

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
LABORATOIRE : de Biochimie et de Microbiologie Appliquée

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT
En Sciences
Option : Biochimie Appliquée

THEME

Caractérisation biochimique d'une pectate Lyase thermostable chez
une espèce d'actinomycète thermophile, *Actinomadura keratinilytica*
CPT20, isolée du compost de poulet (région Annaba).

Présentée par: SAOUDI Boudjema

Directeur de thèse :LADJAMA Ali Professeur, Université Badji Mokhtar - Annaba

Membres de Jury:

Président : M. CHEKIREB Djamel Professeur, Université Badji Mokhtar - Annaba
Examineurs : M. BENOURETH Djamel E Professeur, Université 8 mai 1945- Guelma
 M. BAUDIN Bruno Professeur, Université de Paris Sud- France
Invités M. GARGOURI Ali Professeur, CBS- Université de Sfax - Tunisie
 M. BELGHITH Hafedh Professeur, CBS- Université de Sfax - Tunisie

N° DBCH..... 01Décembre/2018

Année universitaire : 2018/2019

REMERCIEMENTS

Remerciant tout d'abord "ALLAH" le tout puissant et miséricordieux, de m'avoir donné la force, la patience et la volonté de réaliser ce travail.

Mes profonds remerciements vont à :

- Mon directeur de thèse Mr. LADJAMA ALI, Professeur de Biochimie à l'université d'Annaba pour avoir accepté de diriger ce travail avec compétence et une grande expérience, pour sa disponibilité, son aide et sa rigueur en matière de rédaction ainsi que pour ces précieux conseils.
- Mr. GARGOURI ALI, et Mr BELGHITH Hafedh, Professeurs du Centre de Biotechnologie de Sfax, Tunisie de leur accueil chaleureux, leurs soutiens, leurs aide scientifique et technique, ainsi pour leurs précieux conseils,
- Mr. CHEKIREB Djamel, Professeur de Microbiologie, à l'université d'Annaba, pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Je remercie également très sincèrement :

Mr. BENOURETH Djamel Eddine, Professeur de Microbiologie, de l'université de Guelma et Mr. BAUDIN Bruno Professeur de Biochimie de l'université de Paris Sud, d'avoir acceptés de juger ce travail,

Je suis très reconnaissant à: Pr KIRANE Djamila, Pr KECHRID Zine,

Pr AOUADI Saoudi, Pr SAKA Saad, Pr MESSARAH Mahfoud, Pr CHEFROUR Azzeddine, Pr MAAZI Med Cherif, Pr BRANES Zidane, Pr BOUDALAA Mokhtar, Pr BOUANANE Amel (USTHB- Alger).

Je remercie très sincèrement mon cher ami Dr JAOUADI Bassem, Maître de conférence-LMBIE-CBS, pour son accueil à Sfax, son suivi, son support, ses précieux conseils et son aide pour la publication de mon article.

J'adresse mes remerciements à: Dr Ghannam Maya, son Mari et mon cher ami Dr Boudjellab Zine Eddine et son père pour le prélèvement des échantillons ainsi pour leur contribution active dans la première partie de thèse. Merci Zino.

Un merci tout particulier à mes très chers amis : Dr Rekié Hatem, Mr Hmídi Maher pour leur accueil chaleureux, leur grande hospitalité, qui ont partagé avec moi les moments les plus difficiles, mais aussi les meilleurs et leur accompagnement durant toute la période de mon séjour à Sfax. Je remercie infiniment toute l'équipe de LBME, spécialement: Dr Triguí Héla, Dr Bensaci Azza, Dr Tounsi Hajer, Dr Borgi Ines, Dr Abdeljalil Salma pour m'avoir fait partager ses compétences et de m'initier aux techniques de biologie moléculaire.

Je remercie chaleureusement mon cher ami: Dr Ben Romdhane Zamen pour leur soutien et leur contribution dans la purification chromatographique. Un grand merci à mon cher ami: Dr Neifer Aref pour leur soutien moral. Merci Si Aref pour votre enthousiasme que je partage.

Je voudrais remercier très sincèrement : Mr Tíchatí Lazher, Mr Kerouaz Billel, Dr Habbeche Amína et Dr Haberra Soumaya, Dr Khacha Nadjette pour leur soutien et pour leur encouragement.

Mes remerciements vont également à mes chers amis: Dr Leboukh Mourad, Dr Dahdouch Faouzi, Dr Alouani Abdelwaheb, Dr Bouzid Slímane, Dr Abíd Tarek, Dr Ayari Adel, Dr Touarfia Moundji, Dr Barour Chokri, Dr Djouamaa Abdelkader, Dr Rouabhia Kamel, Dr Hmídi Abderrazak, Dr Khiari Mohamed, Dr Loucif Lotfi, Dr Abdi Saíd, Dr Sahraoui Yassine, Dr Nahal Mourad, Dr Bennour Farid, Dr Boudiaf Abdelmalek, Dr Bouleghlem Hocine, Dr Zeggar Mahdi, Dr Bendjeffal Hacem, Dr Boukachabia Mourad, Dr Saibi Walid, Dr Guerfali Mohamed, Dr Béjar Wacim, Dr Smaoui Slím, Dr Chabbi Alif, Dr Zenati Billel, Mr Mestari Abderrahman, Mr Walha Kamel...

J'adresse mes remerciements, aussi chaleureux que les précédents à tous mes collègues et staffs de LBMA-UBMA et LBME-CBS. Je remercie également tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

DEDICACES

A mes chers parents, Tout le mérite leur revient.

A la mémoire de mon frère Adel, ma sœur Nora et ma collègue

et sœur Zina Taïbi.

A ma chère femme et mon adorable fille Oumaima.

A mes frères et mes sœurs.

A toute ma famille maternelle et paternelle.

A tous mes maîtres.

A tous mes amis.

Boudjema

ملخص

يقدم هذا البحث تقريراً عن الأكتينومييسيتات المحبة للحرارة المعزولة من سماد الدجاج والمنتجة لانزيمات البكتيناز الخارج خلوية. أظهرت مختلف التجارب أن سلالة المعزولة من الأكتينومييسيتات المحبة للحرارة (من Cpt1 إلى Cpt29) مفرزة لانزيمات البكتيناز. من بين هذه السلالات المعزولة الانفة الذكر، تبين أن السلالة Cpt20 هي الأكثر نشاطاً من خلال إفرازها للبكتات لياز (Pel-20) حيث تم اختيارها لإجراء مزيد من الدراسة المعمقة. سمح التعريف الجزيئي بالاعتماد على تحليل تسلسل الحمض النووي الريبوزومي (RNAr16S) بتصنيف هذه السلالة باسم *Actinomadura keratinilytica Cpt20*. كذلك قمنا بدراسة وتحديد الظروف المثلى و وسط الزرع الأمثل لإنتاج الإنزيم Pel-20 و قد أدى ذلك للحصول على مستوى مردودية إنتاج أكثر من ثلاثة أضعاف في حدود 21101.32 وحدة دولية/مل. و قد تم تنقية الإنزيم حيث أظهرت تقنية الرحلان الكهربائي على هلامة الأكريلاميد (SDS-PAGE) أن الإنزيم المعزول هو عبارة عن جزيء وحيد البلمرة ذو كتلة مولية 34 كيلودالتون كما مكنت تقنية طيف الكتلة MALDI-TOF/MS من تحديد الوزن الجزيئي بدقة حيث تمثل في 33,12511 كيلودالتون. بين تحليل تسلسل الأحماض الأمينية من الطرف النهائي الأميني (NH₂) لانزيم البكتات لياز (Pel-20) كما يلي: (GFATNQQGGTTGGAGGTL) تجانسا كبيرا مع عائلة البكتات لياز. هذا و قد تم تحديد الخواص البيوكيميائية للإنزيم حيث كانت درجة الحموضة (pH) المثلى 10.5 ودرجة الحرارة المثلى 70 درجة مئوية. تم تثبيط الإنزيم في وجود الـ EDTA وتنشيطه بالكالسيوم (بتركيز 1 مللي مولر) و هذا ما يؤكد انتمائها لعائلة البكتات لياز (pectate lyases). تمثلت مادة التفاعل (الركيزة substrat) المفضلة لهذا الإنزيم في البكتين الضعيف الأسترة (32%). تم تحسين خصائص النشاط الحراري والاستقرار الحراري لـ Pel-20 في وجود 1 مللي مولر من الكالسيوم. كما تم تحديد زمن نصف العمر بـ 7, 12, 18 و 2 ساعة في درجات حرارة مئوية 70, 80, 90 و 100 درجة مئوية على التوالي. نستخلص من هذه الدراسة أن الخصائص القلوية ومقاومة الحرارة لـ Pel-20 تجعله مرشحا محتملا للعديد من التطبيقات في الطرائق الحيوية الصناعية في المستقبل.

الكلمات المفتاحية: الأكتينومييسيتات المحبة للحرارة، بكتات لياز، المحبة للقاعدية، التنقية.

RÉSUMÉ

Dans ce travail de recherche, nous rapportons le criblage d'actinomycètes thermophiles isolées du compost de poulet produisant des pectinases extracellulaires. Ainsi, les différentes investigations ont montré que 29 espèces (de Cpt1 à Cpt29) d'actinomycètes thermophiles secrètent des lyases. Parmi ces espèces, la Cpt20 semble être la plus active par sécrétion de pectate lyase (Pel-20), a été choisie pour une étude approfondie. L'identification moléculaire de l'ARNr16S a permis de classer cette espèce comme étant *Actinomadura keratinilytica* Cpt20. L'optimisation du milieu de production de la Pel-20 a permis d'avoir un niveau d'activité de l'ordre de 21101,32 UI/ml. Par la suite cette enzyme a été purifiée et caractérisée. La Pel-20 s'est révélé un monomère de masse molaire 34 kDa par SDS-PAGE et 33,12511 kDa par MALDI-TOF/MS. La séquence de l'extrémité NH₂-terminale de la Pel-20 (GFATNQGGTTGGAGGTLS), montre une forte homologie avec la superfamille des pectate lyases. La Pel-20 a un pH optimum de 10,5 et une température optimale de 70°C. L'enzyme est inhibée par l'EDTA et activée par le calcium à 1mM ce qui confirme son appartenance à la superfamille des pectate lyases. Le substrat préférentiel de cette enzyme est la pectine faiblement estérifiée (32%). La thermoactivité et la thermostabilité de la Pel-20 ont été améliorées en présence de 1 mM de Ca²⁺. Les durées de demi-vie à 70, 80, 90 et 100°C sont respectivement de 18, 12, 7 et 2 h. En conclusion, les propriétés d'alcaliphilie et de thermostabilité de Pel-20 ont permis de dire que cette enzyme est un candidat potentiel pour des applications futures dans les bioprocédés industriels.

Mots-clés: Actinomycètes thermophiles; Pectate lyase; Alcalophile; Purification.

SUMMARY

In this research work, we report the screening of thermophilic actinomycetes isolated from poultry compost, producing extracellular pectinases. Indeed, various investigations showed that 29 of thermophilic actinomycetes species (from Cpt1 to Cpt29) secrete lyases. Among these species, the Cpt20 appears to be highly active species in pectate lyase secretion (Pel-20), and hence this species has been chosen for a detailed study. The molecular identification based on the 16S rRNA sequence promotes to classify this species as *Actinomadura keratinilytica* Cpt20. The optimization of the production medium of Pel-20 is in the order of 21101.32 IU/ml, leading then to purify and to characterize this enzyme. SDS-PAGE and MALDI-TOF/MS methods proved respectively that the molar mass of monomer (Pel-20) is 34 kDa and 33.12511 kDa. The NH₂-terminal sequence of Pel-20 (GFATNQGGTTGGAGGTLS) shows a strong homology along with the pectate lyases super-family. Pel-20 has an optimum pH of 10.5 and an optimum temperature of 70 °C. The enzyme is inhibited by EDTA and activated by 1mM calcium, confirming therefore its belonging to the super-family of pectate lyases. The preferred substrate of this enzyme is low esterified pectin (32%). The thermo-activity and thermo-stability of Pel-20 were enhanced by 1mM Ca⁺². The half-life times at 70, 80, 90 and 100 °C are, respectively, 18, 12, 7 and 2h. Conclusively, the alkaliphilicity and thermostability properties of the Pel-20 prove that this enzyme is a potential candidate for future applications in industrial bioprocesses.

Keywords: Thermophilic Actinomycetes; Pectate lyase; Alkalophilic; Purification.

SOMMAIRE

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1

PARTIE THEORIQUE

Chapitre 1 : Les enzymes pectinolytiques et leurs substrats pectiques

I.1. Les substances pectiques ou la pectine.....	5
I.1.1. Localisation de la pectine.....	5
I.1.2. Structure moléculaire des pectines.....	7
I.1.2.1. Homogalacturonane.....	8
I.1.2.2. Rhamnogalacturonane type I (RG-1)	9
I.1.2.3. Rhamnogalacturonane type II (RG-II)	10
I.1.3. Applications et intérêts industriels des substances pectiques.....	12
I.2. Les enzymes pectinolytiques.....	13
I.2.1. Les dépolymérases.....	15
I.2.1.1. Les polygalacturonases (PGase)	15
I.2.1.2. Les lyases ou transéliminases.....	16
I.2.2. Les pectinestérases (PE) ou pectine-méthylestérases (PME)	18
I.2.3. Autres enzymes intervenant dans la dégradation des substances pectiques	19
I.2.3.1 Les rhamnogalacturonases.	19
I.2.3.2 Les arabinanases.	19
I.2.3.3 Les galactanases.....	20
I.2.4. Structure tridimensionnelle des pectinases.....	21
I.2.5. Régulation génétique de la production des pectinases.....	23
I.2.6. Applications des enzymes pectinolytiques.....	24
I.2.6.1. Applications des pectinases acides dans l'industrie des boissons.....	24
I.2.6.1.1. Quelques applications des pectinases dans la fabrication des jus de fruits.....	24
I.2.6.2. Applications des pectinases basiques dans l'industrie	27
I.2.6.2.1. Rôle des pectinases basiques dans l'industrie de textile.....	27
I.2.6.2.2 Rôle des pectinases dans l'extraction des huiles.....	28

I.2.6.2.3. Fermentation du thé et du café.....	28
I.2.6.2.4. Autre intérêts biotechnologiques des enzymes pectinolytiques.....	28
Chapitre 2 : Les actinomycètes et leurs intérêts biotechnologiques	
II.1.Généralités sur les actinomycètes.....	29
II.2.Classification Moléculaire des actinomycètes.....	31
II.3. Les actinomycètes en tant que sources de produits naturels.....	35
II.4. Les actinomycètes en tant que sources d'enzymes.....	37
II.5. Les actinomycètes thermophiles producteurs de pectinases.....	39
PARTIE EXPERIMENTALE	
III. Matériel et méthodes	
III.1 Echantillonnage et isolement des espèces d'actinomycètes thermophiles	45
III.1.1 Prélèvement des échantillons	45
III.1.2. Prétraitement des échantillons	46
III.1.3. Isolement des espèces d'actinomycètes autochtones	47
III.1.3.1. Milieu de dilution	47
III.1.3.2. Milieux et conditions d'isolement	47
III.1.3.3. Purification des espèces	48
III.1.4. Conservation des isolats	48
III.1.4.1. Conservation par repiquage sur gélose incliné.....	48
III.1.4.2. Conservation des spores par congélation dans le glycérol	49
III.1.4.3. Conservation des espèces par la méthode de stabilisation sur terre.....	49
III.5. Identification taxonomique de l'espèce d'actinomycète sélectionnée.....	49
III.5.1. Études morphologiques et observation microscopique.....	49
III.5.1.1. Critères micro-morphologiques	50
III.5.2. Identification biochimique	52
III.5.2.1. Réduction du nitrate.....	52
III.5.2.2. Recherche de la catalase.....	52
III.5.2.3. Système de galeries API 20E	52
III. 3. Critères physiologiques	54
III. 3. 1. Production des pigments mélanoides.....	54
III. 3.3. Test du pH	54
III. 3.4. Test de la tolérance au NaCl	54

III.4. Identification moléculaire et analyse phylogénétique de l'espèce sélectionnée	54
III.4.1. Extraction de l'ADN génomique de l'espèce sélectionnée.....	55
III.4.2. Analyse de l'ADNg par électrophorèse sur gel d'agarose.....	55
III.4.3. Dosage de l'ADN	55
III.4.4. Amplification génique du fragment d'ADN de l'ARNr 16S par la technique PCR	56
III.4.5. Préparation de l'ADN plasmidique (ADNp)	56
III.4.6. Clonage du fragment d'ADN de l'ARNr 16S chez <i>E .coli</i>	56
III.4.7. Séquençage automatique de l'ADNp contenant le fragment	57
III.4.8. Identification par alignement et analyse phylogénétique des séquences nucléotidiques avec les banques de données	57
III.5. Recherche de l'activité pectinolytique	58
III.5.1. Mise en évidence de l'activité pectinolytique en milieu liquide.....	58
III.5.2. Mise en évidence de l'activité pectinolytique en milieu solide.....	58
III.5.3. Méthodes analytiques de détection des activités pectinolytiques	59
III.5.3.1. Recherche du pouvoir réducteur par la méthode de Nelson-Somogyi.....	60
III.5.3.2. Recherche des lyases et/ou polygalacturonases par le test TBA.....	60
III.5.3.3. Recherche des lyases en UV à 232nm	61
III.5.3.4. Dosage des protéines par la méthode de Bradford	61
III.5.3.5. Détermination des activités spécifiques.....	62
III.6. Choix de la source de carbone et d'azote pour la production de l'enzyme..	63
III.6.1. Optimisation du temps de culture	63
III.6.2. Choix de la source de carbone.....	63
III.6.3. Choix de la source d'azote.....	63
III.7. Mise au point d'un protocole de purification de l'enzyme	64
III.7.1. Chromatographie sur colonne mono-Q (FPLC : <i>Fast Performance Liquid Chromatorgraphy</i>)	64
III.7.2. Chromatographie par filtration sur gel (HPLC : <i>High Performance Liquid Chromatorgraphy</i>)	64
III.7.3. Détermination de la masse moléculaire relative (Mr) de l'enzyme par électrophorèse en condition dénaturante (PAGE-SDS)	65

III.7.4. Détection de l'activité pectinolytique par la méthode de Zymogramme....	65
III.7.5. Détermination de la séquence de l'extrémité NH ₂ -terminale de l'enzyme.....	66
III.7.6. Détermination du poids moléculaire de l'enzyme par spectrométrie de masse (MALDI-TOF/MS)	66
III.8. Propriétés et caractérisation physicochimiques de l'enzyme purifiée	66
III.8.1. pH optimum d'action de l'enzyme	66
III.8.2. Effet du pH sur la stabilité de l'enzyme	66
III.8.3. Température optimale d'action de l'enzyme.....	67
III.8.4. Effet de la température sur la stabilité de l'enzyme.....	67
III.8.5. Effet des ions métalliques.....	67
III.8.6. Spécificité de l'enzyme vis-à-vis de substrats à différents degrés d'estérification	67
III.8.7. Analyse statistique.....	68

IV. Résultats et discussions

Partie 01 : Mise en évidence et criblage de l'activité pectinolytique.

IV.1.1. Espèces isolées du compost de poulet	69
IV.1.2. Criblage de l'activité pectinolytique des espèces d'actinomycète isolées	69
IV.1.3. Nature de l'enzyme secrétée	71
IV.1.4. Identification moléculaire de la Cpt20 et phylogénie	75
IV.1.4.1. Identification moléculaire de la Cpt20.....	75
IV.1.4.2. Analyse phylogénétique.....	79

Partie 02 : Optimisation de la production des pectate lyases.

IV.2.1 Optimisation du temps de culture.....	82
IV.2.2. Choix de la source de carbone et d'azote pour la production des pectate lyases.....	83
IV-2-3 Répression catabolique par le glucose.....	85

Partie 03 : Purification de la pectate lyase de la Cpt20.

IV-3-1 Purification de l'enzyme	88
IV.3.2. Détermination de la masse molaire par SDS-PAGE et MALDI-TOF/MS	90
IV.3.3. Détection de l'activité pectate lyase par zymogramme	92
IV.3.4. Séquençage de l'extrémité NH ₂ -terminale de la Pel-20.....	93

Partie 04 : Caractérisation biochimique de l'enzyme Pel-20.

IV.4.1. pH optimum d'action de l'enzyme.....	95
IV.4.2. Température optimale d'action de l'enzyme.....	96
IV.4.3. Etude de la thermostabilité de l'enzyme	97
IV.4.4. Etude de la stabilité au pH	99
IV.4.5. Spécificité de l'enzyme vis-à-vis de substrats à différents degrés d'estérification.....	100
IV.4.6. Effet des ions métalliques.....	101
IV.4.7. Détermination de la concentration optimale de calcium.....	103
Conclusion et perspectives.....	106
Références bibliographiques.....	110
Annexes I.....	126
Annexes II.....	135
Annexes III.....	140
Annexes IV.....	151

Liste des abréviations

AS :	Activité Spécifique
AG :	Acide Galacturonique
APS :	<i>Ammonium Persulfate</i>
BBC:	Bleu Brillant de Comassie
CCM:	Chromatographie sur Couche Mince
CTAB:	<i>Hexadecyl Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide</i>
DM:	Degrés de Méthylation
EDTA:	Ethylène Diamine Tetra-Acétique
HG:	HomoGalacturonane
HM:	Hautement Méthylé
kb:	Kilo base
MALDI - TOF/MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time Of Flight /Mass Spectrometry</i>
pb:	Pair de Base
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDA:	<i>Potato Dextrose Agar</i>
PGA :	Acide PolyGalacturonique
PGases :	PolyGalacturonases
PE:	Pectine Estérases
pH:	Potentiel d'Hydrogène
PME:	Pectine Méthyle Estérase
q.s.p:	Quantité Suffisante Pour
RG:	RhamnoGalacturonane
rpm:	Rotation Par Minute
SAB:	Sérum Albumine Bovine
SDS:	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
TBA:	Acide Thio-Barbiturique

Liste des figures

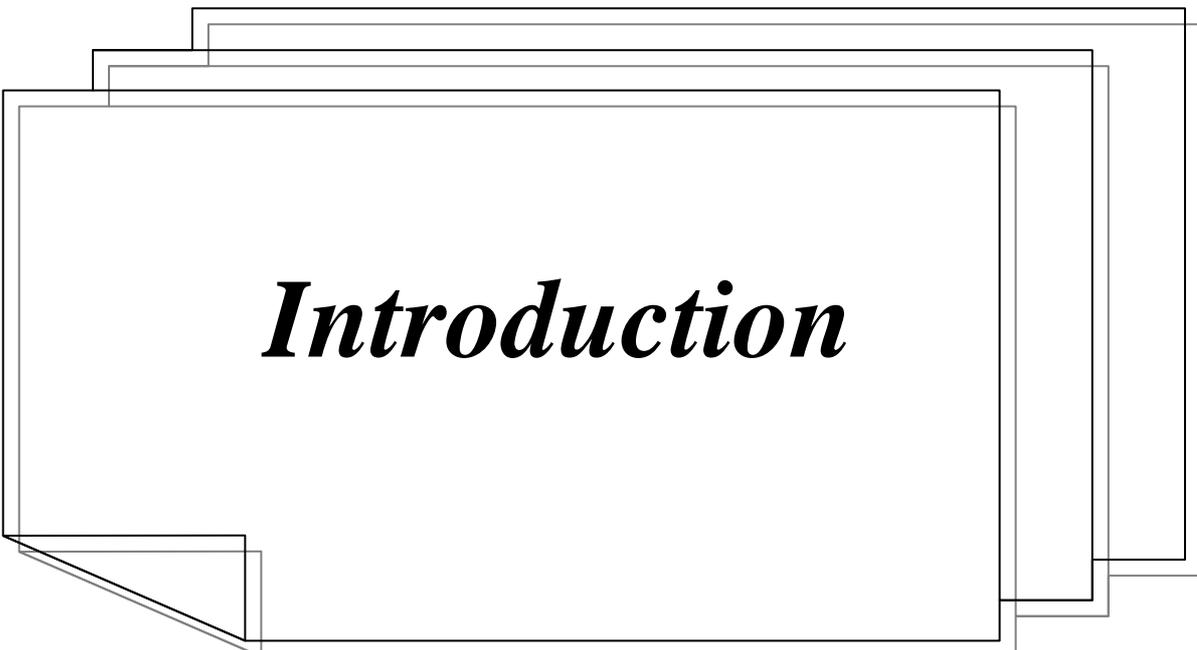
Figure	Titre	Page
1	Structure de la paroi végétale	05
2	Représentation Schématique de la pectine et ses éléments structurels	08
3	Structure primaire d'un homogalacturonane	09
4	Structure d'un rhamnogalacturonane I	10
5	Structure primaire du rhamnogalacturonane II avec quatre chaînes latérales de structure différente (A-D)	11
6	Mode d'action des pectinases	14
7	Mécanisme de β élimination par les lyases	17
8	Structure tridimensionnelle de cinq exemples d'enzymes pectinolytiques ayant le motif d'«hélice β » («parallel-beta- helix»)	21
9	Structure tridimensionnelle de pectate lyase C (PelC)	22
10	Vue stéréoscopique du site actif du complexe PelC R218K- $(Ca^{+2})_4$ -pentaGalpA	22
11	Jus d'orange clarifié	25
12	Rouissage du chanvre (<i>Crotolaria juncea</i>) sous l'action d'une pectin lyase de l'espèce <i>Aspergillus flavus</i> MTCC 7589	27
13	Représentation schématique du cycle de vie des actinomycètes sporulant.	30
14	Dendrogramme phylogénétique des Actinobacteria, basée sur les séquences du gène codant d'ARNr 16S	33
15	Arbre phylogénétique basé sur 97 séquences du génome du phylum <i>Actinobacteria</i>	35
16	Applications potentielles des actinomycètes industrielles	36
17	Localisation des sites de prélèvement par Google Earth	46
18	Aspect morphologique de l'espèce d'actinomycète Cpt20 sur milieu ISP2	71
19	Mise en évidence de l'activité pectinolytique sur milieu solide d'Horikoshi	71
20	Test spécifique à l'acide thiobarbiturique (TBA)	73
21	Electrophorèse sur gel d'agarose à 0,7% en tampon TAE et pH8 de L'ADNg de l'espèce d'actinomycètes thermophile Cpt 20.	75
22	Analyse du produit PCR par électrophorèse sur gel d'agarose de l'amplification du fragment de gène codant pour l'ARNr 16S de l'espèce Cpt20.	76

Liste des figures (Suite)

Figure	Titre	Page
23	Nouvelle carte de restriction de plasmide pAL-16S	76
24	Séquence nucléotidique du fragment de gène de l'ARNr 16S (1511 pb) de l'espèce Cpt20.	78
25	Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences d'ARNr 16S et montrant la position taxonomique de l'espèce Cpt20 par rapport aux autres espèces types des espèces du genre <i>Actinomadura</i> .	80
26	Temps de culture de l'espèce <i>A. keratinilytica</i> strain Cpt20	82
27	Effet de la source de carbone et d'azote sur la production de l'activité pectate lyase par l'espèce Cpt20.	84
28	Chromatographie sur colonne monoQ (FPLC)	88
29	Chromatographie sur colonne gel filtration OH40 (HPLC)	89
30	Chromatographie sur colonne gel filtration OH40 par HPLC (réinjection et contrôle de la pureté)	89
31	SDS-PAGE (10%) de la pectate lyase (Pel-20) purifiée	91
32	Spectre MALDI-TOF de la pectate lyase (Pel-20) purifiée (20 pmol) de l'espèce <i>Actinomadura</i> sp. strain Cpt20.	91
33	Electrophorèse et Zymogramme sur gel natif à 10% de la pectate lyase (Pel-20) purifiée.	92
34	pH optimum d'action de l'enzyme (Pel-20)	95
35	Température optimale d'action de l'enzyme (Pel-20)	96
36	Etude de la thermostabilité de l'enzyme (Pel-20)	98
37	Etude de la stabilité de la Pel-20 au pH	99
38	Spécificité de l'enzyme vis-à-vis de substrats à différents degrés d'estérification de l'enzyme (Pel-20).	100
39	Concentration optimale de calcium d'action de l'enzyme (Pel-20)	103
40	Mode opératoire de la galerie API 20 E	133
41	Carte de restriction du vecteur de séquence <i>pGEM-T Easy</i> .	139
42	Courbe d'étalonnage de l'acide galacturonique.	141
43	Courbe d'étalonnage de la SAB.	142
44	Dégradation chimique d'EDMAN automatisée sur microséquenceur de protéines.	148
45	Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse.	150
46	Résultats des tests morphologiques physiologiques et biochimiques de l'espèce Cpt20.	153
47	Aspect macroscopique de quelques colonies de l'espèce Cpt20 non sporulé sur milieu ISP2 sous binoculaire.	154
48	Aspect morphologique macroscopique de quelques colonies de l'espèce Cpt20 sporulées sur milieu ISP3 sous binoculaire.	154
49	Aspect microscopique de l'espèce Cpt20 après examen de la coloration de Gram (X100).	155

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Teneurs en substances pectiques de quelques végétaux	06
2	Classification des pectinases	15
3	Classification des lyases	17
4	Enzymes commercialement pertinentes produites par les actinomycètes et leurs utilisations potentielles	38
5	Origine et caractéristiques de quelques pectinases thermostables chez les microorganismes thermophiles	41
6	Différents types de prétraitements chimiques et physiques et les milieux d'isolements	47
7	Les séquences des différents oligonucléotides utilisés dans cette étude pour l'amplification du fragment de gène de l'ARNr 16S de l'espèce sélectionnée.	57
8	Mise en évidence des pectinases chez les espèces d'actinomycètes thermophiles.	70
9	Activité lyases de la Cpt20 par test UV à 232 nm en présence de pectate (APG) comme substrat.	72
10	Effet de l'EDTA sur l'activité enzymatique	73
11	Résultat de l'alignement du fragment de gène de l'ARNr 16S de l'espèce Cpt20 avec la banque de NCBI.	78
12	Bilan de la purification de l'enzyme (Pel-20)	90
13	Séquence NH ₂ -terminale de Pel-20 provenant de l'espèce Cpt20 et comparaison avec les séquences NH ₂ -terminales d'autres pectate lyases putatives des actinomycètes.	93
14	Effet des ions métalliques sur l'enzyme (Pel-20).	102
15	Tableau de lecture du système API 20 E	134
16	Gamme d'étalonnage du galacturonate	141
17	Gamme d'étalonnage du sérum albumine bovine (BSA)	142
18	Composition du gel de polyacrylamide 10%.	145
19	Résultat de l'étude morphologique et tests biochimiques des cinq espèces sélectionnées.	151



Introduction

INTRODUCTION

Les enzymes microbiennes sont couramment utilisées dans de nombreux secteurs industriels pour la mise au point de processus respectueux de l'environnement. Les enzymes thermostables ou résistantes aux pH extrêmes ou aux solvants organiques et à activité accrues sont très recherchées dans l'industrie, étant donné les conditions de transformation utilisées (température et pH élevées). La recherche visant le remplacement de certains procédés chimiques classiques polluants par des procédés biotechnologiques dans lesquels les microorganismes et les enzymes offrent non seulement une solution économique viable mais aussi une alternative non polluante et sans risque pour l'environnement est un domaine en plein essor (**Sharma et al., 2013 ; Garg et al., 2016**). Ces recherches visent également à augmenter aussi bien le niveau d'activité que la stabilité des enzymes libres ou immobilisées. Ainsi, une thermostabilité et une activité catalytique élevée sont des caractéristiques importantes car elles augmentent le taux d'activité et la durée de conservation de l'enzyme, tout en diminuant la consommation d'énergie et les coûts requis pour transformer les substrats. Par ailleurs, l'amélioration de l'activité enzymatique permet de transformer un plus grand volume de substrat qui est un souci majeur pour les applications industrielles.

Au niveau de l'intérêt industriel et agro-alimentaire, il existe une réelle demande d'enzymes d'origines microbiennes telles que les pectinases, les xylanases, les cellulases, les protéases, les lipases et bien d'autres enzymes. Ainsi, les premières préparations enzymatiques de pectinases les plus connues et les plus utilisées proviennent essentiellement de l'espèce *Aspergillus niger* (**Abdulrachman et al., 2017**). En effet, les premières applications remontent aux années 1930 lorsque la société Röhm et Haas lancent sur le marché la « Pectinol K » pour la clarification du jus de pomme trouble (**Charnock et al., 2005**). De même que les préparations de pectinases peuvent être associées aux xylanases et aux cellulases et cela dans la filière viticole.

Les pectinases qui font l'objet de notre travail de thèse, sont une famille d'enzymes qui présentent un grand potentiel pour diverses utilisations industrielles, du fait qu'elles sont capables de dégrader les pectines, un polysaccharide trouvé dans les tissus de la plupart des végétaux. En effet, les pectinases sont un groupe hétérogène d'enzymes composé de: pectine estérases PE (EC 3.1.1.11), polygalacturonases PG (EC 3.2.1.15); et lyases ou trans-éliminases avec deux groupes: pectine-lyase, PNL (EC 4.2.2.10) et pectate-lyase, PL (EC 4.2.2.2) (**Yadav et al., 2009**). Ces enzymes (pectinases) sont très répandues

dans la nature et sont produites par les bactéries, les champignons filamenteux, les végétaux et les animaux (**Sharma et al., 2013**).

Par ailleurs et actuellement, les microorganismes extrêmophiles constituent une source d'enzymes supérieure aux biocatalyseurs traditionnels par leurs propriétés uniques: thermostables, thermoactives, actives en présence des solvants organiques, résistantes aux agents protéolytiques et aux valeurs extrêmes du pH (**Siddiqui., 2015**). C'est le cas par exemple des enzymes pectinolytiques thermostables d'origine microbiennes qui ont attiré l'attention des biotechnologues dans le monde entier comme étant des catalyseurs biologiques susceptibles de les utiliser dans des procédés industriels (**Rebello et al., 2017**). Diverses espèces sont connues dans la production de pectinases et c'est le cas des champignons tels que *Penicillium* (**Damak et al., 2011 ; Amin et al., 2017**) et *Aspergillus* (**Abdulrachman et al., 2017**) et des bactéries telles que *Bacillus* (**Zhou et al., 2017**) et *Paenibacillus* (**Li et al., 2014**) et les actinomycètes comme l'espèce *Streptomyces halstedii* ATCC10897, produisant une polygalacturonase alcaline et thermostable (**Tapias et al., 2015**).

Dans ce contexte global, nous signalons que le marché mondial des enzymes est en nette progression essentiellement du fait de l'intérêt que portent ces dernières à l'environnement et aux industries dites propres. Ainsi selon le groupe américain *Freedonia*, le marché global des enzymes industrielles (*global industrial enzyme*, janvier 2018) est estimé pour l'année 2021 à une valeur de 4,1 Milliards de Dollars (<http://www.freedoniagroup.com/>). Les hydrolases à elles seules occupent un marché d'environ les deux tiers du marché mondial de ventes d'enzymes industrielles (**Kashyap et al., 2001**), les carbohydrate hydrolases ou les glycosyl hydrolase (GH), y compris les pectinases viennent en deuxième position (**Khan et al., 2013; Priya and Sashi., 2014**). Dans le cas des pectinases microbiennes, le marché est estimé à 25 % des ventes mondiales commercialisés dans l'agro-alimentaire (**Sharma et al., 2013**).

Par ailleurs, grâce aux progrès de la biologie moléculaires, en particulier le clonage et l'expression hétérologue, l'emploi des enzymes connaît un succès remarquable et entrouvre des perspectives étonnantes comme la production des biodiesels (**Batista-García et al., 2016**). Ainsi, des approches de génie génétique ont permis de créer des variants appropriés avec un niveau de production d'enzymes très élevé. Ainsi, des pectinases recombinantes ont été obtenues avec succès (**Evangelista et al., 2014; Habrylo et al., 2018**). Récemment, une étude à l'échelle méta-génomique couplée à la technique classique d'enrichissement en culture (criblage) ouvre des perspectives de l'utilisation de ces enzymes à grande échelle (**Antunes et al., 2016; Lemos et al., 2017**).

En Algérie, malgré l'importance des enzymes pectinolytiques, peu de travaux de recherche sont mentionnés. A notre connaissance, nous citons à titre d'exemple les travaux de recherche sur les bactéries lactiques : *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc* (**Karam et Belarbi., 1995, 1997**) et notamment du lait cru de vache (**Bekhouche., 2006**). Nous signalons également d'autres travaux sur les polygalacturonases des champignons (**Fenghour et al., 1998; 2002; Taibi et al., 1999, 2002**) et chez les actinomycètes du genre *Streptomyces* (**Ladjama et al., 1991**).

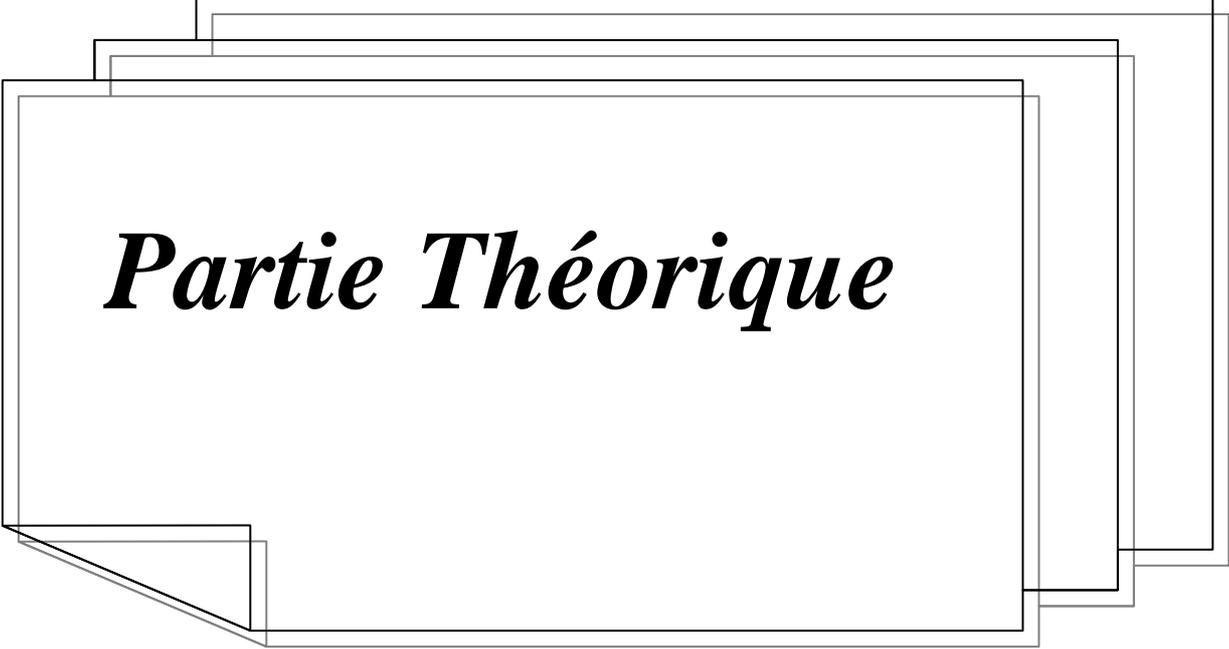
Ces différents centres d'intérêts nous ont donc encouragés à traiter cette thématique de recherche. En effet, ces dernières années, au niveau de notre laboratoire de biochimie et de microbiologie appliquée (LBMA), deux espèces d'actinomycètes thermophiles isolées du compost de poulet appartenant au genre *Actinomadura* ont fait l'objet de travaux de recherche très intéressants. Ainsi, ces espèces produisent différentes hydrolases et c'est le cas des xylanases (**Taibi et al., 2012; Habbera et al., 2013**), des protéases en l'occurrence des kératinases (**Habbeche et al., 2013, 2014**) et enfin ces espèces produisent des amylases et des lipases très actives (travaux de thèse en cours). A travers cette démarche scientifique, nous nous sommes intéressés à rechercher d'autres enzymes, en l'occurrence les pectinases (polygalacturonases ou lyases) qui sont d'une importance capitale pour compléter nos travaux antérieurs.

Ce travail de thèse a été effectué principalement au laboratoire de Biochimie et de Microbiologie Appliquée (LBMA, Algérie) sous l'encadrement du Pr Ali LADJAMA, en collaboration avec le laboratoire de Biotechnologie Moléculaire des Eucaryotes (LBME) domicilié au Centre de Biotechnologie de Sfax (Tunisie) sous l'encadrement du Pr Hafeth BELGHITH et la responsabilité du directeur du laboratoire le professeur Ali GARGOURI. En outre, ce travail de recherche est intégré dans un projet de recherche bilatéral (Algéro-Tunisien) et un projet national de recherche PNR.

Cette thèse s'articule autour des points suivants:

- **Partie 1:** Données bibliographiques qui cadrent le travail de recherche.
- **Partie 2:** partie expérimentale se présentant comme suit:
 - ❖ Recherche et isolement des espèces d'actinomycètes thermophiles à partir du compost de poulet.
 - ❖ Criblage et mise en évidence des activités pectinolytiques des espèces isolées et identification phénotypique et moléculaire de l'espèce la plus active.

- ❖ Effet des conditions de culture sur la production de l'enzyme.
- ❖ Mise au point d'un protocole de purification de l'enzyme détectée.
- ❖ Propriétés et caractérisation biochimiques de l'enzyme purifiée.
- ❖ Conclusion et perspectives.



Partie Théorique



Chapitre I

I. Les enzymes pectinolytiques et leurs substrats pectiques

I.1. Les substances pectiques ou la pectine

La pectine est probablement le polysaccharide le plus complexe dans la nature du point de vue structure chimique et biosynthèse. Les substances pectiques forment un groupe de polysaccharides très hétérogène en composition et en poids moléculaire. La pectine peut être présentée comme un polymère hétéro-polysaccharidique composé de plus de 17 mono-saccharides différents engageant plus d'une vingtaine de liaisons osidiques différentes (Voragen *et al.*, 2009 ; Bonnin *et al.*, 2014).

I.1.1. Localisation de la pectine

La pectine est localisée dans la lamelle moyenne et la paroi primaire des cellules végétales (Carpita et Gibeaut., 1993). La paroi végétale est une structure extracellulaire organisée et complexe, semi rigide et dynamique qui enveloppe la membrane cytoplasmique des cellules végétales (Figure 01). Parmi des nombreuses fonctions, elle joue un rôle essentiel dans les propriétés mécaniques des organes, participe à la croissance des tissus et assure un rôle de barrière qui permet aux cellules de résister à la pression osmotique et aux attaques des pathogènes. Elle est composée majoritairement de lignocelluloses, un assemblage complexe de cellulose, lignines, hémicelluloses et de la pectine à des proportions variables selon l'espèce (Albersheim *et al.*, 1996 ; Voragen *et al.*, 2013).

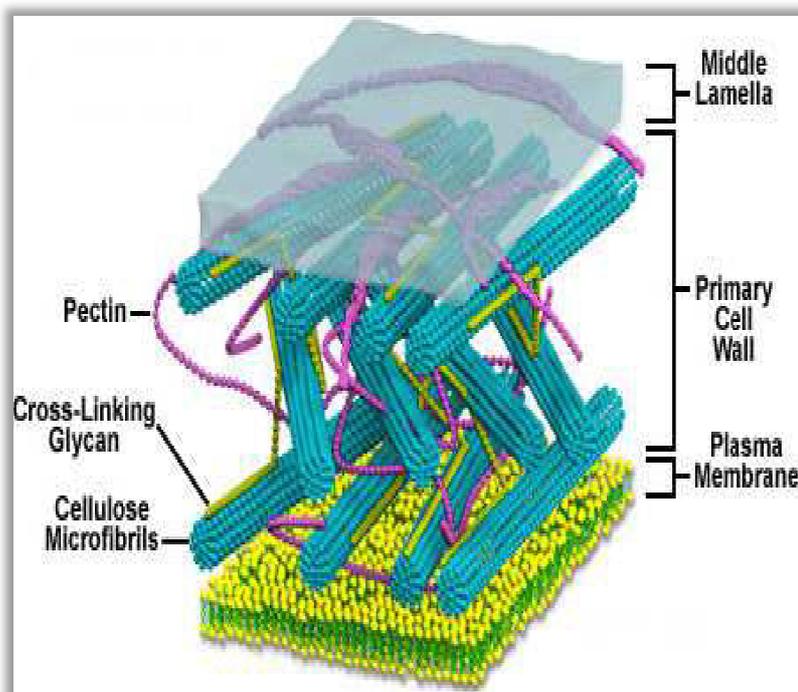


Figure 01 : Structure de la paroi végétale (Gaberiel., 2005).

Des études immunologiques ont été réalisées pour déterminer la localisation et la distribution des polymères pectiques dans la paroi primaire des cellules végétales (Knox, 1997). Les chaînes d'homo-galacturonanes non estérifiées sont localisées dans la lamelle moyenne tandis que celles qui sont estérifiées sont localisées dans la paroi (Ridley et al., 2001). Les chaînes d'arabinane sont présentes généralement dans la paroi des cellules en division, tandis que les chaînes de galactanes se trouvent enfermées dans la membrane plasmique des cellules en expansion.

Les pectines sont abondantes dans les fruits et les légumes (Tableau 01) et évoluent avec la maturation des tissus. Bien qu'elles puissent être extraites d'un grand nombre de végétaux, les principales sources industrielles de pectines sont les marcs de pomme et les écorces de citron et d'orange. Les pectines représentent environ 0,5 à 4 % du poids frais du matériel végétal (Kashyap et al., 2001), avec une masse moléculaire variant de 10 à 400 kDa suivant leur origine (Sakai et al., 1993).

Tableau 01 : Teneurs en substances pectiques de quelques végétaux (Thakur et al., 1997).

Fruit	Teneur en substances pectiques*
Pomme (<i>Malus spp.</i>)	0,5-1,6
Marc de pomme	1,5-2,5
Banane (<i>Musa acuminata</i>)	0,7-1,2
Pulpe de betterave (<i>Beta vulgaris</i>)	1,0
Carambole (<i>Averrhoa carambola</i>)	0,66
Carotte (<i>Daucus carota</i>)	0,2-0,5
Goyave (<i>Psidium guajava</i>)	0,77-0,99
Pulpe de citron (<i>Citrus lemon</i>)	2,5-4,0
Litchi (<i>Litchi chinesis</i>)	0,42
Mangue (<i>Mangifera indica</i>)	0,26-0,42
Zeste d'orange (<i>Citrus sinesis</i>)	3,5-5,5
Papaye (<i>Carcia papaya</i>)	0,66-1,0
Fruit de la passion (<i>Passiflora edulis</i>)	0,5
Péricarpe du fruit de la passion	2,1-3,0
Pêche (<i>Prunus persica</i>)	0,1-0,9
Ananas (<i>Ananas comosus</i>)	0,04-0,13
Fraise (<i>Fragaria ananassa</i>)	0,6-0,7
Tamarin (<i>Tamarindus indica</i>)	1,71
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	0,2-0,6

* pourcentage (%) du poids frais

Les pectines présentent des propriétés physico-chimiques spécifiques du fait de leur caractère poly-électrolyte. Ce caractère leur confère la capacité de s'associer entre elles et de former des gels en présence de cations divalents tels que le calcium (**Fang et al., 2008**). Généralement, les pectines sont caractérisées par leur degré de méthylation (DM) défini comme étant le pourcentage de groupements carboxyles estérifiés par le méthanol (**Levigne et al., 2002**).

Contrairement à l'acétylestérification, la méthylestérification est en proportion considérable dans les pectines natives (**Tho et al., 2006**). Ainsi, en fonction du DM, on distingue :

- Les pectines hautement méthylées (**HM**) : dont le degré d'estérification est supérieur à 50%,
- Les pectines faiblement méthylées (**LM**) : dont le degré d'estérification est inférieur à 50 %.

Le DM est un paramètre important qui influe sur le processus et le mécanisme d'association des pectines dans la formation des gels. Les pectines HM forment des gels en présence de sucres neutres ou en milieu acide, alors que les LM forment des gels en présence de calcium. Mis à part le DM, le pH, la concentration en sucre ou acide, la présence de chaînes latérales, le degré de polymérisation (DP) et la température jouent également un rôle important dans la formation d'un gel (**Capel et al., 2006 ; Guillotin et al., 2007**). Ces propriétés font que les pectines sont d'une importance considérable pour les industries alimentaires, pharmaceutiques, biotechnologiques et les industries de traitement de polluants (**Willats et al., 2006 ; Fang et al., 2008**).

I.1.2. Structure moléculaire des pectines

Les pectines sont des hétéro-polysaccharides caractérisés par une forte teneur en acide galacturonique (GalA), monomères liés entre eux par des liaisons α -(1-4) et partiellement acétylés ou estérifiés par des groupements méthyles. Elles sont ramifiées par différents polysaccharides: les homogalacturonanes, les xylogalacturonanes, les arabinanes, les rhamnogalacturonanes, les galactanes et les arabinogalactanes.

Cette association permet de décrire les pectines comme étant constituées essentiellement de trois domaines distincts, à savoir un domaine linéaire (l'homogalacturonane) qui forme la zone lisse des pectines ou «*smooth region*» et deux régions ramifiées (les rhamnogalacturonanes I et II ou RG-I et RG-II), qui forment la zone hérissée des pectines ou «*Hairy region*» (**Pedrolli et al., 2009**) (**Figure 02**).

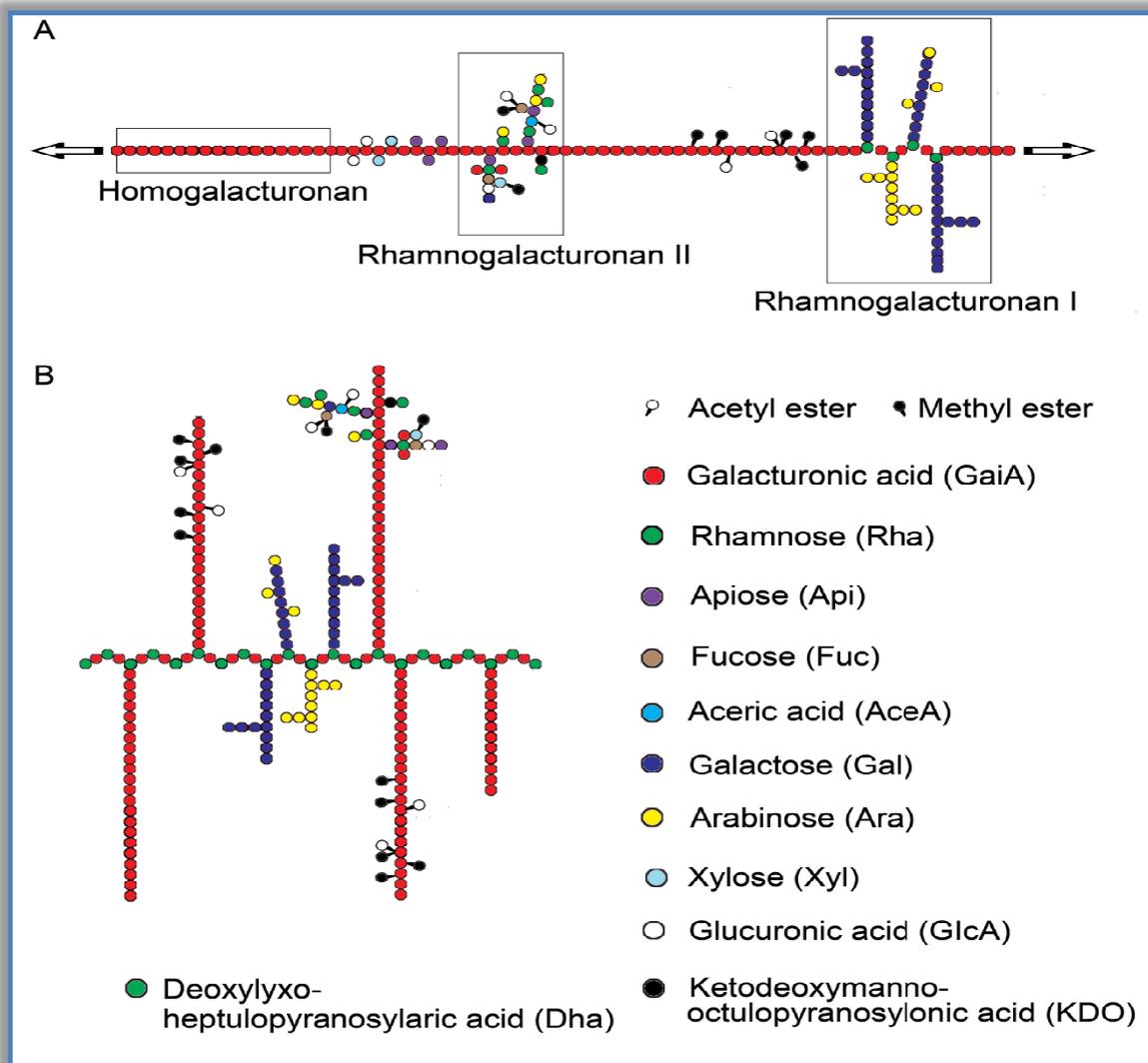


Figure 02 : Représentation Schématique de la pectine et ses éléments structurels (Pedrolli et al., 2009).

I.1.2.1. Homogalacturonane

Les homogalacturonanes (**Figure 03**) représentent 57 à 69 % de la pectine (**Jackson et al., 2007**). Ce sont des polymères linéaires constitués uniquement d'acides D-galacturoniques reliés entre eux par des liaisons α -(1-4) et dont les fonctions carboxyliques et alcools peuvent être estérifiées respectivement par du méthanol en position C6 et par l'acide acétique en position C2 ou C3. Elles forment la zone lisse des pectines ou « *smooth region* ».

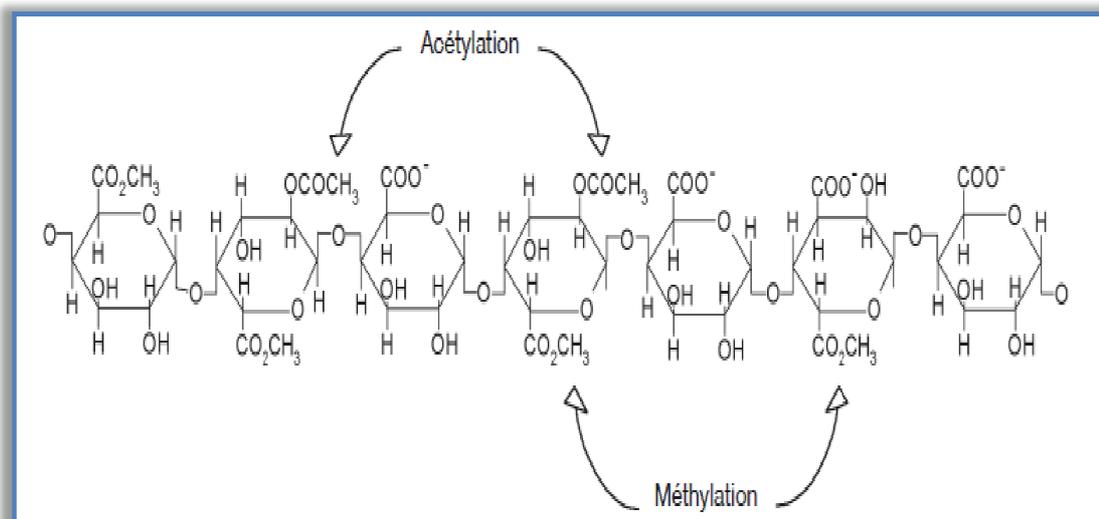


Figure 03 : Structure primaire d'un homogalacturonane (Combo et al., 2011).

La méthyl-estérification des régions homogalacturonanes détermine dans une large mesure l'application industrielle des pectines et leur capacité d'interaction (Ralet et al., 2005). En effet, de nombreuses propriétés et fonctions biologiques des pectines sont déterminées par une interaction ionique entre les régions homogalacturonanes (Ridley et al., 2001).

I.1.2.2. Rhamnogalacturonane de type I (RG-1)

Le RG-I est une famille de polysaccharides pectiques qui représente 7 à 14 % de la pectine dont environ 20 à 80 % des rhamnosés du RG-I sont substitués (Ridley et al., 2001 ; Jackson et al., 2007). Le RG-I a un degré de polymérisation (DP) d'environ 1000, il est constitué d'une alternance d'unités rhamnosiques et d'unités galacturoniques [$\rightarrow 4$]- α -D-GalA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rha-(1 \rightarrow)]. Comme dans l'homogalacturonane, certains résidus d'acide galacturonique de RG-I sont acétylés (Dumville et al., 2000 ; Perrone et al., 2002).

Différents substituants polysaccharidiques neutres sont capables de se greffer à ce squelette osidique au niveau du carbone C4 du L-rhamnose (Figure 04). Parmi ces substituants, on peut citer le L-arabinose, le D-galactose, les arabinanes, les galactanes ou les arabinogalactanes (Bonnin et al., 2002).

I.1.3. Applications et intérêt industriel des substances pectiques

Du fait de l'intérêt de leurs propriétés biologiques, les substances pectiques et leurs dérivés font l'objet de nombreuses études et trouvent aujourd'hui des applications dans des domaines aussi différents que la médecine, l'agriculture et l'industrie agro-alimentaire (**Combo et al., 2011**).

Les substances pectiques participent à l'organisation structurale du végétal et interviennent dans l'évolution de ce dernier au cours de la maturation. Egalement par sa grande hydrophilidité, la pectine peut jouer un rôle dans la régulation du métabolisme de l'eau dans la plante.

Après leur extraction à partir des végétaux, et vue leur propriétés gélifiantes, épaississantes, suspensoïdes et thérapeutiques, les substances pectiques interviennent aussi très largement dans la fabrication des produits alimentaires et pharmaceutiques.

Les pectines sont principalement des gélifiants et l'industrie alimentaire utilise cette propriété, soit pour restituer à certains aliments une texture dégradée par les traitements de conservation, soit pour permettre leur présentation sous une forme appropriée à leur bonne conservation et leur bon usage. L'industrie alimentaire reste donc la principale utilisatrice des pectines H.M pour leurs propriétés fonctionnelles de gélification. Elles sont utilisées principalement dans les confitures, les confiseries, les biscuiteries, les pâtisseries ainsi que pour la fabrication des gelées et marmelades (**Thibault et Petit., 1979; Thibault., 1980**).

Il semble également que les applications des pectines faiblement méthylées soient nombreuses puisqu'elles sont utilisées dans la préparation des desserts à base de lait tels que les laits gélifiés aromatisés, les crèmes desserts, les crèmes glacées et les yaourts aux fruits.

La consommation journalière de pectines dans un régime alimentaire occidental se situe entre 4 et 5 g. Quant à la consommation annuelle mondiale de la pectine extraite industriellement, elle est estimée à 45 millions de kg (**Willats et al., 2006**).

Dans le domaine thérapeutique, de nombreuses recherches médicales ont mis en évidence le rôle important que pourrait jouer la pectine ou ses dérivés dans le traitement de certaines maladies (**Combo et al., 2011**).

A l'action antibiotique, antihémorragique, hypocholestérolémiante et détoxifiante des substances pectiques, s'ajoute souvent un effet anti-vomitif permettant aux jeunes enfants de mieux tolérer les aliments en particulier les laits et les produits lactés. La pectine est connue également dans le traitement de certains diabètes, ulcères et gastrites (**Thibault et Petit., 1979; Thibault., 1980**).

Un grand nombre d'études *in vivo* et *in vitro* a été mené sur l'effet des différents oligosaccharides non digestibles (NDO), y compris les oligosaccharides pectiques (POS). Bien que certains des effets ne soient pas clairement démontrés, certaines données indiquent des effets cliniquement significatifs qui justifient l'ensemble des travaux actuels (Swennen et al., 2006). Par exemple, ces oligosaccharides sont connus pour avoir des effets sur le métabolisme bactérien, la croissance des bactéries dans le colon, la diminution du risque de cancer, la modulation du système immunitaire, la diminution du cholestérol (Mussatto et al., 2007 ; Qiang et al., 2009).

Les oligosaccharides pectiques (POS) font partie des oligosaccharides non digestibles NDO et peuvent présenter des effets bénéfiques sur la santé (Combo et al., 2011). Leurs principales applications comprennent la fonction « élicitrice » des plantes, la protection contre le cancer du colon, la stimulation de la croissance de bactéries bénéfiques dans le colon (prébiotiques), l'inhibition de l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales, mais aussi l'induction d'une mort par apoptose des cellules d'adénocarcinome du colon.

Ainsi, il a été rapporté que les fragments pectiques pouvaient inhiber l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales et ainsi être utilisés comme des agents thérapeutiques. Par exemple, l'acide digalacturonique empêche l'adhésion d'*Escherichia coli* sur les cellules uroépithéliales *in vitro* (Hotchkiss et al., 2003). Egalement, Olano-Martin et al., (2003) ont montré que les POS exerçaient un rôle protecteur en inhibant les shiga-toxines sécrétées par *Escherichia coli* O157:H7. Par ailleurs, certains effets anti-cancérigènes ont été rapportés. Les pectines et les POS sont capables d'induire une mort par apoptose des cellules d'adénocarcinome HT-29 du colon (Olano-Martin et al., 2003). Des essais réalisés sur des lignées de cellules myéloïdes (Chauhan et al., 2005) et sur des cellules cancéreuses de la prostate (Jackson et al., 2007) ont montré les mêmes effets. En outre, certains dérivés de la pectine ont été utilisés pour la préparation de vaccins, mais aussi en tant que vecteurs dans l'administration de produits pharmaceutiques (Souto-Maior et al., 2010).

I.2. Les enzymes pectinolytiques

Les enzymes pectinolytiques ou pectinases sont un groupe hétérogène d'enzymes qui hydrolysent les substances pectiques et qui sont largement distribuées dans les plantes supérieures et dans les micro-organismes. Cette famille d'enzymes est capable d'attaquer une variété de liaisons chimiques des pectines (Figure 06). Le terme « enzyme pectinolytique » ne concerne que les enzymes qui agissent sur la partie galacturonique des substances pectiques et les enzymes capables de dégrader les chaînes latérales ne sont pas classées parmi les enzymes pectolytiques (Combo et al., 2011).

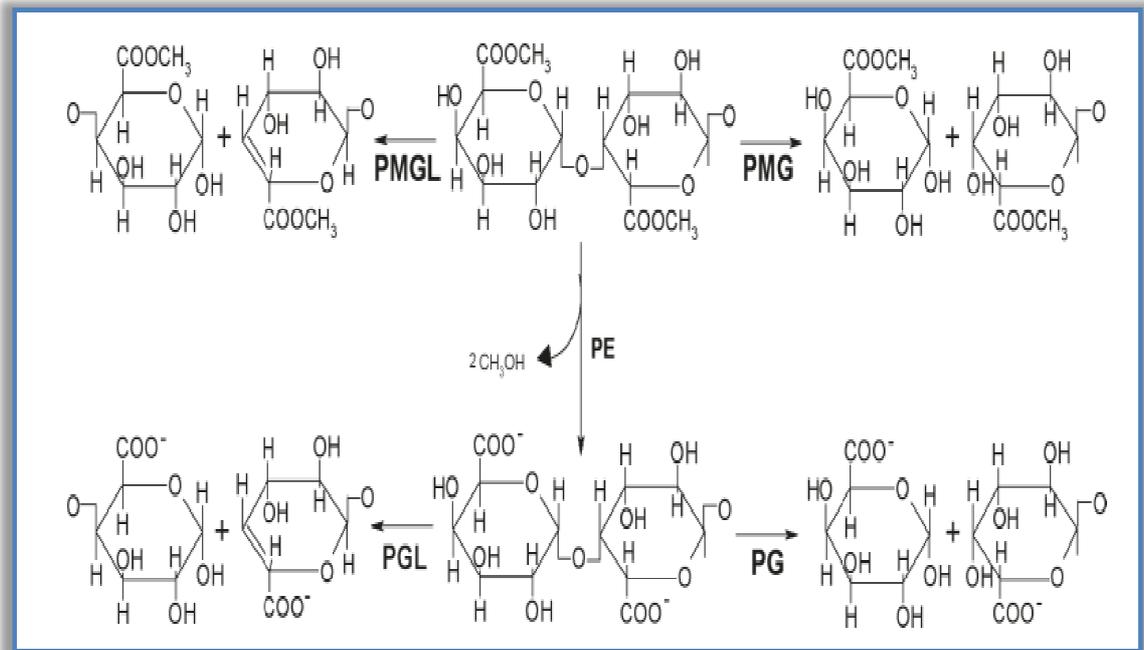


Figure 06 : Mode d'action des pectinases (Combo et al., 2011).

