

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN

MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

PAR

NORMAND ARCAND

CLONAGE ET EXPRESSION DU GÈNE DE LA MANNANASE

CHEZ STREPTOMYCES LIVIDANS.

FÉVRIER 1992

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
SOMMAIRE	x
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
1. STRUCTURE DES HÉMICELLULOSES	4
1.1 Biodégradation des hémicelluloses	4
2. LES MANNANASES [EC 3.2.1.78]	6
3. LES SUBSTRATS	7
3.1 Les pâtes de papier du bois dur	7
3.2 Les pâtes de papier du bois mou	7
3.3 Autres substrats	7
4. MÉCANISME D'HYDROLYSE DU GALACTOMANNANE	9
4.1 Glycosidases associées avec la β -mannanase	9
4.2 Mécanisme d'action des β -mannanases	10
4.3 Spécificité des β -mannanases	13
5. ORGANISMES PRODUCTEURS DE MANNANASES	13
5.1 Taux de production de mannanase par différents microorganismes.	16
6. PURIFICATION DES MANNANASES	17
6.1 Méthodes de purification des mannanases	17
6.2 Propriétés physico-chimiques des mannanases purifiées	17
6.3 Inhibiteurs de l'activité mannanasique	22
7.0 CLONAGE DES GÈNES DE MANNANASE	22
7.1 Clonage hétérologue chez <i>Escherichia coli</i>	22
OBJECTIFS DE LA RECHERCHE	24

MATÉRIEL ET MÉTHODES	26
1. MICROORGANISMES UTILISÉS	27
1.1 Souches bactériennes	27
1.2 Vecteur plasmidique	27
2. SPORULATION ET CONSERVATION DES SOUCHES	29
2.1 Tubes de banque	30
2.2 Tubes de travail	30
3. MILIEUX DE CULTURE	31
3.1 Substrat	31
3.2 Milieu pour la production de l'inoculum	31
3.3 Milieu de production pour la mannanase	32
3.4 Milieu de dépistage	32
3.5 Milieu pour la régénération des protoplastes	33
3.6 Milieu LB agar	34
4. CONDITIONS DE CULTURE	34
5. CRIBLAGE D'UNE BANQUE GÉNOMIQUE DE <i>Streptomyces lividans</i>	34
5.1 Rappel concernant la banque génomique	34
5.2 Criblage de la banque génomique	35
5.3 Purification des clones β -mannanase positifs	37
5.4 Isolement de plasmide	37
6. PRÉPARATION DE PROTOPLASTES DE <i>S. lividans</i>	38
7. MÉTHODE DE TRANSFORMATION	39
7.1 Sélection des transformants	39
8. CARTOGRAPHIE ET SOUS-CLONAGE	40
8.1 Digestion avec enzymes de restriction	40
8.2 Electrophorèse de l'ADN	40
8.3 Sous-clonage	40
8.4 Hybridation de type "Southern"	41
8.5 Marquage de l'ADN	42
8.6 Hybridation de l'ADN	42
8.7 Délétion de l'ADN avec l'exonucléase III	43
9. FERMENTATION EN "BATCH"	45
9.1 Filtration et précipitation	46

10. DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE	46
10.1 Détection de l'activité mannanasique sur plats de Petri	46
10.2 Mesure quantitative de l'activité de la β - mannanase (EC 3.2.1.78)	47
10.3 Détermination des protéines	49
10.4 Activité spécifique	49
11. PURIFICATION	49
11.1 Courbe de titration électrophorétique	49
11.2 Purification par HPLC (colonne DEAE)	50
11.3 Analyse de la pureté de l'enzyme	51
11.4 Lyophilisation de l'enzyme	52
12. DÉTERMINATION DES CARACTÉRISTIQUES DE L'ENZYME	52
12.1 Masse moléculaire	52
12.2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS	53
12.3 Température, pH et temps d'incubation optimum	54
12.4 Cinétique de l'enzyme	55
12.5 Stabilité de l'enzyme	56
12.6 Production d'anticorps	56
RÉSULTATS	59
1. CLONES β-MANNANASE POSITIFS	60
1.1 Cartographie des insertions et sous-clonage . .	60
1.2 Hybridation de type "Southern"	62
1.3 Délétion de l'ADN avec l'exonucléase III . . .	64
1.4 Séquence nucléotidique du gène codant pour la β -mannanase.	70
1.5 Peptide signal, contenu en G+C et utilisation des codons.	74
1.6 Homologie de séquence en acides aminés.	76
2. PRODUCTION DE LA β-MANNANASE DE <i>Streptomyces lividans</i>	79
2.1 Fermentation en "batch"	84
3. PURIFICATION DE LA β-MANNANASE	84
3.1 Rendement du procédé de purification	88
3.2 Analyse de la pureté	88
4. CARACTÉRISATION DE L'ENZYME	92
4.1 Température, pH et temps d'incubation optimum .	92
4.2 Cinétique de l'enzyme	98

4.3	Stabilité de l'enzyme	101
4.4	Séquence des acides aminés de l'extrémité NH ₂ - terminale de la mannanase	103
4.5	Production d'anticorps	103
DISCUSSION	104
CONCLUSION	113
REMERCIEMENTS	117
BIBLIOGRAPHIE	118

LISTE DES TABLEAUX

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1: Proportion de mannose retrouvé dans quelques substrats	8
Tableau 2: Microorganismes producteurs d'endo- β - mannanase (EC 3.2.1.78).	15
Tableau 3: Microorganismes producteurs d'exo- β -D- mannanase.	16
Tableau 4: Activité enzymatique des endo- β -mannanases bactériennes	16
Tableau 5: Activité enzymatique des endo- β -mannanases de champignons	17
Tableau 6: Exemples de purification des mannanases	18
Tableau 7: Propriétés physico-chimiques des mannanases purifiées	20
Tableau 8: Clonage, séquençage et expression du gène codant pour la β -mannanase, chez <i>E.coli</i>	23

RÉSULTATS

Tableau 9: Utilisation des codons pour les acides aminés de la β -mannanase de <i>S. lividans</i> IAF36.	75
Tableau 10: Activité mannanasique (UI) du clone <i>S. lividans</i> IAF36 en milieu M13 modifié (M) contenant du glucose ou du LBG, comme source de carbone	80
Tableau 11: Activité mannanasique (UI) des différents clones de <i>S. lividans</i> , en milieu Arc-GM.	81
Tableau 12: Rendement du procédé de purification pour la β -mannanase de <i>Streptomyces lividans</i> IAF36	89

LISTE DES FIGURES

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure 1: Structure de quelques hémicelluloses, retrouvés dans le bois	5
Figure 2: Mécanisme d'action de la β -mannanase sur le galactomannane de gomme de caroube	11
Figure 3: Hydrolyse du galactomannane.	12

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Figure 4: Plasmide pIJ702 (Vecteur multicopie)	28
Figure 5: Schéma de purification et conservation des clones	36
Figure 6: Protocole d'immunisation des lapins pour la production d'anticorps anti-mannanase de <i>S. lividans</i> IAF36	57

RÉSULTATS

Figure 7: Cartographie de restriction des plasmides pIAF3, pIAF36 et pIAF61	61
Figure 8: Hybridation de type "Southern"	63
Figure 9: Autoradiogramme de l'hybridation de type "Southern" avec la sonde #1	65
Figure 10: Autoradiogramme de l'hybridation de type "Southern" avec la Sonde #2	67
Figure 11: Construction plasmidique de pNAM1.7+	69
Figure 12: Séquence nucléotidique du gène codant pour la β -mannanase, et séquence en acides aminés correspondant à la protéine	71

Figure 13: Homologie de séquence en acides aminés entre la mannanase de <i>S.lividans</i> IAF36 et celle de <i>C. saccharolyticum</i>	77
Figure 14: SDS-PAGE des protéines sécrétées par <i>S. lividans</i>	82
Figure 15: Production de β -mannanase par <i>S. lividans</i> IAF36 en milieu Arc-GM	85
Figure 16: Schéma de purification de la β -mannanase de <i>Streptomyces lividans</i> IAF36	86
Figure 17: Profil d'élution de la β -mannanase de <i>S. lividans</i> IAF36 sur colonne échangeuse d'anions (DEAE), utilisant un gradient linéaire de 0 à 1 M NaCl, dans le tampon Tris-HCl 20 mM pH 8.5	87
Figure 18: Analyse de la pureté de la β -mannanase de <i>S. lividans</i> IAF36, sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (PhastSystem TM , PHARMACIA).	90
Figure 19: Courbe de titration électrophorétique de la β -mannanase purifiée, sur gel de polyacrylamide contenant des ampholines formant un gradient de pH de 3 à 9 (PhastSystem TM , PHARMACIA).	93
Figure 20: Effet de la température sur l'activité enzymatique de la mannanase	95
Figure 21: Effet du pH sur l'activité enzymatique de la mannanase	96
Figure 22: Effet du temps d'incubation sur l'activité enzymatique de la mannanase	97
Figure 23: Cinétique enzymatique de la mannanase de <i>S. lividans</i> IAF36 (Lineweaver & Burk)	99
Figure 24: Cinétique enzymatique de la mannanase de <i>S. lividans</i> IAF36 (Eadie-Hofstee)	100
Figure 25: Stabilité de la mannanase à différentes températures	102

LISTE DES ABRÉVIATIONS

a.a.	: acide aminé
ADN	: acide déoxy-ribonucléique
Arc-GM	: milieu de production pour la mannanase.
ARN	: acide ribonucléique
BSA	: albumine du sérum bovin
cel ⁻	: n'exprimant pas d'activité cellulasique
CsCl	: chlorure de césium
DEAE	: diéthylaminoéthyle
DMSO	: diméthyl-sulfoxyde
DNS	: acide dinitro-salicylique
D.S.	: degré de substitution
EDTA	: éthylènediaminetétraacétate
ELISA	: dosage immuno-enzymatique
HPLC	: chromatographie liquide à haute performance
kb	: kilobase(s)
kDa	: kilodalton(s)
K _m	: constante de Michaelis-Menten, concentration de substrat à laquelle la vitesse d'hydrolyse est la moitié de la vitesse maximale (V _{max}) pour une concentration d'enzyme donnée.
LBG	: gomme de caroube (galactomannane).
NTG	: N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
pI	: point isoélectrique
psi	: livre(s) par pouce carré
p/v	: poids/volume
rpm	: révolutions par minutes
SDS-PAGE:	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate.
TES	: N-tris[Hydroxyméthyl]méthyl-2-aminoéthanesulfonic acid
Tris	: tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TSB	: bouillon tryptone de soya
UI	: unité internationale
V _{max}	: vitesse maximale d'hydrolyse du substrat par une concentration d'enzyme donné.
v/v	: volume/volume
xln ⁻	: n'exprimant pas d'activité xylanasiqque
YEME	: extrait de levure, extrait de malt

SOMMAIRE

La présente étude porte sur le clonage et l'expression du gène d'une β -mannanase de *Streptomyces lividans*. La mannanase étudiée est une enzyme capable d'hydrolyser les liens $\beta(1\rightarrow4)$ du D-mannane. Ce type de mannanase est classé EC 3.2.1.78 [β -1,4-D mannan-mannohydrolase].

L'objectif de la recherche était d'une part, de cloner le gène de la β -mannanase, en faire la cartographie, le sous-clonage et vérifier l'homologie entre les clones positifs. Ainsi le gène d'une β -mannanase a été cloné de façon homologue à partir d'une banque génomique de *S. lividans* comprenant 25,000 clones. Le criblage des clones s'est effectué sur un milieu solide contenant du galactomannane et l'hydrolyse de ce substrat permettait la détection des clones positifs. À partir des trois clones positifs identifiés, la technique du sous-clonage a permis la localisation du gène codant pour la β -mannanase, au niveau de chaque insertion. Un de ces clones produisait environ soixante fois plus de mannanase que la souche sauvage *S. lividans* 1326.

D'autre part, l'objectif de la recherche était de produire l'enzyme par fermentation et ensuite de la purifier et caractériser.

À partir de la β -mannanase purifiée, la caractérisation de cette enzyme s'est effectuée dans le but de déterminer les conditions optimales de température, pH et temps d'incubation. Ensuite, l'étude de la stabilité de la mannanase à différentes températures, et la détermination du K_m et V_{max} ont complété cette section. Le gène codant pour la β -mannanase a été séquencé et l'analyse de la séquence en acides aminés de l'extrémité NH_2 -terminale de l'enzyme purifiée a fourni l'information concernant le cadre de lecture du gène. Les anticorps anti-mannanasique ont été produits et serviront comme outils d'analyse en biologie moléculaire.

INTRODUCTION

Les streptomycètes sont des microorganismes procaryotes, retrouvés dans le sol. La croissance de ces bactéries filamenteuses (Gram positives) sur un milieu de culture solide, consiste en la formation d'un mycélium végétatif, lequel permet la formation d'un mycélium aérien. Par la suite, la segmentation du mycélium aérien donne lieu à la sporulation. Les streptomycètes ont aussi une autre caractéristique, leur génome contient environ 70% de G+C (Shapiro, 1989).

Plusieurs microorganismes dont *Aeromonas hydrophila* (Araki et Kitamikado, 1982), *Bacillus subtilis* NRRL 356 (Araujo et Ward, 1990a) et *Streptomyces* sp. no. 17 (Kusakabe et Takahashi, 1988) produisent des endo- β -mannanases (EC 3.2.1.78). Ces enzymes hydrolysent les liens (1 \rightarrow 4)- β -D-mannopyranosyl du mannane substitué, des copolymères de mannane et du D-mannane linéaire (Dekker, 1985). Le mannane est un des éléments constitutifs des plantes et des arbres.

Le traitement des pâtes de papier de type Kraft par des hémicellulases, pour faciliter l'enlèvement de la lignine, a permis de démontrer que le bioblanchiment était possible (Paice et al., 1988; Viikari et al., 1986; 1987; Paice et Jurasek, 1984). De plus, dans les laboratoires du groupe de recherche sur les streptomycètes de l'Institut Armand-Frappier, on a cloné

dans un système homologue le gène d'une xylanase de *Streptomyces lividans* (Mondou et al., 1986) et isolé un clone qui exprimait cette enzyme en grande quantité (2 g/L) dans le milieu extracellulaire. Grâce à la collaboration étroite avec la compagnie ICI (Mississauga, Ontario) des tests préliminaires de bioblanchiment se sont avérés positifs.

La xylanase est donc efficace pour blanchir les pâtes de bois dur qui contiennent une forte proportion de xylane. Les pâtes de bois mou contiennent de 15 à 20% de galactoglucomannane (Ratto et Poutanen, 1988) qui est un bon substrat pour la β -mannanase. Des essais préliminaires de bioblanchiment en industrie ont montré l'efficacité de la mannanase.

Une des applications possibles de cette recherche serait de diminuer l'utilisation du chlore en utilisant les mannanases dans les premières étapes du procédé de blanchiment, ce qui contribuerait à réduire la quantité de dioxine et de furfural responsables de certains problèmes de pollution.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

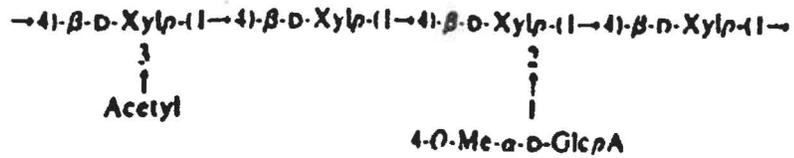
1. STRUCTURE DES HÉMICELLULOSES

Les hémicelluloses sont des polysaccharides associés avec la cellulose de la paroi des plantes. Ces structures sont ensuite recouvertes par un film continué constitué de lignine. Ainsi pourrait-on dire de cette dernière, qu'elle représente la plus "grosse" molécule au monde considérant qu'un arbre contient une seule molécule d'hétéropolymère.

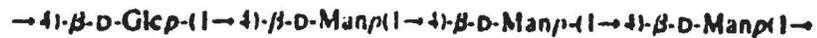
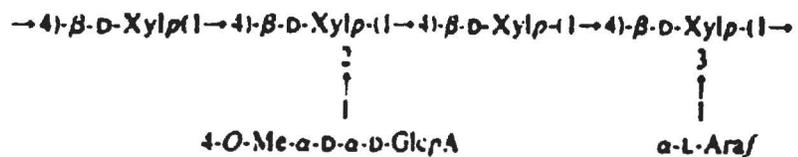
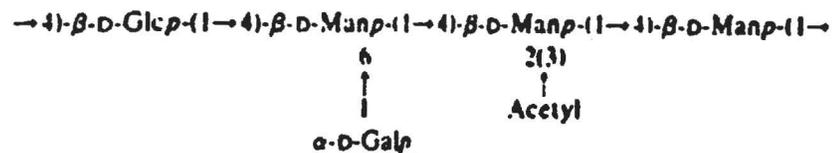
Les hémicelluloses incluent les β -D-glucanes non cellulose, les substances pectiques et plusieurs complexes hétéropolysaccharidiques tel que ceux enrichis en galactose (par exemple, l'arabinogalactane), mannose (galactogluco- et glucomannanes) et en xylose (arabinoglucurono- et glucuronoxylanes) (Dekker, 1985). Parmi les différentes espèces d'arbres, trois types prédominants d'hémicelluloses sont retrouvés. Il y a le 1,3- β - et 1,4- β -D-galactane, le 1,4- β -D-mannane et le 1,4- β -D-xylane. Les structures de quelques hémicelluloses retrouvés dans le bois sont présentées à la figure 1 (Dekker, 1985).

1.1 Biodégradation des hémicelluloses

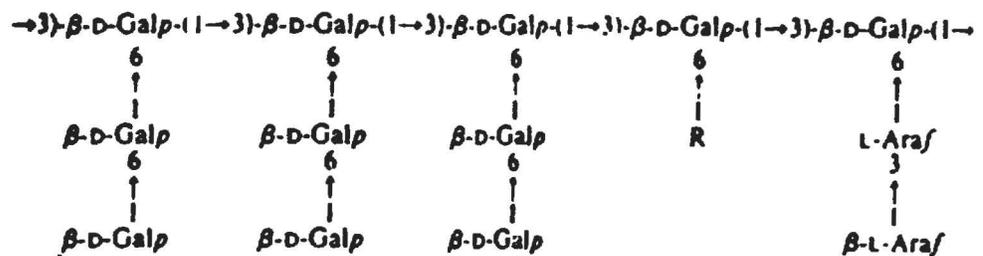
Les hémicelluloses sont hydrolysées par des hémicellulases (glycane hydrolases, EC 3.2.1). On y retrouve les β -D-galactanases, les β -D-mannanases et les β -D-xylanases.

(a) *O*-Acetyl-4-*O*-methylglucuronoxylan (hardwood)

(b) Glucomannan (hardwood)

(c) Arabino-4-*O*-methylglucuronoxylan (softwood)(d) *O*-Acetylgalactoglucomannan (softwood)

(e) Arabinogalactan (larch)



(f) Galactan (compression wood)

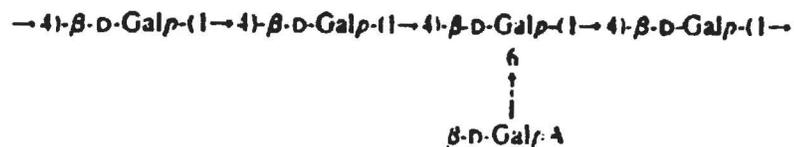


Figure 1: Structure de quelques hémicelluloses retrouvés dans le bois (reproduit de Dekker, 1985).

Ces enzymes dégradent spécifiquement les chaînes principales des hémicelluloses. Pour hydrolyser complètement ces molécules en monosaccharides d'autres enzymes nommées exoglycosidases sont nécessaires. Ainsi, l' α et β -D-galactosidase, la β -D-mannosidase, l' α -L-arabinofuranosidase et la β -D-xylosidase agissent en synergisme avec les endoglycanases.

Les "exo" et "endo" enzymes se distinguent par leur mode d'action sur les substrats. Ainsi, une enzyme de type "exo" dégrade le polysaccharide en enlevant successivement une unité glycosidique à la fois en commençant par l'extrémité non réductrice de la chaîne polysaccharidique. La présence d'un résidu branché latéralement arrête la réaction enzymatique. L'enzyme de type "endo" coupe la chaîne de façon aléatoire aux endroits libres de branchements latéraux. Le polymère est donc dégradé progressivement en fragments de plus en plus courts, jusqu'aux monosaccharides.

2. LES MANNANASES [EC 3.2.1.78]

Les β -D-mannanases de type "exo" et "endo" hydrolysent les liens (1->4)- β -D-mannopyranosyl du mannane substitué (par exemple, le D-galacto-D-mannane), des copolymères de mannane (D-gluco et D-galacto-D-gluco-D-mannane), et du D-mannane linéaire (Dekker, 1985; Kusakabe et Takahashi, 1988).

3. LES SUBSTRATS

3.1 Les pâtes de papier du bois dur

Le bois dur contient une bonne proportion de xylane et peu de mannane. Par exemple, la composition chimique des pâtes de papier de bouleau, est la suivante; arabinose 0.7%, xylose 25.2%, mannose 2.0%, glucose 72.1% (Dr D. Kluepfel, communication personnelle).

3.2 Les pâtes de papier du bois mou

Au Canada, le bois mou duquel la majorité des pâtes de papier est dérivée, contient de 15 à 20% d'hémicellulose sous forme de galactoglucomannane (Ratto et Poutanen, 1988). Ainsi, les pâtes d'épinette noire sont constituées de 1.4% d'arabinose, 7.7% de xylose, 8.9% de mannose et 82.0% de glucose.

3.3 Autres substrats

La grande variété de substrats contenant du mannane est résumée dans le tableau 1.

Tableau 1- PROPORTION DE MANNOSE RETROUVÉ DANS QUELQUES SUBSTRATS.

Substrats	Proportion %		
	Mannose	Galactose	Glucose
1,4- β -mannane de café ^a	98	2	
1,4- β -mannane (codium) ^b	95		5
mannane de noix d'ivoire ^c	95		5
mannane de copra ^d	93	7	
gomme de caroube (LBG) ^e	80	20	
gomme de guar ^f	62	38	
glucomannane (Konjac) ^g	60		40

- a) Araki et Kitamikado (1988)
 b) Araki et Kitamikado (1988)
 c) Meier et Reid (1981)
 d) Kusakabe et al. (1986)
 e) Sigma Chemical Co.
 f) McCleary et al. (1984)
 g) Emi et al. (1972)

Parmi ces substrats, le mannane de copra, la gomme de caroube (LBG) et la gomme de guar, sont les plus étudiés dans la littérature. Kusakabe et al. (1986) ont analysé la structure du galactomannane de copra en effectuant une hydrolyse de ce substrat par la β -mannanase IV purifiée de *Streptomyces sp.* no. 17. Ils ont démontré que le galactomannane de copra est composé d'une chaîne principale de résidus 1,4- β -D-mannosyl à laquelle sont attachées des unités d' α -D-galactosyl branchés en position 6 du résidu D-mannosyl. De plus, une distribution irrégulière des résidus α -galactosyl a été observée. McCleary et al. (1984) ont étudié la structure fine de la gomme de caroube et de guar. Ils ont trouver que ces deux substrats portaient une distribution irrégulière de résidus D-galactosyls. Le galactomannane de gomme de caroube est caractérisé par une très forte proportion de dimères D-mannosyls substitués, mais possédant très peu de trimères substitués. De plus, ils ont constaté que la substitution en alternance des résidus D-mannosyl était très rare.

