System. Evolut. Microbiol.* 50: 505–509.
- Kittur F.S., Mangala S.L., Rusd A.A., Kitaoka M., Tsujibo H., Hayashi K. (2003). Fusion of family 2b carbohydrate-binding module increases the catalytic activity of a xylanase from *Thermotoga maritima* to soluble xylan. *FEBS Lett.* 549: 147–151.
- Kohli U., Nigam P., Singh D., Chaudhary K. (2001). Thermostable, alkalophilic and cellulase free xylanase production by *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C. *Enzyme Microb. Technol.* 28: 606–610.
- Kormelink F.J.M., Voragen A.G.J. (1993). Degradation of different [(glucurono)arabino]xylans by a combination of purified xylan-degrading enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 688–95.
- Kshirsagar S.D., Saratale G.D., Saratale, R.G. Govindwar S.P., Oh M.K. (2016). An isolated *Amycolatopsis* sp. GDS for cellulase and xylanase production using agricultural waste biomass. *J. Appl. Microbiol.* 120: 112–125.
- Kulkarni N., Shendye A., Rao M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews.* 23: 411–456.
- Kumar B., Bhardwaj N., Alam A., Agrawal K., Prasad H., Verma P. (2018). Production, purification and characterization of an acid/alkali and thermo tolerant cellulase

- from *Schizophyllum commune* NAIMCC-F-03379 and its application in hydrolysis of lignocellulosic wastes. *AMB Express* 8:1–16.
- Kumar A., Gupta R., Shrivastava B., Khasa Y.P., Kuhad R.C. (2012). Xylanase production from an alkalophilic actinomycete isolate *Streptomyces* sp. RCK-2010, its characterization and application in saccharification of second-generation biomass. *J. Molecul. Catal. B: Enzymatic*. 74: 170–177.
- Kumar R., Singh S., Singh O.M.V. (2008). Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 35: 377–391.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680–685.
- Lama L., Calandrelli V., Gambacorta A., Nicolaus B. (2004). Purification and characterization of thermostable xylanase and  $\beta$ -xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*. *Res. Microbiol.* 155: 283–289.
- Larsen J., Haven M.T., Thirup L. (2012). Inbicon makes lignocellulosic ethanol a commercial reality. *Biomass Bioen.* 46: 36–45.
- Lau R.M., Sorgedraeger M.J., Carrea G., van Rantwijk F., Secundo F., Sheldon R.A. (2004). Dissolution of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids: effects on structure and activity, *Green Chem.* 6: 483–487.
- Leite P., Salgado J.M., Venâncio A., Domínguez J.M., Belo I. (2016). Ultrasounds pretreatment of olive pomace to improve xylanase and cellulase production by solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* 214 : 737–746.
- Li H., Kankaanpaa A., Hummel M., Sixta H., Xiong H. and Turunen O. (2013). Thermostabilization of extremophilic *Dictyoglomus thermophilum* GH11 xylanase by an N-terminal disulphide bridge and the effect of ionic liquid [emim]OAc on the enzymatic performance. *Enzyme Microb. Technol.* 53: 414–419.
- Li H., Turunen O., (2015). Effect of acidic amino acids engineered into the active site cleft of *Thermopolyspora flexuosa* GH11 xylanase, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 62: 433–440.

- Li Z., Pei X., Zhang Z., Wei Y., Song Y., Chen L., Liu S., Zhang SH. (2018). The unique GH5 cellulase member in the extreme halotolerant fungus *Aspergillus glaucus* CCHA is an endoglucanase with multiple tolerance to salt, alkali and heat: prospects for straw degradation applications, *Extremophiles* 22 675–685.
- Li Y.1., Zhang Y.J., Ma Y.C., Gong Z.L., Jia M., Tian F., Klenk H.P., Tang S.K. (2015). *Jonesia luteola* sp. nov., a bacterium isolated from Xinjiang Province, China. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 108: 611-618.
- Liu J., Yuan X., Zeng G., Shi J., Chen S. (2006) Effect of biosurfactant on cellulase and xylanase production by *Trichoderma viride* in solid substrate fermentation. *Process Biochem* 41:2347–2351.
- Liu Z., Zhao X., Bai F. (2013). Production of xylanase by an alkaline-tolerant marine-derived *Streptomyces viridochromogenes* strain and improvement by ribosome engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 4361–4368.
- Lohning A.E., Levonis S.M., Williams-Noonan B., Schweiker S.S. (2017). A practical guide to molecular docking and homology modelling for medicinal chemists, *Curr. Top. Med. Chem.* 17: 2023–2040.
- Lombard V., Golaconda Ramulu H., Drula E., Coutinho PM., Henrissa B. (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nuc. Acids Res.* 42: 490–495.
- Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S. (2002). Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 66: 506–577.
- MacFarlane D.R., Pringle J.M., Johansson K.M., Forsyth S.A., Forsyth M. (2006). Lewis base ionic liquids. *Chem. Commun.* 18: 1905–1917.
- Macleod A.M., Lindhorst T., Withers S.G., Warren R.A.J. (1994). The acid/base catalyst in the exoglucanase/xylanase from *Cellulomonas fimi* is glutamic-acid-127 - evidence from detailed kinetic-studies of mutants. *Biochem.* 33: 6371–6376.

- Maheswari M.U., Chandra T. (2000). Production and potential applications of a xylanase from a new strain of *Streptomyces cuspidosporus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16: 257–263.
- Maidak B.L., Cole J.R., Parker C.T.Jr., Garrity G.M., Larsen N., Li B., Liburn T.G., McCaughey M.J., Olsen G.J., Overbeek R., Pramanik S., Schmidt T.M., Tiedje J.M., Woese C.R. (1999). A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). *Nucl. Acids. Res.* 27: 1 171–173.
- Mäki-Arvela P., Anugwom I., Virtanen P., Mikkola J.P. (2010). Dissolution of lignocellulosic materials and its constituents using ionic liquids – A review. *Ind. Crops Prod.* 32: 175–201.
- Malhotra G, Chapadgaonkar S.S. (2018) Production and applications of xylanases— an overview. *BioTechnologia* 99:59–72.
- Mamo G., Hatti-Kaul R., Mattiasson B. (2006). A thermostable alkaline active endo-beta-1-4-xylanase from *Bacillus halodurans* S7: Purification and characterization. *Enzyme Microb. Technol.* 39: 1492-1498.
- Mamo G., Thunnissen M., Hatti-Kaul R., Mattiasson B. (2009). An alkaline active xylanase: Insights into mechanisms of high pH catalytic adaptation. *Biochimie* 91: 1187–1196.
- Mangala S.L., Kittur F.S., Nishimoto M., Sakka K., Ohmiya K., Kitaoka M., Hayashi K. (2003). Fusion of family VI cellulose-binding domains to *Bacillus halodurans* xylanase increases its catalytic activity and substrate binding capacity to insoluble xylan. *J. Mol. Catal. B Enzymol.* 21: 221–230.
- McCarthy A.A., Morris D.D., Bergquist P.L., Baker E.N. (2000). Structure of XynB, a highly thermostable  $\beta$ -1,4-xylanase from *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1, at 1.8 Å resolution, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 56 : 1367–1375.
- Meissner K., Wassenberg D., Liebl W. (2000). The thermostabilizing domain of the modular xylanase XynA of *Thermotoga maritima* represents a novel type of binding domain with affinity for soluble xylan and mixed-linkage-1,3/-1,4-glucan. *Mol. Microbiol.* 36: 898–912.

- Mevarech M., Frolow F., Gloss L.M. (2000). Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. *Biophys Chem.* 86: 155–164.
- Mienda B.S., Idi A., Umar A. (2011). Microbiological features of solid-state fermentation and its applications - An overview. *Res. Biotechnol.* 2: 21–26.
- Miller G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426–428.
- Morris D.D., Gibbs M.D., Ford M., Thomas J., Bergquist PL. (1999). Family 10 and 11 xylanase genes from *Caldicellulosiruptor* sp. strain Rt69B.1. *Extremophiles* 3: 103–111.
- Motta F.L., Andrade C.C.P., Santana M.H.A. (2013). A Review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. in: sustainable degradation of lignocellulosic biomass: techniques, applications and commercialization, Chandel A.K., da Silva S.S. (Eds.). Chapter 10, InTech Publisher, Rijeka, pp: 251–275.
- Nakamura S., Wakabayashi K., Nakai R., Aono R., Horikoshi K. (1993). Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2311–2316.
- Namasivayam S, Babu M, Bharani R.S. (2015). Evaluation of lignocellulosic agro wastes for the enhanced production of extracellular cellulase and xylanase by *Trichoderma harzianum*. *Nat. Environ. Pollut. Technol.* 14 : 47–52.
- Nascimento R.P., Coelho R.R.R., Marques S., Alves L., Girio F.M., Bon E.P.S., Amaral-Collaco M.T. (2002). Production and partial characterization of xylanase from *Streptomyces* sp. Strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme Microbiol. Technol.* 31: 549–55.
- Nascimento R.P., Marques S., Alves L., Coelho R.R.R. (2003). A novel strain of *Streptomyces malaysiensis* isolated from Brazilian soil produces high endo- -1,4-xylanase titres. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 879-881.

- Naveen M., Saroj Y., Pramod T., Jayaramu M., Siddalingeshwara K.G. (2014). Role of nitrogen source for the production of xylanase from *Aspergillus* sp. *J. Drug Deliv. Ther.* 4: 147–149.
- Nevalainen H, Peterson R. (2014). Making recombinant proteins in filamentous fungi—are we expecting too much? *Front Microbiol* 5: 1–10.
- Ninawe S., Kuhad R.C. (2005). Use of xylan-rich cost effective agro-residues in the production of xylanase by *Streptomyces cyaneus* SN32. *J. Appl. Microbiol.* 99: 1141–1148.
- Nishiyama Y., Langan P., Chanzy H. (2002). Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose I $\alpha$  from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 9074–9082.
- Paës G., Tran V., Takahashi M., Boukari I., O'Donohue M.J. (2007). New insights into the role of the thumb-like loop in GHII xylanases. *Protein Eng., Des. Sel.* 20: 15–23.
- Parviainen A., King A.W.T., Mutikainen I., Hummel M., Selg C., Hauru L.K.J., Sixta H., Kilpeläinen I. (2013). Predicting cellulose solvating capabilities of acid-base conjugate ionic liquids, *ChemSusChem* 6: 2161–2169.
- Parviainen H., Parviainen A., Virtanen T., Kilpeläinen I., Ahvenainen P., Serimaa R., Grönqvist S., Maloney T., Maunu S.L. (2014). Dissolution enthalpies of cellulose in ionic liquids. *Carbohydr. Polym.* 113: 67–76.
- Parthasarathi R., Bellesia G., Chundawat S., Dale B.E., Langan P., Gnanakaran S. (2011). Insights into hydrogen bonding and stacking interactions in cellulose. *J. Phys. Chem. A.* 115: 14191–14202.
- Patel R., Kumari M., Khan A.B. (2014). Recent advances in the applications of ionic liquids in protein stability and activity: A review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172: 3701–3720.
- Paul S., Bag S.K., Das S., Harvill E.T., Dutta C. (2008). Molecular signature of hypersaline adaptation: insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes. *Genome Biol.* 9: R70.

- Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. (2004). UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25: 1605–1612.
- Polizeli M., Rizzatti A.C.S., Monti R., Terenzi H.F., Jorge J.A., Amorim D.S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 577–591.
- Pollet A., Vandermarliere E., Lammertyn J., Strelkov S.V., Delcour, J.A., Courtin C.M. (2009). Crystallographic and activity-based evidence for thumb flexibility and its relevance in glycoside hydrolase family 11 xylanases. *Proteins* 77: 395–403.
- Poosarla V.G., Chandra T.S. (2014). Purification and characterization of novel halo-acid-alkali-thermo-stable xylanase from *Gracilibacillus* sp. TSCPVG. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 173: 1375–1390.
- Pottkamper J., Barthen P., Ilmberger N., Schwaneberg U., Schenk A., Schulte M., Ignatiev N., Streit W.R. (2009). Applying metagenomics for the identification of bacterial cellulases that are stable in ionic liquids. *Green Chem.* 11: 957–965.
- Prakash S., Veerangouda Y., Kyoung L. and Sreeramulu K. (2009). Xylanase production using inexpensive agricultural wastes and its partial characterization from a halophilic *Chromohalobacter* sp. TPSV 101. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25: 197–204.
- Pukall R., Gehrich-Schröter G., Lapidus A., Nolan M., Del Rio T. G. and 30 others. (2009). Complete genome sequence of *Jonesia denitrificans* type strain (Prevot 55134<sup>T</sup>). *Stand Genomic Sci.* 1: 262–269.
- Purmonen M., Valjakka J., Valjakka K., Laitinen T., Rouvinen J. (2007). Molecular dynamics studies on the thermostability of family 11 xylanases, *Protein Eng. Des. Sel.* 20: 551–559.
- Qin L., Li W.C., Liu L., Zhu J.Q., Li X., Li B.Z., Yuan Y.J. (2016). Inhibition of lignin-derived phenolic compounds to cellulase, *Biotechnol. Biof.* 9: 70.
- Rahikainen J., Anbarasan S., Wahlström R., Parviainen A., King A.W.T., Puranen T., Kruus K., Kilpeläinen I., Turunen O., Suurnäkki A. (2017). Screening of glycoside

- hydrolases and ionic liquids for fibre modification. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 93: 818–826.
- Rahim T, Ray A.L, Beauty S.P, Gomes D.J. (2009). Induction of mutation in *Neurospora crassa* with ultraviolet radiation and evaluation of cellulase and xylanase activities. *Bangladesh J. Bot.* 38: 201–203.
- Rainey F.A., Ward-Rainey N., Kroppenstedt R.M., Stackebrandt E. (1996). The genus *Nocardiopsis* represents a phelogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage; proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 463: 1088–1092.
- Ratanakhanokchai K., Kyu K.L., Tanticharoen M. (1998). Purification and properties of a xylan-binding endoxylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. strain K-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 694–697.
- Ravichandra K., Yaswanth V.V.N., Nikhila B. Ahmad J., Srinivasa Rao P., Uma A., Ravindrababu V., Prakasham R.S. (2016). Xylanase production by isolated fungal strain, *Aspergillus fumigatus* RSP-8 (MTCC 12039): Impact of agro-industrial material as Substrate. *Sugar Tech.* 18: 29–38.
- Reis S.D., Ferreira-Costa M.A., Peralta R.M. (2003). Xylanase production by a wild strain of *Aspergillus nidulans*. *Acta Scientiarum: Biol. Sci. Maringa.* 25: 221.
- Ren W., Zhang F., Yang X., Tang S., Ming H., Zhou E., Yin Y., Zhang Y., Li W. (2013). Purification and properties of a SDS-resistant xylanase from halophilic *Streptomonospora* sp. YIM 90494. *Cellulose.* 20: 1947–1955.
- Renaud F. N. R., 2000. Précis de bactériologie clinique. ESKA
- Rosmine E, Edassery Sainjan N.C., Silvester R, Varghese S.A. (2019). Utilisation of agrowaste xylan for the production of industrially important enzyme xylanase from aquatic *Streptomyces* sp. and potential role of xylanase in deinking of newsprint. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 8: 2061–2076.
- Sánchez C. (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv.* 27:185–194.

- Sanghi A. Garg N. Kuhar K. Kuhad R.C. Gupta V.K. (2009). Enhanced production of cellulase-free xylanase by alkalophilic *Bacillus subtilis* ASH and its application in biobleaching of kraft pulp. *Bioresource* 4: 1109–1129.
- Sá-Pereira P., Paveia H., Costa-Ferreira M., Aires-Barros M.R. (2003). A new look at xylanases. *Molecul. Biotechnol.* 24: 257–281.
- Schumann P.1., Cui X., Stackebrandt E., Kroppenstedt R.M., Xu L., Jiang C. (2004). *Jonesia quinghaiensis* sp. nov., a new member of the suborder Micrococccineae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 2181–2184.
- Seeliger H.P.R., Jones D. (1986). The genus *Listeria*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp.1235-1245. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair & M. E. Sharpe. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Seyis I., Aksoz N. (2005). Effect of carbon and nitrogen sources on xylanase production by *Trichoderma harzianum* 1073 D3. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 55: 115–119.
- Shallom D., Shoham Y. (2003). Microbial hemicellulases. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 219–228.
- Sharma A., Milstein O., Vered Y., Gressel J., Flowers H.M. (1985). Effects of aromatic compounds on hemicelluloses degrading enzymes in *Aspergillus japonicus*, *Biotechnol. Bioeng.* 27: 1095–1101.
- Shoseyov O., Shani Z., Levy I. (2006). Carbohydrate binding modules: biochemical properties and novel applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 283–295.
- Sianidis G., Pozidis C., Becker F., Vrancken K., Sjoeholm C., Karamanou S., Takamiya-Wik M., van Mellaert L., Schaeffer T., Anné J., Economou A. (2005). Functional large-scale production of a novel *Jonesia* sp. xyloglucanase by heterologous secretion from *Streptomyces lividans*. *J. Biotechnol.* 121: 498–507.
- Silveira M.H.L., Morais A.R.C., da Costa Lopes A.M., Oleksyszzen D.N., Lukasik, J. Andraus R.B., Ramos L.P. (2015). Current pretreatment technologies for the development of cellulosic ethanol and biorefineries. *ChemSusChem*, 8: 3366–3390.

- Sindhu R., Binod P., Mathew A.K., Abraham A., Gnansounou E., Ummalyma S.B., Thomas L., Pandey A. (2017). Development of a novel ultrasound assisted alkali pretreatment strategy for the production of bioethanol and xylanases from chili post-harvest residue. *Bioresour. Technol.* 242:146–151.
- Singh S., Simmons B.A., Vogel K.P. (2009). Visualization of biomass solubilization and cellulose regeneration during ionic liquid pretreatment of switchgrass. *Biotechnol. Bioeng.* 104: 68–75.
- Singla A., Paroda S., Dhamija S.S. Goyal S., Shekhawat K., Amachi S., Inubushi K. (2012). Bioethanol production from xylose: problems and possibilities. *J. Biof.* 3:1–17.
- Simair A.A., Dahot M.U., Mangrio G.S., Mangrio S.M., Xu J.H., Zhong J.J. (2010). Enhancing effect of amino acids and vitamins on xylanase production by *Pleurotus eryngii* through submerged fermentation. *Pak J. Biotechnol.* 7:123–126.
- Sizova M.V., Izquierdo J.A., Panikov N.S., Lynd L.R. (2011). Cellulose-and xylandegrading thermophilic anaerobic bacteria from biocompost. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 2282–2291.
- Solomon V., Teplitsky A., Shulami S., Zolotnitsky G., Shoham Y., Shoham G. (2007). Structure–specificity relationships of an intracellular xylanase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Acta Cryst.* 63: 845–859.
- Stevens J.C., Das L., Mobley J.K., Asare S.O., Lynn B.C., Rodgers D.W., Shi J. (2019). Understanding laccase–ionic liquid interactions toward biocatalytic lignin conversion in aqueous ionic liquids, *ACS Sus. Chem. Eng.* 7: 15928–15938.
- Subramaniyan S., Prema P., Ramakrishna S.V. (1997). Isolation and screening for alkaline thermostable xylanases. *J. Basic Microbiol.* 37: 431–437.
- Subramaniyan S., Prema P. (2002). Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Crit. Rev. Biotechnol.* 22: 33–64.
- Suleman M, Aujla M.I. (2016). Production and characterization of xylanase from *Aspergillus niger* using wheat bran, corn cobs, and sugar cane bagasse as carbon sources with different concentrations. *J. Bioresour. Mang.* 3:1–9.

- Summers S.R., Sprenger K.G., Pfaendtner J., Marchant J., Summers M.F., Kaar J.L. (2017). Mechanism of competitive inhibition and destabilization of *Acidothermus Cellulolyticus* endoglucanase 1 by Ionic Liquids, *J. Phys. Chem. B.* 121: 10793–10803.
- Sun J., Liu H., Yang W., Chen S., Fu S. (2017). Molecular mechanisms underlying inhibitory binding of alkyimidazolium ionic liquids to laccase. *Molecules.* 22: 1353.
- Sun N., Rodriguez H., Rahman M., Rogers R.D. (2011). Where are ionic liquid strategies most suited in the pursuit of chemicals and energy from lignocellulosic biomass? *Chem. Commun.* 47: 1405-1421.
- Sunna A., Antranikian G. (1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Rev. Biotechnol.* 17: 39–67.
- Tadeo X., Lopez-Mendez B., Trigueros T., Lain A., Castano D. Millet O. (2009). Structural basis for the aminoacid composition of proteins from halophilic archaea. *PLoS Biol.* 7: e1000257.
- Taibi Z., Saoudi B., Boudelaa M., Trigui H., Belghith H., Gargouri A. Ladjama A. (2012). Purification and biochemical characterization of a highly thermostable xylanase from *Actinomadura* sp. strain Cpt20 isolated from poultry compost. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166: 663–679.
- Techapun C. Poosaran N. Watanabe M. Sasaki K. (2003). Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review. *Process Biochem.* 9: 1327–1340.
- Teleman A., Tenkanen M., Jacobs A., Dahlman O. (2002). Characterization of O-acetyl-(4-O-methylglucurono) xylan isolated from birch and beech. *Carbohydr. Res.* 337: 373–377.
- Teo S.C., Liew K.J., Shamsir M.S., Chong C.S., Bruce N.C., Chan K-G., Goh K.M. (2019). Characterizing a halo-tolerant GH10 xylanase from *Roseithermus sacchariphilus* strain RA and its CBM-Truncated Variant. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 2284.