PMGL : polyméthylgalacturonate lyase; PMG : polyméthylgalacturonase; PE : pectinestérase ;
PGL : polygalacturonate lyase; PG : polygalacturonase.

La plupart des préparations commerciales de pectinases sont d'origine fongique. *Aspergillus niger* est la source fongique la plus communément utilisée pour la production industrielle d'enzymes pectinolytiques (Jayani et al., 2005).

Les enzymes pectinolytiques sont classées selon la nature du substrat (pectine, acide pectique, oligogalacturonate), le mécanisme de dégradation (trans-élimination ou hydrolyse) et le type de clivage (endo ou exo) (Favela-Torres et al., 2006). Ces enzymes peuvent être divisées en deux grands groupes : les dépolymérase (polygalacturonases et lyases) et les pectinestérase (PE) ou pectine-méthylestérase (PME) (Tableau 02).

Tableau 02 : Classification des pectinases (Sharma et al., 2013).

Type de pectinases	Numéro E.C	Substrat	Mode d'action	Produit
1. ESTERASES				
(a) PME	3.1.1.11	Pectine	Hydrolyse	Acide pectique + méthanol
(b) PAE	3.1.1.6	Pectine	Hydrolyse	Acide pectique + éthanol
2. DÉPOLYMERASES				
(a) Hydrolases				
(i) Endo PG	3.2.1.15	Acide pectique	Hydrolyse	Oligogalacturonates
(ii) Exo PG	3.2.1.67	Acide pectique	Hydrolyse	Monogalacturonates
(b) Lyases				
(i) Endo PL	4.2.2.2	Acide pectique	Transélimination	Oligogalactouronates insaturés
(ii) Exo PL	4.2.2.9	Acide pectique	Transélimination	Digalactouronates insaturés
(iii) Endo PNL	4.2.2.10	Pectine	Transélimination	Méthyl-oligogalactouronates insaturés

PME, pectine-méthylestérase; PAE, pectine-acétylestérase; PG, polygalacturonase; PL, pectate lyase; PNL, pectine lyase.

I.2.1. Les dépolymérasés

Les dépolymérasés sont des hydrolases (polygalacturonases et lyases) qui possèdent des activités endo- ou exo-galacturonases. Les dépolymérasés peuvent être subdivisées, en fonction du substrat et du mécanisme de clivage des liaisons glycosidiques, en quatre catégories différentes : les polygalacturonases (PG), les polyméthylgalacturonases (PMG), les polygalacturonate lyases (PGL) et les polyméthylgalacturonate lyases (PMGL). Les PG et PMG agissent respectivement sur les pectates et les pectines par un mécanisme d'hydrolyse, tandis que les PGL et PMGL agissent respectivement par β -élimination sur les pectates et les pectines (Alkorta et al., 1998). Suivant leur mode d'attaque, la réaction peut se faire soit de manière aléatoire, soit à l'extrémité de la chaîne, ce qui permet de distinguer les endo- et les exo-dépolymérasés (Jayani et al., 2005).

I.2.1.1. Les polygalacturonases

Les PG sont des enzymes pectolytiques qui catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques α -(1-4) des pectines acides (acide polygalacturonique). Ces enzymes sont spécifiques des substances pectiques non ou partiellement estérifiées par du méthanol. Elles sont les plus étudiées parmi la famille des enzymes pectolytiques. Les PG impliquées dans

l'hydrolyse des substances pectiques sont des endo-PG (EC 3.2.1.15) et des exo-PG (EC 3.2.1.67) (**Jayani et al., 2005**).

Deux méthodes ont été développées pour déterminer l'activité des PG et des PMG. On apprécie cette activité en mesurant la diminution de la viscosité ou l'augmentation du pouvoir réducteur du substrat (acide pectique ou pectine). La comparaison des mesures de viscosité et de pouvoir réducteur au cours de la dépolymérisation des pectines et des acides pectiques permet de faire la part des activités « endo » et « exo ». Ainsi, avec une endo-PG, la viscosité diminue de moitié quand seulement 2 à 3% des liaisons glycosidiques sont rompues. Avec une exo-PG, le même abaissement de la viscosité n'est observé qu'après rupture de 20% des liaisons glycosidiques (**Sakai et al., 1993 ; Jayani et al., 2005**).

Les endo-PG sont produites par divers microorganismes tels que des bactéries, des levures et des moisissures. Elles sont aussi présentes chez certains végétaux et surtout dans les fruits. En général, l'action des endo-PG libère des mono-, di- et tri-acides galacturoniques par un mécanisme d'attaque multiple à chaîne unique ou par un mécanisme d'attaque « multi-chaîne », dans lequel les mono-, di- et trimères s'accumulent seulement après hydrolyse des produits initiaux de dépolymérisation. Pour les pectines HM, l'hydrolyse n'a lieu qu'au niveau des résidus d'acide galacturoniques non méthylés. Toutefois, lorsque le DM augmente, la vitesse d'hydrolyse de l'enzyme diminue (**Sakai et al., 1993**). Les exo-PG sont moins fréquentes. Elles sont produites par des moisissures et quelques bactéries. On distingue deux types : les exo-PG fongiques avec comme produit final l'acide galacturonique et les exo-PG bactériennes qui produisent principalement l'acide digalacturonique. Les PG isolées des différentes sources microbiennes diffèrent nettement entre elles par leurs propriétés physico-chimiques et leur mode d'action.

I.2.1.2. Les lyases ou transéliminases

Les lyases dégradent la pectine, les oligomères et les polymères d'acide galacturonique. Ce sont des enzymes qui rompent la liaison glycosidique C-O par un mécanisme de β -élimination. L'absence de molécule d'eau dans le mécanisme réactionnel de leur action dépolymérisante entraîne la libération d'uronides insaturés et d'oligomères de petite taille avec la formation de double liaison entre C4 et C5 à l'extrémité non réductrice libérée (**Payasi et al., 2009**). En fait, la méthode la plus commode pour suivre l'activité des lyases est la mesure de l'augmentation de l'absorbance à 232 nm due à la double liaison produite à l'extrémité non réductrice des composés insaturés (**Albersheim et Killias., 1962 ; Payasi et al., 2009**). De plus, les méthodes de détermination de l'activité des PG peuvent également être utilisées pour les lyases.

Les lyases sont classées en différents types sur la base de leur mode d'action et en fonction du substrat sur lequel elles agissent (**Tableau 03**).

Tableau 03 : Classification des lyases (**Jayani et al., 2005**).

Enzyme	Numéro EC	Mécanisme d'action	Modèle d'action	Premier substrat	Produits
Endopolygalacturonase lyase	4.2.2.2	Trans- élimination	Aléatoire	Acide pectique	Oligogalacturonates insaturés
Exopolygalacturonase lyase	4.2.2.9	Trans- élimination	Avant- dernière liaison	Acide pectique	Digalacturonates insaturés
Endopolyméthyl-Dgalactosiduronate lyase	4.2.2.10	Trans- élimination	Aléatoire	Polyméthyl- Ddigalacturonates insaturés	Méthyloligogalacturonates insaturés
Exopolyméthyl-Dgalactosiduronate lyase	-	Trans- élimination	Dernière liaison	Polyméthyl- Ddigalacturonates insaturés	Méthyloligogalacturonates insaturés

Comme pour les PG, selon que la réaction enzymatique se fait au hasard ou à l'extrémité de la chaîne, on distingue les endo- et les exo-lyases. Les réactions catalysées par les lyases sont illustrées à la **figure 07**.

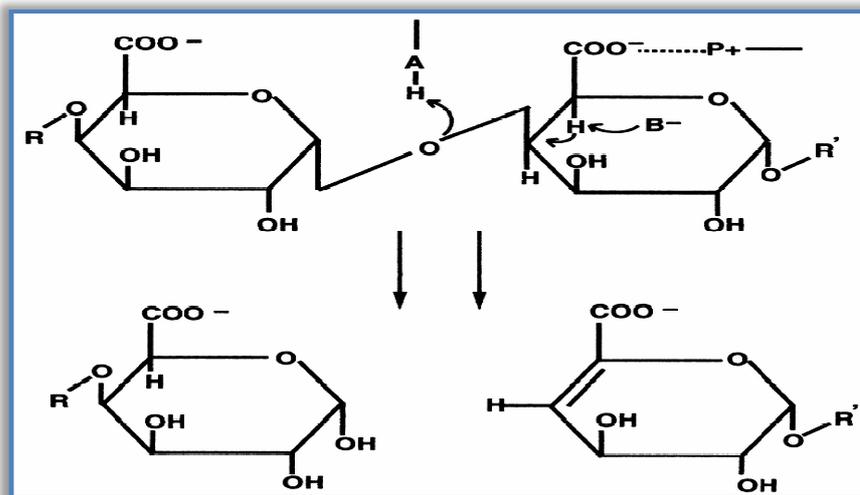


Figure 07 : Mécanisme de β élimination par les lyases (**Herron et al., 2000**)

Diagramme schématisant le principe du clivage d'un acide polygalacturonique par un mécanisme de beta élimination: Les pectate lyases sont censées contribuer par un minimum de trois groupes pour le mécanisme catalytique: P+, qui neutralise la charge sur le groupe acide carboxylique; B⁻, une base générale qui fait abstraction du proton du C-5, et A, un acide général qui est impliqué dans le transfert du proton final de l'oxygène glycosidique, laissant une double liaison entre C-4 et C-5.

Les PGL sont produites par plusieurs bactéries et quelques moisissures pathogènes, avec les endo-PGL plus abondantes que les exo-PGL. Les PMGL sont produites par *Aspergillus japonicus*, *Penicillium paxilli* et *Pichia pinus*. La plupart des lyases sont d'origine microbienne. Les pectate lyases bactériennes constituent le plus grand groupe d'enzymes pectolytiques. Elles sont considérées comme étant exclusivement d'origine microbienne. Cependant, une pectate lyase a été mise en évidence et purifiée chez une espèce végétale supérieur *Musa acuminata* (banane) (Payasi et Sanwal., 2003; Payasi et al., 2006).

Les PGL sont activées par les ions Ca^{2+} et, dans certains cas, par d'autres ions divalents tels que Mg^{2+} , Co^{2+} et Sr^{2+} . Elles sont, par contre, inhibées par l'agent chélateur EDTA. Les PMGL sont par contre actives en l'absence d'ions Ca^{2+} , mais la présence de Ca^{2+} ou celle d'autres cations les stimule. Les PMGL sont les seules dépolymérase capables de dégrader les pectines HM sans action préalable d'autres enzymes (Jayani et al., 2005).

I.2.2. Les pectinestérases (PE) ou pectine-méthylestérases (PME)

Les PE catalysent l'hydrolyse des liaisons esters méthyliques des pectines HM, entraînant la libération de méthanol et la formation d'acide polygalacturonique. L'activité de la PE peut être suivie soit par le dosage du méthanol libéré, soit par la détermination de l'augmentation du nombre de carboxyles libres ou encore en utilisant un régulateur de pH. En effet, l'ionisation du groupe carboxyle produit un proton dans le milieu, ce qui cause une variation du pH (Jayani et al., 2005). Les PE sont présentes dans de nombreux végétaux supérieurs et elles peuvent être extraites de divers fruits tels que la banane, l'orange, la tomate, la papaye et la pomme (Denès et al., 2000). Mais elles peuvent être aussi produites par des champignons, des bactéries et des levures. Les PE des végétaux, très spécifiques des esters méthyliques des acides pectiques, sont mieux connues que celles d'origine fongique et bactérienne. Leur pH optimum est compris entre 7 et 8, alors que les PE fongiques et bactériennes sont plus actives à pH 4-5. Les PE hydrolysent seulement les groupes esters adjacents à un groupe carboxyle libre et enlèvent ainsi les groupes méthyles de la chaîne les uns après les autres dans une direction donnée (Sakai et al., 1993).

Beaucoup de travaux ont été menés sur les propriétés physicochimiques et cinétiques des PE, cependant leur mode d'action n'est toujours pas bien élucidé. Selon Jayani et al. (2005), le mécanisme d'attaque des PE varie en fonction de l'origine. Ainsi, les PE fongiques agissent au hasard suivant un mécanisme « multi-chaine » par lequel l'enzyme forme un complexe enzyme-substrat, se dissocie après la réaction et s'associe à nouveau avec une autre molécule du substrat pour enlever les groupes méthyles. En revanche, les PE des végétaux tendent à agir à l'extrémité non réductrice ou à côté d'un groupe carboxyle libre le long de la

molécule par un mécanisme « unichaine » où le substrat est progressivement déméthylé jusqu'à ce que l'enzyme atteigne l'extrémité de la chaîne ou un résidu qui bloque sa progression pour se dissocier du complexe enzyme-substrat (Cameron et al., 2008).

Un troisième mode d'action a été évoqué : il s'agit d'un mécanisme d'attaque multiple qui est un mécanisme intermédiaire aux deux premiers. Dans ce cas, l'enzyme catalyse la transformation d'un nombre moyen de résidus pour chaque complexe enzyme-substrat formé (Denès et al., 2000 ; Cameron et al., 2008).

La PE est inhibée par l'augmentation du nombre des carboxyles libres le long des chaînes polygalacturoniques progressivement déméthylées. Cette inhibition est due à la répulsion exercée par la charge négative des carboxyles ionisés. La présence de cations (Ca^{2+} , Na^{+}) pourrait contrecarrer cette inhibition. Cette inhibition des PE serait également due aux chaînes latérales des sucres neutres dans la molécule de pectine (Sakai et al., 1993).

I.2.3. Autres enzymes intervenant dans la dégradation des substances pectiques

L'amélioration des connaissances sur les différences structurales entre la chaîne principale des régions « lisses » et des régions « hérissées » (RG1 et RG2) de la pectine a permis de découvrir de nouvelles enzymes impliquées dans la dégradation des chaînes latérales des substances pectiques (De Vries et al., 2001). Ces enzymes purifiées ont également acquis une importance en tant qu'outils analytiques dans les études structurales en raison de leur grande spécificité. Une série d'enzymes, toutes hautement spécifiques pour la région « hérissée » de la pectine, a été purifiée et caractérisée. Parmi ces enzymes, il y a lieu de citer les rhamnogalacturonases, les arabinanases et les galactanases (Mutter et al., 1998).

I.2.3.1. Les rhamnogalacturonases.

La rhamnogalacturonase isolée à partir d'*Aspergillus aculeatus* est spécifique du squelette rhamnogalacturonique au niveau de départ des zones « hérissées » où il existe une alternance d'unités rhamnosés et galacturoniques.

Deux endorhamnogalacturonases (RhgA, RGase A) et deux exo-rhamnogalacturonases (RG-rhamnohydrolase, RG-galacturonohydrolase) ont été isolées chez cette moisissure. Ces enzymes sont freinées dans leur action par la présence de groupements acétyles (De Vries et al., 2001). Les produits libérés par cette enzyme sont des oligomères linéaires composés d'une alternance de rhamnose et d'acide galacturonique (4 à 6 résidus) avec des résidus galactoses connectés à certains ou à tous les résidus rhamnose (Schols et al., 1995).

I.2.3.2. Les arabinanases.

Les arabinanases sont des enzymes capables d'hydrolyser les arabinanes, mais aussi les chaînes latérales d'arabinose présentes dans les arabinoxylianes et les arabinogalactanes.

Dans la nature, différents micro-organismes secrètent des endo-arabinanases (EC 3.2.1.99) et des arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) pour la dégradation des polysaccharides contenant l'arabinose. Cependant, la plupart des préparations enzymatiques commerciales contenant des activités arabinanases sont obtenues à partir de moisissures, comme par exemple *Aspergillus niger*. Cette moisissure secrète deux arabinofuranosidases (AbfA et AbfB) et une endo-arabinanase. L'arabinofuranosidase de type A agit seulement sur les petites chaînes de résidus arabinose liés par des liaisons α -(1-5), tandis que le type B hydrolyse les liaisons α -(1-5), α -(1-3) et α -(1-2) des résidus arabinoses. À la différence de certaines arabinofuranosidases, l'arabinofuranohydrolase d'*Aspergillus awamori* est incapable de libérer l'arabinose de la pectine, mais est fortement spécifique des résidus d'arabinose liés au xylane (Gielkens et al., 1999). L'endo-arabinanase agit au hasard sur les liaisons α -(1-5) des polysaccharides d'arabinane qui sont présents dans les chaînes latérales de la pectine. Cette enzyme augmente fortement l'efficacité de la dégradation des arabinanes et influence l'action des arabinofuranosidases. Jusqu'ici, seulement une exoarabinanase a été purifiée d'*Aspergillus*. Cette enzyme libère principalement de l'arabinobiose et peu d'arabinotriose (De Vries et al., 2001).

I.2.3.3. Les galactanases

Les galactanases sont impliquées dans la dégradation des polysaccharides des plantes en général et des pectines en particulier. Deux types de chaînes arabinogalactanes sont présents dans la pectine. Le type I se compose d'unités galactose liées par des liaisons β -(1-4), alors que le type II contient des résidus galactose liés par des liaisons β -(1-3) qui peuvent être substitués avec des résidus galactose en β -(1-6).

De plus, les deux types d'arabinogalactanes peuvent être substitués avec une chaîne d'arabinofuranose en α -(1-3). Parallèlement aux deux types d'arabinogalactanes, il existe deux types de galactanases : les endo- β -1,4-galactanases et les exo- β -1,3-galactanases. La différence entre ces enzymes réside dans leur capacité à hydrolyser les liaisons β -(1-3), β -(1-4) ou β -(1-6) entre les résidus de galactose. Les endo- β -1,4-galactanases sont actives sur les galactanes et les arabinogalactanes de type I, libérant ainsi des galacto-oligosaccharides.

Les endo- β -1,4-galactanases bactériennes libèrent principalement du galactotriose et du galactotétraose, bien que certaines libèrent aussi du galactobiose (De Vries et al., 2002). Les exo- β -1,3-galactanases sont actives sur les arabinogalactanes de type II où elles hydrolysent spécifiquement les liaisons β -(1-3) (De Vries et al., 2001).

I.2.4. Structure tridimensionnelle des pectinases

Par contraste aux familles des cellulases et des hémicellulases, les lyases ainsi que les polygalacturonases présentent la même topologie sous la forme d'un tonneau ou d'une « hélice β » (**Figure 6**), (**Herron et al., 2001**). En effet, les feuilletts β s'enroulent en hélices droite ou gauche, qui sont souvent appelées improprement «hélice β » ou structure en hélices de feuilletts β («*parallel-beta-helix*»). Ces dernières peuvent contenir deux, trois ou quatre brins par tour d'hélice (**Figure 08**).

Les pectates et les pectine lyases se présentent sous la forme d'une « hélice β » droite à 8 tours dont chacun est formé par trois brins parallèles. Les polygalacturonases sont formées d'une hélice droite à 10 tours dont chacun est formé par 4 brins parallèles. L'Aspartate 202 et 223 sont conservés pour les polygalacturonases et les RGases A (**Pickersgill et al., 1994**).

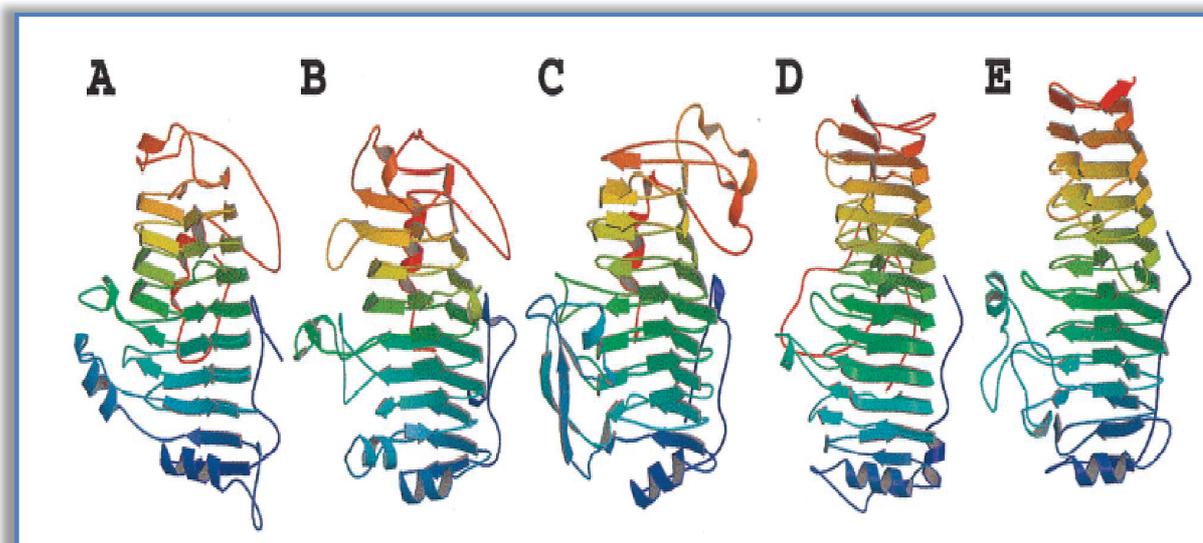


Figure 08: Structure tridimensionnelle de cinq exemples d'enzymes pectinolytiques ayant le motif d'«hélice β » («*parallel-beta-helix*») (**Herron et al., 2001**).

A : Pectate lyase C d'*E. chrysanthemi* **B :** Pectate lyase E d'*E. chrysanthemi*
C : Pectine lyase B d'*A. niger* **D :** Polygalacturonase d'*E. carotovora*
E : Rhamnogalacturonase A d'*A. aculeatus*.

La topologie d'«hélice β » parallèle a été initialement élucidée pour la pectate lyase d'*Erwinia chrysanthemi*. La même topologie a été observée chez la pectate lyase d'*E. chrysanthemi* et de *Bacillus subtilis*, les deux pectine lyases d'*Aspergillus niger* (PLA et PLB), la polygalacturonase d'*Erwinia carotovora* et l'endopolygalacturonase II d'*Aspergillus niger*. Actuellement, la structure tridimensionnelle de plusieurs pectate lyases et le mécanisme de fixation de substrat sur le site actif a été bien élucidée par la méthode de cristallographie nous citons les exemples: BsPel de *Bacillus subtilis* (**Pickersgill et al., 1994**) PelA Pel9A

(Jenkins *et al.*, 2004) et PelC (Yoder *et al.*, 1993a, 1993b; Yoder et Jurnak., 1995; Herron *et al.*, 2001) (Figure 09, 10).

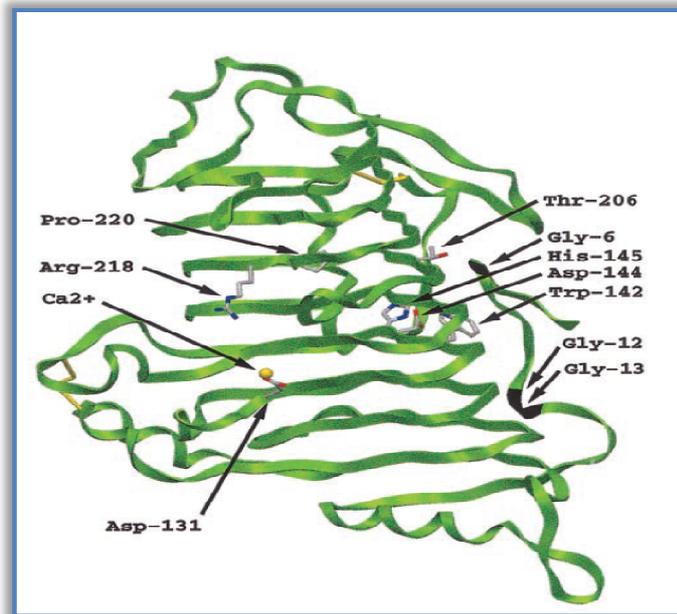


Figure 09 : Structure tridimensionnelle de pectate lyase C (PelC) (Herron *et al.*, 2001).

Localisation de 10 acides aminés invariants (conservés) dans la superfamille des pectate lyase extracellulaire. Les deux groupes des acides aminés invariants sont situés sur les côtés opposés de l'hélice parallèle β , séparés par environ 25Å à travers le diamètre et d'environ 90Å autour de l'axe de l'hélice parallèle β . L' α -carbone de PelC est illustré comme un ruban vert et les ions Calcium comme des sphères jaunes. Les acides aminés invariants sont marqués au carbone α et sont représentés par des bâtonnets. En utilisant le code de coloration de l'union internationale de chimie pure et appliquée: les atomes de carbone sont représenté en gris; les atomes d'oxygène en rouges; et les atomes d'azote en bleu.

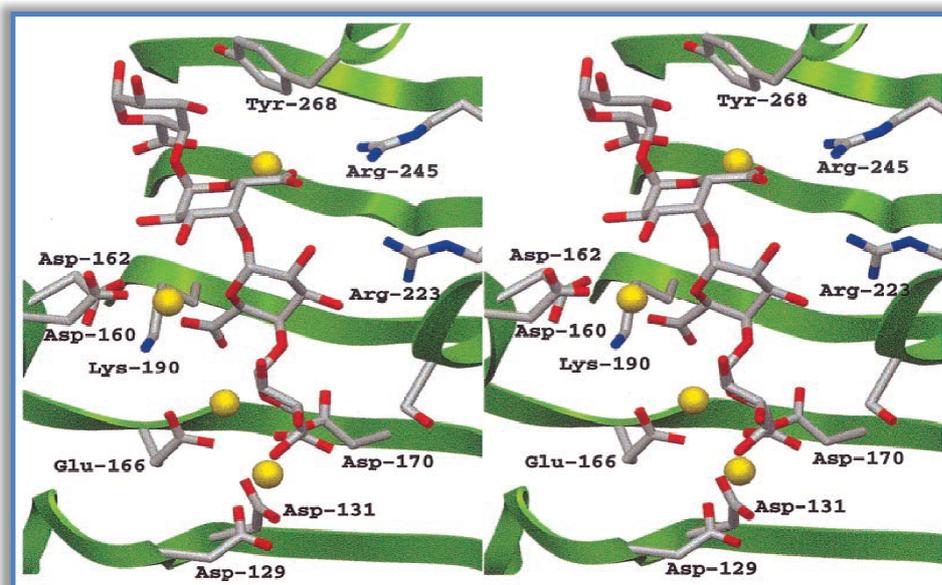


Figure 10: Vue stéréoscopique du site actif du complexe PelC R218K- (Ca²⁺)₄-pentaGalpA (Herron *et al.*, 2001).

Le code de couleur utilisé est le même que celui utilisé dans la Figure 9.
Le calcium a été postulé comme appartenant au site actif.

I.2.5. Régulation génétique de la production des pectinases

Pour toute enzyme, étant le produit direct de l'activité d'un gène, l'augmentation des capacités productrices d'une espèce microbienne passe nécessairement par la mise en œuvre de techniques permettant d'obtenir une activité élevée du (ou des) gènes intéressants.

La régulation des gènes de pectinases est très complexe et dépend de plusieurs conditions environnementales. Ainsi l'expression de ces gènes est induite par les substrats pectiques ainsi que par les produits de la réaction de catabolisme des pectines et affectée par la phase de croissance, la répression catabolique, l'osmolarité, le manque d'oxygène et d'ions **(Hugouvieux-Cotte Pattat et al., 1994).**

Les études par génie génétique sur la famille des enzymes pectiques produites par divers microorganismes tels que *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, ainsi que quelques bactéries phytopathogènes telles que *Erwinia carotovora* et *Erwinia chrysanthemi* a conduit à l'identification de plusieurs gènes régulateurs. Parmi eux, le gène *pem* codant pour une pectine-méthylestérase (PME) et les gènes de structures des 5 PEL qui sont localisés dans deux régions du chromosome et qui codent pour 5 isoenzymes de pectate lyases: le groupe des gènes *pelB*, *pelC* et celui de *pelA*, *pelD*, *pelE* **(Hugouvieux-Cotte Pattat et al., 1996).**

Chez *Erwinia chrysanthemi*, l'analyse génétique des gènes de pectinases a permis d'identifier trois régulateurs, KdgR, PecS-PecM et PecT, qui répriment l'expression des gènes de pectinases. Ces facteurs agissent par fixation directe sur une région régulatrice située en amont des gènes en question. Le régulateur KdgR se fixe à une séquence cible hautement conservée dans la région régulatrice de la majorité des gènes pectinolytiques. La présence de 2-keto-3-deoxyglyconate (KDG), un inducteur de l'expression des gènes pectinolytiques, empêche la fixation de la protéine KdgR à sa cible permettant ainsi l'expression de ces gènes. En plus de ces trois régulateurs, il a été montré que le complexe AMPc-AMPC *Receptor* (CRP: *Cyclic Amp Receptor Protein*) active la transcription de la majorité des gènes de pectinases. La protéine CRP agit comme un inhibiteur de l'expression du gène *pelA* en absence du répresseur KdgR. Ces deux régulateurs, KdgR et CRP, contrôlent aussi l'expression des gènes codant pour les transporteurs, *TogT* et *TogMNAB*. Ces derniers permettent le passage des oligogalacturonides à l'intérieur de la cellule **(Hugouvieux-Cotte Pattat et al., 2001).**

I.2.6. Applications des enzymes pectinolytiques

Les pectinases microbiennes sont une famille d'enzymes qui présentent un grand potentiel pour diverses utilisations industrielles, puisqu'elles sont capables de dégrader la pectine, un polysaccharide trouvé dans les tissus de la plupart des végétaux.

Depuis 1940, les enzymes pectinolytiques ont été exploitées dans diverses applications industrielles en vue d'améliorer le rendement de différents procédés industriels (**Alkorta et al., 1998 ; Soriano et al., 2000**). Les champignons, en particulier du genre *Aspergillus*, comptent parmi les principales espèces productrices d'enzymes pectinolytiques utilisées à l'échelle industrielle (**Jayani et al., 2005**). Ces enzymes jouent un rôle important dans la destruction et la putréfaction des végétaux et des fruits. Les pectinases, avec les cellulases, ont été utilisées dans l'industrie des papiers et des pulpes (**Ahlawat et al., 2008**) et sont très impliquées dans les pathologies des plantes et la technologie de fusion des protoplastes (**Gummadi et Panda, 2003**). Dans l'industrie alimentaire, l'emploi de ces enzymes occupe une place majeure dans l'amélioration de la qualité des produits, l'augmentation du taux d'extraction, la stabilisation des produits et l'amélioration des arômes. Les enzymes pectinolytiques occupent 75% du marché mondial relatif à l'industrie agroalimentaire (**Hadj Sassi et al., 2016**). Les fabricants cherchent à améliorer les performances des préparations pectinolytiques en adaptant le plus possible leur spectre d'activité enzymatique à chaque technologie.

I.2.6.1. Application des pectinases acides dans l'industrie des boissons

Les pectinases utilisées dans l'industrie des boissons sont produites généralement par les champignons et surtout par *Aspergillus niger*. Ces enzymes, agissant en milieu acide, jouent un rôle important dans l'amélioration de la qualité et de la quantité des jus. Selon l'origine des cellules végétales et la nature du jus, les industries agroalimentaire classent les jus produits en trois groupes (**Kashyap et al., 2001**):

- ❖ Les jus clairs et moussants / le jus de pomme, le jus de poire et le jus de raisins.
- ❖ Les jus troubles / le jus de citron, le jus d'orange et le jus de banane.
- ❖ Les produits unicellulaires dans lesquels on préserve l'intégrité des cellules par hydrolyse sélective des polysaccharides de la lamelle moyenne. Ces produits sont utilisés dans les jus pulpeux, dans les nectars et comme ingrédients pour les produits alimentaires.

I.2.6.1.1. Quelques applications des pectinases dans la fabrication des jus de fruits

L'obtention de jus de fruits limpide (jus de pomme, orange, poire) ou la production de concentré à haute teneur en matière sèche nécessitent la dégradation des macromolécules

pectiques (**Baron et Thibault., 1985**). Dans l'industrie des jus de fruits, les enzymes pectinolytiques sont utilisées de façon régulière depuis longtemps pour dépolymériser les pectines solubles (**Hadj Sassi et al., 2016**). Les jus de fruits sont généralement extraits par un procédé de pression suivi d'un traitement enzymatique de la pulpe provoquant une hydrolyse partielle de la pectine (**Alkorta et al., 1998; Kashyap et al., 2001**).

Le traitement enzymatique des pulpes avant pressurage est obligatoire pour l'extraction des jus de certains fruits (cassis, framboise, fraise, raisin). Ainsi, le pressage mécanique de la pulpe produit un jus très visqueux et engendre la formation d'une masse semi-gélifiée dont il est difficile d'extraire le jus. L'addition d'enzymes pectinolytiques dégrade cette structure et facilite ainsi l'écoulement. De plus, en dégradant partiellement les tissus épidermiques du fruit, les enzymes pectinolytiques favorisent l'extraction des pigments et contribuent à améliorer la couleur du jus (**Baron et Thibault., 1985**) (**Figure 11**).



(A)

(B)

Figure 11 : Jus d'orange clarifié (**Arunachalam et Asha., 2010**).

(A): à droite: Jus d'orange non clarifié; à gauche: Jus d'orange clarifié.

(B): Une préparation enzymatique commerciale pour clarification de jus d'orange.

L'action simultanée de la pectinestérase et de polygalacturonase et/ou de la pectinolyase solubilise une fraction pectique des particules en suspension, démasquant ainsi les charges positives de composés azotés. L'hydrolyse des pectines solubles se poursuivant, la viscosité du milieu diminue, les particules flocculent par interaction électrostatique et sédimentent. L'adjonction de gélatine, de bentonite ou de gel de silice favorise la floculation (**Baron et Thibault., 1985**).

La clarification des moûts de pommes destinés à l'élaboration de cidres peut être obtenue par le procédé de défécation. Le contrôle de cette opération est obtenu, industriellement, par l'emploi d'une préparation de pectine estérase exempte de toute activité

dépolymérisante; les pectines du moût, partiellement déméthylées (DM=40 à 50%) par cette enzyme, gélifient sous forme de pectate de calcium ; puis le gel se rétracte à la surface du moût en quelques heures (10 à 24h) entraînant avec lui les particules en suspension (**Baron et Thibault., 1985**).

✓ **Jus d'agrumes** : Les préparations enzymatiques utilisées pour la production du jus d'orange doivent être riches en polygalacturonases puisque la pectine d'orange est partiellement méthylée (**Kashyap et al., 2001**). Dans la préparation du jus, les enzymes additionnées, après la première étape ou à la fin de l'extraction, engendrent une augmentation de la stabilité du jus, une réduction de sa viscosité et une augmentation du rendement de l'extraction.

✓ **Jus de pomme**: Les préparations enzymatiques utilisées pour la production du jus de pomme doivent être riches en PNL (pectine lyases) et PME (pectine-méthyl-estérases) puisque la pectine de pomme est hautement méthylée (**Kashyap et al., 2001**).

L'utilisation de ces enzymes présente plusieurs avantages à savoir :

- ❖ L'augmentation du rendement de l'extraction;
- ❖ La diminution du temps nécessaire pour l'extraction du jus;
- ❖ La production de jus très stables et ayant un goût agréable;
- ❖ La réduction des déchets et du coût de la production du jus.

✓ **Jus de raisin** : L'utilisation essentielle de ces enzymes dans les jus de raisin peut être réalisée à température élevée pour obtenir des taux importants en jus et enlever la couleur persistante du raisin. Il y a quatre phases distinctes et successives dans la fabrication des jus de raisin: la clarification, la déstabilisation, la coagulation et la sédimentation (**Baron et Thibault., 1985**). Dans la clarification des jus, la pectine doit être hydrolysée pour qu'elle n'interfère pas avec la phase de coagulation. La dégradation des substances pectiques est très importante lors de la filtration afin d'éviter le colmatage du filtre.

Dans l'industrie des boissons, et plus particulièrement en oenologie, les pectinases sont employées dans des cas bien précis de la vinification. Ainsi, les préparations enzymatiques permettent de faciliter la clarification des moûts (les pectinases améliorent et accélèrent le débouillage) et de renforcer le profil aromatique de certains cépages. La lyse de la paroi cellulaire de raisin permet d'augmenter la quantité en jus, de donner des vins plus riches en arômes, tanins et en substances colorantes (anthocyanes). Les vins enzymés sont plus structurés et en même temps moins amers.

I.2.6.2. Application des pectinases basiques dans l'industrie

Les pectinases basiques sont essentiellement utilisées dans le dégomme des tissus, l'extraction des huiles et la fermentation du café et du thé (Hoondal et al., 2002).

I.2.6.2.1. Rôle des pectinases basiques dans l'industrie textile

Les pectinases basiques sont essentiellement utilisées dans le dégomme du tissu et la séparation des fibres. En plus, ces enzymes pectinolytiques permettent l'isolement des fibres textiles à partir des tiges de lin (Henriksson et al., 1997 ; Zhou et al., 2015) (Figure 12).



Figure 12: Rouissage du chanvre (*Crotalaria juncea*) sous l'action d'une pectine lyase de l'espèce *Aspergillus flavus* MTCC 7589. après traitement enzymatique (E) en comparaison avec le témoin (C) Control (Yadav et al., 2009).

Les enzymes pectinolytiques des actinomycètes ont également montré une bonne corrélation entre l'activité de la pectate lyase et les effets de dégomme, ce qui permet une bonne séparation de la fibre (Bruhlman., 1994; Sharma et al., 2013).

Egalement, dans une série d'expériences réalisées par Cao et al. (1992), ils ont signalé l'isolement d'une espèce de *Bacillus sp.* NT-33 qui pourrait bien se développer à pH 10,0, ce qui est de grand avantage pour la productivité et l'activité de dégomme. De plus, la fermentation à haute température dans des hautes valeurs du pH ont également l'avantage d'empêcher la contamination microbienne et ouvrent donc la voie pour développer peut être des processus de fermentation ouverts. Il a été rapporté que cette espèce élimine plus de 70% de gomme de ramie après 24 h de fermentation dans les conditions alcalines (Sharma et al., 2013). L'application de ces enzymes, produites essentiellement par les bactéries (*Bacillus*, *Clostridium*), présente plusieurs avantages tels que:

- La réduction de l'utilisation des composés chimiques polluants comme la soude qui est utilisée dans le processus de dégomme (Zhou et al., 2015);

- La réduction de la consommation d'énergie nécessaire pour le dégommeage (**Kashyap et al., 2001**).

I.2.6.2.2. Rôle des pectinases dans l'extraction des huiles

Les huiles d'olives, de grignon d'olives, d'amandes et de colza sont traditionnellement produites par extraction en présence de solvants organiques tels que l'hexane. Les enzymes pectinolytiques ont été introduites dans le secteur oléicole. En effet, ces enzymes sont additionnées au cours du broyage des olives pour améliorer l'extraction d'huile.

L'augmentation du rendement d'extraction dépend de plusieurs facteurs tels que le pH, la température et la dose d'enzyme utilisée (**Kashyap et al., 2001; Rebbelo et al., 2017**).

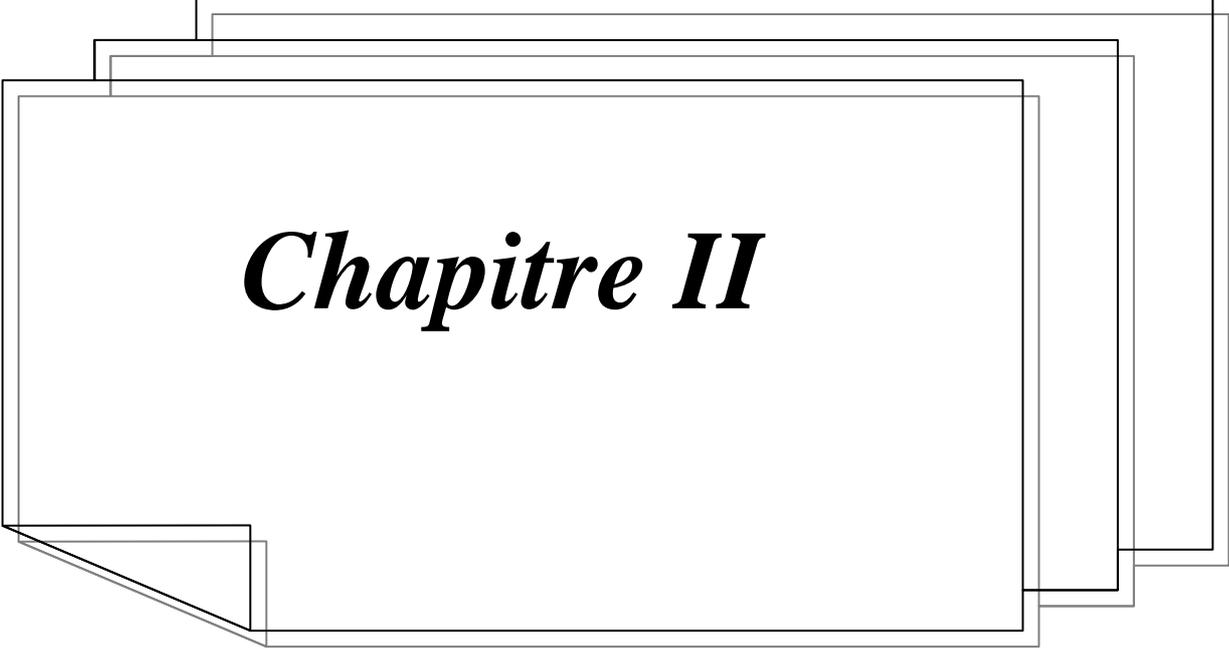
L'utilisation de la préparation enzymatique du mutant de *Penicillium occitanis* CT1 dans le secteur oléicole a permis une amélioration du taux d'extraction d'huile de 2 % (**Hadj-Taieb et al., 2006**).

I.2.6.2.3. Fermentation du thé et du café

Les pectinases jouent un rôle important dans la fermentation du thé et du café. En effet, l'utilisation des microorganismes pectinolytiques au cours de la fermentation entraîne une accélération très nette du processus de fermentation (de 80 à 20 heures) (**Kashyap et al., 2001; Hoondal et al., 2002 ; Rebbelo et al., 2017**).

I.2.6.2.4 Autre intérêts biotechnologiques des enzymes pectinolytiques

Les pectinases ont un spectre d'utilisation industrielle très large. Ces enzymes interviennent dans l'alimentation des bétails, dans le traitement des eaux usées issues de l'industrie du jus (**Tanabe et al, 1988; Tapias et al. 2015**), dans l'industrie du papier (**Hoondal et al., 2002 ; Ahlawat et al. 2008**). Ainsi dans la recherche, citons les exemples: l'extraction des acides nucléiques, l'isolement des protoplastes (**Kashyap et al., 2001**) et la purification des virus infectant les plantes (**Jayani et al., 2005**). Nous pouvons également citer l'exemple de l'emploi des pectinases dans l'extraction des fibres de cellulose à partir du Chanvre ou de l'Alfa en vue de fabriquer des composites (**Saleem et al., 2007; Hanana et al., 2014**). Par ailleurs, il est intéressant de noter l'utilisation de la pectine lyase dans l'hydrolyse du ginseng afin de l'utiliser dans l'espoir de traiter des problèmes rénaux liés au diabète (**Kim et al., 2017**).



Chapitre II

II. Les actinomycètes et leurs intérêts biotechnologiques

II.1. Généralités sur les actinomycètes

Les actinomycètes sont des organismes vivants qui sont largement distribués dans les écosystèmes terrestres et rarement dans les milieux aquatiques (**Lacey., 1973**). La plupart des actinomycètes sont des organismes saprophytes vivant dans le sol qui passent la majeure partie de leur cycle de vie en tant que spores en particulier dans des conditions limitées en nutriments. Ils sont plus abondants dans les sols que d'autres milieux, en particulier dans les sols alcalins et les sols riches en matière organique, où ils constituent une partie importante de la population microbienne (**Williams et Cross., 1971**). Les actinomycètes sont des bactéries à Gram positif et peuvent être aussi trouvés à la surface du sol et à des profondeurs de plus de 2 m sous terre (**Williams et al., 1984; Sabaou., 1988**).

La densité de population des actinomycètes dépend de leur habitat et des conditions climatiques dominantes. Ils sont typiquement présents à des densités de l'ordre de 10^6 à 10^9 cellules par gramme de sol; les populations de sol sont dominées par le genre *Streptomyces*, qui représente plus de 95% des actinomycètes isolés du sol. D'autres facteurs, tels que la température, le pH et l'humidité du sol, influencent également la croissance des actinomycètes. Comme les autres bactéries du sol, les actinomycètes sont principalement mésophiles, avec une croissance optimale à des températures comprises entre 25 et 30°C. Cependant, les actinomycètes thermophile peuvent se développer à des températures allant de 45 à 60°C (**Lechevalier et Lechevalier., 1967; Williams et al., 1984**).

La plupart des actinomycètes poussent dans des sols à pH neutre. Ils poussent mieux à un pH entre 6 et 9, avec une croissance maximale autour de la neutralité. Cependant, quelques espèces de *Streptomyces* ont été isolées de sols acides (pH3,5). Bien qu'ils soient des organismes mésophiles, les espèces de la famille des *Thermoactinomycetaceae* sont communément trouvées dans le compost et le fumier à température de croissance supérieur à 45°C (**Theilleux., 1997 ; Prescott., 2002**).

Les actinomycètes avec des modes de vie principalement mycéliens se reproduisent habituellement en formant des spores asexuées. Les actinomycètes présentent une grande variété de morphologies, différant principalement par la présence ou l'absence de mycélium substrat ou de mycélium aérien, la couleur du mycélium, la production de pigments

mélanoïdes diffusibles et la structure et l'aspect de leurs spores. Le mycélium substrat se développe à partir de la croissance d'une spore en germination (**Figure 13**). Il est souvent ramifié et monopodial, mais dans certains cas rares, des *Actinobacteria*, comme les membres de la famille des *Micromonosporaceae*, produisent un mycélium substrat étendu avec un mycélium aérien absent ou rudimentaire (**Theilleux., 1997; Prescott., 2002**).

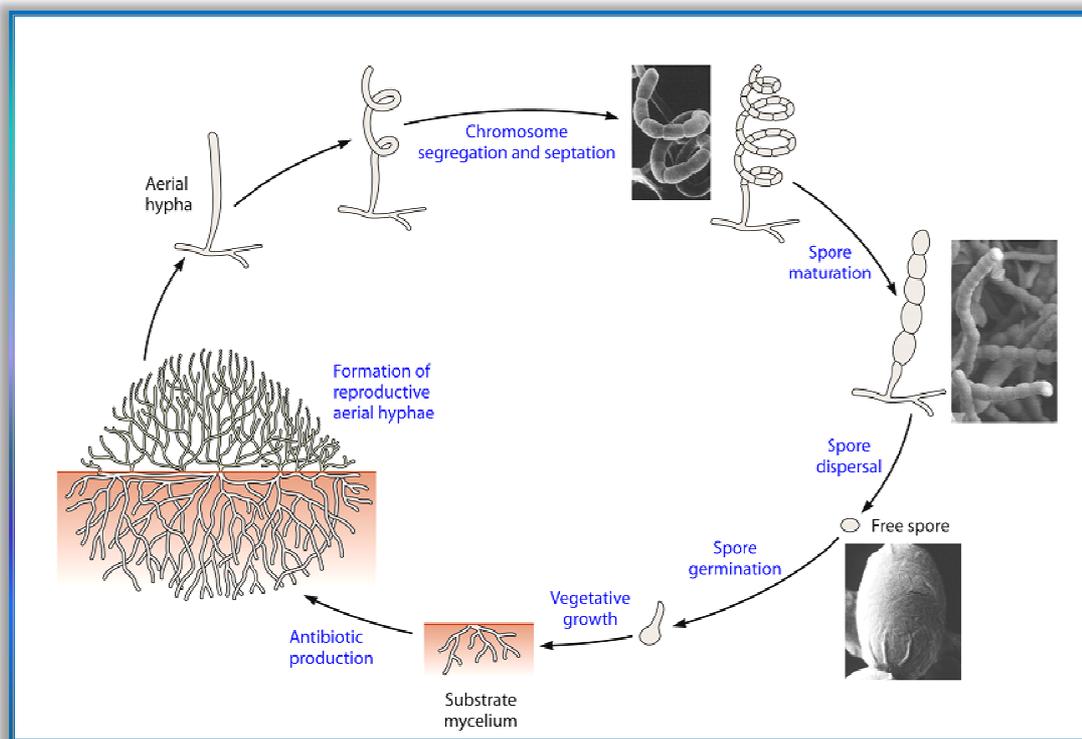


Figure 13: Représentation schématique du cycle de vie des actinomycètes (**Barka et al., 2015**).

Les actinomycètes présentent une grande variété de morphologies, y compris le coccioïde (*Micrococcus*) et le bâtonnet-coccioïde (*Arthrobacter*), ainsi que des formes hyphales fragmentées (*Nocardia* spp.) et des formes avec des mycéliums ramifiés permanents et hautement différenciés (par exemple, *Streptomyces* spp., *Frankia*). Les rhodocoques forment des filaments allongés sur le substrat et ne produisent pas de véritable mycélium, tandis que, les corynébactéries ne produisent aucun mycélium (**Larpen et Larpen-Gourgand., 1997 ; Prescott., 2002**).

Le nombre de spores par chaîne varie considérablement d'un genre à l'autre. Les genres: *Micromonospora*, *Salinispora*, *Thermomonospora*, *Saccharomonospora* et *Promicromonospora*, produisent des spores isolées, tandis que *Microbispora* produit des spores en paires longitudinales. Les membres des genres *Actinomadura*, *Saccharopolyspora*,

Sporichthya et certaines espèces de *Nocardia* spp, ont de courtes chaînes de spores, tandis que les membres des genres *Streptomyces*, *Nocardioides*, *Kitasatospora*, *Streptoverticillium* et *Nocardia* spp produisent de très longues chaînes jusqu'à 100 spores. En revanche, les espèces de *Frankia* produisent des sporanges, qui sont essentiellement des sacs de spores. Les chaînes de spores des streptomycètes peuvent être classées comme étant droites à flexibles (*Rectus-Flexibilis*), ouvertes (*Relinaculam-Apertum*), spirales ouvertes ou fermées (*spira*) ou verticillées (**Larpent et Larpent-Gourgand., 1997**).

On sait depuis longtemps que les actinomycètes produisent des pigments qui peuvent être rouges, jaunes, orange, roses, brunâtres, bruns, brun verdâtre, bleus ou noirs, selon l'espèce, le milieu utilisé et l'âge de la culture. Généralement appelés mélanines ou pigments mélanoïdes, ces polymères métaboliques brun-noir sont importants non seulement en raison de leur utilité dans les études taxonomiques, mais aussi en raison de leur similitude avec les substances humiques du sol (**Theilleux., 1997; Prescott., 2002**).

La classification et l'identification chimio-taxonomiques peuvent également être effectuées sur la base d'informations dérivées de techniques d'empreintes chimiques d'organismes entiers, comme les marqueurs sucres, acides aminés, phospholipides, ménaquinones. L'analyse de la composition de la paroi cellulaire des actinomycètes est taxonomique, car elle diffère entre les sous-ordres. Ainsi, le genre *Streptomyces* est caractérisé par la présence de l'acide LL-2,6 diaminopimélique (LL-DAP), Le genre *Actinomadura* est caractérisé par la présence de sucre madurose (ou 3-O-méthyl-galactose) (**Lechevalier et Lechevalier., 1965 ; Lechevalier et al., 1977**).

II.2. Classification moléculaire des actinomycètes

Plus récemment, la classification morphologique et chimique des actinomycètes a été contestée par des données taxonomiques moléculaires, dont la plupart ont été obtenues grâce à l'avancement rapide du séquençage du génome. Notamment, certains organismes placés de manière inappropriée dans certains groupes taxonomiques ont récemment été reclassés sur la base d'analyses moléculaires (**Barka et al., 2015**).

Parmi les caractères importants, non seulement dans la reconnaissance des genres mais aussi des familles d'actinomycètes, nous notons que la détermination du coefficient de Chargaff (G+C) et le séquençage de l'ADN ribosomique, lesquels ont permis en outre de

tracer toute la phylogénie des actinomycètes. La détermination du coefficient de Chargaff a permis de reconsidérer la définition des actinomycètes dont l'ADN contient un pourcentage de G+C supérieur à 55%. Ceci a permis de différencier la lignée des actinomycètes de celle des *Bacillaceae*, des *Lactobacillaceae* et d'autres bactéries à Gram positif. De même, d'autres bactéries non mycéliennes telles que *Corynebacterium*, *Cellulomonas*, *Arthrobacter* et même *Micrococcus*, sont considérées comme faisant partie de la lignée phylogénétique des actinomycètes (Stackebrandt et al., 1997).

La **figure 14** représente les intra-classe apparentées des Actinobactéries et les relations phylogéniques entre les ordres, les sous-ordres et les familles, montrant la présence de cinq ordres sur la base de la comparaison des séquences du gène de l'ARNr 16S (Zhi et Stackebrandt., 2009).

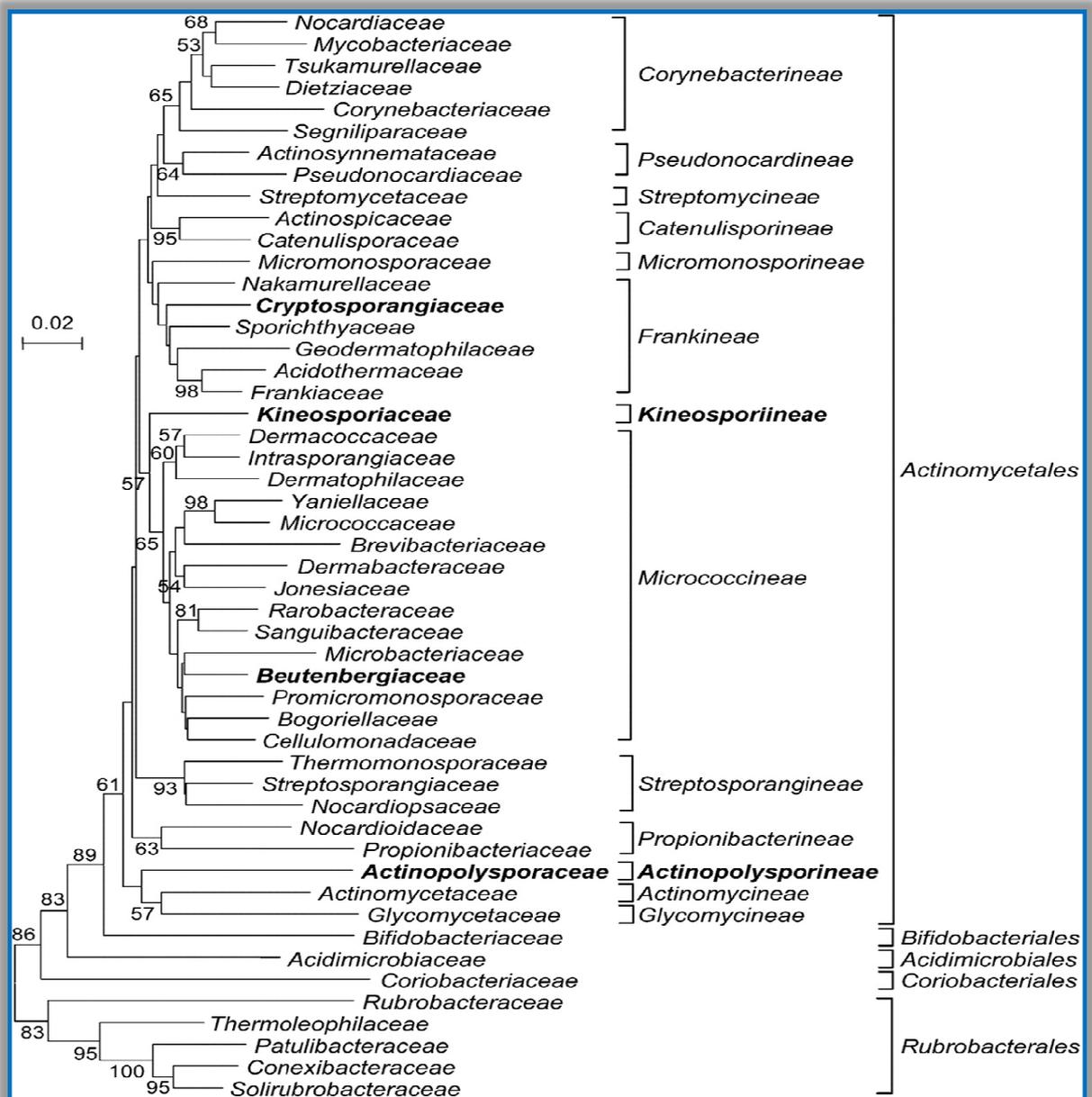


Figure 14: Dendrogramme phylogénétique des *Actinobacteria*, basée sur les séquences du gène codant d'ARNr 16S (Zhi et Stackebrandt, 2009).

Les relations phylogéniques entre les ordres, les sous-ordres et les familles, basées sur les données de l'ARNr 16S. Les taxa nouvellement décrit sont représentés en gras. Les valeurs de démarrage de sangle (*bootstrap*) de 50% ou plus sont indiquées aux points de branchement. La barre représente 2 substitutions de nucléotides par 100 nucléotides.

Actuellement, Le phylum *Actinobacteria* est l'une des plus grandes unités taxonomiques parmi les lignées majeures actuellement reconnues chez les bactéries. Les *Actinobactéries* comprennent 6 classes, 25 ordres, 52 familles et 232 genres et représentent l'une des plus grandes unités taxonomiques parmi les 18 lignées majeures actuellement reconnues dans le domaine des bactéries (Barka et al., 2015).

Le phylum *actinobacteria* est délimité sur la base de sa position de ramification dans les arbres du gène de l'ARNr 16S. Cependant, les séquences d'ARNr ne distinguent pas bien les espèces étroitement apparentées ou même les genres, ce qui peut créer une ambiguïté. Une taxonomie mise à jour du phylum *Actinobacteria* qui est basée sur des arbres ARNr 16S a été récemment rapportée. Cette mise à jour a éliminé les rangs taxonomiques des sous-classes et des sous-ordres, élevant les anciennes sous-classes et sous-ordres aux rangs des classes et des ordres, respectivement. Le phylum est ainsi divisé en six classes: *Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteria*, *Nitriliruptoria*, *Rubrobacteria* et *Thermoleophilia* (Sathya et al., 2017).

La classe *actinobacteria* contient 16 ordres, y compris les deux ordres précédemment proposés, *Actinomycetales* et *Bifidobacteriales*. L'ordre *actinomycetales* est maintenant restreint aux membres de la famille des *actinomycetaceae*, et les autres sous-ordres qui faisaient auparavant partie de cet ordre sont maintenant désignés comme des ordres distincts. Par conséquent, 43 des 53 familles de l'embranchement *actinobacteria* sont assignées à une seule classe, *actinobacteria*, alors que les cinq autres classes ne contiennent ensemble que 10 familles (Figure 15).

A l'heure actuelle, une nouvelle espèce ne peut être revendiquée sans une analyse génétique fondée sur le séquençage du gène de l'ARNr 16S et l'hybridation ADN-ADN, et même le séquençage du génome devient routinier. Des critères de composition moléculaire et chimique ont été utilisés pour regrouper l'ordre des *actinomycétales* en 14 sous-ordres: *Actinomycineae*, *Actinopolysporineae*, *Catenulisporineae*, *Corynebacterineae*, *Frankinea*, *Glycomycineae*, *Jiangellineae*, *Kineosporineae*, *Micrococcineae*, *Micromonosporineae*, *Propionibacterineae*, *Pseudonocardineae*, *Streptomycineae* et *Streptosporangineae*. De plus, le séquençage des gènes de l'ARNr 16S a permis la reconnaissance de 39 familles et de 130 genres. Tous les groupes précédemment assignés au rang taxonomique de «ordre» ont été retrouvés comme étant strictement monophylétiques sur la base de critères moléculaires et chimiques, mais certains groupes paraphylétiques ont été trouvés dans le rang «sous-ordre». En effet, les arbres phylogénétique de gènes ARNr, qui ont été générés sans support *bootstrap* et peuvent donc inclure des ambiguïtés. Les caractéristiques de certains de ces genres sont résumées dans la figure 15 ci-dessous.

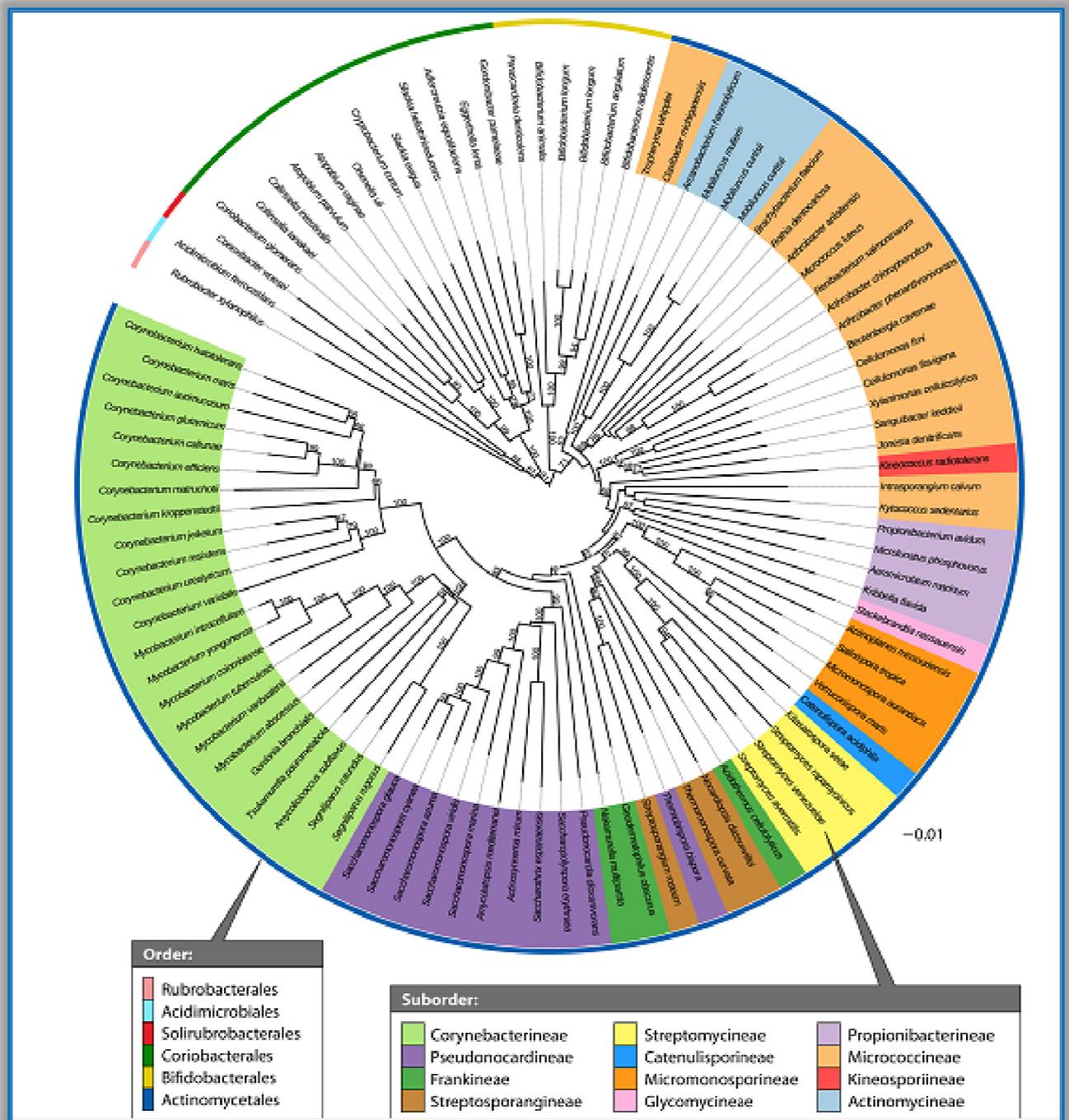


Figure 15 : Arbre phylogénétique basé sur 97 séquences du génome du phylum *Actinobacteria* (Barka et al., 2015).