4. MÉCANISME D'HYDROLYSE DU GALACTOMANNANE

4.1 Glycosidases associées avec la β -mannanase

Pour hydrolyser complètement le galactomannane en ses constituants de base, mannose et galactose, trois enzymes sont requises, soit une β -mannanase, une β -mannosidase et une

α -galactosidase.

4.2 Mécanisme d'action des β -mannanases

Les β -1,4-mannanases sont retrouvées fréquemment chez les bactéries et les champignons. En présence d'un substrat, il y a induction de la production d'enzyme. La plupart des β -mannanases étudiées sont de type "endo" agissant au hasard sur de longues chaînes et incapable d'agir sur le mannotriose et le mannobiose (Reese et Shibata, 1964). Les figures 2 et 3, nous donnent un exemple d'hydrolyse du galactomannane de gomme de caroube (LBG).

Yamazaki et Dietrichs (1979) ont étudié le mode d'action d'une endo- β -1,4-mannanase sur le galactomannane de gomme de guar. Les auteurs n'ont pas mentionné le nom du microorganisme producteur de cette enzyme. Ils ont identifié quatre phases dans le mécanisme de dégradation du galactomannane. Dans la première phase, la chaîne principale de galactomannane était scindée au hasard, coupée préférentiellement aux régions non branchées. Dans la deuxième phase, une coupure supplémentaire des fragments suit, favorisant encore les régions moléculaires sans chaînes latérales. Les plus longs oligomères avec des chaînes latérales, étaient successivement raccourcis en fragments plus courts dans la troisième phase, et finalement des produits de dégradation étaient accumulés.

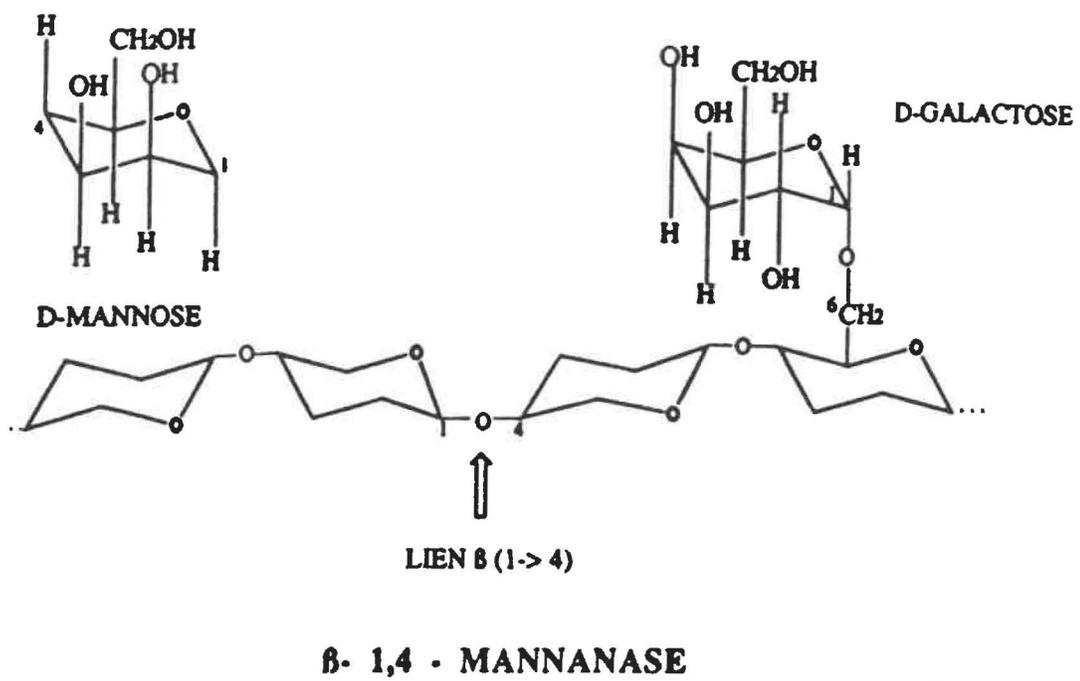


Figure 2: Mécanisme d'action de la β -mannanase, sur le galactomannane de gomme de caroube.

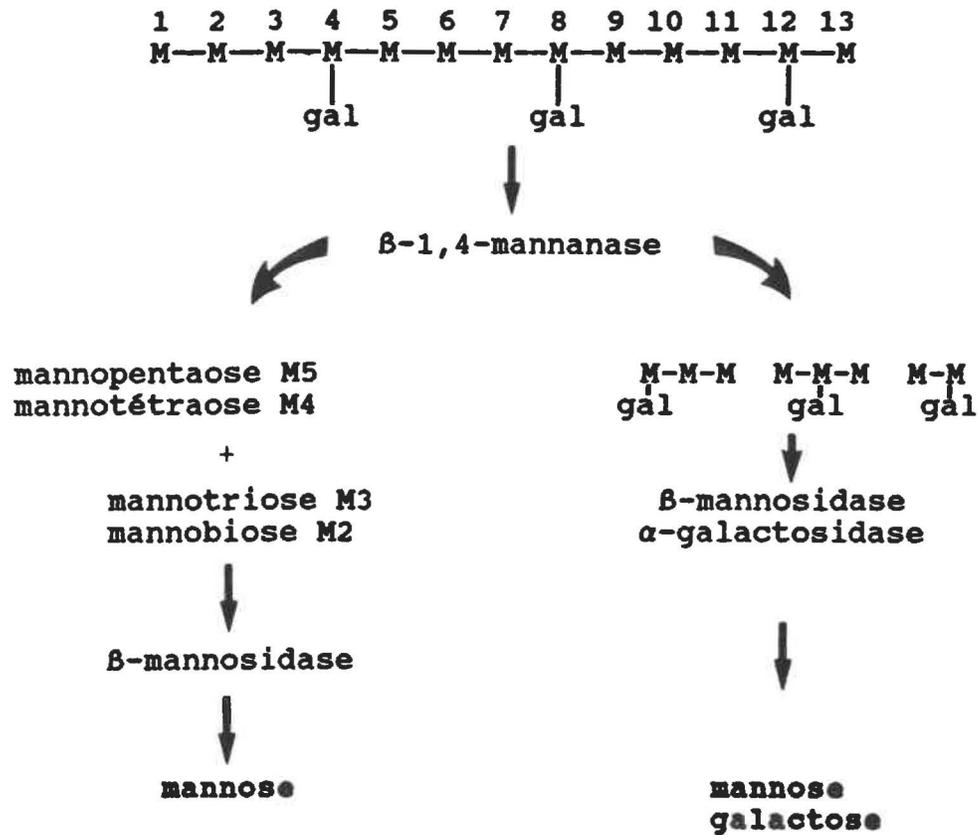


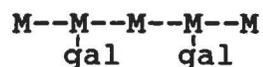
Figure 3: Hydrolyse du galactomannane (LBG)

Ces produits de dégradation ont été identifiés comme étant le mannobiose, le mannotriose et une série de composés constitués de galactose et de mannose dans le rapport 1:2.

4.3 Spécificité des β -mannanases

Les β -mannanases hydrolysent spécifiquement les liens β -1,4 du mannane et sont incapables de scinder les liens α , retrouvés par exemple dans l' α -mannane de la levure.

Un minimum de trois résidus mannosyls successifs non branchés est requis pour une action enzymatique. Ainsi, les β -mannanases sont incapables d'hydrolyser la structure suivante, à cause de l'encombrement stérique des résidus galactosyl (Reese et Shibata, 1964).



En effet, cette structure empêche l'enzyme d'accéder au substrat. Donc, un degré de substitution (D.S.) de 0.5 est suffisant pour rendre la structure polymérique résistante à l'hydrolyse par les endoenzymes.

5. ORGANISMES PRODUCTEURS DE MANNANASES

Les endo- β -mannanases sont impliquées dans le processus de

germination des graines de légumineuse. Ainsi, Halmer et al. (1975) ont étudié le mécanisme d'hydrolyse du galactomannane retrouvé dans l'endosperme de la laitue. Le mannane est un composant structural de la paroi de plusieurs plantes terrestres et aquatiques. Araki et Kitamikado (1982) ont isolé du contenu intestinal de truite arc-en-ciel, une bactérie *Aeromonas hydrophila* sous espèce *anaerogenes*, laquelle produisait une exo- β -mannanase. Grâce à cette bactérie, la truite peut utiliser le mannose libéré lors de l'hydrolyse de la paroi des algues.

Les gymnospermes contiennent une bonne proportion de galactomannane. Il n'est donc pas surprenant de retrouver sur du bois mort en forêt, des champignons producteurs de mannanase. Par exemple, Ratto et Poutanen (1988) ont étudié la production de mannanase par *Trichoderma reesei*. Plusieurs bactéries et champignons producteurs de différentes β -mannanases sont présentés aux tableaux 2 et 3.

**TABLEAU 2- MICROORGANISMES PRODUCTEURS D'ENDO- β -MANNANASE
(EC 3.2.1.78)**

<u>Bactéries</u>	<u>Références</u>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Araki et Kitamikado (1982)
<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 72	Ratto et Poutanen (1988)
<i>Bacillus subtilis</i>	Araujo et Ward (1990d)
	Akino et al. (1989)
	Emi et al. (1972)
	Ratto et Poutanen (1988)
<i>Bacillus subtilis</i> NRRL 356	Araujo et Ward (1990a)
<i>Bacillus sp.</i> AM-001	Akino et al. (1988)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Talbot et Sygusch (1990)
<i>Bacteroides ovatus</i>	Gherardini et Salyers (1987)
<i>Caldocellum saccharolyticum</i>	Luthi et al. (1991)
<i>Pseudomonas sp.</i> PT-5	Yamaura et al. (1990)
<i>Streptomyces sp.</i> no.17	Kusakabe et Takahashi (1988)
<i>Streptomyces sp.</i>	Takahashi et al. (1984)
<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	Poutanen et al. (1987)
	Ratto et Poutanen (1988)
<u>Champignons</u>	<u>Références</u>
<i>Aspergillus awamori</i>	Ratto et Poutanen (1988)
<i>Aspergillus niger</i>	Sinner et al. (1979)
<i>Aspergillus tamarii</i>	Civas et al. (1984)
<i>Basidiomycètes sp.</i> (Driselase)	McCleary (1979)
<i>Chaetomium globosum</i>	Reese et Shibata (1964)
<i>Penicillium sp.</i>	Reese et Shibata (1964)
<i>Polyporus versicolor</i>	Johnson et Ross (1990)
<i>Talaromyces byssochlamydoides</i> NRRL 3658	Araujo et Ward (1990c)
<i>Talaromyces emersonii</i> NRRL 3221	Araujo et Ward (1990c)
<i>Thielavia terrestris</i>	Araujo et Ward (1990b)
<i>Trichoderma harzianum</i> E58	Torrie et al. (1990)
<i>Trichoderma reesei</i>	Ratto et Poutanen (1988)
<i>Trichoderma viride</i>	Reese et Shibata (1964)

Les β -mannanases de type "endo", forment ainsi le groupe le plus commun. La production d'une série d'exo- β -mannanase est indiquée au tableau 3.

TABLEAU 3- MICROORGANISMES PRODUCTEURS D'EXO-1,4- β -D-MANNANASE

<u>Microorganismes</u>	<u>Références</u>
<i>Aeromonas sp.</i>	Araki et Kitamikado (1982)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Araki et Kitamikado (1988)
<i>Aspergillus giganteus</i>	Reese et Shibata (1964)
<i>Paecilomyces varioti</i>	Reese et Shibata (1964)
<i>Penicillium wortmanni</i>	Reese et Shibata (1964)
<i>Cyamopsis tetragonolobus</i>	McCleary (1988)

5.1 Taux de production de mannanase par différents microorganismes

Les tableaux 4 et 5 résument la production de β -mannanases par les bactéries et les champignons.

Tableau 4 - Activité enzymatique des endo- β -mannanases bactériennes

Microorganismes	Substrats	Activité
<i>Bacillus subtilis</i> NRRL 356	LBG(galactomannane)	106.2 UI/mL
<i>Bacillus sp.</i> AM-001	Farine de copra	30.1 UI/mL
<i>Bacillus subtilis</i>	LBG	15.3 UI/mL
<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	LBG	2.7 UI/mL

**Tableau 5 - Activité enzymatique des endo- β -mannanases
de champignons**

Microorganismes	Substrats	Activité
<i>Talaromyces byssochlamydoïdes</i>	LBG (galactomannane)	52.4 UI/mL
<i>Talaromyces emersonii</i>	LBG	43.1 UI/mL
<i>Aspergillus awamori</i>	LBG	2.0 UI/mL
<i>Trichoderma reesei</i>	LBG	1.4 UI/mL

6. PURIFICATION DES MANNANASES

6.1 Méthodes de purification des mannanases

Généralement, les méthodes de purification des mannanases commencent par une précipitation du surnageant de culture. La précipitation de l'enzyme peut se faire par l'éthanol 95%, par le sulfate d'ammonium ou par l'acétone. L'utilisation d'une résine échangeuse d'ions permet de concentrer davantage l'enzyme. Une deuxième séparation sur résine échangeuse d'ions ou une filtration sur gel, permet de bien séparer l'enzyme des autres protéines. L'ensemble des méthodes de purification des mannanases, est résumé dans le tableau 6.

6.2 Propriétés physico-chimiques des mannanases purifiées

Les propriétés physico-chimiques de plusieurs β -mannanases sont résumées au tableau 7.

TABEAU 6 - EXEMPLES DE PURIFICATION DES MANNANASES

Organismes	Etapas de purification	Act.spéc (U/mg)	Facteur purific.	Rendement (%)	Auteurs
Basidiomycètes sp.	Dialyse pH 8.0 1)DEAE Cellulose 2)Chromatographie d'affinité sur glucomannane-AH-Sépharose	30.3	120	45	McCleary (1979)
Aeromonas sp.	Sulfate d'ammonium 1)DEAE-Sephadex A-50 2)CM-Sephadex C-50 3)Sephadex G-100 4)DEAE-Sephadex A-50	86.5	3.970	17.7	Araki et Kitamika-do (1982)
Streptomyces sp.	Dialyse 1)ECTEOLA-Cellulose 2)Ultrafiltration 3)Filtration sur Biogel P-100	462	79.7	26.8	Takahashi et al. (1984)
Bacteroides ovatus	Ultracentrifugation 1)Chromatographie DEAE 2)Filtration sur gel	76	138	4	Gherardini et Salyers (1987)
Bacillus sp.	Sulfate d'ammonium 1)DEAE-Toyopearl 2)Hydroxyapatite 3)Sephacryl S-200	3 enzym. M1 et M2 :312 M3:470	13.6 20.4	31 9	Akino et al. (1988)

TABEAU 6 (SUITE) - EXEMPLES DE PURIFICATION DES MANNANASES

Organismes	Etapes de purification	Act.spéc (U/mg)	Facteur purific.	Rendement (%)	Auteurs
<i>Bacillus pumilus</i>	Acétone 1) Sephadex G-25 2) SP-Sephadex C-50 3) Toyo pearl HW55 4) Electrophorèse préparative	1616	n.d. ¹	n.d.	Araujo et Ward (1990d)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Sulfate d'ammonium 1) Sephacryl S-200 2) Echangeur cationique (Mono S) 3) HIC (phenyl-Superose) 4) Tamis moléculaire (Superose 12)	enzyme dimérique composée de 2 sous-unités B: 100 C: 97	43 42	4.5 1.2	Talbot et Sygusch (1990)
<i>Thielavia terrestris</i>	Acétone 1) SP-Sephadex C-50 2) Electrophorèse préparative	4 composantes β-mannanasique M1: 28.2 M2: 38.7 M3: 52.8 M4: 4.2	n.d. n.d. n.d. n.d.	n.d. n.d. n.d. n.d.	Araujo et Ward (1990b)

1) n.d. : non déterminé

TABLEAU 7 - PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES MANNANASES PURIFIÉES

Organismes	optima t°C	pH	M _r (kDa)	pI	K _m (mg/mL)	V _{max} (U/mg)
<i>Bacillus subtilis</i> ¹	<55	6.0	22	5.24	n.d.	n.d.
<i>Aeromonas</i> sp.F-25 ²	<45	6.0	64	5.9	M3: 5.1×10 ⁻⁴ M	n.d.
					M4: 2.4×10 ⁻⁴ M	n.d.
					M5: 1.3×10 ⁻⁴ M	n.d.
<i>Streptomyces</i> sp. ³	57	6.8	42.9	3.65	n.d.	n.d.
<i>Bacteroides ovatus</i> ⁴	37	6.2-6.5	61	4.8	n.d.	n.d.
<i>Bacillus</i> sp. ⁵	60	9.0	M1: 58	5.9	3.8 (LBG)	1470
	60	9.0	M2: 59	5.7	2.1 (LBG)	1100
	65	8.5	M3: 42	5.1	3.9 (LBG)	2000

¹ Emi et al. (1972)

² Araki et Kitamikado (1982)

³ Takahashi et al. (1984)

⁴ Gherardini et Salyers (1987)

⁵ Akino et al. (1988)

TABLEAU 7 (SUITE) - PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES MANNANASES PURIFIÉES

Organismes	optima t°C	pH	M _r (kDa)	pI	K _m (mg/mL)	V _{max} (U/mg)
<i>Thielavia terrestris</i> ⁶	M1) 70	4.5-5.5	1) 52, 2) 30	n.d.	n.d.	n.d.
	M2-M4) 75	4.5-5.5	3) 55, 4) 89	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Bacillus pumilus</i> ⁷	A) 65	5.5-6.9	A) 55	n.d.	n.d.	n.d.
	B) 70	6.0	B) 37	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Polyporus versicolor</i> ⁸	65	5.5	33.9	3.75	A) 33.3 (g/L)	2500
			à 57.5	à 4.6	B) 28.6 (g/L)	4000
					C) 50.0 (g/L)	5000
					2A) 28.6 (g/L)	20
<i>Bacillus stearothermo-</i> <i>philus</i> ⁹	70	6.5	dimère	n.d.	1.5 (LBG)	455
			2 x 73			
<i>C. saccharolyticum</i> ¹⁰	80	6.0	38.9	n.d.	n.d.	n.d.

⁶ Araujo et Ward (1990b)

⁷ Araujo et Ward (1990d)

⁸ Johnson et Ross (1990)

⁹ Talbot et Sygush (1990)

¹⁰ Luthi et al. (1991)

6.3 Inhibiteurs de l'activité mannanasique

L'activité de certaines mannanases a été inhibée par des ions. Ainsi, la mannanase IV purifiée de *Streptomyces* sp. no.17 (Kusakabe et Takahashi, 1988) était complètement inhibée par Al^{+++} , Cu^{++} , Ag^+ , Hg^+ , Fe^{++} et le Fe^{+++} . L'activité a été réduite de 50 à 90% par le Cd^{++} , Sn^{++} et le Zn^{++} , tandis que le Ni^{++} , Na^+ , K^+ , Mg^{++} n'affectaient pas l'activité.

7.0 CLONAGE DES GÈNES DE MANNANASE

7.1 Clonage hétérologue chez *Escherichia coli*

Jusqu'à maintenant, seulement deux groupes de chercheurs ont cloné, séquencé et étudié l'expression du gène codant pour une β -mannanase, utilisant comme vecteur, pUC18 et pUC19, et effectuant l'expérimentation chez *Escherichia coli*. Le tableau 8 résume ces travaux.

TABLEAU 8 - Clonage, séquençage et expression du gène codant pour la β -mannanase, chez *Escherichia coli*.

Bactérie	Vecteurs utilisés	Gène	M _r (kDa)	Activité	Auteurs
<i>Bacillus</i> sp AM001	pUC19 pUC118 pUC119 pHSG398	<i>Xba</i> I--- - <i>Pst</i> I 2.0 kb	A) 58 b) 43	qualita- tif	Akino et al. (1989)
<i>C.saccha- rolyticum</i>	pBR322 pUC18 pUC19 pBS (+) pBS (-)	<i>Kpn</i> I--- - <i>Sal</i> I 1.2 kb	38.9 ¹	6.8 U/mg pUC18 2.4 U/mg pBS (-)	Lüthi et al. (1991)

¹- Cette enzyme a un pH optimal de 6.0 et une température optimale de 80°C. De plus, le contenu en G+C du gène qui code pour cette β -mannanase, est de 43%.

OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

La première partie de ce projet de maîtrise, était:

- Cribler la banque génomique (25,000 clones) de *Streptomyces lividans* souche 1326.
- Identifier les clones β -mannanase positifs et effectuer la cartographie de chaque insertion (fragment d'ADN inséré au site unique *Bgl*/II du plasmide pIJ702) par digestions simples et digestions doubles avec des endonucléases de restriction.
- Sous-cloner le gène codant pour la β -mannanase dans le but de localiser ce gène dans l'insertion.
- Effectuer une hybridation de type "Southern" afin de savoir si le gène codant pour la β -mannanase est homologue chez les trois clones positifs.
- Raccourcir le fragment de 1.7 kb contenant le gène de la β -mannanase, en utilisant l'exonucléase III, pour localiser le gène codant pour l'enzyme et de créer une série de fragments délétés, qui se chevauchent, pour le séquençage.
- Séquencer le gène de la β -mannanase.

La deuxième partie s'adressait à la purification et caractérisation de l'enzyme:

- Développer un milieu approprié pour la production d'enzyme β -mannanase par fermentation en culture liquide.
- Purifier la β -mannanase par HPLC.
- Caractériser la β -mannanase, pour déterminer les conditions optimales de température, pH et temps d'incubation. Étudier la stabilité enzymatique à différentes températures et trouver les constantes de la cinétique de l'enzyme.
- Séquencer les cinq premiers acides aminés de l'extrémité NH_2 -terminale de la β -mannanase, pour connaître le cadre de lecture du gène codant pour cette enzyme.
- Produire des anticorps (anti-mannanasique) qui serviront ultérieurement comme outils d'analyse pour la biologie moléculaire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. MICROORGANISMES UTILISÉS

1.1 Souches bactériennes

Streptomyces lividans 66 souche 1326 a été obtenue du Dr D.A. Hopwood (John Innes Institute, Norwich, G-B.).

S. lividans 3131, la souche sauvage, contient le plasmide pIJ702 qui porte le gène de résistance à la thiostreptone (Katz et al., 1983).

S. lividans 10-164 est cellulase et xylanase négatifs. Ce mutant a été obtenu par mutagénèse au NTG de *S. lividans* 1326. L'intérêt particulier de ce mutant est qu'il ne produit ni cellulases, ni xylanases, susceptibles de contaminer les préparations de mannanase.

1.2 Vecteur plasmidique

Le vecteur pIJ702 de 5.8 kb est un vecteur multicopie qui peut atteindre de 40 à 300 copies par cellule. Il porte le gène de résistance à la thiostreptone (antibiotique produit par *S. azureus* ATCC 1492). Une insertion au site unique *Bgl*II empêche la formation de mélanine (pigment noir). Le plasmide pIJ702 est illustré à la figure 4.