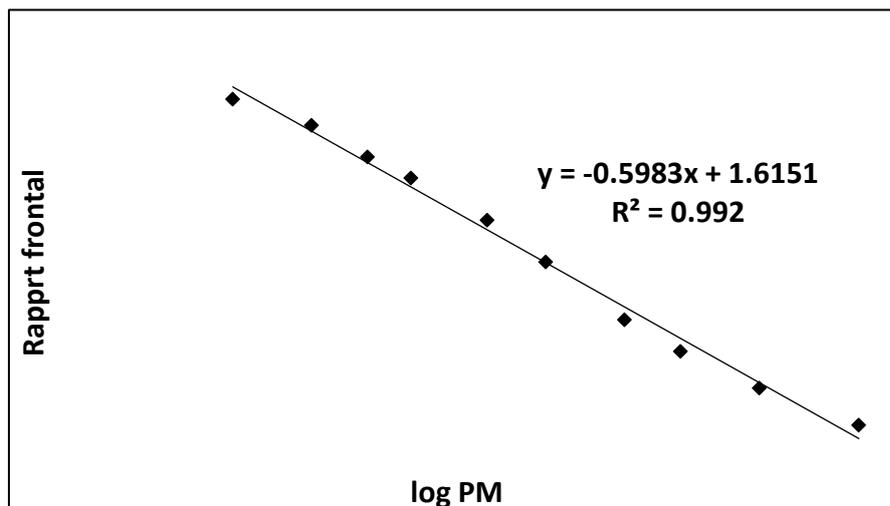
- Thomas L., Sindhu R., Pandey A. (2013). Identification and characterization of a highly alkaline and thermotolerant novel xylanase from *Streptomyces* sp. *Biologia* 68: 1022–1027.
- Thomas M.F., Li L., Handley-Pendleton J.M, van der Lelie D., Dunn J.J., Wishart J.F. (2011). Enzyme activity in dialkyl phosphate ionic liquids. *Bioresour. Technol.* 102: 11200–11203.
- 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. *J. Appl. Microbiol.* 97: 783–791.
- Tuncer M., Ball A.S., Rob A., Wilson M.T. (1999). Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25. *Enzyme Microb. Technol.* 25: 38–47.
- Turunen O., Etuaho, K., Fenel, F., Vehmaanperä, J., Wu, X., Rouvinen, J., Leisola, M. (2001). A combination of weakly stabilizing mutations with a disulfide bridge in the  $\alpha$ -helix region of *Trichoderma reesei* endo-1,4- $\beta$ -xylanase II increases the thermal stability through synergism. *J. Biotechnol.* 88: 37–46.
- Turunen O., Vuorio M., Fenel F., Leisola M. (2002). Engineering of multiple arginines into the Ser/Thr surface of *Trichoderma reesei* endo-1,4-beta-xylanase II increases the thermotolerance and shifts the pH optimum towards alkaline pH. *Protein Eng.* 15: 141–145.
- Turunen O., Etuaho K., Fenel F., Vehmaanpera J., Wu X., Rouvinen J., Leisola M. (2001). A combination of weakly stabilizing mutations with a disulfide bridge in the alpha-helix region of *Trichoderma reesei* endo-1, 4-beta-xylanase II increases the thermal stability through synergism. *J. Biotechnol.* 88: 37–46.
- van Rantwijk F., Sheldon R.A. (2007). Biocatalysis in ionic liquids. 107: 2757-2785.
- Verma D., Kawarabayasi Y., Miyazaki K., Satyanarayana T. (2013). Cloning, expression and characteristics of a novel alkalistable and thermostable xylanase encoding gene (Mxyl) retrieved from compost-soil metagenome. *PLoS ONE* 8: e52459.

- Viet D.N., Kamio Y., Abe N., Kaneko J., Izaki K. (1991). Purification and properties of  $\beta$ -1,4- xylanase from *Aeromonas caviae* W-61. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 445–449.
- Virupakshi S., Babu K.G., Gaikwad S.R., Naik G.R. (2005). Production of a xylanolytic enzyme by a thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in solid state fermentation. *Process Biochem* 40: 431–435.
- Wahlström R. (2014). Enzymatic hydrolysis of cellulose in aqueous ionic liquids. *VTT Science* 52. 102 p.
- Wang C.L., Yen Y.H., Shih I.L., Chang A.C., Chang W.T., Wu W.C., Chai Y.D. (2003). Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. *Enzyme Microb. Technol.* 33: 917-925.
- Walia A., Guleria S., Mehta P., Chauhan A., Parkash J. (2017). Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. *3 Biotech.* 7: 1–12.
- Wang S., Luo Z. (2016). *Pyrolysis of biomass*. Berlin, Boston: DeGruyter.
- Wang Y., Radosevich M., Hayes D., Labbé N. (2011). Compatible Ionic liquid-cellulases system for hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Bioeng.* 108: 1042–1048.
- Wejse P.L., Ingvorsen K., Mortensen K.K. (2003). Purification and characterisation of two extremely halotolerant xylanases from a novel halophilic bacterium. *Extremophiles.* 7: 423-431.
- Wenpeng L., Lan X. (2006). Production of alkaline xylanase by a newly isolated alkaliphilic *Jonesia* sp. Strain YNUCC0043. *Biotechnol. Bulletin.* 1: 459–463.
- Willför S., Sundberg A., Hemming J., Holmbom B. (2005a). Polysaccharides in some industrially important softwood species. *Wood Sci. Technol.* 39: 245–257.
- Willför S., Sundberg A., Pranovich A., Holmbom B. (2005b). Polysaccharides in some industrially important hardwood species. *Wood Sci. Technol.* 39: 601-617.

- Winterhalter C., Liebel W. (1995). Two extremely thermostable xylanases of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Appl. Env. Microbiol.* 61: 1810–1815.
- Wong K.K, Tan L.U, Saddler J.N. (1988). Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol. Rev.* 52: 305–317.
- Wyman C.E., Dale B.E., Elander R.T., Holtzapple M., Ladisch M.R., Lee Y.Y. (2005). Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.* 96: 1959–1966.
- Xia S., Baker G.A., Li H., Ravula S., Zhao H. (2014). Aqueous ionic liquids and deep eutectic solvents for cellulosic biomass pretreatment and saccharification. *RSC Adv.* 4: 10586–10596.
- Xu Y., (2017). CO<sub>2</sub> absorption behavior of azole-based protic ionic liquids: Influence of the alkalinity and physicochemical properties, *J. CO<sub>2</sub> Util.* 19: 1–8.
- Yang L.L., Tang S.K., Zhang Y.Q., Zhi X.Y., Wang D., Xu L.H., Li WJ. (2008). *Thermobifida halotolerans* sp. nov., isolated from a salt mine sample, and emended description of the genus *Thermobifida*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 1821–1825.
- Yang Z., Pan W. (2005). Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enzyme Microb. Technol.* 37: 19–28.
- Yang Z. (2009). Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis, *J. Biotechnol.* 144: 12–22.
- Yang V.W., Zhuang Z., Elegir G., Jeffries T.W. (1995). Alkaline-active xylanase produced by an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolated from kraft pulp. *J. Industr. Microbiol.* 15: 434–441.
- Yang S.Q., Yan Q.J., Jiang Z.Q., Li L.T., Tian H.M., Wang Y.Z. (2005). High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* 97: 1794–1800.
- Yoon K.Y., Woodams E.E., Hang Y.D. (2006). Enzymatic production of pentoses from the hemicellulose fraction of corn residues. *LWT Food Sci. Technol.* 39: 388–392.

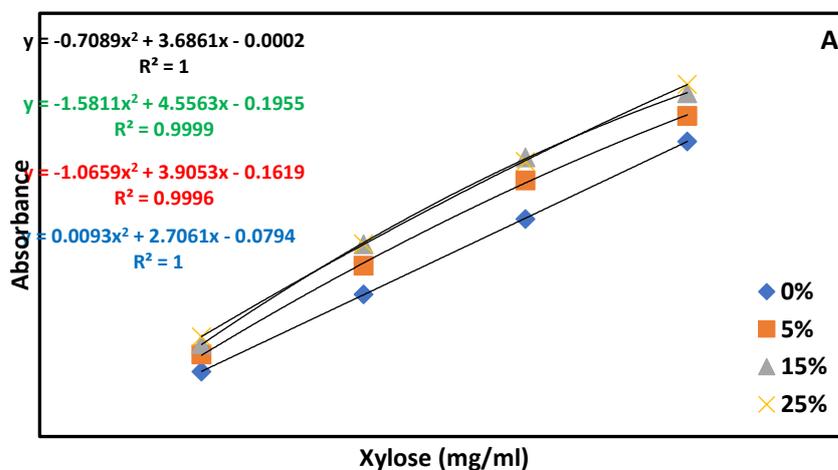
- Yu T., Anbarasan S., Wang Y., Telli K., Aslan A.S., Su Z., Zhou Y., Zhang L., Iivonen P., Havukainen S., Mentunen T., Hummel M., Sixta H., Binay B., Turunen O., Xiong H. (2016). Hyperthermostable *Thermotoga maritima* xylanase XYN10B shows high activity at high temperatures in the presence of biomass-dissolving hydrophilic ionic liquids. *Extremophiles* 20: 515–524.
- Zhang T., Datta S., Eichler J., Ivanova N., Axen S.D., Kerfeld C.A., Chen F., Kyrpides N., Hugenholtz P., Cheng J., Sale K.L., Simmons B., Rubin E. (2011). Identification of a haloalkaliphilic and thermostable cellulase with improved ionic liquid tolerance. *Green Chem.* 13: 2083–2090.
- Zhang F., Hu S.N., Chen J.J., Lin L.B., Wei Y.L., Tang S.K., Xu L.H., Li W.J. (2012). Purification and partial characterization of a thermostable xylanase from salt-tolerant *Thermobifida halotolerans* YIM 90462T. *Process Biochem.* 47: 225–228.
- Zhao H., Jones C.L., Baker G.A., Xia S., Olubajo O., Person V.N. (2009a). Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis. *J. Biotechnol.* 139: 47-54.
- Zhao H. (2010). Methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids—a review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85: 891–907.
- Zhao H. (2016). Protein stabilization and enzyme activation in ionic liquids: specific ion effects. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91: 25–50.
- Zhou J., Gao Y., Dong Y., Tang X., Li J., Xu B., Mu Y., Wu Q., Huang Z. (2012). A novel xylanase with tolerance to ethanol, salt, protease, SDS, heat, and alkali from actinomycete *Lechevalieria* sp. HJ3. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39: 965–975.
- Zilliox C., Debeire P. (1998). Hydrolysis of wheat straw by a thermostable endoxylanase: Adsorption and kinetic studies. *Enzyme Microb. Technol.* 22: 58–63.
- Zoete V., Grosdidier A., Cuendet M., Michielin O. (2010). Use of the FACTS solvation model for protein–ligand docking calculations. Application to EADock, *J. Mol. Recognit.* 23: 457–461.

**Annexe I :**  
**Courbes d'étalonnage et cinétiques**  
**enzymatiques**

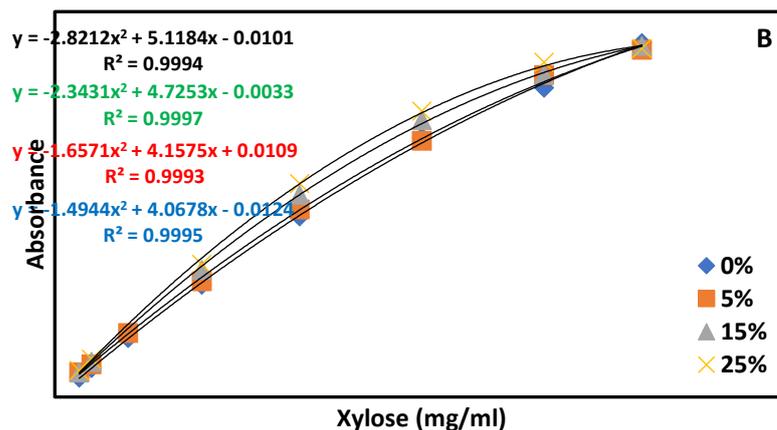


**Figure S1.** Droite d'étalonnage des marqueurs en électrophorèse dénaturante

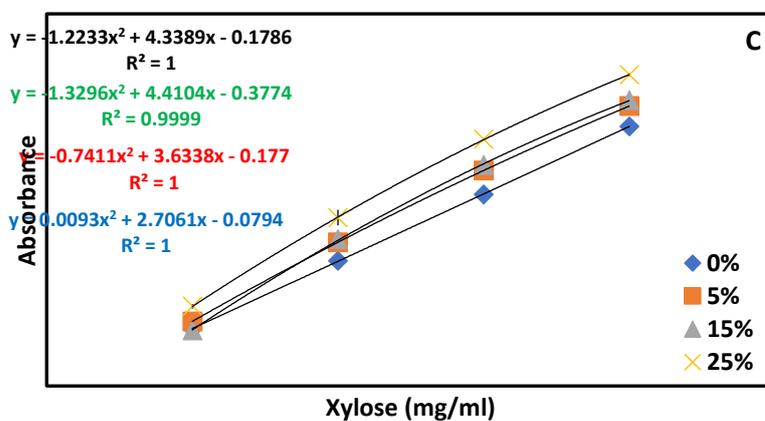
Les courbes d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs en absence ou en présence des liquides ioniques sont montrées sur la figure S2. Les courbes pour la détermination des paramètres cinétiques sont montrées sur les figures S3-S14.



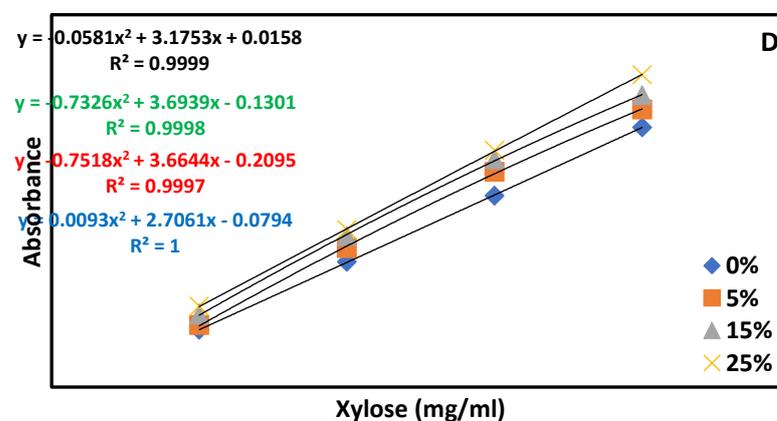
**Figure S2A.** Courbes d'étalonnage pour le dosage du xylose en présence de [DBNH]OAc



**Figure S2B.** Courbes d'étalonnage pour le dosage du xylose en présence de [DBNH]CO<sub>2</sub>Et



**Figure S2C.** Courbes d'étalonnage pour le dosage du xylose en présence de [DBUH]OAc



**Figure S2D.** Courbes d'étalonnage pour le dosage du xylose en présence de [DBUH]CO<sub>2</sub>Et

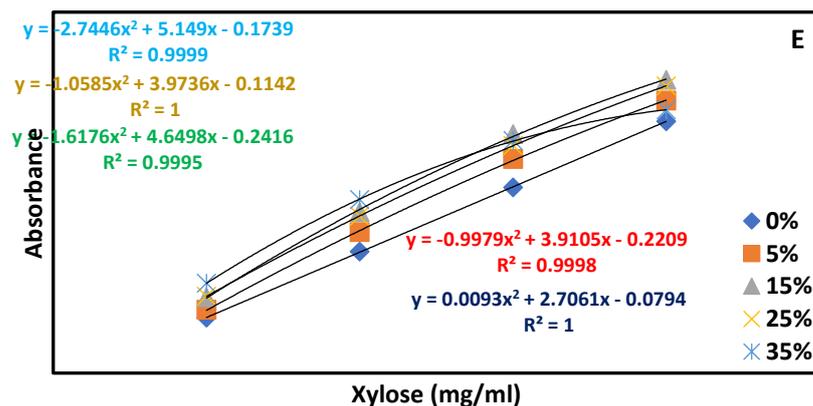


Figure S2E. Courbes d'étalonnage pour le dosage du xylose en présence de [EMIM]OAc

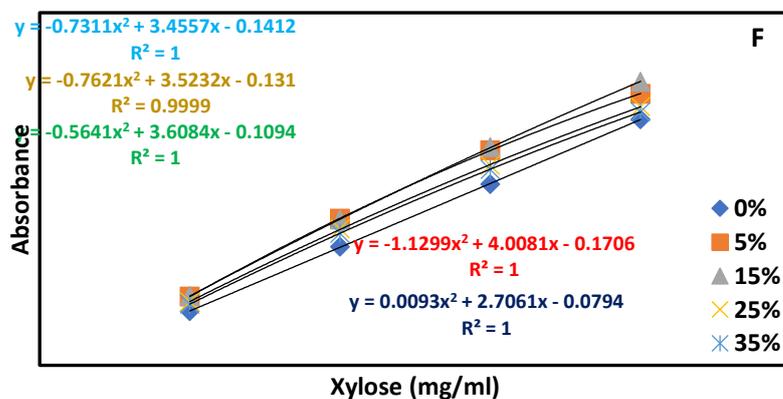


Figure S2F. Courbes d'étalonnage pour le dosage du xylose en présence de [mDBN]Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

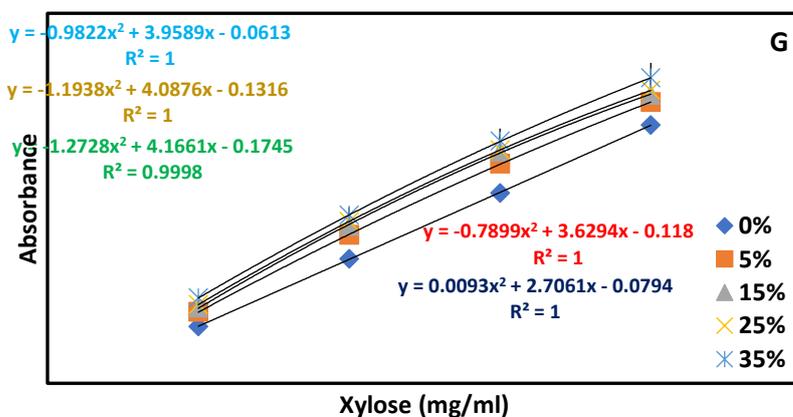
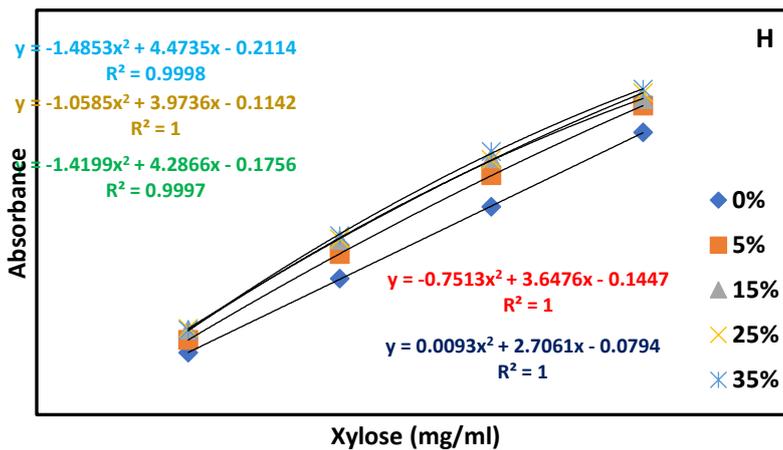
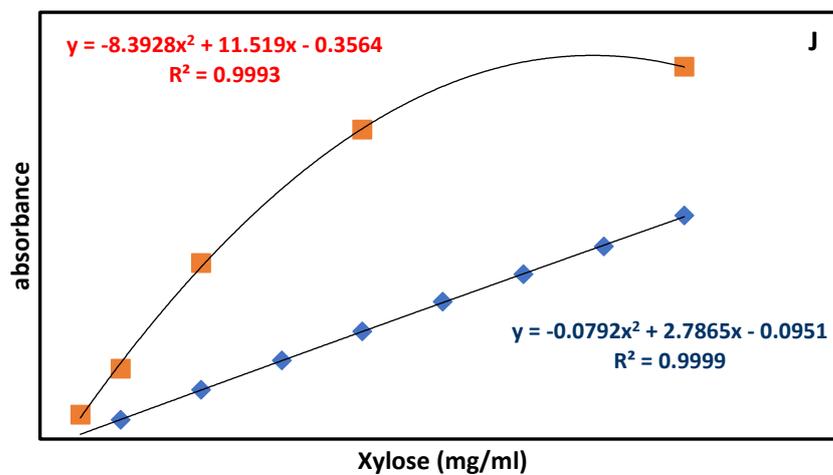


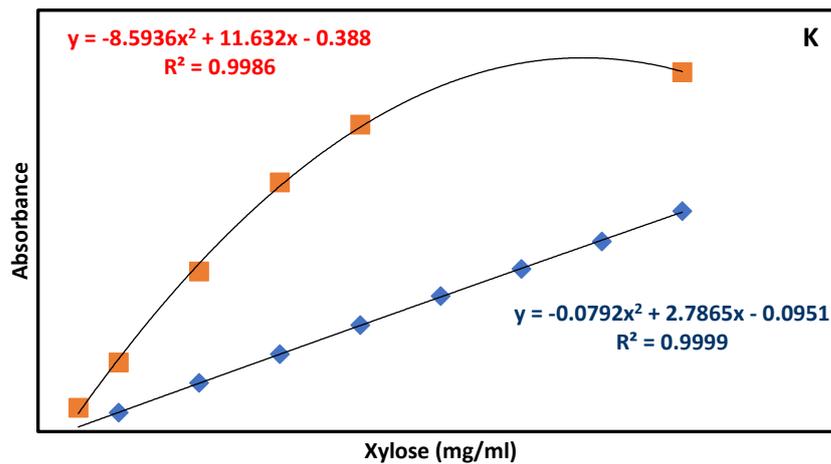
Figure S2G. Courbes d'étalonnage pour le dosage du xylose en présence de [TMGH]OAc



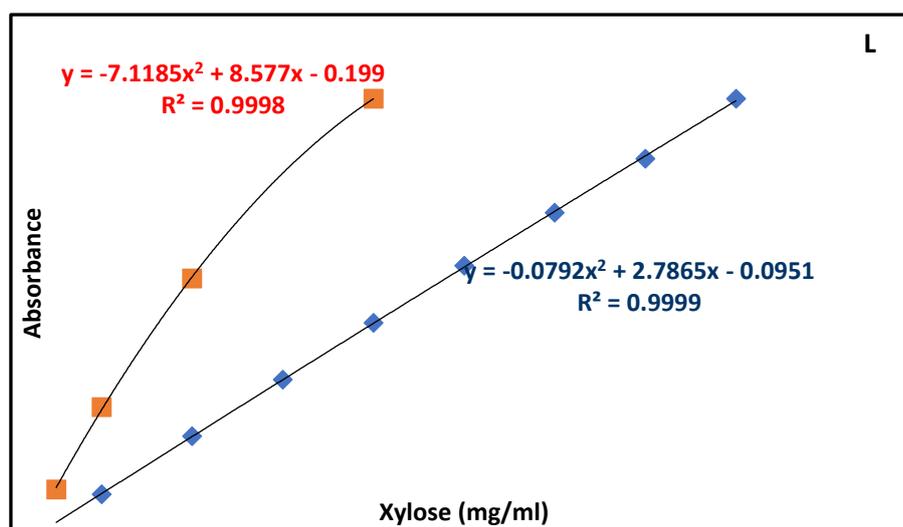
**Figure S2H.** Courbes d'étalonnage pour le dosage du xylose en présence de [TMGH]CO<sub>2</sub>Et