II.3. Les actinomycètes en tant que sources de produits naturels

Les actinomycètes ont la capacité de produire de nombreuses substances biologiquement actives : antibactériennes, antifongiques, antivirales, antiparasitaires, herbicides, pesticides, antioxydantes et antitumorales. Les actinomycètes ont fourni de

nombreux composés bioactifs d'importance industrielle (Shivlata et Satyanarayana., 2015). (Figure 16).



Figure 16 : Applications potentielles des actinomycètes (Shivlata et Satyanarayana., 2015).

En fait, l'émergence des microbes multi-résistants aux antibiotiques a créé le besoin d'orienter la recherche vers de nouvelles molécules antibiotiques. Les actinomycètes constituent en effet une solution, elles produisent approximativement deux tiers de ces biomolécules (Bulter *et al.*, 2002). Ainsi, de nombreuses actinobactéries du sol synthétisent des substances antimicrobiennes dont 75% et 60% sont utilisés respectivement en médecine et en agriculture (Riedlinger *et al.*, 2006 ; Mehdi *et al.*, 2006), les Streptomycètes sont à l'origine de 75% de ces antibiotiques (Bulter *et al.*, 2003). A titre d'exemple, la platensimycine, synthétisée par une espèce de *Streptomyces platensis*, dans un extrait de

terre africaine représente une classe d'antibiotiques jusqu'ici inconnue ; Ce travail fût publié dans la revue renommée Nature (Wang et al., 2006). Les antibiotiques de cette nouvelle classe agissent en bloquant les enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras dont les bactéries ont besoin pour construire leurs membranes cellulaires. La platensimycine s'est révélée efficace contre des bactéries à Gram+ et contre les *Staphylococcus aureus* multi-résistants responsables de redoutables infections nosocomiales (Wang et al., 2006).

II.4. Les actinomycètes en tant que sources d'enzymes

Les actinomycètes produisent un certain nombre d'enzymes (pectinases, amylases, cellulases, xylanases) dont certains sont utilisés industriellement (Kumar et Suneetha., 2015; Janaki., 2017; Mukhtar et al., 2017). Les actinomycètes synthétisent aussi des glucanases, des peroxydases et des glutaminases (Tokala et al., 2002 ; Divya Teja et al., 2014). D'autres espèces sont capables de dégrader la lignine. L'espèce *Streptosporangium* sp. isolée à partir des feuilles de maïs produit des glucoamylases exploitées en industrie afin de dégrader l'amidon (Hasegawa et al., 2006). Les lipases sont aussi produites par certaines espèces actinomycétales (Sommer et al., 1997). La production d'enzymes chitinolytiques par *Streptomyces albovinaceus*, *S. caviscabies*, *S. griseus*, *S. setonii* et *S. virginiae* est considérée comme l'action antagoniste la plus efficace dans le contrôle de certaines maladies fongiques en raison de leur action directe sur les chitinases (Macagnan et al., 2008). Les protéases sont aussi parmi les enzymes les plus importantes, elles constituent plus de 65% des applications industrielles totales comme agents blanchisseurs dans les détergents ou dans la synthèse des peptides (Thumar et Singh., 2007). Certaines enzymes importantes sont brièvement décrites dans le **tableau 4**.

Tableau 04: Enzymes commercialement pertinentes produites par les actinomycètes et leurs utilisations potentielles (Shivlata et Satyanarayana., 2015).

Enzyme	Espèce d'actinobacteria	Température optimale et pH optimum	Applications industrielles
Pectinases	<i>Amycolata sp</i>	70°C et pH 10.3	Industrie textile
	<i>Streptomyces sp. S27</i>	60°C et pH 10.0	Industrie textile
Amylase	<i>Thermomonospora viridis TF-35</i>	60°C et pH 6.0	Détergent, Boulangerie
	<i>Thermomonospora curvata</i>	65°C et pH 5.5–6.0	Papier et pate, Industrie textile
Protease	<i>Saccharomonospora viridis SJ-21</i>	70°C et pH 9.0	Détergents Pharmaceutique
	<i>Nocardiopsis prasina HA-4</i>	55°C et pH 7–10	Brassage de cuir
Keratinase	<i>Actinomadura</i>	70°C et pH 10.0	Brassage de cuir
	<i>keratinilytica Cpt29</i>		Utilisation pharmaceutiques
	<i>Thermomonospora curvata</i>	65°C et pH 6.0	
Xylanase	<i>Thermomonospora fusca</i>	60°C et pH 7.0	Papier et pâte Boulangerie
	<i>Kocuria sp. RM1</i>	30–85°C et pH 4.5–9	Alimentation des animaux
	<i>Streptomyces sp. Ab 106</i>	60°C et pH 9.0	
Acetyl xylan esterase	<i>Thermobifida fusca NTU22</i>	80°C et pH 8.0	Papier et pate
Dextranase	<i>Streptomyces sp. NK458</i>	60°C et pH 9.0	Moulins à sucre
Nitrile hydratase	<i>Pseudonocardia thermophila JCM 3095</i>	Thermostable (50–80°C)	Production d'acrylamide
Laccase	<i>Thermobifida fusca BCRC 19214</i>	Stable à 50°C et pH 10.0	Traitement des déchets Traitement de teinture textile
Carbon-monoxide dehydrogenase	<i>Streptomyces sp. strain G26</i>	69°C	Génération de bioénergie Biofiltres

II.5. Les actinomycètes thermophiles producteurs des pectinases

Les enzymes industrielles sont obtenues par extraction à partir de cellules animales, végétales et microbiennes. Cependant, seules les enzymes microbiennes produites par fermentation ont connu un essor considérable dans les industries agro-alimentaires (**Larrata-Garde., 1997**).

Les pectinases sont secrétées par une variété très large de micro-organismes incluant les bactéries et les champignons. Ces enzymes ont été mises en évidence chez d'autres organismes tels que les graines d'orges germées et chez certains microorganismes des ruminants (Protozoaires, bactéries anaérobies) (**Boulahrouf., 1988 ; Fonty et Forano., 1999**).

Cependant, les préparations pectinolytiques commerciales les plus étudiées en bioindustrie proviennent des bactéries et des champignons (**Kashyap et al., 2001**).

Les bactéries de la famille des actinomycètes thermophiles comme les *Thermomonosporacea* présentent certains avantages par rapport aux espèces mésophiles dans la biodégradation de la biomasse accumulée par la production d'enzymes thermostables capables de briser de nombreux composés organiques, grâce à leur capacité de catalyser des réactions à haute température et leurs grandes stabilités (**Shivlata et Satyanarayana., 2015**).

Les actinomycètes thermophiles retiennent particulièrement notre attention et semblent être d'excellents candidats producteurs des pectinases avec des propriétés intéressantes. Ces bactéries ont principalement pour habitat naturel le sol et le compost où elles jouent un rôle important dans la décomposition et la minéralisation des matières organiques et la biomasse végétale (pectine, lignine, cellulose, hémicelluloses...). Grâce à la production de nombreuses enzymes lytiques extracellulaires comme par exemple les pectinases, les amylases, les cellulases, les xylanases et les lipases (**Shivlata et Satyanarayana., 2015**).

Toutefois, Il existe peu de données disponibles sur les actinomycètes thermophiles producteurs de pectinases thermostables. Nous citons quelques exemples de la production des pectinases chez les espèces: *Streptomyces thermovulgaris* CR42 (**Niranjan et Dhala., 1981**), *Thermomonospora fusca* (**Stutzenberger, 1987**), *Amycolata* sp (**Bruhlmann, 1995**), *Streptomyces thermocarboxydus* (**Miyairi et al., 2003 ; Tonouchi et al., 2010**).

Selon l'étude bibliographique, aucune espèce appartenant au genre *Actinomadura* ayant une activité pectinolytique n'a été signalée. Nous signalons que peu de travaux de recherche sur d'autres activités enzymatiques chez quelques espèces appartenant à ce genre ont été publiés tels que : *Actinomadura* sp Cpt29 qui produit une kératinase (**Habbeche et al., 2013, 2014**) et les espèces *Actinomadura keratinilytica* T16-1 et *Actinomadura miaoliensis* qui

dégradent le polyester (poly D L-lactide ou PLA) (Tseng et al., 2009 ; Sukkhum et al., 2009a,b, 2012 ; Panyachanakul et al., 2017). Egalement un groupe Taiwanais a breveté (US 8.476,056 B2) une nouvelle espèce d'*Actinomadura* sp BC44T-5 qui dégrade le polyester (Hoang et al., 2013). Par ailleurs, d'autres travaux chez *Actinomadura* sp ont signalé la production d'une xylanase thermostable (Brzezinski et al., 1999 ; Taibi et al., 2012; Habbera et al., 2013).

Le **tableau 05** regroupe quelques pectinases thermostables chez les microorganismes thermophiles.

Tableau 05 : Origine et caractéristiques de quelques pectinases thermostables chez les microorganismes thermophiles.

Microorganisme d'origine	Type de pectinase	pH optimum et stabilité au pH	Température optimale et thermostabilité	Activité enzymatique	Référence
<i>Streptomyces sp. S27</i>	pectate lyase	pH optimum 10.0	Température optimale 60 °C conserve 70% de l'activité du pH 9 à 12 après préincubation à 37°C pendant 1h.	–	(Yuan et al., 2012)
<i>Thermomonospora fusca</i>	polygalacturonate lyase	pH optimum 10.45	Température optimale 60 °C	–	(Stutzenberger, 1987)
<i>Amycolata sp.</i>	pectate lyase	pH optimum 10.3	Température optimale 70 °C	–	(Bruhlmann et al., 1995)
<i>Streptomyces thermovulgaris CR42</i>	Endo-Polygalacturonase Lyase	pH optimum 9.6	Température optimale 55 °C	–	(Niranjan et Dhala, 1981)
<i>Streptomyces thermocarboxydus</i>	Endo-pectate lyase	pH optimum 9.0	Température optimale 50 °C stable à un intervalle du pH entre 6 et 10 pendant 10h à 30°C et pendant 15min à 50°C et à pH 6.	–	(Miyairi et al., 2004)
<i>Bacillus subtilis</i> ZGL14	pectinase	stable à pH 8.6–10.0	Activité résiduelle de 51, 40 et 22% après incubation 80°C pendant 60, 80 et 100 min.	52,372.52 U/mg	(Yu et al., 2017)

Tableau 05 : Origine et caractéristiques de quelques pectinases thermostables chez les microorganismes thermophiles (Suite)

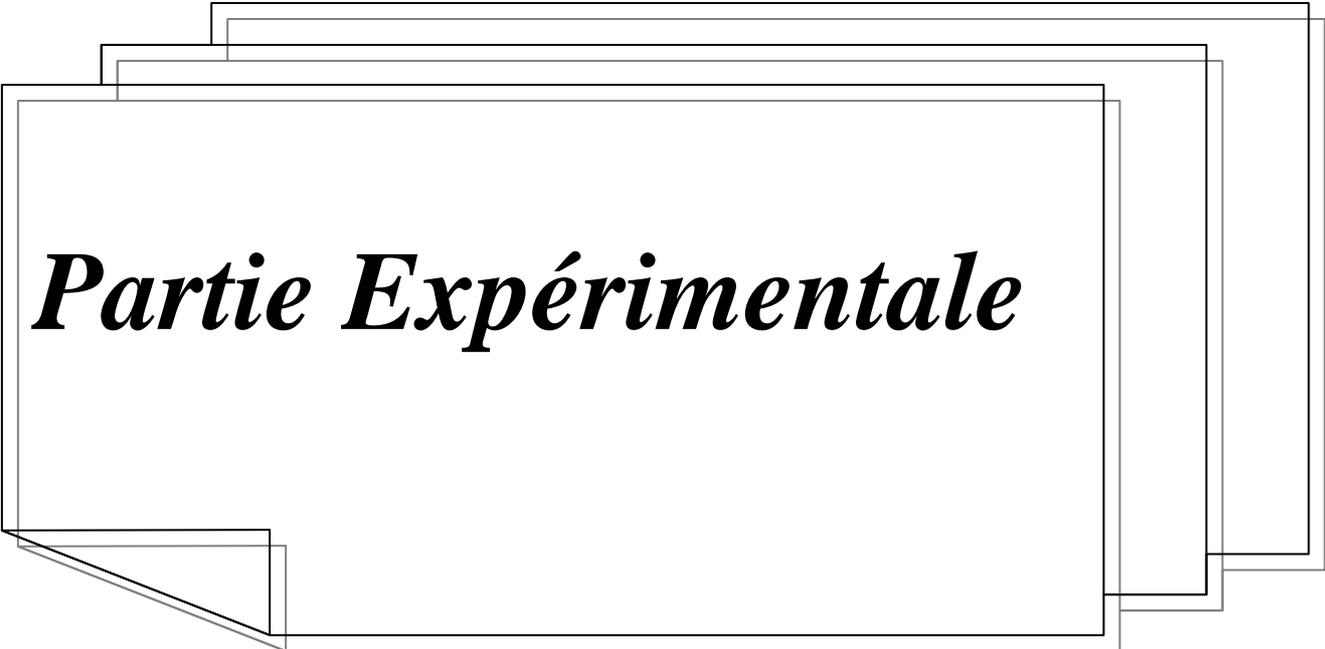
Microorganisme d'origine	Type de pectinase	pH optimum et stabilité au pH	Température optimale et thermostabilité	Activité enzymatique	Référence
<i>Sclerotium rolfsii</i>	Polygalacturonases PG1 et PG2	pH optimum 5.0	PG1 a un Temps de demi-vie $t_{1/2}$ de 20 min à 70°C et $t_{1/2}$ de 80 min à 50 °C	300 U/ml	(Schnitzhofer et al., 2007)
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> BR1	Pectate lyase	pH optimum alcaline	pH alcalin et les ions Ca^{2+} favorise la thermostabilité de PL purifiée à 60 et 70 °C	–	(Maisuria et Nerurkar 2012)
<i>Penicillium notatum</i>	Polygalacturonase avec son de blé comme substrat	pH optimum entre 4.5 et 6.0	Température optimale de 50 °C	1129.62 U/gds	(Amin et al., 2017)
<i>Penicillium occitanis</i>	Pectate lyase avec la pectin de pomme comme substrat	pH optimum 9.0	Température optimale de 60 °C	434 U/ml	(Damak et al., 2011)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Pectinase et polygalacturonase	pH optimum 4.0	Perte de 25% de l'activité après incubation pendant 10 min	1116 Ug^{-1} avec pectinase	(Phutela et al., 2005)
<i>Fres. MTCC 4163</i>	(PG) avec son de blé comme substrat	pH très alcalin et très acide	à 80 °C	et 1270 Ug^{-1} avec polygalacturonase	

Tableau 05 : Origine et caractéristiques de quelques pectinases thermostables chez les microorganismes thermophiles (Suite)

Microorganisme d'origine	Type de pectinase	pH optimum et stabilité au pH	Température optimale et thermostabilité	Activité enzymatique	Référence
<i>Aspergillus fumigatus</i> R6	Polygalacturonase en fermentation solide Avec son de riz comme substrat	Large gamme du pH de 3.0 à 8.0	–	565 U/g	(Wong et al., 2017)
<i>Aspergillus kawachii</i>	Deux exo-polygalacturonase inductibles	pH optimum entre 3.0–4.0	Exo PG1 à pH 4.0 après 2h d'incubation à 37, 50 et 60 °C a une activité résiduelle de 95, 79 et 54%	45 U/mg-ExoPG1 32 U/mg-ExoPG2	(Byrne et al., 2017)
<i>Aspergillus niger</i>	Pectin lyase Dans un milieu liquide à 1% de pectine pure	Garde 60–90% de son activité à pH entre 6.2–9.2	Stable à 70 °C avec environ 82% d'activité pectinase à 100 °C	24 U/ml avec 2.5% de pectine	(Khatri et al., 2015)
<i>Aspergillus giganteus</i>	Polygalacturonase (PG) dans un milieu Vogel liquide avec pectin de citron	pH optimum 6.0, très stable a pH alcalin et acide	Température optimale de 55–60 °C, Temps de demi-vie $t_{1/2}$ de 115, 18 et 6 min à 40, 50 et 55 °C, respectivement	419.4 U/mg	(Pedrolli et Carmona 2010)
<i>Acrophialophora nainiana</i>	Pectinases, Culture à 0.5% pectin de citron	pH optimum 8.0	Température optimale de 60 °C, $t_{1/2}$ de 7jours à 50 °C	286.63 nkatal/mg	(Celestino et al., 2006)

Tableau 05 : Origine et caractéristiques de quelques pectinases thermostables chez les microorganismes thermophiles (Suite)

Microorganisme d'origine	Type de pectinase	pH optimum et stabilité au pH	Température optimale et thermostabilité	Activité enzymatique	Référence
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Polygalacturonase En culture submergé avec marc de tomate comme déchets de l'agriculture	Large gamme de pH entre 5.0 et 10.0	Stabilité à une large gamme de température (5–90 °C) avec une température optimale de 60 °C	25.75 U/mL	(Bennamoun et al., 2016)
<i>Bacillus sp. RN1</i>	pectate lyase	pH optimum 10.0	Température optimale 90 °C	–	(Sukhumsirchart et al., 2009)
<i>Thermotoga maritima</i>	Exo-pectate lyase	pH optimum 9.0	Température optimale 90 °C Temps de demi-vie t _{1/2} de 2h à 95 °C.		(Kluszens et al., 2003)
<i>Bacillus sp. I4</i>	Pectate lyase	pH optimum de 10.5 ~ 11.0 Stable à pH 7 à 11 et garde 80% de l'activité après préincubation à 37°C pendant 1h.	Température optimale de 50 °C, Temps de demi-vie t _{1/2} de ~60 min à 70 °C	-	(Zhou et al., 2012).



Partie Expérimentale



Matériel et méthodes

MATERIEL ET METHODES

III.1. Echantillonnage et isolement des espèces d'actinomycètes thermophiles

III.1.1. Prélèvement des échantillons

Le prélèvement des échantillons pour le screening des actinomycètes à activités pectinolytiques a été réalisé à partir de deux sites différents du Nord-Est Algérien, durant l'hiver (Février 2008) dans des conditions d'asepsie.

Deux échantillons provenant de deux fermes étatiques: l'unité d'engraissement des poulets de chair, appartenant au Groupe Avicole de l'Est (G.A.E) et la Société des Abattoirs de l'Est (S.A.E). Les deux fermes sont proches de la route des salines (GPS : 36° 50' N' 7° 56' E') (Route nationale N° 44, Gharbi Issa 3 Km à l'Aéroport Rabah Bittât). Les prélèvements ont été effectués à partir du compost après avoir écarté les quinze premiers centimètres de ce dernier, l'échantillon (environ 50g) est déposé à l'aide d'une spatule stérile, dans des capsules stériles. Au niveau de cette couche se concentrent les actinomycètes, vu sa richesse en matières organiques. Ainsi, elle se caractérise par une température élevée exercée par des réactions exergoniques dues au processus de la dégradation de la matière organique, ce qui implique un meilleur développement des actinomycètes en général et particulièrement ceux qui sont thermophiles (**Williams et Wellington., 1982 ; Goodfellow et Williams., 1982 ; Williams et al., 1984 ; Michaud., 2007**). Les différents sites de prélèvement sont localisés par la technologie **Google Earth (Figure 17)**.

Ces échantillons seront utilisés ultérieurement pour l'isolement des actinomycètes.



Figure 17 : Localisation des sites de prélèvement par Google Earth

X₁: Situation géographique de l'unité d'engraissement des poulets de chair appartenant au Groupe Avicole de l'Est (G.A.E) et la Société des Abattoirs de l'Est (S.A.E) Algérien (Wilaya d'Annaba) : est située proche de la route des salines (N 44, Gharbi Issa 3 Km à l'Aéroport Rabah Bittât). (**X₁** : échantillon 1 **X₂**: échantillon2)

<http://maps.google.com/>.

III.1.2. Prétraitement des échantillons

Les actinomycètes ont une croissance relativement lente par rapport aux bactéries non mycélienne et leurs colonies ne sont pas envahissantes comme celles des champignons. Ainsi, la forte compétition exercée par les autres bactéries dont le nombre, très important et la croissance très rapide, empêche la majorité des actinomycètes de croître. Pour cela, les différents échantillons ont subi des prétraitements physiques (température) et chimique (utilisant le CaCO_3) pour augmenter le rapport actinomycètes/autres microorganismes (Williams et Cross., 1971 ; Williams et Wellington., 1981). Les différents types de prétraitements sont présentés dans le **tableau 06**.

Tableau 06 : Différents types de prétraitements chimiques et physiques et les milieux d'isolements

TYPES DE ESPÈCES	MILIEUX D'ISOLEMENT	ANTIBIOTIQUES ADDITIONNES EN µg/ml DU MILIEU	PRÉTRAITEMENTS ET INCUBATION DES ECHANTILLONS	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
ACTINOMYCETES THERMOPHILES	ISP4 (<i>International Streptomyces Project</i>)	Actidione Nystatine (50µg/ml)	0,1 g CaCO ₃ pour 1 g d'échantillon Incubation à 55°C	Williams et Cross (1971). Williams et Wellington (1982).
	Caséine- Amidon	Rifampicine (0.5µg/ml)	Pendant 4 jours	

III.1.3. Isolement des espèces d'actinomycètes autochtones

III.1.3.1. Milieu de dilution

Les actinobactéries sont isolées à partir d'une solution mère, en mélangeant 5g de l'échantillon avec 45 ml de solution Ringer stérile diluée au ¼ (Rodier., 2009 ; Sahin et al., 2002). Cette solution est agitée au vortex en présence de billes de verres stériles de 5 mm de diamètres pendant 10 min (Kitouni., 2007). Une série de dilutions allant de 10⁻² à 10⁻⁵, est effectuée pour réduire la concentration microbienne de la solution mère (Goodfellow et Alderson., 1979 ; Goodfellow et al., 1987).

III.1.3.2. Milieux et conditions d'isolement

Deux milieux différents qui sont le milieu ISP₄ et le milieu caséine-amidon (Annexe I) additionnés d'actidione et de nystatine (antifongiques) à une concentration de 50µg/ml et de rifampicine (antibiotique) à une concentration de 0,5 µg/ml sont utilisés pour l'isolement des actinomycètes. Le pH des deux milieux est ajusté à 7,2 avant stérilisation.

Les deux milieux sont ensemencés à raison de 0,2 ml de chaque dilution par boîte de Pétri (trois boîtes pour chaque dilution) (Williams et al., 1983 ; Goodfellow et al., 1987). Les boîtes sont incubées à 45°C pendant 7 à 10 jours dans une enceinte humide développée au

laboratoire pour éviter la dessiccation des milieux. Les boîtes sont observées quotidiennement après le 3^{ème} jour d'incubation.

Après incubation, un dénombrement des populations par boîtes est effectué, les valeurs du dénombrement seront exprimées au niveau des résultats par nombre d'UFC (*Unité Forming Colony*) par gramme d'échantillon. Seules les valeurs entre 30 et 300 sont prises en considération (**Guiraud., 1998**).

Après numération, les espèces isolées sont repiquées sur le même milieu d'isolement; les bactéries ayant l'aspect filamenteux caractéristique des actinomycètes au microscope optique sont sélectionnées préférentiellement.

III.1.3.3. Purification des espèces

Cette étape permet l'obtention des espèces pures lorsque le milieu inoculé présente une multitude de colonies d'aspects différents et très variés. Plusieurs repiquages successifs sur le même milieu sont donc réalisés. L'ensemencement se fait par stries serrées qui vont en s'élargissant pour obtenir des colonies bien définies et distinctes (**Shirling et Gottlieb., 1966**). Toutes les colonies se rapprochant par leur aspect macroscopique aux actinomycètes sont observées au microscope. Celles appartenant aux actinomycètes sont repiquées, par la méthode des stries, sur les mêmes milieux que ceux de l'isolement. Cette dernière opération est répétée jusqu'à l'obtention de espèces pures.

La pureté des espèces est contrôlée par des examens microscopiques directs, après chaque repiquage. Il est préconisé d'éviter l'excès de repiquage, qui peut être à l'origine des mutations des espèces obtenues (**Hopwood., 1967 ; Chen., 1995**).

III.1.4. Conservation des isolats

III.1.4.1. Conservation par repiquage sur gélose incliné

Les espèces d'actinomycètes isolées et purifiées sont conservées par la méthode de repiquage sur gélose incliné, sur le milieu ISP₂ (**Annexe I**) coulé en pente dans des tubes à vis. Ces derniers sont incubés à 45° jusqu'à sporulation, puis conservés à 4°C dans un réfrigérateur, le repiquage est réalisé tous les deux mois (**Wink., 2001**).

III.1.4.2. Conservation des spores par congélation en glycérol

Les espèces sont ensemencées sur milieu gélosé, puis incubées jusqu'à sporulation, une suspension de spores est préparée par raclage de la surface de la culture puis conservée par congélation à -20°C en présence de glycérol à 40% comme agent cryoprotecteur (Guiraud., 1998 ; Wink., 2001).

III.1.4.3. Conservation des espèces par la méthode de stabilisation sur terre

Une troisième technique de conservation utilisée, c'est la technique de stabilisation sur terre ou (*Stock Soil Culture*), c'est une méthode plus simple, qui s'applique surtout à la conservation des *Streptomyces* et de certains champignons possédant des spores (Simon et Meunier., 1970).

La conservation des espèces se fait dans des tubes à vis à température ambiante, par ensemencement de spores, récupérées par raclage, sur le sol de jardin stérilisé après environ 40 cycles d'autoclavage (8h) à 120°C durant 20 min tout en gardant les espèces en état de dormance dans leur biotope naturel.

Cette méthode de conservation présente quelques avantages, d'une part elle est préconisée pour les actinomycètes telluriques, d'autre part grâce à ce procédé, on assure la conservation convenable des espèces pendant une longue période qui peut atteindre une vingtaine d'années. Elle est aussi économique, et ne nécessite pas d'énergie de conservation (réfrigération) (Simon et Meunier., 1970).

III.5. Identification taxonomique de l'espèce d'actinomycète sélectionnée

III.5.1. Études morphologiques et observation microscopique

Les isolats obtenues sont identifiées en se basant sur leurs caractères culturaux et morphologiques sur des milieux de culture gélosés spécifiques (milieu ISP: ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP6 et ISP7) de *l'International Streptomyces Project*. Ces milieux sont préconisés par Shirling et Gottlieb (Pridham et Gottlieb., 1948 ; Shirling et Gottlieb., 1969). La préparation et la conservation des milieux de culture utilisés sont présentés dans l'annexe I.

Après 7, 14 et 21 jours d'incubation, l'importance de la croissance et le développement du mycélium aérien sur chaque milieu sont observés. La pigmentation du mycélium aérien et celui du substrat, ainsi que la production des pigments mélanoides est notée.

III.5.1.1. Critères micro morphologiques

Toutes les colonies qui apparaissent sont systématiquement observées au microscope optique afin d'apprécier certains caractères propres aux actinomycètes.

L'observation microscopique des espèces se fait à partir du milieu ISP3, milieu favorisant la sporulation, ce milieu est choisi comme référence selon la clé de Nonomura (**Shirling et Gottlieb., 1966, 1969**). Deux examens sont réalisés, l'un direct entre lame et lamelle, et l'autre indirect au fort grossissement après montage. Cette méthode permet ainsi de déterminer le genre de chaque espèce.

➤ **Observation directe à faible grossissement**

Les espèces sont observées directement en utilisant l'objectif X10 et X40, et parfois X60 pour une meilleure observation des structures mycéliennes. Cette étude permet de donner une idée sur la structure morphologique des bactéries et leurs mobilités. Le montage se fait entre lame et lamelle avec une goutte d'eau physiologique stérile (**Larpen et Larpen-Gourgand., 1997 ; Dellaras, 1998**).

***Mode opératoire :**

- Mettre une goutte d'eau physiologique sur la lame.
- Prélèvement d'un échantillon à partir d'une colonie bactérienne à l'aide d'une anse de platine stérile.
- Déposer et étaler la colonie sur la goutte d'eau physiologique.
- Recouvrir avec une lamelle propre de manière à éviter les bulles d'air
- Observer sous microscope optique à grossissement (X 10) puis (X 40) et (X 60)

➤ **Observation a fort grossissement**

La coloration de Gram c'est une coloration différentielle liée à la composition de la paroi, qui se pratique au fort grossissement (X100). Cette technique permet de différencier les bactéries à Gram (+) qui sont colorées en violet, des bactéries à Gram (-) qui sont colorées en rose. Elle permet également l'identification de la forme des chaînes de spores et mycélium

(Larpent et Larpent-Gourgand., 1997 ; Guiraud., 1998). Sachant que les actinomycètes sont des Bactéries à Gram + (Prescott., 2002).

***Mode opératoire :**

***Préparation des frottis :**

Sur des lames en verre propres, des frottis des espèces isolées sont réalisés par fixation à la chaleur en les passant, par mouvements rapides, trois à quatre fois sur la flamme du bec Bunsen (Larpent et Larpent-Gourgand., 1997 ; Dellaras, 1998).

***Coloration de Gram :**

C'est un procédé qui permet de diviser les bactéries en deux groupes distincts : les bactéries à coloration de Gram positif et les bactéries à coloration de Gram négatif. Cette coloration permet en plus de préciser la morphologie et le mode de groupement des cellules (Larpent et Larpent-Gourgand., 1997 ; Dellaras, 1998).

***Technique :**

- Colorer le frottis préparé sur les lames par la solution de violet de Gentiane, pendant une minute.
- Laver doucement la lame avec l'eau distillée.
- Recouvrir la lame d'une solution de Lugol durant 30 secondes.
- Laver la lame à l'éthanol jusqu'à ce que la dernière goutte soit transparente, cette étape engendre l'aspect différentiel de la coloration de Gram.
- Rincer rapidement à l'eau distillée et recouvrir la lame par la Fuschine pendant 1 minute.
- Laver abondamment à l'eau.
- Sécher la lame à l'aide d'un papier buvard.
- Les lames sont examinées sous microscope à immersion (objectif X100), après avoir déposé une goutte d'huile de cèdre sur la lame.

***Lecture :**

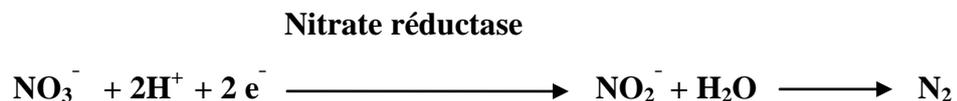
Les bactéries à Gram négatif apparaissent colorées en rose tandis que les bactéries à Gram positif sont colorées en violet (Guiraud., 1998 ; Prescott., 2002).

III.5.2. Identification biochimique

III.5.2.1. Réduction du nitrate

La nitrate réductase est recherchée selon la méthode de Griess (**Guiraud., 1998**). Ce test nous permet de mettre en évidence chez les bactéries aérobies une particularité de vie anaérobie (**Djlouat., 1990**). La réduction des nitrates en nitrites indique la présence du nitrate réductase. Il se forme une coloration rose à rouge claire suite à l'addition des réactifs I ou réactif Nit I (solution acide parasulfaniqu) et réactif II ou réactif Nit II (α naphthylamine) (**Guiraud., 1998**).

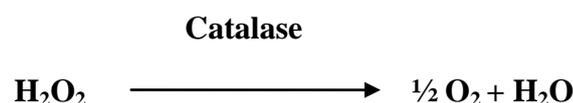
L'espèce estensemencée dans des tubes stériles contenant le bouillon nitraté et incubés à 45°C pendant 48h. A chaque tube trois gouttes de réactif Nit I et trois gouttes de réactif Nit II sont ajoutées (**Guiraud., 1998**).



En absence de coloration rouge, quelques points de spatule de poudre de zinc sont ajoutés : l'apparition de la coloration rouge indique que le test est négatif (les nitrates du milieu ne sont pas réduits par les espèces isolées). En absence de coloration, le test est considéré comme positif (les nitrates sont réduits au-delà du stade des nitrites : N_2) (**Djlouat., 1990**).

III.5.2.2. Recherche de la catalase

Ce test permet de mettre en évidence la capacité des microorganismes à décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). A l'aide d'une anse de platine, on décolle une colonie, qu'on dissocie dans une goutte de H_2O_2 . La présence de l'enzyme est révélée par la formation de bulles d'oxygène, résultant de la décomposition du peroxyde de l'hydrogène.



III.5.2.3. Système de galeries API 20E

Le Système de galeries biochimiques standardisées et miniaturisées API20E (Bio Merieux), permet l'identification des *Enterobacteriaceae* essentiellement, mais qui peut s'appliquer pour le groupe des actinomycètes (**Wink., 2001**).

La galerie API20E comporte 20 micro-tubes qui renferment des substrats sous forme déshydratés. Les différents tubes sont inoculés à l'aide d'une suspension de la bactérie à identifier, qui reconstitue le milieu réactionnel. Les réactions produites pendant la durée de l'incubation se traduisent soit par un virage spontané du milieu ou bien par virage révélé par l'addition d'un réactif approprié (**Annexe I**).

***Mode opératoire**

Le mode opératoire de la galerie API20E est présenté dans l'**annexe I**.

***Préparation des galeries**

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la bactérie sur la languette latérale de la boîte.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

***Préparation de l'inoculum**

Ouvrir une ampoule de suspension Medium (5ml) et réaliser une suspension homogène avec la colonie isolée sur milieu gélosé.

***Inoculation de la galerie**

- Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, et GEL.
- Remplir uniquement les tubes des autres tests.
- Créer une atmosphère anaérobie dans les tests : ADH, LDC, ODC, H₂S et URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation et incuber à 45°C pendant 24h à 72h.

***Lecture**

- La lecture de la galerie se fait en se référant au tableau de lecture dans l'**annexe I**.
- Les réactifs utilisés lors de la lecture sont présentés dans l'**annexe I**.

***Important**

1. Une très légère couleur jaune est également positive.
2. Une couleur orange apparaissant après la période d'incubation doit être considérée négative.
3. Lecture dans la cupule (zone aérobie).
4. La fermentation commence dans la partie inférieure des tubes, l'oxydation commence dans la cupule.
5. Une légère coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être lue négative.

III. 3. Critères physiologiques

III. 3. 1. Production des pigments mélanoides

Les milieux ISP6 et ISP7 ont été utilisés pour l'observation de la production ou pas de pigments mélanoides par comparaison des boîtes témoins non ensemencées, sur lesquelles on remarque la formation de pigments mélanoides qui se traduit visuellement par une coloration brune à noire du milieu de culture. L'observation des boîtes se fait dès le 2^{ème} jour d'incubation (**Wink., 2001**).

III. 3.3. Test du pH

L'espèce sélectionnée est cultivée sur milieu ISP2 liquide en tubes à essai à raison de 5ml/tubes pour une gamme de pH allant de 2 à 10 et incubés à 45°C, pendant 7 jours (**Wink., 2001**). Le pH du milieu est ajusté par addition de NaOH ou HCl.

III. 3.4. Test de la tolérance au NaCl

La culture de l'espèce sélectionnée se fait sur milieu ISP2 liquide additionné de NaCl à des concentrations de 2.5%, 5%, 7.5% et 10%. L'incubation se fait à 45°C pendant 7 jours.

III.4. Identification moléculaire et analyse phylogénétique de l'espèce sélectionnée

Les techniques conventionnelles utilisées (chimiotaxonomiques, biochimiques, physiologiques et morphologiques) n'ont pas permis d'identifier l'espèce d'actinomycète thermophile. Nous avons donc utilisé une technique moléculaire plus performante basée sur l'ARNr 16S (**Gurtler et Stanisich, 1996**), ainsi que son séquençage et son alignement par le logiciel BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (**Altschul et al., 1990**), ce qui permet d'identifier le genre et l'espèce de cette espèce. Cette partie de travail est effectuée au niveau du laboratoire LBME du Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS) Tunisie.

III.4.1. Extraction de l'ADN génomique de l'espèce sélectionnée

A partir d'une boîte de Pétri, une colonie de l'espèce sélectionnée est mise en culture sur milieu ISP₂ liquide (**Annexe 1**) à 45°C pendant 24h. Les cellules jeunes obtenues après incubation sont utilisées pour l'extraction de l'ADNg par la méthode de **Gurtler et Stanisich (1996)**. Le protocole détaillé utilisé pour l'extraction de l'ADN figure dans la partie **annexe II**.

III.4.2. Analyse de l'ADNg par électrophorèse sur gel d'agarose

Cette technique permet de séparer les fragments d'ADN selon leurs tailles. L'électrophorèse d'ADN est réalisée sur gels d'agarose à des concentrations variables. Généralement le plus souvent utilisé est le gel d'agarose à 1%. L'agarose est fondu dans un tampon à pH 8,0 [TAE 1× (40mM Tris-acétate et 5mM EDTA) ou TBE 1× (90mM Tris-borate et 20mM EDTA)], auquel on ajoute du bromure d'éthidium (BET) à une concentration finale de 0,5µg/ml. La migration se fait dans un champ électrique à voltage constant. Le BET est un agent intercalant à l'ADN qui fluoresce quand il est excité par des rayons U.V à 254 ou 365nm. Il permet donc de détecter au moyen d'un trans-illuminateur la présence d'ADN.

L'étalonnage du gel est effectué grâce au dépôt, dans un puits, d'un marqueur de poids moléculaire (Ladder : 1 kb, 100 pb ou encore λ/HindIII etc) constitué d'un mélange de fragments d'ADN linéaires de tailles connues permettant l'analyse ultérieure de la taille et la concentration des échantillons.

III.4.3. Dosage de l'ADN

Selon la pureté de l'échantillon, la quantité d'ADN peut être déterminée soit par spectrophotométrie, soit par estimation de la concentration après électrophorèse sur gel d'agarose.

➤ Méthode spectrophotométrique

La lecture des densités optiques est effectuée à 280nm et à 260nm, en utilisant un Spectrophotomètre UV/Vis, ou un appareil spécifique : le Nanodrop. Une unité d'absorbance correspond à une concentration de 50µg/ml d'ADN double brin. La pureté de l'ADN est estimée par le rapport DO₂₆₀/DO₂₈₀. Ce rapport doit être compris entre 1,8 et 2. Quand la valeur est < 1,8, la solution d'ADN est considérée comme étant contaminée par des protéines.

➤ Méthode utilisant la fluorescence émise par le BET (méthode empirique)

L'intensité de la fluorescence émise par les molécules de BET intercalées au sein de l'ADN est proportionnelle à la masse totale de ce dernier. Ainsi, la quantité d'ADN présente dans l'échantillon est estimée par comparaison de la fluorescence de l'échantillon et celle d'une gamme de concentration connue après électrophorèse sur gel d'agarose.

III.4.4. Amplification du fragment d'ADN de l'ARNr 16S par la technique PCR

La réaction de Polymérisation en chaîne (PCR) est une technique qui permet l'amplification spécifique d'une séquence d'ADN grâce à deux amorces nucléotidiques synthétiques, qui sont :

5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' et 5'-AAGGAGGTGATCCAAGCC-3'.

Ces amorces s'hybrident avec des séquences complémentaires bordant la séquence à amplifier dont l'un sert pour polymériser le brin "sens" et l'autre le brin "anti-sens". Chaque cycle de polymérisation comprend: une étape de dénaturation de la matrice, une étape d'hybridation des oligonucléotides à la matrice et enfin une étape de polymérisation par la *Taq DNA Polymérase*. Le volume du milieu réactionnel de la PCR est généralement de 50µl contenant 0,5 à 1 unités de l'ADN polymérase, 100 à 500ng de l'ADN matrice, 10 à 20 picomoles de chacun des deux amorces (sens et antisens), 0.2 mM de chacune des bases dNTP, 2 mM MgCl₂ dans le tampon de la Taq fournis par le fabricant. Le mode opératoire est bien détaillé dans l'**annexe II**.

III.4.5. Préparation de l'ADN plasmidique (ADNp)

La méthode utilisée pour la préparation et la purification d'ADNp est la lyse alcaline. Une mini-préparation d'ADN (1 à 3ml) lors de la sélection de transformant après un clonage et une midi-préparation (20ml) ou une maxi-préparation (100ml) nous permet de purifier un ADN de meilleure qualité et en plus grande quantité, utilisée par exemple pour le séquençage ou pour un clonage. Le principe des midi- ou des maxi-préparations demeure le même que celui des mini-préparations. Le protocole utilisé est une modification de la technique de lyse alcaline (**Sambrook et al., 1989**). (La technique est détaillée dans l'**annexe II**).

III.4.6. Clonage du fragment d'ADN de l'ARNr 16S chez *E. coli*

Le clonage se déroule en deux étapes. La première étape est la ligation entre le gène d'intérêt et le plasmide commercial pGEM-T Easy (3015pb) (**Annexe II**). La ligation consiste

à insérer le fragment dans le plasmide commercial *pGEM-T Easy* (3015pb) (*Promega*), par la suite on procède à la transformation sur boîte chez *E.coli* pour obtenir un clone recombinant suivie d'une Miniprep et extraction de l'ADNp (**Sambrook et al., 1989**). Le détail de la technique figure dans l'**annexe II**.

III.4.7. Séquençage automatique de l'ADNp contenant le fragment

Le séquençage automatique est réalisé par l'utilisation de deux amorces externes Oligo D-73 et Oligo R-74 dont les séquences appartiennent aux régions conservées de ce gène, respectivement de 8 à 27 et de 1541 à 1525 de l'opéron d'ARNr chez *E. coli* (**Tableau 07**). Pour compléter le séquençage, on utilise deux amorces nucléotidiques internes; Oligo D-156 et Oligo R-157 (**Tableau 7**) qui vont compléter le séquençage interne. Par la suite, on apporte des corrections manuelles aux chevauchements des nucléotides par utilisation du logiciel *BioEdit* pour obtenir la séquence finale du gène ARNr 16S. Cette séquence finale servira pour l'identification de l'espèce par l'outil de bioinformatique.

Tableau 07 : Les séquences des différents oligonucléotides utilisés dans cette étude pour les amplifications du gène de l'ARNr 16S de l'espèce sélectionnée

OLIGO-NUCLEOTIDE	SEQUENCES D'OLIGONUCLEOTIDE	TAILLE (PB)	Tm (°C)
Oligo D-S73	⁵ AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ³ '	20	48
Oligo R-S74	⁵ AAGGAGGTGATCCAAGCC ³ '	18	51
Oligo D-S156	⁵ ATTCCACGTGTAGCGGTG ³ '	18	52
Oligo R-S157	⁵ ATCTCACGACACGAGCTG ³ '	18	52

III.4.8. Identification par alignement et analyse phylogénétique des séquences nucléotidiques avec les banques de données

L'analyse phylogénétique a été réalisée par comparaison des séquences d'ADN codant pour l'ARNr 16S des bactéries phylogénétiquement proches dont la séquence est déposée dans les banques de données : GenBank (USA), utilisant les programmes BLAST (NCBI, USA) disponibles sur le site du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Par la suite, ces séquences ont été analysées par le logiciel (MEGA) version 4.1, pour déterminer l'arbre

phylogénétique et la parenté de l'espèce d'actinomycètes étudiée. Les distances et les grappes ont été calculées en utilisant la méthode *neighbor-joining* et l'analyse de *Bootstrap* a été utilisée pour évaluer la topologie de l'arbre phylogénétique des données (**Tamura et al., 2007**). Ce programme effectue une recherche rapide dans les banques de séquences nucléiques et protéiques combinée avec une estimation rigoureuse des statistiques pour apprécier la signification des similitudes par alignement local.

III.5. Recherche de l'activité pectinolytique

III.5.1. Mise en évidence de l'activité pectinolytique en milieu liquide

A partir d'une colonie cultivée sur milieu Horikochi solide à base de pectine (HP), les espèces sont repiquées sur milieu HP liquide, ce milieu est celui de Horikochi (HP) modifié par Kuhad et al (**2004**) (**Annexe I**).

Des Erlenmeyers de 500ml contenant 100 ml de milieu liquide sontensemencés et incubés sous agitation (180rpm) dans un Shaker (*Thermo Scientific Max Q4000*) à 45°C pendant 48 heures afin d'avoir un pré-inoculum. 2ml de ce dernier (ou 1ml d'une suspension de spores à raison de 10^6 spores/ml) est introduit stérilement dans des Erlenmeyers de 500 ml contenant 100ml de milieu liquide HP, incubé dans les mêmes conditions pendant 5 jours.

L'activité pectinolytique est détectée directement dans le milieu de culture ou sur le milieu réactionnel selon les méthodes ci-dessous :

III.5.2. Mise en évidence de l'activité pectinolytique sur milieu solide

Afin d'évaluer l'activité pectinolytique chez les espèces isolées, nous avons utilisé un milieu de culture dérivé de celui de Horikoshi, à base de pectine de citrus estérifiée à 85 % (*Sigma* N° 9135) comme seule source de carbone à une concentration de 5g/l (**Horikoshi et Akiba., 1982**) modifié par **Kuhad et al (2004)** (**Annexe 1**). Le milieu de culture est ajusté à pH 7.4 par le réactif Na_2CO_3 et additionné de 20g/l d'agar. Le milieu est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes, puis coulé dans des boîtes de Pétri. Après ensemencement, l'incubation se fait pendant 3 à 5 jours dans une étuve thermostatée à 45°C sous une enceinte humide pour éviter la dessiccation du milieu.

L'activité pectinolytique est détectée par le bromure d'hexadécyl triméthylammonium (CTAB). Ainsi, après trois à cinq jours d'incubation, la culture est recouverte d'une solution chaude (40°C) de 1% de CTAB dit « Cetavlon ou encore Cetrimide » (**Hankin et al., 1971**).

Après 20 minutes de contact et rinçage à l'eau distillée, la dégradation de la pectine est visualisée par l'apparition d'halos translucides autour des colonies alors que le fond reste opaque du fait de la complexation du CTAB avec la pectine non dégradée.

III.5.3. Méthodes analytiques de détection des activités pectinolytiques

L'activité des pectinases est déterminée directement dans le surnageant ou dans le milieu réactionnel. Les dépolymérase (polygalacturonases et / ou lyases) sont mises en évidence par la mesure du pouvoir réducteur par la méthode de Nelson et Somogyi (**Nelson., 1944; Somogyi., 1945**). L'activité est exprimée en unité internationale (UI) : correspondante au nombre de micromoles (μM) de sucres réducteurs libérés par minute. Ces derniers sont calculés à partir de la courbe d'étalonnage du galacturonate (**annexe III**).

L'activité des polygalacturonases et /ou des lyases est également mise en évidence par la méthode de l'acide thiobarbiturique (TBA) qui détecte les lyases à 550nm et les polygalacturonases à 515nm (**Weissbach et Hurwitz., 1959; Nedjma et al., 2001**).

Une autre méthode de détection des lyases se fait par mesure de l'absorbance en UV à 232 nm (**Albersheim et Killias, 1962; Collmer et al., 1988**).

Les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford (**Bradford., 1976**) et l'activité spécifique des enzymes est exprimée en UI par mg de protéines.

L'activité des pectinases est déterminée sur le milieu réactionnel :

- **Préparation du milieu réactionnel**

- Extrait enzymatique brut ou enzyme pure +/- dilué.....0.2ml
- APG à 0.2%, tampon Tris-HCl 50mM pH9 (Tampon A).....1.3ml
- CaCl_2 (100mM).....0.015ml

Le milieu réactionnel est maintenu dans un bain marie thermostaté à 55°C pendant 20 minutes. Toutes les lectures se font contre un blanc traité dans les mêmes conditions mais l'extrait enzymatique brut ou l'enzyme est remplacé par le tampon A. Le milieu réactionnel est utilisé pour la recherche de pectinases. L'étude comparative des activités enzymatiques des différentes espèces nous permet de sélectionner l'espèce la plus active pour la production et la purification de l'enzyme.

III.5.3.1. Recherche du pouvoir réducteur par la méthode de Nelson-Somogyi

III.5.3.1.1. Principe de la méthode

Les extrémités réductrices provenant de la dépolymérisation de la pectine réduisent le sulfate de cuivre en oxyde cuivreux qui réduit à son tour le réactif arséniomolybdique de Nelson avec formation du complexe arséniomolybdeux molybdique stable de coloration bleue mesurable au spectrophotomètre à 650nm. (**Annexe III**)

III.5.3.1.2. Mode opératoire :

- Milieu réactionnel0.25ml
- Réactif Somogyi0.50ml

Les tubes bouchés sont placés au bain-marie bouillant pendant 20 minutes. Au bout de ce temps, les tubes sont immédiatement refroidis sous un courant d'eau. On ajoute ensuite dans chaque tube :

- Réactif Nelson...0.25ml
- H₂O distillée3.00ml

L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 650nm.

L'activité est exprimée en μ moles de sucres réducteurs par prise de volume et par minute. Le nombre de μ moles de sucres réducteurs est déterminé à partir de la courbe d'étalonnage du galacturonate. Pour cela on a réalisé une courbe d'étalonnage de l'acide galacturonique (**Annexe III**)

III.5.3.2. Recherche des lyases et/ou polygalacturonases par le test TBA

III.5.3.2.1. Principe de la méthode

Ce test permet de mettre en évidence les oligogalacturonates saturés et insaturés libérés au cours de la dépolymérisation du substrat pectique en milieu liquide. On obtient une coloration rose avec les oligogalacturonates insaturés provenant de l'action des lyases avec un maximum d'absorption à 550nm et une coloration orangée avec les oligogalacturonates saturés provenant de l'action des polygalacturonases avec un maximum d'absorption à 515nm (**Weissbach et Hurwitz., 1959; Nedjma et al., 2001**). L'apparition de la coloration rose vif est une bonne présomption de la présence d'oligogalacturonates insaturés donc de lyases (**Ladjama., 1991**).

III.5.3.2.2. Mode opératoire

Le test est réalisé directement sur le filtrat et/ou sur le milieu réactionnel.

- milieu réactionnel 1ml
- NaOH 1N.....0.1ml

Les tubes sont d'abord bouchés et portés au bain-marie à 80°C pendant 5 minutes ; puis ils sont immédiatement refroidis sous un courant d'eau. On ajoute ensuite dans chaque tube

- Acide thiobarbiturique à 0.04M.....1ml
- HCl 1N.....1.2ml

Les tubes sont encore bouchés et portés au bain-marie à 80°C pendant 5 minutes. Puis ils sont immédiatement refroidis dans la glace. Les absorbances sont mesurées à des longueurs d'ondes de : 515nm et 550nm. L'activité enzymatique est exprimée en UI et calculé selon la loi de Beer Lambert. Le coefficient d'extinction molaire (ϵ) est de 54000 M⁻¹ L⁻¹cm⁻¹ d'après Nedjma et al (2001).

III.5.3.3. Recherche des lyases en UV à 232nm

Les lyases sont des groupes d'enzymes qui attaquent la pectine par le mécanisme de β -élimination et fait apparaître des oligomères insaturés (Δ 4-5) avec un maximum d'absorption à 232nm.

III.5.3.3.1. Mode opératoire

La lecture au spectrophotomètre à 232nm se fait directement sur l'extrait enzymatique brut ou sur le milieu réactionnel, avec ou sans dilution, contre le blanc, en utilisant une cuve en Quartz. L'activité enzymatique est exprimée en UI et calculée selon la loi de Beer-Lambert, avec un coefficient d'extinction molaire (ϵ) de 4600 M⁻¹ L⁻¹cm⁻¹ d'après Albersheim (Albersheim et Killias., 1962)

III.5.3.4. Détection des pectates lyases

Pour distinguer entre les pectine lyases et les pectate lyases un test basé sur l'éthylène diamine tétraacétique (EDTA) est utilisé. En effet, les pectate lyases sont inhibés par l'EDTA par chélation des ions de Ca²⁺ essentiel pour l'activité pectate lyases ; par contre, le calcium n'est pas essentiel pour l'activité pectine lyase. De ce fait, l'EDTA n'a aucun effet sur les pectine lyases. Une concentration de 10 mM d'EDTA est additionnée au milieu réactionnel dans les conditions standards de la réaction.

III.5.3.4. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Le dosage des protéines est réalisé par la méthode de Bradford (**Bradford, 1976**).

✓ Principe

On utilise le réactif bleu brillant de Coomassie (BBC) qui forme avec les protéines un complexe coloré présentant un maximum d'absorption à 595nm. Cette méthode permet de déterminer des concentrations de protéine allant de 1 à 20µg/ml. La coloration très sensible peut être effectuée très rapidement et reste stable pendant 30 minutes. On utilise le BBC-G250 (Merck) comme réactif et le sérum albumine bovine (SAB, Sigma) à raison de 0.1g/l comme standard pour la réalisation de la courbe d'étalonnage (**Annexe III**).

✓ Mode opératoire

- Le dosage des protéines a été effectué dans une fraction aliquote (100µl).
- Les prises de l'échantillon sont additionnées de la solution de Bradford (4ml).
- L'ensemble est agité et laissé reposer pendant 5 minutes pour stabiliser la coloration.
- La lecture des absorbances est réalisée à une longueur d'onde de 595nm contre un blanc où l'échantillon est remplacé par de l'eau distillée.
- A partir de la courbe d'étalonnage et en fonction de la dilution, on détermine la concentration en protéines exprimée en mg/ml de l'échantillon.
- Les différents tests sont effectués en trois répétitions (triplicata)

III.5.3.5. Détermination des activités spécifiques

L'activité enzymatique spécifique (AS) est déterminée à partir de l'activité enzymatique exprimée en micromoles (µM) de sucres réducteurs /volume (ml)/ minute, et la concentration des protéines en (mg/ml). Ainsi, l'activité spécifique est le nombre d'unité d'enzyme (UI) par unité de masse de protéines, exprimée en mg.

L'activité spécifique a été donc exprimée selon l'équation suivante :

$$AS = \frac{\text{Activité (UI)}}{\text{mg de protéine}}$$

L'unité internationale (UI) est définie comme : La quantité d'enzyme capable de transformer une µmoles (µM) de sucres réducteurs par minutes.

III.6. Choix de la source de carbone et d'azote pour la production de l'enzyme

III.6.1. Optimisation du temps de culture

L'espèce sélectionnée est cultivée sur milieu Horikoshi liquide à pH 7.4 en Erlenmeyers à baffles (déflecteur) de 500ml dans un Shaker thermostaté à 45°C sous agitation à 180 rpm. L'activité enzymatique spécifique (UI/mg protéines) est mesurée chaque jour pendant huit (08) jours d'incubation.

La cinétique de la croissance cellulaire a été contrôlée en mesurant l'absorbance à 600 nm à des intervalles de temps réguliers (6h). Le milieu de culture a été centrifugé pour éliminer le mycélium et les débris de milieu. Le surnageant a été utilisé comme solution enzymatique brute.

III.6.2. Choix de la source de carbone

L'effet de différentes sources de carbone à différents degrés d'estérification (Pectine de citron 85%, Pectine de pomme 90%, Acide polygalacturonique (0%), Ecorce d'orange (substrat naturel), sur la production de l'enzyme par l'espèce sélectionnée a été étudié, en utilisant le milieu d'Horikoshi additionné de différentes sources de carbone à 0,5% avec l'extrait de levure (0,5%) et le tryptone (0,5%) comme sources d'azote. Le pH initial du milieu a été ajusté à 7.4 par addition de Na₂CO₃ (0.1M). Les mesures des activités sont réalisées chaque 24h pendant 6 jours.

Par ailleurs la répression catabolique de la synthèse de l'enzyme par le glucose en présence de la pectine a été également étudiée. Pour cela, l'espèce d'actinomycète sélectionnée a été cultivée sur le milieu liquide d'Horikoshi contenant la pectine de citrus à 0.5% et le glucose à 0.5% comme sources de carbone.

III.6.3. Choix de la source d'azote

L'effet de différentes sources d'azote sur la production de l'enzyme par l'espèce sélectionnée a été également étudié en utilisant le milieu d'Horikoshi additionné de différentes sources d'azote (Peptone, Tryptone, Extrait de levure, Nitrate d'ammonium, Nitrate de Sodium, Urée, Chlorure d'ammonium, Sulfate d'ammonium, Acétate d'ammonium et Biotine) à raison de 0,2% avec la pectine de citron (0,5%) comme seule source de carbone. Le pH initial du milieu a été ajusté à 7.4. Les mesures des activités sont réalisées chaque 24h pendant 6 jours.

III.7. Mise au point d'un protocole de purification de l'enzyme

Afin de mieux caractériser l'enzyme à l'état pur, le surnageant de culture a fait l'objet d'un protocole de purification. Au bout de 5 jours d'incubation, la culture est arrêtée puis centrifugée à 5000g pendant 30 minutes pour séparer le mycélium du surnageant. Le surnageant a été concentré par évaporateur rotatif (Rotavap) sous vide à 45°C puis dialysé pendant une nuit contre un tampon Tris-HCl 10 mM, pH 8 (tampon B), avec renouvellement du bain de dialyse.

Le protocole de purification a été effectué en deux étapes: une chromatographie sur colonne mono Q par le système FPLC suivie d'une chromatographie sur une colonne de filtration sur gel, en utilisant le système HPLC.

III.7.1. Chromatographie sur colonne mono-Q FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography*)

C'est une méthode rapide de séparation des protéines selon leur charge. La colonne utilisée est une échangeuse anionique mono-Q-12 (*UNO-Q-12 column (15 × 68 mm) (Bio-Rad Laboratories, USA)*). Les étapes de cette chromatographie sont les suivantes :

- Equilibration de la colonne avec le Tris-HCl 20 mM, pH 8 (tampon C) ;
- Filtration de l'échantillon sur une membrane millipore (0.45 µm) ;
- Injection de l'échantillon (2ml) ;
- Rinçage avec le tampon C pour éliminer les protéines non fixées sur la colonne ;
- Elution des protéines fixées par un gradient linéaire de force ionique de 0 à 1 M de NaCl et conservation des fractions à 4°C pour d'éventuelles études. Le débit d'élution est de 3 ml/min. Les pics qui apparaissent sur le chromatogramme correspondent et à une élévation de l'absorbance à 280 nm ;
- Récupération des fractions (3ml) pour effectuer des dosages des activités pectinolytiques ;
- Détermination de l'activité spécifique (AS=UI/mg de protéines). Les protéines ont été quantifiées par la méthode de Bradford.

III.7.2. Chromatographie par filtration sur gel (HPLC : *High Performance Liquid Chromatography*)

C'est une méthode de séparation des protéines selon la masse molaire. Les protéines de grande masse moléculaire vont passer les premières et ainsi de suite, les petites protéines seront retardées.

Les fractions actives, obtenues de la colonne échangeuse d'ions sont rassemblées et concentrées par membrane millipore (Amicon Inc., Beverly, MA, USA, avec une membrane de 10-kDa cut-off), puis déposées sur une colonne de gel de filtration par HPLC (Pl aquagel OH-40 10 μ m column (300 \times 25 mm). La colonne est équilibrée par le tampon C (Tris-HCl 20mM, pH 8), l'élution a été effectuée à un débit de 5 ml/min avec le même tampon (tampon C). Les protéines sont suivies par mesure de l'absorbance à 280 nm. Ainsi l'activité spécifique (AS=UI/mg de protéines) a été mesurée. Les protéines ont été quantifiées par la méthode de Bradford.

III.7.3. Détermination de la masse moléculaire relative (M_r) de l'enzyme par électrophorèse en condition dénaturante (SDS-PAGE)

La masse moléculaire relative (M_r) de l'enzyme a été estimée par électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide (10 %) en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), au moyen d'un appareil «*Mini Protean*» de BIO-RAD. La technique est détaillée dans l'**annexe III**.

Le gel de polyacrylamide est préparé selon la méthode décrite par Laemmli (**Laemmli., 1970**). Les échantillons de protéines sont déposés après ajout de bleu dénaturant (1/10 du volume) et dénaturation pendant 5 min à 100°C. A la fin de la migration, à ampérage constant (entre 30 et 50 mA), le gel est démoulé et les protéines sont révélées par une solution de coloration (bleu de Coomassie : BBC-R250 à 0,25%) (*Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA*) pendant environ 1h suivi par décoloration complète du gel pendant une nuit par une solution de décoloration pour visualiser les bandes correspondantes aux protéines séparées.

III.7.4. Détection de l'activité pectinolytique par la méthode de Zymogramme

Après migration sur gel de polyacrylamide (10%), dans les conditions natives (PAGE), incorporant un substrat de l'APG à 0.2% dans le gel de séparation (en absence de SDS et sans traitement thermique des protéines avant le dépôt). Le gel est lavé dans de l'eau distillée pendant 1h et incubé pendant 2 h à 50°C en présence du tampon A, puis recouvert pendant

20min dans une solution de rouge de ruthénium à raison de 0,05% (**Annexe I**). Une zone claire est visualisée sur le gel traité, indique la dégradation de substrat.

III.7.5. Détermination de la séquence de l'extrémité NH₂-terminale de l'enzyme

La séquence N-terminale de l'enzyme purifiée est déterminée par la méthode d'Edman automatisée sur microséquenceur de protéines (**Hunkapiller et Hood., 1978; Hewick et al., 1981**).

Le séquençage de la partie NH₂-terminale de l'enzyme purifiée permet de savoir si l'enzyme a été bien purifiée et de comparer la séquence obtenue de l'enzyme étudiée par rapports aux autres pectinases microbiennes produites par d'autres microorganismes. L'alignement des différentes séquences par (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) permet de déterminer la similitude de cette enzyme par rapport aux autres pectinases étudiées chez d'autres espèces microbiennes. Le principe de la technique est détaillé dans **l'annexe III**.

III.7.6. Détermination du poids moléculaire de l'enzyme par spectrométrie de masse (MALDI-TOF/MS)

La spectrométrie de masse (MALDI-TOF/MS : *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry* : Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice en Spectrométrie de Masse) permet de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse mono-isotopique et de caractériser leur structure chimique, en les fragmentant. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Elle comporte une source d'ionisation suivie d'un ou de plusieurs analyseurs qui séparent les ions produits selon leur rapport m/z et les comptent (**Annexe III**).

III.8. Propriétés et caractérisation physicochimiques de l'enzyme purifiée

III.8.1. pH optimum d'action de l'enzyme

L'activité enzymatique à chaque pH a été étudiée par incubation de l'enzyme pure avec le polygalacturonate (APG) à 0.2% ; à pH 5 à 6 en présence de tampon Acétate, à pH 6 à 8 dans le tampon phosphate, à pH 8 à 9 dans le tampon Tris-HCl et pour une gamme de pH allant de 9 à 13 dans le tampon Glycine-NaOH. Les systèmes tampons ont été utilisés à 50 mM additionnés du Calcium à 1mM.

III.8.2. Effet du pH sur la stabilité de l'enzyme

La stabilité du pH de l'enzyme a été étudiée par pré-incubation dans des tampons de différentes valeurs de pH allant de 6 à 12 à la température ambiante pendant 24 h. Des aliquotes ont été récupérées et les activités enzymatiques résiduelles ont été déterminées dans les conditions standards. Les systèmes tampons suivants ont été utilisés à 50 mM: acétate de sodium à pH 5-6, phosphate à pH 6-8, Tris – HCl à pH 8-9, glycine – NaOH à pH 9-12. Le pH de tous les tampons a été équilibré à la température utilisée.

III.8.3. Température optimale d'action de l'enzyme

L'effet de la température sur l'activité Pel-20 a été étudié sur des températures allant de 50 à 100 °C pendant le test de réaction dans le tampon A et en utilisant APG comme substrat. Le mélange réactionnel est réalisé selon le même protocole décrit précédemment.

III.8.4. Effet de la température sur la stabilité de l'enzyme

La thermostabilité de l'enzyme est déterminée en mesurant l'activité résiduelle après incubation de l'enzyme (sans substrat) à des températures 70°C, 80°C, 90°C et 100°C pendant 24h en absence et en présence de Calcium à 1mM. Des aliquotes ont été prélevées à des intervalles de temps pour déterminer l'activité résiduelle. Le mélange est incubé dans les conditions optimales de la réaction pendant 30min d'incubation. Dans chaque cas, le substrat a été pré-incubé à la température désirée pendant 5 minutes. L'activité dans les conditions optimales (sans préincubation) (t=0) est considérée comme référence 100%.

III.8.5. Effet des ions métalliques

L'effet des ions métalliques sur l'activité de l'enzyme a été effectué au pH optimum et à la température optimale. Le substrat est constitué d'acide polygalacturonique à 0.2% additionné des différents ions (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Sn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , NH_4^+ , K^+ et Na^+) sous forme de chlorure de sels à une concentration de 1mM.

La concentration optimale du meilleur activateur a été également déterminée au pH optimum et à la température optimale de l'enzyme. Le substrat est l'acide polygalacturonique à 0.2% additionné du sel à des concentrations variant de 0 à 2mM.