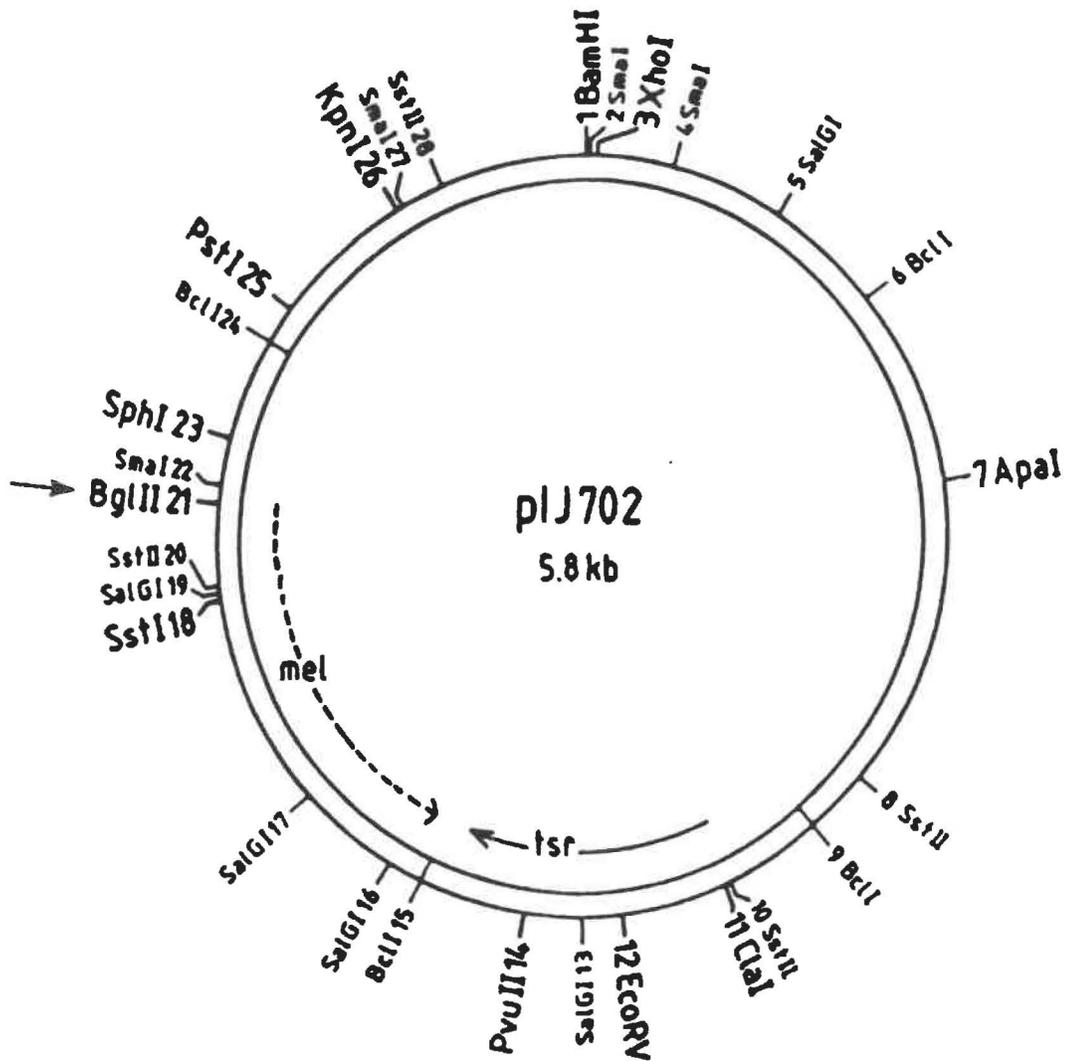


Figure 4: Plasmide pIJ702 (vecteur multicopie)
(reproduit de Hopwood et al., 1985).

2. SPORULATION ET CONSERVATION DES SOUCHES

Pour la sporulation et la conservation de *S. lividans* 1326, *S. lividans* 3131 et *S. lividans* 10-164, un milieu YEME maltose (Pridham et al., 1956/57) de la composition suivante est utilisé: chaque litre de milieu contient: 4.0 g d'extrait de levure (Difco); 10.0 g d'extrait de malt (Difco); 4.0 g de maltose (Difco); et 18.0 g d'agar (Difco). Le pH du milieu est ajusté à 7.3 avec une solution de NaOH 1N. La stérilisation est faite à l'autoclave pendant 20 minutes à 121°C. Au besoin, une solution à 5% de thiostreptone (Squibb Canada Ltée, Montréal) dans le DMSO (B.D.H. Chem.) est ajoutée aseptiquement (pour obtenir une concentration finale de 50 µg de thiostreptone par mL de milieu) lorsque le milieu atteint une température inférieure à 55°C.

Les spores des souches de *S. lividans* sont obtenues sur milieu YEME maltose, après 7 jours d'incubation à 34°C. Ces spores peuvent être suspendues dans une solution stérile comprenant 10% de lait écrémé et lyophilisées pour une conservation à long terme.

Pour la sporulation et la conservation, un milieu Bennett (Kenneth, 1949) de la composition suivante est utilisé: on retrouve: extrait de levure (Difco), 1.0 g; extrait de boeuf

(Difco), 1.0 g; NZ amine A (Shelfield), 2.0 g; maltose (Difco), 10.0 g; et agar (Difco), 18.0 g, dissout dans 1 L d'eau distillée. Le pH du milieu est ajusté à 7.3 avec une solution de NaOH 1N et ce milieu est stérilisé à 121°C, pour 20 minutes. Juste avant de couler le milieu, 1 mL de thiostreptone (50 mg/mL de DMSO) est ajouté par litre de milieu de culture.

2.1 Tubes de banque

Le contenu d'un vial lyophilisé renfermant les spores est transféré dans un Erlenmeyer de 125 mL contenant 25 mL de milieu TSB (au besoin avec thiostreptone). Après incubation à 34°C, 240 rpm, durant 24 heures, la culture est homogénéisée avec un homogénéisateur et, ensuite, incubée pour un autre 24 heures. La stérilité de la culture est vérifiée sous le microscope optique et cette culture sert à ensemercer des tubes inclinés contenant du milieu Bennett. Pour obtenir une bonne sporulation, les tubes inclinés sont incubés à 34°C dans une étuve durant 7 jours. Ils peuvent être conservés à 4°C pour une période maximale de 6 mois.

2.2 Tubes de travail

Une partie du mycélium provenant des tubes inclinés (tube de banque) décrit en 2.1 est utilisée pour ensemercer directement d'autres tubes contenant le même milieu, et

l'incubation se fait dans les mêmes conditions. Ce passage additionnel réduit la durée de vie de cette deuxième banque, à un mois.

3. MILIEUX DE CULTURE

3.1 Substrat

Le substrat utilisé dans les milieux de culture liquides et solides est le galactomannane de gomme de caroube (LBG, Locust bean gum; Sigma Chem. Co.) obtenu des graines de *Ceratonia siliqua*. Le galactomannane de gomme de caroube est utilisé à cause de son degré de substitution par le D-galactose (gal:man = 20:80) suffisant pour permettre la solubilité sans interférer avec l'hydrolyse par la β -mannanase.

3.2 Milieu pour la production de l'inoculum

Les spores provenant des cultures sur tubes inclinés, suspendues dans un volume minimal de bouillon tryptone de soya (TSB; DIFCO, Detroit, Michigan, USA) servaient pour inoculer 25 mL de TSB dans un Erlenmeyer de 125 mL, ou 100 mL du même milieu dans un Erlenmeyer de 500 mL selon l'inoculum requis pour l'expérience.

Le TSB est préparé en dissolvant 30 g de poudre dans 1 L d'eau distillée, donnant un pH de 7.2 - 7.3. En milieu liquide, si nécessaire, la thiostreptone est ajoutée à raison de 5 µg/mL, après stérilisation.

3.3 Milieu de production pour la mannanase

Pour la production d'enzyme en culture submergée, le milieu M13 modifié (Bertrand et al., 1989) est utilisé. La composition par litre d'eau distillée est la suivante: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.4 g; K_2HPO_4 , 2.5 g; KH_2PO_4 , 1.0 g; solution de sels minéraux¹, 1.0 mL; huile d'olive Bertolli, 2.0 mL. Le pH est ajusté à 7.0 avec du NaOH 1N et 10 g de galactomannane (LBG) sont ajoutés. Ce milieu a été nommé milieu de production Arc-GM. Lorsque le milieu est stérilisé, 10 mL/L d'une solution stérile de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ à 3% (p/v = poids/volume) et 6 mL/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à 5% (p/v) sont ajoutées.

3.4 Milieu de dépistage

Le milieu minimal Stewart modifié (Daigneault-Sylvestre et Kluepfel, 1979) comprenant 1% de galactomannane (LBG) et de la thiostreptone, contient par litre de milieu: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.0 g;

¹- La solution de sels minéraux de Mandels contient, pour 100 mL d'eau distillée: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 140 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 160 mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 500 mg; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 200 mg.

KH_2PO_4 , 1.5 g; K_2HPO_4 , 5.0 g; solution de sels minéraux de Mandels, 1.0 mL; KCl , 0.5 g; agar, 17.0 g; et 10.0 g de galactomannane (LBG). Le pH est ajusté à 7.2 et après stérilisation, 10 mL d'une solution stérile de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à 5% (P/V) sont ajoutés.

3.5 Milieu pour la régénération des protoplastes

Les protoplastes sont régénérés sur le milieu R5 (Hopwood et al., 1985). Chaque litre du milieu contient: sucrose, 103 g; K_2SO_4 , 0.25 g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10.12 g; glucose, 10 g; casamino acids (Difco), 0.10 g; solution de microéléments¹, 2 mL; extrait de levure (Difco), 5 g; tampon TES, 5.73 g; agar (Difco), 22 g .

Après stérilisation, les solutions suivantes sont ajoutées: KH_2PO_4 0.5% (p/v), 10 mL; CaCl_2 5M, 4 mL; L-proline à 20% (p/v), 15 mL; CuSO_4 5 mg/mL, 1 mL; méthionine 1% (p/v), 10 mL, tyrosine 0.4 g dans 5 mL de NaOH 1N, 5 mL. Une fois le milieu réparti dans les plats de Petri, ceux-ci sont gardés à la température de la pièce jusqu'à ce qu'ils perdent environ 15% de leur poids initial, ce qui prend de 3 à 4 jours.

¹- La solution de microéléments contient, par litre d'eau distillée: ZnCl_2 , 40 mg; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 200 mg; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10 mg; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 10 mg; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10 mg.

3.6 Milieu LB agar

Le milieu LB agar contient par litre d'H₂O distillée; 10 g de tryptone (Difco); 5 g d'extrait de levure (Difco); 5 g de NaCl; et 11 g d'agar (Difco).

4. CONDITIONS DE CULTURE

Les milieux pour la production de l'inoculum (TSB) et pour la production d'enzyme (Arc-GM) sont incubés à 34°C, dans un agitateur rotatif (New Brunswick Sci. Co., modèle G25) à 240 rpm. Les cultures en milieux TSB sont homogénéisées au départ avec un homogénéisateur, afin d'obtenir une culture homogène en phase logarithmique après 20 heures d'incubation.

Un inoculum de 5 à 6% (v/v) est transféré dans un milieu Arc-GM et incubé durant 72 heures pour la production d'enzyme.

5. CRIBLAGE D'UNE BANQUE GÉNOMIQUE DE *Streptomyces lividans*

5.1 Rappel concernant la banque génomique

Une banque génomique représentative du génome de *Streptomyces lividans* souche 1326 (génome d'environ 6,000 kb) a été constituée dans le vecteur pIJ702. En insérant au site unique *Bgl*II de

pIJ702, des fragments d'ADN chromosomique variant de 4 à 10 kb (obtenus par digestion partielle avec l'enzyme de restriction *Sau3A*), il y a interruption du gène responsable de la formation de mélanine. Les clones sont étalés sur milieu R5 (voir section 3.5) et incubés à 34°C. Les colonies, transformées par un plasmide recombinant, sont blanches tandis qu'en absence d'une insertion, permettant la production de mélanine, les colonies sont noires.

5.2 Criblage de la banque génomique (25,875 clones)

L'activité enzymatique de la β -mannanase est détectée par la formation de zone d'hydrolyse autour des colonies, sur le milieu de dépistage, après incubation des plats de Petri à 34°C pour 48 heures. La visualisation des zones d'hydrolyse, est améliorée par une coloration au rouge Congo (J.T. Baker Chem. Co., Phillipsburg, N.J., USA) selon la méthode de Teather et Wood (1982). La figure suivante, résume les étapes pour purifier et conserver les clones β -mannanase positifs.

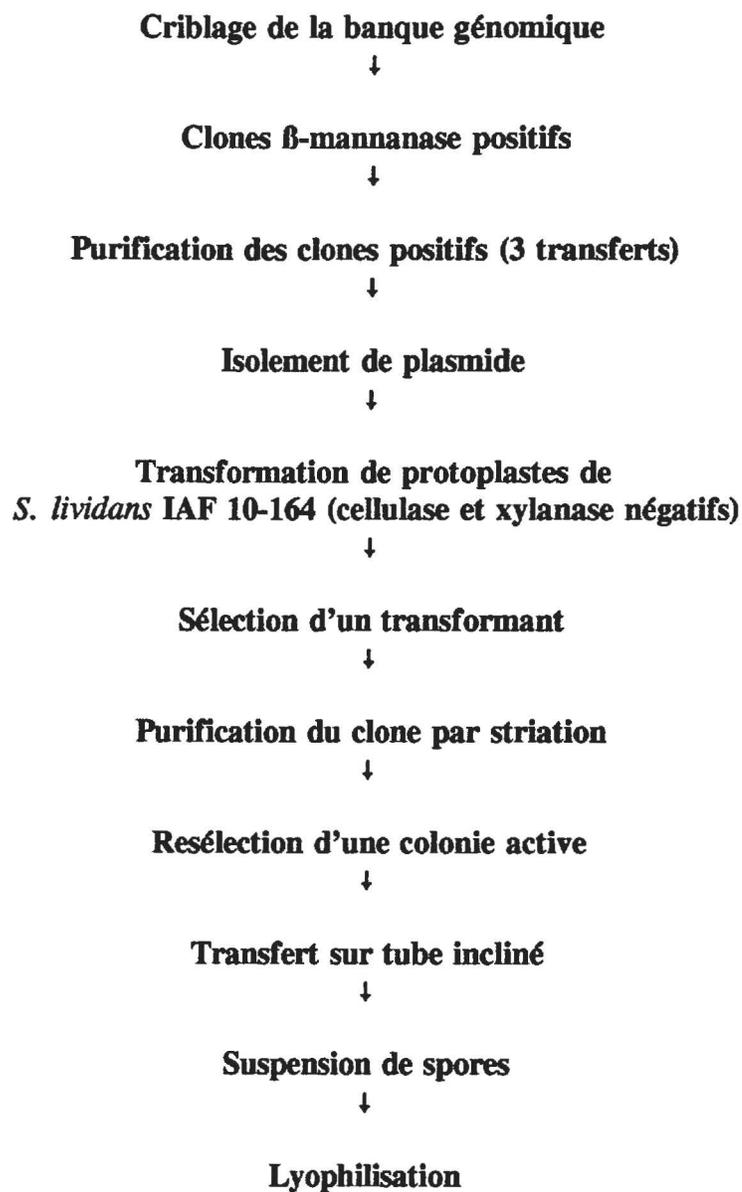


Figure 5: Schéma de purification et conservation des clones.

5.3 Purification des clones β -mannanase positifs

Cette étape est essentielle pour s'assurer de l'homogénéité du clone. Des suspensions de spores sont préparées dans 10 mL d' H_2O distillée stérile contenant 0.1% de Tween 80, en grattant la surface avec un fil de platine. Cette suspension est filtrée à travers de la laine de verre dans un Erlenmeyer de 125 mL, contenant des billes de verre et une barre magnétique stérilisées. Par agitation rapide à la température de la pièce durant 5 minutes, cette suspension homogène de spores est diluée en série de 10^{-2} à 10^{-7} , avec de l'eau distillée stérile contenant 0.1% de Tween 80. De chacune des dilutions, 0.1 mL est étalé avec une tige de verre recourbée, sur un plat de Petri contenant 20 mL du milieu solide Stewart modifié galactomannane. Ces plaques sont incubées à $34^{\circ}C$, pendant 2 à 3 jours. Après ce temps, une coloration au rouge Congo permet de mieux visualiser les zones d'hydrolyse autour des colonies β -mannanase positives.

5.4 Isolement de plasmide

Les plasmides sont isolés selon la méthode de Kieser (1984).

6. PRÉPARATION DE PROTOPLASTES DE *Streptomyces lividans*

Pour préparer des protoplastes, un milieu YEME 0.5% de glycine ou un TSB 0.5% de glycine, est ensemencé à 5% (v/v) avec l'inoculum produit en TSB, puis incubé à 30°C, 240 rpm d'agitation, pour environ 40 heures. Le mycélium est récupéré par une centrifugation de 10 minutes dans une centrifugeuse clinique, à 4,000 rpm. Suivent deux lavages en sucrose 10.3%. La solution de lysozyme (Boehringer) est ensuite ajoutée au mycélium, et la digestion des parois cellulaires est activée par une incubation à 34°C au bain-marie, 1 heure (ou jusqu'à ce que le mycélium soit presque entièrement transformé en protoplastes, ce qui est estimé par une observation au microscope). Le mycélium non protoplasté est éliminé par une filtration sur laine de verre ou de coton. Les protoplastes sont récupérés par une centrifugation, 10 minutes à 4,000 rpm dans la centrifugeuse clinique. Le surnageant est décanté, et le culot est resuspendu dans une goutte de tampon P restant au fond du tube. Suivent deux lavages (2X) en tampon P. La composition du tampon P est la suivante: sucrose, 103 g; K_2SO_4 , 0.25 g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 2.02 g; solution de microéléments (voir la section 3.5), 2 mL; eau distillée, 800 mL. Stériliser en aliquots de 80 mL et, avant usage, ajouter à chaque aliquot les solutions stériles suivantes: KH_2PO_4 0.5% (p/v), 1 mL; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 3.68% (p/v), 10 mL; tampon TES 5.73% ajusté à pH 7.2, 10 mL.

Pour estimer la quantité de protoplastes, un aliquot de la préparation de protoplastes est dilué de façon à obtenir une lecture de densité optique de moins de 0.1, à 600 nm. La quantité de protoplastes présents est déterminée en se rapportant à une courbe, représentant la D.O. en fonction du nombre de protoplastes par mL.

7. MÉTHODE DE TRANSFORMATION

Pour introduire de l'ADN plasmidique dans les streptomycètes, des protoplastes de *S. lividans* IAF 10-164 sont mélangés avec l'ADN et du polyéthylèneglycol (PEG) (Hopwood et al., 1985). La suspension est étalée sur le milieu de régénération R5 et incubés à 34°C durant 16 heures. Après, de la thiostreptone est ajoutée sur les plats de Petri pour obtenir une concentration finale de 50 µg de thiostreptone par mL de milieu. L'incubation se continue jusqu'à 72 heures.

7.1 Sélection des transformants

Les colonies blanches isolées sur milieu R5, sont transférées sur un milieu Stewart modifié galactomannane. Après 3 à 5 jours d'incubation à 34°C, les colonies blanches produisent des zones d'hydrolyse. Après avoir établi l'homogénéité par resélection, une colonie estensemencée sur

un tube incliné contenant du milieu Bennett agar. Ce clone est conservé par lyophilisation de ses spores.

8. CARTOGRAPHIE ET SOUS-CLONAGE

8.1 Digestion avec enzymes de restriction

La cartographie de chaque insertion est étudiée, par digestion simple et double avec des endonucléases de restriction. Une unité d'enzyme par μg d'ADN est utilisée dans le tampon "One-Phor-All Buffer PLUS" 10X (Pharmacia LKB Biotechnology) contenant 100 mM Tris-acétate (pH 7.5), 100 mM magnésium acétate et 500 mM potassium acétate, suivi d'une incubation de quatre heures à 37°C dans un volume de 30 μL .

8.2 Electrophorèse de l'ADN

L'ADN est analysé par électrophorèse sur gel de 0.7% d'agarose dissous dans un tampon TBE (0.089 M Tris, 0.089 M acide borique, 0.02 M EDTA), dans un appareil à électrophorèse "DNA sub cell" de Bio-Rad. Une tension de 5 Volts/cm est appliquée durant 16 heures.

8.3 Sous-clonage

L'ADN digéré (selon la méthode décrite à la section 8.1)

dans un volume final de 10 μ L, est relié par la T4 ADN ligase, dans le tampon "T 10X ligase", durant 16 heures à la température de la pièce. Le lendemain, des protoplastes de *S. lividans* IAF 10-164 sont transformés avec chacun des plasmides sous-clonés.

En repiquant les transformants de chaque clone positif, sur milieu Stewart modifié galactomannane, c'est possible de déterminer les zones d'hydrolyse du substrat. L'ADN de chaque colonie est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose afin de faire correspondre la présence d'un fragment contenu dans l'insertion, avec la grosseur de la zone d'hydrolyse. Ainsi, il est possible de localiser le gène codant pour la β -mannanase.

8.4 Hybridation de type "Southern"

L'ADN est digéré avec plusieurs enzymes de restriction dans le but de générer des fragments de l'insertion. Après électrophorèse sur agarose, les gels sont recouverts avec une solution de 1.5 M NaCl et 0.5 M NaOH pour dénaturer l'ADN, et transférés dans une solution 1 M Tris-HCl pH 8.0, 1.5 M NaCl. L'ADN est transféré en 30 minutes d'un gel d'agarose sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher et Schuell Inc., Keene, NJ, USA) par la méthode de Southern (1975), en utilisant un tampon 10X SSC (= 1.5 M NaCl et 0.15 M citrate de sodium) sous

le vide, par l'appareil Vacublot Vac-1000 (ABN, Emeryville, Californie, USA). L'ADN est fixé sur la membrane par chauffage à 80°C sous vide pendant deux heures.

8.5 Marquage de l'ADN

La préparation des sondes pour détecter le gène codant pour l'enzyme, est effectuée par une digestion du plasmide recombinant afin de libérer le fragment portant le gène en question. Après électrophorèse sur gel d'agarose, le fragment d'ADN est électro-élué selon la technique "Extraphor" basée sur l'utilisation d'une barrière saline hautement conductive. Les molécules éluées par électrophorèse, sont ainsi concentrées dans ce tampon "high salt" (3 M acétate de sodium). 1 µg d'ADN est marqué par déplacement de l'encoche avec l'ADN polymérase I de *E. coli* et la ADNase I de pancréas de boeuf. L'incorporation du ³²P est réalisée en ajoutant 100 µCi de [α -³²P]dCTP (10 µL) ayant une activité spécifique de 3000 Ci/mme (ICN, Co.). L'incubation dure 60 minutes à 13°C. Les précurseurs radioactifs non incorporés dans l'ADN sont éliminés par centrifugation ("Spun column") (Maniatis et al., 1982).

8.6 Hybridation de l'ADN

Après avoir fixé l'ADN sur une membrane de nitrocellulose,

celle-ci est plongée dans une solution de pré-hybridation contenant 50% formamide (v/v), 5X SSC, 0.1% SDS, solution de Denhardt's 5X (1% Ficoll, 1% PVP, 1% BSA) ainsi que 100 µg/mL d'ADN de sperme de saumon dénaturé. Après une heure d'incubation à 55°C (Maniatis et al., 1982), la solution de pré-hybridation est remplacée par la solution d'hybridation, de la même composition contenant en plus, la sonde. L'hybridation dure 16 heures à 55°C. La membrane est lavée successivement par du tampon 2X SSC / 0.1% SDS à la température de la pièce pendant 10 minutes, puis une heure dans du tampon 0.1X SSC / 0.1% SDS, à 68°C. Elle est séchée à la température de la pièce et autoradiographiée sur un film Kodak X-Omat AR (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA), avec des écrans intensifiants. L'exposition dure de 3 à 16 heures à -70°C .