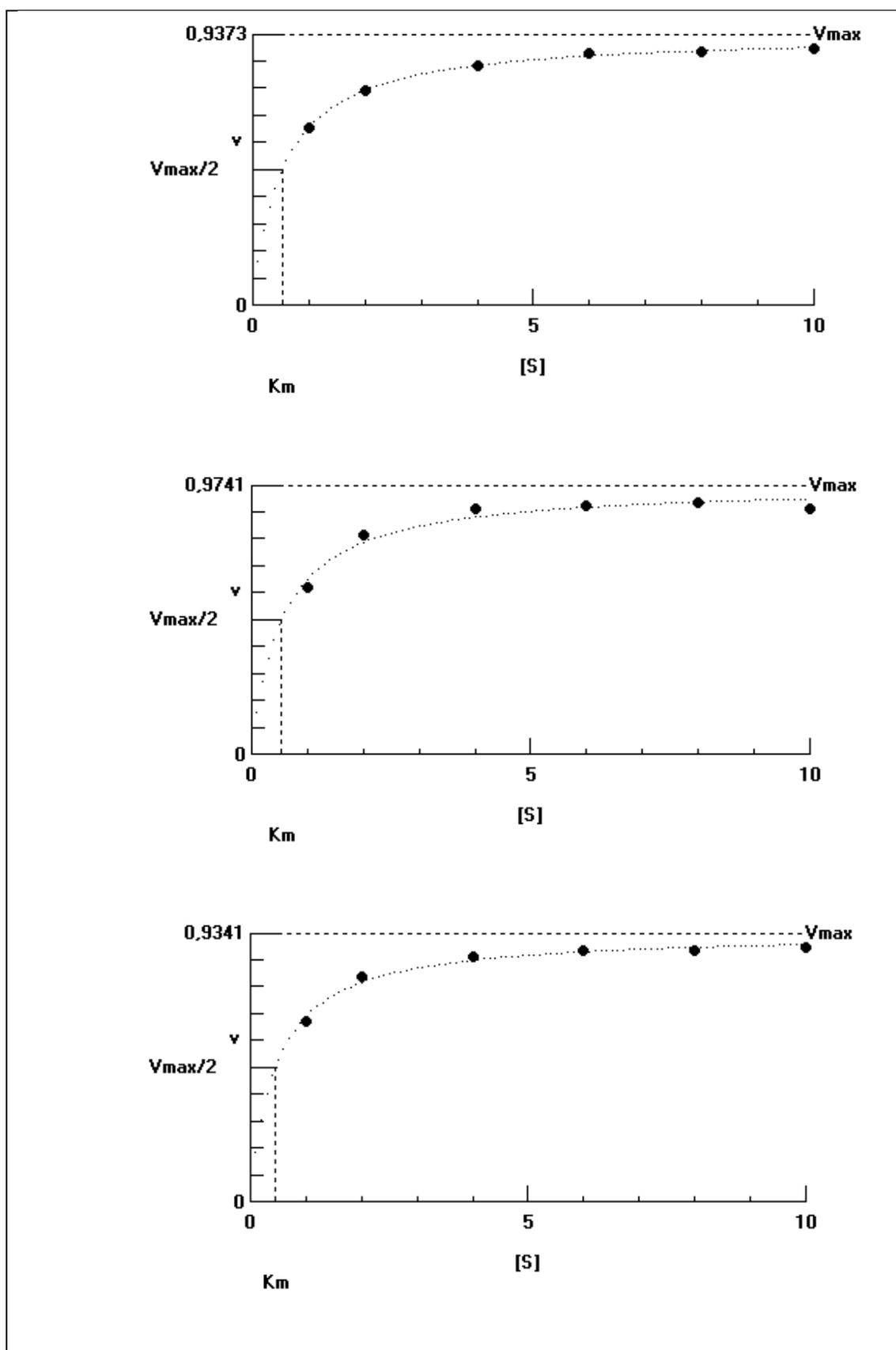
**Figure S2I.** Courbes d'étalonnage pour le dosage du xylose en présence de 5% [DBNH]guaiacolate



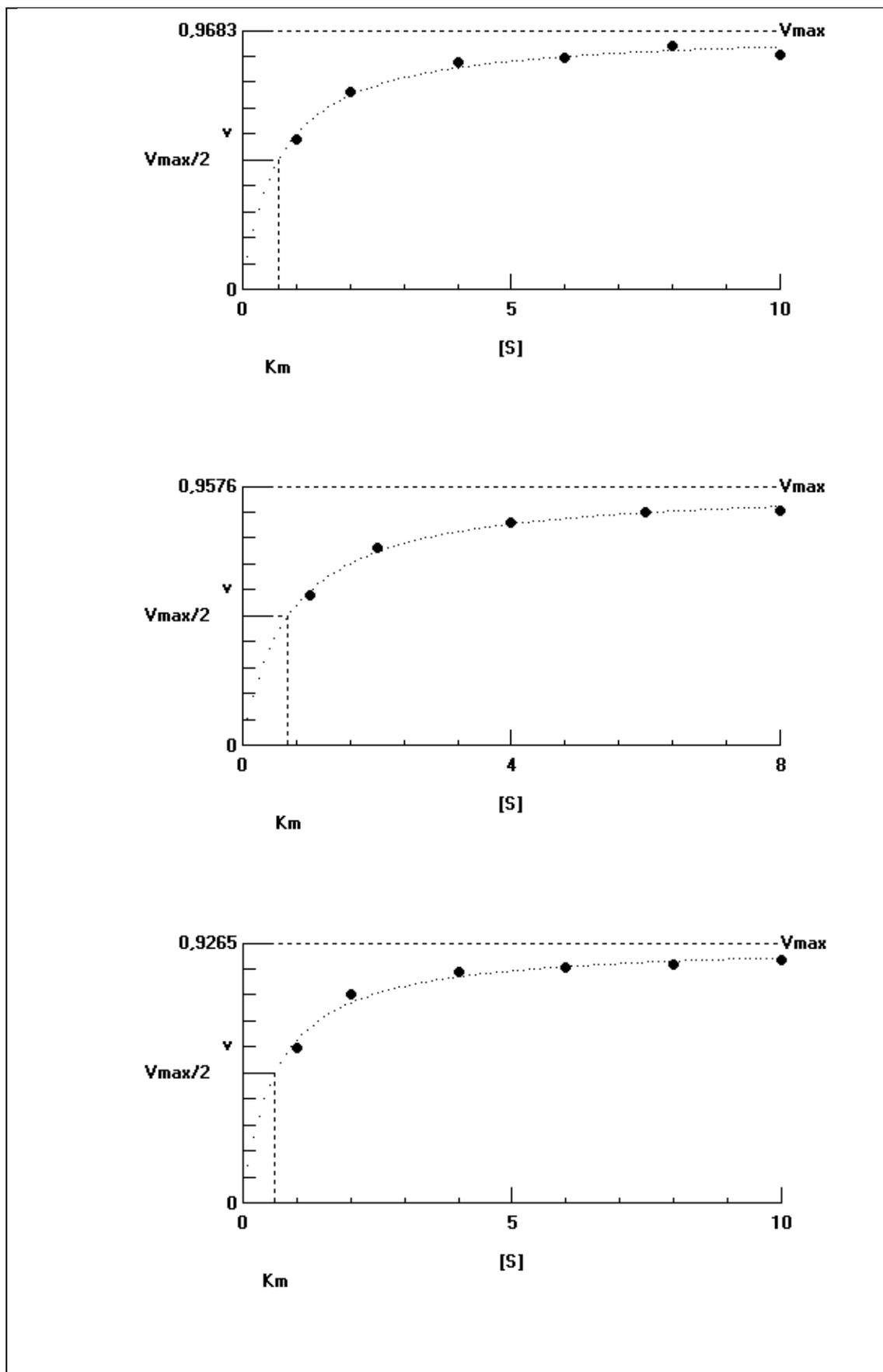
**Figure S2J.** Courbes d'étalonnage pour le dosage du xylose en présence de 5% [DBUH]guaiacolate



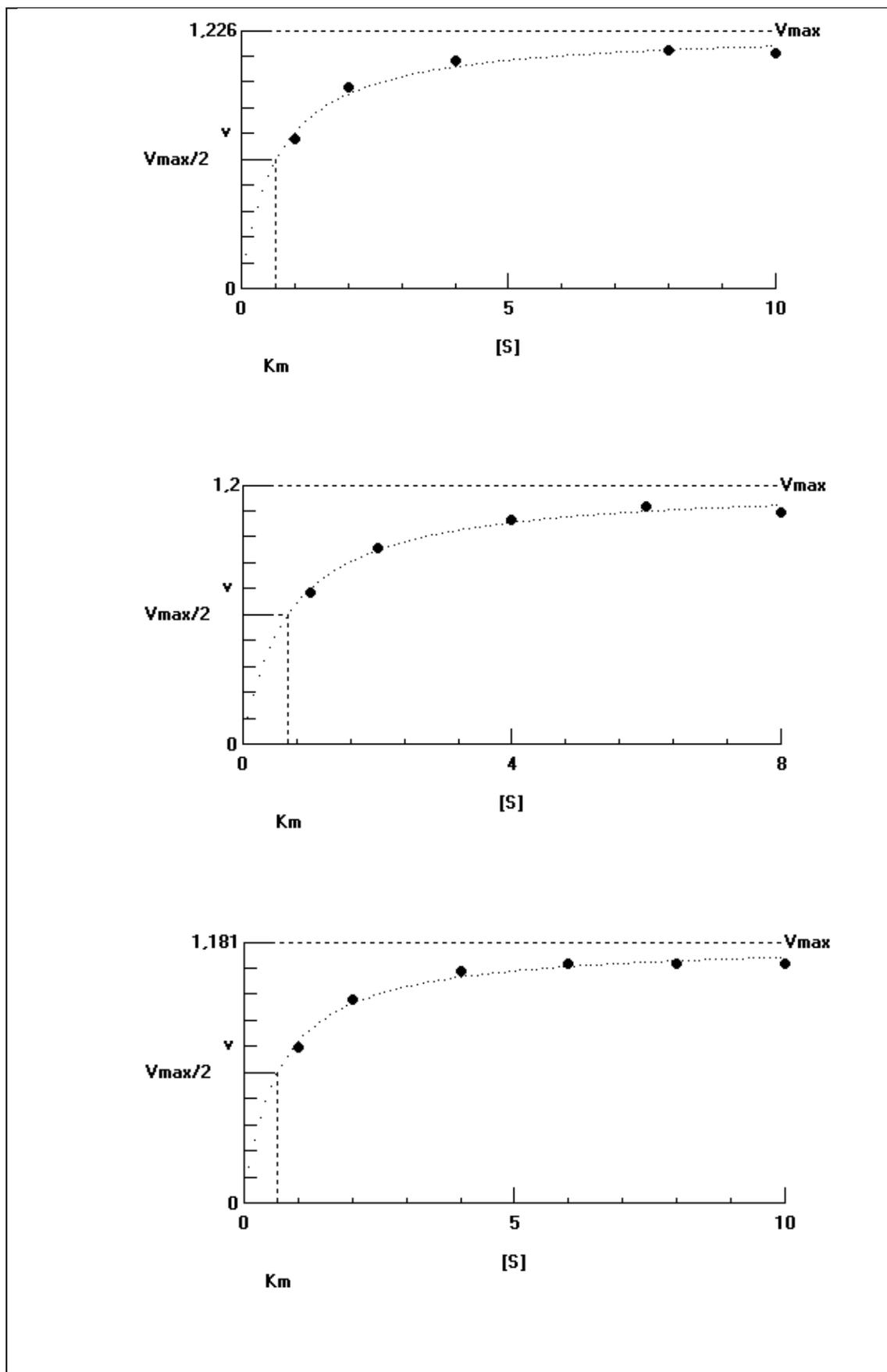
**Figure S2K.** Courbes d'étalonnage pour le dosage du xylose en présence de 5% [TMGH]guaiacolate



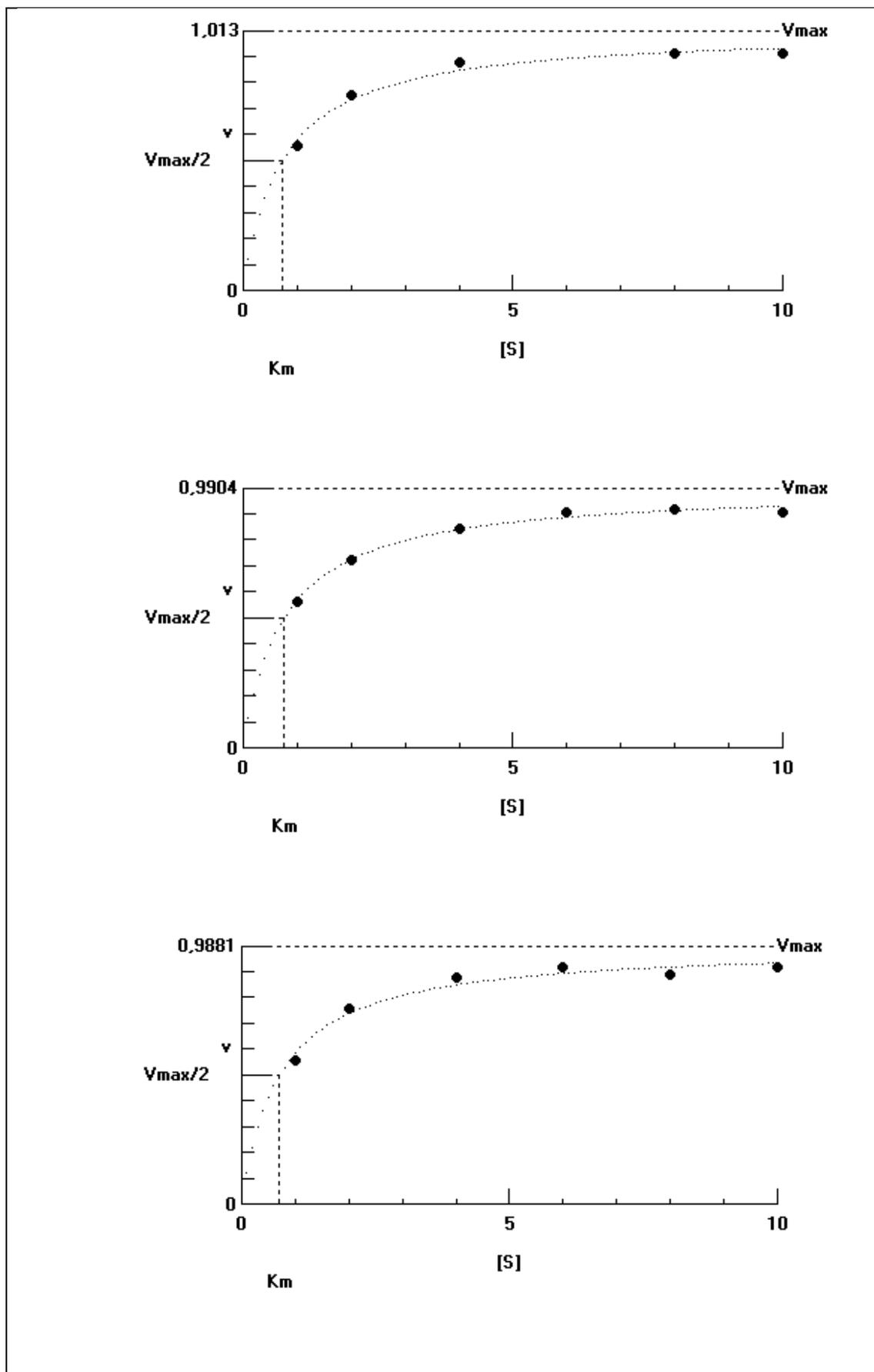
**Figure S3.** Evolution de la vitesse de la réaction de TFXYN10A en fonction de la concentration du substrat en absence de liquide ionique



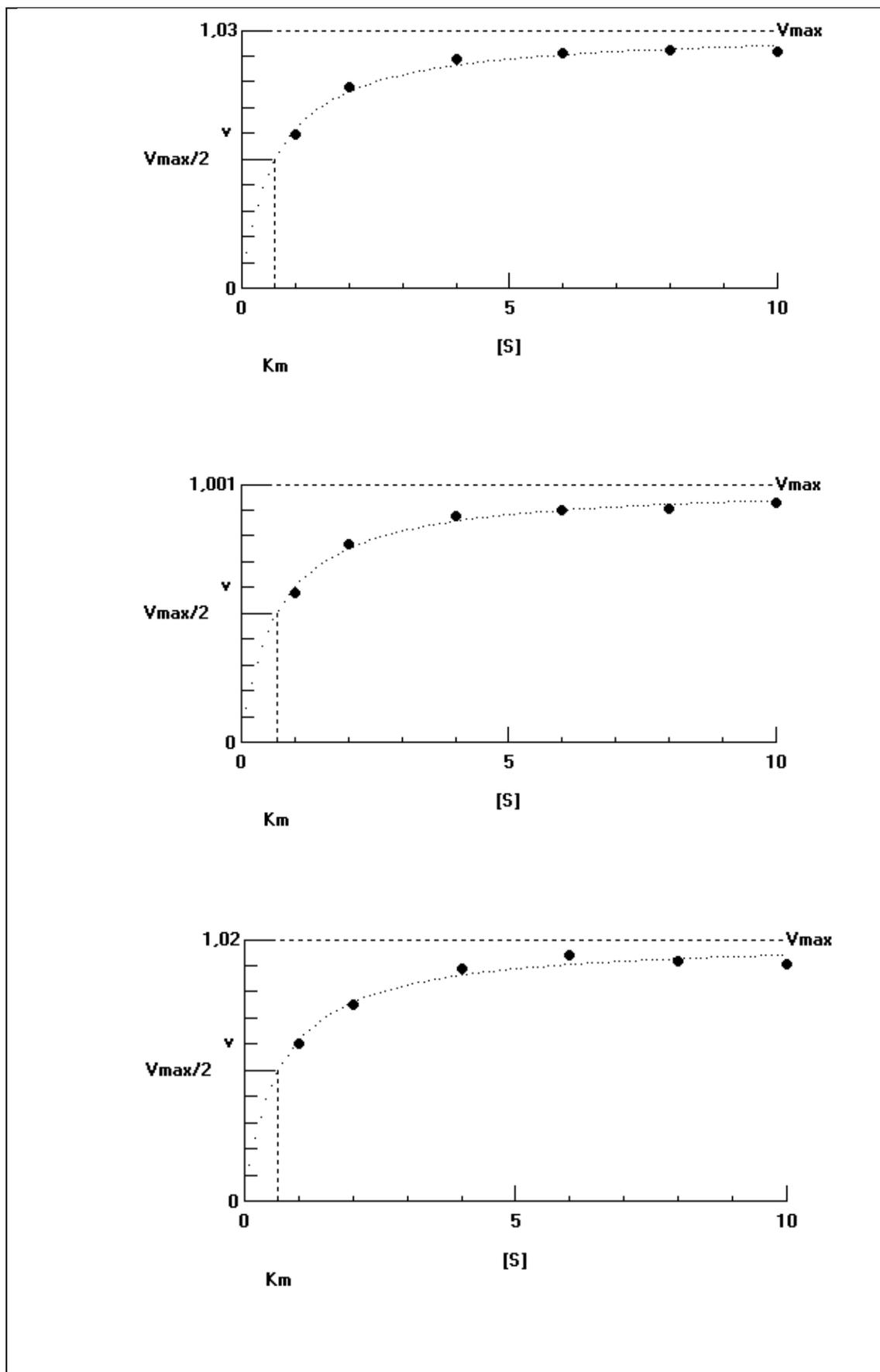
**Figure S4.** Evolution de la vitesse de la réaction de TfXYN10A en fonction de la concentration du substrat en présence de [DBNH]OAc IL



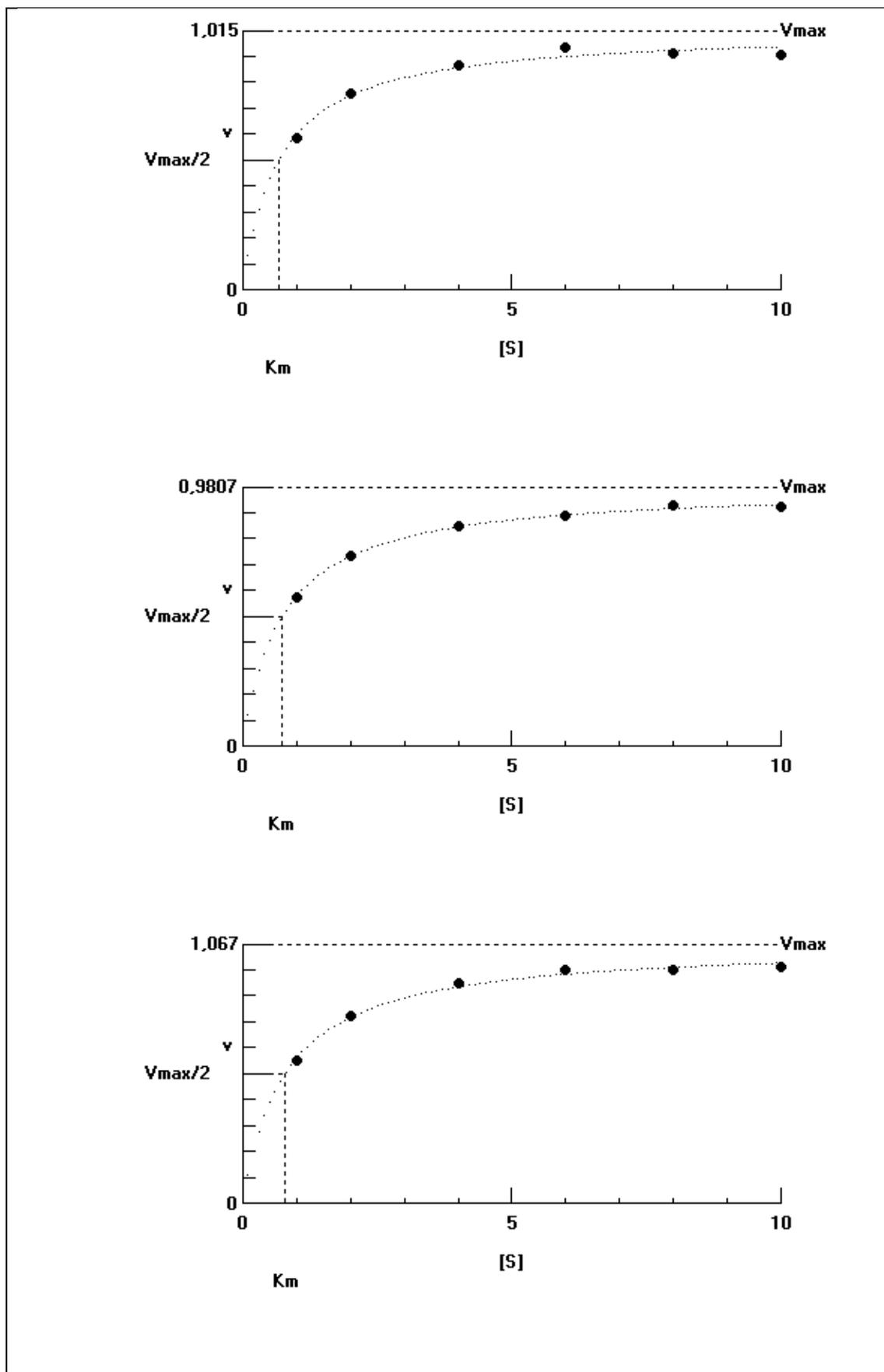
**Figure S5.** Evolution de la vitesse de la réaction de TfXYN10A en fonction de la concentration du substrat en présence de [DBNH]CO<sub>2</sub>Et IL