III.8.6. Spécificité de l'enzyme vis-à-vis de substrats à différents degrés d'estérification

La spécificité de substrat de Pel-20 purifiée a été déterminée en utilisant de la pectine ayant différents degrés de méthylestérification (0, 32, 54, 72, 85 et ~90%) comme substrat, dans de tampon ammoniac, pH 10 à 50 mM. Ce tampon a été utilisé pour protéger les groupes méthoxy dans la pectine hautement estérifiée et pour éviter la dé-estérification de la pectine, comme cela a été observé dans des conditions fortement alcalines dans plusieurs études.

L'activité enzymatique contre divers substrats a été déterminée dans des conditions d'essai standards, tant que l'APG était substitué par les pectines estérifiées, celle contre l'APG étant prise pour 100%.

III.8.7. Analyse statistique

Les données représentent la moyenne de trois répétitions (Triplicata) indépendantes avec leur écart type (moyenne \pm DS) à l'aide de Microsoft Excel.

Les résultats ont été considérés comme statistiquement significatifs pour des valeurs de P inférieures ou égale à 0.05.



Résultats et Discussion

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Partie 01 : Mise en évidence et criblage de l'activité pectinolytique.

IV.1.1. Espèces isolées du compost de poulet

En se basant sur les clés d'identification classiques en l'occurrence, les caractères morphologiques (macroscopiques et microscopiques), physiologiques (production des pigments mélanoides, tolérance au NaCl, pH optimum de croissance) et biochimiques (activité Catalase et Nitrates réductase, galerie API20E), 29 espèces d'actinomycètes thermophiles isolées du compost de poulet de la région d'Annaba, sont identifiées et dénommées de Cpt1 à Cpt29 (**Tableau 08**). Toutes les espèces se présentent comme des colonies incrustées dans l'agar, sèches, ridées et bombées de différentes couleurs (**Figure 18**). L'examen microscopique montre que ces différentes espèces sont à Gram positif et présentent un mycélium ramifié stable (non fragmenté), toutes les espèces Cpt possèdent des chaînes de spores de type RF (*Rectus Flexibilis*) et ne possèdent pas de sporange. Ainsi, on remarque que toutes les espèces sont à Catalase positive et Nitrate réductase positive. Les espèces isolées poussent bien à la température d'isolement (45°C).

Ces différentes espèces ont alors fait l'objet du criblage de l'activité pectinolytique afin de sélectionner l'espèce la plus active pour une étude approfondie.

IV.1.2. Criblage de l'activité pectinolytique des espèces d'actinomycète isolées

Après cinq jours de culture sur milieu Horikoshi liquide à base de pectine, l'extrait brut est récupéré et incubé sur l'acide polygalcturonique (APG) comme substrat, l'activité pectinolytique est recherchée par l'apparition des sucres réducteurs qui sont mesurés par la méthode Nelson-Somogyi. Les résultats obtenus figurent dans le **tableau 08**.

Tableau 08 : Mise en évidence des pectinases chez les espèces d'actinomycètes thermophiles.

Espèce d'actinomycète	Activité enzymatique UI/ml	Espèce d'actinomycète	Activité enzymatique UI/ml
Cpt 1	55,57±5	Cpt 16	88,89±9
Cpt 2	63,23±6	Cpt 17	65,45±6
Cpt 3	68,66±7	Cpt 18	38,53±4
Cpt 4	79,78±8	Cpt 19	54,83±5
Cpt 5	90,65±9	Cpt 20	428,3±40***
Cpt 6	61,75±6	Cpt 21	120,53±12
Cpt 7	75,58±7	Cpt 22	99,29±10
Cpt 8	135,11±13	Cpt 23	60,26±6
Cpt 9	64,22±6	Cpt 24	71,38±7
Cpt 10	85,21±8	Cpt 25	64,46±6
Cpt 11	83,48±8	Cpt 26	47,18±4
Cpt 12	69,40±7	Cpt 27	62,74±6
Cpt 13	60,02±6	Cpt 28	70,64±7
Cpt 14	58,29±6	Cpt 29	95,59±9
Cpt 15	30,63±3	/	/

*** : Activité de l'espèce la plus active ; les activités des cinq espèces les plus actives sont indiquées en gras.

Le criblage de l'activité pectinolytique des différentes espèces d'actinomycètes sur milieu liquide (**tableau 08**) a permis de montrer que toutes espèces sont actives sur la pectine (soit 100% des espèces). L'examen du **tableau 08** montre que le niveau d'activité est situé entre 30,63UI/ml pour l'espèce Cpt15 et 428,3 UI/ml pour la Cpt20. Parmi ces espèces, cinq isolats (Cpt 29, Cpt 22, Cpt 21, Cpt 8 et Cpt20), semblent plus actives que les autres espèces. Notamment, la Cpt 20 donne une activité, la plus importante et qui est de l'ordre de 428 UI/ml soit 14 fois plus que la Cpt15 et 4,5 fois que la Cpt29.

Le test du criblage sur milieu solide à base de pectine est visualisé après 20 minutes de contact du réactif de bromure d'hexadécyl triméthyl ammonium (CTAB). L'examen de la **figure 19** montre des zones translucides autour des colonies sur un fond opaque, ce qui prouve que l'espèce est active sur son substrat pectique et peut être utilisée afin de produire des pectinases (polygacturonases ou lyases)

Ce test préliminaire a permis donc de sélectionner la Cpt20 pour une étude plus approfondie aussi bien sur le plan moléculaire (identification moléculaire de l'espèce au ARNr 16S) que biochimique.



Figure 18 : Aspect morphologique de l'espèce d'actinomycète Cpt20 sur milieu ISP2.

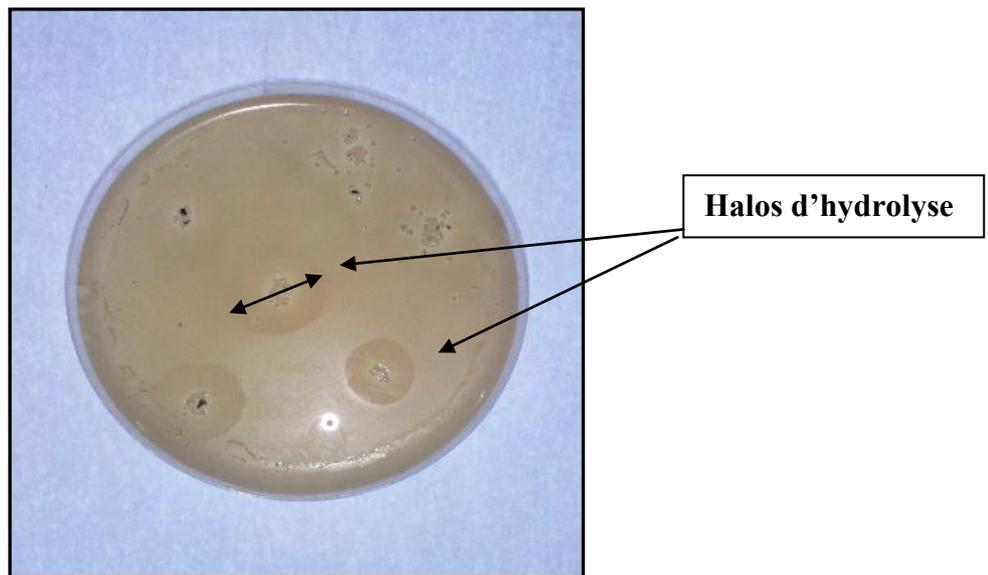


Figure 19 : Mise en évidence de l'activité pectinolytique sur milieu solide d'Horikoshi :
(Test CTAB) après 5 jours de culture

IV.1.3. Nature de l'enzyme sécrétée

Les tests sur milieu liquide pour la recherche de l'activité pectinolytique en suivant les sucres réducteurs libérés n'a pas suffi pour mettre en évidence tous les types de dépolymérase. Ainsi pour identifier la nature, de l'enzyme (polygalacturonases ou lyases), d'autres tests (UV 232 nm et TBA) sont utilisés. En outre, les résultats du criblage montrent que l'espèce est active sur le substrat pectique par sécrétion de dépolymérase extracellulaires

(polygalacturonases ou lyases) qui dégradent les substances pectiques en oligomères et monomères assimilables par l'espèce isolée.

En fait, pour distinguer la présence de l'une ou l'autre (polygalacturonases ou lyases), un autre test aux lyases, basé sur l'adsorption à l'Ultraviolet, est utilisé.

La mesure de l'absorbance à 232 nm permet de détecter la présence d'oligomères insaturés qui résultent de l'action des lyases. En effet, lors de l'attaque du polymère par les lyases il y a formation d'oligomères insaturés en position Δ 4-5 de l'extrémité non réductrice de l'unité galacturonate externe. La conjugaison de la double liaison en position Δ 4-5 et du groupe carboxyle en C5 entraîne une forte absorption à 232 nm, le résultat obtenu avec la Cpt 20 est représenté dans le **tableau 09**.

Tableau 09: Activité lyases de la Cpt20 par test UV à 232 nm en présence de pectate (APG) comme substrat

Milieu réactionnel	Activité (UI/ml)
l'extrait enzymatique brut	376.08±11

L'examen du **tableau 09** montre que l'activité détectée par la méthode UV 232 nm est de l'ordre 376 UI/ml, ce qui indique qu'il s'agit de lyases (pectase lyase ou pectine lyases) agissant par mécanisme de β élimination pour libérer dans le milieu réactionnel des oligomères insaturés.

Par ailleurs pour confirmer ce résultat, un test basé sur l'acide thiobarbiturique (test TBA) qui réagit avec les composés insaturés pour donner un maximum d'absorption à 550 nm (couleur rose) mettant en évidence la présence de lyases. Aucune absorbance à 515 nm (couleur orangé) mettant en évidence la présence des polygalacturonases, n'a été enregistrée. Le résultat obtenu est représenté par la **figure 20**.

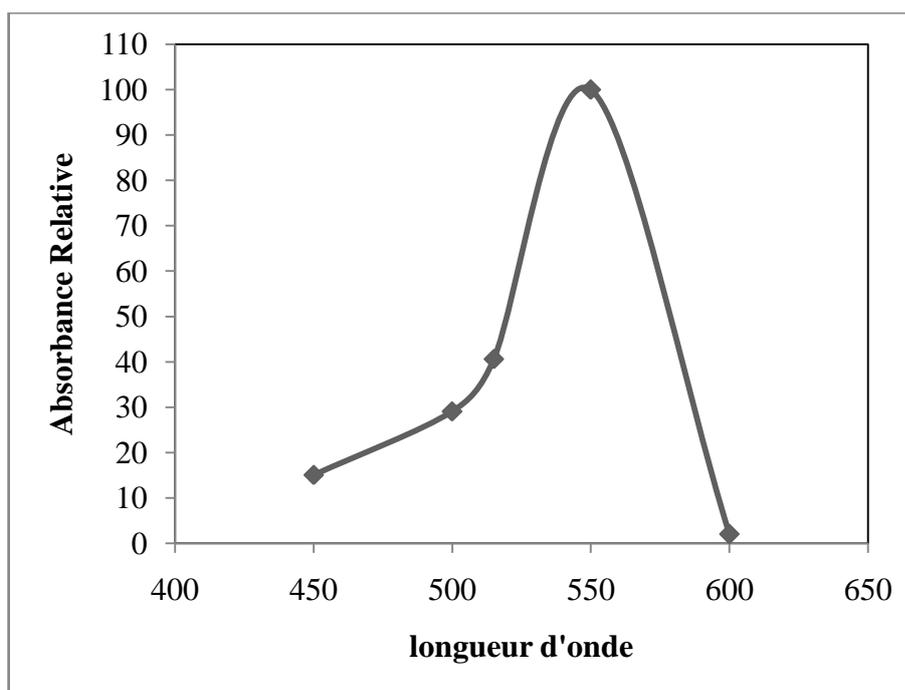


Figure 20 : Test de l'acide thiobarbiturique (TBA)

L'analyse de cette courbe montre que le maximum d'absorbance se situe à 550nm, ce qui confirme la présence des lyases (pectine lyases ou pectates lyases).

Dans cette partie du travail, pour distinguer entre les pectine lyases et les pectate lyases un test basé sur l'EDTA est utilisé. En effet, les pectate lyases sont inhibées par l'éthylène diamine tétra acétique (EDTA) par chélation des ions de Ca^{2+} essentiels à l'activité pectate lyases (Rexova-Benkova, 1976, Thibault et petit 1979). Pour la pectine lyase, le calcium n'est pas essentiel pour l'activité de l'enzyme. De ce fait, l'EDTA n'a aucun effet sur les pectines lyases (Henrissat et al., 1995). Les résultats obtenus sont rapportés sur le **tableau 10**.

Tableau 10: Effet de l'EDTA sur l'activité enzymatique de la Cpt20 en présence de pectate (APG) comme substrat

Mesure de l'activité pectates lyases	CaCl ₂ (1mM)	
	En présence D'EDTA (10mM)	En absence D'EDTA
Activité UI/ml	00	376.08±11

L'examen des résultats montre qu'en présence de l'EDTA (agent chélateur à 10mM) l'activité enzymatique s'annule, en comparaison avec l'activité enzymatique obtenue en absence de l'EDTA, qui est de l'ordre de 376 UI/ml (100%).

En effet, l'EDTA complexe le calcium; qui active normalement l'enzyme; inhibant ainsi l'action de l'enzyme. Ces résultats montrent qu'il s'agit bien d'une pectate lyase et non pas une pectine lyase car l'EDTA n'a pas d'effet sur l'activité de cette dernière (**Rexova-Benkova, 1976 ; Herron et al., 2000 ; Jayani et al 2005**). Ces différents tests préliminaires montrent que l'espèce Cpt20 secrète une lyase de type pectate lyase.

Divers microorganismes secrètent des pectate lyases sont décrites dans les revues de littératures (**Gummadi et Kumar, 2005 ; Pyasi et al., 2009**).

Chez les actinomycètes, les travaux de Kaiser ont montré que plus de 70% des espèces sont pectinolytiques dans plus de 80% dans le genre *Streptomyces* (**Kaiser., 1971**).

En effet, d'autres pectate lyases sont isolées chez les actinomycètes et la plupart des espèces étudiées appartenaient au genre *Streptomyces* et c'est le cas de: *Streptomyces fradiae* IFO3439 (**Sato et kaji, 1975**), *Streptomyces nitrosporeus* (**Sato et kaji, 1977**) *Streptomyces massasporeus* (**Sato et kaji, 1980**), *Streptomyces* SK (**Ladjama et al., 1991**), *Streptomyces* sp. S27 (**Yuan et al., 2012**), qui produisent des pectate lyases. Par ailleurs, il semble que dans la plupart des cas, le genre *Bacillus* est considéré comme meilleur sources de production de pectate lyases thermostables (**Rebello et al., 2017**).

Nous signalons qu'au niveau des actinomycètes thermophiles peu de travaux de recherches sur les pectate lyases ont été réalisés. Nous citons l'exemple de : *Streptomyces thermovulgaris* CR42 (**Niranjan et Dhala., 1981**), *Thermopomonospora fusca* (**Stutzenberger, 1987**), *Amycolata* sp (**Bruhlmann, 1995**), *Streptomyces thermocarboxydus* (**Tonouchi et al., 2010**).

Par ailleurs, d'autres bactéries mésophiles, psychrophiles et thermophiles secrètent également des pectinases et les plus connues sont *Streptomyces* sp. QG-11-3 (**Beg et al., 2000**), *Streptomyces thermocarboxydus* (**Miyairi et al., 2004**), *Streptomyces lydicus* (**Jacob et Prema., 2006**) *Streptomyces halstedii* ATCC10897 (**Tapias et al., 2015**), mais aussi *Pectobacterium carotovorum subsp.carotovorum* BR1 (**Maisuria et Nerurka, 2012**), *Paenibacillus* sp. 0602 (**Li et al., 2014**), *Bacillus subtilis* ZGL14 (**Yu et al., 2017**) *Bacillus subtilis* PB1 (**Zhou et al., 2017**) et enfin des espèces fongiques: *Penicillium occitanis* (**Damak et al., 2011**), *Aspergillus niger* (**Khatri et al., 2015**), *Aureobasidium pullulans* (**Bennamoun et al., 2016**), *Penicillium notatum* (**Amin et al., 2017**) *Planococcus donghaensis* JH1 (**See-Too et al., 2017**).

Récemment, des études à l'échelle méta-génomique couplées à la technique classique d'enrichissement en culture ouvre des perspectives de l'utilisation de ces enzymes à grande échelle (Antunes et al 2016; Lemos et al., 2017 ; Zhou et al., 2017).

IV.1.4. Identification moléculaire de la Cpt20 et phylogénie

IV.1.4.1. Identification moléculaire de la Cpt20

L'identification classique n'a pas permis d'identifier le genre et l'espèce de la Cpt20, d'où l'intérêt de procéder à l'identification moléculaire en se basant sur le gène ARNr 16S.

En effet, actuellement, l'étude moléculaire de l'ARNr 16S est considérée comme méthode rapide et fiable pour la détermination de l'espèce et présente le meilleur moyen pour la réalisation des études phylogénétiques comparée aux techniques taxonomiques classiques.

Après extraction de l'ADN génomique par la méthode d'alumine et contrôle de sa qualité (**Figure 21**) et amplification du fragment (ARNr 16S) par PCR en utilisant les deux couples d'amorces universels des procaryotes (Directe, Oligo D-S73 et Reverse, Oligo R-S74) et (Directe, Oligo D-156 et Reverse, Oligo R-157) dont les séquences appartiennent aux régions conservées du gène (Bentley et al., 2002).



Figure 21: Electrophorèse sur gel d'agarose à 0,7% en tampon TAE et pH8 de L'ADNg de l'espèce d'actinomycètes thermophile Cpt 20.

E : Point de dépôt de l'échantillon d'ADNg.

L'examen du profil électrophorétique (**figure 21**) sur gel d'agarose montre que L'ADNg extraite est de bonne qualité (non dégradée) et par conséquent on peut l'utiliser pour amplifier le gène de l'ARNr 16S. Ce fragment d'ADN est purifié puis cloné dans le vecteur

pGEM-T Easy Vector, 3015 pb, de (*Promega*) pour construire le plasmide *pAL-16S* de taille 4526pb et de nouveau purifié. (Figures 22 et 23).

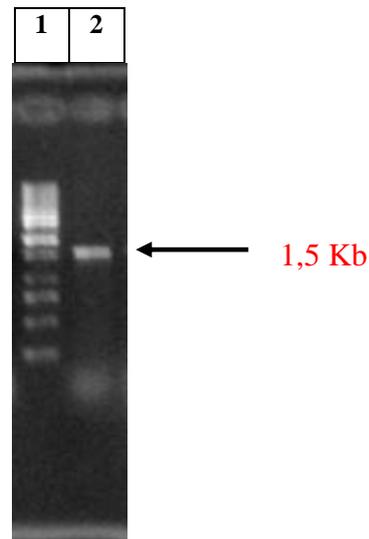


Figure 22 : Analyse du produit PCR par électrophorèse sur gel d'agarose de l'amplification du fragment de gène codant pour l'ARNr 16S de l'espèce *Cpt20*. (gel d'agarose 1% en tampon TBE et révélation au bromure d'éthidium) (piste 1 : MT : marqueur de taille *phage lambda* 1kb ; piste 2 : produit l'amplification du l'ARNr 16S).

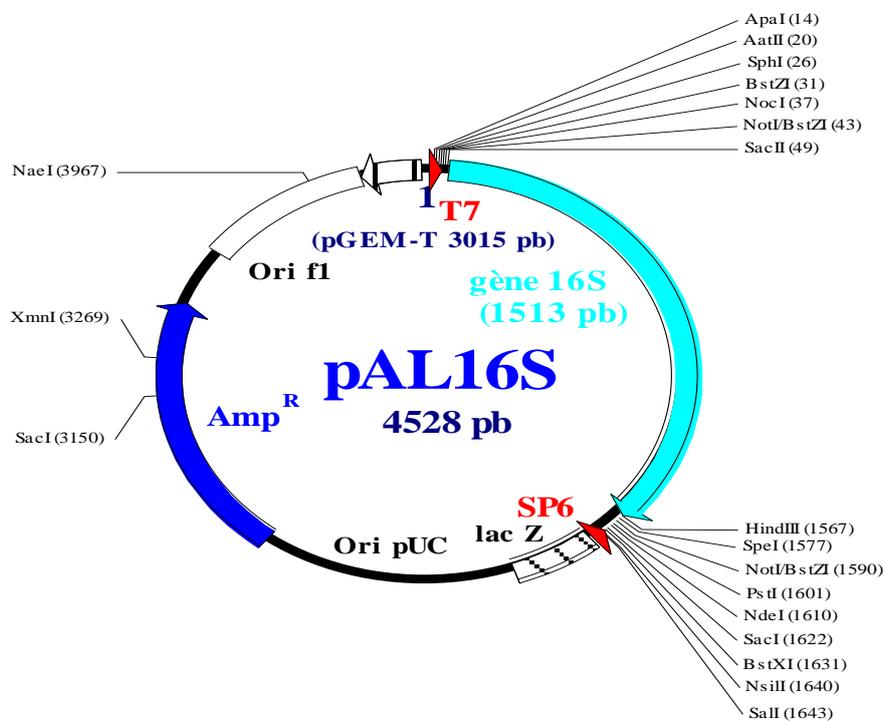


Figure 23 : Carte de restriction de plasmide *pAL-16S*

Le séquençage de ce fragment (**figure 24**) et son alignement (**Tableau 11**) en utilisant l'outil bioinformatique BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) a permis de rattacher cette espèce au genre *Actinomadura* correspondant à *Actinomadura keratynilica* Cpt20 (**Taibi et al., 2012**), avec une identité de 99% avec l'ARNr 16S de l'espèce *Actinomadura keratinilytica* WCC-2265T (numéro d'accèsion : EU637009), et l'espèce *Actinomadura keratinilytica* T16-1 (numéro d'accèsion : FJ199994.1). Ce résultat suggère fortement que l'espèce Cpt20 est une *Actinomadura keratinilytica* (homologie de séquence supérieure au seuil de discrimination entre deux espèces de même genre qui est de 97%) (**Tableau 11**).

Cette séquence est déposée dans la banque de données «GenBank database» sous le numéro d'accèsion : **GQ205433** et accessible dans la banque des gènes en ligne (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Notre espèce d'actinomycète thermophile Cpt20 isolée et identifiée par ANRr 16S est donc: *Actinomadura keratinilytica* Cpt20. Cette même espèce a fait l'objet de travaux scientifiques au niveau de notre laboratoire pour la production de xylanases (**Taibi et al., 2012**), mais nous avons aussi isolé une autre espèce, Cpt29, de la même espèce *Actinomadura keratinilytica* qui produit des protéases, en l'occurrence des kératinases (**Habbeche et al., 2014**) et des xylanases (**Haberra et al., 2013**).

Le genre *Actinomadura* est l'un des genres les plus rares dans la classe des actinomycètes et peu connu par rapport au genre *Streptomyces* (56 espèces valides recensés jusqu'au 08/11/2017, comparativement aux 669 espèces appartenant au genre *Streptomyces* recensés à la même date et selon la même source (**Extrait [15/10/2018] du système d'information taxonomique intégré (ITIS)** www.itis.gov). Ce résultat est donc encourageant dans l'investigation d'autres microorganismes peu connus dans la production de pectinases. Selon l'étude bibliographique, aucune espèce appartenant au genre *Actinomadura* ayant une activité pectinolytique n'a été signalée, d'où l'intérêt d'étudier cette espèce. Par ailleurs, un groupe Taïwanais a breveté (US 8,476,056 B2) une nouvelle espèce d'*Actinomadura* sp BC44T-5 dégradant le polyester (**Hoang et al., 2013**); de même que chez l'espèce *Actinomadura keratinilytica* T16-1, qui produit une enzyme qui dégrade un polyester aliphatique (poly D L-lactide ou PLA) (**Sukkhum et al., 2009a,b, 2012 ; Panyachanakul et al., 2017**). Egalement, un groupe canadien a breveté (US 5,871,730) une xylanase thermostable chez l'espèce *Actinomadura* sp. FC7 (**Brzezinski et al. 1999**).

```

>GQ205433.1 Actinomadura keratinilytica strain Cpt20 16S ribosomal RNA
gene, partial sequence
CTCCCTCCCTTACTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCCCTT
CGGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCCTG
GGAAACCGGGTCTAATACCGGATACGACCATTGCGGGCATCCGTTGGTGGTGGAAAGTTTTTTCGGTCCG
GGATGGGCTCGCGGCTATCAGCTTGAACGTATTGTGACGGCTACCAAGGCGACGACGGGTTTTCCGGC
CTGAGAGGGGCGACCGGTCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
TATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACC
TCTTTCAGCGGGGACGAAGCCCTTTGGGGTACGCTTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAAATATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTT
TGTCGCGTTCGGATGTGAAAGCCCATGGCTAAACTGTGGGTCTGCATTCGATACGGGACAGACTAGAGGTAG
GTAGGGGAGCATGGAATTCCTGGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCGGGAGGAACACCGGTGGCGAAG
GCGGTGCTCTGGGCCTTACCTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGAATAGATACCCTGG
TAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGTTCCTCCACGGATTCCGCGCCGTAGCTAACGCA
TTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAG
CGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACCGGAAGAACCTTACCAACCCTTGACATCACCCGAAAAC
TGCAGAGATGCGGGGTCCTTTCCGGGCGGGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAG
ATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCTCGTTCCATGTTGCCACGACGTGATGGTGGGGACTCA
TGGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGTGGGGATGACGCTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTG
GGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGACGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAG
CCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCA
GCAACGCTGCGGTGAATACGTTACCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACAC
CCGAAGCCCGTGGCCCAACCTTTGTGGGGGAGCGGTGGAAGGTGGGGCCCGCATTTGGGACGAAGTCGT
AACAAGGTAACCGTACTATAGGTCACCTAAATAGGCAGCAG

```

Figure 24: Séquence nucléotidique du fragment de gène de l'ARNr 16S (1511 pb) de l'espèce Cpt20.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/GQ205433.1?report=genbank>)

Tableau 11 : Résultat de l'alignement du fragment de gène de l'ARNr 16S de l'espèce Cpt20 avec la banque de NCBI.

Accession	Description	score max	score total	Query coverage	E value	ident max
EU637009	<i>Actinomadura keratinilytica</i> strain WCC-2265 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2603	2603	97%	0.0	99%
FJ199994.1	<i>Actinomadura sp.</i> T16-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2597	2597	97%	0.0	99%
GQ153848.1	<i>Actinomadura keratinilytica</i> strain T16-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2562	2562	96%	0.0	99%
AY766302.1	<i>Actinomadura sp.</i> E6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2519	2519	97%	0.0	98%
KC447297.1	<i>Actinomadura keratinilytica</i> strain Cpt29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2603	2603	95%	0.0	98%
NR_044094.1	<i>Actinomadura miaoliensis</i> strain BC 44T-5 16S ribosomal RNA, partial sequence	2484	2484	97%	0.0	97%

IV.1.4.2. Analyse phylogénétique

L'arbre phylogénétique construite, par le logiciel (MEGA: software version 4.1), après alignement avec des séquences les plus proches, montre que l'espèce d'actinomycète Cpt20 et l'espèce *A. keratinilytica* WCC-2265T (numéro d'accèsion : EU637009) forment un groupe distinct des autres espèces et confirme bien l'apparenté de la Cpt20 à l'espèce *Actinomadura keratinilytica* (**Figure 25**). En se basant sur toutes ces données, il a été assigné que la bactérie ainsi criblée est sélectionnée du nom d'*Actinomadura keratinilytica* Cpt20.

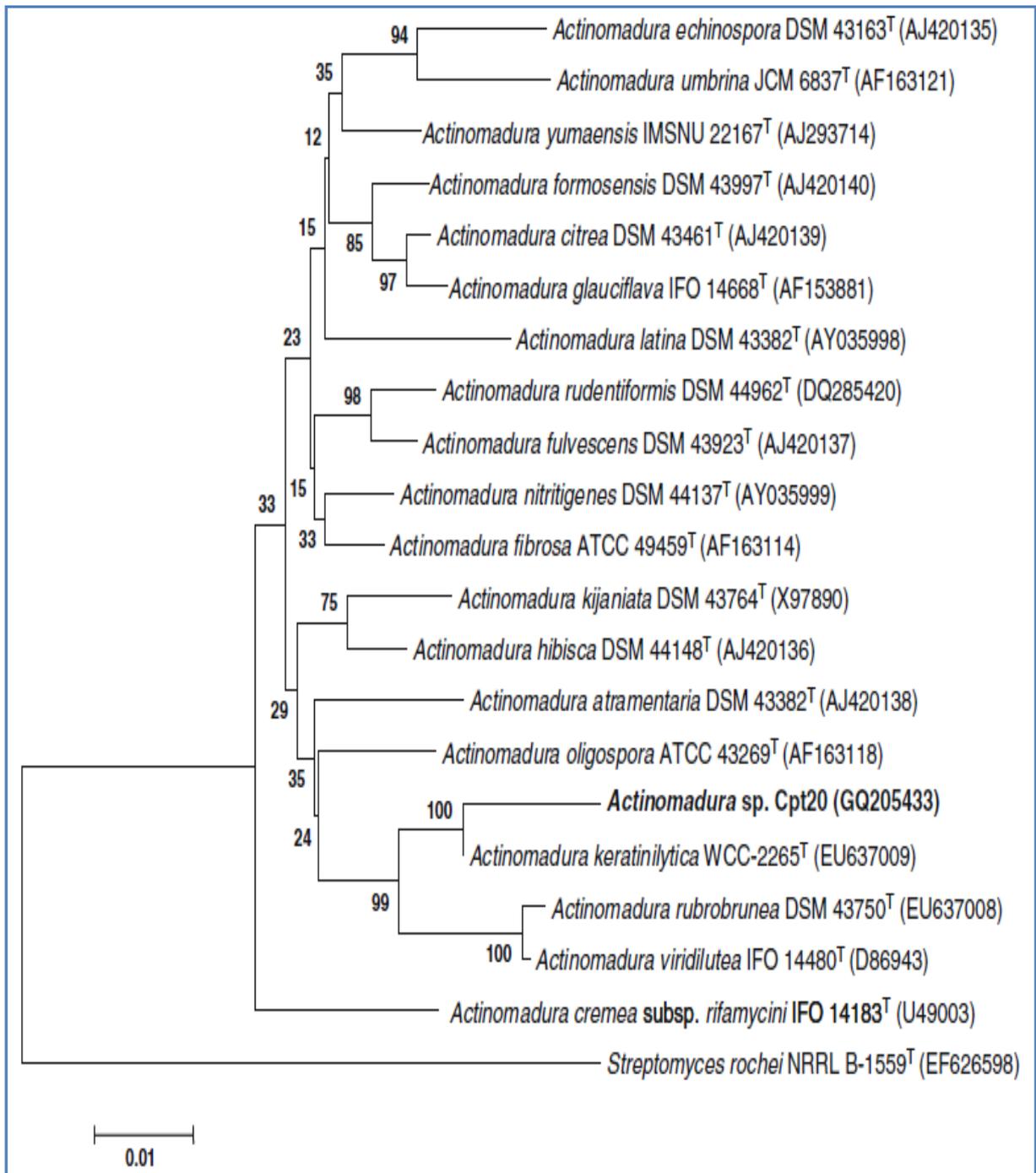


Figure 25: Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences d'ARNr 16S et montrant la position taxonomique de l'espèce Cpt20 par rapport aux autres espèces types des espèces du genre *Actinomadura*.

La séquence de l'espèce *Streptomyces rochei* NRRL B-1559^T a été choisie arbitrairement comme témoin externe du groupe. Les nombres figurant au niveau des nœuds (>50%) indiquent les taux du « bootstrap » (pourcentages de 100 sangles (*bootstraps*), la barre indique 1 substitution de nucléotide par 100 nucléotides. Les numéros d'accès (adhésion) NCBI sont présentés entre parenthèses.

Conclusion

Dans cette étude a pour objectif la recherche de nouvelles espèces d'actinomycètes pectinolytiques à partir du compost de poulet de la région d'Annaba, produisant des pectinases thermostables. Une espèce a été choisie pour la production des pectinases, il s'agit de l'espèce la Cpt20. Les résultats des tests préliminaires prouvent que cette espèce est pectinolytique et capable de produire des pectinases extracellulaires de type pectate lyase. L'identification de cette espèce a été basée sur des méthodes phénotypiques (Aspect microscopique et macroscopiques) et sur des tests biochimiques et physiologiques d'une part et sur la méthode moléculaire par la détermination de la séquence nucléotidique du fragment du gène de l'ARNr 16S, d'autre part. Les résultats obtenus dans cette partie d'étude ont permis d'identifier l'espèce Cpt20 en tant que *Actinomadura keratinilytica* Cpt20. Les espèces appartenant au genre *Actinomadura* sont parmi les espèces les plus rares dans le phylum des Actinobactéries.

Partie 02 : Optimisation de la production des pectate lyases

Pour l'optimisation de la production de l'enzyme, la cinétique de production, la source de carbone (substrats pectiques) et les sources d'azote (organiques et minérales) ont été étudiées.

IV.2.1 Optimisation du temps de culture

L'examen de la cinétique de production de l'activité enzymatique et la croissance cellulaire montre que l'activité enzymatique croît en fonction du temps jusqu'au 5^{ème} jour, et décroît par la suite progressivement (**Figure 26**).

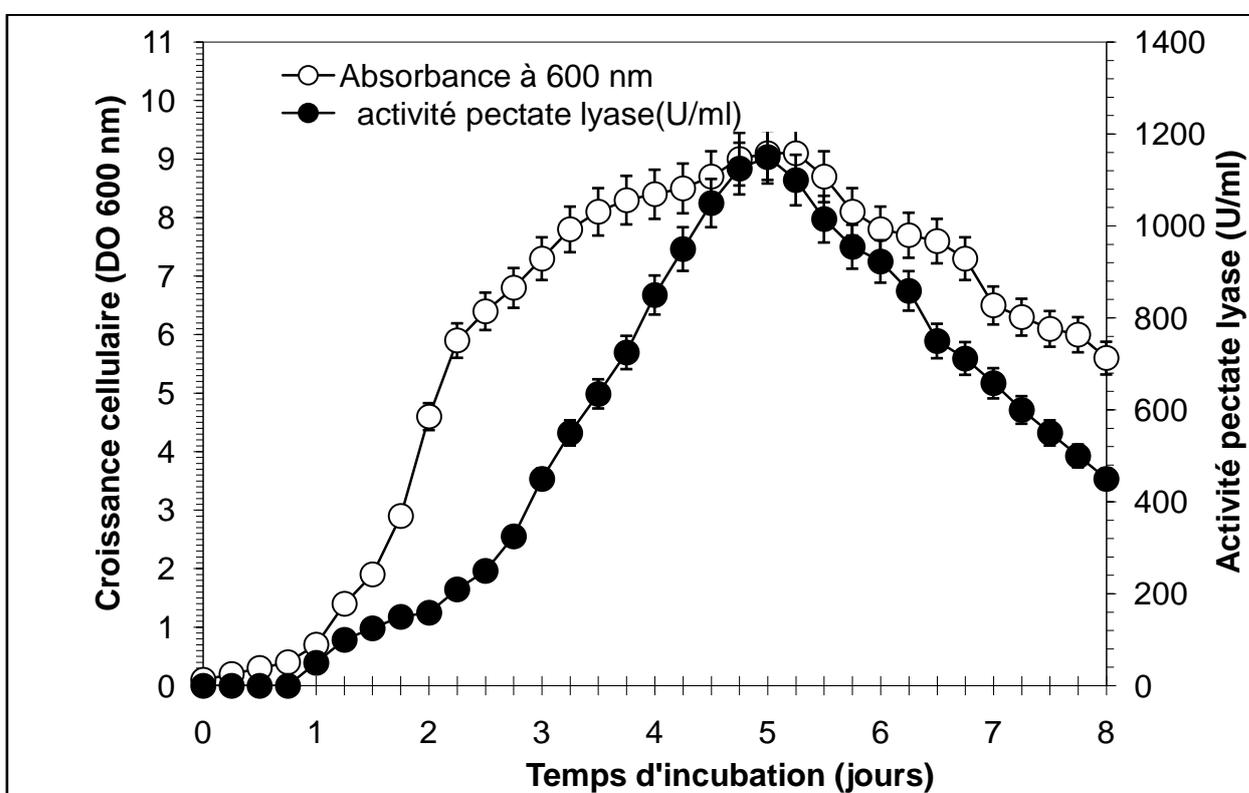


Figure 26 : Temps de culture de l'espèce *A. keratinilytica* strain Cpt20.

La croissance cellulaire (○) suivie par la détermination de la turbidité à 600 nm et la production de l'activité pectate lyase (●).

La cinétique de la croissance de l'espèce Cpt20, sur le milieu à base de pectine de citron comme seule source de carbone, est similaire aux cinétiques classiques de la croissance des microorganismes avec une phase de latence (1^{er} jour), une phase exponentielle (2^{ème} – 3^{ème} jours), une phase stationnaire (4^{ème} – 5^{ème} jours), et une phase de déclin après le cinquième jour de culture (**Figure 26**). La durée de la culture retenue est donc de cinq jours et ceci pour

éviter une lyse cellulaire et une diminution de l'activité enzymatique produite. Ce temps de culture est compatible avec le cycle de vie des actinomycètes qui est relativement plus long (7 jours) par rapport aux autres microorganismes (**Shivlata et Satyanarayana., 2015**).

On constate également un parallélisme entre l'évolution de l'activité enzymatique et la cinétique de la croissance cellulaire.

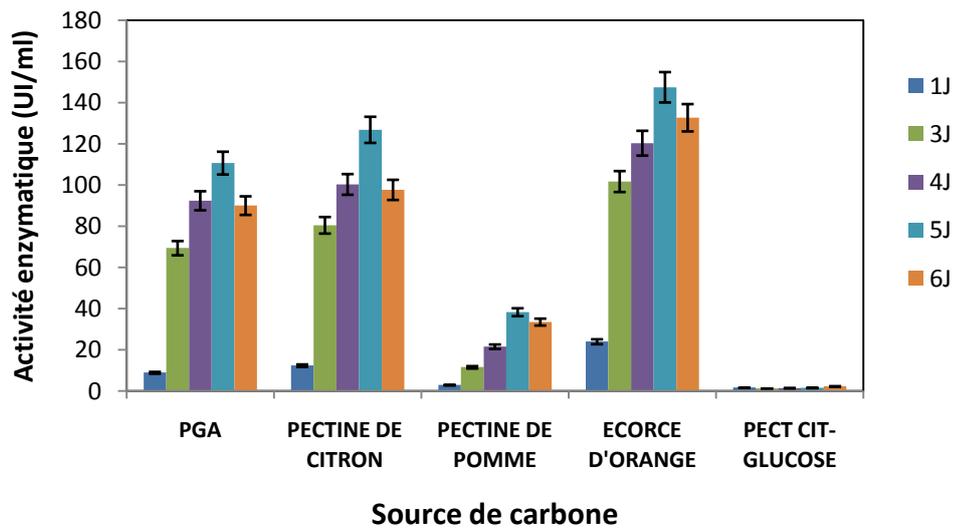
IV.2.2. Choix de la source de carbone et d'azote pour la production des pectate lyases

Les différents résultats portant sur le choix de la source de carbone et d'azote pour la production de la pectate lyase par l'espèce Cpt20 sont illustrés par des histogrammes (**figure 27 A et B**).

L'effet de différentes sources de carbone à différents degré d'estérification (Pectine de citron 85%, Pectine de pomme 90%, Acide polygalacturonique (0%), Ecorce d'orange (substrat naturel), sur la production de l'enzyme par l'espèce Cpt20 a été étudié, en utilisant le milieu d'Horikoshi additionné de différentes sources de carbone à 0,5% avec l'extrait de levure (0,5%) et le tryptone (0,5%) comme sources d'azote est illustrés sur la **figure 27 A**.

Egalement, l'effet de différentes sources d'azote sur la production de l'enzyme par l'espèce Cpt20 a été étudié en utilisant le milieu d'Horikoshi additionné de différentes sources d'azote (Peptone, Tryptone, Extrait de levure, Nitrate d'ammonium, Nitrate de Sodium, Urée, Chlorure d'ammonium, Sulfate d'ammonium, Acétate d'ammonium et Biotine) à raison de 0,2% avec la pectine de citron (0,5%) comme seule source de carbone est illustrés sur la **figure 27 B**.

(A)



(B)

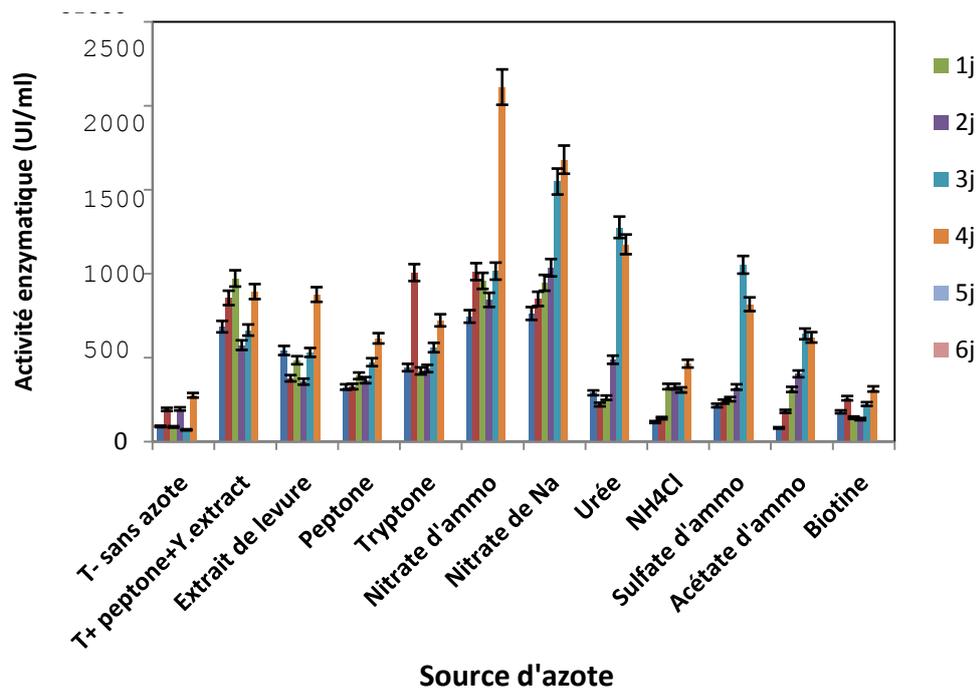


Figure 27 : Effet de la source de carbone et d'azote sur la production de l'activité pectate lyase par l'espèce Cpt20.

(A) Effet de différentes sources de carbone sur la production de pectate lyase. Les sources de carbone sont utilisées à raison de 0,5% avec l'extrait de levure et le tryptone comme source d'azote.

(B) Effet de différentes sources d'azote sur la production des pectates lyase. Les sources d'azote sont additionnées à raison de 0,2% avec la pectine de citron comme seule source de carbone.

Les mesures d'activité sont réalisées chaque 24h pendant 6 jours.

L'analyse de la **figure 27** (A et B) montre que le niveau de production de la pectate lyase est bien lié à la nature des sources de carbone et d'azote utilisées. Ces deux dernières exercent un effet régulateur sur le système d'induction et/ou de sécrétion des pectinases de l'organisme. Ainsi, l'écorce d'orange semble être le meilleur inducteur de l'activité pectate lyase par rapport aux autres sources de carbone enregistrant une activité de 147,46 UI/ml soit une augmentation de 3,45 fois par rapport à un milieu de culture de base contenant la pectine de citron comme seule source de carbone. Ce résultat peut s'expliquer par la richesse de l'écorce d'orange en pectine (3,5-5,5 % du poids frais) ou bien par des facteurs de croissance bénéfiques (**Thakur et al., 1997**).

Toute fois, la pectine de citron commerciale semble aussi être un bon inducteur des pectate lyases donnant une activité de 126,80 UI/ml. Cependant, le choix est porté sur l'écorce d'orange naturel (bon marché) du fait que celui-ci a l'avantage d'être disponible comme déchet des industries agroalimentaires, ce qui permet de le valoriser et de diminuer son potentiel polluant pour l'environnement.

En ce qui concerne la source d'azote, le nitrate d'ammonium s'est montré le meilleur inducteur de l'activité de l'enzyme par rapport aux autres sources d'azote. Ce substrat d'azote fait augmenter d'une façon considérable avec un facteur de 7,66 fois par rapport au témoin et une production de l'enzyme de 211,132 UI/ml. En revanche, la présence de la biotine augmente légèrement la production de l'enzyme (31,34 UI/ml) par rapport au témoin (27,536 UI/ml). L'étude des autres sources d'azote ont été également testées, ainsi, le sulfate de sodium et l'urée augmentent également considérablement le taux de la production de l'enzyme par rapport aux autres sources d'azote avec des facteurs de : 6, 4 fois respectivement.

L'étude préliminaire de l'optimisation des conditions de production de la pectate lyase (sources de carbone et sources d'azote), a conduit initialement à une augmentation du taux de production de l'activité de plus de 3 fois par rapport à l'écorce d'orange et de plus de 7 fois par rapport au nitrate d'ammonium. En plus, cette étude a permis de choisir une source de carbone bon marché (Ecorces d'oranges Broyés) et elle a permis également de réduire la quantité de la source d'azote utilisée dans le milieu (0,2% au lieu de 1%) (**Kuhad et al., 2004**).

IV-2-3 Répression catabolique par le glucose

La **figure 27A** montre qu'aucune activité enzymatique n'a été produite dans le milieu liquide contenant de la pectine de citron (0,5%) additionnée de glucose (0,5%). Ceci montre que, malgré la présence de la pectine, le glucose a réprimé la synthèse de l'enzyme.

Il existe donc une régulation par répression catabolique du système d'expression des gènes de la pectinolyse par le glucose. Cette propriété a été étudiée chez *Streptomyces SK* et *Streptomyces coelicolor* (**Ladjama et al., 1991**) ainsi que chez *Erwinia carotovora* et *Pseudomonas fluorescen.* Ils ont observé que ces espèces subissaient une répression catabolique par le glucose (**Zuker et Hankin, 1970**).

Conclusion

Au terme de la deuxième partie de travail, les différentes investigations ont montré que la cinétique de production de l'activité pectate lyase est induite par le substrat pectique et réprimée par le glucose. La production de cette enzyme passe par un optimum de cinq jours avec un rendement 3 fois plus important que le milieu de base. En ce qui concerne la source de carbone et la source d'azote, l'écorce d'orange broyé semble être la meilleure source de carbone avec une augmentation considérable de 3,45 fois par rapport au témoin. De plus, ce substrat (écorce d'orange), étant bon marché, permettra de valoriser d'avantage les déchets d'oranges. Pour ce qui est de la source d'azote, le nitrate d'ammonium donne la meilleure production d'activité avec un taux d'augmentation de 7,66 fois par rapport au témoin. Le nitrate d'ammonium est donc retenu comme source de d'azote par rapport aux autres composés azotés.

Partie 03 : Purification de la pectate lyase de la Cpt20.

IV-3-1 Purification de l'enzyme

L'extrait brut est obtenu après culture de 5 jours avec un volume (1L), concentré au Rotavapeur suivi d'une dialyse contre le tampon A. Le dialysat obtenu est déposé sur une colonne mono Q (FPLC) à échange cationique. L'élution étant effectuée par un gradient de NaCl (0-1M) et le premier profil chromatographique est présenté sur la **figure 28**.

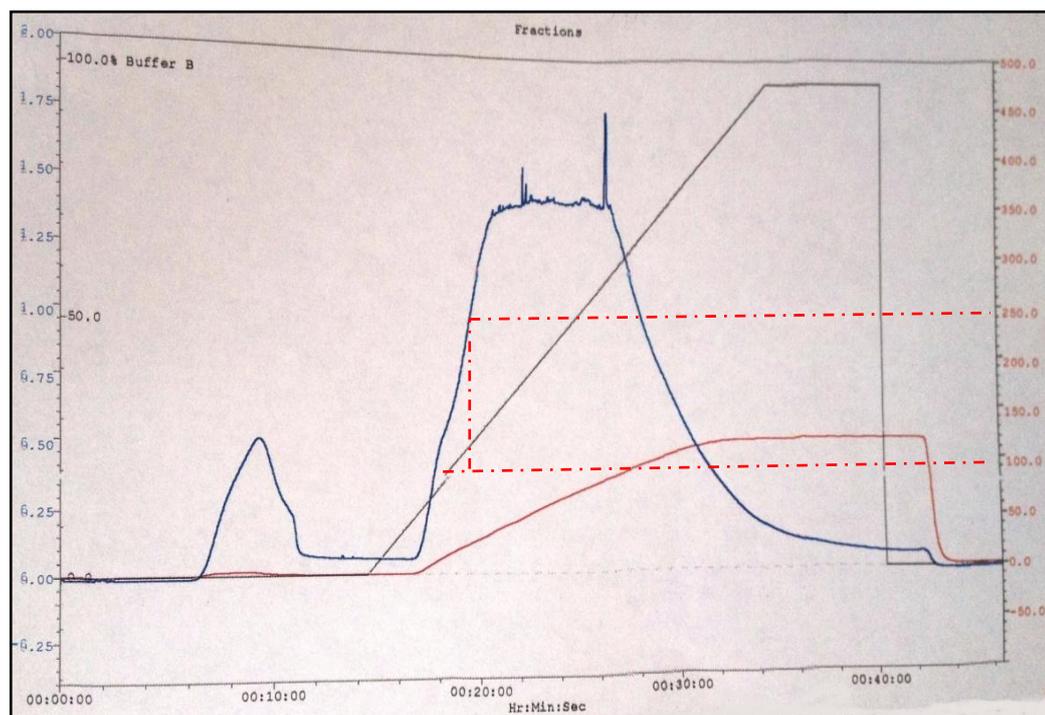


Figure 28 : Chromatographie sur colonne monoQ (FPLC)

(15mm ID X 68mm L, Biorad) (Tampon A: Tris-HCl 20mM pH8, Tampon B: Tris-HCl 20mM pH8 1M NaCl)
Débit : 5ml /min ; UV 280nm

L'analyse du chromatogramme (**figure 28**) montre que l'activité majoritaire de la Pel-20 mesurée directement à 232nm a été retenue dans la fraction entre 100 mM à 250 mM d'NaCl. A partir de cette concentration 250 mM de NaCl, aucune activité n'a été décelée.

Après plusieurs injections sur la colonne FPLC MonoQ, les fractions actives sont collectées et concentrées par filtration sur membrane Centricon (*Amicon Inc., Beverly, MA, USA, 10-kDa*).

Par la suite, l'ensemble est injecté sur une colonne de filtration sur gel HPLC OH40. Le résultat obtenu est représenté par le chromatogramme **figure 29**.

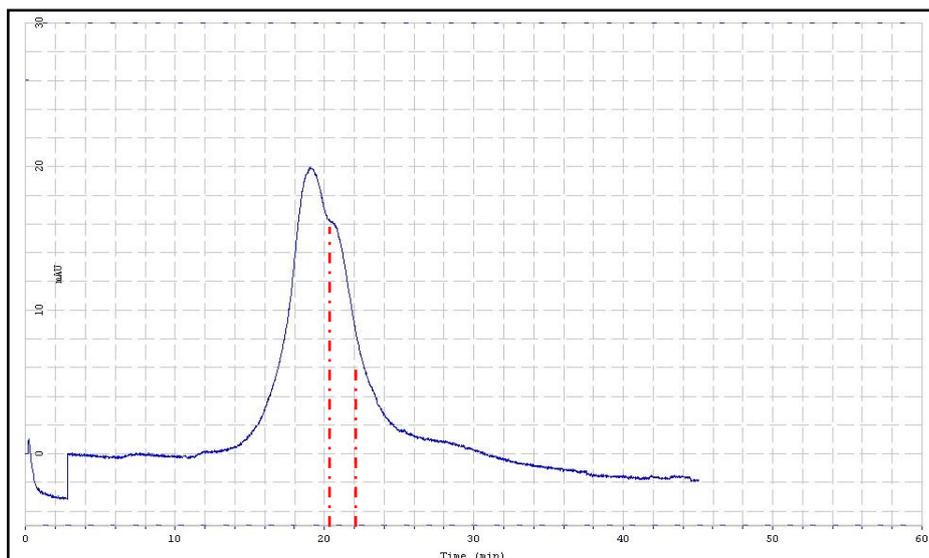


Figure 29 : Chromatographie sur colonne gel filtration OH40 (HPLC) (Shodex. PROTEIN kw P 802.5, 8 mm ID* 300 mm L) (Tampon: Tris-HCl 20 mM, pH 8)

L'analyse du chromatogramme montre qu'une seule activité Pel-20 majoritaire est retenue entre les temps de rétention (Tr) se situant de 20 et 22 min, aucune autre activité pectinolytique n'a été décelée. Ceci suggère qu'il n'y a qu'une seule enzyme responsable de l'activité Pel, dans les conditions opératoires.

La fraction active est donc récupérée et de nouveau concentrée par filtration sur membrane Centricon (10kDa) puis réinjectée sur la même colonne HPLC OH40 et cela pour contrôler sa pureté. Ainsi, le profil d'élution obtenu est représenté par la **figure 30**.

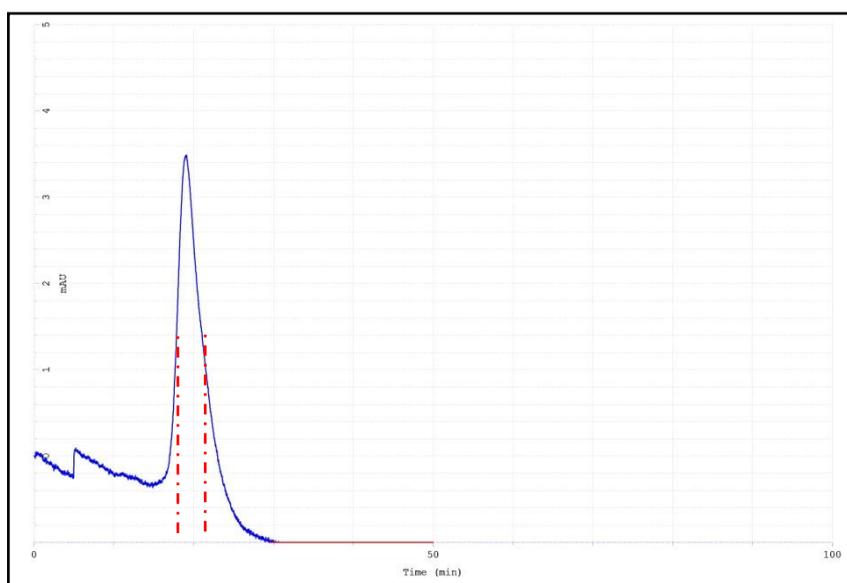


Figure 30 : Chromatographie sur colonne gel filtration OH40 par HPLC (réinjection et contrôle de la pureté) (Shodex. PROTEIN kw P 802.5, 8 mm ID* 300 mm L) (Tampon: Tris-HCl 20 mM, pH 8)

Ce profil montre que la totalité de l'activité pectate lyase est éluée avec un temps de rétention de 20 à 22min. Le pic obtenu est symétrique ce qui indique que l'enzyme est pure. Cette fraction sera ultérieurement contrôlée en SDS-PAGE.

Les différentes étapes de purifications sont récapitulées dans le **tableau 12**.

Tableau 12 : Bilan de la purification de l'enzyme (Pel-20)

Étapes de purification ^a	Activité totale (UI) ^b × 10 ³	Protéines totales (mg) ^c	Activité spécifique (U/mg de protéine)	Rendement (%)	Facteur de purification (x)
Extrait brut	1150 ± 75	4045 ± 93	284 ± 45	100	1
Evaporateur rotatif	920 ± 23	825 ± 10	1115 ± 66	80	3.9
FPLC UNO Q-12	609 ± 18	90 ± 12	6422 ± 149	52	22.6
HPLC OH-40	394 ± 10	18 ± 2	21889 ± 459	34	77

^a Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences indépendantes ± les écarts types.

^b Une unité d'activité enzymatique a été définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour produire des oligogalacturonides insaturés équivalents à 1 µmole d'acide galacturonique par minute dans les conditions expérimentales utilisées.

^c Les quantités de protéines ont été estimées par la méthode de Bradford.

L'examen du tableau de purification montre que la Pel-20 de l'espèce d'*Actinomadura keratinilytica* Cpt20 a été purifiée avec un facteur de purification de 77 fois et un rendement de 34%. Egalement on remarque que l'activité spécifique augmente au cours des différentes étapes de purification pour atteindre un maximum de 21889 U/mg.

IV.3.2. Détermination de la masse molaire par SDS-PAGE et MALDI-TOF/MS

Le contrôle de la pureté de cette enzyme et la détermination de sa masse molaire est réalisé par électrophorèse en condition dénaturante (SDS-PAGE) et la technique au MALDI-TOF/MS. Les résultats obtenus sont représentés par les **figures 31 et 32**.

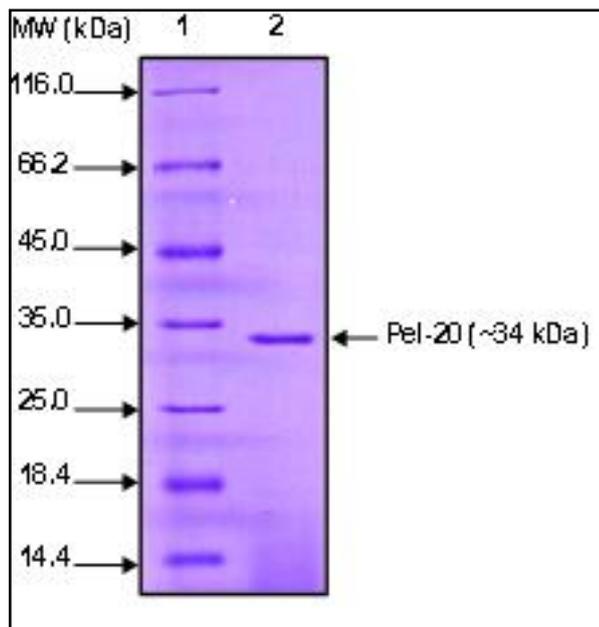


Figure 31 : SDS-PAGE (10%) de la pectate lyase (Pel-20) purifiée. **Piste 1** : Marqueur protéique (LMW); **piste 2** : Enzyme purifiée (50 ng) obtenue après chromatographie HPLC OH-40.

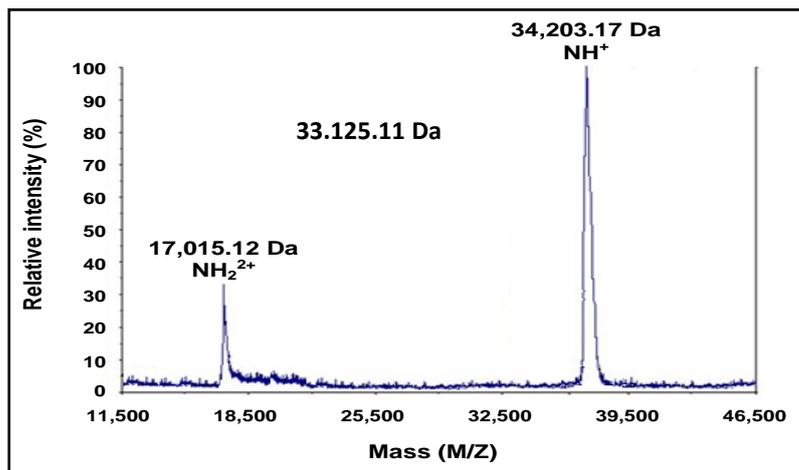


Figure 32 : Spectre MALDI-TOF de la pectate lyase (Pel-20) purifiée (20 pmoles) de l'espèce *Actinomadura* sp. strain Cpt20.

Le spectre de masse montre une série d'ions moléculaires multi-protonés.

L'analyse de la **figure 31** montre que la Pel-20 se présente sous forme d'un seul monomère d'environ 34 KDa en comparaison avec le marqueur de taille LMW (*Low Molecular Weight*). Cette même valeur est validée par MALDI-TOF/MS (**figure 32**) mais avec un peu plus de précision et qui est de 33,12511 KDa ce qui prouve que les deux méthodes convergent vers un résultat très proche. Cette valeur obtenue par les deux techniques est proche de celles produites par d'autres bactéries comme *Streptomyces* sp. S27

(Yuan et al., 2012) de même pour quelques espèces appartenant au genre *Bacillus* (Sawada et al., 2000, Takao et al., 2000, Berensmeier et al., 2004, Basu et al., 2008).

La majorité des pectate lyases isolées des actinomycètes sont de faible masse moléculaire (entre 23 et 30 kDa) en l'occurrence *Amycolata* sp (Bruhlmann., 1995), *Streptomyces thermocarboxydus* (Tonouchi et al., 2010). Cependant, la pectate lyase isolée de l'espèce apparentée *Thermomonospora fusca* est de masse moléculaire de 56 kDa (Stutzenberger, 1987), 41 kDa pour l'espèce *Streptomyces nitrosporeus* (Sato et Kaji, 1977), 54 kDa pour l'espèce *Streptomyces massasporeus* (Sato et Kaji, 1980), et 40 kDa pour l'espèce *Streptomyces* SK (Ladjama, 1991). La pectate lyase ayant la masse moléculaire la plus basse (12,1 kDa) a été isolée du champignon *Fusarium moniliformae* (Rao et al., 1996 ; Dixit et al., 2004).

IV.3.3. Détection de l'activité pectate lyase par zymogramme

Parallèlement à l'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), un zymogramme sur gel PAGE en conditions natives est effectué et les résultats obtenus sont illustrés par la figure 33.

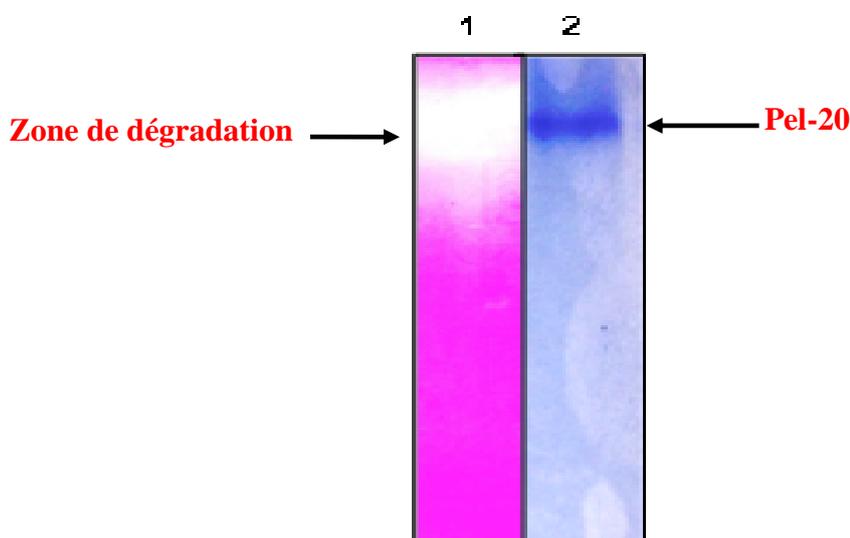


Figure 33 : Electrophorèse et Zymogramme sur gel natif à 10% de la pectate lyase (Pel-20) purifiée.

Piste 1, coloration de l'activité du zymogramme. Pour détecter l'activité de la pectate lyase, nous avons utilisé un gel de polyacrylamide natif à 10% contenant 0,2% de APG comme substrat suivi par une coloration avec du rouge de ruthénium à 0,05%. **Piste 2**, Pel-20 purifiée (100 ng) dans un gel de polyacrylamide 10% natif.

L'analyse du zymogramme après migration sur gel natif de polyacrylamide, incorporant le substrat, montre qu'il y a une zone claire visualisée suite à une coloration par le Rouge de ruthénium indiquant la dégradation du substrat (APG) par la Pel-20.

IV.3.4. Séquençage de l'extrémité NH₂-terminale de la Pel-20

Dans cette partie, la détermination de la séquence la N-Terminal de l'enzyme pure a pour intérêt de démontrer la pureté de l'enzyme et de mieux identifier l'appartenance phylogénétique et la nature de la pel-20. Ainsi, les 18 premiers aminoacides de l'extrémité NH₂-terminale de la Pel-20 ont été identifiés : **GFATNQGGTTGGAGG TLS (18 aa)** (tableau 13).