8.7 Délétion de l'ADN avec l'exonucléase III

Le fragment d'ADN contenant le gène codant pour l'enzyme, est digéré par l'exonucléase III. L'ADN double brin avec extrémités franches et 5' protubérantes est un bon substrat pour l'exonucléase. Par contre, les extrémités 3' protubérantes de plus de trois nucléotides de longueur, sont résistantes à l'enzyme (Henikoff, 1984). Nous nous sommes servi du système "double-stranded Nested Deletion" de Pharmacia. La linéarisation du plasmide recombinant est réalisée en utilisant des enzymes de restriction appropriées qui ont des sites de

restriction uniques dans la construction plasmidique. Deux extrémités, 3'-4 bases protubérantes et 5'-4 bases protubérantes, sont générées. Après avoir inactivé les endonucléases de restriction à 70°C durant 10 minutes, la réaction de délétion se fait à la température de la pièce en présence de 10 µg d'ADN plasmidique (linéarisé), 75 mM NaCl, tampon pour l'*ExoIII* et H₂O. 2.5 µL d'*ExoIII* est ajouté et la réaction s'effectue dans un volume final de 80 µL. À toutes les 5 minutes, 8 µL de mélange réactionnel (*ExoIII*) est prélevé et placé dans un microtube Eppendorf contenant 12 µL de nucléase S1, refroidi sur glace. Après 50 minutes, tous les échantillons (en présence de la nucléase S1) sont incubés à la température de la pièce durant environ une heure. La nucléase S1 dégrade l'ADN simple brin et donne des fragments d'ADN à bouts francs. Ensuite, 4 µL de tampon d'arrêt est ajouté à chaque microtube Eppendorf et ces derniers sont incubés à 65°C durant 10 minutes. L'analyse des délétions d'ADN est faite par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8%. La recircularisation de l'ADN (à bouts francs) pour chaque échantillon, est effectuée en utilisant la T4 ADN Ligase. Le mélange suivant, "Ligase mix", PEG 25%, 10 mM ATP, H₂O, est ajouté à 3 µL de chaque échantillon. La ligation à 16°C dure 16 heures. Par la suite, une transformation des cellules compétentes de *E. coli* JM83 est réalisée. Ces dernières sont étalées sur plats de Petri contenant un milieu LB agar avec 1% du substrat approprié et

100 μg d'ampicilline par mL de milieu. Après une incubation des plats de Petri à 37°C pendant 16 heures on observe si les colonies (transformants) donnent des zones d'hydrolyse. Chaque colonie positive ou négative, sélectionnée au hasard, est transférée dans un tube contenant 2 mL de milieu LB et 8 μL d'ampicilline (25 mg/mL). Après incubation à 37°C, ces cultures servent à l'extraction de plasmide. Les fragments délétés sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1.2%. Certains fragments d'ADN sont choisis et purifiés en gradient de CsCl, afin d'effectuer le séquençage du gène codant pour l'enzyme, selon la méthode des didéoxynucléotides développée par Sanger et al. (1977).

9. FERMENTATION EN "BATCH"

Une suspension de spores provenant de tubes de travail, est homogénéisée avec un homogénéisateur, et sert à inoculer 50 mL de TSB (plus thiostreptone) dans un Erlenmeyer de 300 mL. L'incubation à 34°C, 240 rpm ne dépasse pas 24 heures. Après ce temps, la stérilité est vérifiée au microscope optique. Un inoculum de 6% provenant du milieu TSB plus thiostreptone est transféré dans un Erlenmeyer de 2 L contenant 400 mL de milieu Arc-GM. L'incubation à 34°C dure de 72 à 96 heures, avec une agitation de 240 rpm.

9.1 Filtration et précipitation

Dans le but de séparer le surnageant du mycélium, la culture est filtrée sur une couche de 3 cm de terre de diatomées déposée dans un entonnoir Buchner. Le filtrat est ajouté lentement sous agitation à 3 volumes d'éthanol 95% froid. Le précipité, déposé au fond du récipient pendant la nuit, peut être récupéré par décantation et par filtration.

10. DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

10.1 Détection de l'activité mannanasique sur plats de Petri

La détermination qualitative de l'activité mannanasique est réalisée sur un milieu solide Stewart modifié galactomannane. Ce milieu peut servir pour le dépistage de colonies produisant la β -mannanase ou pour l'analyse qualitative de l'activité mannanasique d'une solution enzymatique. Pour l'analyse qualitative, des trous de 5 mm de diamètre sont percés dans la gélose, et 50 μ L de la solution enzymatique à analyser, est déposé. Le plat de Petri, placé dans un sac de plastique, est incubé à 40°C durant 16 heures.

10.2 Mesure quantitative de l'activité de la β -mannanase (EC 3.2.1.78)

Le test des sucres réducteurs est effectué de façon semblable au test de la xylanase adapté de Miller et al. (1959). Le principe est le suivant, la β -mannanase, en présence du galactomannane (LBG), libère des oligomères du mannane. En scindant la chaîne de mannose, une extrémité réductrice est créée, qui, dans une réaction d'oxydo-réduction avec l'acide dinitro-salicylique (DNS), modifie la couleur originale de celui-ci. Le nombre de ces groupes réducteurs peut être mesuré par spectrophotométrie à 575 nm et comparé à une courbe standard de D-mannose. Un mL d'une solution enzymatique est mélangé dans un tube de 10 mL avec 1 mL d'une solution aqueuse de 0.5% galactomannane (LBG, Sigma), préalablement chauffée jusqu'à ébullition. Après une incubation de 10 minutes à 57°C, au bain-marie, les tubes sont refroidis et 2 mL de DNS sont ajoutés. La réaction est arrêtée dans un bain d'eau bouillante pendant 15 minutes. Les éprouvettes sont ensuite refroidies dans l'eau et 4 mL d'eau déionisée sont ajoutés à chacune. Les échantillons sont lus, contre un témoin d'échantillon, au spectrophotomètre à 575 nm. Le substrat (galactomannane), est préparé de la façon suivante: 100 g de LBG est suspendu dans 2 L d'éthanol 80% (v/v) et chauffé dans l'eau bouillante durant 10 minutes, filtré sur un entonnoir Buchner, et le résidu est lavé avec de l'éthanol 80%. Le précipité est alors dissous dans

2 L d'eau distillée froide à 4°C. Le lendemain, 3 L d'eau distillée (à 22°C) sont ajoutés et la solution est passée à l'homogénéisateur (à vitesse maximale), pendant deux minutes. Par centrifugation à 5,000 rpm durant 30 minutes, la fraction soluble est séparée. Le LBG est reprecipité avec 2 volumes d'éthanol 95% et séché à l'acétone. Pour le test des sucres réducteurs, la composition des solutions utilisées est la suivante; a) tampon McIlvaine 0.1 M composé d'une solution de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à 0.2 M et diluée avec une solution d'acide citrique à 0.1 M, pour obtenir un pH de 6.75 à 25°C (McIlvaine, 1921), b) solution d'acide dinitro-salicylique, composée de: NaOH, 10 g; acide dinitro-salicylique, 10 g; phénol, 2 g; sodium potassium tartrate, 200 g, par litre d'eau déionisée (Miller et al., 1960). Comme cette solution contient un agent réducteur, elle est conservée à l'obscurité pour préserver l'intégrité des composés et, au moment de l'utiliser, est additionnée de 0.5 mL de sulfite de sodium 10% par 100 mL de DNS. Avant le dosage des sucres réducteurs, l'enzyme est diluée dans le tampon McIlvaine pH 6.75, de manière appropriée, pour obtenir une valeur de densité optique qui se situe entre 0.1 et 0.2. L'activité relative de la β -mannanase est exprimée en $\mu\text{mole/mL/min}$ (unité internationale), définie par le nombre de μmole de sucres réducteurs libéré en une minute.

10.3 Détermination des protéines

Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry et al. (1951), en utilisant l'albumine du sérum bovin (fraction V, Sigma Chem. Co.) comme standard.

10.4 Activité spécifique

L'activité spécifique d'une enzyme est exprimée en $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ ou UI/mg et est obtenue en divisant l'activité relative par la concentration en protéines, de la solution.

11. PURIFICATION

11.1 Courbe de titration électrophorétique

La détermination d'une courbe de titration électrophorétique d'une protéine, est réalisée par focalisation isoélectrique sur un gel de polyacrylamide contenant des ampholines formant un gradient de pH de 3 à 9 (PhastgelTM 3-9) en utilisant un appareil PhastSystemTM (Pharmacia, 1989). L'échantillon est appliqué dans un puits central faisant la largeur du gel. Les protéines migrent sur le gel perpendiculairement au gradient de pH, selon leurs charges positives et négatives et s'arrêtent au point de leur équilibre. Une protéine montre différentes mobilités électrophorétiques à

différentes valeurs de pH. Une ligne courbe continue se forme pour chacune des protéines présentes dans le surnageant de culture. Cette technique permet de déterminer le pH de la plus grande mobilité électrophorétique et les conditions optimales pour séparer une protéine par rapport aux autres. Ainsi, le pH permettant la meilleure séparation, sera celui du tampon utilisé pour la purification par HPLC. Le gel de la courbe de titration électrophorétique est coloré à l'argent.

11.2 Purification par HPLC (colonne DEAE)

Dans le procédé de purification, le précipité est dissous dans un tampon Tris-HCl, 0.02 M, pH 8.5 (Gomari, 1955) préalablement filtré sur une membrane de 0.22 μm (Millipore Milli-Q). Cette solution est dialysée contre le même tampon à 4°C durant 24 heures, centrifugée, filtrée et diluée 1:2 toujours avec le tampon Tris-HCl pour obtenir un même pH et une même conductivité que le tampon de départ. Cette solution est centrifugée à 18,000 rpm pendant 30 minutes à 4°C et filtrée à travers une membrane de 0.22 μm . La solution est passée sur une colonne à échange anionique DEAE-5-PW (WatersTM, Millipore) contenant les groupements actifs diéthyl-aminoéthyles liés à un polymère à base de silice. La colonne DEAE était préalablement équilibrée avec le même tampon à un débit de 8 mL/min, contenant 5% du tampon d'éluion (Tris-HCl 0.02 M, pH 8.5 contenant 1 M NaCl). La colonne est lavée pendant une heure avec le même

tampon afin d'éliminer tous résidus.

Le principe de la séparation est le suivant: la colonne, contient des groupements actifs diéthyl-aminoéthyles chargés positivement. Selon l'importance de leurs charges négatives, les protéines s'accrochent plus ou moins fortement à ces groupements. L'enzyme est éluée avec un gradient linéaire de 0 à 1 M de NaCl en 75 minutes. Les fractions sont récoltées à la sortie du détecteur d'absorbance UV à raison de 8 mL par fraction et l'activité enzymatique est déterminée. Les fractions actives sont combinées et dialysées contre de l'eau déionisée Milli-Q, à 4°C, pour éliminer les sels.

11.3 Analyse de la pureté de l'enzyme

La purification de l'enzyme est démontrée par une augmentation de l'activité spécifique, ce qui permet de calculer le facteur de purification à chaque étape. De plus, l'homogénéité de la préparation d'enzyme peut être vérifiée par SDS-PAGE (Phastgel™ 12.5%) selon la méthode de Laemmli (1970), de la manière suivante:

Un volume de 10 µL d'échantillon est ajouté à 5 µL de tampon d'échantillon 3x composé de: solution de Tris-EDTA pH 8 (Tris, 124.1 mg; EDTA, 37.2 mg; eau déionisée, 80 mL; pH ajusté à 8 avec une solution de HCl 1N), 10 mL; SDS, 250 mg;

β -mercaptoéthanol, 500 μ L et de 1 mg de bromophénol bleu. L'échantillon est placé dans l'eau bouillante pendant 7 minutes, puis 4 μ L est introduit dans un applicateur (Applicator 6/4, Pharmacia) qui est déposé sur le gel de concentration. La migration est réalisée dans l'unité de séparation du PhastSystemTM selon la méthode décrite par Pharmacia (1989). Le gel est coloré à l'argent, dans l'unité de développement du PhastSystemTM de Pharmacia.

11.4 Lyophilisation de l'enzyme

Les fractions contenant l'enzyme purifiée sont combinées dans un petit Erlenmeyer, congelées sur de la glace sèche et lyophilisées avec un appareil VIRTIS modèle 10-147 (Gardiner, New York, USA).

12. DÉTERMINATION DES CARACTÉRISTIQUES DE L'ENZYME

12.1 Masse moléculaire

La masse moléculaire est déterminée par SDS-PAGE selon la méthode de Laemmli (1970), en utilisant un appareil PhastSystemTM et par coloration du gel au nitrate d'argent. Les échantillons migrent sur le gel, en parallèle avec une gamme de protéines de masses moléculaires connues composée de: α -lactoglobuline, 14.4 kDa; inhibiteur de trypsine de soya, 20.1

kDa; anhydrase carbonique, 30 kDa; ovalbumine, 43 kDa; BSA, 67 kDa et de phosphorylase B, 94 kDa (Electrophoresis calibration Kit, LMW, Pharmacia). Cette échelle de masses moléculaires standard permet d'établir une régression linéaire du logarithme de la masse moléculaire en fonction du Rf (distance de migration de la protéine / distance totale). Le Rf de la protéine étudiée est localisé sur cette courbe pour déterminer sa masse moléculaire.

12.2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

Le SDS-PAGE est effectué de façon non-automatisée. La préparation du gel de polyacrylamide et du tampon de migration est établie selon Laemmli (1970) pour un gel de séparation à 12% de concentration. Un volume de surnageant de culture est appliqué tel quel. Des quantités de 100 μ L de l'échantillon sont mélangées à 50 μ L de tampon-échantillon 3x constitué de 0.187 M Tris-HCl pH 6.8, 6% SDS, 30% glycérol, 15% β -mercaptoéthanol, 0.003% bleu de bromophénol. Le mélange est bouilli pour 10 minutes et déposé dans un puits du gel. L'échantillon migre selon un courant continu de 10 mA pendant 16 heures, en parallèle avec une gamme de protéines pré-colorées de masses moléculaires connues: myosine, 200 kDa, phosphorylase B, 92.5 kDa, albumine sérique bovine, 69 kDa, ovalbumine, 46 kDa, anhydrase carbonique, 30 kDa, inhibiteur de trypsine de

soya, 21.5 kDa et lysozyme, 14.3 kDa (Rainbow MarkersTM, Molecular range 14,300 - 200,000, Amersham International, Canada). Le gel est ensuite coloré à l'argent.

12.3 Température, pH et temps d'incubation optimum

Pour l'étude de ces trois paramètres, l'activité est évaluée par la méthode de DNS de Miller et al. (1960) en utilisant le galactomannane comme substrat. À partir d'une solution mère d'enzyme à 1 mg/mL, des dilutions allant de 1/200 jusqu'à 1/2000 fournissent des lectures d'absorbance à l'intérieur des courbes standards pour chacun des paramètres étudiés. L'effet de la température sur l'activité mannanasique est établi à des températures d'incubation variant de 35°C à 70°C. Une courbe de l'activité relative de l'enzyme en fonction de la température détermine la température optimale de l'enzyme. Le pH optimum de la mannanase, est étudié à la température optimale de l'enzyme et une gamme de pH variant de 4.5 à 8.0 sert à l'élaboration d'une courbe de l'activité en fonction du pH. Le temps d'incubation optimal est établi au pH et à la température optimum en variant le temps de réaction de 5 à 40 minutes. Une région linéaire est alors obtenue sur la courbe de l'activité relative en fonction du temps d'incubation, contenant la valeur de la durée optimale nécessaire pour l'hydrolyse du substrat.

12.4 Cinétique de l'enzyme

La cinétique de l'enzyme, est étudiée par un dosage des sucres réducteurs dans des conditions de pH, température et temps d'incubation optimales, en fonction de la concentration du substrat de 0.5 à 5.0 mg/mL de galactomannane (LBG, Sigma). L'affinité (K_m), se définit par la concentration de substrat qui donnerait une activité enzymatique égale à $V_{max} / 2$ et la vélocité maximale (V_{max}), par la vitesse maximale de réaction due à une saturation de l'enzyme en substrat, où tous les sites actifs de l'enzyme sont occupés par des molécules de substrat.

Le K_m et le V_{max} peuvent être déterminés en traçant le graphique de Lineweaver et Burk, de l'inverse de l'activité relative en fonction de l'inverse de la concentration du substrat. La pente de la droite représente K_m/V_{max} . À l'interception de l'ordonnée, l'inverse de l'activité relative équivaut à l'inverse de V_{max} et à l'interception de l'abscisse, l'inverse de la concentration en substrat est égale au négatif de l'inverse du K_m .

Les deux paramètres K_m et V_{max} , peuvent aussi être déterminés en traçant le graphique de Eadie-Hofstee, de l'activité relative en fonction du rapport activité relative sur concentration du substrat. À l'interception de l'ordonnée, la valeur indiquée équivaut à V_{max} et la pente de la droite

représente le négatif du K_m .

12.5 Stabilité de l'enzyme

L'étude de la stabilité de l'enzyme est effectuée aux températures suivantes: 4°C, 30°C, 38°C, 42°C, 50°C et 57°C. L'enzyme est incubée à ces différentes températures, dans du tampon McIlvaine 0.1 M pH 6.75 et en absence de substrat (galactomannane).

12.6 Production d'anticorps

Le protocole d'immunisation des lapins décrit à la figure 6 est le même que celui qui a servi à la production d'anticorps contre les xylanases et l'endoglucanase de *S. lividans* dans les laboratoires de l'équipe des streptomycètes de l'Institut Armand-Frappier.

L'enzyme pure lyophilisée est redissoute dans un tampon PBS de pH 7.2 composé de: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.45 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.8 g; NaCl , 8.5 g et 0.05 g EDTA par litre d'eau déionisée. Une émulsion du mélange enzyme-adjuvant est préparée en utilisant un système composé de deux seringues de 5 mL et d'une valve à trois voies. L'immunisation de la première semaine est faite avec un adjuvant complet de Freund (Difco, Mi., USA), tandis que

Première semaine

100 µg d'antigène / 1 mL PBS + 1 mL adjuvant complet de Freund
2 injections intramusculaires de 0.5 mL chacune par lapin.

Deuxième et troisième semaine

200 µg d'antigène / 1 mL PBS + 1 mL adjuvant incomplet de
Freund, 4 injections sous-cutanées de 0.25 mL chacune
par lapin.

Repos 1 mois

Septième semaine

200 µg d'antigène / 1 mL PBS + 1 mL adjuvant incomplet de
Freund, 4 injections sous-cutanées de 0.25 mL chacune
par lapin

Huitième semaine

Euthanasie des lapins et récupération du sang
pour la préparation de l'antisérum.

Figure 6: Protocole d'immunisation des lapins pour la production
d'anticorps anti-mannanase de *S. lividans* IAF36.

les suivantes se font en utilisant un adjuvant incomplet de Freund (Difco). Deux lapines âgées de 8 semaines, de race New Zealand sont utilisées pour cette expérience. Une prise de sang pré-immun est pratiquée sur chacun des lapins, avant l'immunisation avec la β -mannanase de *Streptomyces lividans* IAF36. Le sang est prélevé par l'artère d'oreille au cours de l'immunisation. À la fin de l'expérience, le lapin anesthésié est saigné par la ponction cardiaque.

RÉSULTATS

1. CLONES β -MANNANASE POSITIFS

Le criblage de la banque génomique (25,875 clones) représentant le génome de *S. lividans* souche 1326 permettait d'identifier trois clones positifs exprimant l'activité enzymatique de la β -mannanase sur milieu solide Stewart modifié contenant 1% de galactomannane. Il s'agissait des clones *S. lividans* IAF3, IAF36 et IAF61, correspondant à des fragments d'ADN chromosomique (insérés au site *Bgl*II du plasmide pIJ702), de 4.3 kb, 10 kb et 4.1 kb respectivement.

1.1 Cartographie des insertions et sous-clonage

Dans un premier temps, la cartographie de chaque insertion était effectuée par digestions simples et digestions doubles avec des endonucléases de restriction. Dans un deuxième temps, le sous-clonage du gène codant pour la β -mannanase était réalisé en enlevant des petits bouts du fragment d'ADN chromosomique cloné et en observant l'effet de cette manipulation sur l'activité mannanasique. La figure 7 montre la cartographie de restriction des plasmides de chaque clone β -mannanase positifs ainsi que la localisation du gène codant pour cette enzyme, au niveau de chaque insertion.

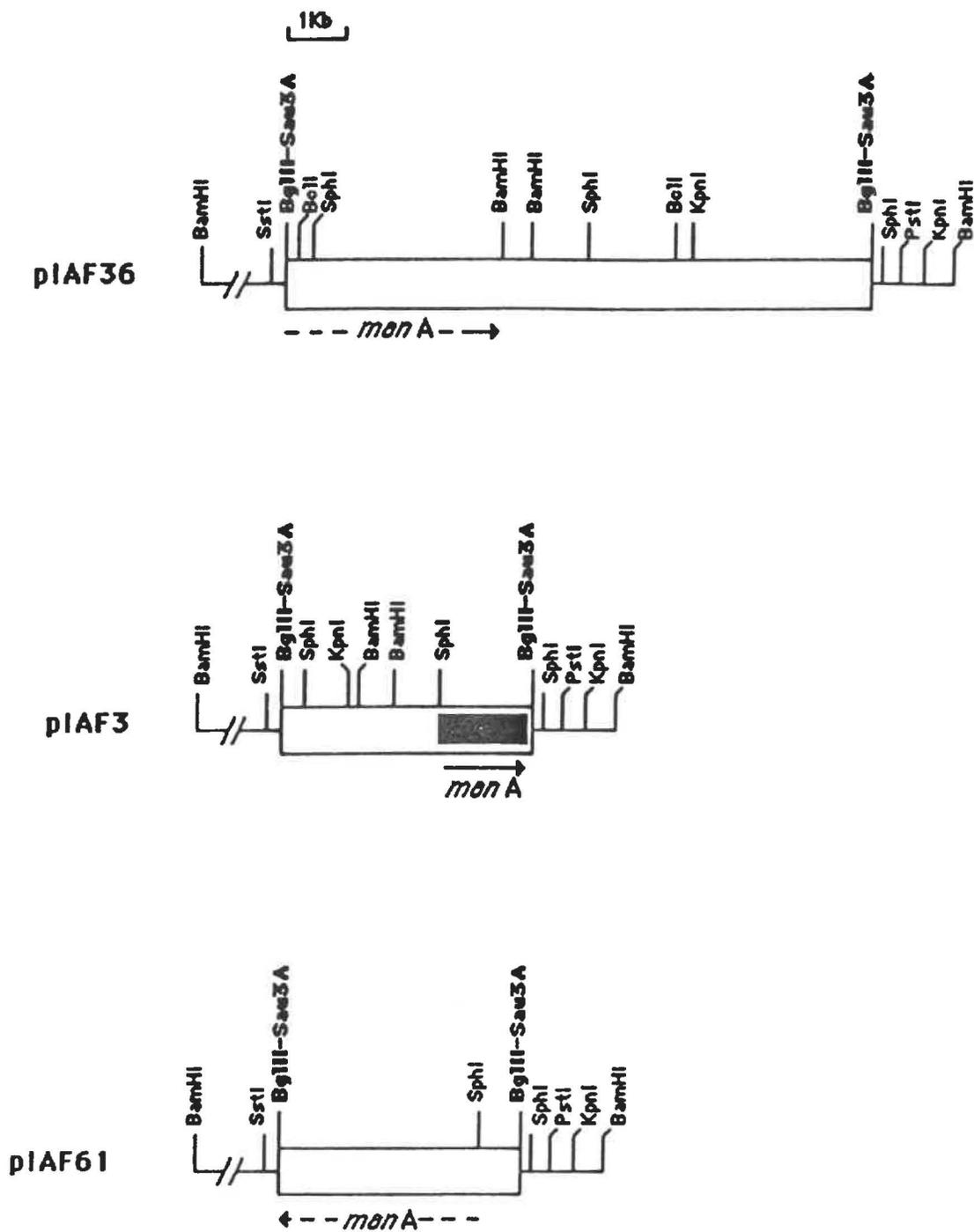


Figure 7: Cartographie de restriction des plasmides pIAF3, pIAF36 et pIAF61.