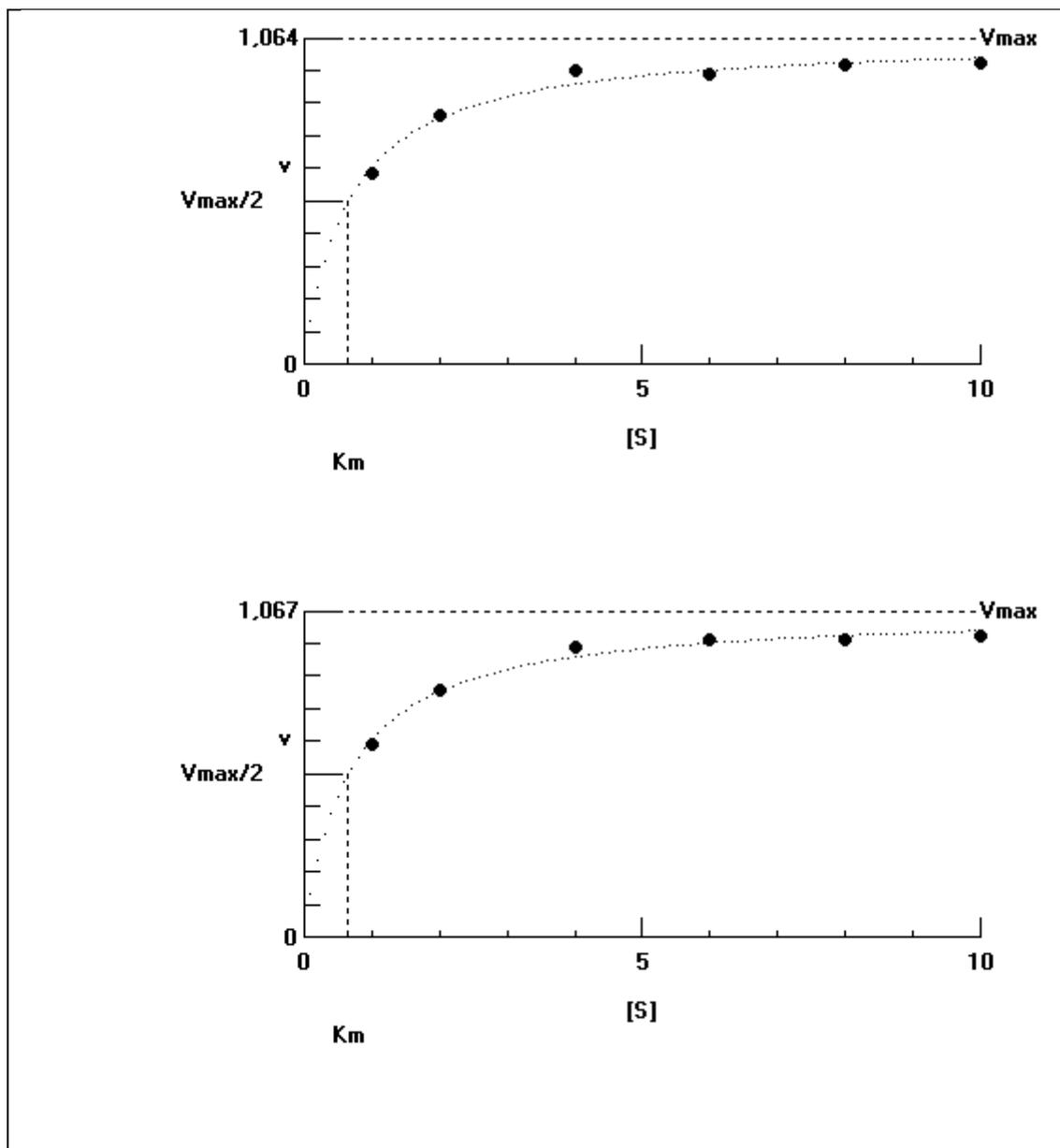
**Figure S6.** Evolution de la vitesse de la réaction de TfXYN10A en fonction de la concentration du substrat en présence de [DBUH]OAc



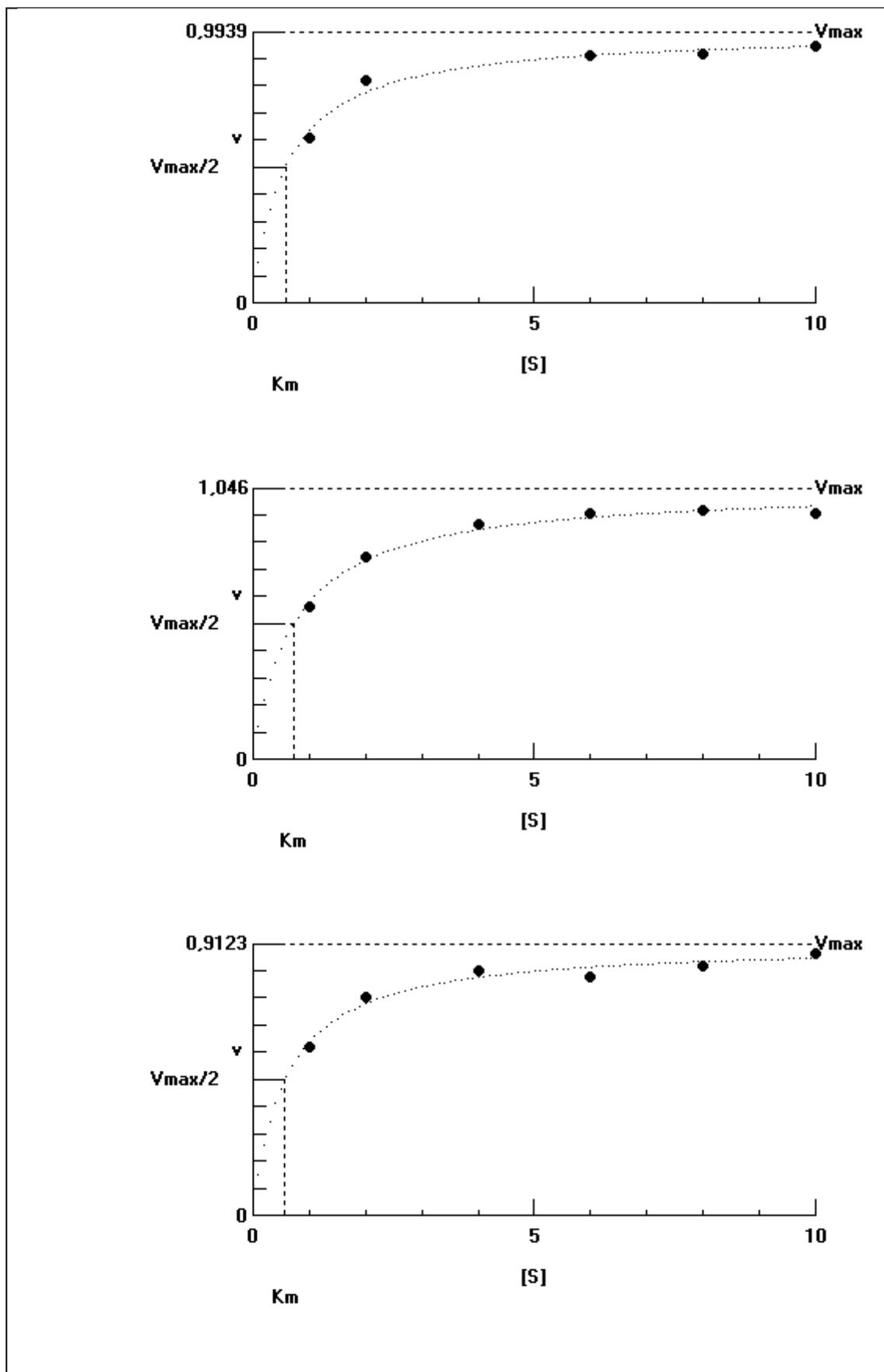
**Figure S7.** Evolution de la vitesse de la réaction de TFXYN10A en fonction de la concentration du substrat en présence de [DBUH]CO<sub>2</sub>Et



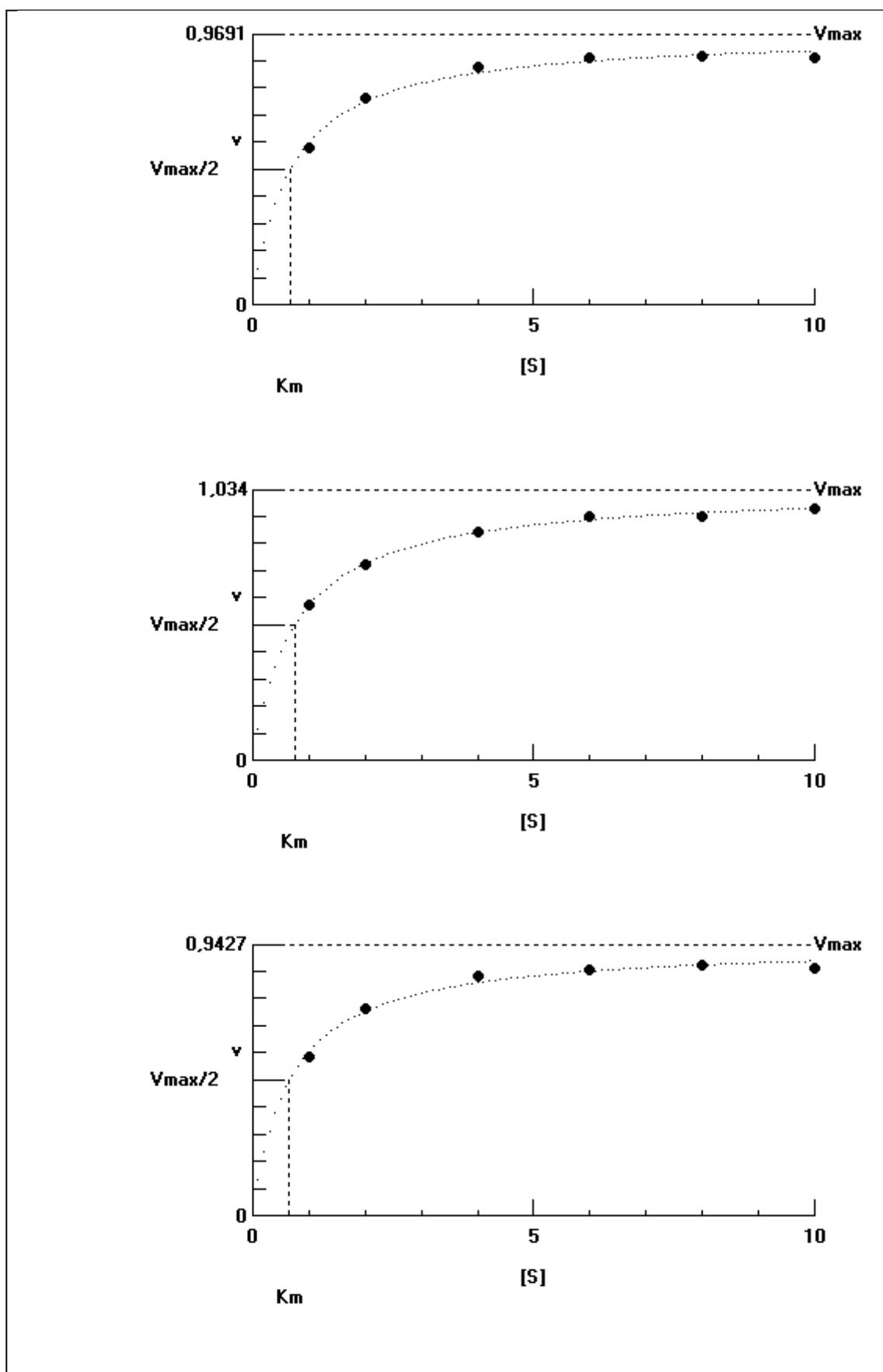
**Figure S8.** Evolution de la vitesse de la réaction de TfXYN10A en fonction de la concentration du substrat en présence de [EMIM]OAc



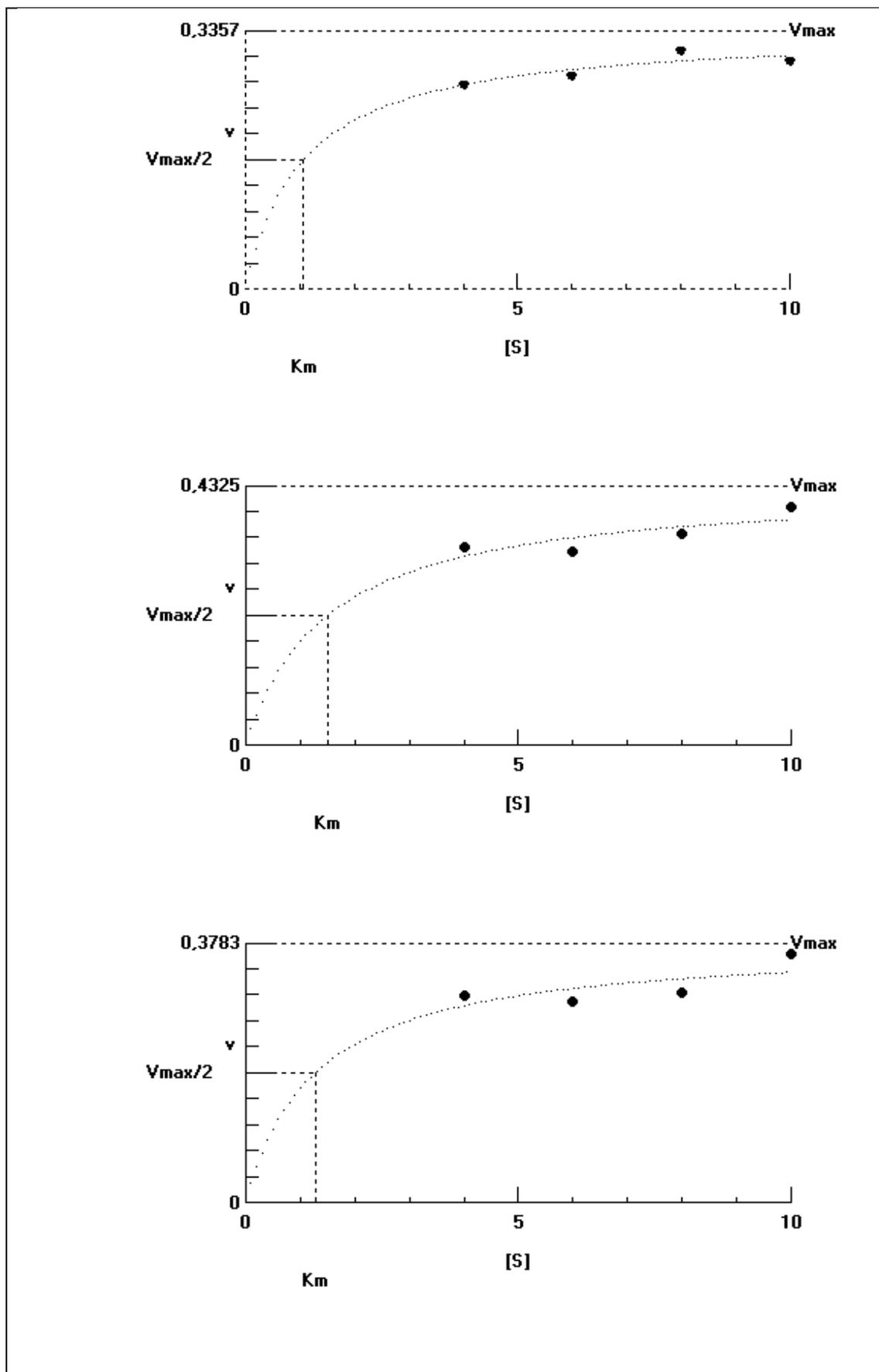
**Figure S9.** Evolution de la vitesse de la réaction de TFXYN10A en fonction de la concentration du substrat en présence  $[mDBN]Me_2PO_4$



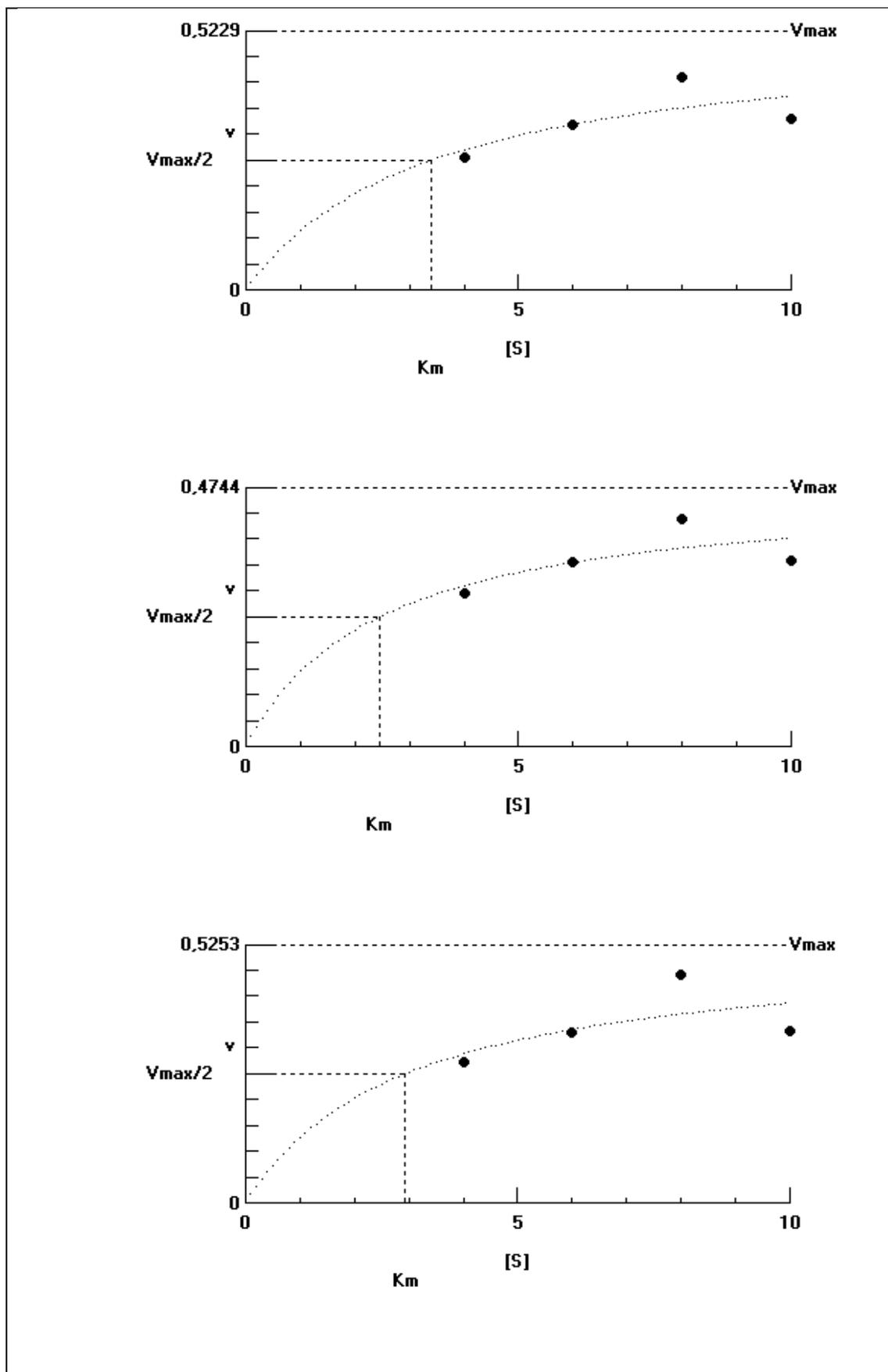
**Figure S10.** Evolution de la vitesse de la réaction de TfXYN10A en fonction de la concentration du substrat en présence de [TMGH]OAc