Tableau 13. Séquence NH₂-terminale de Pel-20 provenant de l'espèce Cpt20 et comparaison avec les séquences NH₂-terminales d'autres pectate lyases putatives des actinomycètes.

Origine	Séquence NH ₂ -terminal	Identité	Protein ID
<i>Actinomadura keratinilytica</i> Cpt20	GFATNQGGTTGGAGG TLS	-	This study
<i>Streptomyces zinciresistens</i>	GFATQNGGTTGGAGGQTV	87	WP_007496695.1
<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>	GFATQNGGTTGGAGGQTV	87	WP_005308540.1
<i>Actinoplanes</i> sp. N902-109	GYATQNGGTTGGAGGTV	81	WP_015623695.1
<i>Streptomyces</i> sp. NRRL S-325	GYATQNGGTTGGAGGTV	81	WP_037830947.1
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> Tue57	GYATQNGGTTGGAGGQKV	80	ELS50769.1

^a Les séquences d'acides aminés pour comparaison ont été obtenues en utilisant la base de données du programme BLASTP (NCBI, NIH, USA).

^b Les résidus (aa) identiques à l'enzyme (Pel-20) provenant de l'espèce Cpt20 sont ombrés.

D'après le **Tableau 13**, l'analyse de la séquence N-Terminal de la Pel-20, montre une grande similitude avec les pectate lyases issues des espèces : *Streptomyces zinciresistens*, *Actinoplanes* sp. N902-109 et *Streptomyces viridochromogenes*. Tue57, avec une similarité allant de 87, 81 et 80% respectivement. Ces résultats indiquent fortement qu'il s'agit d'une nouvelle pectate lyase de l'espèce isolée *Actinomadura keratinilytica* Cpt20. Ainsi, on remarque la présence d'une région consensus (GGTTGGAGG) chez les pectate lyases alignées par le programme Bioedit.

Conclusion

La troisième partie de ce travail de recherche a été consacrée à la purification de l'enzyme et la détermination de ses caractéristiques physicochimiques et moléculaires (pH, température, stabilité, activateurs, inhibiteurs, spécificité, poids moléculaire, séquence la N-terminale). Les profils électrophorétiques montrent que la Pel-20 se présente sous une seule bande majoritaire et homogène de taille apparente de 34 kDa. L'activité enzymatique de la fraction purifiée a été vérifiée par zymogramme sur gel natif en utilisant l'acide polygalacturonique comme substrat. L'analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF/MS) de l'enzyme purifiée, montre que la masse moléculaire exacte de la Pel-20 est de 33125.11 Da, ce qui est proche à la masse relative trouvée par la méthode PAGE-SDS. la pectate lyase Pel-20 produite par notre espèce *A. keratinilytica* Cpt20 montre une forte similitude, au niveau de la séquence peptidique N-terminale, avec les pectate lyase issues des espèces *Streptomyces zinciresistens*, *Actinoplanes* sp. N902-109 et *Streptomyces viridochromogenes* Tue57, avec une similarité de 87, 81 et 80% respectivement.

Partie 04 : Caractérisation biochimique de l'enzyme Pel-20

IV.4.1. pH optimum d'action de l'enzyme

La courbe (Figure 34) représente l'évolution de l'activité de l'enzyme en fonction du pH à 50°C avec un maximum d'activité est atteint à pH 10,5.

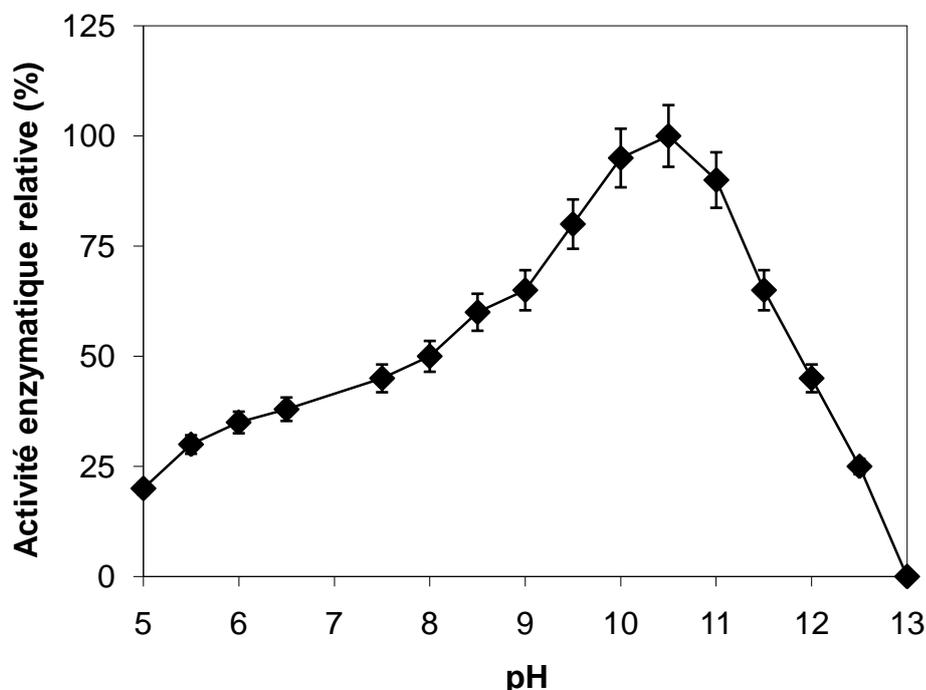


Figure 34: pH optimum d'action de l'enzyme (Pel-20)

L'analyse de cette courbe montre que l'enzyme Pel-20 est active sur une gamme du pH comprise entre 10 et 11, avec une activité optimale enregistrée à pH 10,5. La valeur du pH de la Pel 20 est peu fréquente chez les lyases isolées des autres actinomycètes (*Streptomyces*) car habituellement les valeurs du pH se situent entre 8 et 9,5.

Le pH optimal de l'activité de Pel-20 est par contre comparable à ceux obtenus chez d'autres espèces étudiées comme *Thermomonospora fusca* (espèce représentative de la famille *Thermomonosporaceae* à laquelle appartient le genre *Actinomadura*) et de *Bacillus sp.* KSM-P15, dont il a été rapporté qu'ils présentaient un pH optimum comparable de 10,45 et 10,5 respectivement (Stutzenberger, 1987 ; Takao, 2000). Les valeurs du pH les plus élevées sont de 10,5 à 11, ont été trouvées chez des espèces alcaliphiles du genre *Bacillus* : *Bacillus sp.* P4-N (Hatada et al., 2001) *Bacillus licheniformis* 14A (Basu et al., 2009) *Bacillus sp.* I4 (Zhou et al., 2012). Également Bruhlmann a isolé une pectate lyase à partir d'une espèce d'actinomycète *Amycolata sp* active à pH 10,3 (Bruhlmann, 1995). L'auteur a également

montré particulièrement l'efficacité de cette enzyme dans le décapage (bioscouring) des fibres de tissu de coton se substituant ainsi aux méthodes chimiques utilisant la soude pour l'élimination de la pectine, les protéines et les cires (Bruhlmann *et al.*, 1994 ; Klug-Santner *et al.*, 2006 ; Zheng *et al.*, 2001 ; Zhang *et al.*, 2013).

On peut dire donc que cette propriété d'alcalinité (pH 10,5) de Pel 20 est un atout majeur pour son utilisation au niveau des agro-industries telles que l'extraction de l'huile d'olive (Hadj-Taieb *et al.*, 2012 ; Jayani *et al.*, 2005) et l'industrie des textiles (*Bioscouring*). Egalement cette espèce Cpt20 peut aussi être exploitée dans le domaine du traitement des eaux usées issus des agro-industries (industries des jus). En effet, Tanabe et ses collaborateurs, ont décrit une endopectate lyase extracellulaire de l'espèce alcalophile *Bacillus sp* GIR 621; ayant un pH optimum de 11 et appliquée pour l'élimination des substances pectiques des eaux usées industrielles (Tanabe *et al.*, 1988; Jayani *et al.*, 2005).

IV.4.2. Température optimale d'action de l'enzyme

La **Figure 35** représente l'évolution de l'activité de l'enzyme à pH optimum (10,5) et en fonction de la température s'étalant entre 40 et 100 °C en absence et en présence du Calcium.

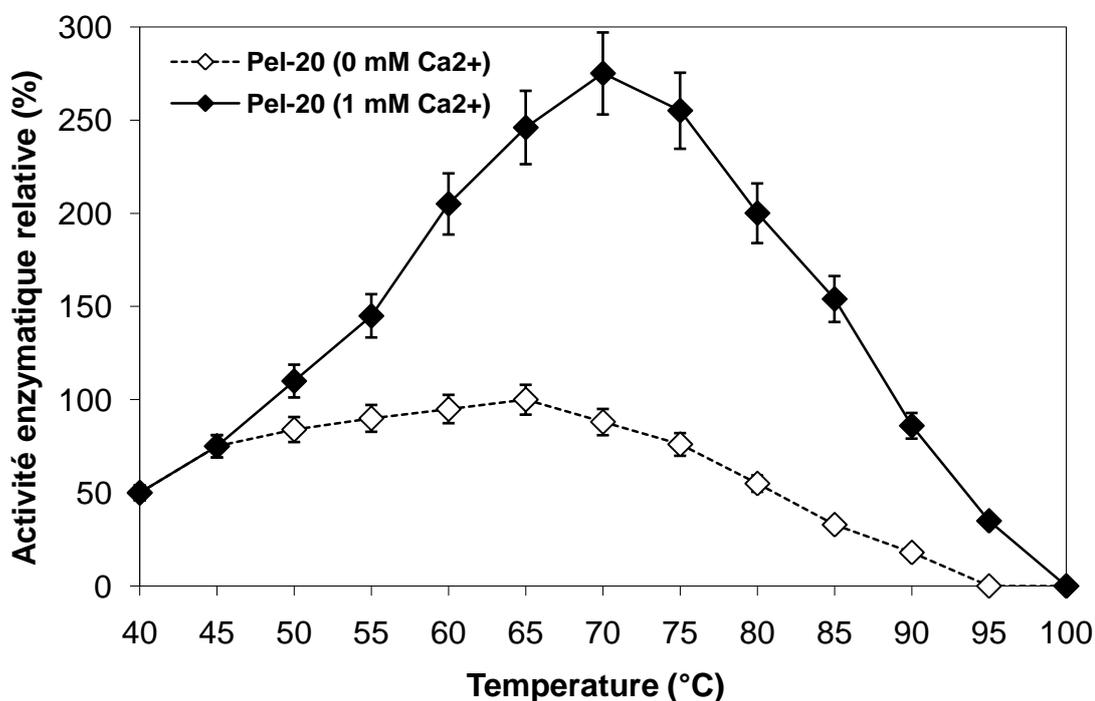


Figure 35 : Température optimale d'action de l'enzyme (Pel-20)

L'analyse des courbes montre que la Pel-20 est active sur son substrat sur une gamme de température relativement large entre 60 et 80 °C en présence de calcium ce qui implique son utilisation dans divers applications potentielles. De plus, nous constatons que la

température optimale d'activité Pel-20 est de 65°C en absence de calcium et 70°C en présence de calcium à 1mM avec un gain d'activité de 260 % (soit 2,6 fois) ce qui montre que le calcium est nécessaire pour l'activité de cette enzyme. Cette température d'action élevée s'avère être une caractéristique importante exigée pour certaines applications.

Les résultats obtenus sont similaires à d'autres travaux de recherche effectués sur les actinomycètes, dont nous citons à titre d'exemple *Thermopomonospora fusca* (Stutzenberger, 1987), *Amycolata* sp (Bruhlmann, 1995), *Streptomyces thermocarboxydus* (Tonouchi et al., 2010), *Streptomyces* sp. S27 (Yuan et al., 2012). Toutefois, peu de travaux de recherche sur les actinomycètes thermophiles producteurs des pectate lyases thermostables ont été cités dans la bibliographie.

Par ailleurs, chez les espèces appartenant au genre *Bacillus*, des pectate lyase ayant une température optimale de 70 °C ont été décrites chez *Bacillus* sp. TS 47 (Takao et al., 2000), *Bacillus pumilus* BK2 (Klug-Santner et al., 2006) *Bacillus* sp. P4-N (Hatada et al., 2001). En outre, Singh et al. ont rapporté une exo-PGL thermoactive chez l'espèce *Bacillus* sp, ayant une activité maximale à pH 11.0 et à température 69°C et l'activité est dépendante du Calcium (Singh et al., 1999).

Selon la littérature, deux pectate lyases les plus thermoactives ayant une température optimale de 90°C ont été isolées par Kluskens et ses collaborateurs chez une bactérie hyperthermophile, *Thermotoga maritima*, (Kluskens et al., 2003) et de l'espèce *Bacillus* sp. RN1 isolée à partir des eaux thermales de Thaïlande et décrite par Sukhumsirchart et al., (2009). Cependant, dans l'industrie, les lyases à température modérée sont les plus recherchées car les hautes températures favorisent le risque de génération d'oligomères insaturés par des réactions spontanées de β -élimination chimique (Berensmeier et al 2004).

IV.4.3. Etude de la thermostabilité de l'enzyme

La thermostabilité des pectinases est un facteur de choix pour une éventuelle utilisation industrielle d'où l'intérêt de déterminer ce paramètre. Les essais de thermolabilité sont effectués à pH 10,5 et à des températures allant de 70, 80, 90 et 100 °C en absence et en présence du calcium sur des intervalles de temps. Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 36.

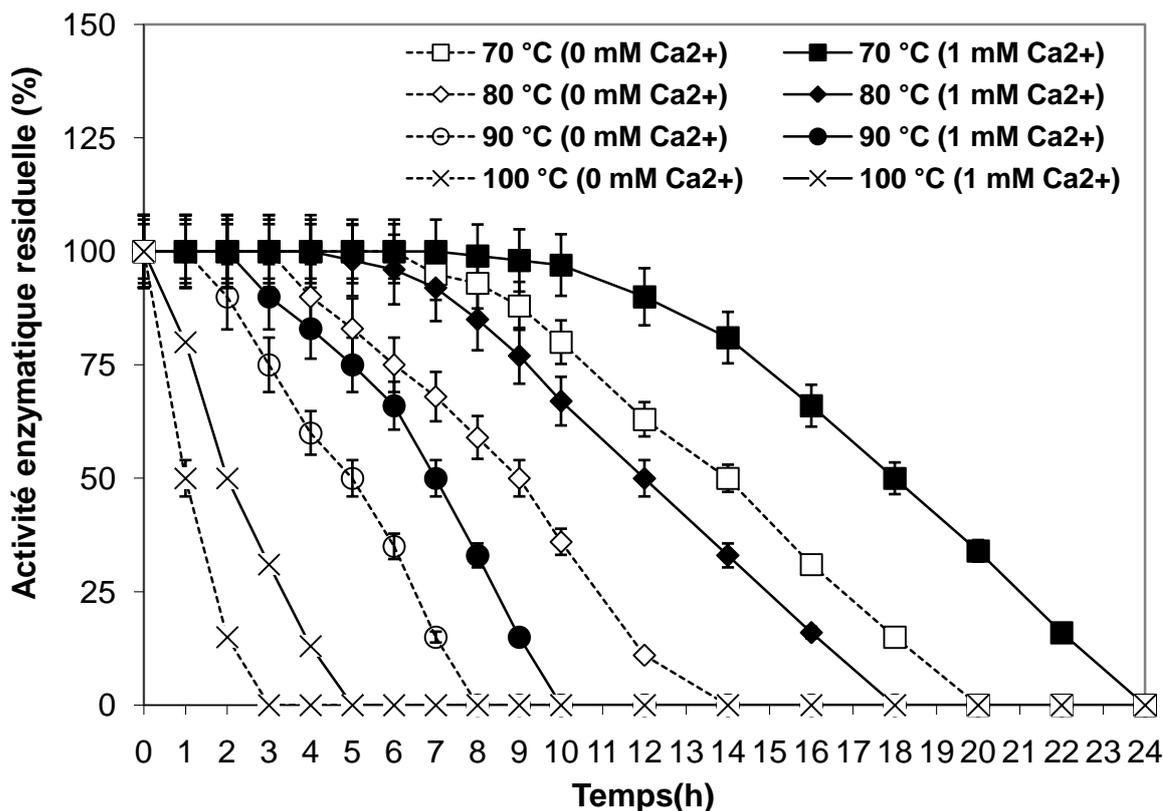


Figure 36: Etude de la thermostabilité de l'enzyme (Pel-20)

L'examen de ces courbes montre que les temps de demi-vie de la Pel 20 en absence de CaCl₂ sont de 14, 9, 5 et 1 h à 70, 80, 90 et 100 °C, respectivement. En revanche, l'addition du Calcium améliore considérablement la thermostabilité de cette pectate lyase. Les temps de demi-vie de la Pel-20 ont augmenté à 18, 12, 7 et 2 h à 70, 80, 90 et 100 °C, respectivement, en présence de 1 mM de CaCl₂. Ainsi, la Pel-20 de l'espèce *Cpt20* d'*A. Keratinilytica* a conservé une activité de 100% à 70 °C pendant au moins 18 heures. La comparaison des temps de demi-vie à 70 °C en absence et en présence de calcium nous a donné un gain du temps de 4h ce qui est considérable à une échelle d'application. Nous signalons que cette enzyme résiste aussi à 100 °C mais avec une demi-vie de 2h en présence de calcium.

En fait, il a été déjà rapporté que le Calcium améliore l'activité et la stabilité de l'enzyme. Il a été suggéré que les ions calcium sont essentiels pour neutraliser le fragment du substrat d'acide uronique chargé négativement pour probablement, stabiliser un anion énolate intermédiaire par résonance; ce qui explique pourquoi les pectines lyases n'ont pas besoin de Ca²⁺ car elles agissent sur la pectine neutre (Henrissat et al., 1995). Ainsi, selon Pickersgill et al, le Ca²⁺ pourrait se lier directement à l'enzyme pour augmenter sa stabilité (Pickersgill et al., 1994).

Ces résultats sont en accord avec plusieurs études sur la pectate lyase des espèces d'actinomycètes *Thermomonospora fusca* (Stutzenberger, 1987), *Amycolata* sp (Bruhlmann, 1995) et des espèces thermophiles appartenant au genre *Bacillus* (Takao et al., 2000 ; Klug-Santner et al., 2006 ; Basu et al., 2009; Sukhumsirchart et al., 2009).

Toutefois, Il existe peu de données disponibles sur les actinomycètes thermophiles producteurs de pectinases thermostables. En outre, nous signalons quelques travaux de recherches sur les pectinases des actinomycètes thermophiles (Stutzenberger., 1987 ; Bruhlmann., 1995 ; Beg, 2000, Kuhad et al., 2004).

IV.4.4. Etude de la stabilité au pH

En ce qui concerne l'analyse de la stabilité du pH, l'enzyme purifiée a été incubée dans des tampons à différentes valeurs de pH (Figure 37).

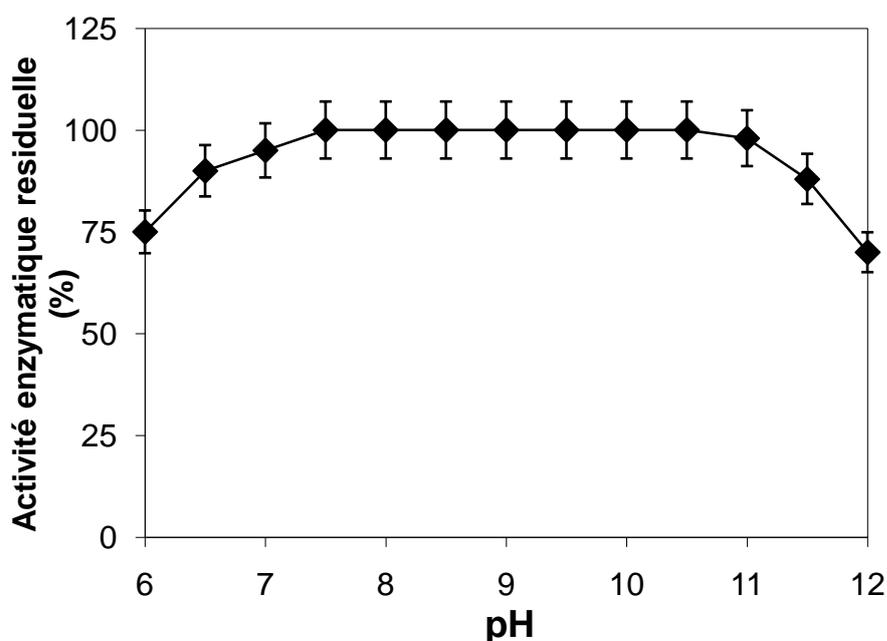


Figure 37 : Etude de la stabilité de la Pel-20 au pH

Le profil de stabilité du pH (figure 37) a montré que la Pel-20 est stable sur une large gamme du pH, en maintenant 100% de son activité initiale à des valeurs de pH comprises entre 7,5 et 11 après une incubation de 24 h à la température ambiante.

Sato et Kaji ont isolé une pectate lyase de l'espèce *Streptomyces fradiae* IFO3439 stable à un intervalle du pH entre 6 et 9 à 2°C pendant 72h (Sato et Kaji., 1975) et une autre Exopolysaccharide lyase de l'espèce *Streptomyces massaporeus* stable à un intervalle

du pH entre 3 et 10 à 2°C pendant 72h et pendant 10min à 50°C à pH 7 (Sato et Kaji., 1980). En outre, Miyairi et ses collaborateurs ont isolé une endo pectate lyase de l'espèce *Streptomyces thermocarboxydus* stable à un intervalle du pH entre 6 et 10 pendant 10h après pré-incubation à 30°C et pendant 15min à 50°C et à pH 6 (Miyairi et al., 2004). D'autres travaux ont décrit une pectate lyase de *Streptomyces sp.* S27 stable qui conserve 70% de l'activité à un intervalle de pH entre 9 et 12 après pré-incubation à 37°C pendant 1h (Yuan et al., 2012). Une pectate lyase recombinante (rPelAI4) de l'espèce *Bacillus sp.* I4 stable à une large gamme du pH (entre 7 et 11) et garde 80% de l'activité à cette intervalle après pré-incubation à 37°C pendant 1h (Zhou et al., 2012).

La forte activité et la stabilité de l'enzyme Pel-20 à des pH élevés constituent en fait un attribut très important qui renforce d'avantage sa candidature potentielle pour des applications industrielles futures.

IV.4.5. Spécificité de l'enzyme vis-à-vis de substrats à différents degrés d'estérification

La spécificité de l'enzyme vis-à-vis de substrats pectiques à différents degrés d'estérification (0%, 32%, 54%, 72%, 85% et ~90%) a été étudiée, en utilisant le tampon ammoniac ($\text{NH}_4\text{OH-NH}_4\text{Cl}$) pour éviter la dés-estérification alcaline spontanée la pectine hautement méthylée (Figure 38).

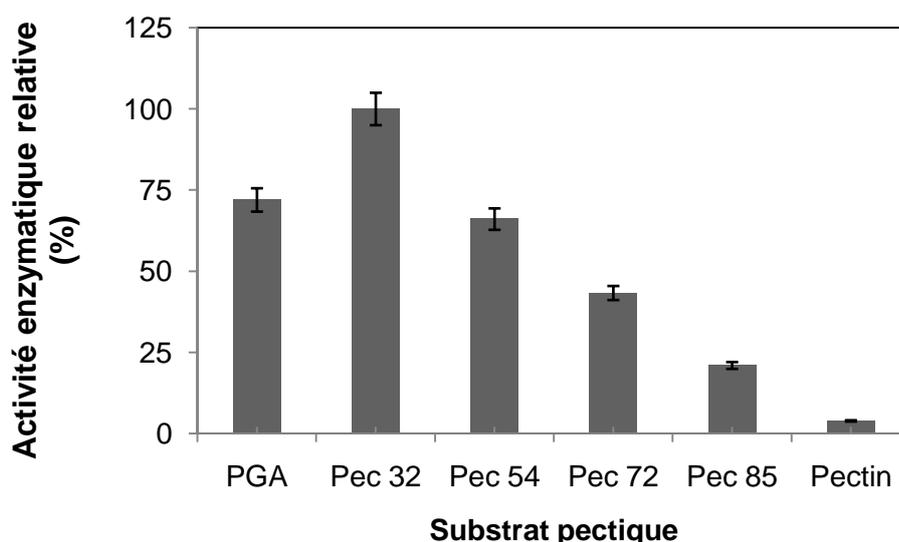


Figure 38 : Spécificité de l'enzyme vis-à-vis de substrats à différents degrés d'estérification de l'enzyme (Pel-20).

APG : Acide polygalacturonique ; Pec32 : Pectine 32% d'esterification ;
 Pec54 : Pectine 54% d'esterification ; Pec72 : Pectine 72% d'esterification ;
 Pec85 : Pectine 85% d'esterification ; Pectine: Pectine ~90% d'esterification.

La **figure 38**, montre que la Pel-20 purifiée est plus active sur un substrat à 32% d'estérification puis sur un substrat totalement dés-estérifié (acide polygalacturonique) que sur la pectine à différents degrés d'estérification. Par ailleurs, l'activité diminue proportionnellement avec l'augmentation du degré d'estérification. Ainsi, avec la pectine hautement estérifiée (72% et 85%), l'activité est plus faible qu'avec un polymère estérifié à 54%. Nous signalons que la pectine totalement esterifiée (Link pectine) est dégradée très faiblement ce qui explique qu'il s'agit bien d'une pectate lyase car la pectine lyase attaque le substrat pectinique hautement estérifié. Ces résultats permettent de classer la Pel-20 parmi les pectate lyases attaquant préférentiellement la pectine faiblement estérifiée à 32% que sur l'acide polygalacturonique et les autres substrats.

Ces résultats sont observés particulièrement pour des pectate lyases isolées des espèces d'actinomycètes *Streptomyces massasporeus* (**Sato et Kaji., 1980**) et *Streptomyces SK* (**Ladjama., 1991**). Contrairement aux résultats trouvés pour les pectate lyases de *Streptomyces nitrosporeus* (**Sato et Kaji., 1977**) et *Streptomyces sp. S27* (**Yuan et al., 2012**) qui se sont montrées plus actives sur l'acide polygalacturonique (APG : pectine totalement dés-estérifié) que sur la pectine faiblement estérifiée.

Il est évident que l'acide polygalacturonique et la pectine faiblement méthylée sont les meilleurs substrats pour la Pel-20 par rapport à la pectine hautement méthylée car, la plupart des pectate lyases dégradent efficacement la pectine avec un degré d'estérification faible ou modéré, mais sont inactives sur la pectine hautement estérifiée (**Berensmeier et al 2004 ; Yuan et al., 2012**). Ce caractère convient aux pectate lyases pouvant être utilisées dans le traitement du tissu de coton car, dans des conditions alcalines et des températures élevées (conditions optimales de récurage), les esters méthyliques de la pectine sont rapidement et spontanément hydrolysés sous forme de pectate (APG), substrat privilégié des pectate lyases. Par conséquent, les pectate lyases qui ont un pH optimal alcalin, tel que Pel-20 et r-PL-STR, sont plus compatibles avec le traitement du textile (**Solbak et al., 2005 ; Yuan et al., 2012**).

IV.4.6. Effet des ions métalliques

Les différents résultats obtenus de l'effet des ions métalliques sur la Pel-20 sont regroupés dans le **Tableau 14**.

Tableau 14 : Effet des ions métalliques sur l'enzyme (Pel-20).

Inhibiteur/Ions métalliques	Concentration	Activité résiduelle (%) ^a
Non	–	100 ± 2.5
EDTA	10 mM	0
Ca ²⁺ (CaCl ₂)	1 mM	306 ± 8.5
Mn ²⁺ (MnCl ₂)	1 mM	268 ± 5.5
Ba ²⁺ (BaCl ₂)	1 mM	216 ± 5.1
Mg ²⁺ (MgCl ₂)	1 mM	226 ± 5.1
Cu ²⁺ (CuCl ₂)	1 mM	51 ± 1.7
Zn ²⁺ (ZnCl ₂)	1 mM	202 ± 4.8
Fe ²⁺ (FeCl ₂)	1 mM	126 ± 3.1
Co ²⁺ (CoCl ₂)	1 mM	180 ± 3.9
Sn ²⁺ (SnCl ₂)	1 mM	90 ± 2.3
Cd ²⁺ (CdCl ₂)	1 mM	0
Hg ²⁺ (HgCl ₂)	1 mM	0
NH ₄ ⁺ (NH ₄ Cl)	1 mM	84 ± 2.1
K ⁺ (KCl)	1 mM	92 ± 2.4
Na ⁺ (NaCl)	1 mM	102 ± 2.5

^a Les valeurs représentent les moyennes de quatre répliques indépendants ± les erreurs standard.

L'analyse du tableau montre que l'activité de l'enzyme a été stimulée par les cations bivalents : Ca²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Ba²⁺, Zn²⁺, Co²⁺ et Fe²⁺ avec des facteurs d'augmentations de : 3.06, 2.68, 2.26, 2.16, 2.02, 1.80 et 1.26 fois respectivement par rapport au témoin. Le Calcium semble être le meilleur activateur de cette enzyme d'où son utilisation comme activateur au niveau de la réaction enzymatique. Les autres ions métalliques inhibent l'activité de l'enzyme et l'inhibition maximale de l'activité de la Pel-20 est obtenue en présence des ions de Cu²⁺ (51%). En outre, l'effet des sels monovalent (Na⁺, K⁺, NH₄⁺) n'est pas important. En revanche, les métaux lourds Hg²⁺ et Cd²⁺ bloquent complètement la réaction enzymatique. Par ailleurs, l'addition de l'EDTA à 10 mM inhibe complètement l'action de l'enzyme, étant un agent chélateur des cations métalliques en l'occurrence le Calcium nécessaire pour l'activité de Pel-20. En plus cet agent n'agit pas sur les pectine

lyases qui ne requièrent pas de Calcium ce qui les différencie des pectate lyases (**Rexova-Benkova., 1976; Herron et al., 2000 ; Jayani et al., 2005**).

Ces résultats sont comparables avec ceux de Basu et ses collaborateurs (**Basu et al., 2009**). En effet, l'exopectate lyase de *C. multif fermentans* et celle de *F. culmorum* sont activées par les ions calcium à des concentrations de 0,5 et 10 mM respectivement, alors que celle d'*Erwinia aroideae* est plus stimulée par les ions sodium (**Baron et Thibault., 1985**). Les exopectate lyases d'*Erwinia chrysanthemi* 3937 sont actives en présence des ions calcium mais surtout en présence des ions cobalt, manganèse et nickel. Ces enzymes attaquent les oligomères pectiques générés par les pectinases extracellulaires (**Shevchik et al., 1997**).

IV.4.7. Détermination de la concentration optimale de calcium

La concentration optimale de calcium a été également déterminée. Sur la **figure 39**, on remarque que l'activité est optimale à une concentration de 1mM de CaCl_2 et on constate une diminution au-delà de cette concentration mais l'activité demeure néanmoins plus élevée qu'en absence de calcium.

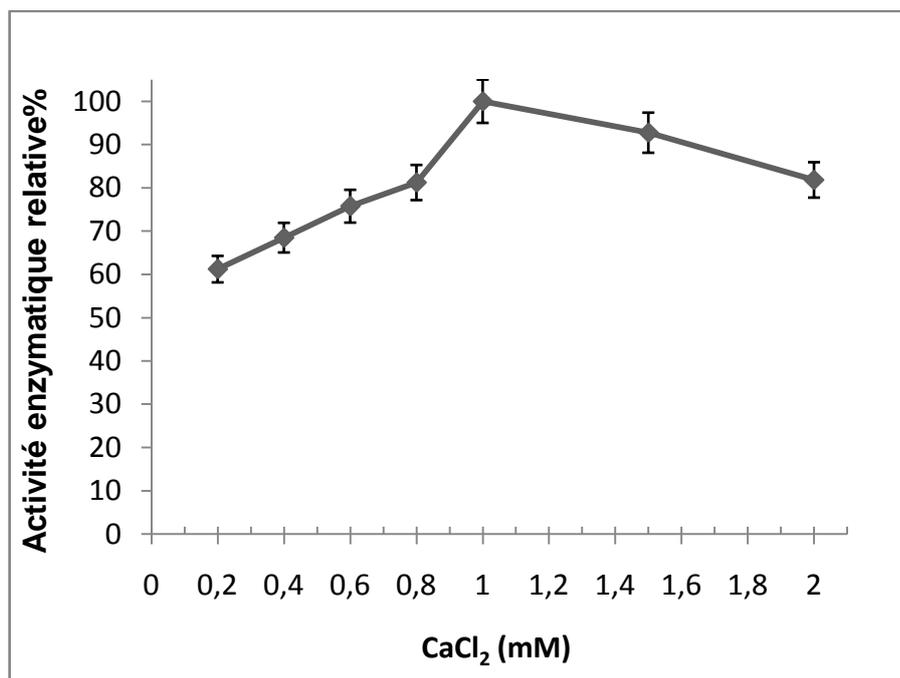


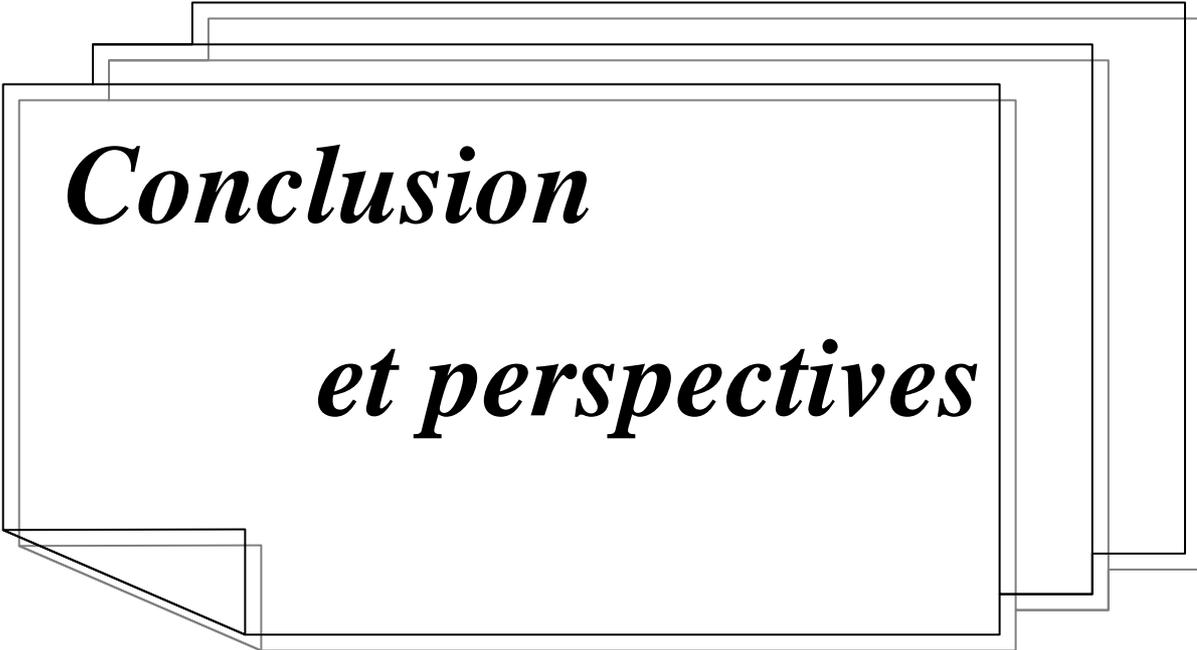
Figure 39 : Concentration optimale de calcium d'action de l'enzyme (Pel-20)

Il a été déjà rapporté que le Calcium améliore l'activité et la stabilité de l'enzyme (Henrissat et al., 1995 ; Rao et al., 1996). En revanche, selon Pickersgill et al, le Ca^{2+} pourrait se lier directement à l'enzyme pour augmenter sa stabilité (Pickersgill et al., 1994). En fait, plusieurs chercheurs ont élucidé le mécanisme d'action des pectate lyases ainsi, les acides aminés (Aspartate et Glutamate) impliqués dans la fixation du Calcium par la méthode de cristallographie (Yoder et al 1993a, 1993b ; Yoder et al 1995; Herron et al., 2000 ; Akita et al., 2001 ; Seyedarabi et al., 2010). Herron et al. ont constaté que le calcium active l'enzyme par pontage entre le polymère pectique et l'enzyme (Herron et al., 2003). Ils ont été suggéré que les ions calcium sont essentiels pour neutraliser le fragment du substrat d'acide uronique chargé négativement pour probablement, stabiliser un anion énolate intermédiaire par résonance; ce qui explique pourquoi les pectines lyases n'ont pas besoin de Ca^{2+} car elles agissent sur la pectine neutre (Herron et al., 2000).

Quelques travaux de recherches sur les actinomycètes et d'autres espèces ont montré que la concentration optimale du calcium est de 1mM (Ladjama., 1991 ; Crawford et Kolattukudy., 1987; Hayashi et al., 1997; Sawada et al., 2000 ; Takao., 2000). Toutefois d'autres travaux de recherche sur d'autres espèces montrent que le calcium agit à d'autres concentrations allant de 0.1 à 10 mM (Stutzenberger., 1987; Bruhlmann., 1995; Beg., 2000; Berensmeier et al., 2004; Hatada et al., 2000; Soriano et al., 2006).

Conclusion

Dans la quatrième partie de ce travail, nous avons déterminé les caractéristiques biochimiques de notre Pectate lyase. Les différentes investigations ont montré que cette nouvelle pectate lyase est alcaline avec un pH optimum de 10,5 et thermoactive avec une température optimale de 65°C qui passe à 70°C en présence de 1mM Calcium. L'effet de cet ion a été aussi exemplifié au niveau de la thermostabilité de l'enzyme, avec une nette augmentation en sa présence. A titre d'exemple, la demie-vie passe d'une à deux heures à 100°C et de 14 à 18 heures à 70°C. La Pel-20 montre aussi une grande stabilité, en gardant 100% de son activité de pH 7.5 à pH11. Par la suite, nous avons classé la Pel-20 parmi les pectate lyases attaquant préférentiellement la pectine faiblement estérifiée, avec une préférence pour la pectine à 32% de degré d'estérification. L'effet de plusieurs ions a été testé à une concentration de 1mM et a montré qu'outre le calcium, d'autres ions divalents, stimulent fortement l'activité lyase comme le Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} et Co^{2+} , alors que d'autres sont fortement inhibiteurs alors que certains inhibent complètement l'enzyme étudiée, comme les ions Hg^{2+} et Cd^{2+} . Finalement, la concentration optimale du meilleur ion stimulateur, le Ca^{2+} , a été déterminée comme étant 1mM et ce, en balayant des concentrations allant de 0 à 2 mM.



Conclusion

et perspectives

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouvelles espèces thermophiles produisant des enzymes d'intérêts industriels (pectinases, xylanases, amylases, chitinases, protéases, kératinases).

Dans une première partie du travail, le criblage de l'activité pectinolytique a concerné vingt neuf (29) espèces d'actinomycètes thermophiles (Cpt1 à Cpt29) qui ont été isolées à partir du compost de poulet de la région d'Annaba. Parmi ces espèces, la Cpt 20 ayant une activité la plus élevée, 428,3UI/ml, soit 14 fois plus que la Cpt15, a été sélectionnée pour une étude plus approfondie. L'identification de cette espèce par la technique moléculaire en se basant sur le gène de l'ARNr 16S montre qu'il s'agit d'une espèce d'actinomycète thermophile appartenant au genre *Actinomadura* nommée: *Actinomadura keratinilytica* Cpt 20. Cette dernière est parmi les espèces d'actinomycètes les plus rares dans la classe des actinomycètes et peu connues, ce qui constitue une nouvelle source pour l'investigation et la production de substances bioactives, en l'occurrence les pectinases. Selon l'étude bibliographique, aucune espèce appartenant au genre *Actinomadura* ayant une activité pectinolytique n'a été signalée, d'où l'intérêt d'étudier l'activité enzymatique de cette espèce.

Dans une deuxième partie du travail, une étude a porté sur l'optimisation de la production de l'enzyme secrétée (cinétique de production de l'enzyme, meilleure source de carbone et d'azote) a permis d'améliorer la production de l'enzyme avant de procéder à sa purification. Ainsi, la cinétique de production de l'enzyme montre que le temps optimal est de 5 jours. Le choix des sources de carbone et d'azote a conduit initialement à une augmentation du taux de production de l'enzyme de plus de 3 fois. En plus, cette étude a permis de choisir une source de carbone bon marché (Ecorces d'oranges broyées) et une source d'azote minérale (nitrate d'ammonium). Cette étude a montré également que l'enzyme est inductible et subit une répression catabolique par le glucose, ce qui semble être le cas des autres microorganismes. Ces différents résultats obtenus ont mis en exergue l'intérêt de notre espèce par rapport aux autres espèces étudiées, en particulier les genres *Bacillus* et *Streptomyces*.

La troisième partie de ce travail de recherche a été consacrée à la purification de l'enzyme et la détermination de ses caractéristiques physicochimiques et moléculaires (pH, température, stabilité, activateurs, inhibiteurs, spécificité, Poids moléculaire, Séquence la N-terminale). Les profils électrophorétiques montrent que la Pel-20 se présente sous une seule bande majoritaire et homogène de taille apparente de 34 kDa. L'activité enzymatique de la

fraction purifiée a été vérifiée par zymogramme sur gel natif en utilisant l'acide polygalacturonique comme substrat. L'analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF/MS) de l'enzyme purifiée, montre que la masse moléculaire exacte de la Pel-20 est de 33125.11 Da, ce qui est en accord avec la masse relative trouvée par la méthode PAGE-SDS.

Dans la quatrième partie de ce travail, la caractérisation biochimique de l'enzyme purifiée a montré que la Pel-20 a une température optimale élevée et un pH optimum très alcalin, qui sont de 70°C et 10.5 respectivement. Egalement, l'étude de la thermolabilité de la Pel-20 a été effectuée au pH optimum et à des températures allant de 70, 80, 90 et 100 °C en absence et en présence du calcium sur des intervalles de temps. Les résultats montrent que les temps de demi-vie de la Pel-20 en absence de calcium sont de 14, 9, 5 et 1 h à 70, 80, 90 et 100 °C, respectivement. En revanche, l'addition du calcium améliore considérablement la thermostabilité de cette pectate lyase. Ainsi, les temps de demi-vie de la Pel-20 ont augmenté à 18, 12, 7 et 2 h à 70, 80, 90 et 100 °C, respectivement, en présence de 1 mM de calcium. La Pel-20 de l'espèce *Cpt20* d'*A. keratinilytica* a conservé une activité de 100% à 70 °C pendant au moins 18 heures avec un gain du temps de 4h à 70 °C ce qui est considérable à une échelle d'application. Cette température pourrait réduire suffisamment le risque de contamination et augmenter la solubilité et la vitesse de diffusion de polymère de substrat tout en évitant la formation non enzymatique d'oligomères insaturés. Cependant, pour une utilisation industrielle, des températures modérément élevées seraient avantageuses car, à des températures très élevées, des mélanges d'oligomères insaturés comme produits secondaires peuvent être générés à partir de substrats de pectine avec un degré d'estérification élevé, via une β -élimination chimique (**Berensmeier et al 2004**). En effet, diverses études indiquent que la thermostabilité est attribuée à la présence de cystéine, résidu présent dans les séquences d'acides aminés des pectinases permettant la formation de liaisons disulfure et conférant aux pectinases une forte hydrophobie (**Rebello, 2017**).

Par ailleurs, la stabilité de l'enzyme aux différents pH a été étudiée. Le profil de stabilité du pH a montré que la Pel-20 est stable sur une large gamme du pH, en maintenant 100% de son activité initiale à des valeurs de pH comprises entre 7,5 et 11 après une incubation de 24 h à la température ambiante. Ces propriétés biochimiques sont très recherchées par les industriels ce qui suggère que la Pel-20 est une excellente candidate pour des applications biotechnologiques futures. L'étude de la spécificité de l'enzyme vis-à-vis de substrats pectiques ayant différents degrés d'estérification a montré que la Pel-20 purifiée est plus active sur un substrat moyennement estérifié (32%). Ainsi, l'activité diminue

proportionnellement avec l'augmentation du degré d'estérification. Ces résultats permettent de classer la Pel-20 parmi les pectate lyases attaquant préférentiellement la pectine moyennement estérifiée. En outre, l'étude de l'effet des ions métalliques sur la Pel-20 a montré que le calcium est le meilleur activateur avec une concentration optimale de 1mM. Quelques ions métalliques inhibent l'activité de l'enzyme et l'inhibition maximale de l'activité de la Pel-20 est obtenue en présence des ions de cuivre (51%). Enfin, les métaux lourds (Hg, Cd) et l'EDTA, bloquent totalement la réaction enzymatique. L'effet de l'EDTA confirme bien qu'il s'agit d'une pectate lyase.

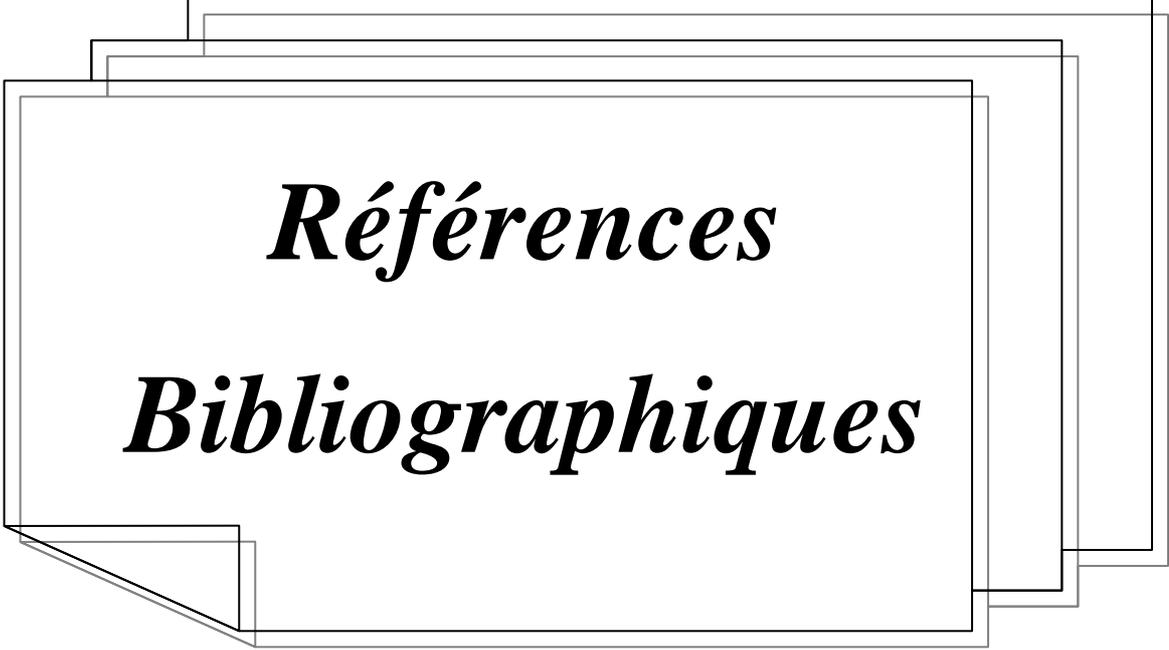
Parallèlement, la protéine pure a permis de déterminer les 19 premiers amino-acides de l'extrémité NH₂-terminale. L'analyse de cette séquence par rapport à d'autres séquences disponibles dans la base de données PDB (*Protein Database*) en utilisant le programme *BLASTP* montre une bonne identité (similitude) avec les pectate lyases bactériennes, particulièrement issues des espèces d'actinomycètes: *Streptomyces zinciresistens*, *Actinoplanes* sp. N902-109 et *Streptomyces viridochromogenes*Tue57, avec une similarité allant de 87, 81 à 80% respectivement. Ces résultats suggèrent fortement qu'il s'agit d'une nouvelle pectate lyase de l'espèce Cpt 20 d'*Actinomadura keratinilytica*.

Du point de vue application, notre espèce *A. keratinilytica* Cpt20 pourrait être exploitée lors des traitements biotechnologiques des déchets de l'agro-industrie (industries de jus) qui présentent un danger aussi bien pour l'environnement que pour la santé humaine. Ceci devrait permettre de valoriser la biomasse rejetée chaque année en grande quantité par les industries et l'obtention des produits de haute valeur ajoutée.

En perspective :

- Puisque nous disposons de la séquence N-terminale de notre protéine, nous penserons à exploiter ce résultat en synthétisant des amorces non dégénérées sur la base de cette séquence, en utilisant à la fois le code génétique et l'usage des codons des espèces les plus proches afin d'isoler le gène (*Pel20*) codant pour la Pel-20.
- En ce qui concerne l'optimisation de la production, nous avons tenté une optimisation factorielle, cependant pour des raisons de temps, nous avons opté pour l'optimisation classique. Il serait souhaitable de reprendre ces expérimentations afin de compléter ce travail de recherche et gagner du temps dans la production de l'enzyme.

- Egalement, le mode d'attaque caractère «endo ou exo » devrait être élucidé en relation avec la nature des produits de dégradation. Ces produits de dépolymérisation peuvent jouer un rôle aussi bien en chimie qu'en nutrition.
- Enfin, il serait intéressant de procéder à une expression hétérologue de cette Pel-20 afin d'augmenter à la fois le rendement de production (sur le plan quantitatif) et une purification plus facile.
- Vu l'intérêt général de l'espèce nouvellement isolée et avec l'avancée des techniques de séquençage haut débit, nous pensons réaliser le séquençage du génome de cette espèce afin de bien l'explorer et exploiter au mieux les autres potentialités, notamment enzymatiques, de notre espèce.



Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

A

Ahlawat S., Mandhan RP., Dhiman SS., Kumar R., Sharma J., 2008. Potential application of alkaline pectinase from *Bacillus subtilis* SS in pulp and paper industry. *Appl Biochem Biotechnol.*, 149: 287-293.

Akita M, Suzuki A, Kobayashi T, Ito S, Yamane T., 2001. The first structure of pectate lyase belonging to polysaccharide lyase family 3. *Acta Crystallogr* 57:1786–1792

Albersheim P et Killias U., 1962. Studies relating to the purification and properties of pectin transesterase. *archives of biochemistry and biophysics* .97; 107-115.

Albersheim, P., Darvill, A.G., O'Neill, M.A., Schols, H.A., Voragen, A.G.J., 1996. An hypothesis; the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. In J. Visser, A.G.J. Voragen, eds, *Pectins and Pectinases*, Elsevier Science 8.V., Amsterdam, pp 47-55.

Alkorta I., Garbisu C., Llama MJ., Serra JL., 1998. Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochem.*, 33: 21-28.

Amin F, Bhatti HN, Bilal M, Asgher M., 2017. Purification, kinetic, and thermodynamic characteristics of an exopolysaccharidase from *Penicillium notatum* with industrial perspective. *Appl Biochem Biotechnol.* doi:10.1007/s12010-017-2455-y

Arunachalam C et Asha S., 2010. Pectinolytic Enzyme - a Review of New Studies. *Adv. Biotech. J.*, 1 : 1-5.

B

Baron A et Thibault J.F., 1985. Les enzymes pectolytiques. Dans: hydrolases et dépolymérasés, enzymes d'intérêt industriel. A. Moranche, C. Costes. Ed, Gauthier-Villars, Paris, pp143-164.

Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., & van Wezel, G. P., 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 80 : 1-43.

Basu S, Saha MN, Chattopadhyay D, Chakrabarti K., 2009. Large-scale degumming of ramie fibre using a newly isolated *Bacillus pumilus* DKS1 with high pectate lyase activity. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36:239-245.

Beg Q.K., Bhushan B. and Hoondal G.S., 2000. Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3, *J Ind. Microbiol. Biot.*, 24, 396–402.

Bentley SD, Chater KF et 42 other Authors., 2002. Complete genome sequence of the model Actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.* 417:141-147.

Berensmeier S. Singh S. A., Meens J et Buchholz K.2004. Cloning of the *pelA* gene from *Bacillus licheniformis* 14A and biochemical characterization of recombinant, thermostable, high-alkaline pectate lyase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 64: 560–567

Bonnin E., Renard C., Thibault J.F et Ducro P. 1997., Les enzymes de dégradation des parois végétales : Mode d'action et utilisations alimentaire. dans. *Enzymes en agroalimentaire. Larrata-Garde.V. Tech & documentation. Lavoisier.* pp. 168-200.

Bonnin E., Dolo E., Le Goff A et Thibault J.F., 2002., Characterisation of pectin subunits released by an optimised combination of enzymes. *Carbohydr. Res.*, 337, 1687-1696.

Bonnin E, Garnier C, Ralet MC., 2014., Pectin-modifying enzymes and pectin derived materials: applications and impacts. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98: 519–32.

Boulahrouf A. (1988). La microflore responsable de la dégradation des polysides pariétaux dans le gros intestin de la souris et du lapin. Thèse de doctorat. Université de Clermont-Ferrand II.

Bradford M., 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.*92: 248-254.

Bruhlmann F, Kim KS, Zimmerman W, Fiechter A., 1994. Pectinolytic enzymes from actinomycetes for the degumming of ramie bast fibers. *Appl Environ Microbiol.* 60: 2107-2112.

Bruhlmann F., 1995. Purification and characterization of an extracellular pectate lyase from an *Amycolata* sp. *Appl Environ Microbiol* 61:3580-3585.

Butler M.J., Bruheim P., Jovetic S., Marinelli F., Postma P.W. et Bibb M.J., 2002. Engineering of primary carbon metabolism for improved antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Appl.Environ.Microbiol.*, 68(10): 4731-4739.

Butler M.J., Takano E., Bruheim P., Jovetic S., Marinelli F. et Bibb M.J., 2003. Deletion of *scbA* enhances antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Appl.Microbiol. Biotechnol.*, 161: 512–516

Byrne CE, Cavalitto SF, Voget CE., 2017. Purification and characterization of two inducible exopolysaccharidases from *Aspergillus kawachii*. *Biocatal Agric Biotechnol.* 10:38–45.

C

Cameron R.G., Luzio G.A., Goodner K. & Williams M.A.K., 2008. Demethylation of a model homogalacturonan with a salt-independent pectin methyltransferase from citrus: I. Effect of pH on demethylated block size, block number and enzyme mode of action. *Carbohydr. Polym.* 71: 287-299.

Cao J., Zheng L., Chen S., 1992. Screening of pectinase producer from alkalophilic bacteria and study on its potential application in degumming of ramie. *Enzyme Microb Technol.*, 4:1013–1016

Capel F. et al., 2006. Calcium and acid induced gelation of (amidated) low methoxyl pectin. *Food Hydrocolloids*, 20, 901-907.

Carpita NC, Gibeaut DM., 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J*; 3:1–30.

Celestino SMC et al., 2006. Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties. *J.Biotechnol.*123:33–42.

Chauhan D. et al., 2005. A novel carbohydrate-based therapeutic GCS-100 overcomes bortezomib resistance and enhances dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells. *Cancer Res.* 65: 8350-8358.

Chen C.W., 1995. The instable ends of the *Streptomyces* linear of chromosomes: A nuisance without cures? *trends in biotechnol.*, 13:157-160.

Collmer A, Ried JL, Mount MS., 1988. Assay methods for pectic enzymes. *Methods Enzymol* 161:329-335.

Combo AMM, Aguedo M et Paquot M., 2011. Les oligosaccharides pectiques : production et applications possibles. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15 : 153-164.

Crawford MS, Kolattukudy PE., 1987. Pectate lyase from *Fusarium solani* f. sp. pisi: purification, characterization, in vitro translation of the mRNA, and involvement in pathogenicity. *Arch Biochem Biophys.*, 258: 196–205.

D

Damak N, Hadj-Taieb N, Bonnin E, Ben Bacha A, Gargouri A. 2011., Purification and biochemical characterization of a novel thermoactive fungal pectate lyase from *Penicillium occitanis*. *Process Biochem.* 46:888-893.

Dellaras C., 1998. 90 heures des travaux pratiques. Gaiten morin.

Denès J.M. et al., 2000. Different action patterns for apple pectin methylesterase at pH 7.0 and 4.5. *Carbohydr. Res.*, 327, 385-393.

De Vries R.P. & Visser J., 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65 : 497-522.

De Vries R.P. et al., 2002. The β -1,4-endogalactanase A gene from *Aspergillus niger* is specifically induced on arabinose and galacturonic acid and plays an important role in the degradation of pectic hairy regions. *Eur. J. Biochem.* 269: 4985-4993.

Divya Teja D., Harsha N., Satya S., Vishala P.K et Lakshmi S. 2014. Production of L-glutaminase from marine ecosystems and optimal conditions for maximal production by actinomycetes. *Int.J.Adv.Rev.*, 2(1): 485-491.

Djlouat S., 1990. Le diagnostic biochimique Bactrien, Ed. Science et technique Constantine ,61p.

Dumville J.C. et Fry S.C., 2000. Uronic acid-containing oligosaccharins: their biosynthesis, degradation and signalling roles in non-diseased plant tissues. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 125-140.

F

Fang Y. et al., 2008. Binding behavior of calcium to polyuronates: comparison of pectin with alginate. *Carbohydr Polym.*, 72, 334-341.

Favela-Torres E., Volke-Sepúlveda T et Vniegra-Gonzalez G., 2006. Production of hydrolytic depolymerising pectinases. *Food Technol. Biotechnol.* 44: 221-227.

Fonty G. et Forano E. (1999). Ecologie de la dégradation et de la fermentation des polyholosides constitutifs des parois vegetales dans la rumeur. *Cahiers d'agriculture.* 21-35.

G

Gaberiel P., 2005. Etude Structure /fonction d'hemicellulases thermostables : la xylanase GH-II et l'arabinofuranosidase GH-51 de *Thermobacillus xylanilyticus*. Thèse de Doctorat. Université de Reims Champagne- Ardenenne Inra umr fare 614 .p.p.350.

Garg, G., Singh, A., Kaur, A., Singh, R., Kaur, J., & Mahajan, R., 2016. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech*, 6(1), 47.

Gielkens M. et al., 1999. The abfB gene encoding the major α -L-arabinofuranosidase of *Aspergillus nidulans*: nucleotide sequence, regulation and construction of a disrupted strain. *Microbiology*, 145, 735-741.

Goodfellow M. et Alderson G., 1979. Numerical Taxonomy of *Actinomadura* and related actinomycetes. *Journal of General Microbiology.*, 112: 95-111.

Goodfellow M. et Williams S.T., 1983. Ecology of actinomycetes. *Ann.Rev.Microbiol.*, 37(1): 189-216.

Goodfellow M., Lacey J et Todd C., 1987. Numerical Classification of Thermophilic *Streptomyces*. *Journal of General Microbiology.*,133: 3135-3149

Guillotin S.E. et al., 2007. Rapid HPLC method to screen pectins for heterogeneity in methyl-esterification and amidation. *Food Hydrocolloids*, 21, 85-91.

Guiraud J.P., 1998. Techniques d'analyse microbiologique. , Ed RIA, Dunod, Paris, pp310-321.

Gummadi SN, Panda T., 2003. Purification and biochemical properties of microbial pectinases: a review. *Proc. Biochem.* 38: 987-996.

Gurtler V., Stanisich V. A. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology.* 142: 3-16.

H

Habbeche A., Habbera S., Saoudi B., Kerouaz B., Ladjama A., 2013. Keratinases production from thermophilic actinomycete strain Cpt29 newly isolated from poultry compost. *Minerva Biotechnologica*. 25: 151-159.

Habbeche A., Saoudi B., Jaoudi B., Habbera S., Kerouaz B., Boudelaa M., Badis A., Ladjama A., 2014. Purification and biochemical characterization of a detergent- stable Keratinase from a newly thermophilic Actinomycete *Actinomadura kiratinilytica* strain Cpt29 isolated from poultry compost. *J. Biosci. Bioeng.*, 117: 413-421.

Habbera S, Habbeche A, Saoudi S, Kerouaz B, Slimani S, Boudelaa M, Ladjama A., 2013. Optimization of xylanase production by a newly thermophilic actinomycete strain Cpt29 isolated from poultry compost. *Eur J Sci Res*. 108 : 227-239.

Hadj-Sassi, A., Tounsi, H., Trigui-Lahiani, H., Bouzouita, R., Romdhane, Z. B., & Gargouri, A., 2016. A low-temperature polygalacturonase from *P. occitanis*: characterization and application in juice clarification. *International journal of biological macromolecules*, 91, 158-164.

Hadj-Taieb N, Ayadi M, Khelif M, Mrad K, Hassairi I, Gargouri A., 2006. Fermentor production of pectinases on gruel, a local by-product and their use in olive oil extraction. *Enzyme Microb Technol*. 39:1072-1076.

Hadj-Taieb N, Grati N, Ayadi M, Attia I, Bensalem H, Gargouri A., 2012. Optimisation of olive oil extraction and minor compounds content of Tunisian olive oil using enzymatic formulations during malaxation. *Biochem Eng J*. 62:79-85.

Hankin L, Zucker M, Sands DC. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. *Appl Microbiol* 1971;22:205-209.

Hanana, S., Elloumi, A., Placet, V., Tounsi, H., Belghith, H., & Bradai, C., 2015. An efficient enzymatic-based process for the extraction of high-mechanical properties alfa fibres. *Industrial Crops and Products*. 70: 190-200.

Hasegawa S., Meguro A., Shimizu M., Nishimura T. et Kunoh H., 2006. Endophytic actinomycetes and their interactions with host plants. *Journal of the Japan Society of actinomycetes*. 20(2): 72-81.

Hayashi K, Inoue Y, Shiga M, Sato S, Takano R, Hirayae K, Hibi T, Hara S., 1997. Pectinolytic enzymes from *Pseudomonas marginalis* MAFF 03-01173. *Phytochemistry* 45:1359-1363.

Henriksson G, Akin DE, Rigsby LL, Patel N, Eriksson KEL., 1997. Influence of chelating agents and mechanical pretreatment on enzymatic retting of flax. *Tex Res J*. 67: 829-836.

Henrissat B, Heffron SE, Yoder MD, Lietzke SE, Journak F., 1995. Functional implications of structure-based sequence alignment of proteins in the extracellular pectate lyase superfamily. *Plant Physiol*. 107:963-976.

Herron SR, Benen JA, Scavetta RD, Visser J, Journak F., 2000. Structure and function of pectic enzymes: Virulence factors of plant pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:8762-8769.

Herron SR, Scavetta RD, Garrett M, Legner M, Journak F., 2003. Characterization and implications of Ca⁺² binding to pectate lyase C. *J Biol Chem*. 278:12271–12277.

Hewick RM., Hunkapiller MW., Hood LE., Dreyer WJ., 1981. A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. *J Biol Chem*. 256: 7990-7997.

Hoondal GS, Tiwari RP, Tewari R, Dahiya N, Beg QK., 2002. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*. 59:409-418.

Horikoshi, K., et Akiba, T. 1982. Alkalophilic Microorganisms: a new microbial world. Springer. New York, NY.

Hotchkiss A.T. et al., 2003. Pectic oligosaccharides as prebiotics. *ACS Symp. Ser.*, 849, 54-62.

Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Dominguez H., Robert-Baudouy J., 1994. Environmental conditions affect the transcription of the pectinase gene of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J Bacteriol* 174:7806–7818.

Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Condemine G., Nasser W., Reverchon., 1996. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu Rev Microbiol* 50:213–257.

Hunkapiller M. W., Hood L. E. 1978. Direct microsequence analysis of polypeptides using an improved sequenator, a nonprotein carrier (polybrene), and high pressure liquid chromatography. *Biochemistry*. 17: 2124-2133.

I

Ishii T. et al., 1999. The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a covalently cross-linked dimer. *J. Biol. Chem.*, 274(19), 13098-13104.

Isik K., Chun J., Hah Y.C. et Goodfellow M., 1999. *Nocardia Salmocida*: a fish pathogen. *Inter. J.Syst.Bacteriol.*, 49, 833-837.

J

Jackson C.L. et al., 2007. Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure. *Glycobiology*. 17: 805-819.

Jacob N. et Prema P., 2006. Influence of mode of fermentation on production of polygalacturonase by a novel strain of *Streptomyces lydicus*, *Food Technol. Biotechnol.*, 44, 263- 267.