1.2 Hybridation de type "Southern"

Cette expérience avait pour but de déterminer si le gène codant pour la β -mannanase était homologue chez les trois clones positifs. En effectuant des digestions simples et digestions doubles avec les endonucléases de restriction suivantes; *Bam*HI, *Kpn*I, *Sph*I, *Kpn*I et *Bam*HI, *Sph*I et *Bam*HI, *Sph*I et *Kpn*I, plusieurs petits fragments d'ADN étaient générés à partir du plasmide pIAF3. Pour le plasmide pIAF61, deux digestions simples, l'une avec *Sph*I et l'autre avec *Sal*I étaient performées. Tandis que le plasmide pIAF36 a été digéré par *Bam*HI, *Kpn*I, *Pst*I, *Sph*I, *Sac*I, *Kpn*I et *Bam*HI, *Sph*I et *Bam*HI, *Sph*I et *Kpn*I. Après électrophorèse sur gel d'agarose, le transfert de l'ADN du gel d'agarose sur une membrane de nitrocellulose était réalisé selon la méthode de Southern (1975). Deux sondes (#1 et #2) ont été préparées en digérant pIAF3 avec l'endonucléase de restriction *Sph*I. Ces sondes étaient marquées avec du [α -³²P]dCTP par déplacement de l'encoche et servaient pour l'étude d'hybridation de l'ADN. La figure 8 schématise l'hybridation de type "Southern". La sonde #1 était un fragment *Sph*I de 2.2 kb et ne contenait pas le gène codant pour une activité enzymatique, tandis que la sonde #2 correspondant au fragment *Sph*I de 1.7 kb, contenait le gène *manA* codant pour

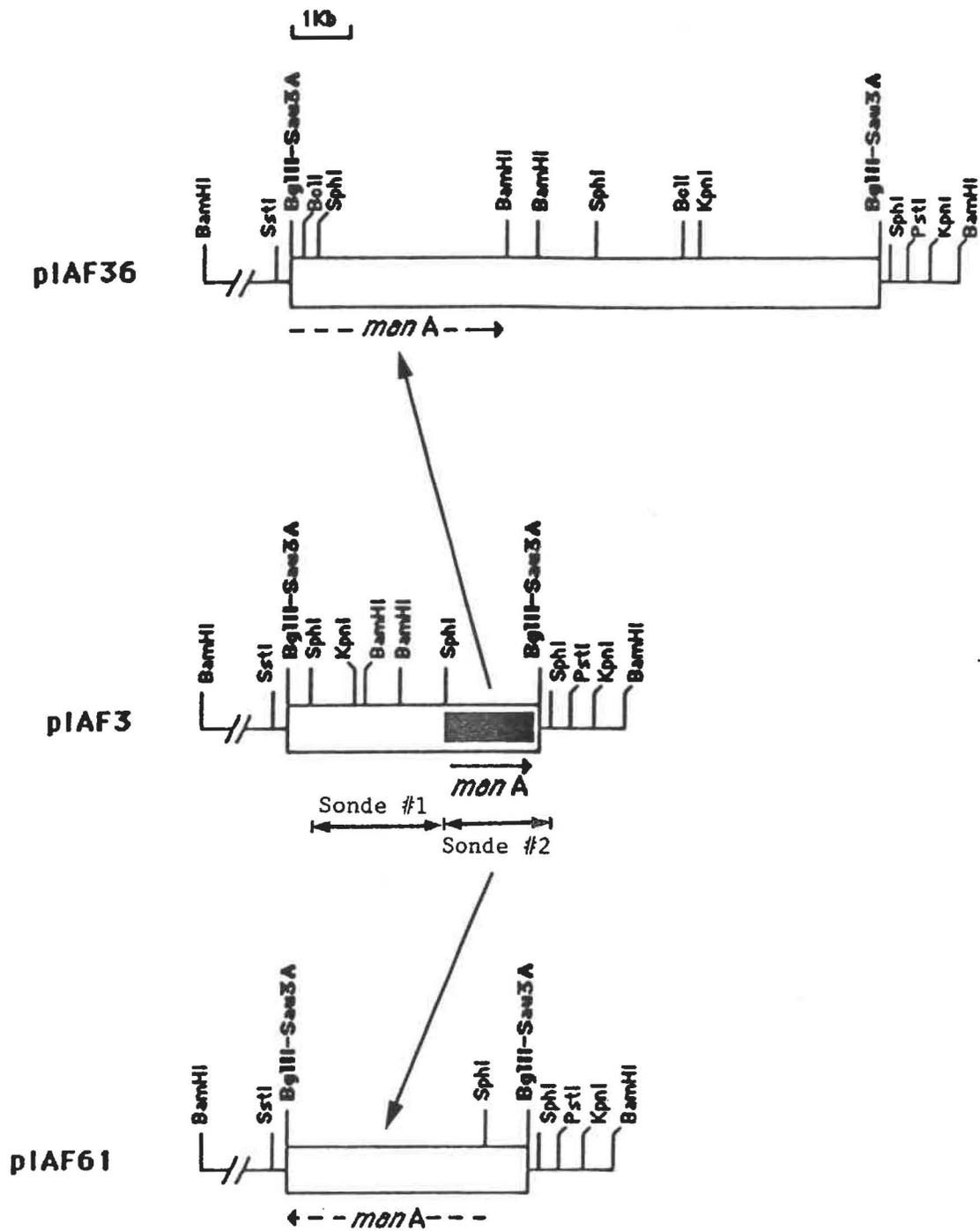


Figure 8: Hybridation de type "Southern".

la β -mannanase. Il y a eu hybridation entre la sonde #2 et le fragment *Bgl*II-*Sau*3A---*Bam*HI du plasmide pIAF36 (figure 10, 4.g.) et aussi avec le fragment *Bgl*II-*Sau*3A---*Sph*I du plasmide pIAF61 (figure 10, 3.g.). Ces résultats permettaient non seulement de situer le gène de la β -mannanase au niveau de chaque insertion, mais aussi indiquaient que le gène *manA* (sonde #2) était homologue chez les trois clones à l'étude. À la figure 9, on retrouve l'autoradiogramme montrant l'hybridation entre les fragments provenant des plasmides pIAF3, pIAF61 et pIAF36 avec la sonde #1 (fragment *Sph*I de 2.2 kb). La figure 10, montre l'hybridation entre les fragments provenant des plasmides pIAF3, pIAF61 et pIAF36 avec la sonde #2 (fragment *Sph*I de 1.7 kb contenant le gène *manA*).

1.3 Délétion de l'ADN avec l'exonucléase III

À partir du vecteur pTZ18U (*E. coli*) et du fragment de 1.7 kb portant le gène codant pour la β -mannanase de pIAF3, une construction plasmidique pNAM1.7+ était réalisée. La figure 11 illustre la construction plasmidique de pNAM1.7+, qui permettait d'effectuer la réaction de délétion de l'ADN chromosomique avec l'exonucléase III.

Figure 9: Autoradiogramme de l'hybridation de type "Southern" avec la sonde # 1 (fragment *SphI* de 2.2 kb, du plasmide pIAF3).

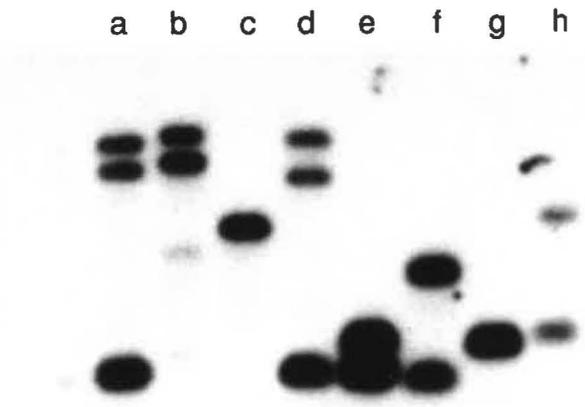
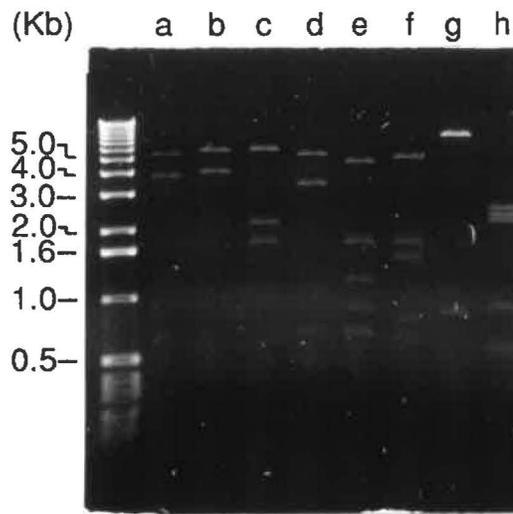
à gauche: Electrophorèse sur gel d'agarose 0.7%.

à droite: Autoradiogramme correspondant.

1 - pIAF3 a. *BamHI*
 b. *KpnI*
 c. *SphI*
 d. *KpnI* + *BamHI*
 e. *SphI* + *BamHI*
 f. *SphI* + *KpnI*
 g. *SphI*
 h. *SalI*
 pIAF61

2 - pIAF36 a. *BamHI*
 b. *KpnI*
 c. *PstI*
 d. *SphI*
 e. *SacI*
 f. *KpnI* + *BamHI*
 g. *SphI* + *BamHI*
 h. *SphI* + *KpnI*

①



②

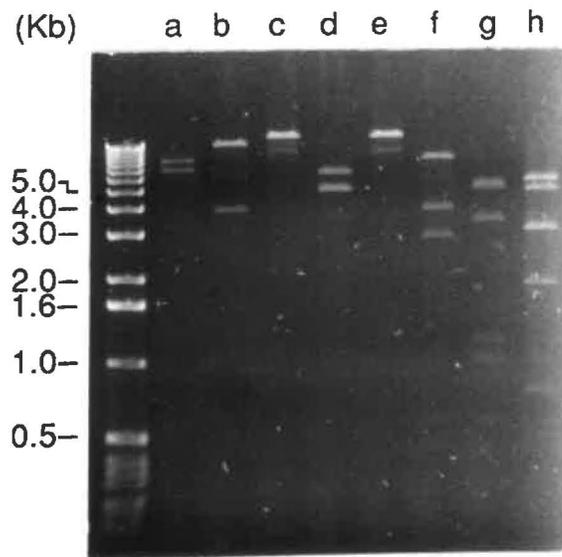


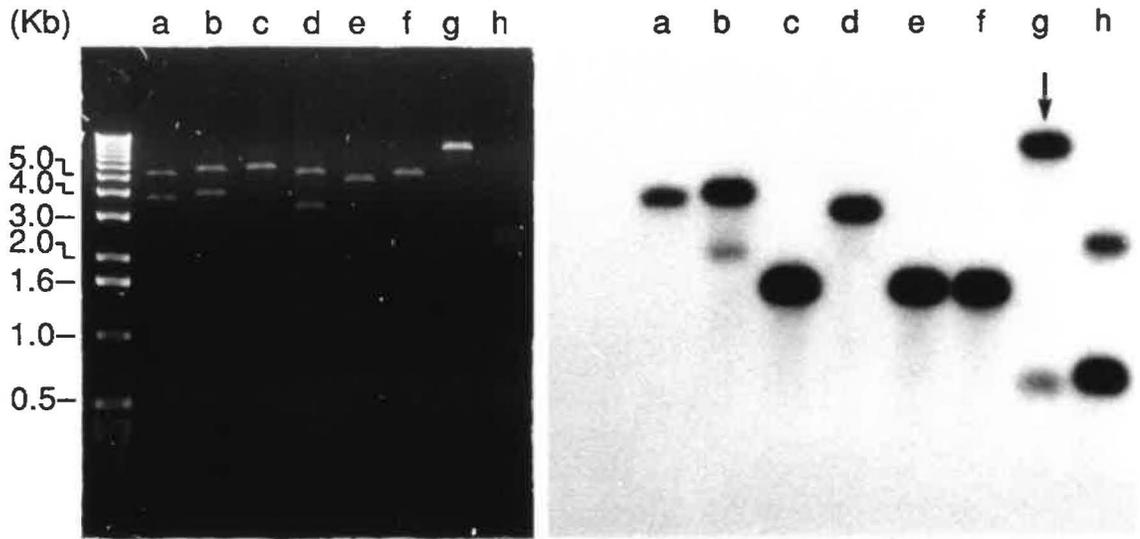
Figure 10: Autoradiogramme de l'hybridation de type "Southern" avec la sonde # 2 (fragment *SphI* de 1.7 kb, du plasmide pIAF3).

à gauche: Electrophorèse sur gel d'agarose 0.7%.

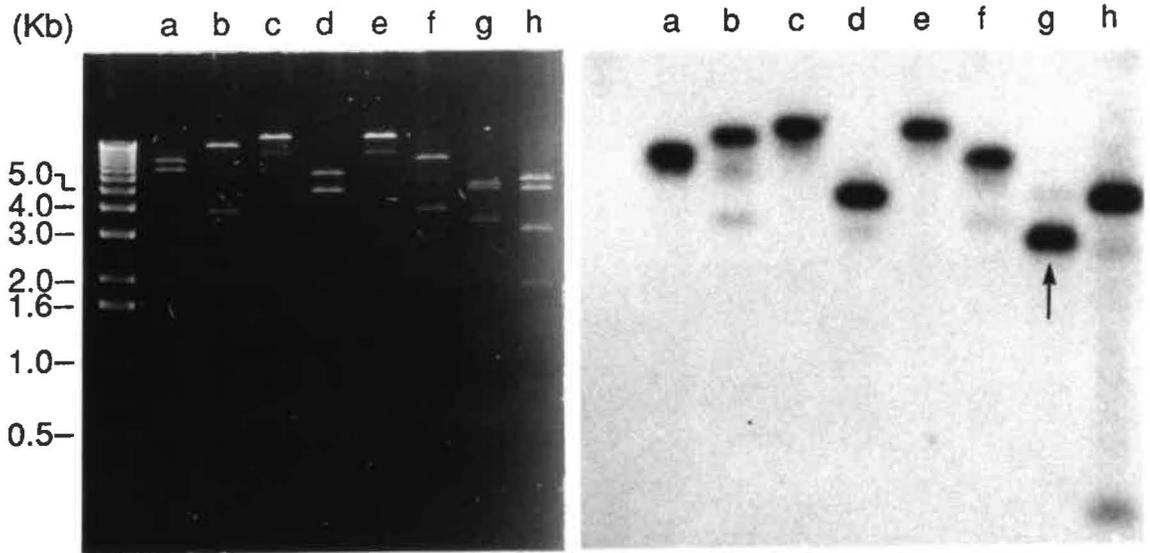
à droite: Autoradiogramme correspondant.

- | | | |
|------------|---|------------------------------------|
| 3 - pIAF3 | a. <i>BamHI</i> | |
| | b. <i>KpnI</i> | |
| | c. <i>SphI</i> | |
| | d. <i>KpnI</i> + <i>BamHI</i> | |
| | e. <i>SphI</i> + <i>BamHI</i> | |
| | f. <i>SphI</i> + <i>KpnI</i> | |
| | pIAF61 | g. <i>SphI</i> (gène <i>manA</i>) |
| | | h. <i>SalI</i> |
| 4 - pIAF36 | a. <i>BamHI</i> | |
| | b. <i>KpnI</i> | |
| | c. <i>PstI</i> | |
| | d. <i>SphI</i> | |
| | e. <i>SacI</i> | |
| | f. <i>KpnI</i> + <i>BamHI</i> | |
| | g. <i>SphI</i> + <i>BamHI</i> (gène <i>manA</i>) | |
| | h. <i>SphI</i> + <i>KpnI</i> | |

③



④



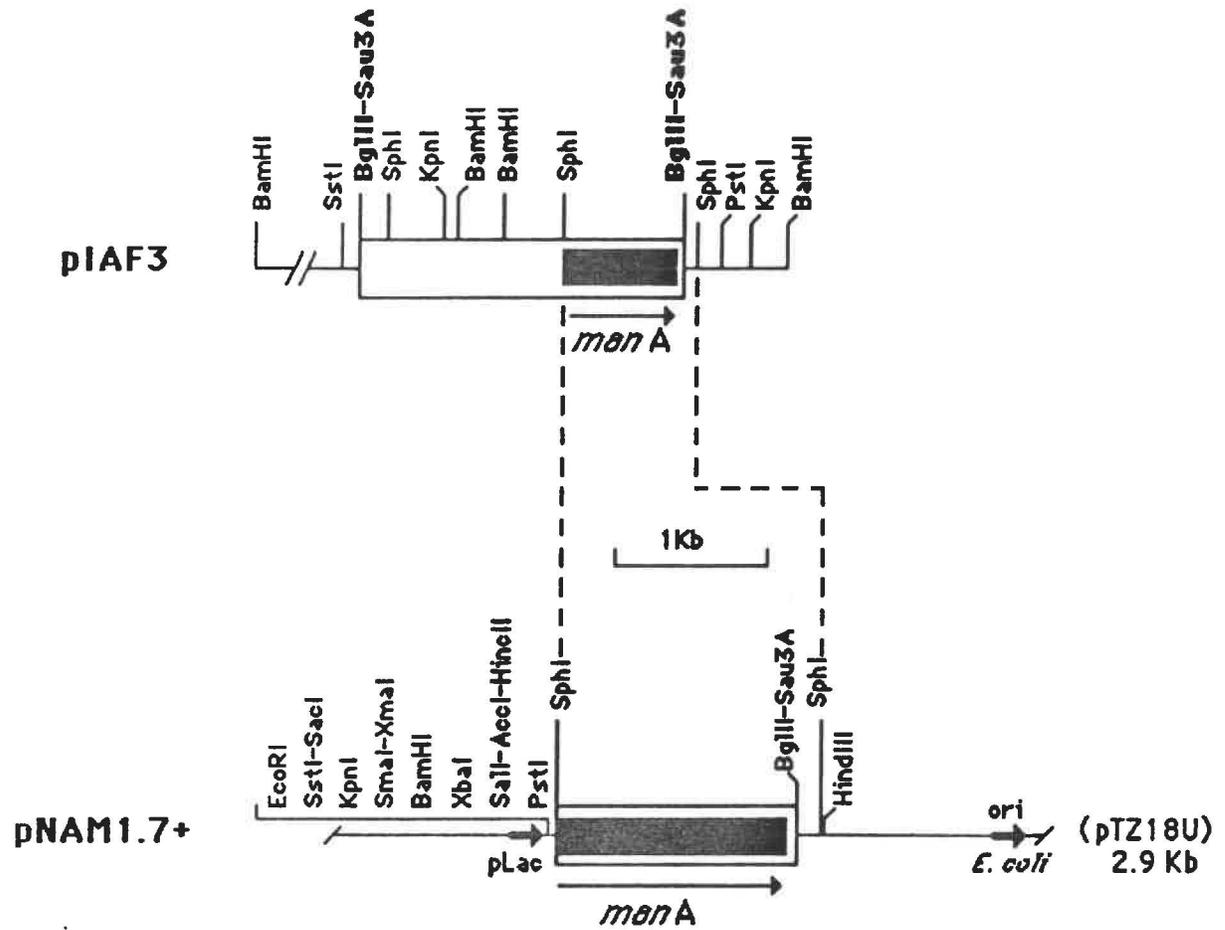


Figure 11: Construction plasmidique de pNAM1.7+.

La linéarisation de pNAM1.7+ était réalisée en utilisant des enzymes de restriction (*SacI* et *BamHI*) qui ont des sites de restriction uniques dans cette construction plasmidique. *SacI* génère une extrémité 3'-4 bases protubérante qui sert de protection contre l'exonucléase III et *BamHI* génère une extrémité 5'-4 bases protubérante qui sert de substrat pour l'*ExoIII*. Les endonucléases de restriction *SacI* et *BamHI* étaient inactivées à 70°C durant 10 minutes. L'exonucléase III, en présence de 75 mM de NaCl et à température de la pièce, dégradait l'insertion à raison de 25 bases/min. Ainsi, 1260 paires de bases étaient délétées, ne laissant que 340 bp à l'extrémité 3' de l'insertion. La perte de l'activité enzymatique lorsque les 110 premières paires de bases étaient délétées, suggérait que le gène codant pour la β -mannanase était situé très près de l'extrémité 5' du fragment inséré. Cette expérience permettait d'obtenir une série de fragments délétés qui se chevauchent, utilisés pour le séquençage du fragment.

1.4 Séquence nucléotidique du gène codant pour la β -mannanase

La figure 12, rapporte la séquence nucléotidique du gène codant pour la β -mannanase, ainsi que la séquence en acides aminés correspondante. Le séquençage du gène s'est effectué selon la méthode des didéoxynucléotides, développée par Sanger et al. (1977). Le site d'initiation ATG est souligné, de même

Figure 12: Séquence nucléotidique du gène codant pour la β -mannanase, et séquence en acides aminés correspondant à la protéine.

1501 GCGGGCCGCCACCTCGACACAGTCGCCGTCACCGCTGCTGCTGTAGCTCGACTTGTGCC
1561 AGGACAGGGCGATTTCCACGCAGTCGCCGTCGCCACCGCTGCTGTACGAGCTTTGAACC
1621 AGGCCAGTTCCGTCGTGTTTCATGAGGCTCCTCGCATCCGCCGCAACAGGCCAGGGAGTC
1681 GTCGAGGGAGAGGGGCCTGTGATCTCGTCGAAGGCCGCGGGGGCGCCGGAACGCGGCCGG
1741 GTTCCCGGGGACCTCGGGGGTGTGGTGCCCCGATCGTCGCGCGGGCGGGGAAGGGCG
1801 ACCAGCGGGACACCGGCGGCGACGACGGCTGCCGCGCGAGCGTGCGACGACGGGTGAGTT
 SphI
1861 CCGGCATGCAAGCTTGGCACTGG

que le site de fixation au ribosome GGAG correspondant à la séquence consensus 5'-GGAG-3' retrouvée chez les streptomycètes (Shapiro, 1989).

1.5 Peptide signal, contenu en G+C et utilisation des codons

La mannanase de *S. lividans* IAF36, est une enzyme extracellulaire sécrétée dans le milieu de culture. Généralement, un résidu proline (casseur d'hélice α) est localisé de 4 à 8 résidus avant le site de coupure (Watson, 1984). Ainsi, le site de coupure du peptide signal, de la mannanase, pourrait être situé à 7 acides aminés après le résidu proline retrouvé à la position 28 (figure 12). Une coupure après la séquence AEA↓, libère d'une part le peptide signal de 35 acides aminés et d'autre part l'enzyme. La séquence nucléotidique du gène codant pour la β -mannanase (figure 12), a un contenu en G+C de 68.8%. Dans la littérature, une analyse impliquant 27 gènes de streptomycètes, révélait que le contenu en G+C correspondait à 70.1% (Shapiro, 1989). Ce rapport élevé en G+C (70.1%) de la séquence nucléotidique, suggère que l'utilisation des codons chez les streptomycètes est biaisée en faveur des codons contenant un G ou un C à la troisième position (Shapiro, 1989). Le tableau 9 montre que sur une possibilité de 64 codons, seulement 43 codons sont utilisés lors de la traduction de l'ARN messager en protéine.