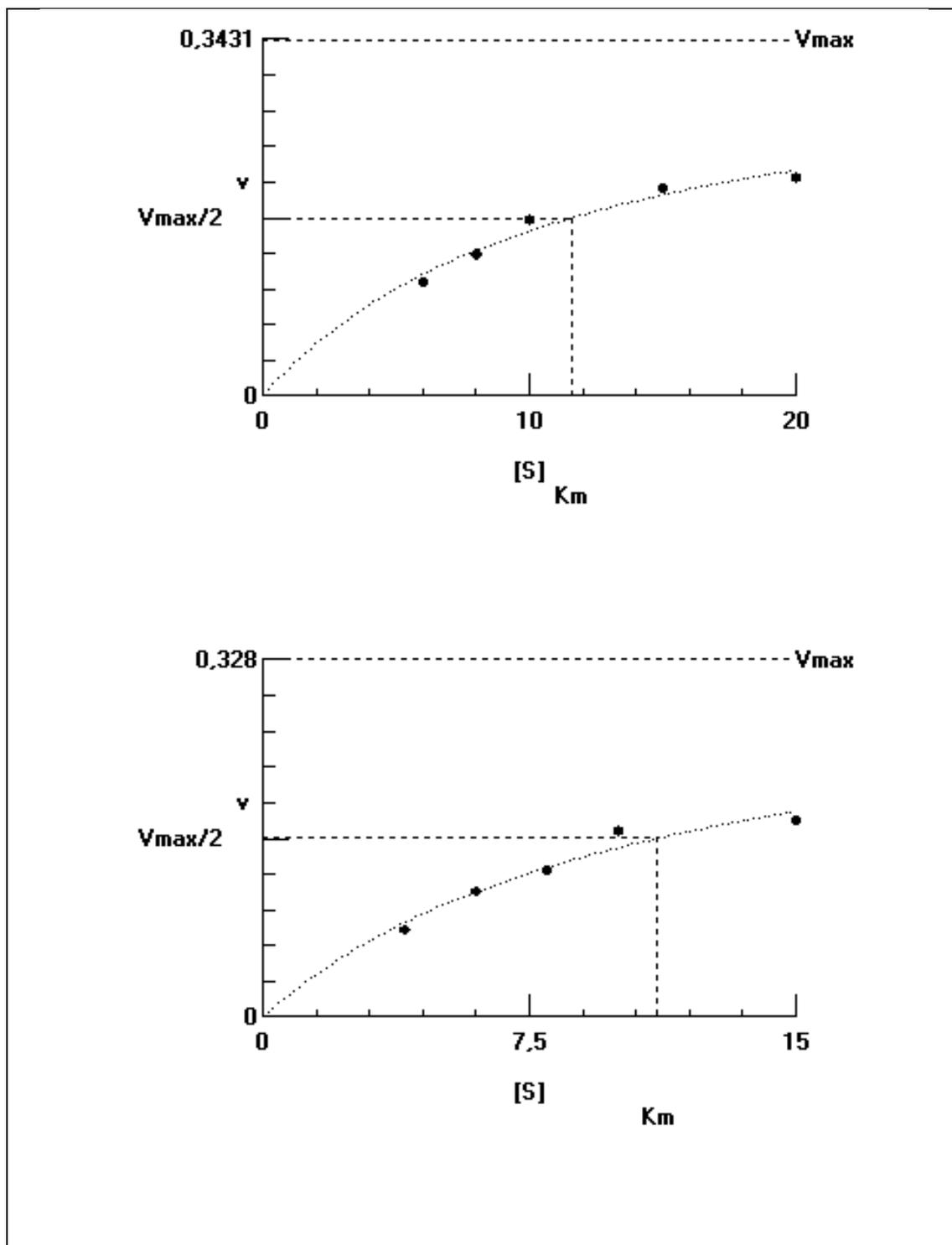
**Figure S11.** Evolution de la vitesse de la réaction de TfXYN10A en fonction de la concentration du substrat en présence de [TMGH]CO<sub>2</sub>Et



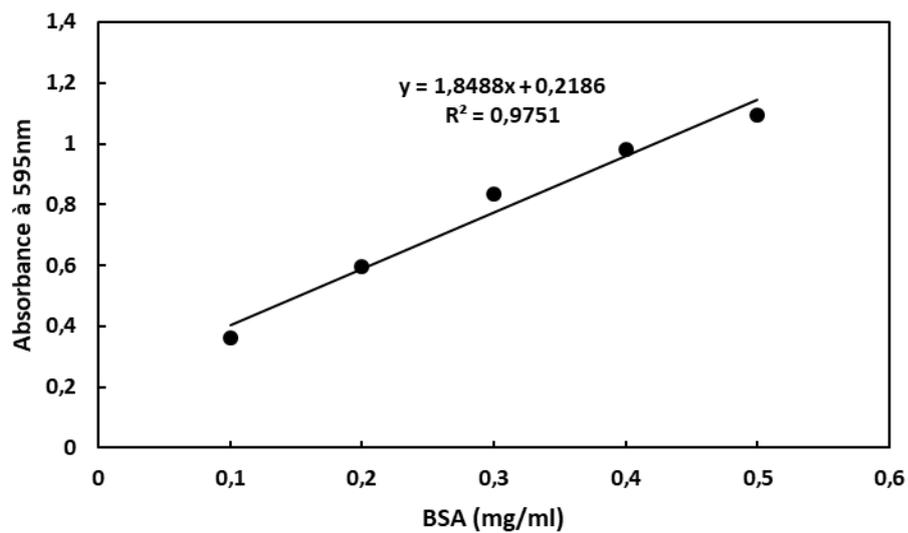
**Figure S12.** Evolution de la vitesse de la réaction de TfXYN10A en fonction de la concentration du substrat en présence de [DBNH]guaiacolate



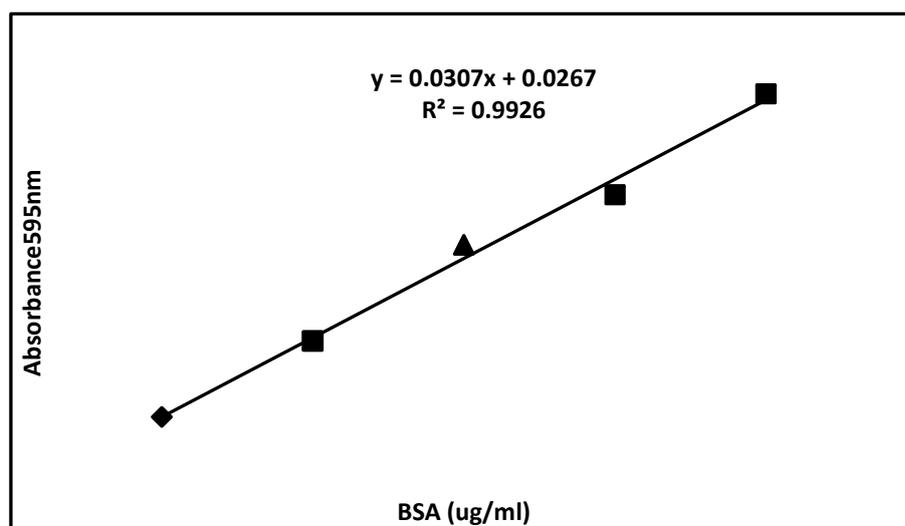
**Figure S13.** Evolution de la vitesse de la réaction de TFXYN10A en fonction de la concentration du substrat en présence de [DBUH]guaiacolate



**Figure S14.** Evolution de la vitesse de la réaction de TFXYN10A en fonction de la concentration du substrat en présence de [TMGH]guaiacolate



**Figure S15.** Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la macrométhode



**Figure S16.** Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la microméthode

**Annexe II :**  
**Docking moléculaire**

**Tableau S1.** Résultats du docking moléculaire par le programme SwissDock et les activités xylanase dans les liquides ioniques. Les activités enzymatiques sont mesurées en présence de xylane d'hêtre.

Enzyme	IL cation	Groupes dans le site actif <sup>1</sup>	Moy. $\Delta G^2$	$\Delta G$ minimale <sup>3</sup>	Activité (%) 25% IL		Activité (%) 15% IL	
					Acetate	Propionate	Acetate	Propionate
TfXYN10A	[DBNH] <sup>+</sup>	12/44	-5,93	-6.69	45.1	15.8	66.4	61.0
	[DBUH] <sup>+</sup>	7/37	-6,19	-6.44	53.5	19.4	90.7	84.5
	[mDBNH] <sup>+4</sup>	4/39	-6.20	-6.42	-	-	-	-
	[EMIM] <sup>+</sup>	11/35	-6,26	-6.83	73.4		91.3	
	[TMGH] <sup>+</sup>	13/50	-6,10	-7.04	66.1	36.9	93.1	95.1
					Activité (%) 5% IL			
					[DBNH] <sup>+</sup>	[DBUH] <sup>+</sup>	[TMGH] +	
	guaiacolate	15/39	-6.80	-7.65	34.0	33.5	17.0	
	propionate	2/35	-6.54	-6.59	111.0	105.2	101.9	
	acetate	2/28	-6.46	-6.48	96.0	102.7	104.0	
DtXYN11B							Activité (%)15% IL	
							Acetate	Propionate
	[DBNH] <sup>+</sup>	28/38	-5,98	-6.60			17.4	18.5
	[DBUH] <sup>+</sup>	33/39	-5,95	-6.47			26.2	13.1
	[mDBNH] <sup>+4</sup>	27/34	-6.11	-6.46			-	-
	[EMIM] <sup>+</sup>	20/36	-6,03	-6.98			36.5	
	[TMGH] <sup>+</sup>	23/34	-5,86	-6.41			44.0	42.0
					Activité (%)5% IL			
					[DBNH] <sup>+</sup>	[DBUH] <sup>+</sup>	[TMGH] +	
	guaiacolate	5/37	-5.60	-6.20	35.9	33.1	55.1	

<sup>1</sup>Par rapport à tous les groupes de liaison à la protéine. <sup>2</sup>Pour les postures d'énergies maximales de chaque groupe de liaison au site actif. <sup>3</sup>Dans chaque groupe. <sup>4</sup>L'activité enzymatique dans 25% et 15% [mDBNH]Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> est de 39,2 % et 68,1 % respectivement pour TfXYN10A, et 24% pour DtXYN11B dans 15% LI.

**Annexe III :**  
**Solutions chimiques**

**Dosage des sucres réducteurs****Solution à base d'acide dinitrosalicylique (DNS)**

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

La solution est préparée dans l'obscurité puis filtrée et conservée à l'abri de la lumière.

**Dosage des protéines**

Solutions utilisées dans le dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976) est :

Bleu de Coomassie Brillant G250.....	100mg
Ethanol 95%.....	50ml
Acide phosphorique 85%.....	100ml
H <sub>2</sub> O.....	Jusqu'à 1000ml

Conservé à 4°C à l'abri de la lumière et filtré avant utilisation

**Composition des solutions d'électrophorèse dénaturante****Tampon de séparation**

Tris.....	18.5 g
SDS.....	400 mg
Eau distillée .....	100 ml

Le pH est ajusté à pH 8.8

**Tampon de concentration**

Tris .....	6 g
SDS .....	400 mg
Eau distillée.....	100 ml

Le pH est ajusté à pH 6.8

**Tampon de migration (X10)**

Tris .....	30.3 g
Glycine .....	144 g
SDS .....	10 g
Eau distillée .....	qsp 1000 ml

Le pH est ajusté à pH 8.3

Le tampon de migration est réalisé par dilution 10 fois de cette solution

#### **Tampon échantillon (X4)**

Trizma base.....	0.303 g
SDS .....	0.8 g
Eau distillée .....	4 ml

Le pH est ajusté à 6.75 avec du HCl concentré

Glycérol .....	4 ml
$\beta$ -mercaptoéthanol (14.3 M) .....	2 ml
Bleu de bromophénol.....	0.1 mg

Des aliquotes de 1 ml sont stockées à – 20°C

#### **Solution de fixation**

Acide trichloroacétique.....	114 g
Ethanol absolu.....	300 ml
Eau distillée.....	qsp 1000 ml

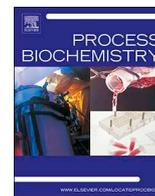
#### **Solution de coloration**

Bleu de Coomassie R250 .....	1 g
Méthanol .....	450 ml
Acide acétique.....	100 ml
Eau distillée.....	qsp 1000 ml

Le colorant est solubilisé dans le mélange méthanol/eau distillée puis l'acide acétique est ajouté. La solution obtenue est filtrée à travers le un papier filtre.

#### **Solution de décoloration**

Méthanol.....	250 ml
Acide acétique.....	100 ml
Eau distillée.....	qsp 1000 ml



## Inhibition of hyperthermostable xylanases by superbase ionic liquids

Hakim Hebal<sup>a</sup>, Arno Parviainen<sup>b</sup>, Sasikala Anbarasan<sup>c</sup>, He Li<sup>c</sup>, Laura Makkonen<sup>c</sup>, Sandip Bankar<sup>c</sup>, Alistair W.T. King<sup>b</sup>, Ilkka Kilpeläinen<sup>b</sup>, Said Benallaoua<sup>a</sup>, Ossi Turunen<sup>c,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Nature Sciences and Life, University of Bejaia, Targa Ouzemmour, 06000, Algeria

<sup>b</sup> Department of Chemistry, FI-00014, University of Helsinki, Finland

<sup>c</sup> Department of Bioproducts and Biosystems, School of Chemical Engineering, FI-00076, Aalto University, Finland

<sup>d</sup> School of Forest Sciences, University of Eastern Finland, FI-80101, Joensuu, Finland



### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Biocatalysis  
GH10 xylanase  
GH11 xylanase  
Enzyme kinetics  
Enzyme inhibition  
Ionic liquid

### ABSTRACT

The use of enzymes in aqueous solutions of ionic liquids (ILs) could be useful for the enzymatic treatment of lignocellulose. Hydrophilic ILs that dissolve lignocellulose are harmful to enzymes. The toleration limits and enzyme-friendly superbase IL combinations were investigated for the hyperthermophilic *Thermopolyspora flexuosa* GH10 xylanase (endo-1,4- $\beta$ -xylanase EC 3.2.1.8) TFXYN10A and *Dictyoglomus thermophilum* GH11 xylanase DtXYN11B. TFXYN10A was more tolerant than DtXYN11B to acetate or propionate-based ILs. However, when the anion of the ILs was bigger (guaiacolate), GH11 xylanase showed higher tolerance to ILs. 1-Ethyl-3-methylimidazolium acetate ([EMIM]OAc), followed by 1,1,3,3-tetramethylguanidine acetate ([TMGH]OAc), were the most enzyme-friendly ILs for TFXYN10A and [TMGH]<sup>+</sup>-based ILs were tolerated best by DtXYN11B. Double-ring cations and a large size anion were associated with the strongest enzyme inhibition. Competitive inhibition appears to be a general factor in the reduction of enzyme activity. However, with guaiacolate ILs, the denaturation of proteins may also contribute to the reduction in enzyme activity. Molecular docking with IL cations and anions indicated that the binding mode and shape of the active site affect competitive inhibition, and the co-binding of cations and anions to separate active site positions caused the strongest enzyme inhibition.

### 1. Introduction

The valorisation of renewable lignocellulosic materials from agriculture and forestry is a global approach to reducing the dependence on fossil resources [1]. The main components of lignocellulosic biomass are cellulose, hemicellulose and lignin [2]. The enzymatic treatment of lignocellulosic carbohydrates generates hexose and pentose sugars [3]. However, the high crystallinity of cellulose and the complex association of polymers in lignocellulose matrix limit the performance of enzymes [4–6]. Lignocellulose processing also liberates compounds that inhibit enzymes, and in high biomass loading their concentrations becomes high. In addition, a major enzyme inhibition form is end-product inhibition in a high substrate concentration, and this principle affects the industrial high-solids conditions [7–9]. Ionic liquids (ILs) have shown great promise in the pretreatment of lignocellulosic biomass in reducing recalcitrance to enzymatic hydrolysis [10,11]. However, ILs may cause a strong enzyme inhibition effect. Thus, studying ways in which to minimize the role of inhibitory factors could be essential to developing efficient processes for enzymatic lignocellulose hydrolysis. ILs are salts that exist in liquid form below 100 °C and are useful as dissolving agents in

the pretreatment of lignocellulose for improving its enzymatic hydrolysis. Pretreatment with ILs can effectively remove the lignin and reduce the crystallinity of cellulose to permit enzymatic hydrolysis at high solid loadings and low enzyme concentrations [12–14]. Ionic liquids can also enhance chemical catalysis of cellulose for products [15] and, together with deep eutectic solvents, are favoured as potential green solvents [16,17]. Hydrophobic ILs are known to stabilize enzymes, whereas those ILs of a hydrophilic nature are highly detrimental to enzymes [18,19]. The incompatibility of enzymes with ILs enhances the need for extensive washing of the cellulose fibre before the enzymatic hydrolysis [20]. Thus, developing new enzymes with a higher tolerance to hydrophilic ILs or finding ILs that are more enzyme-friendly is necessary in order to increase the use of hydrophilic ILs together with enzymes.

Xylan is the major constituent of hemicelluloses and the second most abundant polymer after cellulose. Endoxylanases (EC 3.2.1.8.) are glycoside hydrolase enzymes that hydrolyse the cleavage of 1,4- $\beta$ -xylosidic linkages in xylan, leading to the liberation of xylooligosaccharides and xylose. Most of the studied endoxylanases belong to the GH10 and GH11 families. Endoxylanases of the GH10 family have a high molecular weight (> 30 kDa) and low isoelectric points (pI), whereas

\* Corresponding author at: School of Forest Sciences, University of Eastern Finland, FI-80101, Joensuu, Finland.

E-mail address: [ossi.turunen@uef.fi](mailto:ossi.turunen@uef.fi) (O. Turunen).

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.03.022>

Received 20 August 2019; Received in revised form 5 March 2020; Accepted 24 March 2020

Available online 03 April 2020

1359-5113/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

GH11 endoxylanases have a low molecular weight (< 30 kDa) and a high pI [21]. Xylanases are used in feed production, pulp bleaching and the food industry [21,22]. They can also be used to assist cellulases in lignocellulose hydrolysis [23,24].

ILs affect both enzyme activity and stability [25,26]. In dilute aqueous solutions, hydrophilic ILs become at least partially dissociated and the solvated ion consequently interact individually with the enzyme [25]. Different enzyme inhibition mechanisms were observed in ILs solutions: competitive [27,28], uncompetitive [29], pure non-competitive [30,31] and mixed inhibition [31]. ILs destabilize enzymes via disruption of the protein secondary structure [32,33]. In dilute IL solutions the kosmotropic effect (Hofmeister series) of the IL ions on enzymes may be applicable: kosmotropic anions and chaotropic cations favour enzyme functioning, while chaotropic anions and kosmotropic cations do not favour it [25]. It is suggested that the specific ion effect is used instead of the Hofmeister series effect because of the debate on whether the hydration of ions perturbs the water structure surrounding the enzymes [25]. Hydrophobicity of ions and polarizability of anions are among the factors that are implicated in the ion-specific effect on enzyme activity and stability in aqueous solutions of ILs [25,26,34,35]. The functioning of certain enzymes in ILs does not follow the Hofmeister series, which reflects the fact that the kosmotropicity/chaotropicity effect is not the only factor governing enzyme performance [25,26].

Lignocellulose-degrading enzymes from extremophile prokaryotes exhibit extreme tolerance towards heat, acids, alkali and salts [36–38]. The use of thermophilic enzymes was among the strategies adopted to promote enzyme tolerance to ILs that dissolve cellulose [36,37,39]. Many endoxylanases from hyperthermophilic microorganisms show tolerance towards ILs [27,39–41]. In general, GH10 xylanases tolerate more 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([EMIM]OAc) and other ILs than GH11 xylanases [39–41,42]. However, resistance to protein unfolding in thermostable enzymes is not the only factor in IL tolerance [28,39,40]. Competitive inhibition was found to be a key factor in xylanases inhibition [27,28,40]. The stronger binding affinity of the substrate to the enzyme appears to lower competitive inhibition [27]. The inactivation of a thermostable endoglucanase from *Acidothermus cellulolyticus* in ILs proceeds at 65 °C in a biphasic manner. The inactivation begins with a rapid reversible competitive inhibition at all IL concentrations, followed by a slow irreversible protein denaturation after a prolonged incubation time at higher IL concentrations [43]. These phenomena were also observed in xylanases [28,44].

The objective of the current work was to study the effect of diluted aqueous solutions of various untested ILs on the functioning of highly thermostable endoxylanases belonging to the GH10 and GH11 family. The ILs used were a set of superbase-derived ILs: 1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-enium acetate, [DBNH]OAc; 1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-enium propionate, [DBNH]CO<sub>2</sub>Et; 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enium acetate, [DBUH]OAc; 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enium propionate, [DBUH]CO<sub>2</sub>Et; 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate, [EMIM]OAc; methyl-1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-enium dimethyl phosphate, [mDBN]Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,1,3,3-tetramethylguanidinium acetate, [TMGH]OAc; 1,1,3,3-tetramethylguanidinium propionate, [TMGH]CO<sub>2</sub>Et; 1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-enium 2-hydroxy-3-methoxybenzoate, [DBNH]guaiaicolate; 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enium 2-hydroxy-3-methoxybenzoate, [DBUH]guaiaicolate; 1,1,3,3-tetramethylguanidinium 2-hydroxy-3-methoxybenzoate, [TMGH]guaiaicolate. The motivation behind the use of these ILs is their cellulose dissolution capability and the recyclability of some of them [45–47]. Furthermore, by using highly thermostable enzymes, the unfolding effect of ILs on enzymes is unlikely or minimal. Consequently, the effect of ILs on enzyme activity could be studied.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sources of enzymes and ionic liquids

The xylanases studied were *T. flexuosa* XYN10A xylanase TFXYN10A

(family GH10) and *D. thermophilum* XYNB xylanase DtXYN11B (family GH11) and its stabilized variant DtXYN11B-DS. The DtXYN11B-DS mutant has an N-terminal disulphide bridge designed between the Cys1 and Cys27 positions [28]. All the enzymes were expressed extracellularly from *Escherichia coli* as previously described [28,48]. TFXYN10A was 80% pure in SDS-PAGE [48]. The purification of DtXYN11B and DtXYN11B-DS was performed as previously described [28] and the proteins were 70% pure in SDS-PAGE (assessed by densitometry) [28]. Ionic liquids based on [DBNH]<sup>+</sup>, [DBUH]<sup>+</sup>, [mDBN]<sup>+</sup> and [TMGH]<sup>+</sup> cations were prepared as previously reported [45,46]. [EMIM]OAc was purchased from BASF (Ludwigshafen, Germany, purity ≥ 95%). To prepare guaiaicolates, 1 eq. of superbase was added to 1 eq. of guaiaicol in a round-bottom flask at room temperature, while stirring. The sample was stored under argon and away from light.

### 2.2. Enzyme assays

Xylanase activity was measured by incubating the enzymes with beechwood xylan for 30 min. at 70 °C. This temperature was chosen because the ILs reduce the apparent temperature optimum for activity (temperature optimum for the enzymes was 80 °C, 90 °C and 95 °C for TFXYN10A [27], DtXYN11B and DtXYN11B-DS [28], respectively). The reaction mixture (2 mL) contained 0.2 mL of an appropriate dilution of enzyme in 1.8 mL of 1% (w/v) substrate dissolved in 50 mM citrate-phosphate buffer at optimal pH of enzyme activity; pH 6 for TFXYN10A and pH 6.5 for DtXYN11B and DtXYN11B-DS. 0.1 mg/mL BSA was used as a stabilizer to prevent non-specific enzyme binding to the tube wall. The reaction was stopped by the addition of 3 mL 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS), boiled for 5 min. and then the reaction product was measured as previously described [49,50]. Enzyme activities in the presence of ILs were carried out with 5%–35% IL solutions. The guaiaicolate-based ILs formed a brown precipitate at high concentration with the xylan solution. For this reason, these ILs were used at 5% concentrations. Each enzyme was appropriately diluted to generate an absorbance of around 1 at 540 nm in the DNS assay without IL. The specific activity of each enzyme used in the final assay was 803 U/mg for TFXYN10A, 2175 U/mg for DtXYN11B and 848 U/mg for DtXYN11B-DS. The reaction was stopped by the addition of cold buffer and the reducing sugars were measured using the DNS method. One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to liberate 1 μmol of product per min. ILs that were not liquid at room temperature were melted in a heated water bath before addition of the substrate solution. The addition of ILs to the substrate solutions induced a change in the pH, which was corrected by the addition of HCl or NaOH before the addition of enzyme. The presence of IL in the reaction mixture led to an increase in the absorbance. Consequently, calibration graphs in the presence of ILs were constructed and used to correct the obtained absorbance values (Fig. S1 in the Supplementary Material).