Janaki T., 2017. Enzymes from Actinomycetes – Review. *International Journal of ChemTech Research*.10: 176-182

Jayani RS, Saxena S, Gupta R., 2005. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochem*; 40:2931-2944.

Jenkins J, Shevchik VE, Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Pickersgill RW. 2004., The crystal structure of pectate lyase Pel9A from *Erwinia chrysanthemi*. *J Biol Chem* 279:9139–9145.

K

Kaiser P., 1971a. L'activité pectinolytique des actinomycètes. *Ann. Inst. Pasteur.*121: 389-404.

Kaiser P., 1971b. pectinolytic function in actinomycetales. *CR Acad. Sci. Hebd. Séances Acad. Sci D.* 18: 272: 501-505.

Karam N.E., Belarbi A., 1995. Detection of polygalacturonases and pectines esterases in lactic acid bacteria. *World.J.Microbiol.Biotechnol.*11: 559-563.

Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, Tewari R., 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour Technol.* 77:215-227.

Khatri BP, Bhattarai T, Shrestha S, Maharjan J., 2015. Alkaline thermo-stable pectinase enzyme from *Aspergillus niger* strain MCAS2 isolated from Manaslu Conservation Area, Gorkha Nepal. *Springer Plus.* 4:1–8.

Kim, C. S., Jo, K., Kim, J. S., Pyo, M. K., & Kim, J., 2017. GS-E3D, a new pectin lyase-modified red ginseng extract, inhibited diabetes-related renal dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC complementary and alternative medicine*, 17: 430.

Kitouni M., 2007. Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaires des souches actives et caractérisation préliminaires des substances élaborées. Thèse de Doctorat. Université Mentouri de Constantine (Algérie). 205 p.

Klug-Santner BG, Schnitzhofer W, Vrsanska M, Weber J, Agrawal PB, Nierstrasz VA, Guebitz GM., 2006. Purification and characterization of a new bioscouring pectate lyase from *Bacillus pumilus* BK2. *J Biotechnol.*121:390-401.

Kluskens LD, van Alebeek GJ, Voragen AG, de Vos WM, van der Oost J., 2003. Molecular and biochemical characterization of the thermoactive family 1 pectate lyase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Biochem J.* 370: 651-659.

Knox, P.J. 1997., The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls. *Int. Rev. Cytol.* 171: 79- I 20.

Kuhad, R.C. Kapoor, M. et Rustagi, R .(2004). Enhanced production of an alkaline pectinase from *Streptomyces* sp. RCK-SC by whole-cell immobilization and solid-state cultivation. *World Journal of Microbiology et Biotechnology* 20: 257–263.

L

Lacey J., 1973. Actinomycetes in soils, composts and fodders, In: Actinomycetales: characteristics and practical importance. *Academic. Press.*, London, New York. 231–251.

Ladjama A., 1991. Isolement, purification, et caractérisation d'une endopectate lyase d'une souche de *Streptomyces*., Thèse de doctorat. Université René Descartes de paris, 168p

Ladjama A, Chardon-Loriaux I, Foglietti MJ., 1991. On the pectinolytic activity of two *Streptomyces* strains. *FEMS Microbiol Lett.* 79:279-284.

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

Larpent J.P. et Larpent-Gourgand M., 1997. Mémento technique de microbiologie. Tech et documentation Lavoisier 3ed: 596-621.

Larrata-Garde V., 1997. Utilisation et fonctionnement des enzymes. La place des enzymes en agroalimentaire. Dans: *Enzymes en agroalimentaire.* Tech et documentation. Lavoisier., 6-12 ; 123-128.

Lechevalier HA et Lechevalier MP. 1965. Classification des actinomycètes aérobies basée sur leur morphologie et leur composition chimique. *Ann Inst Pasteur* 108:662–673. (In French.)

Lechevalier H.A. et Lechevalier M.P., 1967. Biology of actinomycetes. *Ann.Rev.Microbiol.*, 21(1): 71-100.

Lechevalier M.P., Bievre C.D. et Lechevalier H., 1977. Chemotaxonomie of aerobic Actinomycetes : phospholipides composition. *Bioch.Syst.Ecol.*, 5(4): 249–260.

Levigne S. et al., 2002. Determination of the degrees of methylation and acetylation of pectin using a C18 column and internal standards. *Food Hydrocolloids*, 16, 547-550.

Li G, Rao L, Xue Y, Zhou C, Zhang Y, Ma Y., 2010. Cloning, expression, and characterization of a highly active alkaline pectate lyase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5. *J Microbiol Biotechnol.* 20: 670-677.

Li X, Wang H, Zhou C, Ma Y, Li J, Song J., 2014. Cloning, expression and characterization of a pectate lyase from *Paenibacillus* sp. 0602 in recombinant *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol* 14: 18.

M

Macagnan D., Romeiro R. D. S. et Pomella A. W., 2008. Production of lytic enzymes and siderophores, and inhibition of germination of basidiospores of *Moniliophthora* (ex *Crinipellis*) *perniciosa* by phylloplane actinomycetes. *Biol.Control.*, 47(3): 309-314.

Maisuria VB, Nerurkar AS., 2012. Biochemical properties and thermal behaviour of pectate lyase produced by *Pectobacterium carotovorum* *subsp. carotovorum* BR1 with industrial potentials. *Biochem Eng J.* 63:22–30.

Mayans O, Scott M, Connerton I, Gravesen T, Benen J, Visser J, Pickersgill R, Jenkins J., 1997. Two crystal structures of pectin lyase A from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in the substrate binding clefts of pectin and pectate lyases. *Structure* 5:677–689

Mehdi R.B.A., Sioud S., Fguira L.F.B., Bejar S. et Mellouli L., 2006. Purification and structure determination of four bioactive molecules from a newly isolated *Streptomyces* sp. *TN97 strain.* *Process.Biochem.*, 41(7): 1506-1513.

Michaud, Lili., 2007. Tout sur le compost : le connaître, le faire, l'acheter et l'utiliser. Éditions MultiMondes, Bibliothèque nationale du Canada, 212p.

Miller G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical.chemistry.*, 31(3), 426-428.

Miyairi K., Ogasawara A, Tonouchi A, Hosaka K, Kudou M et Okuno T., 2004. Low molecular weight Pectate lyase from *Streptomyces thermocarboxydus* .*J.Appl.Glycosci.* 51: 1-7

Mukhtar S, Zaheer A, Aiysha D, Malik KA et Mehnaz S., 2017., Actinomycetes: A Source of Industrially Important Enzymes. *J Proteomics Bioinform.* 10: 316-319.

Mussatto S.I. & Mancilha I.M., 2007. Non-digestible oligosaccharides: a review. *Carbohydr. Polym.* 68: 587-597.

Mutter M. et al., 1998. Rhamnogalacturonan α -D-galactopyranosyluronohydrolase: an enzyme that specifically removes the terminal non reducing galacturonosyl residue in rhamnogalacturonan regions of pectin. *Plant Physiol.* 117: 153-163.

N

Nedjma M., Hoffmann N et Belarbi A.(2001). Selective and sensitive detection of pectine lyase activity using a colorimetric test: application to the screening of microorganisms possessing pectin lyase activity. *Anal.Biochem.* 291; 290-296.

Nelson N., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi methode for the determination of glucose. *J.Biol.Chem.* 153; 375-380.

Niranjan RR, Dhala SA., 1981. Endo polygalacturonase lyase of *Streptomyces thermovulgaris* CR42. *J. Food Sci. Technology.* 18: 171–175.

O

Olano-Martin E., Williams M.R., Gibson G.R et Rastall R.A., 2003. Pectins and pectic-oligosaccharides inhibit *Escherichia coli* O157:H7 shiga-toxin as directed towards the human colonic cell line HT29. *FEMS Microbiol. Lett.*, 218, 101-105.

P

Panyachanakul, T., Kitpreechavanich, V., Tokuyama, S., Krajangsang, S., 2017. Poly (DL-lactide)-degrading enzyme production by immobilized *Actinomadura keratinilytica* strain T16-1 in a 5-L fermenter under various fermentation processes. *Electronic Journal of Biotechnology*, 30, 71-76.

Kumar P., Suneetha V., 2015. Pectinases from Actinomycetes: A Thorough Study. *International Journal of ChemTech Research.*08: 345-350.

Payasi A., Sanwal G G., 2003. Pectate lyase activity during ripening of banana fruit. *Phytochemistry.*63.243–248.

Payasi A., Misra P C., Sanwal G G., 2006. Purification and characterization of pectate lyase from banana (*Musa acuminata*) fruits .*Phytochemistry.* 67: 861–869.

Payasi A., Sanwal R., Sanwal G.G., 2009. Microbial pectate lyases: characterization and enzymological properties. *World J Microbiol Biotechnol* 25:1–14

Pedrolli DB, Carmona EC., 2010. Purification and characterization of the exopolygalacturonase produced by *Aspergillus giganteus* in submerged cultures. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 37:567–573.

Pedrolli DB, Monteiro AC, Gomes E, Carmona EC., 2009. Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *Open Biotechnol J* 3:9–18

Perrone P. et al., 2002. Patterns of methyl and O-acetyl esterification in spinach pectins: new complexity. *Phytochemistry.* 60: 67-77.

Phutela U, Dhuna V, Sandhu S, Chadha BS., 2005. Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. *Braz J Microbiol* 36:63–69

Pickersgill R, Jenkins J, Harris G, Nasser W, Robert-Baudouy J., 1994. The structure of *Bacillus subtilis* pectate lyase in complex with calcium. *Nat Struct Biol.* 1:717-723.

Prescott H.K., 2002. Les actinomycètes. dans : Microbiologie générale. DeBoek 4 Ed. pp 506-540.

Pridham T.G. et Gottlieb D., 1948. The utilization of carbon compounds by some actinomycetes as an aid for species determination. *J.Bacteriol.*, 56: 107-114.

Q

Qiang X., Yonglie C. & Qianbing W., 2009. Health benefit application of functional oligosaccharides. *Carbohydr. Polym.* 77: 435-441.

R

Ralet M.-C. et al., 2005. Mapping sugar beet pectin acetylation pattern. *Phytochemistry*, 66: 1832-1843.

Rao MN, Kembhavi AA, Pant A., 1996. Role of lysine, tryptophan and calcium in the β -elimination activity of a low-molecular mass pectate lyase from *Fusarium moniliformae*. *Biochem J.* 319:159–164.

Rebello, S., Anju, M., Aneesh, E. M., Sindhu, R., Binod, P et Pandey, A., 2017. Recent advancements in the production and application of microbial pectinases: An overview. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology.* 16: 381-394.

Rexova-Benkova L. et Markovic O., 1976. Pectic enzymes. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 38; 323-385.

Ridley B.L., O'Neill M.A. et Mohnen.D., 2001, Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochem.* 57:929-967.

Ried JL et Collmer A. 1985. Activity stain for rapid characterization of pectic enzymes in isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:615–622.

Riedlinger J., Schrey S.D., Tarkka M.T., Hampp R., Kapur M. et Fiedler H.P., 2006. Auxofuran, a novel metabolite that stimulates the growth of fly agaric, is produced by the mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces Strain AcH 505*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(5): 3550-3557

Rodier J. 2009., L'analyse de l'eau. Ed Dunod, Paris, 9e edition 1526p

Rogstad S., Keane B., Keiffer C., Hebard F & Sisco P., 2001. DNA extraction from plants: the use of pectinase *Plant Molecular Biology Reporter*.19:353–359.

S

Sabaou N., 1988. Contribution à l'étude des actinomycètes des sols des palmeraies Algériennes: systématique et écologie. Thèse de Doctorat Es Sciences Naturelles, Option Microbiologie des sols, USTHB, Alger. 192p

Sahin N., Ozturk E., Isik K., Karlptas E et Ozkanca R., 2002. Selective isolation and numerical classification of novel thermophilic *Streptomyces*. *Turkish Journal of Biology.*, 26: 13-24.

Shivlata, L., et Tulasi Satyanarayana., 2015. Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: biology and potential applications. *Front. Microbiol.* 6:1014. doi: 10.3389/fmicb.2015.01014

Sakai T., Sakamoto T., Hallaert J et Vandamme EJ., 1993. Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties, and applications. *Adv. Appl. Microbiol.*39: 213-294.

Saleem, Z., Rennebaum, H., Pudel, F., & Grimm, E., 2008. Treating bast fibres with pectinase improves mechanical characteristics of reinforced thermoplastic composites. *Composites Science and Technology.* 68 : 471-476.

Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory Manual. 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. NY. USA

Sandhya G. Nanjani et Harsha P.S., 2011. Isolation and characterization of extremely halotolerant and halophilic organisms from dwarka and veraval. *Bioinformatica.*, 1(1) : 1-15.

Sato, M. et Kaji, A., 1975. Purification and properties of pectate lyase produced by *Streptomyces fradiae* IFO3439. *Agric. Biol. Chem.* 39,819-824

Sato M et Kaji A., 1980a. Exopolygalacturonate lyase produced by *Streptomyces massaporeus*. *Agric. Biol. Chem.*44 (4) ;717-721.

Sato M. et Kaji A., 1980b. Another pectate lyase from *Streptomyces nitosporeus.*, *Agric. Biol. Chem.*4:1345-1349.

Sawada K., Ogawa A., Ozawa T, Sumitomo N, Hatada Y, Kobayashi T et Ito S. 2000., Nucleotide and amino-acid sequences of a new-type pectate lyase from an alkaliphilic strain of *Bacillus*. *Eur. J. Biochem.* 267: 1510-1515.

Schols H.A., Bakx E.J., Schipper D et Voragen A.G.J., 1995. A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydr. Res.*, 279, 265-279.

Schnitzhofer W et al., 2007. Purification and mechanistic characterization of two polygalacturonases from *Sclerotium rolfsii*. *Enzyme Microb Technol.* 40:1739–1747.

Seyedarabi A, To TT, Ali S, Hussain S, Fries M, Madsen R, Clausen MH, Teixeira S, Brocklehurst K, Pickersgill RW., 2010. Structural insights into substrate specificity and the anti beta-elimination mechanism of pectate lyase. *Biochemistry.*, 49:539-546.

Sharma N, Rathore M, Sharma M., 2013. Microbial pectinase: Sources, characterization and applications. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 12: 45–60.

Shevchik V. E., Robert-Baudouy J. et Hugouvieux-Cotte-Pattat N. (1997). Pectate lyase Pell of *Erwinia chrysanthemi* 3937 belongs to a new family. *J Bacteriol* 179, 7321-7330.

Shirling E.B. et Gottlieb D., 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int.J.Syst.Bacteriol.*, 16,313-340.

Shirling E.B., Gottlieb D., 1969. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. IV. Species descriptions from the second, third and fourth studies. *Int.J.Syst.Bacteriol.*, 19: 391-512.

Solbak AI, Richardson TH, McCann RT, Kline KA, Bartnek F, Tomlinson G, Tan X, Parra-Gessert L, Frey GJ, Podar M, Luginbuhl P, Gray KA, Mathur EJ, Robertson DE, Burk MJ, Hazlewood GP, Short JM, Kerovuo J., 2005. Discovery of pectin-degrading enzymes and directed evolution of a novel pectate lyase for processing cotton fabric. *J Biol Chem.*, 280:9431-9438.

Sommer P., Bormann C. et Cötz F., 1997. Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. *Appl.Environ.Microbiol.*, 63(9): 3553-3560.

Somogyi M., 1945. A new reagent for the determination of sugars. *J.Biol.Chem.*160;61-73.

Soriano M, Blanco A, Diaz P, Pastor FI., 2000. An unusual pectate lyase from a *Bacillus* sp. with high activity on pectin: Cloning and characterization. *Microbiology.*, 146 (Pt 1):89-95.

Souto-Maior J.F.A., Reis A.V., Pedreiro L.N & Cavalcanti O.A., 2010. Phosphated crosslinked pectin as a potential excipient for specific drug delivery: preparation and physicochemical characterization. *Polym. Int.*, 59, 127-135.

Stackebrandt E., Rainey F.A. et Ward-Rainey N.L., 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int.J. Syst. Evol.Microbiol.*, 47(2): 479–491.

Stutzenberger FJ. Inducible thermoalkalophilic polygalacturonate lyase from *Thermomonospora fusca*. *J Bacteriol* 1987;169:2774-2780.

Sukhumsirchart W, Kawanishi S, Deesukon W, Chansiri K, Kawasaki H, Sakamoto T. Purification, characterization, and overexpression of thermophilic pectate lyase of *Bacillus* sp. RN1 isolated from a hot spring in Thailand. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009;73:268-273.

Sukkhum, S., Tokuyama, S., Tamura, T. & Kitpreechavanich, V., 2009a. A novel poly(L-lactide) degrading actinomycetes isolated from Thai forest soils, phylogenic relationship and enzyme characterization. *Journal of General and Applied Microbiology*. 55: 459-467

Sukkhum, S., Tokuyama, S. & Kitpreechavanich, V., 2009b. Development of fermentation process for PLA-degrading enzyme production by a new thermophilic *Actinomadura* sp. T16-1. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 14: 302-306.

Sukkhum S, Tokuyama S, Kitpreechavanich V., 2012. Poly(L-lactide)-degrading Enzyme production by *Actinomadura keratinilytica* T16-1 in 3L airlift bioreactor and its degradation ability for biological recycle. *J Microbiol Biotechnol*. 22:92–9.

Swennen K., Courtin C.M et Delcour J.A., 2006. Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. *Food Sci. Nutr*. 46: 459-471.

T

Thakur B.R., Singh R.K et Handa A.K., 1997. Chemistry and uses of pectin: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 37: 47-73.

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.

Takao M., Nakaniwa T., Yoshikawa K., Terashita T et Sakai T., 2000. Purification and characterization of thermostable Pectate Lyase with Protopectinase activity from thermophilic *Bacillus* sp. TS47. *Biosci.Biotechnol.Biochem*.64: 2360-2367.

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. 24:1596-1599.

Tanabe, H., Kobayashi Y., Akamatsu T., 1988. Pretreatment of pectic waste water in pectate lyase from an alkalophilic *Bacillus* species. *Agric.Biol.chem*. 52:1853-1856.

Tapias Y.A.R., Rivero C.W., Britos C.N. and Trelles J.A., 2015. Alkaline and thermostable polygalacturonase from *Streptomyces halstedii* ATCC10897 with applications in wastewaters, *Biocat. Agri. Biotechnol*. 4, 221–228.

Theilleux J., 1997. Les actinomycètes Dans: Microbiologie industrielle: Les microorganismes d'intérêt industriel, *Lavoisier, Tech et Doc*, 61: 425p.

Thibault J.F et Petit R., 1979. Les substances pectiques: Généralités et domaine d'application dans les industries alimentaires. *Industries Alimentaires et Agricoles*. 12: 1231-1240.

Thibault J.F., 1980. Les substances pectique, Dans: Les polymères végétaux, polymères pariétaux et alimentaires non azotés. *B. Monties Ed, Gauthier-Villars, Paris*, pp232-251.

Tho I., Kjonilsen A.-L., Knudsen K.D. & Nyström B., 2006. Effect of solvent composition on the association behaviour of pectin in methanol-water mixtures. *Eur. Polym. J.*, 42, 1164-1172.

Thumar J.T. et Singh S.P., 2007. Secretion of an alkaline protease from a salt tolerant and alkaliphilic *Streptomyces clavuligerus* Strain MIT-1. *Braz.J.Microbiol.*, 38(4): 766-772.

Tokala R.K., Strap J.I., Jung C.M., Crawford D.L., Love M.H.S., Deoblad L.A., Bailey J.F. et Morra M.J., 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl.Environ.Microbiol.*, 68(5): 2161-2171.

Tonouchi A, Hara Y, Umehara R, Sanuki T, Fukusawa T, Miyairi K., 2010. Cloning of the gene encoding an endo-acting pectate lyase from *Streptomyces thermocarboxydus*. *Biosci Biotechnol Biochem.*74:433-436.

Tseng M., Yang S.-F., Hoang K.-C., Liao H.-C., Yuan G.-F. et Liao C.-C., 2009. *Actinomadura miaoliensis* sp. nov., a thermotolerant polyester-degrading actinomycete. *Int. J. of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 517-520.

V

Voragen AG, Coenen G-J, Verhoef RP, Schols HAJSC., 2009, Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Struct Chem.* 20:263-275.

Voragen, F., Schols, H., & Visser, R. G., 2013. Advances in pectin and pectinase research. Eds Springer. 504p

W

Wang J., Soisson S.M., Young K., et 34 other authors., 2006. Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. *Nature.*, 441 (7091): 358–361.

Weissbach A et Hurwitz J., 1959. The formation of 2-keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of *Escherichia coli*. *British Journal of Biological Chemistry.*, 234: 705-709.

Willats W.G.T., Knox J.P., Mikkelsen J.D., 2006. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends Food Sci. Technol.*,17: 97-104.

Williams ST, Cross.T., 1971. Actinonycetes, in C.Booth, ED, Methods in microbiology. chapter XI academic press, 20 n, new york, pp.

Williams ST et wellington EBH., 1982. Principal and problems of selective isolation of microbes. in: JD. Bu. lock, LG. Nisbet,DT. Winstanley, Eds.bioactive microbial products. search and discovery, chapitre 2p. acadimic press london new york.

Williams S.T., Lanning S et Wellington E.M.H., 1984. Ecology of Actinomycetes, *In: The Biology of the Actinomycetes.* Academic press, London, New York, Sydney, Tokyo, Sao Paulo: 481–528.

Williams ST., Goodfellow M., Alderson G., Wellington E.M.H., Sneath P.H.A. et Sackin M.J., 1983. Numerical classification of *streptomyces* and related genera. *J.Gen.Microbiol.*129 :1743–1813.

Wink J., 2002. The Actinomycètes. An order in the classe of Actinobacteria, importance to the pharmaceutical industry. Electronic Manual Handbook. *Aventis pharma.Deutschland. GmbH.*

Wong LY, Saad WZ, Mohamad R, Tahir PM., 2017. Optimization of cultural conditions for polygalacturonase production by a newly isolated *Aspergillus fumigatus* R6 capable of retting kenaf. *Ind Crops Prod* 97:175–183.

Y

Yadav S, Yadav PK, Yadav D, Yadav KDS., 2009. Pectin lyase: a review. *Process Biochem.*, 44: 1-10.

Yoder MD, Journak F., 1995. The refined three-dimensional structure of pectate lyase C from *Erwinia chrysanthemi* at 2.2 Å resolution. *Plant Physiol* 107:349–364

Yoder MD, Keen NT, Journak F., 1993a. New domain motif: the structure of pectate lyase C, a secreted plant virulence factor. *Science* 260:1503–1507

Yoder MD, Lietzke SE, Journak F., 1993b. Unusual structural features in the parallel β -helix in pectate lyases. *Structure* 1:241–251

Yuan P, Meng K, Shi P, Luo H, Huang H, Tu T, Yang P, Yao B., 2012. An alkaline-active and alkali-stable pectate lyase from *Streptomyces* sp. S27 with potential in textile industry. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 39: 909-915.

Yu P., Zhang Y., Gu D., 2017. Production optimization of a heattolerant alkaline pectinase from *Bacillus subtilis* ZGL14 and its purification and characterization. *Bioengineered.* 16:1–11.

Z

Zhang C, Yao J, Zhou C, Mao L, Zhang G, Ma Y., 2013. The alkaline pectate lyase PEL168 of *Bacillus subtilis* heterologously expressed in *Pichia pastoris* is more stable and efficient for degumming ramie fiber. *BMC Biotechnol.* 13:26.

Zheng L, Du Y, Zhang J., 2001. Degumming of ramie fibers by alkalophilic bacteria and their polysaccharide-degrading enzymes. *Bioresour Technol.* 2001;78:89-94.

Zhi X.Y., Li W.J. et Stackebrandt E., 2009. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.*,59: 589–608.

Zhou, J., Dong, Y., Gao, Y., Tang, X., Li, J., Yang, Y., & Huang, Z., 2012. Characterization of a family 3 polysaccharide lyase with broad temperature adaptability, thermo-alkali stability, and ethanol tolerance. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 17 : 729-738.

Zhou C., Ye J., Xue Y., Ma Y., 2015. Directed evolution and structural analysis of alkaline pectate lyase from the alkaliphilic bacterium *Bacillus* sp. strain N16-5 to improve its thermostability for efficient ramie degumming. *Appl Environ Microbio.*, 81:5714 –5723.

Zhou M., Wu J., Wang T., Gao L., Yin H et Lü X., 2017. The purification and characterization of a novel alkali-stable pectate lyase produced by *Bacillus subtilis* PB1. *World J Microbiol Biotechnol.* 33:190.

Sites internet:

<http://www.freedoniagroup.com/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

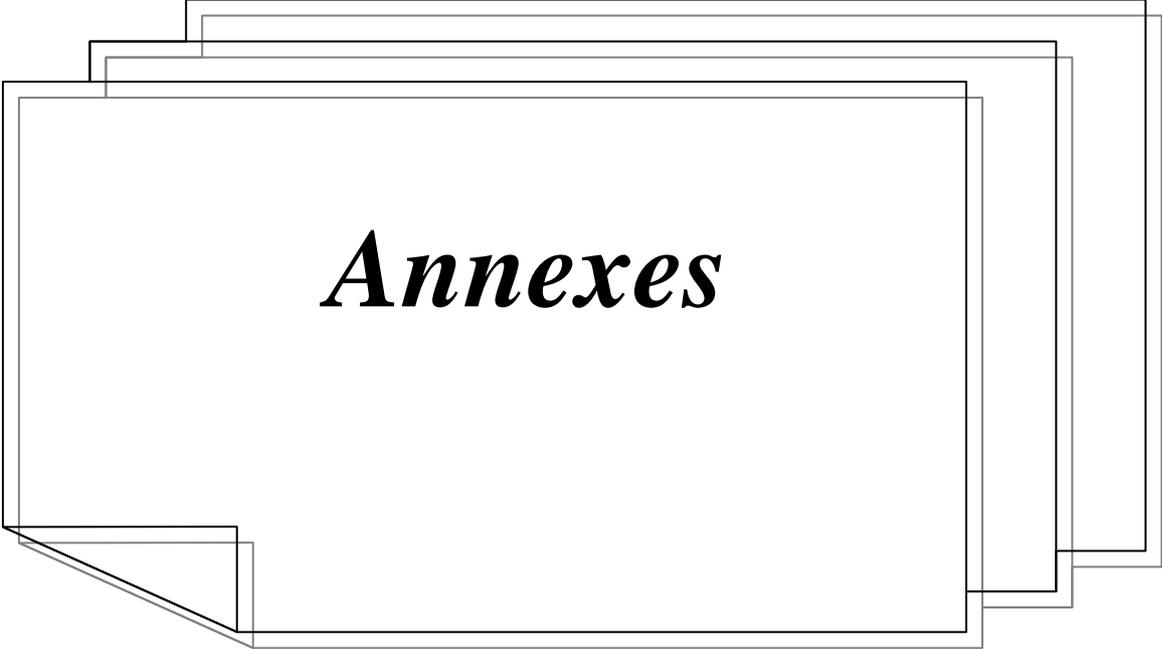
www.itis.gov

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/GQ205433.1?report=genbank>

Brevets :

Brzezinski, R., Dery, C. V., Beaulieu, C., 1999. Thermostable xylanase DNA, protein and methods in use, U.S. Patent N°. 5,871,730. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Hoang, K. C., Yang, S. F., Tseng, M., & Yuan, G. F., 2013. Thermotolerant *actinomadura* strain capable of degrading polyesters. U.S. Patent N°. 8,476,056. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.



Annexes

ANNEXE I

I-Milieus de culture et solutions

Tous les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage 20 min à 120°C.

I-1. Milieux solides

I.1.1. Milieux d'isolement des *Actinomycètes*

➤ Milieu caséine-amidon

Amidon.....	10g
Caseine.....	0.3g
KNO ₃	2g
NaCL.....	2g
K ₂ HPO ₄	2g
MgSO ₄ ,7H ₂ O.....	0.05g
CaCO ₃	0.02g
FeSO ₄ ,7H ₂ O.....	0.01g
H ₂ O distillée.....	1000ml
Agar.....	20g
pH.....	7.0 à 7.4

➤ **Milieu ISP4** (milieu d'isolement et d'identification voir ci-dessous)

I.1.2. Composition des milieux utilisés pour l'étude morphologique

I.1.2.1. Les milieux ISP

Ces milieux sont préconisés par Shirling et Gottlieb de *l'International Streptomyces Project* ou *ISP (Shirling et Gottlieb, 1966)*

➤ L'ISP 1

Tryptone	05g
Extrait de levure	03g
Agar.....	20g
H ₂ O distillée qsp.....	1000ml
pH	7.2

➤ L'ISP 2

Extrait de levure.....	4g
Extrait de malt.....	10g
Glucose.....	4g
Agar.....	20g
H ₂ O distillée qsp.....	1000ml
pH	7.2

➤ L'ISP 3

Farine d'avoine	20g
solution saline standard(*).....	1ml
Agar.	18g
H ₂ O distillée	1000ml
pH	7.2

➤ **L'ISP 4** (milieu d'isolement et d'identification)

Amidon.....	10g
H ₂ O distillée	500ml
K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1g
NaCl.....	1g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2g
CaCO ₃	2g
solution saline standard (*).....	1ml
H ₂ O distillée	500ml
Agar.	20g
pH	7.0 à 7.4

➤ **ISP5**

-Glycerol.....	10g
- L-Asparagine.....	1g
-K ₂ HPO ₄	1g
-solution saline standard (*).....	1ml
-H ₂ O distillée	1000ml
-Agar.	20g
pH	7.0 à 7.4

(*) **Solution saline standard (Pridham et Gottlieb, 1948)**

CuSO ₄ . 5 H ₂ O.....	0.64g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.11g
MnCl ₂ .4 H ₂ O.....	0.79g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O.....	0.15g
H ₂ O distillée qsp.....	100ml

➤ **L'ISP 6** (Production des pigments mélanoides)

Peptone.....	20g
-Extrait de levure.....	1g
-Citrate ferrique ammoniacal.....	0.5g
-K ₂ HPO ₄	1g
-Thiosulfate de sodium.....	0.08g
-Agar.....	15g
-H ₂ O distillée.....	1000ml
pH.....	7.2

➤ **ISP 7** (Production des pigments mélanoides)

-Glycerol.....	15g
-L-Tyrosine.....	0.5g
-L-Asparagine.....	1g
-KH ₂ PO ₄	0.5g
-MgSO ₄ ,7H ₂ O.....	0.5g
-NaCl.....	0.5g
-FeSO ₄ ,7H ₂ O.....	0.01g
-solution saline standard.....	1ml
-Agar.....	20g
-H ₂ O distillée.....	1000ml
pH.....	7.2

I.1.3. Milieu de culture solide pour *E. coli*

Milieu LB: milieu LB liquide ; 1,7 % agar avec ou sans antibiotique.

Milieu LBA : LB + 100 µg/ml d'ampicilline.

Milieu LBAT : LB + 100 µg/ml d'Ampicilline + 12,5 µg/ml de tétracycline.

I-2. Milieux liquides

I.2.1. Milieu de culture liquide pour *E. coli*

Milieu « LuriaBertani» (LB) modifié : 10 g pastone (Diagnostics Pasteur); 10 g NaCl; 5 g extrait de levure (Diagnostics Pasteur); H₂O distillée q. s. p. 1000 ml, pH ajusté à 7,4 par NaOH 10 N.

Milieu LBA : LB + 100 µg/ml d'ampicilline.

Milieu LBAT : LB + 100 µg/ml d'Ampicilline + 12,5 µg/ml de tétracycline.

* **Milieu Psi** : ce milieu est utilisé pour la préparation des bactéries compétentes: Bacto Extrait de levure 5 g, BactoTryptone 20 g, MgSO₄ 5 g, Le pH est ajusté à 7,6 par KOH

I.2.2. Milieu de culture liquide pour *Actinomadura*

Milieu ISP2 liquide : Extrait de levure 4g - Extrait de malt 10g- Glucose 4g -H₂O distillée q. s. p. 1000 ml, pH ajusté à 7,4 (**Shirling E.B et Gottlieb D., 1966**).

I.2.3. Compositions de milieu HP liquide de production modifié par Kuhad et al (2004)

Milieu HP (**Horikochi-Pectine**) liquide à base de pectine pour la production des pectinase : Extrait de levure 5g - Peptone 5g- KH₂PO₄ 1g- MgSO₄ - Pectine 5g- Solution trace Saline 1/1000 (v/v) 1ml (Solution Saline : FeSO₄. 7H₂O - MnCl₂. 4H₂O et ZnSO₄. 7H₂O :1g/l Chacun)-H₂O distillée q.s.p. 1000 ml, pH ajusté à 7,4 par une solution de Na₂CO₃ (**Horikouchi., 1999 ; Kuhad et al 2004**).

I.3. Compositions des milieux et techniques utilisées pour l'étude physiologique et tests

Biochimiques

I.3.1. Milieu Bouillon nitraté (Guiraud, 2003)

Peptone.....	10g
Extrait de Viande.....	5g
NaCl.....	0.5g
KNO ₃	1g
H ₂ O distillée qsp	1000ml
pH	7.0 à 7.4

I.3.2. Eau physiologique

NaCl	8.5 g
H ₂ O distillée qsp	1000 ml

I.3.3. Préparation de la Solution de Ringer (Rodier 2002)

NaCl	6.5 g
KCl	0.25 g
NaHCO ₃	0.20g
CaCl ₂	0.30g
Eau distillée q.s.q.....	1000 ml

I.3.4. CTAB : Bromure d'Hexadécyl Triméthylammonium

Composition :

CTAB.....	1g.
Eau distillée q.s.p	100 ml.

Préparation

- Dissolution du CTAB dans l'eau chaude avec agitation.
- Conservation dans un milieu ambiant.

I.3.5. Solution de Rouge de ruthénium :

Composition :

Rouge de ruthénium	0.05g.
Eau distillée q.s.p	100 ml.

I.3.6. Préparation du lugol :

I ₂	1g
KI.....	2g
H ₂ O distillée q.s.p	100 ml

I.4. Solutions et tampons

- Solution I: 25 mM Tris-HCl, 50 mM Glucose, 10 mM EDTA;
- Solution II: 0,2 M NaOH, 1 % SDS;
- Solution III: 3 M Acétate de sodium pH 5,2;
- TBE 10X: 0,89 M Tris-Borate, 0,89 M Acide borique, 20 mM EDTA pH 8;
- TAE 10X: 0,4 M Tris acétate, 10 mM EDTA pH 8;
- BEt: 10 mg/ml;
- Tampon 10X (PCR): 100 mM Tris-HCl pH 8,3; 500 mM KCl, 1 % Triton;
- Tampon de dépôt de l'ADN: 30 % glycérol, 0,25 % bleu de bromophénol, 0,25 % xylène cyanol FF;
- Tampon TfbI : 30 mM acétate de potassium; 100 mM RbCl; 10 mM CaCl₂; 50 mM MnCl₂; 15% glycérol; (le pH est ajusté à 5,8 par l'acide acétique)
- Tampon TfbII : 10 mM MOPS; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl₂; 15% glycérol; (le pH est ajusté à 6,5 par NaOH)
- Tampon de migration des protéines: Tris-glycine (0,2 M) pH 8,6, 0,1 % SDS;
- Tampon de dépôt (5X) des protéines: 50 mM Tris-HCl pH 6,8; 1 % bleu de Bromophénol; 10 % glycérol; 2 % SDS; 200 mM DTT
- Tampon Tris-HCl 0,05 M, 0,02 M, 0,01 M pH 8;
- Tampon A: utilisé pour équilibrer la colonne MonoQ et pour éluer les protéines. Il est formé de tampon Tris HCl 0,02 M pH 8.
- Tampon B: utilisé pour éluer les protéines à partir de la colonne Mono Q: Tris HCl 0,02 M pH 8 + 1 M NaCl;
- Tampon Acétate Sodique 0,05 M pH 4 et pH 5. Tampon phosphate 0,05 M pH 6 et pH 7. Tampon Tris-HCl 0,05 M pH 8 et pH 9. Tampon Glycine -NaOH 0,05 M pH 9,5 ; pH 10 ; pH 10,5 ; pH 11 et pH 12.

I.5. Galerie Api 20 E:

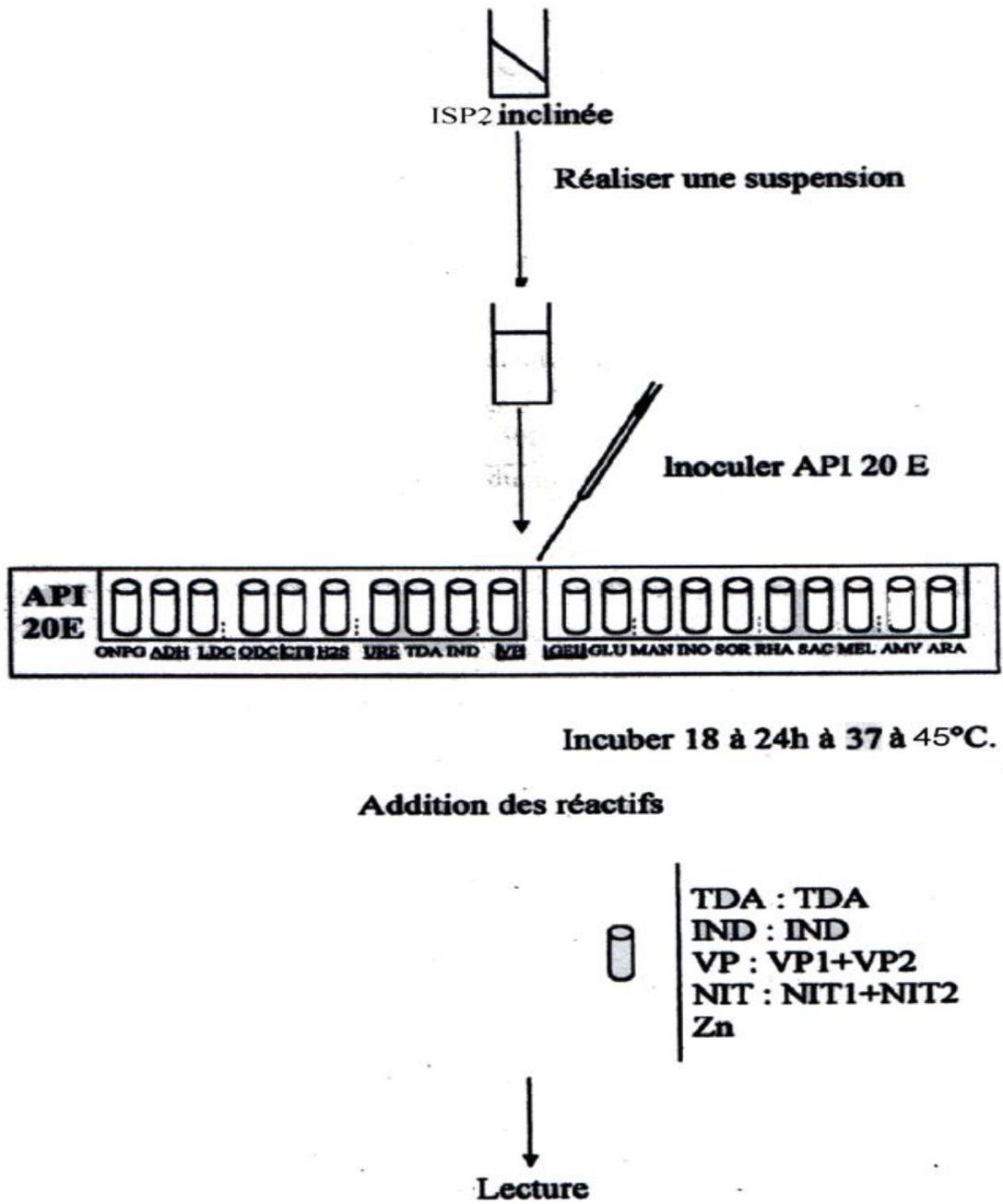


Figure. 40 : Mode opératoire de la galerie API 20 E

Tableau15 : Tableau de lecture du système API 20 E

Tests	Composant actifs	QTE (mg/cup).	Réactions/enzymes	Résultats	
				Négatif	Positif
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	0.223	β -galactosidase (OrthoNitro Phényl- β D-galactopiranosidase)	Incolore	Jaune
<u>ADH</u>	L- arginine	1.9	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orangé
<u>LDC</u>	L- lysine	1.9	Lysine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
<u>ODC</u>	L- Ornithine	1.9	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
<u>CIT</u>	Trisodium Citrate	0.758	Utilisation du citrate	Vert pâle/ jaune	Bleu vert / bleu
<u>H₂S</u>	Thiosulfate de sodium	0.075	Production d'H ₂ S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir / fin ilseré
<u>URE</u>	Urée	0.79	Uréase	Jaune	Rouge/orangé
TDA	L- Tryptophane	0.38	Tryptophane désaminase	Immédiate Jaune	Immédiate Marron/ rougeâtre
IND	L- Tryptophane	0.19	Production d'indole	Incolore Vert pâle/ jaune	Rose
<u>VP</u>	Pyruvate de sodium	1.9	Production d'acétoïne	VP1+VP2/10min Incolore	VP1+VP2/10min Rouge /Rose
<u>GEL</u>	Gélatine (origine bovine)	0.6	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	D- Glucose	1.9	Fermentation/ oxydation (glucose)	Bleu/ Bleu-vert	Jaune/ Jaune gris
MAN	D- mannitol	1.9	Fermentation/ oxydation (mannitol)	Bleu/ Bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	1.9	Fermentation/ oxydation (inositol)	Bleu/ Bleu-vert	Jaune
SOR	D- sorbitol	1.9	Fermentation/ oxydation (sorbitol)	Bleu/ Bleu-vert	Jaune
RHA	L-rhamnose	1.9	Fermentation/ oxydation (Rhamnose)	Bleu/ Bleu-vert	Jaune
SAC	D- saccharose	1.9	Fermentation/ oxydation (saccharose)	Bleu/ Bleu-vert	Jaune
MEL	D- melibiose	1.9	Fermentation/ oxydation (melibiose)	Bleu/ Bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	0.57	Fermentation/ oxydation (amygdaline)	Bleu/ Bleu-vert	Jaune
ARA	L- arabinose	1.9	Fermentation/ oxydation (arabinose)	Bleu/ Bleu-vert	Jaune

ANNEXE II

II. Méthodes moléculaires

II.1. Extraction de l'ADN génomique (ADNg) à partir de l'espèce d'actinomycète Cpt20

A partir d'une boîte de pétri, une colonie est mise en culture en milieu liquide de 100ml (ISP₂) sous agitation 250rpm, et à 45°C pendant une nuit. Par la suite l'ensemble est centrifugé à 8000×g pendant 10min. Le culot cellulaire est lavé avec 10ml de tampon I (50mM glucose anhydre; 25mM Tris-base et 10mM EDTA à pH 8,0). Les cellules sont alors lysées dans 20ml de tampon I contenant 5mg/ml de lysozyme et sont incubées une heure à 37°C. Par la suite, la solution est centrifugée à 8000×g pendant 15min à 4°C et le culot cellulaire est remis dans 30ml de tampon II (10mM Tris-base ; 100mM NaCl ; 5mM EDTA et 1% du SDS à pH 8,0). Au surnageant on ajoute 30ml de phénol/chloroforme (v/v) et après centrifugation pendant 20min à 8000×g on ajoute 2,5v d'éthanol absolu et 1/10 de volume d'acétate de sodium 3M à pH 5,2.

A l'aide d'une pipette Pasteur effilée on récupère les filaments d'ADN apparus, par la suite, on remet en solution les filaments dans 2ml de TE 1× [100 mM Tris-base et 10 mM EDTA à pH 8,0]. On centrifuge ensuite la solution restante pendant 15min à 10000×g, le précipité est resuspendu dans 6ml de TE 1× contenant 10mg/ml de RNase A et incubé à 37°C pendant 1 à 2h. Puis on ajoute de la protéinase K à une concentration finale de 5mg/ml et on incube la solution à 50°C pendant 2 à 3h. Après une extraction avec 1 volume de phénol suivie d'une autre extraction par 1 volume égal de phénol/chloroforme puis une dernière extraction avec 1 volume de chloroforme, la solution est précipitée avec 2 volumes d'éthanol 100% et 10% de chlorure de sodium 5M ou d'acétate de sodium 3M à pH 5,2 et laissée au moins 2h à -20°C ou gardée 15 min à -80°C. La solution est alors centrifugé à 12000×g pendant 15 min et le précipité est lavé avec une solution d'alcool iso-amylique puis d'éthanol 70% et séché à température ambiante pendant environ 15 min. Enfin, le précipité est resuspendu dans 50µl d'eau stérile ou de TE 1× et conserver à -20°C (Gurtler et Stanisich., 1996).

II.2. Clonage du fragment de gène de l'ARNr 16S

❖ Préparation d'ADN plasmidique (ADNp)

Une clonie isolée sur boîte est mise en culture pendant une nuit dans 3ml de milieu LB contenant l'antibiotique choisi, le plus souvent 100µg/ml d'ampicilline. Après incubation,

1,5ml de culture est centrifugé dans un tube à 12000×g pendant 15min. Les cellules sont resuspendues dans 100µl de solution I [45ml glucose 20% ; 25ml Tris-HCl 1 M et 20ml EDTA 0,5M à pH 8,0], puis bien homogénéisées. Les cellules sont alors lysées pendant 15min avec 200µl d'une solution de NaOH 0,2N contenant 1% SDS (p/v) (Solution II). On ajoute immédiatement 150µl d'acétate de potassium 3M et d'acide acétique 2M à pH 4,8 (incubé 24h à -20°C) (Solution III) et les cellules sont incubées 10min dans un bain de glace. Le mélange est alors centrifugé à 12000×g pendant 10min à 4°C, surnageant obtenu est additionné par 0,6 volume d'isopropanol.

Le précipité se forme au bout de 10min à température ambiante. Après une centrifugation à 12000×g pendant 10min, le précipité est resuspendu dans 100µl TE 1× contenant 10mg/ml de RNase A et incubé à 37°C pendant 1 à 2h. La protéinase K est alors ajoutée au mélange à une concentration finale de 5mg/ml et incubé à 50°C pendant 2 à 3h. Après une extraction au solvant organique (phénol/chloroforme), la solution est précipitée avec 2 volumes d'éthanol 100% et 10% de NaCl 5M ou d'acétate de sodium 3M à pH 5,2 et laissée au moins 2h à -20°C ou gardée 15 min à -80°C. La solution est ensuite centrifugé à 12000×g pendant 15min et le précipité est lavé avec une solution d'alcool iso-amylque puis d'éthanol 70% et séchée à température ambiante pendant environ 15min. Enfin, le précipité est resuspendu dans 50µl d'eau ou de TE 1× et conserver à -20°C (**Sambrook et al., 1989**).

❖ Ligation

Nous avons réalisé deux types de ligatures, la première utilisant des extrémités franches (c'est le cas du clonage de produit PCR) et la seconde utilisant des extrémités cohésives libérées par restriction enzymatique. Dans les deux cas, le vecteur préalablement digéré avec l'endonucléase de restriction choisie est soumis à une déphosphorylation avec une phosphatase alcaline thermosensible d'intestin de veau nommée CIAP, pour éviter que le vecteur vide ne se recircularise pas lors de l'étape de ligation. Pour le clonage de produit PCR, nous avons utilisé le vecteur pCR2.1. En parallèle, le fragment d'ADN à cloner est préparé pour la ligation. Dans les autres cas, les plasmides sont digérés avec l'endonucléase de restriction de choix pour libérer le fragment d'ADN à cloner, qui sera purifié après électrophorèse en réalisant l'extraction de la bande d'intérêt du gel d'agarose. Afin de réaliser la réaction de ligation, les concentrations du fragment d'ADN et du vecteur sont déterminées le plus souvent par estimation sur gel après migration. La ligation a lieu, à température

variable selon la ligase utilisée, pendant une nuit dans un tampon de ligature livré par le fournisseur avec 1U d'ADN ligase du phage T4. Cette dernière permet la formation d'une liaison covalente entre une extrémité 3' hydroxylée et une extrémité 5' phosphate de deux molécules d'ADN (Sambrook et al., 1989).

❖ Transformation d'*Escherichia coli*

Une colonie isolée de l'espèce *E coli* désirée est inoculée dans 3ml de milieu LB et incubée durant 24h à 37°C, après incubation, 99ml de milieu LB sont inoculés avec 1ml de ce pré-inoculum et incubés environ 3h à 37°C sous une agitation de 250rpm jusqu'à atteindre une absorbance comprise entre 0,4 et 0,6. Les cellules en plein phase exponentielle sont alors centrifugées à 5000rpm pendant 5min à 4°C et resuspendues dans 10ml d'une solution tampon CaCl₂-MOPS-glucose (100mM CaCl₂; 10mM MOPS et 0,5% glucose) stérile et préalablement refroidie. Toutes les étapes suivantes se déroulent dans un bain de glace. Après 30min dans la glace, les cellules sont centrifugées dans les mêmes conditions que précédemment et le culôt résultant est repris dans 2ml de la même solution tampon. Les cellules sont alors prêtes à être transformées. Pour cela, 200µl de cellules sont utilisés pour une réaction de transformation. L'ADN est ajouté aux cellules dans un microtube et le tout est incubé 2h dans un bain de glace. Un choc thermique est alors réalisé à 42°C durant 2min et on ajoute immédiatement 800µl de milieu LB préalablement préchauffé à 37°C. Les cellules sont alors incubées une heure à 37°C pour l'expression du phénotype puis étalées sur milieu sélectif pour la sélection des transformants. L'efficacité de la transformation est généralement de 10⁶ à 10⁷ transformants par µg d'ADN pour un ADNp et de 10⁴ à 10⁵ pour une ligation (Sambrook et al., 1989). Au cours de ce travail nous avons adopté ces conditions en utilisant l'appareil PCR :

- 1 µl ADNg (300ng)
- 5 µl Tampon d'ADN polymérase
- 2 µl dNTP (10mM)
- 5 µl Amorces directes (10pmol)
- 5 µl Amorce reverse (10pmol)
- 1 µl ADN polymérase (2U)
- 1 µl MgCl₂ 25mM (facultatif)
- 5 µl DMSO 50% (facultatif)
- q.s.p. 50µl H₂O ultrapure

Dans ces conditions, une étape de dénaturation de la matrice pendant 5min à 94°C est suivie de 40 cycles de polymérisation dont chacun comprend :

- Une étape de dénaturation de la matrice (30 sec à 94°C).
- Une étape d'hybridation des nucléotides amorces à la matrice (1min à la température d'hybridation convenable comprise entre 50 et 55°C).
- Une étape de polymérisation par une ADN polymérase : 1 à 2 minutes à 72°C (le temps d'élongation est variable selon la taille du fragment à amplifier avec 1min par 1kb).

Une étape de polymérisation supplémentaire de 10min à 72°C est généralement réalisée afin que la *Taq* polymérase puisse additionner un ATP à l'extrémité 3' du fragment amplifié ce qui permet le clonage dans des vecteurs adéquats (*pGEM-T Easy*). Lorsque l'amplification est réalisée par la *Pfu* polymérase, incapable d'ajouter des d'ATP à l'extrémité 3', cette étape supplémentaire est réalisée après purification de l'ADN moyennant la *Taq* polymérase en présence de d'ATP.

❖ **pGEM-T Easy** (3015 pb) : Ce vecteur contient une origine de répllication *E. coli* et le gène de résistance à l'ampicilline. Il permet d'insérer des fragments d'ADN dans leurs cassettes de clonage qui se situent au niveau du gène *lacZ* codant la β -galactosidase. Le clonage d'un fragment d'ADN empêche ainsi la synthèse de la β -galactosidase et les clones recombinants sont détectés par α -complémentation sur un milieu contenant l'IPTG et l' X-GAL. Enfin, il permet l'utilisation des amorces universelles et inverses, permettant le séquençage de la séquence insérée (**Figure 41**).

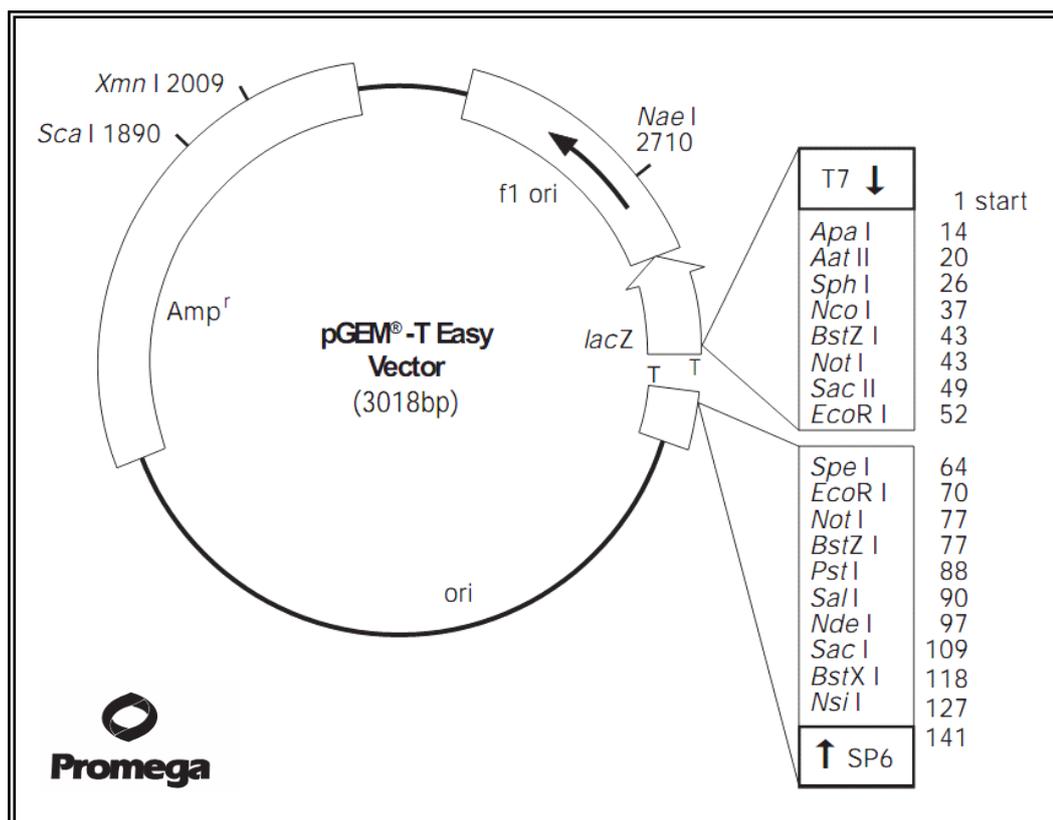


Figure 41 : Carte de restriction du vecteur de séquence *pGEM-T Easy*. Ce vecteur possède un site de clonage multiple contenant le site *EcoRI*.

❖ Séquençage automatique de l'ADN

Les réactions de séquençage ont été réalisées en utilisant le séquenceur automatique. Ces séquences ont été faites dans des plaques PCR de 96 puits en utilisant le kit de séquençage (*BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*). Le volume de réaction est de 10µl contenant : 2µl de produit PCR ; 1,5µl de tampon I; 1µl d'un mélange d'enzyme; 0,25µl de différentes amorces (200ng/µl = 30µM) et on complète avec de l'eau ultra pure à 10µl. Le programme de la réaction comporte 25 cycles : 10 secondes de dénaturation à 96°C, 5 secondes d'hybridation à 50°C et 4min d'élongation à 60°C. Les produits de séquences sont alors purifiés en utilisant le kit (*Montage SEQ 96 cleanup*) de millipore. Cette étape de purification permet d'avoir des réactions de séquence de bonne qualité.

ANNEXE III**III. Méthodes analytiques****III.1 Préparation de réactif Nelson Somogyi (Dosage des sucres réducteurs)****Solution A**

Dans une fiole jaugée de 1 litre, on dissout :

- Carbonate de Na anhydre 25g.
- Tartrate double de Na et de K 25g.
- Carbonate acide de Na anhydre 20g.
- Sulfate de Na anhydre 200g.
- H₂O distillée q.s.p 1000ml.

Solution B

On dissout 15g de CuSO₄ dans 100ml d'eau distillée, puis on ajoute 1 à 2 gouttes d'acide sulfurique concentré.

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

➤ Réactif de Nelson

25g de molybdate d'ammonium-H₂O sont dissouts à chaud dans 400ml d'eau distillée. Après refroidissement, on ajoute 25ml d'H₂SO₄ concentré et 3g d'arséniate de Na-7H₂O dissout dans 25ml d'eau distillée. L'ensemble est décanté pendant un temps de 48 heures à 37°C. La solution finale est filtrée et conservée à l'abri de la lumière.

Le réactif de Nelson doit avoir une coloration jaune dorée. Si avec le temps la coloration devient verdâtre, on peut ajouter quelques gouttes d'une solution de permanganate de potassium (KMnO₄) à 0.05N jusqu'à l'obtention de la couleur initiale.

III.1.1. Réalisation de la gamme d'étalonnage du galacturonate pour le dosage des sucres réducteurs

Une solution mère contenant 216mg (1mM) d'acide polygalacturonique, dans un litre d'eau distillée est préparée et on réalise une gamme d'étalonnage allant de 0 à 200 μ g (Tableau 16).

Tableau 16: Gamme d'étalonnage du galacturonate.

	B	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
Solution de galacturonate (216mg/l) en ml	0	0.06	0.08	0.1	0.12	0.14	0.16	0.18	0.20
Concentration de galacturonate en μ M	0	0.06	0.08	0.1	0.12	0.14	0.16	0.18	0.20
Eau distillée	0.25	0.19	0.17	0.15	0.13	0.11	0.09	0.07	0.05

- On obtient un volume final de 0.25ml, utilisé directement pour la mesure du pouvoir réducteur par la méthode de Nelson- Somogyi à 650nm.

III.1.2. Courbe d'étalonnage d'acide galacturonique

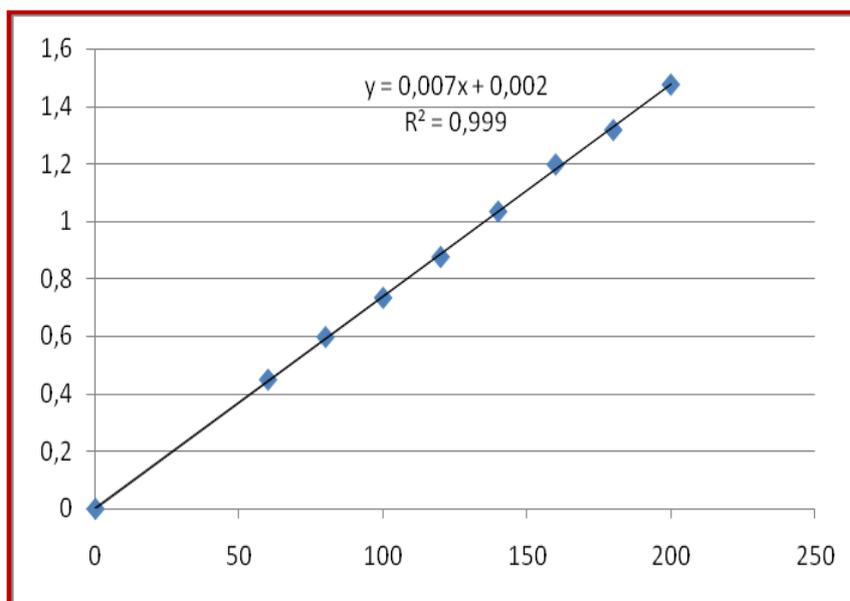


Figure 42: Courbe d'étalonnage de l'acide galacturonique.

relation entre l'absorbance mesurée à 650nm et la concentration en galacturonate (μ M/ml)

(R^2 : coefficient de détermination)

III.2. Préparation de réactif de Bradford (Dosage des protéines)

Dans une fiole jaugée de 1 litre, on dissout :

Bleu de Coomassie G250100mg

Ethanol 95%50ml

Agitation pendant 2 heures puis, on ajoute :

Acid ortho phosphorique100ml

H₂O distillée q.s.p1000ml

III.2.1. Réalisation de la gamme d'étalonnage du sérum albumine bovine (SAB)

La gamme d'étalonnage indiquée dans le tableau, a été réalisée à partir d'une solution mère contenant 0.1mg/ml de sérum albumine bovine (**Tableau 17**)

Tableau 17 : Gamme d'étalonnage du sérum albumine bovine (BSA)

Tubes	1	2	3	4	5	6
SAB (µl)	00	20	40	60	80	100
Eau distillée µl	100	80	60	40	20	00
Réactif BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

III.2.2. Courbe d'étalonnage de Bradford

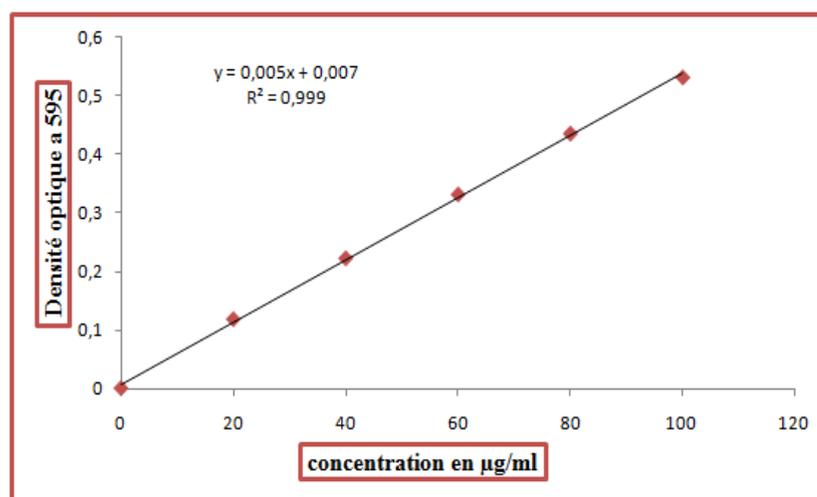


Figure 43: Courbe d'étalonnage de la SAB.

Relation entre l'absorbance et la concentration en protéines (µg) (R^2 : coefficient de détermination) (**Bradford M., 1976**)

III.3. Electrophorèse (SDS-PAGE)

Les protéines sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10 % (**Tableau 18**) en présence de SDS selon la méthode de Laemmli (1970) (**Laemmli., 1970**). La préparation du gel de polyacrylamide en présence de SDS est obtenue par polymérisation d'acrylamide qui forme des chaînes et de bis-acrylamide qui pontent les chaînes d'acrylamide. La réaction de polymérisation est initiée par la formation de radicaux libres par le persulfate d'ammonium (APS) et catalysée par le **TEMED** (N, N, N', N'-tétraméthyl-1,2-diaminométhane-toxique).

III.3.1. Compositions de gel d'acrylamide et solutions pour électrophorèse

❖ Solution : Acrylamide – Bisacrylamide :

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

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

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

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

Filtrer et stocker à 4°C.

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

- Tris base..... 6g
- HCl 1N 48ml
- H₂O q.s.p 100ml

Filtrer et stocker à 4°C.

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

- Tris base..... 15.1g
- Glycine 72g
- SDS 0.1%.....5g
- H₂O q.s.p1000ml

Conservation à 4°C.

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

Dissoudre 10g de persulfate d'ammonium dans 100ml d'eau distillée. Cette solution doit se préparer juste au moment de l'emploi (extemporanément).

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

- Tris base (0.5M) pH6.8..... 2.13ml
- SDS1g
- Glycerol 10 %..... 5ml
- Bleu de bromophenol 20mg
- β mercaptoethanol 2.56ml
- H₂O q.s.p..... 10m

❖ **Solution de coloration** :

- Acide acétique.....10ml
- Ethanol absolue.....45ml
- H₂O45ml
- BBC (R250).....0.25g

❖ **Solution de décoloration** :

- Acide acétique.....10ml
- Ethanol absolue.....45ml
- H₂O45ml

III.3.2. Préparation et migration du gel pour l'électrophorèse SDS-PAGE

Le gel de polyacrylamide est préparé selon la méthode décrite par **Laemmli (1970)**

Tableau 18: Composition du gel de polyacrylamide 10%.