Tableau 9 - Utilisation des codons pour les acides aminés de
la β -mannanase de *S. lividans* IAF36.

CODON	COUNT	%AGE									
TTT-Phe	0	0.0%	TCT-Ser	0	0.0%	TAT-Tyr	1	0.3%	TGT-Cys	1	0.3%
TTC-Phe	9	2.5%	TCC-Ser	10	2.8%	TAC-Tyr	14	3.9%	TGC-Cys	2	0.6%
TTA-Leu	0	0.0%	TCA-Ser	0	0.0%	TAA-***	0	0.0%	TGA-***	0	0.0%
TTG-Leu	0	0.0%	TCG-Ser	4	1.1%	TAG-***	0	0.0%	TGG-Trp	10	2.8%
CTT-Leu	1	0.3%	CCT-Pro	1	0.3%	CAT-His	0	0.0%	CGT-Arg	2	0.6%
CTC-Leu	9	2.5%	CCC-Pro	8	2.2%	CAC-His	6	1.7%	CGC-Arg	7	1.9%
CTA-Leu	0	0.0%	CCA-Pro	0	0.0%	CAA-Gln	0	0.0%	CGA-Arg	1	0.3%
CTG-Leu	9	2.5%	CCG-Pro	2	0.6%	CAG-Gln	6	1.7%	CGG-Arg	3	0.8%
ATT-Ile	0	0.0%	ACT-Thr	0	0.0%	AAT-Asn	0	0.0%	AGT-Ser	1	0.3%
ATC-Ile	13	3.6%	ACC-Thr	14	3.9%	AAC-Asn	23	6.3%	AGC-Ser	12	3.3%
ATA-Ile	0	0.0%	ACA-Thr	0	0.0%	AAA-Lys	0	0.0%	AGA-Arg	1	0.3%
ATG-Met	8	2.2%	ACG-Thr	10	2.8%	AAG-Lys	8	2.2%	AGG-Arg	3	0.8%
GTT-Val	1	0.3%	GCT-Ala	0	0.0%	GAT-Asp	0	0.0%	GGT-Gly	8	2.2%
GTC-Val	25	6.9%	GCC-Ala	28	7.7%	GAC-Asp	20	5.5%	GGC-Gly	40	11.0%
GTA-Val	0	0.0%	GCA-Ala	2	0.6%	GAA-Glu	1	0.3%	GGA-Gly	5	1.4%
GTG-Val	6	1.7%	GCG-Ala	16	4.4%	GAG-Glu	9	2.5%	GGG-Gly	3	0.8%

***: codon stop

1.6 Homologie de séquence en acides aminés

La séquence en acides aminés de la β -mannanase produite par *Streptomyces lividans* IAF36 était comparée à celle de *Caldocellum saccharolyticum* (Lüthi et al., 1991). La figure 13 montre l'homologie de séquence en acides aminés entre les deux mannanases. Cette étude comparative indique qu'il y a 67% d'homologie de séquence en acides aminés, entre ces deux protéines.

Figure 13: Homologie de séquence en acides aminés, entre la mannanase de *S. lividans* IAF36 et celle de *C. saccharolyticum*.

Ala(A), Ser(S), Thr(T), Pro(P), Gly(G)
Asn(N), Asp(D), Asx(B), Glu(E), Gln(Q), Glx(Z)
His(H), Arg(R), Lys(K)
Met(M), Leu(L), Ile(I), Val(V)
Phe(F), Tyr(Y), Trp(W)

La séquence en acides aminés de la mannanase de *S. lividans* IAF36 (MANA.AMI) est représentée sur la ligne supérieure et en dessous est alignée la séquence en a.a. de la mannanase de *C. saccharolyticum* (MANC.AMI) afin d'observer l'homologie de séquence en acides aminés. Deux petits points indiquent que les 2 a.a. sont identiques et un petit point relie 2 a.a. semblables ayant les mêmes propriétés chimiques (même polarité de la chaîne latérale).

FILE1 NAME	START	END	FILE2 NAME	START	END		
MANA.AMI	1	363	MANC.AMI	1	347		
FILE NAME	1	10	20	30	40	50	60
MANA.AMI	MRNARSTL----ITTA-GMAFAVLGLLFALAGPSA-GR-AEAAAG--GIHVSNGRVVEGN						
MANC.AMI	MRL-KTKIRKKWLSVLCVVVF-LLNILF-IANVTILPKVG-AATSNDGV-V---KI-DT-						
	1	10	20	30	40	50	60
FILE NAME	61	70	80	90	100	110	120
MANA.AMI	GSAFVMRGVNHAYTWYPDRT-GSI-ADIAARG-A-NTVRVVLSSGGRWTKTSASEVSALI						
MANC.AMI	ST--LIGT-NHAHCWYRDRDLTALRG-I--RSWGMNSVRVLSNGYRWTKIPASEVANI I						
	61	70	80	90	100	110	120
FILE NAME	121	130	140	150	160	170	180
MANA.AMI	GQCKAN--KVICVLEVHDTTGYGKDGAT-SLDQAGDYWVGKSAAWRAQEDYVVVNIGNE						
MANC.AMI	SLSRSLGFKAI-ILEVHDTTGYGEDGAACSLAQAVEYWKIKSVLD-GNEDFVIINIGNE						
	121	130	140	150	160	170	180
FILE NAME	181	190	200	210	220	230	240
MANA.AMI	PFGNTNYAAWTDATKSAIGK-LRGAGLGHALMVDAPNWDWSGTMRNSAASVFASDPDR						
MANC.AMI	PYGNNNYQNWVNDTKNAI-KALRDAGFKHTIMVDAPNWDWSNTMRDNAQSIMEADPLR						
	181	190	200	210	220	230	240
FILE NAME	241	250	260	270	280	290	300
MANA.AMI	NTVFSIHMYGVYDTAAEVRDYLNAPVGN-GLPIVVGEFGDQHS DGNPDEDAIMATA-QS-						
MANC.AMI	NLVFSIHMYGVYNTASKVEEYIKSFV-DKGLPLVIGEPGHQHTDGPDEEAIVRYAKQYK						
	241	250	260	270	280	290	300
FILE NAME	301	310	320	330	340	350	360
MANA.AMI	LGVGYLGWSWSGNGGGVEYLDVNGFDPN-SLTSWGNRILYGSNGIAATSRTATVYGGGG						
MANC.AMI	IGL-F-SWSWCGNSSYVGYLDMVNNWDPNNP-TPWGQW--YKTNAIGTSS-TPT--PTSR						
	301	310	320	330	340	350	360
FILE NAME	361	370	380				
MANA.AMI	GSTGGTAPNGYPYCVNGGAVRPR..						
MANC.AMI	VTPTPPPRQH-----Q-----H--RQ*						
	361	370	380				

MATCHING PERCENTAGE

TOTAL WINDOW 67% (261/ 386)

ALIGNMENT WINDOW 67% (261/ 384)

2. PRODUCTION DE LA β -MANNANASE DE *Streptomyces lividans*

Le clone *S. lividans* IAF36, produisant les plus grosses zones d'hydrolyse sur milieu Stewart modifié 1% galactomannane, était choisi pour l'étude de la production de mannanase. Le tableau 10 résume la production de l'enzyme en milieux M13 modifiés. Le glucose en milieu M13 modifié, créait une répression catabolique et ainsi empêchait la formation de mannanase par le clone *S. lividans* IAF36. En présence de galactomannane (LBG), ce clone produisait de la mannanase à un taux de 88 UI après 96 heures d'incubation. L'augmentation du LBG à 2% et l'addition d'acide oléique, n'avaient pas d'effets significatifs sur la production de mannanase. Ainsi le milieu Arc-GM a été retenu pour les études subséquentes.

Au tableau 11, la production de mannanase par les trois clones IAF3, IAF36 et IAF61 était comparée à celle de *S. lividans* 1326, 3131 et IAF 10-164. En milieu Arc-GM, le clone IAF3 produisait 2 fois plus d'enzyme mannanase, le clone IAF61 en produisait 6 fois plus et le clone IAF36 produisait 60 fois plus de mannanase que la souche sauvage et le mutant.

Un SDS-PAGE des protéines sécrétées par *S. lividans*, après 72 heures d'incubation à 34°C, dans un milieu Arc-GM, est présentée à la figure 14.

Tableau 10 - Activité mannanasique (UI) du clone *S. lividans* IAF36, en milieu M13 modifié (M) contenant du glucose ou du LBG, comme source de carbone.

Milieu	IAF 10-164			clone IAF36		
	48h	72h	96h	48h	72h	96h
M-H ^a + GLU ^b 1%	1	1	1	1	1	1
M-H + LBG 1%	1	1	2	10	63	88
M-AO ^c + LBG 1%	1	1	1.5	16	69	93
M-AO + LBG 2%	n.d.	n.d.	n.d.	27	73	97

- a) Huile d'olive Bertolli
- b) Glucose
- c) Acide oléique

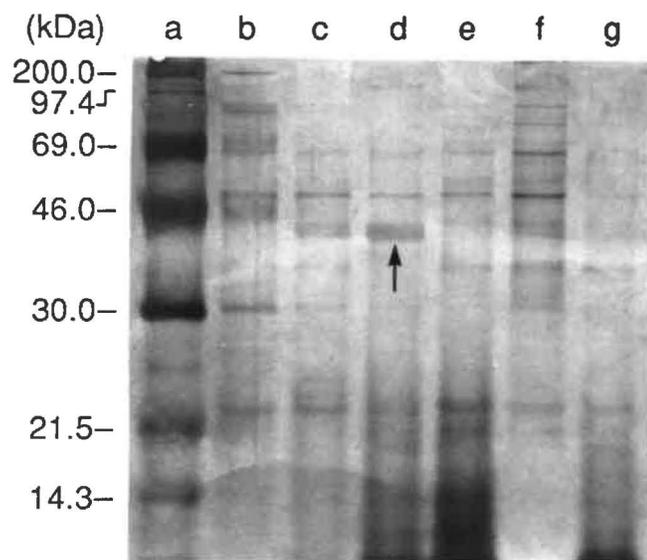
Tableau 11 - Activité mannanasique (UI) des différents clones de *S. lividans*, en milieu Arc-GM.

<i>S. lividans</i> souches ou clones	Activité relative (UI/mL) 72 h
1326	1
3131	1
10-164	1
IAF3	2
IAF61	6
IAF36	63

Figure 14: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, des protéines sécrétées par *S. lividans*, après 72 heures d'incubation à 34°C, dans un milieu Arc-GM.

(a) Standards de masses moléculaires; (b) clone IAF3; (c) clone IAF61; (d) clone IAF36; (e) mutant 10-164, cellulase et xylanase négatifs; (f) 1326, souche sauvage; (g) 3131, souche sauvage contenant le plasmide pIJ702.

La concentration de protéines par puits, est de 50 µg. Le gel est coloré à l'argent.



Une flèche indique une bande majeure d'environ 40 kDa, correspondant à une enzyme qui est présumément la β -mannanase clonée dans pIAF36 (d). Cette bande de 40 kDa est aussi visible chez le clone IAF61 (c) mais moins intense, tandis qu'elle est absente chez le mutant *S. lividans* IAF 10-164 (e).

2.1 Fermentation en "batch"

Après avoir déterminé le temps exact où il y avait plafonnement de la production de mannanase par *S. lividans* IAF36, en milieu Arc-GM, une fermentation en "batch" de 8 litres plafonnait après 96 h, à 88 UI/mL (figure 15).

3. PURIFICATION DE LA β -MANNANASE

Le schéma du procédé de purification établi pour la mannanase de *S. lividans* IAF36, est illustré à la figure 16.

La précipitation éthanolique de l'enzyme permettait d'isoler 27 g de précipité. L'activité spécifique du précipité était de 300 UI/mg de protéines. Une partie du précipité (4.6 g) était dissous dans 40 mL d'un tampon Tris-HCl, 0.02 M, pH 8.5. Un seul passage sur colonne DEAE, permettait d'obtenir un profil d'élution de la β -mannanase de *S. lividans* IAF36 (figure 17).

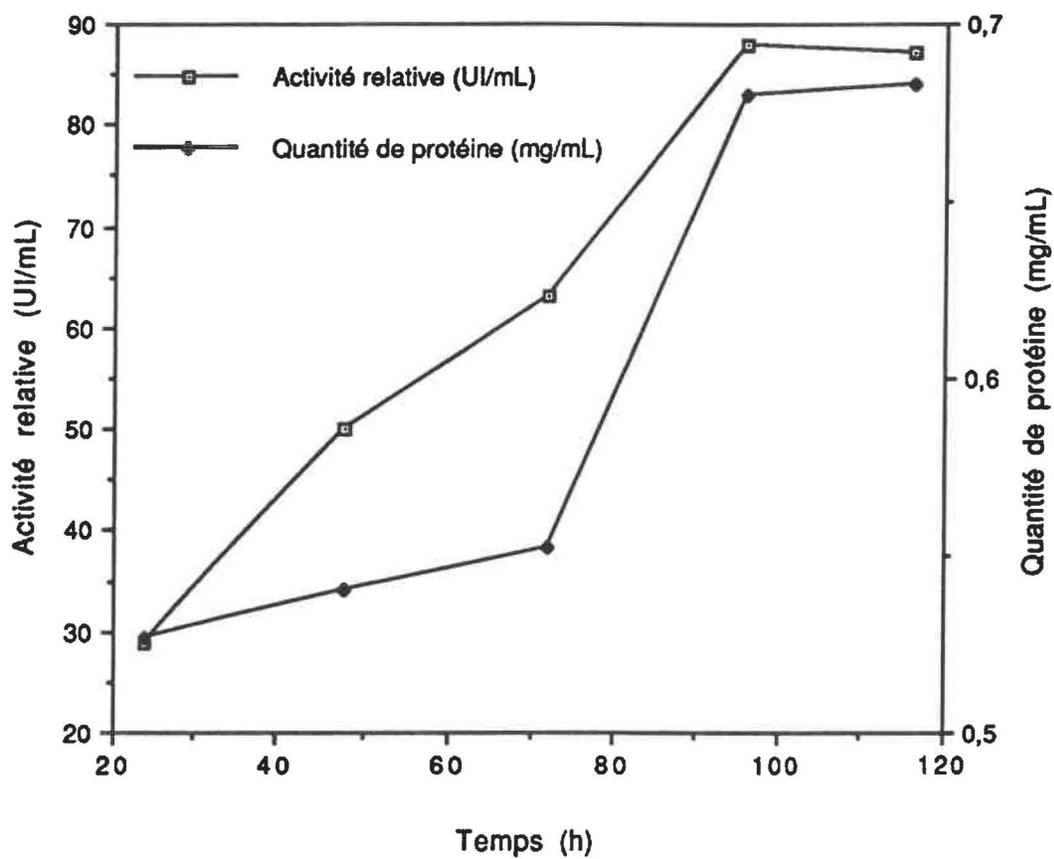


Figure 15: Production de β -mannanase par *S. lividans* IAF36, en milieu Arc-GM.

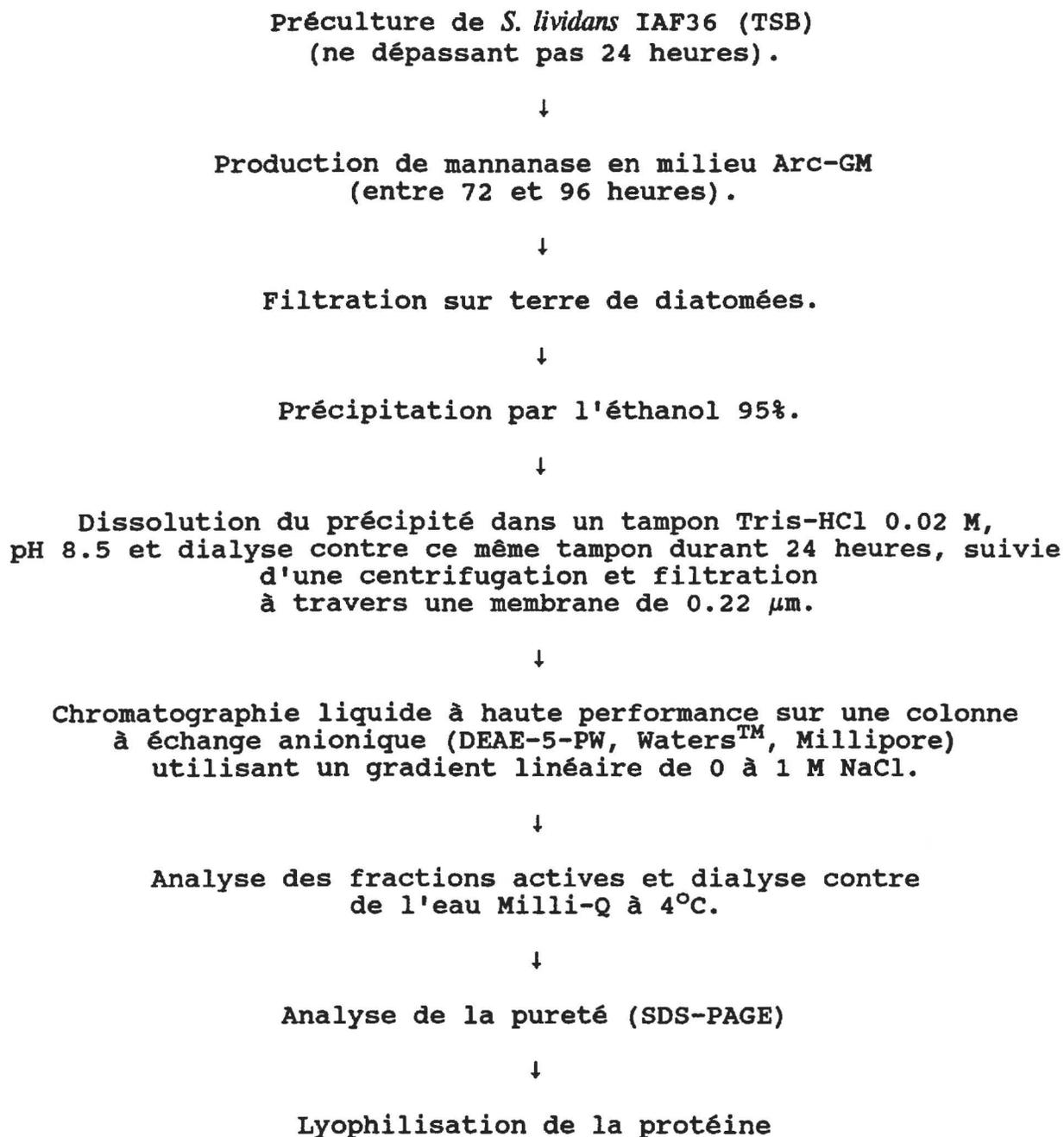


Figure 16: Schéma de purification de la β -mannanase de *Streptomyces lividans* IAF36.

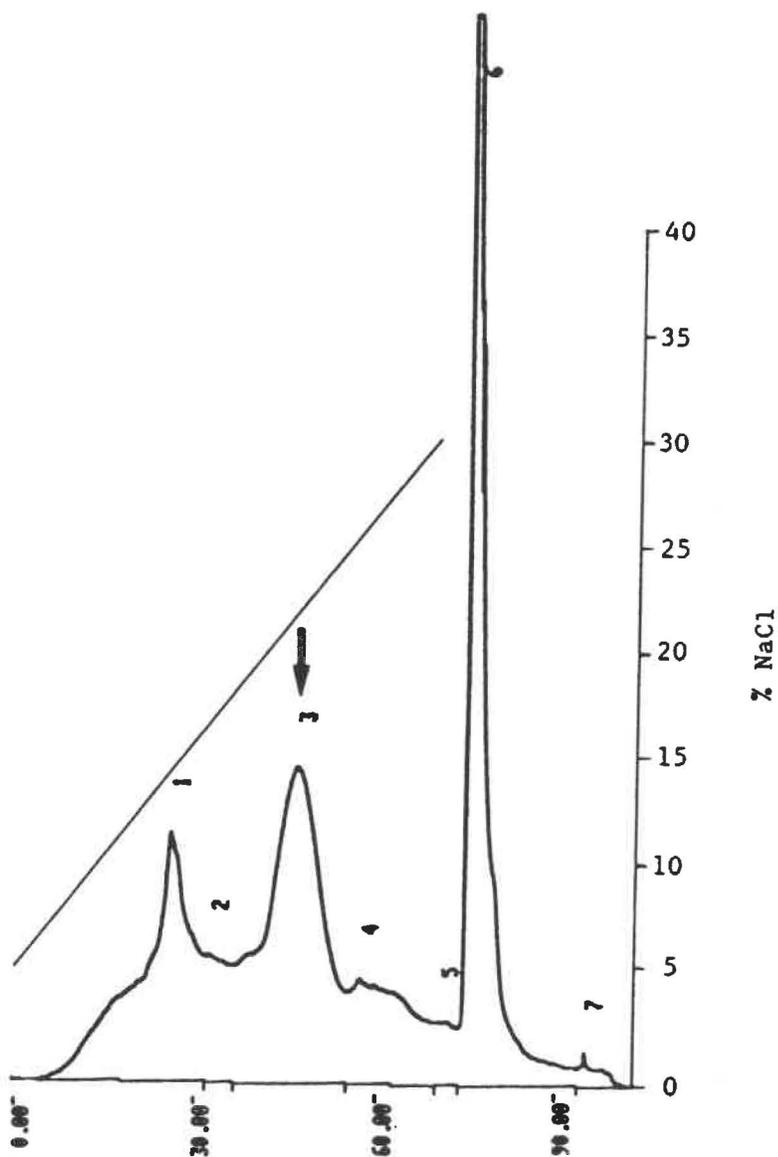


Figure 17: Profil d'élution de la β -mannanase de *S. lividans* IAF36 sur colonne échangeuse d'anions (DEAE-5-PW, WatersTM, Millipore) utilisant un gradient linéaire de 0 à 1 M NaCl, dans le tampon Tris-HCl 20 mM pH 8.5.

L'activité enzymatique maximale de la β -mannanase coïncidait avec le pic no.3 observé sur le chromatogramme, correspondant à une élution à 0.21 M de NaCl. L'activité spécifique des fractions actives ainsi récupérées étaient de 876 UI/mg de protéines.

3.1 Rendement du procédé de purification

Le rendement de chacune des étapes du procédé de purification est résumé dans le tableau 12. En effectuant un seul passage sur colonne DEAE, la β -mannanase était purifiée avec un rendement établi à 28.8%. Il n'y a pas eu de perte significative d'enzyme β -mannanase lors de ce procédé de purification. Et, il y a eu une augmentation de l'activité spécifique de 300 UI/mg de protéines à 876 UI/mg de protéines. Le facteur de purification atteinte entre le surnageant de culture (ayant une activité spécifique de 114 UI/mg de protéines) et l'enzyme pure, était évalué à 7.7.