### 2.3. Kinetic experiments

Kinetic parameters were performed for TFXYN10A in standard assay conditions with and without 5% (v/v) IL, using 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 and 20 mg/mL beechwood xylan as substrate (Figs. S2 to S13). Activity was measured at 70 °C, pH 6. All the experiments were performed at least three times with triplicates. The kinetic values (unweighted) were calculated by hyperbolic regression analysis function by using the Hyper 32 programme.

### 2.4. Molecular docking

IL cations and anions were docked one by one by SwissDock [51] to the active site of the DtXYN11B structure (PDB code 1F5J [52]) and the modelled structures of TFXYN10A based on the PDB structure 1v6w [48]. The protein and ligand structures included hydrogens (added in Swiss-PdbViewer to proteins). Cation and anion structures were energy minimized by using MM2 in ChemBio3D Ultra 12.0 (CambridgeSoft) or

the geometry was optimized by using Avogadro (<http://avogadro.cc/>) (in the case of guaiacolate anion) before the docking experiments, although prior ligand minimization is not required in SwissDock [53]. SwissDock performs the final minimization during the docking [51]. Accurate mode was used in SwissDock and flexibility was permitted for the ligand but not for the side chains. Charges are from MMFF. The SwissDock computed CHARMM binding energies. The binding modes were ranked based on favorable energies, including the solvent effect using the Fast Analytical Continuum Treatment of Solvation (FACTS) implicit solvation model [51,54]. The obtained results were analysed by using UCSF Chimera [55].

### 3. Results

#### 3.1. Activity of xylanases in ionic liquids

The activity of a family GH10 xylanase (TfXYN10A) and a family GH11 xylanase and its stabilized variant (DtXYN11B and DtXYN11B-DS, respectively) was studied in a new set of hydrophilic ILs and compared to our previous studies [27,28,39,40]. The two enzyme families were first compared by measuring their activities in 15% (v/v) concentrations of acetate-propionate ILs and [mDBN]Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fig. 1) and in 5% (v/v) concentrations of guaiacolate-based ILs (Fig. 2). TfXYN10A showed high tolerance to most of the studied ILs in 15% concentrations (Fig. 1). In contrast, almost all the acetate-propionate ILs and [mDBN]Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> had a drastic effect on the GH11 xylanase DtXYN11B and its stabilized variant (DtXYN11B-DS) (Fig. 1). Similar tolerance values were obtained for both enzymes (DtXYN11B and DtXYN11B-DS), indicating that the additional stability of DtXYN11B-DS did not offer any additional benefits to the enzymes in this high thermostability range of the enzymes. Remarkably, [EMIM]OAc, which was tolerated best by GH10 xylanase in 25–35% IL concentrations (Fig. 5), was not best tolerated by GH11 xylanases at milder (15%) IL concentrations (Fig. 1), but the difference was not big.

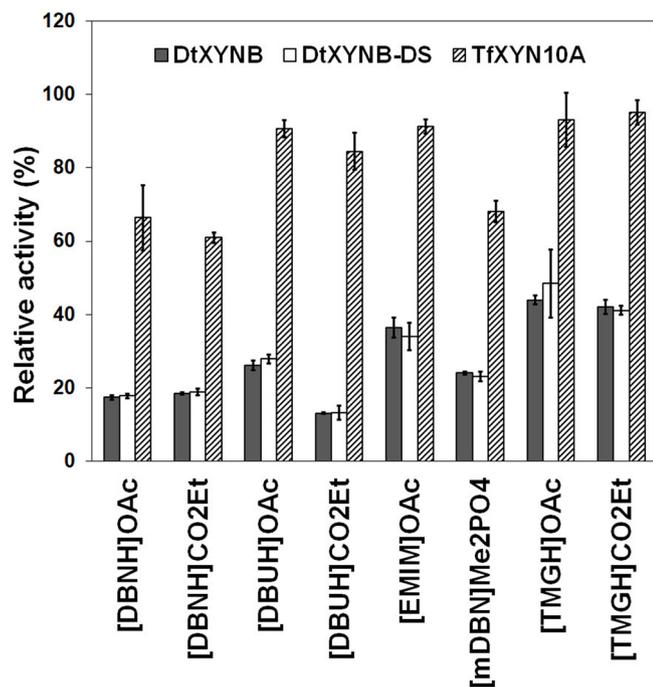


Fig. 1. Comparison between the activities of *D. thermophilum* GH11 xylanases (DtXYN11B and DtXYN11B-DS) and *T. flexuosa* GH10 xylanase (TfXYN10A) in 15% ILs with 1% beechwood xylan. Activities were measured at 70 °C and pH 6.5 for DtXYN11B and DtXYN11B-DS and pH 6 for TfXYN10A. The relative activity is shown in relation to a 100% activity level without the IL.

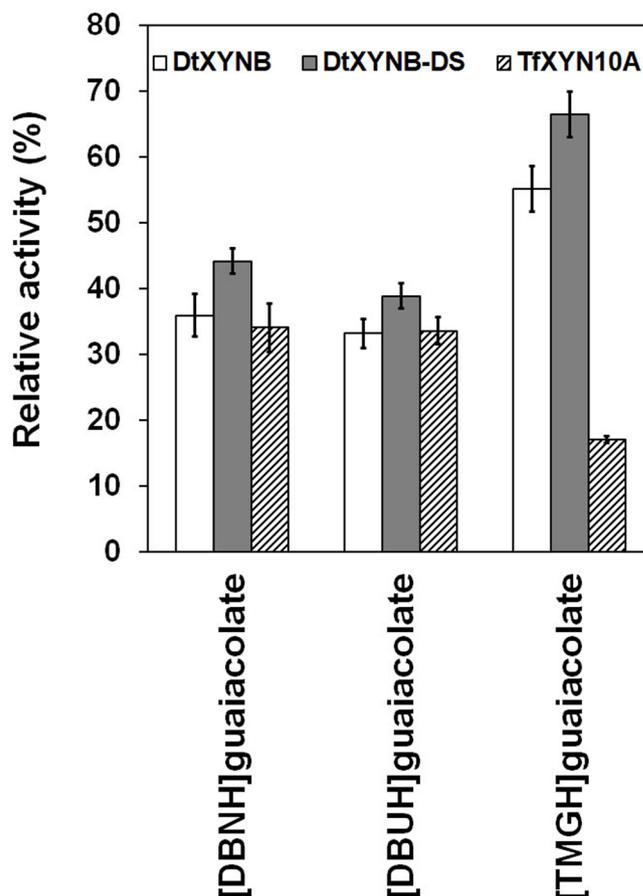


Fig. 2. Activities of *T. flexuosa* GH10 xylanase (TfXYN10A) and *D. thermophilum* GH11 xylanases (DtXYN11B and DtXYN11B-DS) in 5% guaiacolate-based ILs with 1% beechwood xylan. Activities were measured at 70 °C and pH 6 for TfXYN10A and pH 6.5 for DtXYN11B and DtXYN11B-DS. 100% activity is the activity level without the IL.

DtXYN11B and DtXYN11B-DS tolerated the [TMGH]<sup>+</sup> cation-based ILs best (Figs. 1 and 2). They tolerated [TMGH]guaiacolate even better than TfXYN10A (Fig. 2). We also found that the more stable variant DtXYN11B-DS was more tolerant to the guaiacolate ILs than DtXYN11B (Fig. 2). Thus, the additional thermostability may account for the higher IL tolerance of DtXYN11B-DS.

#### 3.2. Activity of TfXYN10A in 4% substrate

Since many ILs are known to cause competitive inhibition, a higher activity should be achieved in the presence of ILs when using a higher substrate concentration. The substrate would in higher concentration replace better the IL away from the active site. Thus, the activities of TfXYN10A were compared in 1% and 4% substrate concentrations (Figs. 3 and 4). The results showed that the enzyme has much higher activity in 4% substrate than in 1% substrate with all ILs. With acetate-propionate ILs or [mDBN]Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, elevated activity of the enzyme was often achieved in 4% substrate in the presence of ILs when compared to activity without IL (Fig. 3), indicating that ILs improved the enzyme activity in 4% substrate when the inhibition effect was overcome. However, with guaiacolate ILs, the recovery of enzyme activity by 4% substrate concentration was much lower than the activity without ILs (Fig. 4), indicating that the enzyme suffers inhibition by guaiacolates even at elevated concentration of the substrate. The increase in activity upon moving from 1 to 4% substrate appears to be higher in guaiacolate ILs in

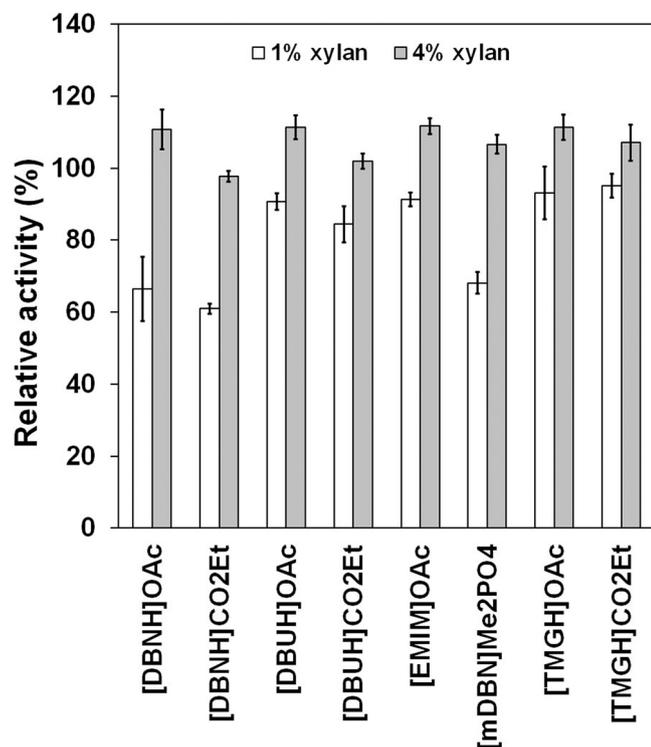


Fig. 3. Activity of *T. flexuosa* GH10 xylanase (TfXYN10A) in 1% and 4% substrate in the presence of 15% ILs. Activity was measured at 70 °C and pH 6. 100% activity is the activity in each substrate concentration without IL.

most cases (Fig. 4) than in the other ILs (Fig. 3). The stronger inhibition may occur because of the presence of ring structure (benzoic ring) in the guaiacolate anion (Fig. S14), which together with the cation, probably bind better to the active site than the acetate and propionate-based ILs. Another reason could be a stronger denaturing effect of the guaiacolate anion on the enzyme.

### 3.3. Effect of 5–35% ILs on TfXYN10A

The activity of TfXYN10A was further studied in different concentrations of the acetate-propionate ILs and [mDBN]Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fig. 5). The 5% (v/v) IL concentrations of all ILs were well tolerated and 5% [DBNH]CO<sub>2</sub>Et and 5% [mDBN]Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> even increased TfXYN10A activity slightly (Fig. 5). A slight enhancement of xylanase activity has been previously observed in xylanase E2 in [EMIM]Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> at all the concentrations used (5%–20% v/v) [56]. [EMIM]OAc, which has been previously studied [27], retained the enzyme activity much better than all the other ILs in 25–35% concentrations. [EMIM]OAc provided the highest activity (60%) in 35% IL concentrations. All other ILs fully inactivated TfXYN10A in 35% concentrations, except 35% [TMGH]OAc, which allowed around 20% activity.

By using a series of ILs based on a set of cations and anions, it was possible to compare the role of each ion in the inhibition. In 25% ILs, the order of decreasing activity follows an order of cations which is the same for both shared anions: [EMIM] > [TMGH] > [DBUH] > [DBNH]. The order [EMIM]OAc > [TMGH]OAc is preserved at 35% concentrations. However, in 15% ILs, this order was only observed in propionate-based ILs, and not at 5% ILs concentrations (Fig. 5). These findings suggest that a sufficient concentration of ILs is necessary to show a clear order of inhibition.

At 25% concentrations the ILs with propionate anions showed a more drastic negative effect on enzyme activity than ILs with acetate anions. No difference in the effect on enzyme activity was observed between these two anions at 5% or 15% concentrations (Fig. 5). Guaiacolate anion generated the strongest inhibition when studied with [DBNH]<sup>+</sup>, [DBUH]<sup>+</sup> and [TMGH]<sup>+</sup> cations at 5% concentrations,

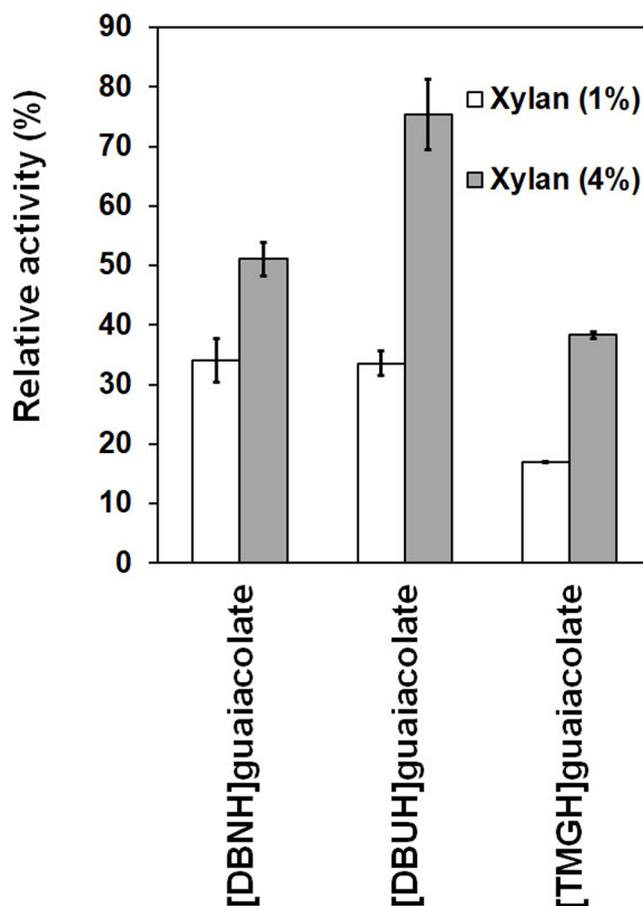


Fig. 4. Activity of *T. flexuosa* GH10 xylanase (TfXYN10A) in 1% and 4% substrate in the presence of 5% guaiacolate-based ILs. Activity was measured at 70 °C and pH 6. 100% activity is the activity in each substrate concentration without IL.

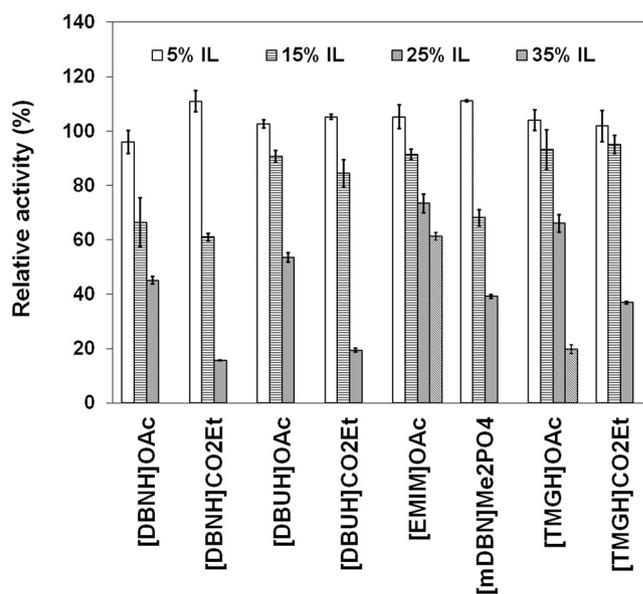


Fig. 5. Activity of *T. flexuosa* GH10 xylanase (TfXYN10A) in 5–35% ILs with 1% beechwood xylan as substrate. Activity was measured at 70 °C and pH 6. 100% activity is the activity without IL.

while with acetate and propionate these cations were well tolerated by TfXYN10A enzyme at this concentration (Fig. 5). With guaiacolates an inhibition of more than 60% was observed. (Fig. 2).

**Table 1**  
The kinetic parameters of TfxYN10A with ionic liquids.

Ionic liquid	Relative $V_{\max}$	$K_M$ (mg/mL)	Relative $V_{\max} / K_M$
No IL	1.000 ± 0.022	0.506 ± 0.048	1.986 ± 0.197
[DBNH]OAc	1.002 ± 0.016	0.651 ± 0.044	1.544 ± 0.094
[DBNH]CO <sub>2</sub> Et	1.267 ± 0.011	0.650 ± 0.023	1.951 ± 0.076
[DBUH]OAc	1.051 ± 0.010	0.735 ± 0.025	1.431 ± 0.048
[DBUH]CO <sub>2</sub> Et	1.072 ± 0.015	0.641 ± 0.021	1.672 ± 0.057
[EMIM]OAc	1.076 ± 0.023	0.729 ± 0.060	1.480 ± 0.121
[mDBN]Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.138 ± 0.000	0.657 ± 0.001	1.732 ± 0.003
[TMGH]OAc	1.037 ± 0.052	0.625 ± 0.088	1.673 ± 0.181
[TMGH]CO <sub>2</sub> Et	1.034 ± 0.026	0.695 ± 0.050	1.492 ± 0.072
[DBNH]guaiacolate	0.357 ± 0.025	1.284 ± 0.217	0.281 ± 0.027
[DBUH]guaiacolate	0.475 ± 0.020	2.928 ± 0.472	0.164 ± 0.023
[TMGH]guaiacolate	0.324 ± 0.003	11.335 ± 0.346	0.028 ± 0.000

### 3.4. Effect of ionic liquids on enzyme kinetic parameters of TfxYN10A

Michaelis Menten's steady-state model describes the kinetic reaction of an enzyme with one substrate binding site. In this model,  $K_M$  is the concentration of substrate corresponding to half of  $V_{\max}$  and reflects the enzyme's affinity for the substrate, while  $V_{\max}$  is the velocity of the reaction at excess substrate concentrations. Thus, the effect of an IL on  $K_M$  and  $V_{\max}$  reflects its effect on binding of the substrate to the active site and its effect on the catalytic rate, respectively.

To get a deeper insight into the effect of ILs on TfxYN10A, the ILs were used at 5% concentrations to study their effect on  $K_M$  and  $V_{\max}$  (Table 1).  $V_{\max}$  was measured as a relative value, in relation to the value in the absence of IL, which gives a comparative result for the effect of IL. All ILs increased the  $K_M$ , but the increase was most pronounced with guaiacolate-based ILs, with [TMGH]guaiacolate resulting in the greatest increase. The  $V_{\max}$  remained close to similar levels than without the IL for most acetate propionate ILs, except [DBNH]CO<sub>2</sub>Et. [DBNH]CO<sub>2</sub>Et and [mDBN]Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> increased the  $V_{\max}$ , which may explain the slight increase in activity observed at 5% IL concentrations (Fig. 5). The common feature of these two ILs is the DBN core of the cation. [DBNH]CO<sub>2</sub>Et showed the highest increase in  $V_{\max}$ , but despite this, the highest inhibition at higher IL concentrations (Fig. 5). Thus, the concentration-dependent behaviour may differ between different ILs.

The very low increase in  $K_M$  with most ILs indicates that TfxYN10A has a very high ability to resist the competition of 5% ILs. The acetate-propionate pairs and [mDBN]Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in the low IL concentration that was used did not show any consistent differences in their effect on the kinetic parameters (Table 1). However, the replacement of acetate or propionate anions with the guaiacolate anion leads to a significant difference in the kinetic parameters, especially in the  $K_M$ . The guaiacolate-based ILs also clearly decreased the  $V_{\max}$  which, in combination with an increased  $K_M$ , may explain the low activities observed in these ILs.

### 3.5. Binding of ionic liquid molecules to the active site

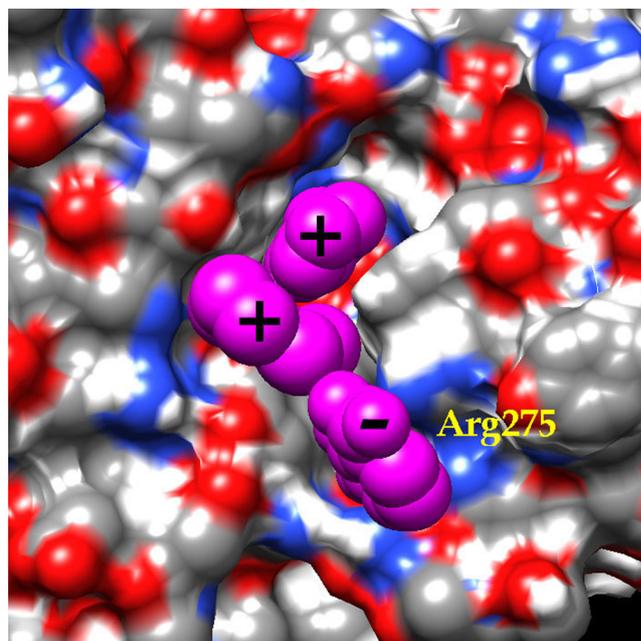
SwissDock, which recognizes charge interactions, was used in the molecular docking of the structures of IL cations and anions onto the xylanase structures (IL cations and anions are shown in Fig. S14). The molecular docking of [DBNH]<sup>+</sup>, [DBUH]<sup>+</sup>, [EMIM]<sup>+</sup>, [mDBN]<sup>+</sup> and [TMGH]<sup>+</sup> cations and acetate, propionate and guaiacolate anions to TfxYN10A structure, and cations and guaiacolate anion to DtXYN11B structure was performed in order to obtain preliminary information on how IL molecules could bind to the active site and how the observed binding behaviour among the detected 250–256 poses grouped into binding clusters could correlate to the enzyme activity in IL solutions. In TfxYN10A, 4–13 cation clusters (out of 35–50 total binding clusters) and in DtXYN11B, 20–33 cation clusters (out of 34–39 total binding clusters) were binding to the active site (Table S1). Each binding cluster

represents an overlapping binding of typically several binding poses, but also many clusters showed highly overlapping binding. All poses of one guaiacolate cluster are placed as an example in Fig. S17A. Number of bound clusters in the active site representing the amount of alternative binding sites quite largely seemed to correlate to the activity inhibition (Table S1). The higher amount of binding cation clusters in DtXYN11B also correlated to the stronger inhibition of DtXYN11B, as seen earlier with [EMIM]<sup>+</sup> cation [40].