Composition du gel polyacrylamide (10%)			
Composants	Gel de séparation (10%)	Composants	Gel de concentration (5%)
H ₂ O	4 ml	H ₂ O	3.4 ml
1.5M Tris-HCl pH 8.8	2.5 ml	1.5M Tris-HCl pH 6.8	830 µl
Acrylamide 30%	3.3 ml	Acrylamide 30%	630 µl
APS 10%	100 µl	APS 10%	50 µl
SDS 10%	100 µl	SDS 10%	50 µl
TEMED	4 µl	TEMED	4 µl
VOLUME TOTAL	10 ml	VOLUME TOTAL	5 ml

*APS : Persulfate d'ammonium ** SDS : Sodium Dodécyle Sulfate

- Couler le gel de séparation entre les deux plaques de verre immédiatement après l'ajout de l'APS et le TEMED.
- Ajouter de l'éthanol a la surface du gel puis le laisser polymeriser durant 30 minutes.
- Ajouter le gel de concentration, après avoir éliminé l'éthanol grâce a un buvardage d'un papier absorbant, ajuster le peigne et laisser polymériser.
- Démouler le peigne quand le gel est polymérisé et fixer l'ensemble à l'appareil.
- Déposer les échantillons de protéines après ajout de bleu dénaturant (1/10 du volume) et dénaturation pendant 5 min a 100°C.
- Il faut de plus s'assurer que toutes les protéines aient le même point de départ pour la migration, c'est pourquoi nous avons démarré la migration dans un gel de concentration.
- La migration est assurée dans le tampon Tris (25mM)-glycine (192mM) contenant 0.1% SDS à ampérage constant (entre 30 et 50 mA) et arrêter exactement quand le "bleu de bromophenol" atteint le bas du gel.

➤ La révélation est effectuée par deux méthodes :

✓ Imprégnation pendant une nuit dans une solution du colorant constituée de bleu de Coomassie 0.25% dans un mélange éthanol-eau-acide acétique glacial. La décoloration est réalisée dans un solvant composé de: éthanol-eau-acide acétique jusqu'à décoloration complète du gel, les bandes correspondants aux protéines restent colorées en bleu.

✓ Ou par imprégnation dans une solution de nitrate d'argent à 0.1% pendant 30 minutes puis rinçage avec l'eau distillée ensuite développe avec une solution de 3% de Na_2CO_3 contenant 0.02% de formaldéhyde enfin stopper avec 1% d'acide acétique et lavage avec l'eau distillée.

III.4. Technique de séquençages de NH₂ terminale

La séquence N-terminale de l'enzyme purifiée est déterminée par la méthode d'Edman automatisée sur microséquenceur de protéines (**Hunkapiller et Hood., 1978; Hewick et al., 1981**). Elle comporte les trois étapes classiques de séquençage, à savoir : le couplage, le clivage et la conversion (**Figure 44**).

- ❖ **Couplage** : sous des conditions basiques, l'extrémité N-terminale de la protéine à séquencer est couplée avec le PhénylIsoThioCyanate (PITC) pour donner le PhénylThioCaramyl (PTC)-polypeptide.
- ❖ **Clivage** : la liaison peptidique entre le résidu protéique et le PTC subit un clivage acide, ce qui mène à la libération de l'AnilinoThiazolinone (ATZ-Aa), dérivé instable du résidu en question.
- ❖ **Conversion** : L'ATZ-Aa est converti en un dérivé d'acide aminé stable, le PhénylThiohydantoin d'acide aminé (PTH-Aa).

A la fin de chaque cycle, le PTH-acide aminé est identifié par HPLC sur C18.

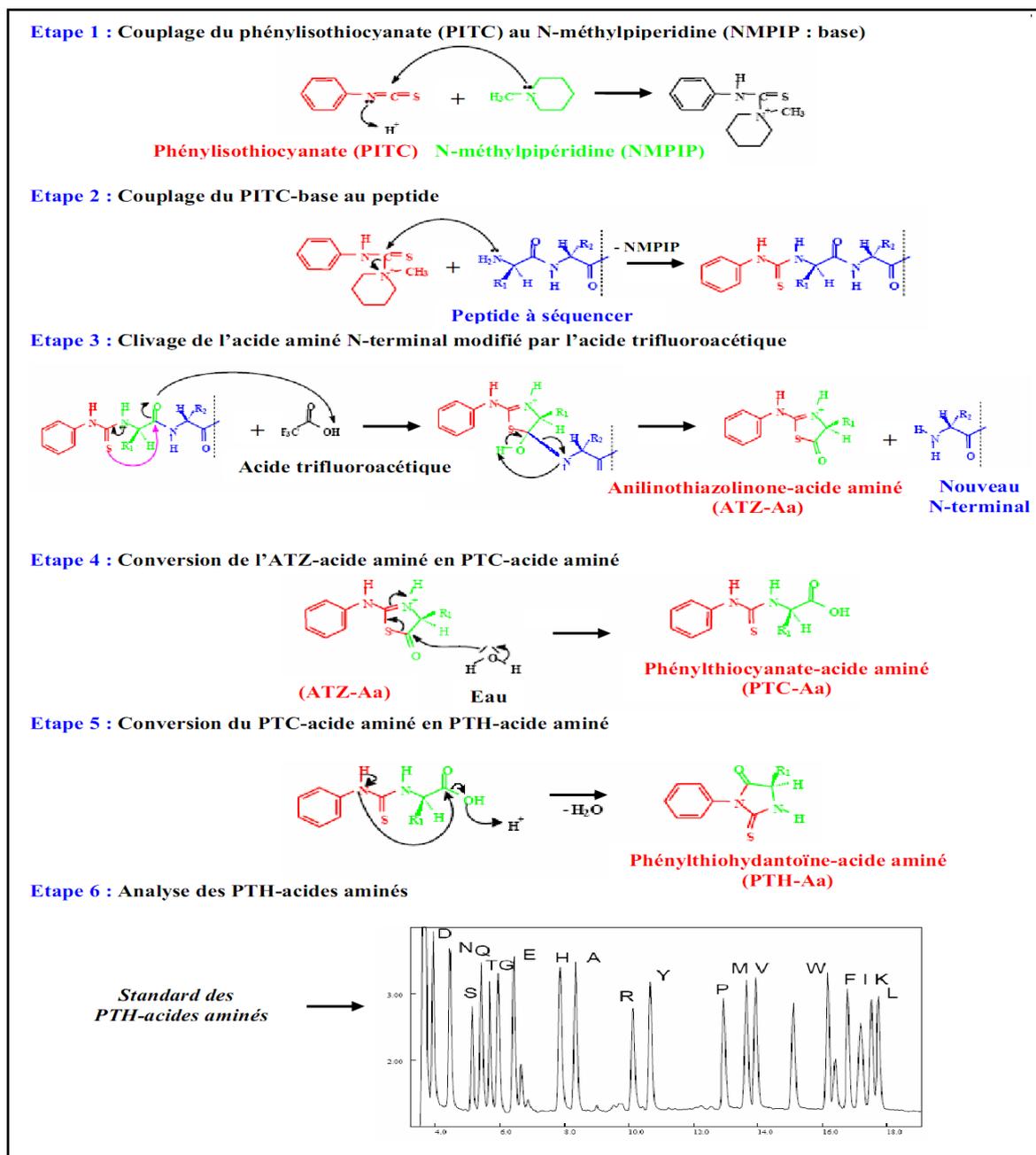


Figure 44: Dégradation chimique d'EDMAN automatisée sur microséquenceur de protéines. (Hewick et al., 1981)

III.5. Détermination de poids moléculaire par spectroscopie de masse (MALDI-TOF)

La spectrométrie de masse (MS), permet de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse mono-isotopique et de caractériser leur structure chimique, en les fragmentant. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Elle comporte une source d'ionisation suivie d'un ou plusieurs analyseurs qui séparent les ions produits selon leur rapport m/z et les comptent (**Figure 45**). La spectrométrie de masse permet non seulement de déterminer la masse des produits étudiés, en mélange ou purifiés, mais également de contrôler les modifications post-traductionnelles des molécules et de donner leur élément de structure extrêmement sensible. Dans le cas particulier des peptides, cette méthodologie permet dans certaines conditions d'obtenir des éléments de la séquence en acide aminés. Il existe deux méthodologies complémentaires en spectrométrie de masse pour l'étude des molécules biologiques : l'ionisation par désorption laser assistée par matrice (MALDI) couplée à un analyseur de masse de type temps de vol (TOF), très efficace pour l'étude directe d'un mélange de produits (**Figure 45**), et l'ionisation par électronébulisation (ESI) couplée à des analyseurs de masse de type quadripolaire et temps de vol (Qq-TOF). Cette technique permet l'interfaçage entre la séparation chromatographique en phase liquide et le spectromètre de masse. La faible taille de la protéine considérée dans cette étude nous permet de fournir nos échantillons sous 2 formes :

1. en solution, ce qui permet de mesurer la masse totale de nos protéines,
2. sur gel d'acrylamide, après migration, ce qui permet de fournir une protéine pure avec moins de molécules parasitant le signal de spectrométrie (Tris notamment). Cette forme nécessite une digestion préalable à la trypsine, permettant de traiter des fragments de plus petite taille.

Cette technique nécessite d'avoir un tampon pauvre en ion Cl et des concentrations de l'ordre de 5pmol/ μ l. En solution ou emprisonnée dans un gel d'électrophorèse, la protéine sera diluée dans un tampon acétate d'ammonium et clivée enzymatiquement (par la trypsine) puis l'hydrolysate final est déposé sur la plaque du MALDI-TOF et mélangé à une solution d'acide alpha cyano-4-hydroxycinnamique. Les différentes étapes peuvent être énumérer comme suit :

1. Après coloration au bleu de commassie G-250, les bandes protéiques d'intérêt sont découpées du gel.

2. Laver les bandes avec un mélange d'acétonitrile/50mM hydrogencarbonate d'ammonium (v/v).
3. Digérer avec la trypsine pendant 16 h à 37 °C.
4. Arrêter la digestion par addition de 2µl acide trifluoro-acétique (TFA).
5. Le produit de la digestion est par la suite analysé grâce à une matrice d'acide cyano-4 hydroxycinnamique (5mg/ml) préparée dans 50% acétonitrile contenant 0,1% TFA.

La taille des fragments protéiques sera ainsi déterminée par rapport à un étalon interne en utilisant le spectromètre de masse. Les valeurs expérimentales seront par la suite comparées avec celles contenues dans les banques de données pour identifier la protéine.

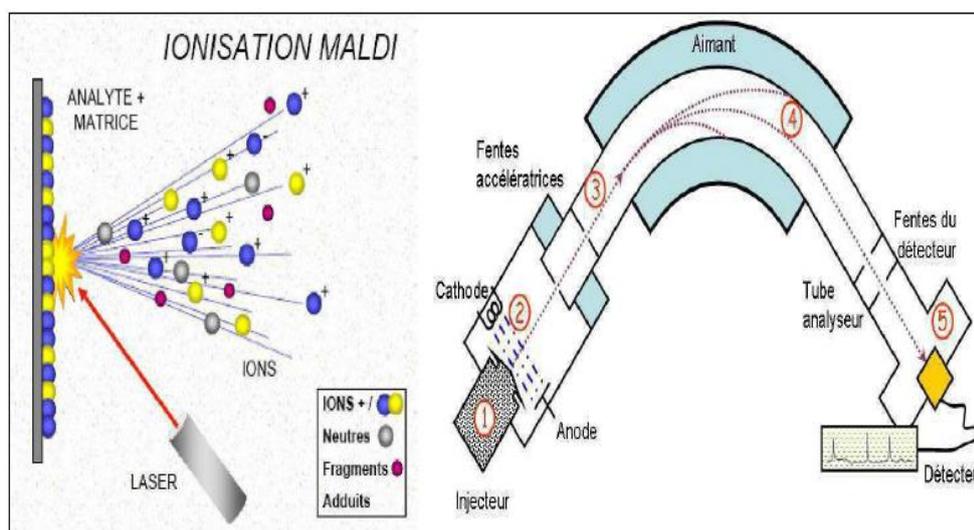


Figure 45 : Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse. Sous l'impact du tir laser, l'échantillon (1) est introduit dans un faisceau d'électrons (2) est désorbé sous vide (environ 5.10^{-7} bar) et les molécules sont ionisées. Les ions obtenus (3) sont déviés par un aimant (4) et se séparent donc selon leur rapport masse/charge. A charge identique, les ions trop légers ou trop lourds sont déviés et ne seront pas détectés. Les ions de masse attendue sont comptés par un détecteur (5).

ANNEXE IV

IV.1. Résultat de l'étude morphologique et tests biochimiques des espèces sélectionnées

Tableau 19 : Résultat de l'étude morphologique et tests biochimiques des cinq espèces sélectionnées.

Espèces	Milieux de culture	Couleurs		Pigments diffusibles	Chaîne des spores	Coloration de Gram	Test catalase	Réduction de nitrate
		MA	MS					
Cpt 8	ISP 1	Beige	Beige	Marron foncé Beige		G +	+	+
	ISP 2	Beige blanc	Beige blanc					
	ISP 3	Marron clair	Beige					
	ISP 4	Marron clair	Beige					
	ISP 5	Beige	Beige					
	LISP 6							
	ISP 7							
Cpt 20	ISP1	Beige	Beige foncé	Beige Beige		G +	+	+
	ISP2	Beige blanc	Beige blanc					
	ISP3	Pas de MA	Beige					
	ISP4	Marron clair	Beige					
	ISP5	Marron clair	Beige foncé					
	ISP6							
	ISP7							
Cpt 21	ISP 1	Beige	Beige	Pas de PM Marron		G +	+	+ (Zn)
	ISP 2	Beige	Beige					
	ISP 3	Marron	Beige					
	ISP 4	Pas de MA	Beige					
	ISP 5	Beige	Beige					
	ISP 6							
	ISP 7							

Tableau 19 : Résultat de l'étude morphologique et tests biochimiques des cinq espèces sélectionnées (Suite).

Espèces	Milieux de culture	Couleurs		Pigments diffusibles	Chaîne des spores	Coloration de Gram	Test catalase	Réduction de nitrate
		MA	MS					
Cpt 22	ISP 1	Beige foncé	Beige	Marron clair Beige		G +	+	+ (Zn)
	ISP 2	Beige	Marron					
	ISP 3	Blanc	Beige					
	ISP 4	Pas de MA	Beige					
	ISP 5	Beige	Beige					
	ISP 6							
	ISP 7							
Cpt 29	ISP 1	Marron	Beige	Beige foncé Beige		G +	+	+
	ISP 2	Beige clair	Beige foncé					
	ISP 3	Marron clair	Blanc beige					
	ISP 4	/	/					
	ISP 5	Beige	Beige					
	ISP 6							
	ISP 7							

***PM : Pigments mélanoides, PS : Pigments solubles.**

Les espèces se développent sur les milieux ISP (ISP1-ISP7) et certaines produisent des pigmentations mélanoides noir ou brun (**tableau 19**)

IV.2. Résultats des tests morphologiques physiologiques et biochimiques de l'espèce Cpt20 (Figure 46) :

Souche numéro: CPT 20										
Caractères culturaux et microscopique										
<u>ISP 2</u>	G Rare A Beige-jaune	R Beige-marron SP -								
<u>ISP 3</u>	G Rare A Beige	R Beige-marron SP -								
<u>ISP 4</u>	G Rare A Beige	R Incolore SP -								
<u>ISP 5</u>	G Rare A Beige	R Incolore SP -								
<u>ISP 6</u>	G Rare A Beige	R Beige-jaune SP -								
<u>ISP 7</u>	G Bonne A Beige	R Beige-marron SP -								
Chaîne de spore: RF										
Sporange: Non										
Pigment mélanoides: Non										
Fragmentation du mycélium: Non										
Caractères physiologiques										
Résistance à NaCl: 10%										
pH: 7-9										
Utilisation de sources carbonées										
Glu	Man	Ino	Sor	Rha	Sac	Mel	Amy	Ara		
+	-	-	+	-	-	-	+	-		
Enzymes produits										
Onp	ADH	LDC	ODC	Cit	H ₂ S	Ure	TDA	Ind	VP	Gel
-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+

Figure 46 : Résultats des tests morphologiques physiologiques et biochimiques de l'espèce Cpt20.



Figure 47 : Aspect macroscopique de quelques colonies de l'espèce Cpt20 non sporulé sur milieu ISP2 sous binoculaire.



Figure 48 : Aspect morphologique macroscopique de quelques colonies de l'espèce Cpt20 sporulées sur milieu ISP3 sous binoculaire.

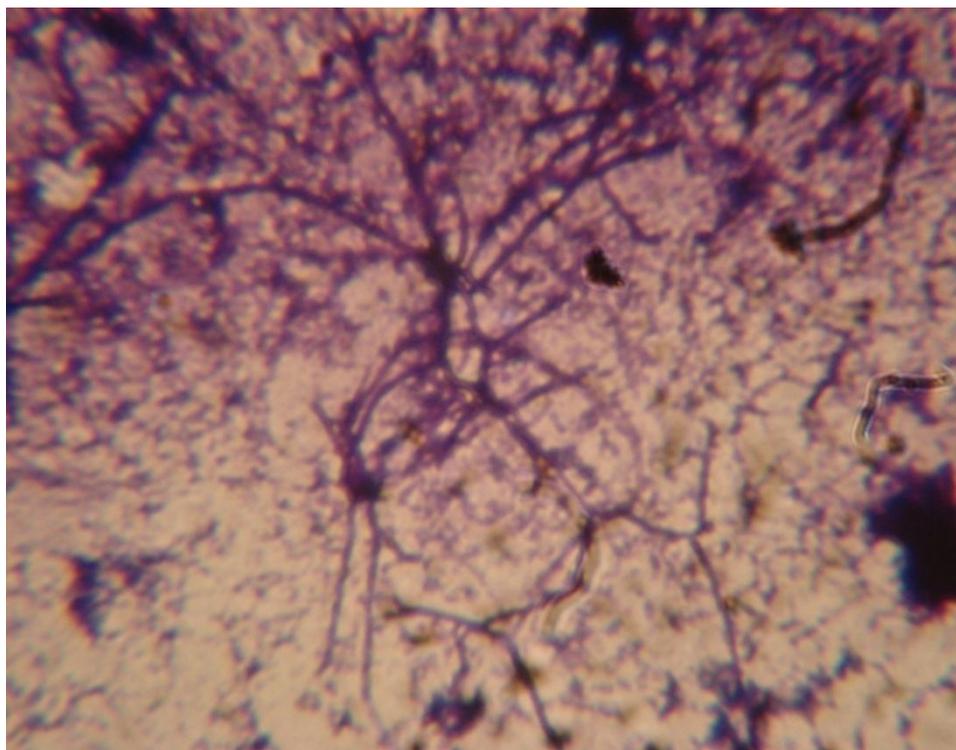
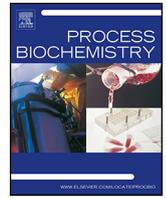


Figure 49 : Aspect microscopique de l'espèce Cpt20 après examen de la coloration de Gram (X100).



Publications



Purification and characterization of a new thermoalkaliphilic pectate lyase from *Actinomadura keratinilytica* Cpt20



Boudjema Saoudi^{a,b,c}, Amina Habbeche^b, Bilal Kerouaz^b, Soumaya Haberra^b, Zamen Ben Romdhane^c, Lazhari Tichati^b, Mokhtar Boudelaa^b, Hafedh Belghith^c, Ali Gargouri^c, Ali Ladjama^{b,*}

^a Departments of Biology, Faculty of Science, Mohamed Cherif Messaadia Souk Ahras University, P.O. Box 1553, Road of Annaba, 41000 Souk Ahras, Algeria

^b Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology, Faculty of Science of Annaba, Badji Mokhtar Annaba University, P.O. Box 12, 23000 Annaba, Algeria

^c Laboratory of Biomasses Valorization and Protein Production in Eucaryotes, Centre of Biotechnology of Sfax, University of Sfax, Road of Sidi Mansour Km 6, P.O. Box 1177, Sfax 3018, Tunisia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 August 2015

Received in revised form 3 October 2015

Accepted 5 October 2015

Available online 14 October 2015

Keywords:

Thermophilic actinomycetes

Pectate lyase

Purification

MALDI-TOF/MS

Kinetic parameters

ABSTRACT

This study was carried out to investigate the purification and biochemical characterization of a new extracellular alkaliphilic and thermostable pectate lyase (Pel-20) isolated from *Actinomadura keratinilytica* strain Cpt20. Pure protein was obtained after sequential chromatographies on a fast performance liquid chromatography (FPLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) columns. Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) analysis revealed that the purified enzyme was a monomer with a molecular mass of 34125.11-Da. The enzyme had an NH₂-terminal sequence of GFATNQGGTTGGAGGTLs, thus, sharing high homology with actinomycetes pectate lyase family. The results showed that this enzyme was completely inhibited by EDTA, which supports its belonging to the pectate lyase superfamily. It showed optimum activity at pH 10.5 and 70 °C. The thermoactivity and thermostability of Pel-20 were enhanced in the presence of 1 mM Ca²⁺. Its half-life times at 70, 80, 90, and 100 °C were 18, 12, 7, and 2 h, respectively. Its kinetic parameters, K_m and V_{max} values were 0.45 mM and 21,700 U/mg, respectively. Low-esterified pectin was the optimum substrate for the Pel-20. However, higher-esterified pectin was also weakly cleaved. Overall, the alkaliphilicity and thermostability properties of Pel-20 make it a potential candidate for future application in industrial bioprocesses.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The growing interest in eco-friendly industries within the last few decades has led to strong commitments from countries all over the world to eliminate environmentally hazardous substances and promote cleaner, greener technologies and processes. Recent research has, therefore, become increasingly interested in the search for viable strategies to save the environment while maintaining and enhancing the privileges so far obtained via chemical technologies. One of the challenging areas for environmental researchers and technologists is the fibers and textile industry, where huge quantities of raw materials are processed and large amounts of hazardous chemicals are generated. Although the

textile industry is increasingly moving towards enzyme-based biotechnological applications, some steps in the textile production process have not yet been able to develop into enzyme-based systems due to technical and cost constraints. Degumming is, for instance, an essential surface modification process of natural fibers that involve the use of sodium hydroxide treatments [1]. The chemical substances used in this traditional strongly alkaline process are toxic, mutagenic, highly persistent, and bio-accumulative, thus posing detrimental effects on the fabric, human health and the environment. In recent years, there has been a growing tendency for the search of efficient enzyme-based substitutes to such hazardous chemical processes, and recent research indicates that microbial enzymes may open promising opportunities for the development of efficient, cost-effective, and eco-friendly alternatives [2].

Of particular interest, pectins, a major constituent of cereals, vegetables, fruits and fibers, are complex, high molecular weight, heterogeneous and acidic structural polysaccharides [3]. Pectinolytic enzymes that hydrolyze pectins have important

* Corresponding author. Fax: +213 38 87 53 99.

E-mail addresses: ladjama.a@yahoo.fr, ali.ladjama@univ-annaba.dz (A. Ladjama).

applications in various industrial processes. Based on their pH requirement for optimum enzymatic activity, pectinases can be broadly classified into acidic and alkaline pectinases. Acidic pectinases are useful for the extraction, clarification and liquefaction of fruit juices [4] and olive oil extraction [5,6]. Alkaline pectinases are widely used in various applications and processes, including textile fiber processing, cotton fabric bio-preparation, tea and coffee fermentation, and paper pulp wastewater treatment [7,8].

Pectinolytic enzymes from natural microorganisms have attracted increasing attention as potential biological catalysts for use in various industrial processes [9,10]. Thermophilic microbial species able to synthesize these enzymes are of great interest because of their promising potential for producing thermostable enzymes [1,11]. In fact, pectinases have been purified from different microorganisms namely fungi, such as *Penicillium occitanis* [12], and *Aspergillus* [13], and bacteria, such as *Bacillus* [3,10,14] *Streptomyces* [15–19] and *Paenibacillus* sp. 0602 [20]. They have been isolated, purified and characterized from various actinomycetes species [11,21]. Thermophilic actinomycetes have a crucial role in the decomposition and composting of plant materials [21,22]. *Actinomadura*, a prominent species within this group, are primarily carbohydrate-degrading actinomycetes that can use a wide range of plant sugars and polymeric carbohydrates as carbon and energy sources [23–25]. However, and to the authors' knowledge, no previous work has so far reported on the pectinases from *Actinomadura* genus. Accordingly, the current study aimed to investigate the production, purification, and biochemical characterization of a new alkaliphilic and thermostable pectate lyase from the *Actinomadura keratinilytica* strain Cpt20 isolated from poultry compost in the region of Annaba, East of Algeria.

2. Materials and methods

2.1. Substrates and chemicals

Polygalacturonic acid (PGA), pectin (with different degrees of methylesterification), bovine serum albumin (BSA), and analytical grade reagents were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). All other chemicals were of the analytical grade unless otherwise stated.

2.2. Bacterial strains and screening of pectinolytic activities

A total of twenty two thermophilic actinomycetes strains were isolated from poultry compost collected from a local farm in Annaba (North East of Algeria) as previously described by Taibi et al. [25]. The thermophilic isolates of actinomycetes were assayed for their abilities to hydrolyze pectin in agar plates containing pectin as a sole carbon source. Halos of hydrolysis were revealed using cetyl trimethyl hexadecyl ammonium bromide (CTAB) [26] in a solid medium containing (g/l): pectin 5; yeast extract 5; peptone 5; KH_2PO_4 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01; bacteriological agar, 20; and trace elements 1/1000 (v/v) [composed of (1 g/l each): $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; and $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$]. The initial pH was adjusted to 7.4 [25]. The plates were incubated at 45 °C for 5 days. Colonies with clear zone formations following pectin hydrolysis were evaluated as pectinase producers. Several pectinolytic strains were isolated, and Cpt20, which exhibited a large clear zone of hydrolysis, was selected and retained for further experimental study.

2.3. Enzyme production and culture condition

Pectinase enzyme production was carried out in initial liquid medium containing pectin at 5 g/l. A 1-ml spore suspension (10^6 spore/ml) of strain Cpt20 was transferred into a 500 ml Erlenmeyer flask with baffles containing 100 ml of medium consisting

of pectin as a sole carbon source containing (g/l): pectin 5; yeast extract 5; peptone 5; KH_2PO_4 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, and trace-salt solution 0.1% (v/v) [composed of (1 g/l each): $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; and $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$] [23–25]. The initial pH was adjusted to 7.4 before sterilization by addition of Na_2CO_3 0.5 M to avoid the chemical degradation of highly esterified pectin substrates via chemical β -elimination mechanism at high temperature. Cultures were incubated at 45 °C for 5 days with shaking at 180 rpm. Growth kinetic was monitored by measuring absorbance at 600 nm at regular time intervals. The culture medium was centrifuged to remove mycelia and medium debris. The cell-free supernatant was used as a crude enzyme solution.

2.4. Enzyme assays

Pectate lyase activity was assayed by measuring the increase in absorbance at 232 nm [27,28]. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to produce unsaturated oligogalacturonides equivalent to 1 μmol per minute under standard assay conditions [1,2,27]. The molar extinction coefficient was assumed to be $4600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for unsaturated digalacturonide [27,28]. Unless specified, a suitably diluted enzyme solution (0.2 ml) was added to a reaction mixture consisting of 1.3 ml of 50 mM Tris–HCl buffer at pH 9 (Buffer A), supplemented with 0.2% (w/v) PGA, or other substrates and 1 mM CaCl_2 , in a total volume of 1.5 ml. The reaction was incubated for 20 min at 55 °C. Pectate lyase activity was also assayed using thiobarbituric acid method as previously described [12]. Specific activity was then expressed as units per milligram of protein.

2.5. Purification procedure

Cells and culture fluid were separated by centrifugation ($5000 \times g$, 30 min), and the supernatant was concentrated by rotavapor at 45 °C and then dialyzed overnight against repeated changes of 10 mM Tris–HCl buffer (pH 8, Buffer B). The sample was loaded on FPLC system using a UNO Q-12 column (15 \times 68 mm) (Bio-Rad Laboratories, USA) equilibrated with 20 mM Tris–HCl buffer, pH 8 (Buffer C). The proteins were eluted at a flow rate of 3 ml/min using a linear NaCl gradient ranging from 0 to 1 M in the same buffer. Fractions of 3 ml each were collected at a flow rate of 30 ml/h and analyzed for pectinase activity and protein concentration. Active fractions were collected and loaded on HPLC system using a PL aquagel OH-40 10 μm column (300 \times 25 mm) equilibrated with buffer C. The elution of pectinase was performed with buffer C at a rate of 5 ml/min. The pooled fractions, containing pectinase activity, were then concentrated and desalted in centrifugal micro-concentrators (Amicon Inc., Beverly, MA, USA) with 10-kDa cut-off membranes and stored at –20 °C for further analysis.

2.6. Protein quantification, electrophoresis, zymography, and mass spectrometry

Protein concentration was determined by the method of Bradford [29] using a “Dc protein assay kit” purchased from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA), with BSA as a standard. The estimated molecular mass of the native purified pectate lyase enzyme was determined by 12% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) under reducing and non-reducing conditions and also confirmed by size exclusion HPLC. Sodium dodecyl sulphate (SDS)-PAGE was performed using 12% (w/v) acrylamide in gels as described by Laemmli [30]. Protein bands were visualized with Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) staining. Pectin zymography staining was performed as described by Collmer et al. [27].

The molecular mass of the purified Pel-20 was analyzed in linear mode by MALDI-TOF/MS using a Voyager DE-RP instrument (Applied Biosystems/PerSeptive Biosystems, Inc., Framingham, MA, USA). Data were collected with a Tektronix TDS 520 numeric oscillograph and analyzed using the GRAMS/386 software (Galactic Industries Corporation, Salem, NH, USA).

2.7. Determination of NH_2 -terminal amino-acid sequence

Bands of purified Pel-20 on SDS gels were transferred into a problot PVDF membrane, and NH_2 -terminal sequence analysis was performed by automated Edman's degradation using an Applied Biosystem Model 473A gas-phase sequencer. The sequence was compared to those in the Swiss-Prot/TrEMBL database using the BLAST search algorithm (NCBI, NIH, USA).

2.8. Effects of EDTA and metallic ions on stability of Pel-20 enzyme

The effect of EDTA on pectinase stability was investigated by pre-incubating the purified enzyme for 20 min at 30 °C. The effects of several metallic ions assayed at concentrations of 1 mM were also investigated by adding divalent ions [Ca^{2+} (CaCl_2), Mn^{2+} (MnCl_2), Mg^{2+} (MgCl_2), Co^{2+} (CoCl_2), Cu^{2+} (CuCl_2), Zn^{2+} (ZnCl_2), Ba^{2+} (BaCl_2), Fe^{2+} (FeCl_2), Sn^{2+} (SnCl_2), Cd^{2+} (CdCl_2), and Hg^{2+} (HgCl_2)], as well as monovalent cations [NH_4^+ (NH_4Cl), K^+ (KCl), and Na^+ (NaCl)] to the reaction mixture. The effect of the calcium concentration (from 0 to 10 mM) on the purified pectinase enzyme was also measured. The remaining pectate lyase stability was measured after the pre-incubation of the purified enzyme with each of the various chemical reagents at room temperature for 24 h. Activity was expressed as a percentage of the stability level measured with PGA as a substrate in the absence of any reagent or metallic ions.

2.9. Effects of pH on pectinase activity and stability

The effect of pH was determined using PGA as a substrate. Pectinase activity was assayed over a pH range of 5–13 at 70 °C. The pH stability of the enzyme was investigated by pre-incubation in buffers of different pH values ranging from 6 to 12 at room temperature for 24 h. Aliquots were withdrawn at specific time intervals, and residual enzymatic activities were determined under standard assay conditions. The following buffer systems, supplemented with 1 mM CaCl_2 , were used at 50 mM: sodium acetate for pH 5–6, phosphate for pH 6–8, Tris-HCl for pH 8–9, glycine-NaOH for pH 9–13. The pH of all buffers was equilibrated at the temperatures used.

2.10. Effects of temperature on pectinase activity and stability

The effect of temperature on Pel-20 activity was studied over temperatures ranging from 50 to 100 °C during the reaction assay in buffer A and using PGA as a substrate. The thermostability of the enzyme was investigated by incubation for 24 h at 70, 80, 90, and 100 °C in the presence or absence of 1 mM CaCl_2 . In each case, the substrate was pre-incubated at the desired temperature for 5 min. Aliquots were withdrawn at desired time intervals to determine the remaining activity. The non-heated enzyme was considered as a control (100%).

2.11. Substrate specificity of Pel-20 enzyme

The substrate specificity of the purified Pel-20 was determined using pectin with various degrees of methylesterification (0, 32, 54, 72, 85, and ~90%) as substrates, in ammonia buffer, pH 10 at 50 mM. This buffer was used to protect the methoxy groups in highly esterified pectin and to avoid desesterification of pectin, as it

has been observed at high alkaline conditions in several studies. The enzyme activity against various substrates was determined under standard assay conditions, as long as the PGA was substituted by the esterified pectins, the rate against PGA taken as 100%.

2.12. Kinetic measurements of Pel-20 enzyme

Kinetic parameters were calculated from the initial rate activities of the purified Pel-20 enzyme using PGA as substrate at different concentrations, ranging from 0.10 to 20 mM, for 20 min at 70 °C and pH 10.5. Each assay was carried out in triplicate, and kinetic parameters were estimated by Lineweaver-Burk plots. Kinetic constants, Michaelis-Menten constant (K_m), and maximum reaction velocity (V_{max}) values were calculated using the Hyper32 software package of the University of Liverpool (<http://homepage.ntlworld.com/john.easterby/hyper32.html>). The value of the turnover number (k_{cat}) was calculated by the following equation:

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{[E]}$$

where $[E]$ refers to the active enzyme concentration and V_{max} to the maximum velocity.

2.13. Statistical analysis

The data represent the mean of three independent replicates with their standard deviation (mean \pm SD) using Microsoft Excel. The results were considered statistically significant for P values of less than or equal to 0.05.

3. Results and discussion

3.1. Screening of alkaline pectinase-producing strains

In the current study, twenty-two thermophilic actinomycetes isolates were screened for their pectinase activities. Using the ratio of the clear zone diameter (onto CTAB agar plates) to colony diameter, five isolates were noted to exhibit the high ratios and were further assayed for pectinase production in liquid culture (data not shown). A bacterium, called strain Cpt20 (isolated from poultry compost in the region of Annaba, East Area of Algeria [25]) displayed a high ratio and the highest extracellular pectate lyase activity (1150 U/ml) after 5 days of incubation in an optimized medium (Fig. 1) and was, therefore, selected and retained for all subsequent studies.

3.2. Purification of Pel-20 enzyme

The Pel-20 enzyme was purified from the culture supernatant (1000 ml) of a 120-h-old culture of the *A. keratinilytica* strain Cpt20 according to the procedure described in Section 2, using rotary evaporator, followed by FPLC UNO Q-12 (Fig. 2A) and HPLC OH-40 (eluted at a retention time of 20 min, Fig. 1).

The results of the purification procedure are summarized in Table 1. The purity of the enzyme was estimated to be 77-fold higher than that of the crude extract. The purified enzyme preparation contained about 34% of the total activity of the crude and had a specific activity of 21,889 U/mg (Table 1).

3.3. Molecular weight determination of Pel-20 enzyme

The homogeneity of the purified enzyme was checked by HPLC chromatography, and SDS-PAGE analysis. Zymogram activity staining, revealed one zone of pectinase activity for the purified sample migrating at an estimated molecular mass of 34 kDa (Fig. 2C and D),

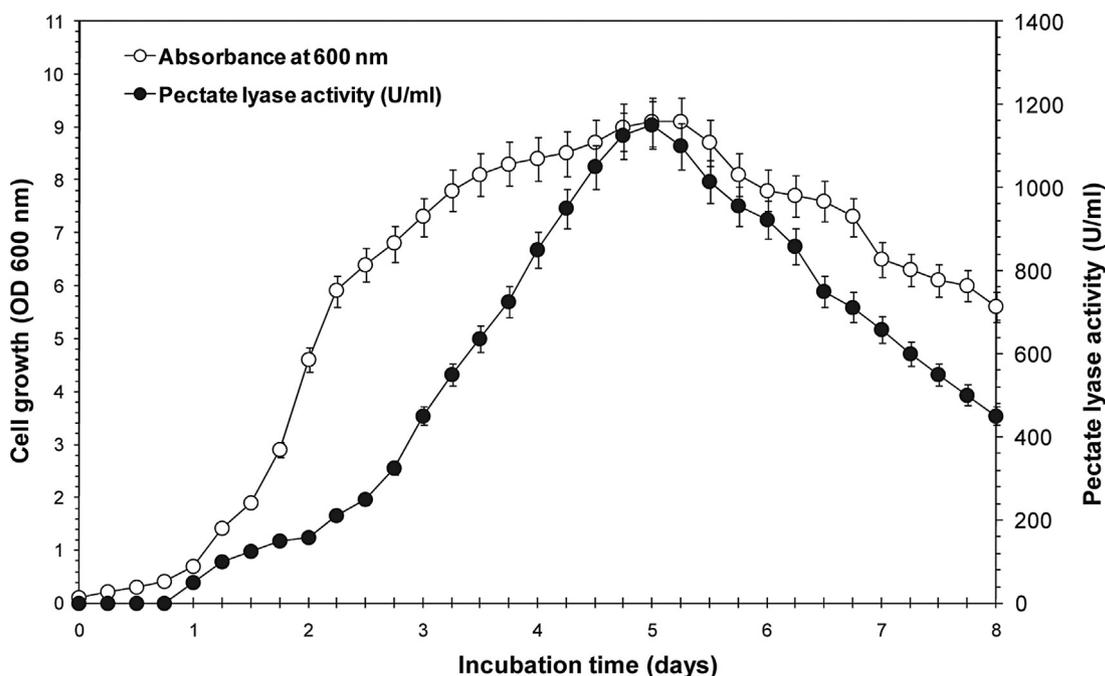


Fig. 1. Time course of *A. keratinilytica* strain Cpt20 cell growth (○) monitored by measuring the OD at 600 nm and Pel-20 production (●).

Table 1
Flow sheet of Pel-20 purification.

Purification step ^a	Total activity (units) ^b × 10 ³	Total protein (mg) ^{b,c}	Specific activity (U/mg of protein) ^b	Activity recovery rate (%)	Purification factor (fold)
Crude extract	1150 ± 75	4045 ± 93	284 ± 45	100	1
Rotary evaporator	920 ± 23	825 ± 10	1115 ± 66	80	3.9
FPLC UNO Q-12	609 ± 18	90 ± 12	6422 ± 149	52	22.6
HPLC OH-40	394 ± 10	18 ± 2	21,889 ± 459	34	77

^a The values represent the mean of three independent experiments, and ±standard errors are reported.

^b One unit of pectate lyase activity was defined as the amount of enzyme required to produce unsaturated oligogalacturonides equivalent to 1 μmol per minute under the experimental conditions used.

^c Amounts of protein were estimated by the method of Bradford [29].

with ruthenium red indicating PGA substrate degradation. A single protein band was obtained for the pooled fractions of the purified enzyme. This preparation was a homogeneous enzyme with high purity exhibiting a unique symmetrical elution peak with a retention time of 20 min, corresponding to a protein of nearly 34 kDa on HPLC gel filtration chromatography (Fig. 2B) and on SDS-PAGE (Fig. 2D). The exact molecular mass of the purified Pel-20 was confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry as being 34125.11 Da (Fig. 2E). Such mass is higher than those previously reported for other bacterial pectate lyase [18,31] and lower than the pectate lyase from thermophilic *Bacillus* strains [3,32,33].

Taken together, these results suggested that Pel-20 is a monomeric protein comparable to those previously reported for other pectinases from microbial strains [3,31–33].

3.4. NH₂-terminal amino-acid sequence determination of Pel-20 enzyme

The sequence determined for the first 18 NH₂-terminal amino acid of Pel-20 from the *A. keratinilytica* strain Cpt20 was GFAT-NQGTTGGAGGTL. It was compared to other protein sequences available at Swiss-Prot database using the BLASTP search programs (Table 2). The sequence showed homology with those found for actinomycetes pectate lyases, reaching 87, 81, and 80% identity matches with the pectate lyases from *Streptomyces zinciresistens*,

Actinoplanes sp. N902-109 and *Streptomyces viridochromogenes*. Tue57, respectively.

These findings strongly suggested that the Pel-20 from the *A. keratinilytica* strain Cpt20 is a new pectate lyase.

3.5. Effects of EDTA and metallic ions on the stability of Pel-20 enzyme

The relative effects of various compounds are listed in Table 3. The findings indicated that enzyme activity was strongly inhibited by 10 mM EDTA (chelating agent), which is a well-known inhibitor of pectate lyases [28]. Several metallic ions were assayed for their effects on Pel-20 stability. The results revealed that enzyme activity was essentially unaffected by monovalent cation (Na⁺, NH₄⁺, and K⁺). The addition of FeCl₂, ZnCl₂, BaCl₂, MgCl₂, MnCl₂, and CaCl₂ at 1 mM was, however, noted to enhance significantly the activity of Pel-20. This result indicated that the enzyme required Ca²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Ba²⁺, Zn²⁺, and Co²⁺ for optimal activity. Furthermore, the enzyme underwent no significant inhibition in the presence of Sn²⁺ but was, however, completely inhibited by Cd²⁺ and Hg²⁺ and moderately inhibited by Cu²⁺. Likewise, previous microbial purified pectate lyases [32,34,35] were reported to be totally activated by Ca²⁺, Mg²⁺, and Mn²⁺ but strongly inhibited by Cd²⁺ and Hg²⁺. These results were agreed with several previous published reports [1,2,4,7,8,18,31,32,34,35]. The increase in pectinase activity with Ca²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Ba²⁺, Zn²⁺, and Fe²⁺ suggested that the

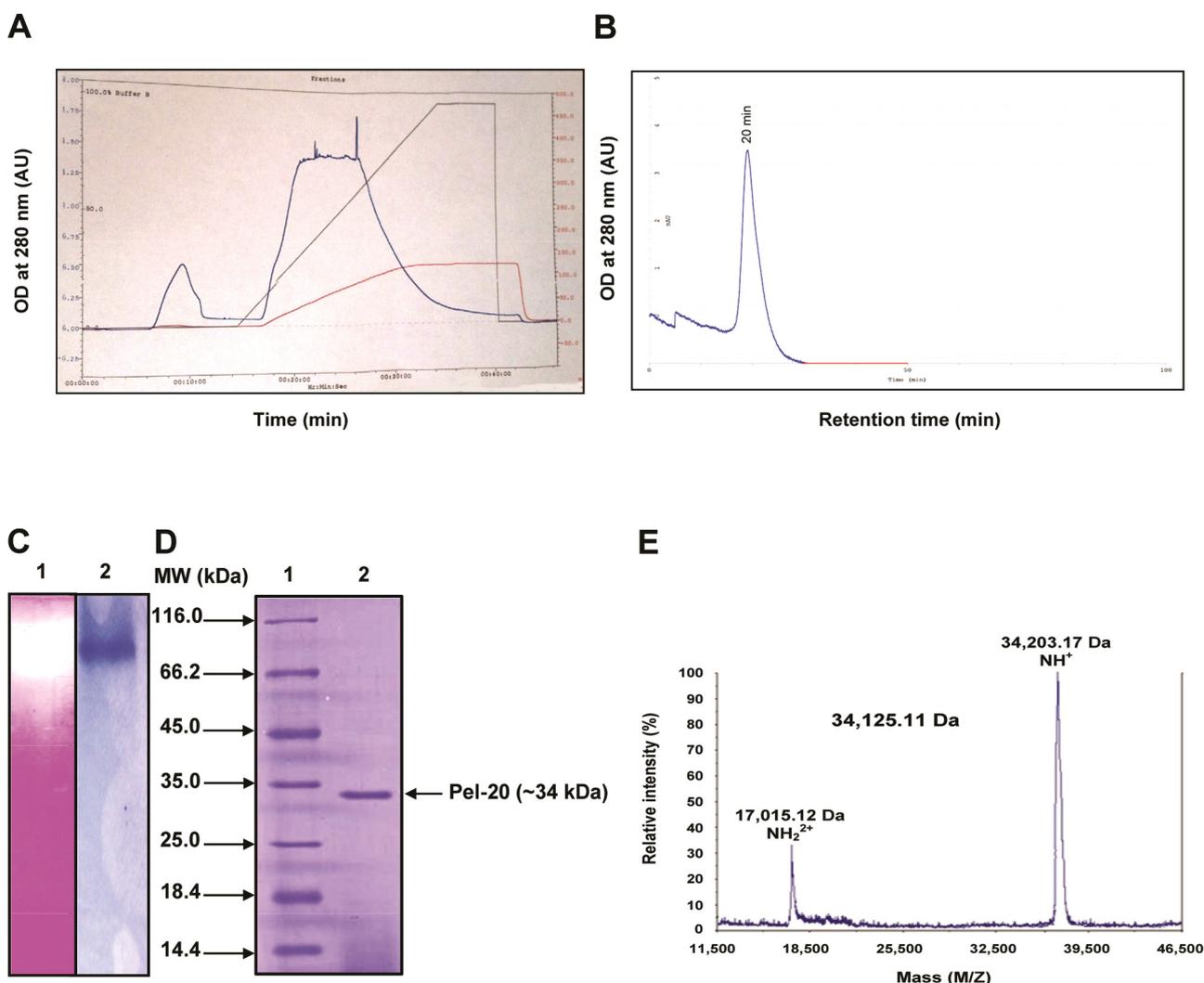


Fig. 2. Chromatography profiles of Pel-20 on FPLC UNO Q-12 (A) and HPLC OH-40 (B). (C) Native gels of the purified pectate lyase. Lane 1, zymogram activity staining. To detect pectate lyase activity, we used native 12% polyacrylamid gel containing 0.1% PGA as substrate followed by staining with 0.05% ruthenium red. Lane 2, purified Pel-20 (50 ng) in native 12% polyacrylamid gel. (D) SDS-PAGE of the purified pectate lyase. Lane 1, protein markers Lane 2, purified Pel-20 (50 ng) obtained after HPLC OH-40 chromatography (fractions from 18 to 25 min). (E) MALDI-TOF spectrum of 10 pmol purified Pel-20. The mass spectrum shows a series of multiply protonated molecular ions. The molecular mass of the enzyme was estimated as 34125.11 Da.

Table 2

NH₂-terminal sequences of the first 18 amino acids of Pel-20 from *A. keratinilytica* strain Cpt20 and comparison with the NH₂-terminal sequences for other actinomycetes pectate lyases.

Origin	NH ₂ -terminal amino-acid sequence ^{a,b}	Identity (%)	Protein ID
<i>Actinomadura keratinilytica</i> Cpt20	GFATNQGTTGGAGGTL	–	This study
<i>Streptomyces zinciresistens</i>	GFAT Q NGGTTGGAGG Q T V	87	WP.007496695.1
<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>	GFAT Q NGGTTGGAGG Q T V	87	WP.005308540.1
<i>Actinoplanes</i> sp. N902-109	GYAT Q NGGTTGGAGG T T V	81	WP.015623695.1
<i>Streptomyces</i> sp. NRRL S-325	GYAT Q NGGTTGGAGG T T V	81	WP.037830947.1
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> Tue57	GYAT Q NGGTTGGAGG Q K V	80	ELS50769.1

^a Amino-acid sequences for comparison were obtained using the program BLASTP (NCBI, NIH, USA) database.

^b Residues not identical with the Pel-20 enzyme from *A. keratinilytica* strain Cpt20 are indicated in bold.

metallic ions exerted a protective effect for the enzyme against thermal denaturation, thus playing a vital role in maintaining its active conformation at higher temperature. In fact, calcium can also be trapped in the pectin polymers or bridged between the polymer structure and pectinolytic enzymes [36]. Additionally, the EDTA, by complexing calcium (which normally activates the enzyme) causes subsequently the inhibition of enzyme activity [36–39].

3.6. Effects of pH on Pel-20 activity and stability

The results presented in Fig. 3A shows that the Pel-20 enzyme was active over a wide range of pH between 7.5 and 12, with optimal activity being recorded at pH 10.5. The relative activity at pH 7.5 and 12 was 45%. The pH optima of Pel-20 activity is comparable to optimum pH of pectate lysae from *Thermomonospora fusca* and *Bacillus* sp. strain KSM-P15, which have been reported to exhibit a

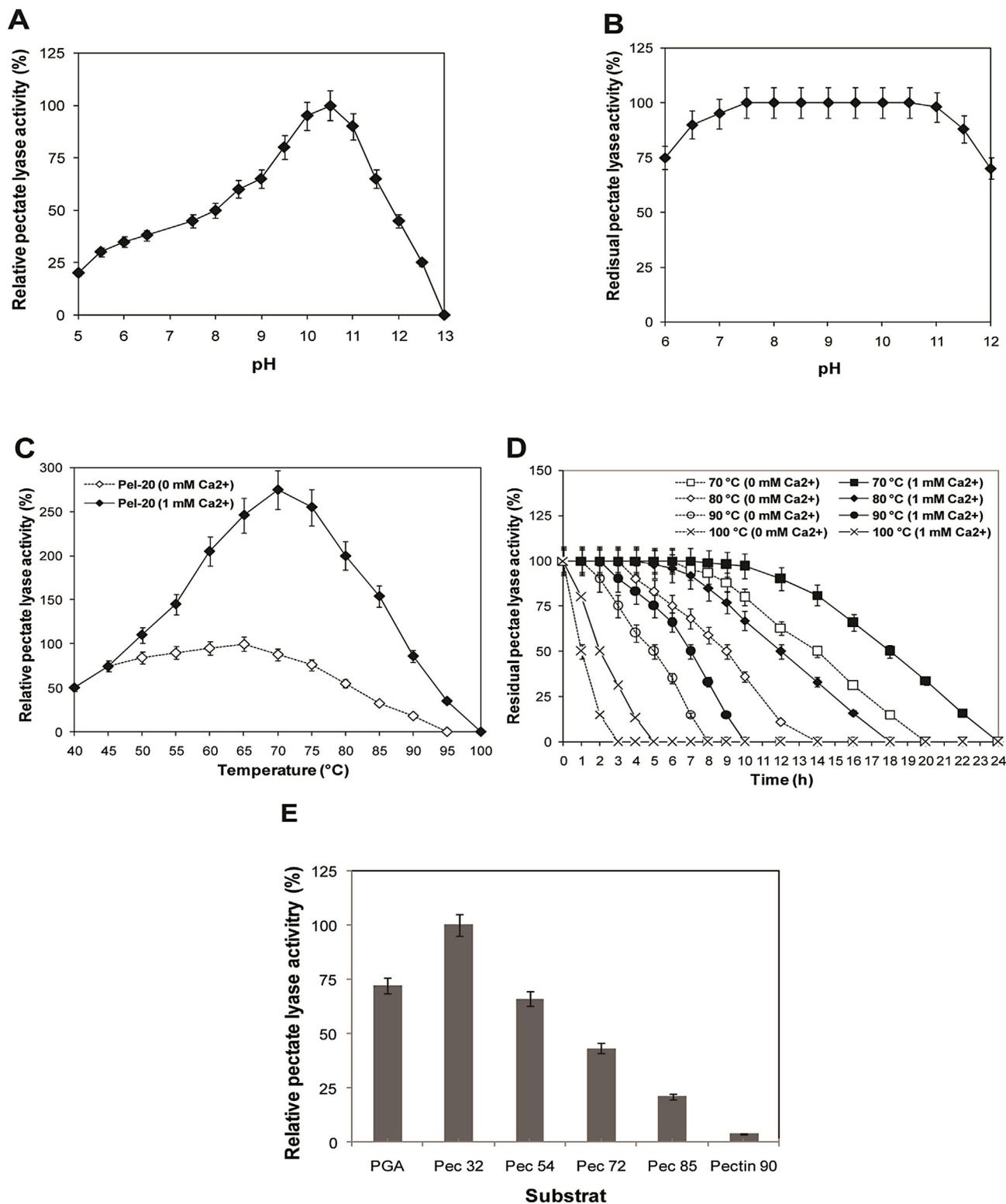


Fig. 3. Effects of pH on the activity (A) and stability (B) of Pel-20 from *A. keratinilytica* strain Cpt20. The activity of the enzyme at pH 10.5 was taken as 100%. Effects of the thermoactivity (C) and thermostability (D) of Pel-20 enzyme. The enzyme was pre-incubated in the presence and absence of CaCl₂ at temperatures ranging from 70 to 100 °C. In each case, the substrate was pre-incubated at the desired temperature for 5 min. The activity of the non-heated enzyme was taken as 100%. (E) Substrate specificity profile of Pel-20 enzyme. Pec: pectin with various degrees of esterification (0, 32, 54, 72, 85, and ~90% highly esterified pectin). Each point represents the mean ($n=3$) \pm standard deviation.

high pH optimum of 10.45 and 10.5 respectively [19]. The highest value of pH 11, was found for pectate lysae of *Bacillus licheniformis* 14A [40].

As far as pH stability analysis was concerned, the purified enzyme was incubated in buffers at various pH values. The pH stability profile showed that Pel-20 was highly stable over a broad range of pH, maintaining 100% of its original activity at pH values

Table 3

Effects of EDTA and metallic ions on Pel-20 stability. Pectate lyase activity measured in the absence of any inhibitor was taken as control (100%). The non-treated and dialyzed enzyme was considered as 100% for metallic ion assay. Residual activity was measured at pH 10.5 at 70 °C.

Inhibitor/metallic ions	Concentration	Residual activity (%) ^a
None	–	100 ± 2.5
EDTA	10 mM	0
Ca ²⁺ (CaCl ₂)	1 mM	306 ± 8.5
Mn ²⁺ (MnCl ₂)	1 mM	268 ± 5.5
Ba ²⁺ (BaCl ₂)	1 mM	216 ± 5.1
Mg ²⁺ (MgCl ₂)	1 mM	226 ± 5.1
Cu ²⁺ (CuCl ₂)	1 mM	51 ± 1.7
Zn ²⁺ (ZnCl ₂)	1 mM	202 ± 4.8
Fe ²⁺ (FeCl ₂)	1 mM	126 ± 3.1
Co ²⁺ (CoCl ₂)	1 mM	180 ± 3.9
Sn ²⁺ (SnCl ₂)	1 mM	90 ± 2.3
Cd ²⁺ (CdCl ₂)	1 mM	0
Hg ²⁺ (HgCl ₂)	1 mM	0
NH ₄ ⁺ (NH ₄ Cl)	1 mM	84 ± 2.1
K ⁺ (KCl)	1 mM	92 ± 2.4
Na ⁺ (NaCl)	1 mM	102 ± 2.5

^a Values represent means of four independent replicates, and ±standard errors are reported.

ranging between 8 and 11 after incubation for 24 h at room temperature (Fig. 3B). The high activity and stability exhibited by Pel-20 enzyme at high pH solutions is, in fact, a very important attribute that provided further support for its potential strong candidacy for future industrial application [11,38–41].

3.7. Effects of temperature on Pel-20 activity and stability

The optimum temperature for pectate lyase activity at pH 10.5 was 60 °C in the absence of CaCl₂ and 70 °C in the presence of 1 mM Ca²⁺, using PGA as a substrate (Fig. 3C). The half-life times of Pel-20 in the absence of any additive were 14, 9, 5, and 1 h at 70, 80, 90, and 100 °C, respectively. The addition of different concentrations of CaCl₂ (0–10 mM) enhanced the thermostability of the enzyme. The maximum thermostability was achieved with 1 mM Ca²⁺. As shown in Fig. 3D, the half-life times of the purified pectate lyase at 70, 80, 90, and 100 °C increased to 18, 12, 7, and 2 h in the presence of 1 mM CaCl₂. Actually, Ca²⁺ was previously reported to improve enzyme activity and stability. Calcium ions have been suggested to be essential for neutralizing the negatively charged uronic acid moiety of the substrate and to likely stabilize an enolate anion intermediate through resonance; which explains why pectin lyases do not need Ca²⁺ as they act on neutral pectin [42]. According to Pickersgill et al., Ca²⁺ binds directly to the enzyme [43]. The activity of the pure enzyme is relatively stable from pH 7.5 to 10.5 [43]. *A. keratinilytica* strain Cpt20 Pel retained 100% activity at 70 °C for at least 18 h [40]. This temperature could sufficiently reduce the risk of contamination and increase the solubility of polymeric substrates and the rate of diffusion as were. Under these conditions, non-enzymatic formation of unsaturated oligomers has never been observed. However, for industrial use, moderately elevated temperatures would be advantageous since, at high temperatures, mixtures of unsaturated oligomers may be generated from pectin substrates with a high degree of esterification, via chemical β-elimination [40,44,45].

These results are in agreement with several studies on thermophilic pectate lyase of *Bacillus* [31–35,38,40] and mesophilic pectinase from *Streptomyces* [15,16,19]. Limited data are, however, currently available on thermophilic actinomycetes producing thermostable pectinase [17,18,21,22].

3.8. Substrate specificity of the Pel-20 enzyme

Pectate lyases can be classified into several types on the basis of their pattern of action and the nature of substrate hydrolyzed [2,7,8,10]. The relative hydrolysis rates of pectin with various degrees of esterification (0, 32, 54, 72, 85, and ~90%) as substrates were investigated to determine the substrate specificity of Pel-20 (Fig. 3E). The results indicated that the Pel-20 enzyme was more active on substrate at 32% of esterification followed by PGA. Furthermore, pectinolytic activity was noted to decrease with the increase in the degree of esterification. In fact, the lowest enzyme activities were observed with highly esterified pectin (85 and ~90%). Most Pels degrade pectin substrates of a low or moderate degree of esterification, but are inactive on highly esterified pectins (~90%). Note worthy, the enzyme of *Bacillus* sp. stain BP-23, which belongs to polysaccharide lyase family 3, is found to be the solely from the Pels enzymes isolated from different species that retains full activity on highly methylated (~90%) citrus pectin [13,44,46].

These results are helpful to classify the secreted Pel-20 enzyme to the superfamily of pectate lyases, similarly to several other pectinases from bacterial origin [10,11,14,23]. Additionally, pectinolytic enzymes from actinomycetes have also shown good correlation between the pectate lyase activity and the degumming effects, resulting in good separation of the bast fiber [4,11].

3.9. Determination of kinetic parameters

Pel-20 exhibited the classical kinetic of Michaelis–Menten with PGA as a substrate. The kinetic parameters Michaelis–Menten constant (K_m) and maximum reaction velocity (V_{max}) values of the Pel-20 enzyme from the *A. keratinilytica* strain Cpt20 were 0.45 mM and 21,700 U/mg, respectively, when PGA was used as the substrate. The deduced turnover number (k_{cat}) and catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) values were 14,467 min⁻¹ and 32,593 min⁻¹ mM⁻¹, respectively.

4. Conclusions

The extracellular pectate lyase from *A. keratinilytica* strain Cpt20 (Pel-20) was purified and biochemically characterized. The results revealed that the enzyme was highly stable and active at high temperature and alkaline pH. Interestingly, Pel-20 presented high pectinolytic activity, and was very effective in pectin degradation, thus offering a potential promising candidate for application in biotechnological processes involving pectin hydrolysis. Under alkaline conditions and high temperatures, defined as the optimal conditions for scouring, methyl esters in pectin are easily hydrolyzed [47]. Hence, pectic substances in cotton fiber which are in a pectate form suitable substrates for pectate lyase. For optimal efficiency the fiber was treated with the enzyme under a temperature above about 70 °C and a pH above 9.5 [47]. The thermoactive pectate lyase from *A. keratinilytica* strain Cpt20 has a high optimum alkaline pH of 10.5. Accordingly, further studies, some of which are currently underway, are needed to investigate the Pel-20 encoding gene, perform site-directed mutagenesis, and determine its structure-function relationships.

Acknowledgments

The authors would like to express their gratitude to Mr. K. Walha (Analysis Unit-CBS) for his technical assistance. Special thanks are also due to Prof. A. Smaoui from the English department at the Sfax Faculty of Science (Sfax University, Tunisia) and Dr. F. Dahdouh from Biology department (Annaba University, Algeria) for

their constructive language editing and polishing services. The authors are also very much grateful to the reviewers for their efforts during the revision of the present manuscript. This work was supported by the Algerian Ministry of High Education and Scientific Research under the National Research Projects “Projet National de Recherche (P.N.R)” No. 231/2011, the Algero-Tunisian project LAD-JAMA/GARGOURI.2012–2015, and the support National Program Outstanding funded by the Fellow Program Residential Training Abroad “Programme National Exceptionnel (P.N.E)” for the benefit of Teachers and Researchers in respect of the academic years 2012–2014.