3.2 Analyse de la pureté

La pureté de la β -mannanase était évaluée par SDS-PAGE comme l'illustre la figure 18. Le gel, coloré à l'argent, montrait une protéine unique de masse moléculaire d'environ 40,000 Da.

Tableau 12: Rendement du procédé de purification pour la β -mannanase de *Streptomyces lividans* IAF36.

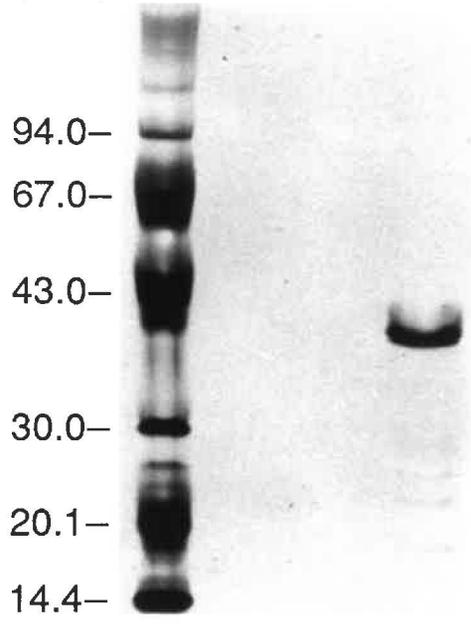
Etape de purification	Activité relative UI totale	[Protéine] mg total	Activité spécifique UI/mg	Rendement (%)
Précipité à l'éthanol	41890	139.2	300	100
Fractions actives (DEAE)	12060	13.8	876	28.8

Figure 18: Analyse de la pureté de la β -mannanase de *S.lividans* IAF36, sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (PhastSystemTM, PHARMACIA). Gel coloré à l'argent.

à gauche: Standards (LMW, PHARMACIA);
 α -lactoglobuline, 14.4 kDa;
inhibiteur de trypsine de soya, 20.1 kDa;
anhydrase carbonique, 30 kDa;
ovalbumine, 43 kDa;
BSA, 67 kDa;
phosphorylase B, 94 kDa.

à droite: β -mannanase (3 μ g/puits)

(kDa)



La courbe de titration électrophorétique à la figure 19, montre une bande continue créée par la β -mannanase. Cette mannanase a un pI d'environ 3.5 et à un pH de 8.0 - 8.5, cette protéine chargée négativement, possède la plus grande mobilité électrophorétique. Donc un pH de 8.0 - 8.5, était indiqué pour séparer par "HPLC", cette mannanase des autres protéines.

4. CARACTÉRISATION DE L'ENZYME

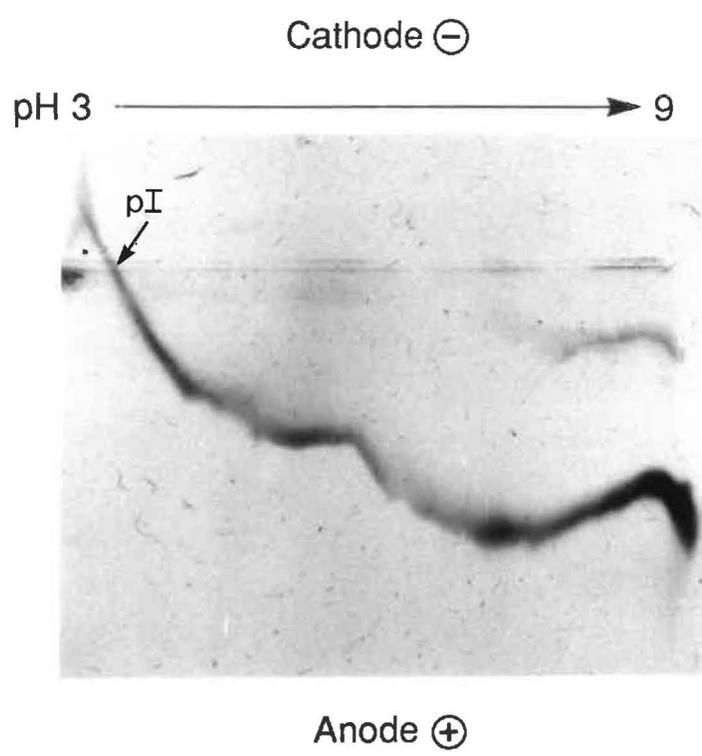
4.1 Température, pH et temps d'incubation optimum

La détermination de la température optimale était réalisée en utilisant le tampon McIlvaine pH 6.0. La courbe obtenue de l'activité enzymatique de la β -mannanase (UI) en fonction de la température, montre que la valeur optimale de ce paramètre pour la β -mannanase de *Streptomyces lividans* IAF36, est de 57°C (figure 20).

La courbe illustrée à la figure 21, représente l'activité de l'enzyme en fonction du pH utilisé, à température optimale de l'enzyme. La β -mannanase a une activité maximale à un pH de 6.75 et cette figure montre bien l'effet de la charge de la protéine sur l'activité.

C'est à 57°C et à pH 6.75 que l'effet du temps d'incubation sur l'activité enzymatique était mesuré. La courbe obtenue (figure 22) révèle qu'un temps d'incubation de 5 à 7 minutes

Figure 19: Courbe de titration électrophorétique de la β -mannanase purifiée (2 μ g / puits), sur gel de polyacrylamide contenant des ampholines formant un gradient de pH de 3 à 9 (PhastSystemTM, PHARMACIA). Gel coloré à l'argent.



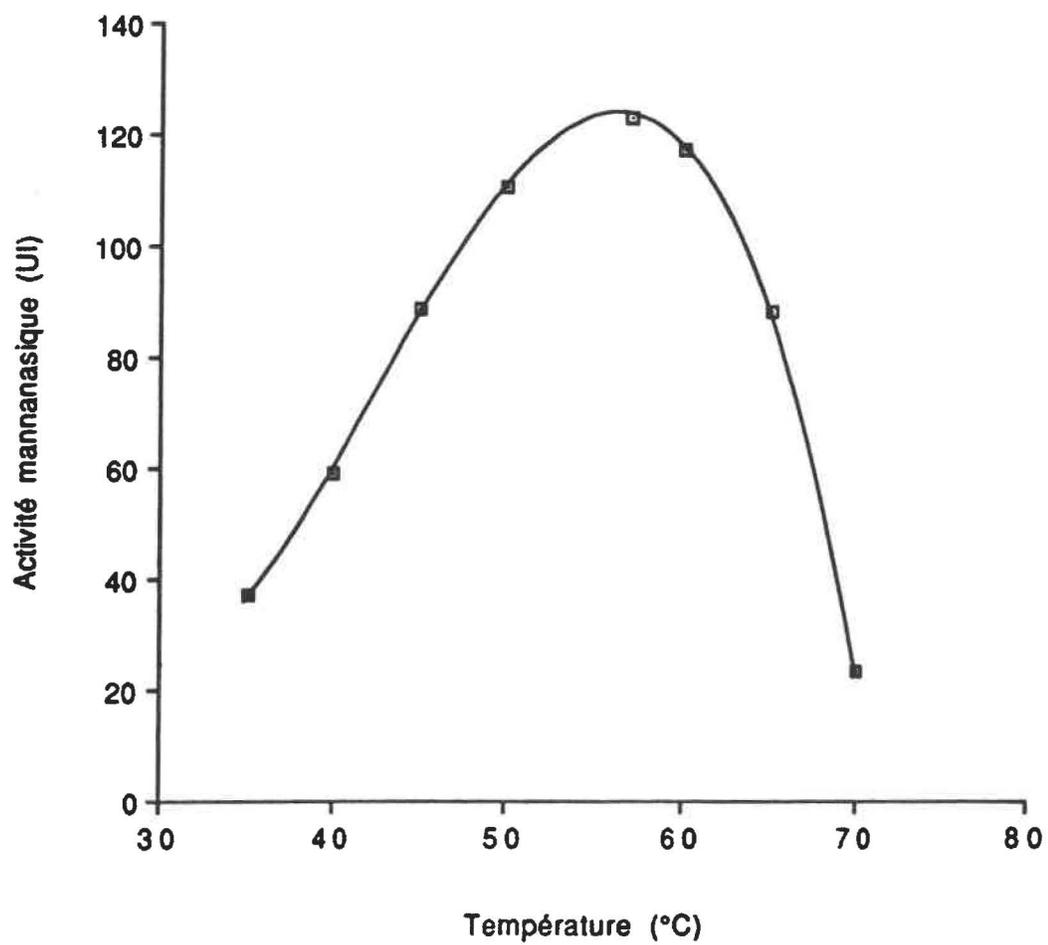


Figure 20: Effet de la température sur l'activité enzymatique de la mannanase.

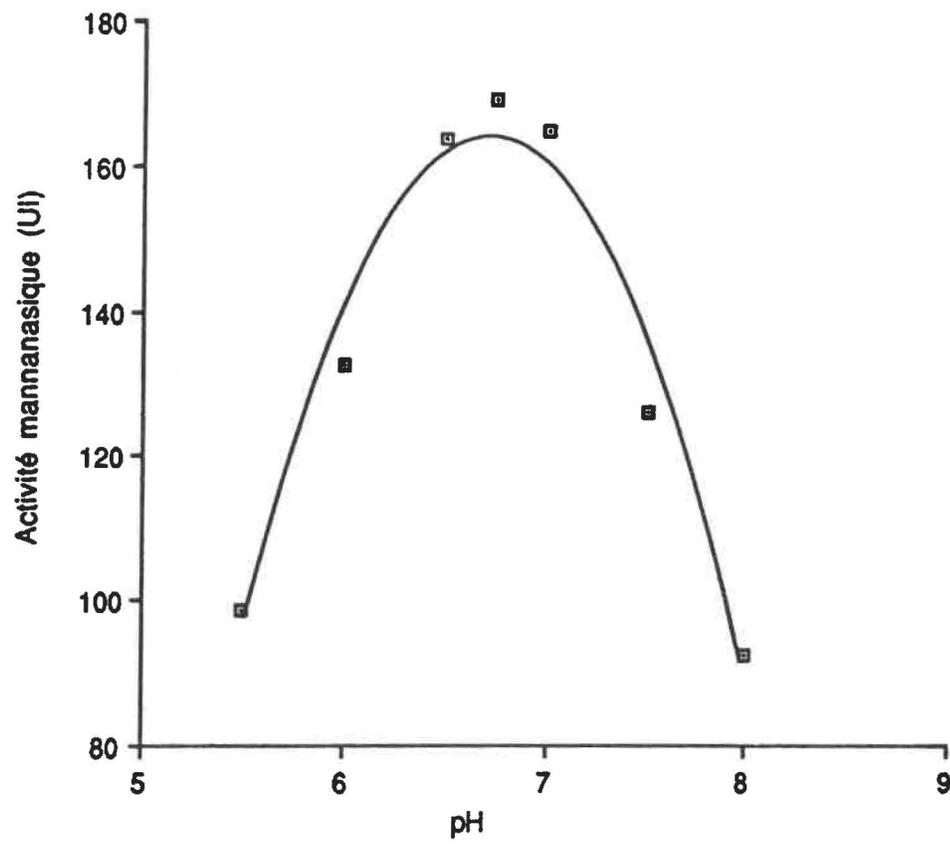


Figure 21: Effet du pH sur l'activité enzymatique de la mannanase.

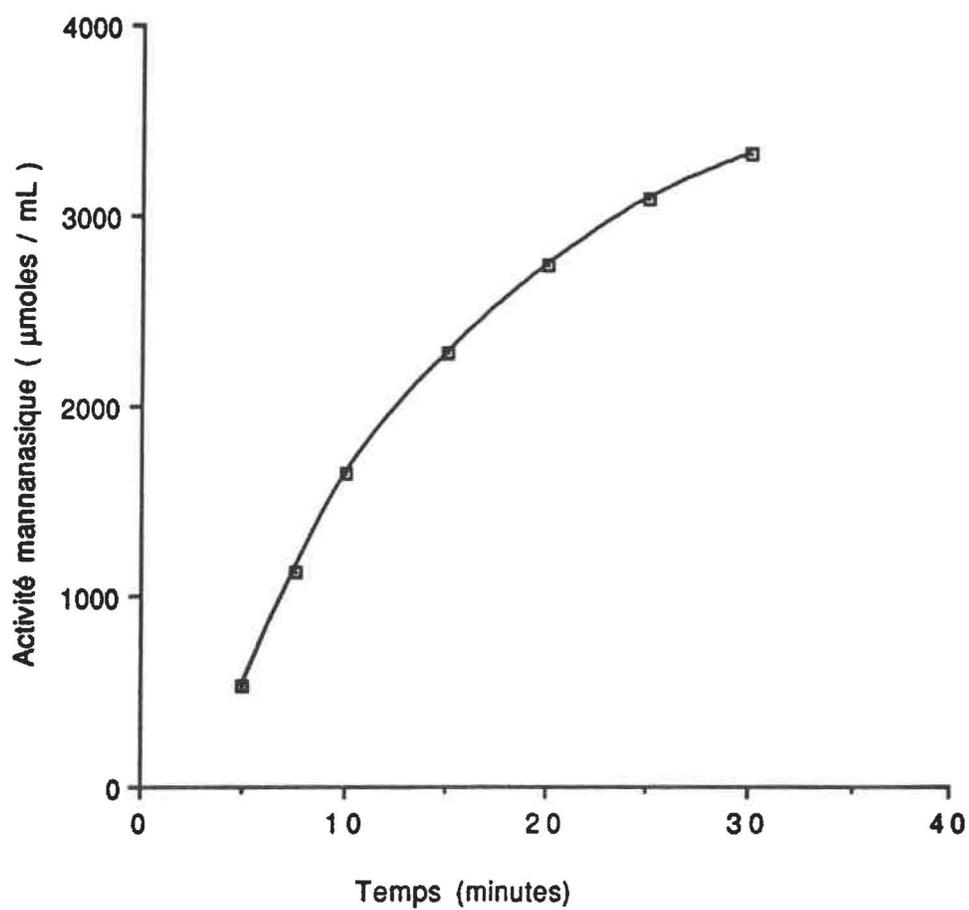


Figure 22: Effet du temps d'incubation sur l'activité enzymatique de la mannanase.

serait idéal, car il se situe dans la portion linéaire de la courbe. Mais étant donné la difficulté d'effectuer le test des sucres réducteurs à un temps d'incubation de 5 minutes, nous avons choisi 10 minutes, correspondant à la limite supérieure de la linéarité, afin de faciliter les manipulations expérimentales.

4.2 Cinétique de l'enzyme

L'étude de la cinétique de la mannanase a été faite dans des conditions de température, pH et temps d'incubation optimales. Deux méthodes graphiques sont utilisées pour déterminer les valeurs du K_m et du V_{max} . Le graphique selon Lineweaver et Burk représenté à la figure 23, illustre l'inverse de l'activité relative de l'enzyme en fonction de l'inverse de la concentration du substrat. Le V_{max} de la β -mannanase est de 207.15 $\mu\text{mole/mL/min}$. Le V_{max} représente la vitesse maximale, où la concentration de substrat est assez élevée pour saturer l'enzyme en substrat. Le K_m , est égal à 0.769 mg de LBG/mL. C'est la concentration de substrat à laquelle la vitesse équivaut à la moitié de la vitesse maximale. L'autre graphique, celui de Eadie-Hofstee représenté à la figure 24, illustre l'activité relative de l'enzyme en fonction du rapport activité relative sur concentration du substrat. Par cette méthode graphique, le V_{max} de la β -mannanase est de 205.76 $\mu\text{mole/mL/min}$ et le K_m est de 0.75 mg de LBG/mL.

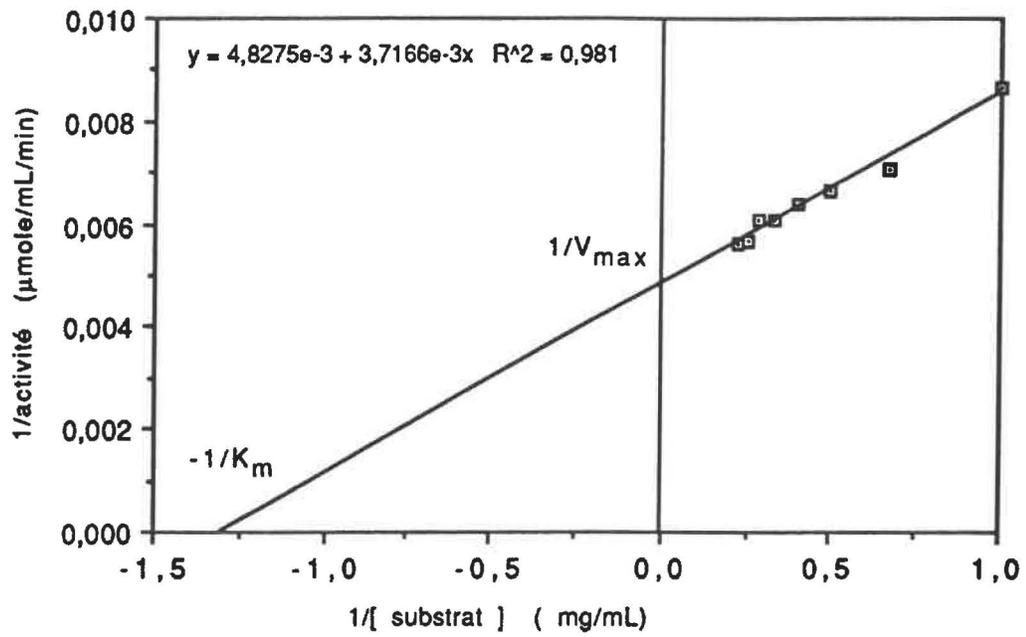


Figure 23: Cinétique enzymatique de la mannanase de *S. lividans* IAF36 (Lineweaver & Burk).

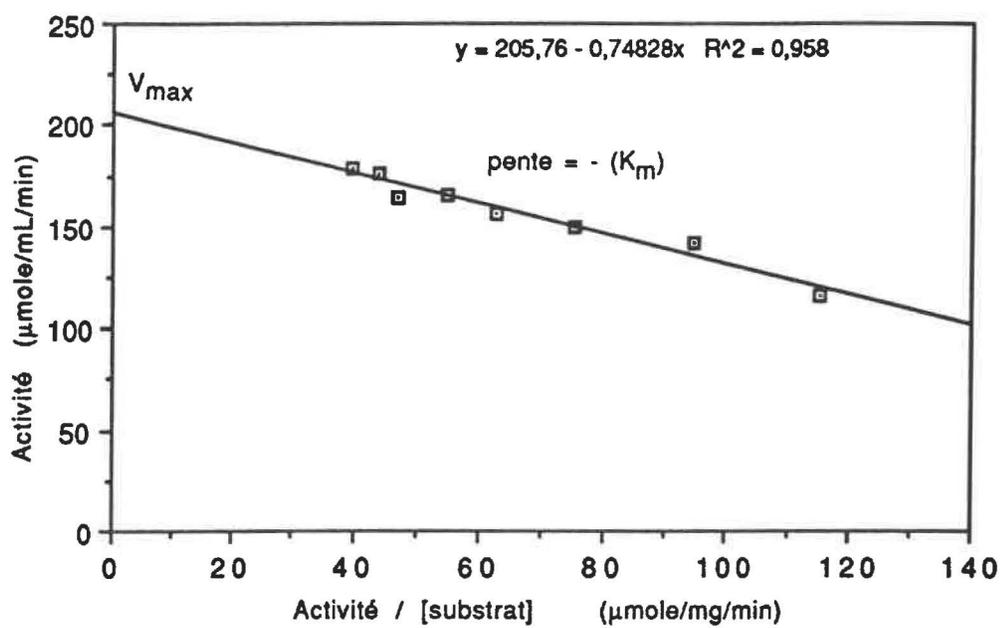


Figure 24: Cinétique enzymatique de la mannanase de *S. lividans* IAF36 (Eadie-Hofstee).

La valeur du K_m déterminée, n'est pas une valeur fixe. En effet, elle varie selon le substrat utilisé. Plus la valeur du K_m est petite, plus l'enzyme démontre de l'affinité pour le substrat.

4.3 Stabilité de l'enzyme

La courbe représentée à la figure 25, illustre l'activité mannanasique résiduelle (%) en fonction du temps (h). Après une incubation de 4 heures en tampon McIlvaine pH 6.75 et en absence de LBG, la mannanase incubée à 4°C, 30°C, 38°C, 42°C, avait 100%, 91%, 95%, 61% de son activité enzymatique initiale. De plus, après une incubation de 8 heures et de 24 heures à 42°C, l'enzyme demeurait active à 53% et 20%. À des températures plus élevées, 50°C et 57°C, la β -mannanase conservait 8% et 4% de son activité enzymatique, après 15 minutes d'incubation.

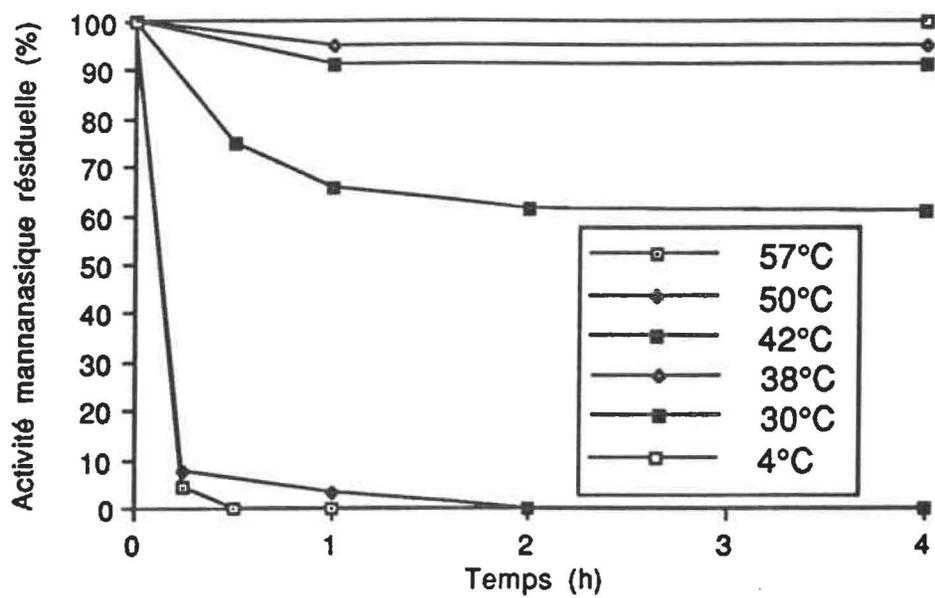


Figure 25: Stabilité de la mannanase à différentes températures.

4.4 Séquence des acides aminés de l'extrémité NH₂-terminale de la mannanase

Le cadre de lecture du gène codant pour l'endo-β-mannanase a été confirmé par séquençage des premiers acides aminés à partir de l'extrémité NH₂-terminale de la mannanase. Cette détermination faite aux laboratoires du Dr Alex Bell du Centre de Biotechnologie Sheldon de l'Université McGill a donné le résultat suivant:

	ATC	CAC	GTC	
- - - -	I	H	V	- - - -

4.5 Production d'anticorps

La production des anti-mannanases a été analysée par Francis Gagnon (CRI) utilisant le test ELISA. Un volume de 50 μL d'anticorps (d'une dilution de 10⁻⁶) réagi avec 250 ng de mannanase fixée dans le puits de la plaque ELISA.