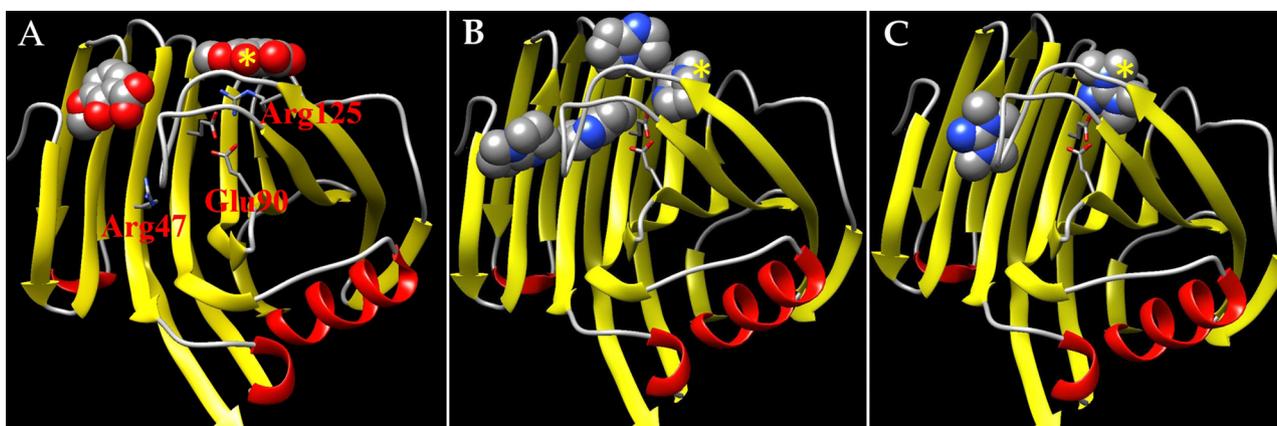
The active site shape is different in TfxYN10A and DtXYN11B, and the extent of IL bindings is different, since the active site of GH11 enzyme is deeper (Figs S15 and S16). As was observed earlier in the docking of [EMIM]<sup>+</sup> cation to the active site of TasXyn10A and DtXYN11B xylanases [40], the potential IL cation binding areas are much smaller in TfxYN10A than in DtXYN11B (Figs. S15 and S16). This was seen in this study with all IL cations, reflecting the much higher average inhibition of DtXYN11B by different ILs. Basically, only a few cations (around one to four) are likely to fit simultaneously to the active sites based on the available space and the size of cations (Figs. 6 and 7).

In the simulation by Jaeger and Pfaendtner (2013) [44], two or three [EMIM]<sup>+</sup> cations preferentially occupy space very near to the substrate binding site of GH11 xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* [44]. Typically, with all cations, the highest binding energy poses of cations in the active sites were located above the catalytic residues, indicating the higher binding capacity of the corresponding substrate binding site. For example, in the highest binding energy pose of [DBNH]<sup>+</sup> cation on TfxYN10A (upper cation in Fig. 6), the nitrogen atom of [DBNH]<sup>+</sup> ring is packed against the catalytic residue Glu128 and the hydrophobic parts of the cation rings pack against nearby aromatic rings of Trp85, Tyr172 and Trp274 on the active site canyon surfaces (not shown).

Jaeger and Pfaendtner (2013) [44] observed a specific interaction in the GH11 xylanase between the positively charged lysine and arginine



**Fig. 6.** Docking of [DBNH]<sup>+</sup> cation and guaiacolate anion to the active site of *T. flexuosa* GH10 xylanase (TfxYN10A). From separate dockings of these ligands, two [DBNH]<sup>+</sup> cations (marked by +) and one guaiacolate anion (marked by -) that have space to fit the active site canyon simultaneously were chosen to be shown. The upper [DBNH]<sup>+</sup> cation had the lowest  $\Delta G$  among the [DBNH]<sup>+</sup> poses. Corresponding [DBNH]<sup>+</sup> clusters are shown in Fig. S17C and Fig. S18A and S18B. The catalytic residues (one with negative charge) are located below the cations. Nitrogens are shown in blue and oxygens in red. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).



**Fig. 7.** Docking of IL molecules to *D. thermophilum* GH11 xylanase (DtXYN11B). Positions of binding guaiacolate anions (A), [DBNH]<sup>+</sup> cations (B) and [TMGH]<sup>+</sup> cations (C) are shown. From separate SwissDock runs, the cation/anion molecules that could fit the active site simultaneously are shown for each ligand after placing the highest energy binder (shown by star). Fig S15 shows the corresponding clusters. The catalytic residues are shown in grey and their oxygens in red. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

surface residues and the negatively charged oxygen atom of acetate and ethyl sulphate anions of the ILs [44]. The docking of anions to GH10 xylanase TfxYN10A revealed that the major anion binding site was at the other end of the active site canyon from where the cations were binding (Figs. 6 and S18). 15 clusters of guaiacolate poses bound into the active site out of total 39 clusters (Table S1), but only two clusters of propionate or acetate. In the anion binding site, the guaiacolate anion is packed against positively charged Arg275 (Fig. 6 and S18A). Acetate and propionate poses were also located close to Arg275 (see Fig. S18B for propionate). In TfxYN10A, based on the size of the active site and sizes of the IL molecules and positions of the potential cation and anion binding sites, the active site space is estimated to be able to simultaneously harbour, for example, two [DBNH]<sup>+</sup> cations and one guaiacolate anion, which then together are likely to fill the active site. [DBNH]<sup>+</sup> cation did not bind to the area that binds guaiacolate (Fig. S18C), probably giving space for guaiacolate anion binding.

Docked molecules of guaiacolate and two cations are shown in Fig. 7 for DtXYN11B so that the highest energy binder was placed first and then the other molecules that fit the active site without overlapping were chosen to be shown. The space-filling structures of guaiacolate anions, and [DBNH]<sup>+</sup> and [TMGH]<sup>+</sup> cations binding to the active site of DtXYN11B from different clusters are shown in Fig. 7 and the corresponding active site clusters are shown in Fig. S17. In DtXYN11B, the active site contained many poses for guaiacolate (5 clusters), but active site hits for propionate and acetate were only few in distant positions (not shown). The docking results indicated that unlike in TfxYN10A, the anion and cation binding sites appear to be overlapping in DtXYN11B (Fig. 7).

Binding energies of cations did not produce any clear general correlation to activity effect (Table S1). The energy level of the highest energy binders in the active site with guaiacolates compared to acetate/propionate reflected the strength of the inhibition level. The strongest inhibition was with guaiacolate anions (highest binding energy -7.65 kcal/mol for TfxYN10A and -6.20 kcal/mol for DtXYN11B) and the weakest inhibition was with propionate (-6.50 kcal/mol) and acetate (-6.48 kcal/mol) (propionate and acetate ILs tested only for TfxYN10A). The cation-binding energies were all in the range of -6.4 – -7.0 kcal/mol for both enzymes, indicating that the guaiacolate binding to TfxYN10A could be strongest among these IL molecules.

#### 4. Discussion

The processing of lignocellulose in high-solids conditions by enzymes for various purposes generates mixtures that contain various molecules that inhibit enzymes. For example, substrate inhibition,

product inhibition, binding of enzymes to lignin and inhibition by enzymatic and chemical degradation products, such as oligosaccharides and furfurals, can reduce enzyme efficiency [7–9]. Thus, enzymes tolerant to inhibiting compounds are important in industrial lignocellulose processing [57,58]. When ionic liquids (ILs) are used to assist lignocellulose pretreatment, they can inhibit enzymatic hydrolysis in the same way as other inhibitors derived from the biomass. We have studied the inhibition mechanism of ILs on glycosyl hydrolases and found that competitive inhibition appears to be the main reason for reduced enzyme activity [27,28,40,42]. The molecular understanding of competitive inhibition is relevant to the development of better enzymes to be used in biorefineries. Knowledge of the factors that affect enzymes in ILs is of great importance in selecting enzyme-ionic liquid combinations for biorefinery applications.

Xylanases have been studied for their ability to assist cellulases in lignocellulose hydrolysis [23,24]. Their activity has been tested in hydrophilic ILs that are capable of dissolving lignocellulose. The first findings with [EMIM]OAc indicated that family GH10 xylanases are more tolerant to ILs than GH11 xylanases [27,28,40–42]. However, further studies with different xylanases and different ILs are necessary in order to establish this hypothesis as a general principle. Thus, in this study, the kinetic behaviour of a GH10 xylanase and a GH11 xylanase with its stabilized variant were studied in new aqueous IL solutions. The goal was to gain a wider picture of the competitive inhibition caused by ILs, and how these two enzyme families differ in this respect. TfxYN10A was already shown to be the most IL-tolerant enzyme among other GH10 and GH11 xylanases (including DtXYN11B), retaining 100% of relative activity at 60 °C in the presence of a 15% concentration of seven hydrophilic ILs ([DMIM]DMP, [BMIM]DBP, [Chol]AcO, [BMIM]DMP, [TMGH]n-PrCOO, [P4444]AcO and [EMIM]DMP) [39]. DtXYN11B retained 49% average activity in this set of ILs, [Chol]OAc being the most tolerated (90% activity) [39]. In the present study, we tested the enzymes at 70 °C with seven acetate propionate-based ILs ([DBNH]OAc, [DBNH]CO<sub>2</sub>Et, [DBUH]OAc, [DBUH]CO<sub>2</sub>Et, [EMIM]OAc, [TMGH]OAc and [TMGH]CO<sub>2</sub>Et), three guaiacolate-based ILs ([DBNH]guaiacolate, [DBUH]guaiacolate, [TMGH]guaiacolate) and [mDBN]Me<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. The results showed that, in general, GH10 xylanase TfxYN10A tolerates this set of ILs better than the GH11 xylanases DtXYN11B and DtXYN11B-DS. [EMIM]OAc, followed by [TMGH]OAc, were the best tolerated by TfxYN10A. [TMGH]OAc followed by [TMGH]CO<sub>2</sub>Et and [EMIM]OAc were the best tolerated by DtXYN11B. [TMGH]OAc is a potentially distillable IL [45] and the studied enzymes were very active in it, making it a promising IL for practical application.

Both GH11 xylanases DtXYN11B and DtXYN11B-DS and GH10 xylanase TfxYN10A are highly thermostable and active well above the 70

°C used as the assay temperature in this study [27,28]. Thus, they are not likely to be denatured by low concentrations of ILs at 70 °C, since in 35% [EMIM]OAc, TfXYN10A had a temperature optimum of 70 °C [27] and in 20% [EMIM]OAc, the temperature optimum of DtXYN11B was 75–80 °C [28]. Because of this, the recovery of activity by increasing the concentration of the substrate suggests that competitive inhibition is the main factor in the inhibition of enzymes by the acetate-propionate ILs and [mDBNH]MePO<sub>4</sub> at 15% concentrations. Previous works have studied the activity and thermal stability of the same xylanases [27,28] or other thermostable xylanases [40,41] in the presence of a dilute aqueous solution of [EMIM]OAc, [EMIM]DMP and [DBNH]OAc in 5–35% concentration. The enzymes appear not to lose as much enzyme stability as activity, and competitive inhibition by the IL ions plays a key role in the loss of activity.

Guaicol is a common phenolic residue produced in lignin degradation during biomass processing [59] and was shown to exert an inhibitory effect on *Aspergillus japonicus* xylanase [60] and *Trichoderma reesei* cellulase [61]. At 5% concentrations of guaiacolate-based ILs, the finding that the stabilized variant DtXYN11B-DS shows a higher tolerance than the wild type DtXYN11B and that there is no full recovery of activity at high substrate concentration, suggests that the N-terminal disulphide that increases enzyme stability protects against the effect of guaiacolate ILs. Thus, in contrast with other ILs, guaiacolate-based ILs may cause unfolding of the enzyme at the studied temperature. Based on a steady-state (tryptophan) fluorescence spectroscopy study, it was suggested that the inhibitory effect of phenolic compounds, like guaiacolate ILs, on thermostable GH11 xylanase was attributable to structural alterations in the protein [62]. It is therefore possible that protein denaturation was delayed by the stabilizing disulphide bridge in the N-terminus of DtXYN11B-DS, a region from which the unfolding starts in GH11 xylanases [63]. However, further experiments are needed to confirm this hypothesis of protein denaturation.

Two ILs appear to have the lowest inhibition effect on DtXYN11B: [TMGH]OAc in our study and choline acetate [Chol]OAc in the study of Rahikainen et al. (2017) [39]. However, [TMGH]<sup>+</sup> cation with a large anion molecule showed much stronger inhibition, particularly [TMGH] guaiacolate in our study and [TMGH]n-PrCOO (butyrate) in the study of Rahikainen et al. (2017) [39]. All these results indicate that the effect of the cation is tuned by the properties of anion.

Several properties of IL ions have been found to play a key role in the inhibition of enzyme in dilute solutions of ILs. They include hydrophobicity, polarizability and the size of the ions [25,26,34,35]. The order of increasing inhibition of TfXYN10 by the cations reveals that cations with one ring structure or without ring ([TMGH]<sup>+</sup> and [EMIM]<sup>+</sup>) are the most tolerated by TfXYN10A, whereas the cations with double-ring structures ([DBNH]<sup>+</sup>, [mDBN]<sup>+</sup> and [DBUH]<sup>+</sup>) are the most inhibiting (Fig. S14). The most tolerated IL cations contain the smallest amount of hydrophobic C and H atoms ([EMIM]<sup>+</sup> 17; [TMGH]<sup>+</sup> 17) and the less tolerated IL cations have a higher amount ([DBNH]<sup>+</sup> 19; [DBUH]<sup>+</sup> 25 and [mDBN]<sup>+</sup> 23). Several studies have indicated that a larger hydrophobic surface in the cation causes stronger enzyme inhibition [39,35,34]. However, the hydrophobicity of the cations does not fully correspond to the order of inhibition for TfXYN10A xylanase that was observed in our study, suggesting that further factors are also implicated in the inhibition.

The cations used are a set of superbase conjugate acids with varying basicities of the unconjugated superbases: [mDBN]<sup>+</sup> > [EMIM]<sup>+</sup> > [DBUH]<sup>+</sup> > [DBNH]<sup>+</sup> > [TMGH]<sup>+</sup> (most to least basic) [45]. [DBNH]<sup>+</sup> and [DBUH]<sup>+</sup> were the most acidic cations and were not the most enzyme-friendly, while [mDBN]<sup>+</sup> was the most basic cation and was not the most tolerated. Thus, properties other than cation acidity-basicity appear to dominate the activity inhibition. There is no correlation in the inhibition of enzymes with the total surface area and cavity volume values (not shown) formed from both polar and nonpolar atoms. Instead, the [EMIM]<sup>+</sup> cation shows a higher surface area/volume (SA/V) ratio than the others, which could relate to its milder inhibition level. The SA/V values are: [DBNH]<sup>+</sup>

1.01; [DBUH]<sup>+</sup> 0.96; [EMIM]<sup>+</sup> 1.11; [mDBN]<sup>+</sup> 1.00 and [TMGH]<sup>+</sup> 1.02 [45].

The decrease in enzyme activity in the presence of propionate compared to acetate anion at 25% concentrations may be attributed to the increasing alkyl chain length of the anion (acetate compared to propionate), which corresponds to an increase in hydrophobicity. Another factor that may contribute to the inhibition is the polarizability of the anion. Anions are more polarisable than cations of the same charge density [64], which explains their dominating effect on enzymes [26]. Experimental values of electronic polarizability obtained through dielectric measurements on gaseous isolated molecules show that acetic acid has less polarizability (5.15 Å<sup>3</sup>) than propanoic acid (6.96 Å<sup>3</sup>) [65]. Thus, inhibition of TfXYN10A xylanase appears to follow an increase in polarizability of the anion. The correlation of increased enzyme inhibition with increasing hydrophobicity and polarizability of the anion was also observed in the activity of tyrosinase in ILs solutions [34]. The propionate-based ILs used in this study exhibit lower viscosity compared to acetate-based ILs [45], which may contribute to the observed higher enzyme inhibition. Xu (2017) found that viscosity decreases as temperature increases due to the weakening interaction between cation and anion [66].

In dilute IL solutions kosmotropic anions favour enzyme functioning, while chaotropic anions do not favour it [25]. Propionate is more kosmotropic than acetate [67], but more inhibiting for the enzyme, which indicates that inhibition cannot be explained by the kosmotropicity effect of the anions. This result agrees with previous studies showing that the anion effect does not always follow the Hofmeister sequences [26].

Enhanced size and hydrophobicity (presence of a benzoic ring) and the polarizability (12.07 Å<sup>3</sup> in solid state [65]) of guaiacolate may account for the stronger enzyme inhibition of this anion compared to acetate and propionate anions at 5% IL concentrations. It appears that an increase in hydrophobicity of the anion decreases the IL concentrations needed to inactivate the enzyme. According to Zhao (2016) [25], in diluted aqueous IL solutions (high concentration of water) kosmotropic anions bearing high H-bond basicity (acetate, propionate) tend to interact strongly with water molecules and become enzyme-friendly [25]. As the anion becomes more hydrophobic (guaiacolate), it is less hydrated and tends to interact with the enzyme. This interaction may be stronger due to enhanced polarizability of this anion and may lead to inactivation of the enzyme at lower IL concentrations.

Based on an examination of the protein structure, Chawachart et al. (2014) [40] proposed a reason for the difference in IL inhibition between GH10 and GH11 xylanases. They proposed that the narrow and deep active site of GH11 xylanases allows transient binding of large amounts of [EMIM]<sup>+</sup> cations, whereas, in the more open active site of GH10 xylanases, the binding of [EMIM]<sup>+</sup> cations is distributed in a more restricted area [40]. We observed in this study that the active site of GH10 xylanase TfXYN10A has separate cation and anion binding sites (Fig. 6). It is likely that together with the high combined hydrophobic binding surface of guaiacolate and cation, the charge interaction between the anion and cation contribute to the synergistic effect of cation and anion in binding to the active site, thus inhibiting more strongly enzyme activity. This effect is smaller in propionate and acetate due to their weaker binding to the active site (Table S1). Accordingly, no kinetically trapped acetate was observed in the simulation of Jaeger and Pfandtner with the GH11 xylanase in the presence of [EMIM]OAc [44].

While in GH10 xylanase TfXYN10A, the cation and anion binding sites seem to be in separate active site areas (Fig. 6), in GH11 xylanase DtXYN11B, the cations and anions seem to bind quite much to the same areas (Fig. 7). Since cation binding energies are higher than guaiacolate binding energy, then cation binding might possibly be preferred in the active site of DtXYN11B (Table S1). These kind of differences between different enzymes may fine tune how the combined dynamic effect of cation and anion interactions with the enzyme cause enzyme inhibition.

Apparently, stronger binding of guaiacolate to TfXYN10A than to DtXYN11B (Table S1) may explain why the inhibition with guaiacolate was strongest with GH10 xylanase. The double ring in the cations and the single ring in guaiacolate form larger hydrophobic binding surfaces. The active site of glycosyl hydrolases contains hydrophobic surfaces to bind the hydrophobic parts of sugar rings in the carbohydrate chains. These surfaces would also form strong interactions with the hydrophobic parts of IL cations and anions.

In conclusion, the shape of the active site, overall interaction properties of the substrate binding area and the interaction mode between the enzyme and inhibitor appear to play an important role in determining the sensitivity of the enzyme to competitive inhibition caused by IL molecules typically binding quite close to the catalytic residues. Both cation and anion contribute to the inhibition by competing out the substrate for binding to the active site. The enzyme-specific differences in IL-tolerance were shown both by experimental and modelling studies. Thus, the inhibition effect depends on the combined properties of the enzymes and ILs. The obtained principles can be used to plan process conditions for enzyme treatments in ILs, to design enzyme-friendly ILs for biotechnical use and to engineer new and more IL-tolerant enzymes.

#### Author statement

HH: experiments and writing; OT: supervision, modeling, writing; AP, AWTK, IK: ionic liquid synthesis, writing; LM: modeling; HL, SA: production of enzymes, reviewing; SBa, SBc: administration, writing.

#### Acknowledgements

We would like to thank Johanna Aura for her technical assistance. We would also like to thank CLIC Innovation (ACel programme) and Business Finland for their support.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.03.022>.