References

- [1] T. Sakai, T. Sakamoto, J. Hallaert, E.J. Vandamme, Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties, and applications, *Adv. Appl. Microbiol.* 39 (1993) 213–294.
- [2] R.S. Jayani, S. Saxena, R. Gupta, Microbial pectinolytic enzymes: a review, *Process Biochem.* 40 (2005) 2931–2944.
- [3] C. Zhang, J. Yao, C. Zhou, L. Mao, G. Zhang, Y. Ma, The alkaline pectate lyase PEL168 of *Bacillus subtilis* heterologously expressed in *Pichia pastoris* is more stable and efficient for degumming ramie fiber, *BMC Biotechnol.* 13 (2013) 26.
- [4] N. Sharma, M. Rathore, M. Sharma, Microbial pectinase: sources, characterization and applications, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 12 (2013) 45–60.
- [5] N. Hadj-Taieb, M. Ayadi, M. Khlif, K. Mrad, I. Hassairi, A. Gargouri, Fermentor production of pectinases on gruel, a local by-product and their use in olive oil extraction, *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006) 1072–1076.
- [6] N. Hadj-Taieb, N. Grati, M. Ayadi, I. Attia, H. Bensalem, A. Gargouri, Optimisation of olive oil extraction and minor compounds content of Tunisian olive oil using enzymatic formulations during malaxation, *Biochem. Eng. J.* 62 (2012) 79–85.
- [7] D.R. Kashyap, P.K. Vohra, S. Chopra, R. Tewari, Applications of pectinases in the commercial sector: a review, *Bioresour. Technol.* 77 (2001) 215–227.
- [8] G.S. Hoondal, R.P. Tiwari, R. Tewari, N. Dahiya, Q.K. Beg, Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59 (2002) 409–418.
- [9] I. Alkorta, C. Garbisu, M.J. Llama, J.L. Serra, Industrial applications of pectic enzymes: a review, *Process Biochem.* 33 (1998) 21–28.
- [10] S. Ahlawat, R.P. Mandhan, S.S. Dhiman, R. Kumar, J. Sharma, Potential application of alkaline pectinase from *Bacillus subtilis* SS in pulp and paper industry, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 149 (2008) 287–293.
- [11] F. Bruhlmann, K.S. Kim, W. Zimmerman, A. Fiechter, Pectinolytic enzymes from actinomycetes for the degumming of ramie bast fibers, *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1994) 2107–2112.
- [12] N. Damak, N. Hadj-Taieb, E. Bonnin, A. Ben Bacha, A. Gargouri, Purification and biochemical characterization of a novel thermoactive fungal pectate lyase from *Penicillium occitanis*, *Process Biochem.* 46 (2011) 888–893.
- [13] E. Stratilova, O. Markovic, D. Skrovinova, L. Rexova-Benkova, H. Jornvall, Pectinase *Aspergillus* sp. polygalacturonase: multiplicity, divergence, and structural patterns linking fungal, bacterial, and plant polygalacturonases, *J. Protein Chem.* 12 (1993) 15–22.
- [14] T. Kobayashi, K. Koike, T. Yoshimatsu, N. Higaki, A. Suzumatsu, T. Ozawa, Y. Hatada, S. Ito, Purification and properties of a low-molecular-weight, high-alkaline pectate lyase from an alkaliphilic strain of *Bacillus*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63 (1999) 65–72.
- [15] B. Saoudi, A. Ladjama, Screening and isolation of pectate lyase producing *Streptomyces* from Algerian saharian soil, *Biologia (Tunisia)* 4 (2006) 121–122.
- [16] B. Saoudi, D. Kirane, Z. Taibi, M. Kahoul, A. Ladjama, Demonstration of a pectate lyase from *Streptomyces* strains isolated from Saharian soil (Biskra), *Technol. Adv. (Algeria)* 19 (2007) 38–46.
- [17] P. Yuan, K. Meng, P. Shi, H. Luo, H. Huang, T. Tu, P. Yang, B. Yao, An alkaline-active and alkali-stable pectate lyase from *Streptomyces* sp. S27 with potential in textile industry, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39 (2012) 909–915.
- [18] A. Tonouchi, Y. Hara, R. Umehara, T. Sanuki, T. Fukusawa, K. Miyairi, Cloning of the gene encoding an endo-acting pectate lyase from *Streptomyces thermocarboxyidus*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74 (2010) 433–436.
- [19] A. Ladjama, I. Chardon-Loriaux, M.J. Foglietti, On the pectinolytic activity of two *Streptomyces* strains, *FEMS Microbiol. Lett.* 79 (1991) 279–284.
- [20] X. Li, H. Wang, C. Zhou, Y. Ma, J. Li, J. Song, Cloning, expression and characterization of a pectate lyase from *Paenibacillus* sp. 0602 in recombinant *E. coli*, *BMC Biotechnol.* 14 (2014) 18.
- [21] F.J. Stutzenberger, Inducible thermoalkaliphilic polygalacturonate lyase from *Thermomonospora fusca*, *J. Bacteriol.* 169 (1987) 2774–2780.
- [22] R. Craveri, P.L. Manachini, F. Aragozzini, C. Merendi, Amino acid composition of the cell-proteins from mesophilic, thermofacultative and thermophilic actinomycetes, *J. Gen. Microbiol.* 74 (1973) 201–204.
- [23] L. Zheng, Y. Du, J. Zhang, Degumming of ramie fibers by alkaliphilic bacteria and their polysaccharide-degrading enzymes, *Bioresour. Technol.* 78 (2001) 89–94.
- [24] S. Haberra, A. Habbeche, S. Saoudi, B. Kerouaz, S. Slimani, M. Boudelaa, A. Ladjama, Optimization of xylanase production by a newly thermophilic actinomycete strain Cpt29 isolated from poultry compost, *Eur. J. Sci. Res.* 108 (2013) 227–239.
- [25] Z. Taibi, B. Saoudi, M. Boudelaa, H. Trigui, H. Belghith, A. Gargouri, A. Ladjama, Purification and biochemical characterization of a highly thermostable xylanase from *Actinomyces* sp. strain Cpt20 isolated from poultry compost, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166 (2012) 663–679.
- [26] L. Hankin, M. Zucker, D.C. Sands, Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria, *Appl. Microbiol.* 22 (1971) 205–209.
- [27] A. Collmer, J.L. Ried, M.S. Mount, Assay methods for pectic enzymes, *Methods Enzymol.* 161 (1988) 329–335.
- [28] L. Rexova-Benkova, O. Markovic, Pectic enzymes, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 33 (1976) 323–385.
- [29] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [30] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [31] W. Sukhumsirchart, S. Kawanishi, W. Deesukon, K. Chansiri, H. Kawasaki, T. Sakamoto, Purification, characterization, and overexpression of thermophilic pectate lyase of *Bacillus* sp. RN1 isolated from a hot spring in Thailand, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73 (2009) 268–273.
- [32] M. Takao, T. Nakaniwa, K. Yoshikawa, T. Terashita, T. Sakai, Purification and characterization of thermostable pectate lyase with protopectinase activity from the thermophilic *Bacillus* sp. TS 47, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64 (2000) 2360–2367.
- [33] G. Li, L. Rao, Y. Xue, C. Zhou, Y. Zhang, Y. Ma, Cloning, expression, and characterization of a highly active alkaline pectate lyase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5, *J. Microbiol. Biotechnol.* 20 (2010) 670–677.
- [34] B.G. Klug-Santner, W. Schnitzhofer, M. Vrsanska, J. Weber, P.B. Agrawal, V.A. Nierstrasz, G.M. Guebitz, Purification and characterization of a new bioscouring pectate lyase from *Bacillus pumilus* BK2, *J. Biotechnol.* 121 (2006) 390–401.
- [35] W. Nasser, F. Chalet, J. Robert-Baudouy, Purification and characterization of extracellular pectate lyase from *Bacillus subtilis*, *Biochimie* 72 (1990) 689–695.
- [36] S.R. Herron, J.A. Benen, R.D. Scavetta, J. Visser, F. Jurnak, Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of plant pathogens, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 8762–8769.
- [37] A. Mehrnough, M.Z. Sarker, S. Mustafa, A.M. Yazid, Direct purification of pectinase from mango (*Mangifera Indica* Cv:Chokanan) peel using a PEG/salt-based aqueous two phase system, *Molecules* 16 (2011) 8419–8427.
- [38] S. Basu, M.N. Saha, D. Chattopadhyay, K. Chakrabarti, Large-scale degumming of ramie fibre using a newly isolated *Bacillus pumilus* DKS1 with high pectate lyase activity, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36 (2009) 239–245.
- [39] A. Mukhopadhyay, N. Dutta, D. Chattopadhyay, K. Chakrabarti, Degumming of ramie fiber and the production of reducing sugars from waste peels using nanoparticle supplemented pectate lyase, *Bioresour. Technol.* 137 (2013) 202–208.
- [40] S. Basu, M.N. Saha, D. Chattopadhyay, K. Chakrabarti, Degumming and characterization of ramie fibre using pectate lyase from immobilized *Bacillus pumilus* DKS1, *Lett. Appl. Microbiol.* 48 (2009) 593–597.
- [41] F. Bruhlmann, Purification and characterization of an extracellular pectate lyase from an *Amycolata* sp., *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 3580–3585.
- [42] B. Henrissat, S.E. Heffron, M.D. Yoder, S.E. Lietzke, F. Jurnak, Functional implications of structure-based sequence alignment of proteins in the extracellular pectate lyase superfamily, *Plant Physiol.* 107 (1995) 963–976.
- [43] R. Pickersgill, J. Jenkins, G. Harris, W. Nasser, J. Robert-Baudouy, The structure of *Bacillus subtilis* pectate lyase in complex with calcium, *Nat. Struct. Biol.* 1 (1994) 717–723.
- [44] A. Seyedarabi, T.T. To, S. Ali, S. Hussain, M. Fries, R. Madsen, M.H. Clausen, S. Teixeira, K. Brocklehurst, R.W. Pickersgill, Structural insights into substrate specificity and the anti beta-elimination mechanism of pectate lyase, *Biochemistry* 49 (2010) 539–546.
- [45] L.D. Kluskens, G.J. van Alebeek, A.G. Voragen, W.M. de Vos, J. van der Oost, Molecular and biochemical characterization of the thermoactive family 1 pectate lyase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, *Biochem. J.* 370 (2003) 651–659.
- [46] M. Soriano, A. Blanco, P. Diaz, F.I. Pastor, An unusual pectate lyase from a *Bacillus* sp. with high activity on pectin: cloning and characterization, *Microbiology* 146 (pt. 1) (2000) 89–95.
- [47] A.I. Solbak, T.H. Richardson, R.T. McCann, K.A. Kline, F. Bartnek, G. Tomlinson, X. Tan, L. Parra-Gessert, G.J. Frey, M. Podar, P. Luginbuhl, K.A. Gray, E.J. Mathur, D.E. Robertson, M.J. Burk, G.P. Hazlewood, J.M. Short, J. Kerovuo, Discovery of pectin-degrading enzymes and directed evolution of a novel pectate lyase for processing cotton fabric, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 9431–9438.

Purification and Biochemical Characterization of a Highly Thermostable Xylanase from *Actinomadura* sp. Strain Cpt20 Isolated from Poultry Compost

Zina Taibi · Boudjemaa Saoudi · Mokhtar Boudelaa ·
Héla Trigui · Hafedh Belghith · Ali Gargouri ·
Ali Ladjama

Received: 9 May 2011 / Accepted: 9 November 2011 /
Published online: 10 December 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract An extracellular thermostable xylanase from a newly isolated thermophilic *Actinomadura* sp. strain Cpt20 was purified and characterized. Based on matrix-assisted laser desorption–ionization time-of-flight mass spectrometry analysis, the purified enzyme is a monomer with a molecular mass of 20,110.13 Da. The 19 residue N-terminal sequence of the enzyme showed 84% homology with those of actinomycete endoxylanases. The optimum pH and temperature values for xylanase activity were pH 10 and 80 °C, respectively. This xylanase was stable within a pH range of 5–10 and up to a temperature of 90 °C. It showed high thermostability at 60 °C for 5 days and half-life times at 90 °C and 100 °C were 2 and 1 h, respectively. The xylanase was specific for xylans, showing higher specific activity on soluble oat-spelt xylan followed by beechwood xylan. This enzyme obeyed the Michaelis–Menten kinetics, with the K_m and k_{cat} values being 1.55 mg soluble oat-spelt xylan/ml and 388 min⁻¹, respectively. While the xylanase from *Actinomadura* sp. Cpt20 was activated by Mn²⁺, Ca²⁺, and Cu²⁺, it was, strongly inhibited by Hg²⁺, Zn²⁺, and Ba²⁺. These properties make this enzyme a potential candidate for future use in biotechnological applications particularly in the pulp and paper industry.

Keywords *Actinomadura* · Xylan · Xylanase · Purification · MALDI-TOF MS · Thermostability

This work is dedicated to the memory of our colleague Mrs. Zina Taibi, who passed away on July 20th, 2011. May God forgive her and have mercy on her soul.

Z. Taibi · B. Saoudi · M. Boudelaa · A. Ladjama (✉)
Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology, Faculty of Science of Annaba,
Badji Mokhtar-Annaba University, P.O. Box 12, 23000 Annaba, Algeria
e-mail: ladjama_ali@yahoo.fr

H. Trigui · H. Belghith · A. Gargouri
Laboratory of Biomass Valorisation and Production of Proteins in Eukaryotes, Centre of Biotechnology of Sfax, University of Sfax, Road of Sidi Mansour Km 6, P.O. Box 1177, 3018 Sfax, Tunisia

Introduction

Xylan is one of the major polymeric constituents of hemicelluloses in plant cell walls and is the second most prevalent biomass after cellulose in nature [1]. It is a heteropolysaccharide with a linear backbone chain of 1,4-linked β -D-xylopyranose units. The xylan from hardwoods, softwoods, and grasses is a heterogeneous polysaccharide that can be substituted by various residues of *o*-acetyl, arabinosyl, and methylglucuronosyl [2]. In nature, the complete hydrolysis of xylan requires the synergistic action of different xylanolytic enzymes, including endoxylanase, β -xylosidase, and accessory enzymes, such as α -arabinofuranosidase, acetyl esterase, and α -glucuronidase. Among these, endo- β -1,4-xylanase (β -1,4-D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.8) is particularly important to catalyze the hydrolysis of long-chain xylan into short xylooligosaccharides, which are further hydrolyzed to D-xylose by β -1,4-xylosidases (β -D-xyloside xylohydrolase; EC 3.2.1.37) [3, 4].

According to the continually updated carbohydrate-active enzymes database [5], xylanases may belong to glycoside hydrolase (GH) families 5, 7, 8, 10, 11, and 43, based on their physicochemical properties, structure, mode of action, and substrate specificities. Although members of GH families 10 (formerly family F) and 11 (formerly family G) have been studied thoroughly, the catalytic properties of recently discovered members of the rest of the families remain very limited. The GH-11 family is monospecific, consisting of “true xylanases” displaying exclusive specificity toward substrates containing D-xylose. Members of the GH-11 family show lower catalytic versatility compared to GH-10 xylanases, and the products of their action can be further hydrolyzed by GH-10 enzymes [3].

So far, several xylanases have been isolated from different microorganisms, including bacteria (actinomycetes, eubacteria, and archaea), fungi, and yeasts [6–12]. Various xylan-degrading thermotolerant actinomycetes, such as *Actinomadura* [13–15], *Nonomuraea* [16], *Microtetraspora* [17], *Streptomyces* [18, 19], and *Thermomonospora* [20, 21], have been purified and characterized. Some research seem, however, to have paid special attention to xylanases from actinomycete origins particularly because of the promising potential they offer for a wide range of biotechnological applications particularly in the pulp and paper industry [22]. In fact, in order for a xylanase to achieve actual industrial application, it should ideally fulfill a number of specific requirements that are highly desired in the marketplace. Some of these are characteristics that pertain to operational standards, such as alkaline pH, high thermostability, high specific activity, and strong resistance to metal cations and chemicals. Other specifications relate to cost-effectiveness, eco-friendliness, and ease of use.

Despite the large flow of data on xylanases, however, only a few reports have so far dealt with the isolation of xylanases from *Actinomadura*. A few studies report on the purification and characterization of xylanases from *Actinomadura* sp. [13–15]. This is due to the limited potential for industrial application, since the xylanases previously purified from *Actinomadura* species had poor enzyme stability and catalytic activity.

The isolation and screening of microorganisms from naturally occurring alkaline habitats or from alkaline wastewater is expected to provide new valuable strains for the production of active and stable enzymes in highly alkaline conditions. In this paper, we report on the purification to homogeneity and the biochemical characterization of a thermoactive and thermostable alkaline xylanase without cellulase activity from *Actinomadura* sp. strain Cpt20 isolated from poultry compost.

Materials and Methods

Substrates and Chemicals

Birchwood xylan, beechwood xylan, oat-spelt xylan, carboxymethyl cellulose (CMC; low viscosity), *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside, *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, bovine serum albumin (BSA), and 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Sephadex G-75 and Mono Q-Sepharose were from Pharmacia (Pharmacia, Uppsala, Sweden). The protein assay kit was obtained from Bio-Rad Laboratories. All other chemicals used were analytical grade reagents unless otherwise stated.

Isolation and Screening of Thermophilic Xylanase-Producing Actinomycetes

Xylan-degrading actinomycetes were isolated from poultry compost in Annaba, east of Algeria. The sample was subjected to physicochemical pretreatment to facilitate the isolation of thermophilic actinomycetes by inhibiting bacterial growth and preventing the growth of invasive fungi that might form invasive colonies and thus inhibit the growth of thermophilic actinomycetes. This treatment consisted of incubating 1 g of the sample with 0.1 g of CaCO_3 at 55 °C for 5 days. Then 2 g of the sample was suspended in 18 ml of sterile suitably diluted Ringer's solution [composed of (grams per liter): NaCl, 8.6; KCl, 0.3; and $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.33 at pH 7.4]. A series of dilutions, ranging from 10^{-2} to 10^{-5} , were made to reduce the microbial concentration of the stock solution. Two different media, namely International *Streptomyces* Project (ISP) medium 4 [composed of (in grams per liter): starch, 10; glucose, 20; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2; NaCl, 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1; MnCl_2 , 1; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001; and bacteriological agar, 15 at pH 7.2] and starch casein agar medium [containing (grams per liter): starch, 10; casein, 0.3; KNO_3 , 2; NaCl, 2; K_2HPO_4 , 2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05; CaCO_3 , 0.02; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01; and agar, 18 at pH 7.5] supplemented with actidione and nystatin (antifungal) at a concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$ and rifampicin (antibiotic) at a concentration of 0.5 mg/ml, were used for the isolation of actinomycetes. The Petri dishes were incubated at 45 °C for 7–10 days. The Petri plates were observed daily after 3 days of incubation.

The thermophilic isolates of actinomycetes were assayed for their abilities to produce xylanase by incubating them on a modified Nammori solid medium [23] containing (in grams per liter): birchwood xylan, 10; yeast extract, 2; K_2HPO_4 , 1; KH_2PO_4 , 1; NaCl, 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3; MnSO_4 , 1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1; CaCl_2 , 0.5; NH_4Cl , 0.2; and bacteriological agar, 20 at pH 7.6. The plates were incubated for 48 h at 45 °C in order to obtain colonial growth. The plates were stained with Congo red solution [composed of 10 mg/ml Congo red and 5% (v/v) ethanol, filter sterilized] for 15 min and destained with 1 M NaCl. In fact, the Congo red was solubilized in sterilized bidistilled water, and the NaCl 1 M was also autoclaved. Colonies with a yellow zone, indicative of xylan hydrolysis, were counted as xylanase producers. One of the strains, a bacterium called Cpt20, was selected for further experimental work based on its highest xylanase production.

Cultivation of Microorganism and Enzyme Production

Aliquots of 1-ml spore suspensions (10^4 to 10^7 spore/ml) of strain Cpt20 were inoculated in 500-ml baffled Erlenmeyer flasks containing modified ISP₂ liquid medium [composed of

(in grams per liter) birchwood xylan, 4; malt extract, 10; and yeast extract, 4 at pH 7]. The flasks were then incubated at 45 °C for 9 days in an incubator (200 rev/min) on a rotary shaker. After cultivation, the cultures were centrifuged and the cell-free supernatant was used as a crude enzyme preparation.

Identification of Microorganism

Analytical profiling index strip tests and 16S rRNA gene sequencing were carried out for the identification of the genus to which the strain belongs. API 50 CH and API ZYM strips (bioMérieux, SA, Marcy-l'Etoile, France) were used to investigate the physiological and biochemical characteristics of strain Cpt20 in accordance with the instructions of the manufacturer. The 16S rRNA gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using two universal primers: forward primer, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', and reverse primer, 5'-AAGGAGGTGATCCAAGCC-3', designed from base positions 8 to 27 and 1,541 to 1,525, respectively. These are the conserved zones within the rRNA operon of *Escherichia coli* [24]. Genomic DNA of strain Cpt20 was used as a template for PCR amplification (40 cycle, 94 °C for 30 s denaturation, 65 °C for 1 min primer annealing, and 72 °C for 2 min extension). The amplified ~1.5-kb PCR product was cloned in the pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA), leading to plasmid pALI-16S plasmid (this study). The *E. coli* DH5 α (F⁻ *supE44* Φ 80 δ *lacZ* Δ *M15* Δ (*lacZYA-argF*) *U169 endA1 recA1 hsdR17* (*r_k⁻*, *m_k⁺*) *deoR thi-1 λ ⁻ gyrA96 relA1*) (Invitrogen Life Technologies) was used as a host strain. All recombinant clones of *E. coli* were grown in LB broth media with the addition of ampicillin, isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, and X-gal for screening. DNA electrophoresis, DNA purification, restriction, ligation, and transformation were all performed according to the method previously described by Sambrook et al. [25].

DNA Sequencing, Phylogenetic Analyses, and Nucleotide Sequence Accession Number

The nucleotide sequence of 16S rRNA gene was determined on both strands using the BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and the automated DNA sequencer ABI Prism[®] 3100-Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems). The 16S rDNA sequence analysis was performed by means of the BLAST program (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted via the molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.1. Distances and clustering were calculated using the neighbor-joining method. Bootstrap analysis was used to evaluate the tree topology of the neighbor-joining data by performing 100 resamplings [26]. The 16S rRNA gene sequence of strain Cpt20 has been deposited in GenBank under the accession number of GQ205433.

Xylanase Activity Assays

Xylanase activity was determined by measuring the release of reducing sugar from soluble xylan using the DNS method described by Miller [27]. Unless stated otherwise, 0.9 ml buffer A (10 mg/ml birchwood xylan in 50 mM glycine–NaOH buffer supplemented with 1 mM MnSO₄ at pH 10) were mixed with 0.1 ml enzyme solution (1 mg/ml). After incubation at 100 °C for 10 min, the reaction was terminated by adding 1.5 ml of the DNS reagent [8]. The mixture was then boiled for 5 min and cooled at room temperature, and the absorption at 540 nm was measured. Each reaction and its control were run in triplicate.

The absorbance of the reference samples (substrate solution incubated without enzyme and diluted enzyme solution in buffer) was deduced from the values of the test samples. One unit of xylanase activity was defined as the amount of enzyme that released 1 μmol of reducing sugar equivalent to xylose per minute under the assay conditions. Specific activity was then expressed as units per milligram of protein. Cellulase activity was assayed as above using low-viscosity CMC at 10 mg/ml instead of xylan.

Enzyme Purification

Purification was conducted at temperatures not exceeding 4 °C. Five hundred milliliters of a 4-day culture of *Actinomadura* sp. strain Cpt20 was centrifuged for 45 min at 10,000 $\times g$ to remove microbial cells. The supernatant was incubated for 1 h at 60 °C, and insoluble material was removed by centrifugation at 10,000 $\times g$ for 30 min. The clear supernatant was precipitated with ammonium sulfate at a concentration between 35% and 55%. The precipitate was then recovered by centrifugation at 10,000 $\times g$ for 30 min, resuspended in a minimal volume of buffer A containing 25 mM NaCl (buffer B). The sample was subsequently dialyzed overnight against repeated changes of buffer B. Insoluble material was removed by centrifugation at 10,000 $\times g$ for 30 min. The supernatant was loaded on a 3 \times 100-cm Sephadex G-75 column equilibrated with buffer B. The elution of xylanase was performed with the same buffer at a rate of 60 ml/h. The fractions containing xylanase activity (eluted between 1.7 and 2.2 void volumes) were pooled. Next, the pooled fractions were applied to a Mono Q-Sepharose column equilibrated in buffer B. The column (2.6 \times 20 cm) was rinsed with 500 ml of the same buffer. Adsorbed material was eluted with a linear NaCl gradient (0 to 0.4 M in buffer A) at a rate of 45 ml/h. Xylanase activity was eluted between 0.15 and 0.2 M NaCl. The pooled fractions containing xylanolytic activity were concentrated in centrifugal micro-concentrators (Amicon Inc.) with 10-kDa cutoff membranes and stored at -20 °C in a 20% glycerol (*v/v*) solution.

Electrophoresis, Protein Determination, Mass Spectrometry, and Zymogram Analysis

Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) was performed as described by Laemmli [28] on a discontinuous buffer system using a Mini-Protean II electrophoresis unit (Bio-Rad). The resolving gel was composed of 0.375 M Tris–HCl buffer, pH 8.8, acrylamide-bis [total acrylamide (*T*) 15%, cross-linking (*C*) 2.7%], 10% (*w/v*) SDS, and glycerol. The stacking gel consisted of 0.125 M Tris–HCl, pH 6.8, acrylamide-bis (*T* 4%, *C* 2.7%), and 10% (*w/v*) SDS. The reservoir buffer (pH 8.3) contained 25 mM Tris and 192 mM glycine. Enzyme samples (20 μg) were loaded along with sample buffer [0.08 M Tris–HCl, pH 6.8, 10% (*w/v*) SDS, 12.5% (*v/v*) glycerol, 0.002% (*v/v*) bromophenol blue] and 2-mercaptoethanol (2-ME) in the ratio 50:1,000 to sample buffer. The samples were boiled at 100 °C for 5 min and centrifuged for 5 min at 14,000 $\times g$ prior to loading. Separations were carried out at 15 mA in the stacking gel and at 25 mA in the resolving gel. Electrophoresis was stopped when the bromophenol blue tracking dye reached the bottom of the resolving gel. The gel was stained with Coomassie brilliant blue R-250 in 50% trichloroacetic acid and destained in 7% acetic acid [methanol/acetic/water, 227:37:236 (*v/v/v*)]. Unstained protein molecular weight markers (Fermentas) were used as standards: β -galactosidase, 116.0 kDa; BSA, 66.2 kDa; ovalbumin, 45.0 kDa; lactate dehydrogenase, 35.0 kDa; REase Bsp981, 25.0 kDa; β -lactoglobulin, 18.4 kDa; and lysozyme, 14.4 kDa.

Protein concentration was determined spectrophotometrically at 595 nm using the DC protein assay kit obtained from Bio-Rad (Hercules, CA, USA) based on the method of Bradford [29] with BSA as a standard. The molecular mass of the purified xylanase was analyzed, in the linear mode, with matrix-assisted laser desorption–ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry using a Voyager DE-RP instrument (Applied Biosystems/PerSeptive Biosystems, Inc., Framingham, MA, USA). The data were collected by a Tektronix TDS 520 numeric oscilloscope and analyzed using the GRAMS/386 software (Galactic Industries Corporation, Salem, NH, USA).

Zymography for xylanase was carried out using SDS–PAGE electrophoresis as described by Kubata et al. [30]. After proteins (20 µg) were separated by SDS–PAGE, the gel was incubated in a renaturation buffer (buffer A) for 1 h at 60 °C with gentle shaking. The treated gel was then overlaid on a pre-cast 5-mg/ml agar gel containing 5-mg/ml birchwood xylan in buffer A. The agar plates were then incubated for 10 min at room temperature. After incubation, the polyacrylamide gel was removed while the agar gel was immersed in 20 mg/ml Congo red dye for 30 min and washed with 1 M NaCl solution to visualize zones of clearance corresponding to xylanase activity.

Amino Acid Sequencing

Bands of purified xylanase were separated on SDS gels and transferred to a ProBlott membrane, and N-terminal sequence analysis was performed by automated Edman's degradation using an Applied Biosystem Model 473A gas-phase sequencer [31]. The sequence was compared with those in the Swiss-Prot/TrEMBL database using a BLAST homology search.

Determination of pH Optimum and Stability

The effect of pH was determined using birchwood xylan as substrate. Xylanase activity was assayed for 10 min over a range of pH 2–13 at 70 °C. The pH stability was determined by pre-incubating the purified xylanase in buffers of different pH values in the range of 3–11 for 24 h at room temperature. Aliquots were then withdrawn and the residual enzymatic activity was determined as described in the xylanase activity assay. The following buffer systems, supplemented with 1 mM MnSO₄, were used at 50 mM: glycine–HCl for pH 2–4.5, MES for pH 4–6, HEPES for pH 6–8, Tris–HCl for pH 8–10, glycine–NaOH for pH 9–11, bicarbonate–NaOH for pH 10.5–12, Na₂HPO₄–NaOH for pH 11–12.5, and KCl–NaOH for pH 12–13.

Determination of Optimum Temperature and Thermostability

The effect of temperature on xylanase activity was examined at 30–100 °C for 10 min at pH 10. In order to monitor thermostability, buffered samples of the purified enzyme were incubated for 12 h at 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C, and 100 °C (50 mM glycine–NaOH buffer, pH 10) in the presence and absence of 1 mM MnSO₄. Aliquots were withdrawn at timed intervals and cooled on ice before being assayed to determine the residual enzyme activity under standard conditions. The non-heated enzyme, which was cooled on ice, was considered as control (100%).

Effect of Metallic Ions and Enzyme Inhibitors on Xylanase Activity

The enzyme was incubated with 10 mM solution of either Mn²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Ba²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Ag⁺, Mg²⁺, or Hg²⁺ and nonmetallic reagents, such as ethylenediaminetetraacetic acid

(EDTA), ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)- N,N,N',N' -tetraacetic acid (EGTA), dithiothreitol (DTT), 2-ME, and SDS for 1 h at room temperature (25 ± 2 °C). The activity was expressed as a percentage of the activity level in the absence of metallic ions or inhibitor. Xylanase activity measured in the absence of any compound was taken as control (100%). Residual activity was measured using the enzyme assay described above.

Substrate Specificity and Kinetic Measurements

Substrate specificity was studied using different natural and synthetic substrates. Enzymatic reactions were carried out in buffer A containing 10 mg/ml of each substrate at 80 °C for 10 min. The amount of reducing sugars produced was estimated using the DNS method as described above. Activities toward *p*-nitrophenyl derivatives were measured by the rate of *p*-nitrophenol formed from 1 mM of the substrates in buffer A at 80 °C for 10 min during hydrolysis and detected by spectrophotometry at 410 nm. One unit of activity was defined as the amount of enzyme releasing 1 μ mol of reducing sugar or *p*-nitrophenol per minute under the above conditions. The effect of soluble oat-spelt xylan concentrations, ranging from 0.20 to 20 mg/ml, on xylanase activity was evaluated under the assay conditions. Each assay was carried out in triplicate. Kinetic constants (K_m and V_{max}) values were calculated using Hyper32 software package developed at Liverpool University (<http://homepage.ntlworld.com/john.easterby/hyper32.html>). The value of the turnover number (k_{cat}) was calculated from the following equation: $k_{cat} = V_{max}/[E]$, where $[E]$ is the active enzyme concentration and V_{max} is the maximal velocity.

Results and Discussion

Screening of Thermophilic Xylan-Degrading Actinomycetes

The colonies of actinomycetes were recovered from different Petri dishes. Actinomycetes are recognized by their characteristic morphological aspect. The colonies appear dry, rough, colored, or not, adhering to the medium and present anaerian and vegetative mycelium. The ratio of the clear zone diameter and that of the colony served as an index for the selection of strains with high xylanase production. Isolates Cpt8, Cpt20, and Cpt29 exhibited a ratio higher than 2, with the highest ratio being 4. Among them, strain Cpt20 displayed the highest extracellular xylanase activity (about 75 U/ml) after 4 days of incubation in an optimized medium [consisting of (in grams per liter): birchwood xylan, 4; malt extract, 10; and yeast extract, 4 (pH 7)] and was, therefore, retained for all subsequent studies. The xylanase activity measured for strain Cpt20 (75 U/ml) was higher than those previously reported for most other actinomycetes (Table 1). The large variations in enzyme activities observed between the different organisms in Table 1 are mainly as a result of cultivation conditions, enzyme preparation, as well as the assay method used.

Identification and Molecular Phylogeny of the Microorganism

The physiological and biochemical characteristics of isolate Cpt20 presented in the current study were investigated according to the well-established protocols and criteria described in the *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* as well as the API 50 CH and API ZYM galleries for representative strains. The findings indicated that the isolate was an endospore-forming, Gram-positive, filamentous, catalase- and oxidase-positive,

Table 1 Xylanase activity recorded in some actinomycetes

Organism	Substrate	Cultivation conditions	Xylanase activity (U/ml)	Reference
<i>Actinomadura</i> sp. Cpt20	Birchwood xylan, 10 g/l	Shake flask, 45 °C, pH 7, 4 days	75	This work
<i>Actinomadura</i> sp. S14	Corn cob, 10 g/l	Shake flask, 55 °C, pH 7, 5 days	26.7	[13]
<i>Jonesia denitrificans</i> BN13	Birchwood xylan, 7 g/l	4 l fermentation, 37 °C, pH 7, 2 days	10.80	[32]
<i>Streptomyces</i> sp. AMT-3	Birchwood xylan, 10 g/l	Shake flask, 30 °C, pH 7, 10 days	10.30	[33]
<i>Streptomyces</i> sp. QG11-3	Birchwood xylan, 10 g/l	Shake flask, 37 °C, pH 8, 5 days	7.50	[22]
<i>Streptomyces malaysiensis</i>	Birchwood xylan, 10 g/l	Shake flask, 30 °C, pH 7, 6 days	11.90	[34]
<i>Streptomyces</i> sp. Ab106	Xylan, 10 g/l	4 l fermentation, 55 °C, pH 7, 10 days	8	[35]
<i>Streptomyces cyaneus</i> SN32	Birchwood xylan, 10 g/l	Shake flask, 42 °C, pH 9, 2 days	716	[19]

motile, and aerobic rod-shaped bacterium. The carbohydrate utilization profile of the isolate was also investigated using API 50 CH strips. The results indicated that while the microorganism could utilize glucose, maltose, D-fructose, galactose, *myo*-inositol, sucrose, D-ribose, and L-rhamnose, it could not utilize L-arabinose, mannitol, raffinose, erythritol, adonitol, and melibiose. The outcome from the API ZYM tests revealed that while the activities exhibited by strain Cpt20 for esterase (C4), lipase (C14), cystine arylamidase, leucine arylamidase, and alkaline phosphatase were positive, those exhibited for trypsin, α -chymotrypsin, *N*-acetyl- α -glucosaminidase, β -glucuronidase, α -mannosidase, and α -fucosidase were negative. All the data obtained with regard to the physiological and biochemical properties of the isolate, therefore, strongly confirmed that strain Cpt20 belonged to the *Actinomadura* genus.

The 16S rRNA gene sequence obtained was submitted to GenBank BLAST search analyses, which yielded a strong homology of up to 98% with those of several cultivated strains of *Actinomadura*. The nearest *Actinomadura* strains identified by the BLAST analysis were *Actinomadura keratinilytica* WCC-2265^T (accession no. EU637009), *Actinomadura rubrobrunea* DSM 43750^T (accession no. EU637008), and *Actinomadura viridilutea* IFO 14480^T (accession no. D86943). Those sequences were imported into MEGA software and aligned. A phylogenetic tree was then constructed (Fig. 1), and the findings further confirmed that the strain Cpt20 (accession no. GQ205433) was closely related to those of the *Actinomadura* strains. In short, all the results obtained strongly suggested that this isolate be assigned as *Actinomadura* sp. strain Cpt20.

Purification of the Xylanase from *Actinomadura* sp. Cpt20

Figure 2a presents the protein elution profile obtained at the final step of purification and shows that the xylanase was eluted at 0.15–0.2 M NaCl. The purity of the enzyme was estimated to be about 89-fold greater than that of the crude extract (Table 2). The purified enzyme preparation contained about 19% of the total activity of the crude and, using birchwood xylan as substrate, showed a specific activity of 570 U/mg. The SDS-PAGE analysis of the pooled fractions showed one band corresponding to an apparent molecular

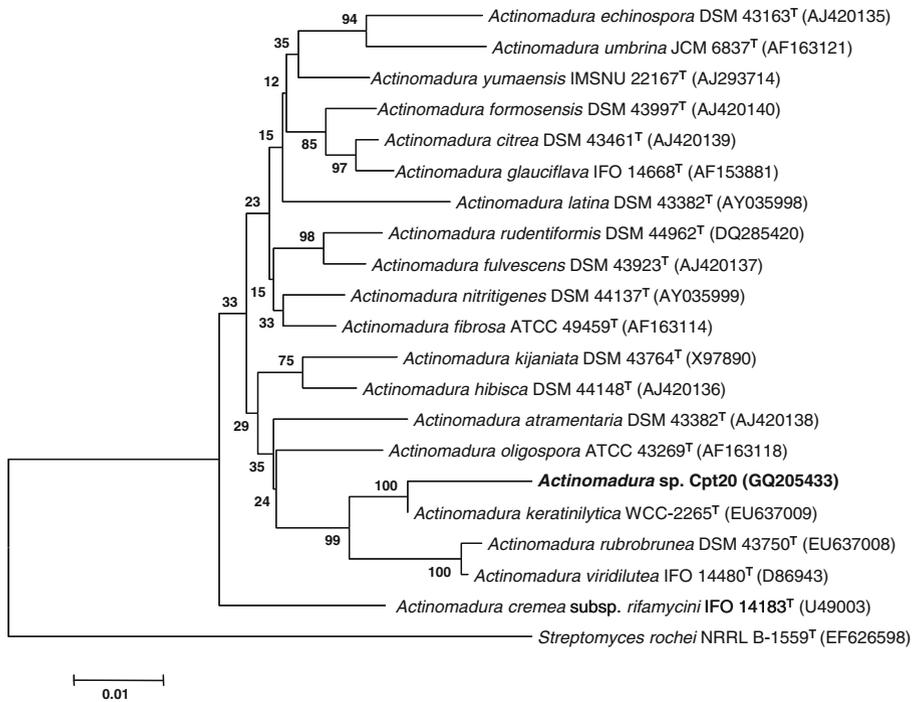


Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of strain Cpt20 within the radiation of the genus *Actinomadura*. The sequence of *Streptomyces rochei* NRRL B-1559^T was chosen arbitrarily as an outgroup. Bar, 0.01-nt substitutions per base. Numbers at nodes (>50%) indicate support for the internal branches within the tree obtained by bootstrap analysis (percentages of 100 bootstraps). NCBI accession numbers are presented in *parentheses*

mass of approximately 20 kDa (Fig. 2b). A similar result was obtained when the xylanase from *Actinomadura* sp. Cpt20 was denatured by SDS in the absence of DTT or 2-ME (data not shown). The exact molecular mass of the purified xylanase from *Actinomadura* sp. Cpt20 was confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry as being 20,110.13 Da. Zymogram activity staining revealed one zone of xylanase activity for the crude extract (data not shown) and purified sample (Fig. 2c) co-migrating with proteins of a molecular mass of 20 kDa. A xylanase having such a low molecular mass would be highly valued in pulp bleaching, since smaller enzymes can access the fiber wall structure more readily and alter the pulp properties more efficiently [36]. These observations presumably suggested that the xylanase from *Actinomadura* sp. Cpt20 was a monomeric protein comparable to those previously reported for other xylanases [13, 37, 38].

N-Terminal Amino Acid Sequence

The 19 N-terminal amino acid residues were determined to be ATTITTNTQGYNGMYYPW. This sequence showed uniformity, indicating that it was isolated in a pure form. The N-terminal sequence of the xylanase from *Actinomadura* sp. Cpt20 was compared to other enzyme sequences using BLASTP (NCBI, NIH, USA) and was found to share the greatest similarity only with endo-1, 4- β -xylanases belonging to GH-11 family, particularly those from *Streptomyces roseiscleroticus* (84% of identity) and *Actinosynnema mirum* (76% of identity)

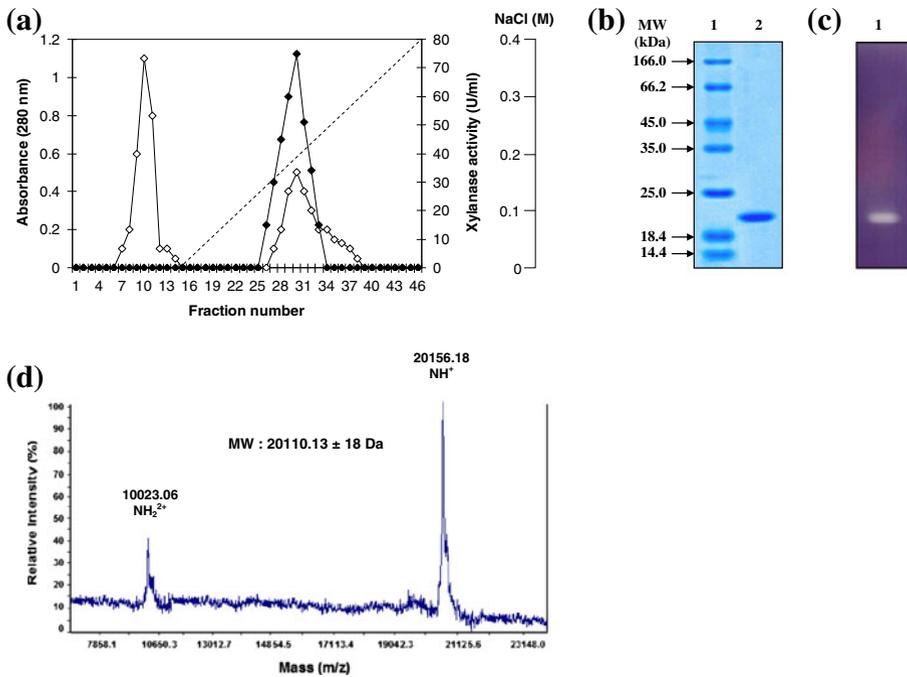


Fig. 2 Chromatography of the xylanase from *Actinomadura* sp. Cpt20 on Mono Q-Sepharose. The column (2.6×20 cm) was equilibrated with buffer B. Adsorbed material was eluted with a linear NaCl gradient (0 to 0.4 M in buffer B) at a flow rate of 45 ml/h and assayed for protein content at 280 nm (open diamond) and xylanase activity (closed diamond) as described in “Materials and Methods” section of the purified xylanase. Lane 1 protein markers, using low molecular weight markers (Fermentas). Lane 2 20 µg of purified xylanase from *Actinomadura* sp. Cpt20 (b). Zymogram of the purified xylanase from *Actinomadura* sp. Cpt20. Lane 1 15 U of purified xylanase (c). MALDI-TOF spectrum of 15 pmol purified xylanase from *Actinomadura* sp. Cpt20. The mass spectrum shows a series of multiply protonated molecular ions. The molecular mass of the enzyme was found to be 20,110.13 Da (d)

(Table 3). This sequence was absent in all known GH families and could therefore be considered as a signature for the GH-11 family. Thus, it was reasonable to deduce that the xylanase from *Actinomadura* sp. Cpt20 should belong to GH-11 family.

Table 2 Flow sheet of xylanase purification

Purification step ^a	Total activity (units) ^{b,c}	Total protein (mg) ^b	Specific activity (U/mg of protein) ^b	Activity recovery rate (%)	Purification factor (fold)
Crude extract	37,500±4,210	5,854±97	6.40±1.11	100	1
Heat treatment (1 h at 60 °C)	31,875±3,860	566±37	56.31±3.58	85	8.79
(NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation (35–55%)	26,625±2,740	165±9	161.36±6.44	71	25.21
Sephadex G-75	16,500±1,520	47±2	351.06±35.5	44	54.85
Mono Q-Sepharose	7,125±0,610	12.5±1	570±46	19	89.06

^a All operations were carried out at 4 °C

^b The experiments were conducted three times and ± standard errors are reported

^c From 500 ml of a 4-day culture of *Actinomadura* sp. strain Cpt20

Table 3 Alignment of the N-terminal amino acid sequence of the purified xylanase from *Actinomadura* sp. Cpt20 with the sequences of other xylanases

Enzyme ^a	N-terminal amino acid ^b	Identity (%)
Endo-1, 4- β -xylanase from <i>Actinomadura</i> sp. Cpt20 [N-terminal; 19 amino acids] (this work)	ATTITTNTQGYNGMYYPW	100
Endo-1, 4- β -xylanase from <i>Streptomyces roseiscleroticus</i> [N-terminal; 31 amino acids; (A57001)]	ATTITTNTQGYDGMYYSF	84
Endo-1, 4- β -xylanase precursor from <i>Streptomyces</i> sp. EC3 [240 amino acids; (X81045)]	ATTITTNTQGYDGMYYSF	84
Endo-1, 4- β -xylanase precursor from <i>Actinosynnema mirum</i> ATCC 29888 [233 amino acids (CP001630)]	AQTITTNTGTGTHNGYYFSF	76

^a Amino acid sequences for comparison were obtained using the BLASTP (NCBI, NIH, USA) program database. The GenBank accession number is in parentheses

^b Residues not identical with the xylanase from *Actinomadura* sp. Cpt20 are italicized

The Effect of Potential Inhibitors or Activators on the Purified Xylanase

Various cations and compounds were assayed at a concentration of 10 mM to investigate their effects on xylanase activity (Table 4). Xylanase activity was inhibited by chelating reagents like EDTA and EGTA and by disulfide-reducing agents 2-ME and DTT, which suggests that disulfide bonds are essential to maintain the active conformation of the xylanase from *Actinomadura* sp. Cpt20. While the xylanase activity was strongly inhibited by Hg²⁺, Zn²⁺, Ba²⁺, and SDS, it was moderately inhibited by Fe²⁺, Mg²⁺, and Ag⁺. The enzyme was, on the other hand, activated by Mn²⁺, Ca²⁺, and Cu²⁺ and noted to undergo no significant inhibition in the presence of Co²⁺.

Table 4 Effect of various reagents on the xylanase from *Actinomadura* sp. strain Cpt20

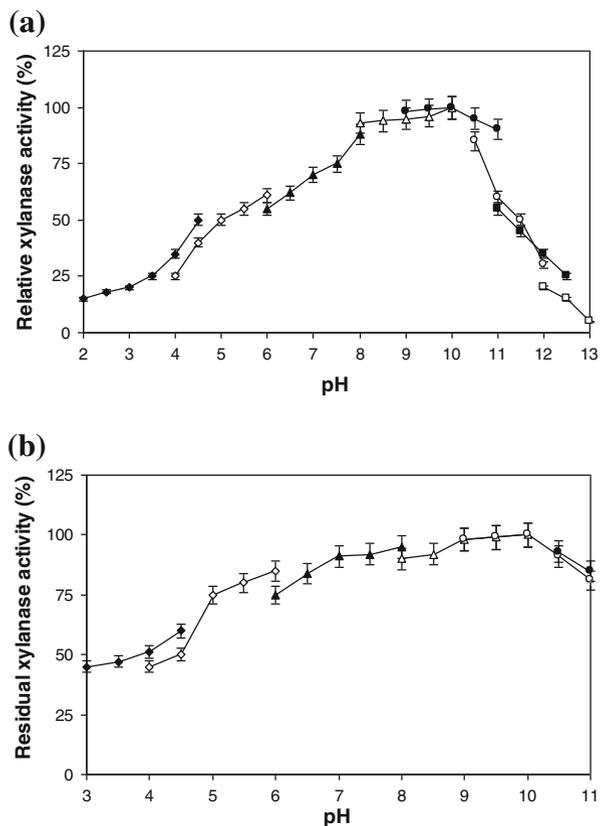
Reagents (at 10 mM)	Specific activity (U/mg of protein)	Relative activity (%) ^a
None	570±46	100
Mn ²⁺ (MnSO ₄)	910±71	159
Ca ²⁺ (CaCl ₂)	715±55	125
Mg ²⁺ (MgSO ₄)	400±21	70
Cu ²⁺ (CuSO ₄)	675±50	118
Zn ²⁺ (ZnSO ₄)	63±10	11
Co ²⁺ (CoSO ₄)	570±46	100
Ba ²⁺ (BaSO ₄)	92±10	16
Fe ²⁺ (FeSO ₄)	375±15	65
Ag ⁺ (AgNO ₃)	419±21	73
Hg ²⁺ (HgCl ₂)	18±05	3
2-ME	414±20	72
DTT	390±18	68
SDS	211±12	37
EDTA	460±31	80
EGTA	425±21	74

^a The values represent the mean of three replicates and standard errors are reported

Effect of pH on Xylanase Activity and Stability

Enzyme activity is markedly affected by pH. This is because substrate binding and catalysis are often dependent on charge distribution of both substrate and particularly enzyme molecules. Most of the xylanases so far reported had an optimum pH between 5 and 8 [9]. The purified xylanase from *Actinomadura* sp. strain Cpt20 showed an optimal pH of 10 (Fig. 3a). The purified xylanase from *Actinomadura* sp. strain Cpt20 showed enzyme stability over a broad pH range of 5–12 at 70 °C and retained more than 60% of its activity (Fig. 3a). The optimum pH range was at 6–11, with a maximum activity at pH 10. This xylanase was, therefore, an alkaline enzyme. It should also be mentioned that the buffer composition had an important effect on the xylanase activity. The enzyme from *Actinomadura* sp. strain Cpt20 displayed about 90% of its optimal activity at pH 11 in a glycine–NaOH buffer, and it showed only 60% of activity in bicarbonate–NaOH buffer. Similar effect of buffer composition was reported for other xylanases [19, 39, 40]. Interestingly, the findings pertaining to pH stability showed that the enzyme retained more than 75% of its activity after being incubated for 24 h at different pH values ranging between 5 and 10 (Fig. 3b). Its residual activity was almost 35% at pH 4 and pH 12. These findings are in agreement with those previously reported for xylanases isolated from several thermophilic actinomycetes, such as *Actinomadura* sp. S14 and *Actinomadura* sp. FC7

Fig. 3 Effect of pH on the activity (a) and stability (b) of the purified xylanase from *Actinomadura* sp. Cpt20. Xylanase activity was evaluated in the pH range of 2–13 at 70 °C using buffers of different pH values with birchwood xylan. The pH stability of the enzyme was determined by incubating the xylanase in different buffers from 3 to 11 for 24 h at room temperature, and the residual activity was measured under the standard assay procedure. The activity of the enzyme before incubation was taken as 100%. Buffer used: glycine–HCl (closed diamond), MES (open diamond), HEPES (closed triangle), Tris–HCl (open triangle), glycine–NaOH (closed circle), bicarbonate–NaOH (open circle), Na₂HPO₄–NaOH (closed square), and KCl–NaOH (open square)



strains, which were stable over a wide pH range [13–15]. Therefore, the tolerance to a broad pH range, especially to alkaline and high-temperature conditions, exhibited by the xylanase from *Actinomadura* sp. strain Cpt20 is promising with regard to future industrial applications.

Effect of Temperature on Xylanase Activity and Stability

The optimum temperature for xylanase activity at pH 10 was 70 °C in the absence of MnSO_4 and 80 °C in the presence of 1 mM Mn^{2+} , using birchwood xylan as substrate (Fig. 4a). The optimal temperature of the xylanase from *Actinomadura* sp. Cpt20 was similar to those of other previously reported xylanases [13, 36]. The xylanase presented in the current investigation retained 100% of its activity after incubation at 60 °C for 5 days (Fig. 4b). The half-life of the xylanase from *Actinomadura* sp. Cpt20 in the absence of any of the additive used were 6, 4, 2, and 1 h at 70 °C, 80 °C, 90 °C, and 100 °C, respectively. The addition of different concentrations of MnSO_4 (1 to 10 mM) was observed to enhance the thermostability of the enzyme. The maximal thermostability was achieved with 1 mM Mn^{2+} . As shown in Fig. 4b, the half-life of the purified xylanase at 70 °C, 80 °C, 90 °C, and 100 °C increased to 7, 5, 3, and 2 h in the presence of 1 mM MnSO_4 . The thermostability exhibited by the xylanase from *Actinomadura* sp. Cpt20 was higher than those of the GH-11 family xylanases from *Actinomadura* sp. S14 [13], *Streptomyces olivaceoviridis* A1 [38], *Nesterenkonia xinjiangensis* CCTCC AA001025 [41], and *Sporotrichum thermophile* (StXyn1) [42]. Enzyme activity and stability were previously reported to be enhanced by Mn^{2+} [32, 43]. The improvement of enzyme thermostability against thermal inactivation in the presence of MnSO_4 could be attributed to the strengthening of interactions inside the protein molecules and to the binding of Mn^{2+} to the autolysis site. These findings further indicate that the enzyme presented here exhibits a number of attractive and promising features that make it a strong candidate for future potential industrial applications.

Substrate Specificity and Determination of Kinetic Parameters of the Xylanase

The hydrolytic activity of the purified xylanase with regard to various natural and artificial substrates was investigated (Table 5). The findings revealed that the enzyme showed high specificity toward several of the xylans tested, with the highest activity being observed with soluble oat-spelt xylan, followed by beechwood xylan. However, it did not show any activity toward filter paper, CMC, *p*NP- β -D-xylopyranoside, and *p*NP- β -D-glucopyranoside. Moreover, the findings indicated that the xylanase from *Actinomadura* sp. Cpt20 displayed the classical Michaelis–Menten kinetics for the soluble oat-spelt xylan used as substrate. The kinetic parameters Michaelis–Menten constant (K_m) and maximal reaction velocity (V_{\max}) values of the xylanase from *Actinomadura* sp. strain Cpt20 were 1.55 mg/ml and 781.71 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, respectively, using oat-spelt xylan as the substrate (Fig. 5). The deduced turnover number (k_{cat}) and catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) were found to be 388 min^{-1} and 250.32 $\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$, respectively.

Overall, the results indicated that the xylanase isolated and purified from *Actinomadura* sp. strain Cpt20 was a true xylanase. In fact, most of the xylanases previously investigated in the literature were reported to display both xylanase and low cellulase activities [44]. Interestingly, the xylanase from *Actinomadura* sp. Cpt20 was noted to hydrolyze only xylan and to be free from all the activities of the other enzymes investigated, including those of carboxymethyl cellulase, β -xylosidase, and β -glucosidase (Table 5). Based on this

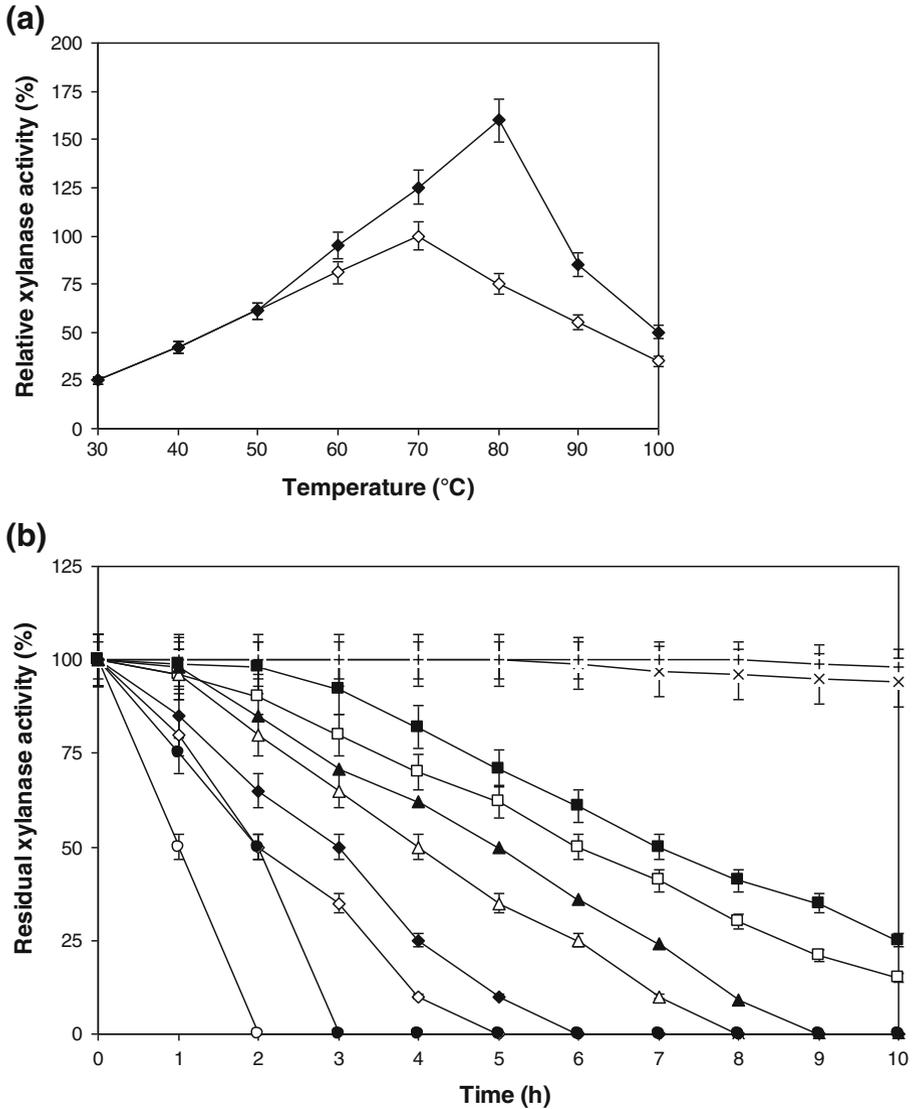


Fig. 4 Effect of temperature on the activity and stability of the purified xylanase from *Actinomadura* sp. Cpt20. The temperature profiles were determined by assaying xylanase activity at temperatures between 30 °C and 100 °C in the absence (*open diamond*) or presence (*closed diamond*) of 1 mM MnSO₄. The activity of the enzyme at 80 °C in the absence of MnSO₄ was taken as 100% (a). The thermostability of the xylanase from *Actinomadura* sp. Cpt20 was examined by incubating the enzyme in the absence or presence of MnSO₄ at various temperatures: 60 °C without 1 mM Mn²⁺ (*multiplication symbol*), 60 °C with 1 mM Mn²⁺ (*plus sign*), 70 °C without Mn²⁺ (*open square*), 70 °C with 1 mM Mn²⁺ (*closed square*), 80 °C without Mn²⁺ (*open triangle*), 80 °C with 1 mM Mn²⁺ (*closed triangle*), 90 °C without 1 mM Mn²⁺ (*open diamond*), 90 °C with 1 mM Mn²⁺ (*closed diamond*), 100 °C without 1 mM Mn²⁺ (*open circle*), and 100 °C with 1 mM Mn²⁺ (*closed circle*). Aliquots were withdrawn at desired time intervals to test the remaining activity at standard conditions. The activity of the non-heated enzyme to which 1 mM EGTA was added was considered as 100% (b). Each point represents the mean ($n=3$)±standard deviation

Table 5 Substrate specificity of the xylanase from *Actinomadura* sp. strain Cpt20

Substrate	Specific activity (U/mg of protein)	Relative activity (%) ^a
Birchwood xylan	570±46	100
Beechwood xylan	712±58	125
Oat-spelt xylan	627±51	110
Soluble oat-spelt xylan	770±60	135
Insoluble oat-spelt xylan	589±48	105
Wheat bran xylan	600±50	80
Filter paper	0	0
CMC	0	0
pNP-β-D-xylopyranoside	0	0
pNP-β-D-glucoxyranoside	0	0

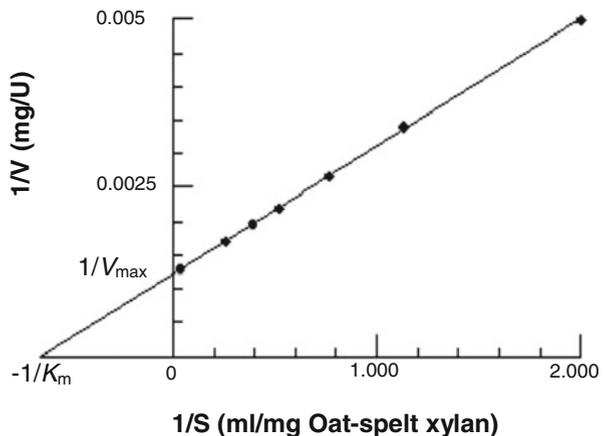
^aThe activity for birchwood xylan was defined as 100%. The results are expressed in mean±standard errors from three separate experiments

result, the xylanase of *Actinomadura* sp. strain Cpt20 can be inferred to belong to the GH-11 family; the xylanases of this family have no activity on cellulose and are low molecular mass enzymes [45]. This property of xylanase is highly valued by several industrial applications and processes, particularly those pertaining to the biobleaching of paper.

Conclusion

In this study, we isolated and characterized a strain of actinomycete capable of producing a thermoactive and thermostable xylanase without cellulase activity. According to the morphology and comparison of 16 rDNA gene sequence, strain Cpt20 was identified as a strain of *Actinomadura* sp. and named as *Actinomadura* sp. strain Cpt20. The time course for xylanase accumulation by the *Actinomadura* sp. strain Cpt20 in submerged fermentation showed that the highest xylanase activity reached 75 U/ml in an optimized medium with birchwood xylan used as a substrate after 96 h of cultivation. The optimal pH and temperature for the purified 20-kDa xylanase were pH 10 and 80 °C, respectively. Overall,

Fig. 5 Double reciprocal plot of the purified xylanase from *Actinomadura* sp. strain Cpt20. Xylanase activity was measured in 50 mM glycine–NaOH buffer (pH 10) at 100 °C for 10 min using oat-spelt xylan as the substrate



the findings indicate that the xylanase presented in the current work is endowed with a number of promising properties that are highly valued in the pulp and paper industry.

Acknowledgments This work was funded by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research. The authors wish to express their gratitude to Miss Amina Habbeche and Miss Soumaya Haberra for their constructive discussions and valuable help during the preparation of this work. Special thanks are also due to Pr. Anouar Smaoui, from the English department at the Sfax Faculty of Science for carefully proofreading and polishing the language of the present paper.

References

1. Polizeli, M. L., Rizzatti, A. C., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., & Amorim, D. S. (2005). *Applied Microbiology and Biotechnology*, *67*, 577–591.
2. Wong, K. K. Y., Tan, L. U. L., & Saddler, J. N. (1988). *Microbiology Reviews*, *52*, 305–317.
3. Collins, T., Gerday, C., & Feller, G. (2005). *FEMS Microbiology Reviews*, *29*, 3–23.
4. Terrasan, C. R., Temer, B., Duarte, M. C., & Carmona, E. C. (2010). *Bioresource Technology*, *101*, 4139–4143.
5. Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2009). *Nucleic Acids Research*, *37*, D233–D238.
6. Sunna, A., & Antranikian, G. (1997). *Critical Review in Biotechnology*, *17*, 39–67.
7. Ben Romdhane, I. B., Achouri, I. M., & Belghith, H. (2010). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *162*, 1635–1646.
8. Maalej, I., Belhaj, I., Masmoudi, N. F., & Belghith, H. (2009). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *158*, 200–212.
9. Chen, X., Xu, S., Zhu, M., Cui, L., Zhu, H., Liang, Y., et al. (2010). *Process Biochemistry*, *45*, 75–80.
10. Liu, L., Cheng, J., Chen, H., Li, X., Wang, S., Song, A., et al. (2010). *Process Biochemistry*, *46*, 395–398.
11. Zhou, P., Zhu, H., Yan, Q., Katrolia, P., & Jiang, Z. (2011). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *164*, 944–956.
12. Shi, Q. Q., Sun, J., Yu, H. L., Li, C. X., Bao, J., & Xu, J. H. (2011). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *164*, 816–830.
13. Sriyapai, T., Somyoonsap, P., Matsui, K., Kawai, F., & Chansiri, K. (2011). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *111*, 528–536.
14. Holtz, C., Kaspari, H., & Klemme, J. H. (1991). *Antonie Van Leeuwenhoek*, *59*, 1–7.
15. Ethier, J. F., Harpin, S., Girard, C., Beaulieu, C., Déry, C. V., & Brzezinski, R. (1994). *Canadian Journal of Microbiology*, *40*, 362–368.
16. Leskinen, S., Mantyla, A., Fagerstrom, R., Vehmaanpera, J., Lantto, R., Paloheimo, M., et al. (2005). *Applied Microbiology and Biotechnology*, *67*, 495–505.
17. Berens, S., Kaspari, H., & Klemme, J. H. (1996). *Antonie Van Leeuwenhoek*, *69*, 235–241.
18. Zhou, J., Shi, P., Zhang, R., Huang, H., Meng, K., Yang, P., et al. (2010). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *38*, 523–530.
19. Ninawe, S., Kapoor, M., & Kuhad, R. C. (2008). *Bioresource Technology*, *99*, 1252–1258.
20. George, S. P., Ahmad, A., & Rao, M. B. (2001). *Bioresource Technology*, *78*, 221–224.
21. Blanco, J., Coque, J. J., Velasco, J., & Martin, J. F. (1997). *Applied Microbiology and Biotechnology*, *48*, 208–217.
22. Beg, Q. K., Bhushan, B., Kapoor, M., & Hoondal, G. S. (2000). *Enzyme and Microbial Technology*, *27*, 459–466.
23. Nanmori, T., Watanabe, T., Shinke, R., Kohno, A., & Kawamura, Y. (1990). *Journal of Bacteriology*, *172*, 6669–6672.
24. Gantler, V., & Stanisch, V. A. (1996). *Microbiology*, *142*, 3–16.
25. Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* (2nd ed., pp. 23–38). Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory.
26. Felsenstein, J. (1985). *Evolution*, *39*, 783–791.
27. Miller, G. L. (1959). *Analytical Chemistry*, *31*, 426–428.

28. Laemmli, U. K. (1970). *Nature*, 227, 680–685.
29. Bradford, M. M. (1976). *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
30. Kubata, B. K., Suzuki, T., Horitsu, H., Kawai, K., & Takamizawa, K. (1994). *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 531–535.
31. Hewick, R. M., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E., & Dreyer, W. J. (1981). *The Journal of Biological Chemistry*, 256, 7990–7997.
32. Nawel, B., Said, B., Estelle, C., Hakim, H., & Duchiron, F. (2011). *Process Biochemistry*, 46, 519–525.
33. Nascimento, R. P., Coelho, R. R. R., Marques, S., Alves, L., Gírio, F. M., Bon, E. P. S., et al. (2002). *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 549–555.
34. do Nascimento, R. P., Marques, S., Alves, L., Gírio, F., Amaral-Collaço, M. T., et al. (2003). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 879–881.
35. Techapun, C., Charoenrat, T., Poosaran, N., Watanabe, M., & Sasak, K. (2002). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93, 431–433.
36. Camacho, N. A., & Aguilar, O. G. (2003). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 104, 159–172.
37. Fang, H. Y., Chang, S. M., Lan, C. H., & Fang, T. J. (2008). *Process Biochemistry*, 43, 49–55.
38. Georis, J., Giannotta, F., Lamotte-Brasseur, J., Devreese, B., Van Beeumen, J., Granier, B., et al. (1999). *Gene*, 237, 123–133.
39. Li, X., She, Y., Sun, B., Song, H., Zhu, Y., Lv, Y., et al. (2010). *Biochemical Engineering Journal*, 52, 71–78.
40. Lv, Z., Yang, J., & Yuan, H. (2008). *Enzyme and Microbial Technology*, 43, 343–348.
41. Kui, H., Luo, H., Shi, P., Bai, Y., Yuan, T., Wang, Y., et al. (2010). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162, 953–965.
42. Vafiadi, C., Christakopoulos, P., & Topakas, E. (2010). *Process Biochemistry*, 45, 419–424.
43. Jaouadi, B., Abdelmalek, B., Fodil, D., Ferradji, F. Z., Rekik, H., Zarai, N., et al. (2010). *Bioresource Technology*, 101, 8361–8369.
44. Kulkarni, N., Lakshmikumaran, M., & Rao, M. (1999). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 263, 640–645.
45. Henrissat, B. (1991). *Biochemical Journal*, 280, 309–316.