#### References

- [1] M. Dittmar, Development towards sustainability: how to judge past and proposed policies? *Sci. Total Environ.* 472 (2014) 282–288.
- [2] R. Kumar, S. Singh, O.M.V. Singh, Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35 (2008) 377–391.
- [3] L. Jia, G.A.L. Gonçalves, Y. Takasugi, Y. Mori, S. Noda, T. Tanaka, H. Ichinose, N. Kamiya, Effect of pretreatment methods on the synergism of cellulase and xylanase during the hydrolysis of bagasse, *Bioresour. Technol.* 185 (2015) 158–164.
- [4] G. Cheng, P. Varanasi, C. Li, H. Liu, Y.B. Melnichenko, B.A. Simmons, M.S. Kent, S. Singh, Transition of cellulose crystalline structure and surface morphology of biomass as a function of ionic liquid pretreatment and its relation to enzymatic hydrolysis, *Biomacromolecules* 12 (2011) 933–941.
- [5] A.T.W.M. Hendriks, G. Zeeman, Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 10–18.
- [6] M.H.L. Silveira, A.R.C. Morais, A.M. da Costa Lopes, D.N. Oleksyszyn, R.B. Lukasik, J. Andraus, L.P. Ramos, Current pretreatment technologies for the development of cellulosic ethanol and biorefineries, *ChemSusChem* 8 (2015) 3366–3390.
- [7] Y. Sun, J. Cheng, Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresour. Technol.* 83 (2002) 1–11.
- [8] Y. Kim, E. Ximenes, N.S. Mosier, M.R. Ladisch, Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass, *Enzyme Microb. Technol.* 48 (2011) 408–415.
- [9] J.S. Van Dyk, B.I. Pletschke, A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 1458–1480.
- [10] R.P. Swatloski, S.K. Spear, J.D. Holbrey, R.D. Rogers, Dissolution of cellulose with ionic liquids, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 4974–4975.
- [11] A.A. Elgharabawy, M.Z. Alam, M. Moniruzzaman, M. Goto, Ionic liquid pretreatment as emerging approaches for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass, *Biochem. Eng. J.* 109 (2016) 252–267.
- [12] P. Mäki-Arvela, I. Anugwom, P. Virtanen, J.P. Mikkola, Dissolution of lignocellulosic materials and its constituents using ionic liquids—A review, *Ind. Crops Prod.* 32 (2010) 175–201.
- [13] A.G. Cruz, C. Scullin, C. Mu, G. Cheng, V. Stavila, P. Varanasi, D. Xu, J. Mentel, Y.D. Chuang, B. Simmons, S. Singh, Impact of high biomass loading on ionic liquid pretreatment, *Biotechnol. Biofuels* 6 (2013) 52.
- [14] A. George, A. Brandt, K. Tran, S.M.N.S. Zahari, D. Klein-Marcuschamer, N. Sun, N. Sathitsuksanoh, J. Shi, V. Stavila, R. Parthasarathi, S. Singh, B.M. Holmes, T. Weltton, B.A. Simmons, J.P. Hallett, Design of low-cost ionic liquids for lignocellulosic biomass pretreatment, *Green Chem.* 17 (2015) 1728–1734.
- [15] K. Gao, J. Xin, D. Yan, H. Dong, Q. Zhou, X. Lu, S. Zhang, Direct conversion of cellulose to sorbitol via an enhanced pretreatment with ionic liquids, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 93 (2018) 2617–2624.
- [16] C.G. Yoo, Y. Pu, A.J. Ragauskas, Ionic liquids: promising green solvents for lignocellulosic biomass utilization, *Curr. Opin. Green Sustain Chem.* 5 (2017) 5–11.
- [17] I. Wazeer, M. Hayyan, M.K. Hadj-Kali, Deep eutectic solvents: designer fluids for chemical processes, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 93 (2018) 945–958.
- [18] H. Zhao, Methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids—A review, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85 (2010) 891–907.
- [19] W.W. Gao, F.X. Zhang, G.X. Zhang, C.H. Zhou, Key factors affecting the activity and stability of enzymes in ionic liquids and novel applications in biocatalysis, *Biochem. Eng. J.* 99 (2015) 67–84.
- [20] Y. Wang, M. Radosevich, D. Hayes, N. Labbé, Compatible ionic liquid-cellulases system for hydrolysis of lignocellulosic biomass, *Biotechnol. Bioeng.* 108 (2011) 1042–1048.
- [21] T. Collins, C. Gerday, G. Feller, Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases, *FEMS Microbiol. Rev.* 29 (2005) 3–23.
- [22] Q.K. Beg, M. Kapoor, L. Mahajan, G.S. Hoondal, Microbial xylanases and their industrial applications: a review, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56 (2001) 326–338.
- [23] H.T. Song, Y. Gao, Y.M. Yang, W.J. Xiao, S.H. Liu, W.C. Xia, Z.L. Liu, L. Yi, Z.B. Jiang, Synergistic effect of cellulase and xylanase during hydrolysis of natural lignocellulosic substrates, *Bioresour. Technol.* 219 (2016) 710–715.
- [24] G.A.L. Gonçalves, Y. Takasugi, L. Jia, Y. Mori, S. Noda, T. Tanaka, H. Ichinose, N. Kamiya, Synergistic effect and application of xylanases as accessory enzymes to enhance the hydrolysis of pretreated bagasse, *Enzyme Microb. Technol.* 72 (2015) 16–24.
- [25] H. Zhao, Protein stabilization and enzyme activation in ionic liquids: specific ion effects, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91 (2016) 25–50.
- [26] Z. Yang, Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis, *J. Biotechnol.* 144 (2009) 12–22.
- [27] S. Anbarasan, R. Wahlström, M. Hummel, H. Ojamo, H. Sixta, O. Turunen, High stability and low competitive inhibition of thermophilic *Thermopolyspora flexuosa* GH10 xylanase in biomass-dissolving ionic liquids, *Appl. Microb. Biotechnol.* 101 (2017) 1487–1498.
- [28] H. Li, A. Kankaanpää, H. Xiong, M. Hummel, H. Sixta, H. Ojamo, O. Turunen, Thermostabilization of extremophilic *Dictyoglomus thermophilum* GH11 xylanase by an N-terminal disulfide bridge and the effect of ionic liquid [EMIM]OAc on the enzymatic performance, *Enzyme Microb. Technol.* 53 (2013) 414–419.
- [29] S. Goswami, N. Gupta, S. Datta, Using the  $\beta$ -glucosidase catalyzed reaction product glucose to improve the ionic liquid tolerance of  $\beta$ -glucosidases, *Biotechnol. Biofuels* 9 (2016) 1–12.
- [30] A.P. Carneiro, O. Rodriguez, F.L. Mota, A.P.M. Tavares, E.A. Macedo, Kinetic and stability study of the peroxidase inhibition in ionic liquids, *Ind. Eng. Chem. Res.* 48 (2009) 10810–10815.
- [31] J.C. Stevens, L. Das, J.K. Mobley, S.O. Asare, B.C. Lynn, D.W. Rodgers, J. Shi, Understanding laccase–ionic liquid interactions toward biocatalytic lignin conversion in aqueous ionic liquids, *ACS Sustainable Chem. Eng.* 7 (2019) 15928–15938.
- [32] R.M. Lau, M.J. Sorgedraeger, G. Carrea, F. van Rantwijk, F. Secundo, R.A. Sheldon, Dissolution of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids: effects on structure and activity, *Green Chem.* 6 (2004) 483–487.
- [33] V. Jaeger, P. Burney, J. Pfandtner, Comparison of three ionic liquid-tolerant cellulases by molecular dynamics, *Biophys. J.* 108 (2015) 880–892.
- [34] M.P. Heitz, J.W. Rupp, K.W. Horn, Biocatalytic activity of mushroom tyrosinase in ionic liquids: specific ion effects and the Hofmeister series, *Insights Enzyme Res.* 2 (2018) 1–12.
- [35] J. Sun, H. Liu, W. Yang, S. Chen, S. Fu, Molecular mechanisms underlying inhibitory binding of alkylimidazolium ionic liquids to laccase, *Molecules* 22 (2017) 1353.
- [36] T. Zhang, S. Datta, J. Eichler, N. Ivanova, S.D. Axen, C.A. Kerfeld, F. Chen, N. Kyripides, P. Hugenholtz, J. Cheng, K.L. Sale, B. Simmons, E. Rubin, Identification of a haloalkaliphilic and thermostable cellulase with improved ionic liquid tolerance, *Green Chem.* 13 (2011) 2083–2090.
- [37] N. Ilmberger, D. Meske, J. Juergensen, M. Schulte, P. Barthen, U. Rabausch, Metagenomic cellulases highly tolerant towards the presence of ionic liquids - linking thermostability and halotolerance, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95 (2012) 135–146.
- [38] Z. Li, X. Pei, Z. Zhang, Y. Wei, Y. Song, L. Chen, S. Liu, S.H. Zhang, The unique GH5 cellulase member in the extreme halotolerant fungus *Aspergillus glaucus* CCHA is an endoglucanase with multiple tolerance to salt, alkali and heat: prospects for straw degradation applications, *Extremophiles* 22 (2018) 675–685.
- [39] J. Rahikainen, S. Anbarasan, R. Wahlström, A. Parvainen, A.W.T. King, T. Puranen, K. Kruus, I. Kilpeläinen, O. Turunen, A. Suurnäkki, Screening of glycoside hydrolases and ionic liquids for fibre modification, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 93 (2017) 818–826.
- [40] N. Chawachart, S. Anbarasan, S. Turunen, H. Li, C. Khanongnuch, M. Hummel, H. Sixta, T. Granstrom, S. Lumyong, O. Turunen, Thermal behaviour and tolerance to ionic liquid [EMIM]OAc in GH10 xylanase from *Thermoascus aurantiacus* SL16W, *Extremophiles* 18 (2014) 1023–1034.

- [41] T. Yu, S. Anbarasan, Y. Wang, K. Telli, A.S. Aslan, Z. Su, Y. Zhou, L. Zhang, P. Iivonen, S. Havukainen, T. Mentunen, M. Hummel, H. Sixta, B. Binay, O. Turunen, H. Xiong, Hyperthermostable *Thermotoga maritima* xylanase XYN10B shows high activity at high temperatures in the presence of biomass-dissolving hydrophilic ionic liquids, *Extremophiles* 20 (2016) 515–524.
- [42] H. Li, O. Turunen, Effect of acidic amino acids engineered into the active site cleft of *Thermopolyspora flexuosa* GH11 xylanase, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 62 (2015) 433–440.
- [43] S.R. Summers, K.G. Sprenger, J. Pfaendtner, J. Marchant, M.F. Summers, J.L. Kaar, Mechanism of competitive inhibition and destabilization of *Acidothermus cellulolyticus* endoglucanase 1 by ionic liquids, *J. Phys. Chem. B* 121 (2017) 10793–10803.
- [44] V.W. Jaeger, J. Pfaendtner, Structure, dynamics, and activity of xylanase solvated in binary mixtures of ionic liquid and water, *ACS Chem. Biol.* 8 (2013) 1179–1186.
- [45] A. Parviainen, A.W.T. King, I. Mutikainen, M. Hummel, C. Selg, L.K.J. Hauru, H. Sixta, I. Kilpeläinen, Predicting cellulose solvating capabilities of acid-base conjugate ionic liquids, *ChemSusChem* 6 (2013) 2161–2169.
- [46] H. Parviainen, A. Parviainen, T. Virtanen, I. Kilpeläinen, P. Ahvenainen, R. Serimaa, S. Grönqvist, T. Maloney, S.L. Maunu, Dissolution enthalpies of cellulose in ionic liquids, *Carbohydr. Polym.* 113 (2014) 67–76.
- [47] A.W.T. King, J. Asikkala, I. Mutikainen, P. Jarvi, I. Kilpeläinen, Distillable acid–base conjugate ionic liquids for cellulose dissolution and processing, *Angew. Chem., Int. Ed.* 50 (2011) 6301–6305.
- [48] S. Anbarasan, J. Janis, M. Paloheimo, M. Laitaoja, M. Vuolanto, J. Karimaki, P. Vainiotalo, M. Leisola, O. Turunen, Effect of glycosylation and additional domains on the thermostability of a family 10 xylanase produced by *Thermopolyspora flexuosa*, *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (2010) 356–360.
- [49] G.L. Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* 31 (1959) 426–428.
- [50] M.J. Bailey, P. Biely, K. Poutanen, Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity, *J. Biotechnol.* 23 (1992) 257–270.
- [51] A. Grosdidier, V. Zoete, O. Michielin, SwissDock, a protein–small molecule docking web service based on EADock DSS, *Nucleic Acid Res.* 39 (2011) W270–W277.
- [52] A.A. McCarthy, D.D. Morris, P.L. Bergquist, E.N. Baker, Structure of XynB, a highly thermostable  $\beta$ -1,4-xylanase from *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1, at 1.8 Å resolution, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 56 (2000) 1367–1375.
- [53] A.E. Lohning, S.M. Levison, B. Williams-Noonan, S.S. Schweiker, A practical guide to molecular docking and homology modelling for medicinal chemists, *Curr. Top. Med. Chem.* 17 (2017) 2023–2040.
- [54] V. Zoete, A. Grosdidier, M. Cuendet, O. Michielin, Use of the FACTS solvation model for protein–ligand docking calculations. Application to EADock, *J. Mol. Recognit.* 23 (2010) 457–461.
- [55] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1605–1612.
- [56] M.F. Thomas, L.L. Li, J.M. Handley-Pendleton, D. van der Lelie, J.J. Dunn, J.F. Wishart, Enzyme activity in dialkyl phosphate ionic liquids, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 11200–11203.
- [57] S. Mohanram, D. Amat, J. Choudhary, A. Arora, L. Nain, Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries, *Sust. Chem. Process* 1 (2013) 15.
- [58] S.K. Khare, A. Pandey, C. Larroche, Current perspectives in enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass, *Biochem. Eng. J.* 102 (2015) 38–44.
- [59] B. Du, L.N. Sharma, C. Becker, S.F. Chen, R.A. Mowery, G.P. van Walsum, C.K. Chambliss, Effect of varying feedstock-pretreatment chemistry combinations on the formation and accumulation of potentially inhibitory degradation products in biomass hydrolysates, *Biotechnol. Bioeng.* 107 (2010) 430–440.
- [60] A. Sharma, O. Milstein, Y. Vered, J. Gressel, H.M. Flowers, Effects of aromatic compounds on hemicelluloses degrading enzymes in *Aspergillus japonicus*, *Biotechnol. Bioeng.* 27 (1985) 1095–1101.
- [61] L. Qin, W.C. Li, L. Liu, J.Q. Zhu, X. Li, B.Z. Li, Y.J. Yuan, Inhibition of lignin-derived phenolic compounds to cellulase, *Biotechnol. Biofuels* 9 (2016) 70.
- [62] I. Boukari, M. O'Donohue, C. Rémond, B. Chabbert, Probing a family GH11 endo- $\beta$ -1,4-xylanase inhibition mechanism by phenolic compounds: role of functional phenolic groups, *J. Mol. Cat. B: Enzy.* 72 (2011) 130–138.
- [63] M. Purmonen, J. Valjakka, K. Valjakka, T. Laitinen, J. Rouvinen, Molecular dynamics studies on the thermostability of family 11 xylanases, *Protein Eng. Des. Sel.* 20 (2007) 551–559.
- [64] A. Grossfield, P. Ren, J.W. Ponder, Ion solvation thermodynamics from simulation with a polarizable force field, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 15671–15682.
- [65] M. Gussonia, M. Ruib, G. Zerbi, Electronic and relaxation contribution to linear molecular polarizability. An analysis of the experimental values, *J. Mol. Struct.* 447 (1998) 163–215.
- [66] Y. Xu, CO<sub>2</sub> absorption behavior of azole-based protic ionic liquids: influence of the alkalinity and physicochemical properties, *J. CO<sub>2</sub> Util.* 19 (2017) 1–8.
- [67] H. Donald, B. Jenkins, Viscosity *B* coefficients of ions in solution, *Chem. Rev.* 95 (1995) 2695–2724.

## Publications

Boucherba Nawel., Benallaoua Said., Copinet Estelle., **Hebal Hakim.**, Duchiron Francis. (2011). Production and partial characterization of xylanase produced by *Jonesia denitrificans* isolated in Algerian soil. *Process Biochem.* 46: 519–525.

**Hebal Hakim**, Parviainen Arno, Anbarasan Sasikala, Li He, Makkonen Laura, Bankar Sandip, King Alistair W.T., Kilpeläinen Ilkka, Benallaoua Said, Turunen Ossi (2020). Inhibition of hyperthermostable xylanases by superbase ionic liquids. *Process Biochem.* 95: 148–156.

## Communications internationales

- Boucherba Nawel, Benallaoua Said, Copinet Estelle, **Hebal Hakim** et Duchiron Francis. La xylanase microbienne : clé pour une chimie durable. Retrospective des travaux réalisés sur les xylanases produites par des bactéries isolées à partir d'un sol algérien. VIème congrès international sur les énergies renouvelables et l'environnement. Hammamet (Tunisie) : 19-21 Mars 2012.
- Boucherba Nawel, Benallaoua Said, **Hebal hakim**, Copinet Estelle, Bettache Azedine et Duchiron Francis. Méthodes utilisées pour la purification des xylanases produites par les actinomycètes : cas d'étude des xylanases de la souche de *Jonesia denitrificans* BN13. 24<sup>ème</sup> forum international des sciences biologiques et de biotechnologie de l'ATSB, Sousse (Tunisie) : 25-28 Mars 2013.
- **Hebal Hakim**, Anbarasan Sasikala, Turunen Ossi, et Benallaoua Said. Effet de liquides ioniques superbasiques sur l'activité de l'endoxylanase de *Thermopomyspora flexuosa*. Conférence internationale sur l'agriculture et la biotechnologie. Bizerte (Tunisie) : 2-3 Novembre 2015.
- **Hebal Hakim**, Hamzaoui Fahima, Turunen Ossi and Benallaoua Said. Tow halotolerant xylanases produced by strain *Jonesia denitrificans*: partial purification and characterization. International symposium on genomics, metagenomics, plant biotechnology, environment and health. Biskra (Algeria) : 22-24 Novembre 2015.
- **Hebal Hakim**, Hamzaoui Fahima, Turunen Ossi et Benallaoua Said. Caractérisation des propriétés physicochimiques de deux xylanases partiellement purifiées de la souche *Jonesia denitrificans*. 1<sup>er</sup> séminaire international de

biologie, bioressources et sécurité des aliments. Bechar (Algérie) : 6-8 Décembre 2015.

- **Hebal Hakim**, Hamzaoui Fahima, Turunen Ossi and Benallaoua Said. Partial purification and characterization of two xylanases produced by the strain *Jonesia denitrificans*. The 1<sup>st</sup> international conference on microbial ecology: towards new challenges. Sétif (algeria): 12-14 Décembre 2015.

### Communications nationales

- **Hebal hakim**, Boucherba Nawel et Benallaoua Said. Isolement et sélection de souches productrices d'endoxyanases. 2<sup>èmes</sup> journées nationales des Sciences de la Nature et de la Vie. Béjaia (Algérie) : 07 Novembre 2012.
- Boucherba Nawel, Duchiron Francis, Copinet Estelle, **Hebal Hakim** et Benallaoua Said. La xylanase microbienne : clé pour une chimie durable. 2<sup>èmes</sup> journées nationales des Sciences de la Nature et de la Vie. Béjaia (Algérie) : 07 Novembre 2012.
- Boucherba Nawel, **Hebal Hakim** et Benallaoua Said. Isolement et sélection de souches productrices d'endoxyanases. XVIII<sup>èmes</sup> journées Nationales de Microbiologie. Tizi Ouzou (Algérie) : 26-27 Novembre 2012.

## Résumé

Les xylanases sont des glycoside hydrolases impliquées dans plusieurs industries de transformation des matières lignocellulolytiques. Dans cette étude, une souche bactérienne xylanolytique appartenant à l'espèce *Jonesia denitrificans* a été isolée d'un compost à base de fiente de volaille. La souche produit une activité xylanase de 502 UI/ml dans un milieu optimisé contenant par litre 150g xylane de hêtre, 5g extrait de malt, 5g NaCl, 30g KCl, 5g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2g MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, après 5 jours d'incubation à pH 9,5 et 30 °C. Deux xylanases, JdXYNA (130 kDa) et JdXYNB (45 kDa) y sont partiellement purifiées. Elles sont halotolérantes et montrent des activités maximales à 50°C. Le pH optimum d'activité est de 6 et 7 respectivement pour JdXYNA et JdXYNB. Les activités des deux xylanases sont également testées en présence de 11 liquides ioniques (LIs) superbasiques et comparées aux activités d'autres xylanase hyperthermostables, TfXYN10A, DtXYN11B et DtXYN11B-DS. La xylanase TfXYN10A est la meilleure enzyme tolérant les LIs à base d'acétate-propionate, suivie de JdXYNA, alors que DtXYN11B-DS est l'enzyme qui tolère le mieux les LIs à base de guaiacololate. Ces derniers désactivent complètement JdXYNA et JdXYNB. Le docking moléculaire des cations et des anions de LIs aux enzymes a permis de cerner quelques conditions liées à l'activité. En effet, un site actif plus large, une surface de liaison au substrat dans le site actif moins hydrophobe et moins d'interactions entre l'enzyme et les ions du liquide ionique semblent jouer un rôle déterminant dans la tolérance aux liquides ioniques. La liaison simultanée du cation et de l'anion dans le site actif cause une très forte inhibition compétitive.

## Abstract

Xylanases are glycoside hydrolases hydrolysing xylan and are applied in several industrial process. A bacterial strain is isolated from poultry manure and identified as member of *Jonesia denitrificans* species. The strain produces 502 UI/ml xylanase activity in optimized medium composed in liter of: 150g beechwood xylan, 5g malt extract, 5g NaCl, 30g KCl, 5g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2g MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, after 5 days incubation at pH 9,5 and 30°C. Two xylanases, JdXYNA (130 kDa) et JdXYNB (45 kDa), are partially purified from this strain. Both enzymes are halotolerant and optimally active at 50°C. The optimum pH activity is 6 for JdXYNA and 7 for JdXYNB. Activities of the two xylanases is tested in a set of 11 superbase ionic liquids (ILs) and compared to activities of hyperthermostables xylanases, TfXYN10A, DtXYN11B and DtXYN11B-DS. TfXYN10A xylanase shows the best tolerance to acetate propionate ILs, JdXYNA being the second, whereas DtXYN11B-DS is the best enzyme resisting deactivation by guaiacololate based ILs. These later deactivate completely JdXYNA and JdXYNB. Molecular docking with IL cations and anions indicated that the binding mode and shape of the active site affect competitive inhibition, and the co-binding of cations and anions to separate active site positions caused the strongest enzyme inhibition.

## ملخص

الجزيلاناز عبارة عن انزيمات محللة للسكريات تستخدم في العديد من الصناعات المحولة للمواد اللينوسيليلوزية. في هذا العمل تم عزل سلالة بكتيرية تنتمي الى نوع *Jonesia denitrificans* من روث الدواجن. السلالة تنتج 502UI/ml نشاطية جزيلاناز في وسط غذائي محسن يتكون من: 150 غ جزيلان خشب الزان، 5 غ مستخلص المالت، 5 غ NaCl، 30 غ KCl، 5 غ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>، 0.2 غ MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O بعد 5 أيام في pH 9,5 في درجة حرارة 30 درجة مئوية. تم كذلك تنقية جزئية لانزيمين من هذه البكتيريا JdXYNA (130 kDa) و JdXYNB (45 kDa). تتسم هاتين الانزيمين بنشاطية قصوى في درجة حرارة 50 درجة مئوية و بتحملها لدرجات عالية من الاملاح. تظهر JdXYNA نشاطية عالية في pH 6 و JdXYNB في pH 7. تم كذلك تجربة نشاطية هاتين الانزيمين في 11 محلول أيوني مقارنة مع نشاطية 3 جزيلاناز محبة للحرارة العالية، TfXYN10A، DtXYN11B، و DtXYN11B-DS. TfXYN10A هي أحسن إنزيم في مقاومة المحاليل الأيونية المحتوية على الأسيتات والبروبيونات، JdXYNA هي الثانية، أما DtXYN11B-DS فهي الإنزيم التي تتحمل أكثر المحاليل الأيونية المحتوية على الجيلاكولات. هذه الأخيرة تثبط نهائياً JdXYNA و JdXYNB. ال docking الجزيني لأيونات المحاليل الأيونية أسفر على أن: موقع فعال واسع للإنزيم، مساحة تثبيت أقل كراهية للماء للمادة المتفاعلة في الموقع الفعال للإنزيم و أقل ارتباط للإنزيم مع أيونات المحلول الأيوني هي أهم العوامل في تحمل الإنزيم للمحاليل الأيونية. الارتباط في نفس الوقت للكتيون و الأنيون في الموقع الفعال تسبب تثبيط تنافسي عالي للإنزيم.