DISCUSSION

Le clonage homologue du gène codant pour la β -mannanase, a permis d'isoler trois clones positifs exprimant l'activité enzymatique. Il s'agit des clones *S. lividans* IAF3, IAF36 et IAF61 comprenant des fragments d'ADN chromosomique de 4.3 kb, 10 kb et 4.1 kb respectivement. Pour la première fois, un gène de mannanase a été cloné dans un système homologue, évitant ainsi les problèmes d'expression et de sécrétion rencontrés dans l'expression hétérologue. Seulement deux groupes de chercheurs ont cloné un gène d'une mannanase de façon hétérologue chez *E. coli*. Ainsi, Akino et al.(1989) clonait un gène de *Bacillus* sp AM-001 (sur un fragment de 2.0 kb) codant pour deux mannanases, d'un M_r de 58 kDa et 43 kDa respectivement. Récemment, Lüthi et al.(1991) ont mis en évidence un gène de *Caldocellum saccharolyticum* (fragment de 1.2 kb) codant pour une mannanase d'un M_r de 38.9 kDa.

Suite à la cartographie et le sous-clonage des gènes *mana* nous avons démontré par hybridation de type "Southern", l'homologie dans les trois clones de *S. lividans*.

La production de mannanase par les clones *S. lividans* IAF3, IAF61 et IAF36 était de 2 UI, 6 UI et 63 UI respectivement (tableau 11). Le promoteur du gène responsable de la production du pigment mélanine (mel), orienté en sens inverse

dans le clone IAF3, pourrait produire un ARN messager antisense qui s'hybriderait avec l'ARN messager transcrit du gène codant pour la β -mannanase. Dans le clone IAF61 ce promoteur meI étant orienté dans le même sens que le gène *manA*, semble annuler l'effet d'interférence au niveau de l'ARN messager. Finalement, le clone IAF36, montrant la meilleure expression contient un fragment de 10 kb. Dans ce cas, l'effet d'interférence par le promoteur du gène responsable de la production du pigment mélanine semble négligeable à cause de la taille du fragment inséré. Ces résultats pourraient expliquer la surexpression du gène de la mannanase dans le clone IAF36. Il est concevable qu'une région régulatrice (régulation négative) absente au niveau du promoteur, permet ainsi une production d'enzyme qui correspond à 60 fois celle de la souche sauvage. Une étude détaillée du promoteur du clone IAF36 en comparaison avec le promoteur du clone IAF3, permettrait de déterminer exactement la région manquante et son rôle au niveau de la régulation du gène codant pour la β -mannanase.

L'analyse de la séquence nucléotidique du gène codant pour la β -mannanase de *S. lividans* IAF36 a démontré que le contenu en G+C de 68.8% correspondait avec le contenu en G+C de 70.1% observé chez les streptomycètes (Shapiro, 1989). Bien que les streptomycètes possèdent des molécules d'ARN de transfert capables de reconnaître chacun des 64 codons, les codons

contenant un G ou un C à la troisième position sont préférés à ceux contenant un A ou un T. Cette observation est bien illustrée par l'utilisation des codons pour les acides aminés spécifiés par 4 codons dégénérés au niveau de la troisième position (voir le tableau 9). Comme prévu, les nucléotides G et C sont prédominants à la troisième position du codon. Selon Shapiro (1989), chez les streptomycètes un G ou un C occupe la troisième position au niveau du codon dans 90.6% des cas. À cette position, un C est présent dans 55% des cas et un G dans 36% des cas.

Le peptide signal analysé ici, est constitué de 35 a.a.. Ce peptide signal comporte trois régions: une région chargée positivement (arginine) suivie d'une longue région hydrophobe contenant plusieurs alanines et leucines, et finalement, une région polaire. De plus, la présence d'alanine en position -3 et -1 forme un site de reconnaissance pour la peptidase. Ce peptide signal est semblable à ceux que l'on retrouve chez les protéines qui doivent être sécrétées, et ceci est vrai pour les procaryotes en général (Watson, 1984).

L'étude de la séquence en acides aminés de la mannanase de *S. lividans* IAF36 a permis de localiser le site de coupure du peptide signal après l'a.a. no 35. Ce site de coupure du peptide signal, est en accord avec l'observation de Watson

(1984) qui montre que très souvent un résidu proline (casseur d'hélice α) est localisé de 4 à 8 résidus avant le site de coupure. Chez la mannanase de *C. saccharolyticum* le site de coupure du peptide signal (41 a.a.) est à 7 a.a. après le résidu proline (Lüthi et al., 1991). Akino et al., (1989) ont démontré que chez *Bacillus* sp AM-001, le peptide signal (26 a.a.) était coupé à 5 a.a. après le résidu proline.

La séquence N-terminale déterminée en page 103 (-I-H-V-) ne concorde pas avec l'analyse théorique du peptide signal pour la raison suivante. La séquence en a.a. à partir de l'extrémité N-terminale, n'a pu être déterminée précisément, à cause de l'interférence créée par les a.a. alanines sur les glycines. En continuant le séquençage de l'extrémité N-terminale, le Dr Bell a réussi à identifier précisément la séquence suivante, -I-H-V-, qui permettait de confirmer le cadre de lecture du gène codant pour la β -mannanase.

Une étude comparative entre la séquence en acides aminés de la mannanase de *S. lividans* IAF36 et celle de *C. saccharolyticum* a montré qu'il y a 67% d'homologie de séquence en a.a.. Cette comparaison tient compte des acides aminés identiques et des acides aminés semblables du point de vue propriétés chimiques.

Lors de la production de l'endo- β -mannanase par *S. lividans*

IAF36 en milieu Arc-GM, l'analyse du surnageant de culture par électrophorèse, démontrait clairement la présence d'une bande majeure correspondant à 40 kDa. La figure 15 illustre que la quantité des protéines totales dans le surnageant de culture suivait celle de l'activité relative de la β -mannanase (UI/mL) en fonction du temps. Ceci permet de dire que le clone *S. lividans* IAF36 produit majoritairement la β -mannanase. L'huile d'olive ajoutée au milieu de culture, pourrait jouer un rôle important au niveau de la membrane cellulaire, favorisant la sécrétion de l'enzyme dans le milieu extracellulaire (Bertrand et al., 1989).

S. lividans IAF36 produisait un taux maximum de 88 UI/mL de mannanase. Cette production se compare avec celle de *Bacillus subtilis* NRRL 356 (Araujo et Ward, 1990a) qui produisait 106.2 UI/mL d'endo- β -mannanase en milieu de culture contenant du galactomannane.

La purification de la β -mannanase s'est avérée relativement simple. Une précipitation éthanolique de l'enzyme dans le filtrat de culture permettait une première purification significative. Ensuite, par un seul passage sur colonne DEAE (HPLC) et récupération des fractions actives, la protéine pure a été obtenue et fut démontré par SDS-PAGE. Le rendement de la purification de la β -mannanase de *Streptomyces lividans* IAF36, a été

de 28.8%. L'activité spécifique de cette enzyme était de 876 UI/mg de protéine. Takahashi et al.(1984) ont purifié une mannanase de *Streptomyces* sp., par chromatographie à échange ionique (ECTEOLA-cellulose). La mannanase IV majoritaire correspondant à 64.4% de l'activité totale, était concentrée par ultrafiltration et passée à travers un tamis moléculaire BIOGEL P-100. Cette fraction IV a été purifiée avec un rendement de 26.8%, l'activité spécifique de l'enzyme était de 462 UI/mg de protéine.

La caractérisation de l'enzyme purifiée dans le présent travail, a permis de déterminer sa masse moléculaire à 40 kDa et ses caractéristiques biochimiques montraient une activité optimale à une température de 57°C et à un pH de 6.75. Ces propriétés sont comparables avec celles de la mannanase IV de *Streptomyces* sp (Takahashi et al., 1984). Le pI observé sur la courbe de titration électrophorétique de la mannanase de *Streptomyces lividans* IAF36 est d'environ 3.5, ce qui correspond très bien avec celui de la mannanase IV de *Streptomyces* sp. La seule différence entre ces deux mannanases, réside dans une légère différence en leur masses moléculaires d'environ 40 kDa et 42.9 kDa. Cette différence pourrait ne pas être significative. Dans la littérature, les masses moléculaires des mannanases varient de 22 kDa jusqu'à 89 kDa (voir le tableau 7). Il y a même une mannanase active sous forme de dimère, composée de

deux sous-unités de 73 kDa chacune, produite par *Bacillus stearothermophilus* (Talbot et Sygush, 1990).

La plus haute température optimale observée d'une mannanase, était de 80°C, provenant de *Caldocellum saccharolyticum* (Lüthi et al., 1991).

Généralement, le LBG est utilisé pour la détermination du K_m des mannanases et ces valeurs indiquent d'une façon inversement proportionnelle, l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Dans ce travail, deux méthodes graphiques, celle de Lineweaver-Burk et celle de Eadie-Hofstee, étaient utilisées et comparées afin de calculer le K_m et le V_{max} de l'enzyme en présence de LBG. Idéalement, en absence d'erreurs expérimentales, les deux méthodes graphiques devraient donner exactement la même information à partir d'une droite. En pratique, l'une ou l'autre des méthodes peut être préférable à cause de la nature des données impliquées. Qualitativement, le tracé d'Eadie-Hofstee, étend les valeurs à forte concentration de substrat (où $v_o \rightarrow V_{max}$), alors que le tracé de Lineweaver-Burk comprime les points dans cette région. L'analyse avec les deux méthodes graphiques a permis de constater que la différence entre les valeurs de K_m et V_{max} n'est pas significative.

L'étude de la stabilité de la mannanase indiquait que cette enzyme est peu stable en absence de son substrat. Lüthi et al.(1991) observaient que la stabilité de la mannanase de *Caldocellum saccharolyticum* semblait augmenter en présence du substrat à des températures au dessus de 80°C. La mannanase perdait son activité si celle-ci était incubée à 90°C ou 95°C pendant 5 minutes, dans un tampon en absence de substrat. Mais 70% de son activité était conservée lorsque l'enzyme était incubée à 95°C pendant 10 minutes en présence de substrat, formant ainsi un complexe enzyme-substrat plus stable. Il serait intéressant d'étudier la stabilité de la β -mannanase de *S. lividans* IAF36 en présence de son substrat.

Le clone *S. lividans* IAF36 produit une mannanase qui ne possède pas d'activité cellulolytique, ni xylanasiqne et cette enzyme est facile à récupérer lors de fermentation. Ces deux propriétés permettent d'envisager avec optimisme, une application directe de cette enzyme, en forme non-purifiée, au bioblanchiment des pâtes de papier du bois mou.

CONCLUSION

Les conclusions que l'on peut tirer de cette recherche en rapport avec le clonage et le séquençage du gène codant pour la β -mannanase de *Streptomyces lividans* IAF36 sont les suivantes:

- Trois clones β -mannanase positifs contenant les plasmides suivants, ont été identifiés:

	taille de l'insertion (kb)
pIAF36 =	10.0
pIAF3 =	4.3
pIAF61 =	4.1

- Après avoir effectué la cartographie de chacune des insertions des clones *S. lividans* IAF3, IAF36 et IAF61, le sous-clonage permettait de localiser le gène de la mannanase au niveau de l'insertion.
- L'hybridation selon Southern a indiqué que pIAF36, pIAF3 et pIAF61 contenaient tous un gène homologue codant pour la β -mannanase.
- La délétion avec l'exonucléase III, du fragment de 1.7 kb (pIAF3) incluant le gène codant pour la β -mannanase, localisait le début du gène à environ 110 paires de bases de l'extrémité 5' du fragment de 1.7 kb et générait une série de fragments délétés se chevauchant, utilisés pour le séquençage du fragment.
- Le séquençage des deux brins du gène de la mannanase selon la méthode des didéoxynucléotides, permettait de

localiser précisément le site d'initiation ATG, à 70 paires de bases de l'extrémité 5' du fragment de 1.7 kb.

- La construction plasmidique pNAM1.7+ servait à déterminer l'orientation du gène *manA*.

- Le contenu en G+C du gène de la mannanase est de 68.8%, du même ordre de grandeur que le contenu en G+C observé chez les streptomycètes.

- Le séquençage des cinq premiers acides aminés à partir de l'extrémité NH₂-terminale de la mannanase, a permis de confirmer le cadre de lecture du gène.

- Le site de coupure du peptide signal (35 a.a.) pourrait être situé à 7 a.a. après le résidu proline retrouvé à la position 28.

- La mannanase de *S. lividans* IAF36 possède 67% d'homologie de séquence en acides aminés lorsque comparée avec celle de *C. saccharolyticum*.

- Les meilleurs rendements de production ont été obtenus entre 72 et 96 heures avec le clone IAF36 produisant environ 60 fois plus de mannanase que la souche sauvage *S. lividans* 1326.

- La méthode de purification de l'enzyme comporte une étape de précipitation éthanolique et un seul passage sur une colonne anionique DEAE. Le rendement de la purification était de 28.8%.

- La masse moléculaire de l'endo- β -mannanase purifiée est d'environ 40 kDa. La courbe de titration électrophorétique de la mannanase indique que le pI est d'environ 3.5.
- Les paramètres optimaux pour l'activité enzymatique de l'enzyme ont été déterminés à 57°C et à un pH de 6.75.
- La méthode graphique de Lineweaver-Burk et celle d'Eadie-Hofstee ont donné des valeurs comparables de K_m égales à 0.769 mg/mL et 0.75 mg/mL respectivement, et des V_{max} de 207.15 μ mole/mL/min et 205.76 μ mole/mL/min respectivement.
- À 42°C, la mannanase conservait 61% de son activité après 4 heures d'incubation mais seulement 20% après 24 heures.

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier le Dr Dieter Kluepfel qui m'a permis de faire deux stages durant mes études de Baccalauréat, stimulant ainsi mon intérêt pour entreprendre des études de deuxième cycle. Je lui suis aussi très reconnaissant d'avoir dirigé mes travaux de recherche pendant ces deux années menant à l'obtention de la maîtrise en microbiologie appliquée.

Je veux aussi remercier mes parents pour leur support moral et financier très apprécié, me permettant ainsi de mener à terme une étape importante de ma vie. Un gros merci aux membres de l'équipe des streptomycètes, et en particulier à Rolf Morosoli, François Shareck, Alain Moreau et François Paradis pour leurs précieux conseils, à Nicole Daigneault, Liette Biron et Lise Trempe pour toute l'aide apportée, ainsi qu'à Francis Gagnon pour sa coopération très appréciée. Merci au Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR), au Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) et à l'Institut Armand-Frappier pour m'avoir accordé l'aide financière couvrant la durée de mes études. Mes remerciements s'adressent aussi au personnel enseignant de l'Institut, celui de la bibliothèque, du service de l'informatique, et du registraire.

BIBLIOGRAPHIE

- AKINO, T., N. NAKAMURA et K. HORIKOSHI.** 1988. Characterization of three β -mannanases of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 773-779.
- AKINO, T., C. KATO et K. HORIKOSHI.** 1989. Two *Bacillus* β -mannanases having different COOH termini are produced in *Escherichia coli* carrying pMAH5. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 3178-3183.
- ARAKI, T. et M. KITAMIKADO.** 1982. Purification and characterization of a novel exo- β -mannanase from *Aeromonas* sp. F-25. *J. Biochem.* **91**: 1181-1186.
- ARAKI, T. et M. KITAMIKADO.** 1988. Exo-1,4- β -mannanase from *Aeromonas hydrophila*. *Methods in Enzymology. Biomass, Part A: Cellulose and hemicellulose.* W.A. WOOD et S.T. KELLOGG eds. Academic Press, San Diego, CA. Vol. **160**: 583-589.
- ARAUJO, A. et O.P. WARD.** 1990a. Hemicellulases of *Bacillus* species - Preliminary comparative studies on production and properties of mannanases and galactanases. *J. Appl. Bact.* **68**: 253-261.
- ARAUJO, A. et O.P. WARD.** 1990b. Purification and some properties of the mannanases from *Thielavia terrestris*. *J. Ind. Microbiol.* **6**: 269-274.
- ARAUJO, A. et O.P. WARD.** 1990c. Extracellular mannanases and galactanases from selected fungi. *J. Ind. Microbiol.* **6**: 171-178.
- ARAUJO, A. et O.P. WARD.** 1990d. Mannanase components from *Bacillus pumilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1954-1956
- BERTRAND, J.L., R. MOROSOLI, F. SHARECK et D. KLUEPFEL.** 1989. Expression of the xylanase of *Streptomyces lividans* and production of the enzyme on natural substrates. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 791-794.
- CIVAS, A., R. EBERHARD, P. LE DIZET et F. PETEK.** 1984. Glucosidases induced in *Aspergillus tamaris*: α -D-galactosidase and β -D-mannanase. *Biochem. J.* **219**: 857.
- DAIGNEAULT-SYLVESTRE, N. et D. KLUEPFEL.** 1979. Method for the rapid screening of cellulolytic streptomycetes and their mutants. *Can. J. Microbiol.* **25**: 858-860.

DEKKER, R.F.H., 1985. Biodegradation of the Hemicelluloses. In biosynthesis and biodegradation of wood components. T. Higuchi, ed. pp 505-533. Orlando: Academic Press.

EMI, S., J. FUKUMOTO et T. YAMAMOTO. 1972. Crystallization and some properties of mannanase. Agr. Biol. Chem. Vol. 36: 991-1001.

GHERARDINI, F.C. et A.A.SALYERS. 1987. Purification and characterization of a cell-associated, soluble mannanase from *Bacteroides ovatus*. J. Bact. 169: 2038-2043.

GOMARI, G.. 1955. Preparation of buffers for use in enzyme studies. Methods in Enzymology. Vol 1: 138. J.N. ABELSON et M.I. SIMON eds. Academic Press, San Diego, CA.

HALMER, P., J.D. BEWLEY et T.A. THORPE. 1975. Enzyme to break down lettuce endosperm cell wall during gibberellin-and light-induced germination. Nature 258: 716-718.

HENIKOFF, S. 1984. Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. Gene 28: 351-359.

HOPWOOD, D.A., M.J. BIBB, K.F. CHATER, T. KIESER, C.J. BRUTON, H.M. KIESER, D.J. LYDIATE, C.P. SMITH, J.M. WARD et H. SCHREMPF. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*, a laboratory manual., John Innes Foundation, Colney Lane, Norwich, 356 p.

JOHNSON, K.G. et N.W. ROSS. 1990. Enzymic properties of β -mannanase from *Polyporus versicolor*. Enzyme Microb. Technol. 12: 960-964.

KATZ, E., C.J. THOMPSON et D.A. HOPWOOD. 1983. Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. J. Gen. Microbiol. 129: 2703-2714.

KENNETH, L. Jones. 1949. Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. J. Bact. 57: 141.

KIESER, T.. 1984. Factors affecting the isolation of cccDNA from *Streptomyces lividans* and *E. coli*. Plasmid 12: 19-36.

KUSAKABE, I., A.F. ZAMORA, S. KUSAMA, W.L. FERNANDEZ et K. MURAKAMI. 1986. Studies on the mannanase of *Streptomyces*. VI. Structure of copra galactomannan and specificity of *Streptomyces* β -mannanase to the substrate. Nettarei Nogyo. 30: 264-271.

- KUSAKABE, I.** et R. TAKAHASHI. 1988. β -Mannanase of *Streptomyces*. Methods in Enzymology. Biomass, Part A: Cellulose and hemicellulose. W.A. WOOD et S.T. KELLOGG eds. Academic Press, San Diego, CA. Vol. 160: 611-614.
- LAEMMLI, U.K.**. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. Nature 277: 680-685.
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR et R.J. RANDALL.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Anal. Chem. 69: 646-648.
- LÜTHI, E., N.B. JASMAT, R.A. GRAYLING, D.R. LOVE, et P.L. BERGQUIST.** 1991. Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of a gene coding for a β -mannanase from the extremely thermophilic bacterium *Caldocellum saccharolyticum*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 694-700.
- MANIATIS, T., E.F. FRITSCH et J. SAMBROOK.** 1982. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- MCCLEARY, B.V.,** 1979. Enzymic hydrolysis, fine structure, and gelling interaction of legume-seed D-galacto-D-mannans. Carbohyd. Res. 71: 205-230.
- MCCLEARY, B.V., I.C.M. DEA et A.H. CLARK.** 1984. The fine structure of carob and guar galactomannans. Gums Stab. Food Ind. Appl. Hydrocolloids, 2nd Proc. Int. Conf. pp. 33-44.
- MCCLEARY, B.V.,** 1988. Exo- β -mannanase from *Cyamopsis tetragonolobus* guar seed. Methods in Enzymology. Biomass, Part A: Cellulose and hemicellulose. W.A. WOOD et S.T. KELLOGG eds. Academic Press, San Diego, CA. Vol. 160: 589-595.
- McILVAINE, T.C.**. 1921. Buffer solution for colorimetric comparison. J. Biol. Chem. 49: 183-186.
- MEIER, H. et J.S.G. REID.** 1981. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. In: Encyclopedia of plant physiology, New Series, 13 A (PIRSON, A. et M.H. ZIMMERMANN, eds.) Springer-Verlag, Berlin, pp 418-471.
- MILLER, G.L.**. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426-428.

- MONDOU, F., F. SHARECK, R. MOROSOLI et D. KLUEPFEL. 1986. Cloning of the xylanase gene of *Streptomyces lividans*. *Gene* **49**: 323-329.
- PAICE, M.G. et L. JURASEK. 1984. Removing hemicellulose from pulps by specific enzymic hydrolysis. *J. Wood Chem. Technol.* **4**: 187-198.
- PAICE, M.G., R. BERNIER Jr. et L. JURASEK. 1988. Viscosity-enhancing bleaching of hardwood Kraft pulp with xylanase from a cloned gene. *Biotechnol. Bioeng.* **32**: 235-239.
- PHARMACIA LKB BIOTECHNOLOGY. 1989. PhastSystemTM: Owners manual. Pharmacia LKB Biotechnology, Sweden.
- POUTANEN, K., M. RATTO, J. PULS et L. VIIKARI. 1987. Evaluation of different microbial xylanolytic systems. *J. Biotechnol.* **6**: 49-60.
- PRIDHAM, T.G., P. ANDERSON, C. FOLEY, L.A. LINDENFELSER, C.W. HESSELTINE et R.G. BENEDICT. 1956/57. *Antibiot. Ann.*: 947-953.
- RATTO, M. et K. POUTANEN. 1988. Production of mannan-degrading enzymes. *Biotechnol. Lett.* Vol. **10**: 661-664.
- REESE, E.T. et Y. SHIBATA. 1964. β -Mannanases of fungi. *Can. J. Microbiol* **11**: 167-183.
- SANGER, F., S. NICKLEN et A.R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**: 5463-5467.
- SHAPIRO, S. 1989. Regulation of secondary metabolism in actinomycetes. S. Shapiro eds. CRC Press Inc., Boca Raton, Fl. pp. 24,25 et 31,32.
- SINNER, M., N. PARAMESWARAN et H.H. DIETRICH. 1979. In "Hydrolysis of cellulose: mechanisms of enzymatic and acid catalysis" (Adv. Chem. Ser. No.181) (R.D. Brown and L. Jurasek, eds.) A. C. S., Washington, D.C. pp. 303-329.
- SOUTHERN, E.M.. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- TAKAHASHI, R., I. KUSAKABE, H. KOBAYASHI, K. MURAKAMI, A. MAEKAWA et T. SUZUKI. 1984. Purification and some properties of mannanase from *Streptomyces* sp. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 2189-2195.

TALBOT, G. et J. SYGUSCH. 1990. Purification and characterization of thermostable β -mannanase and α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. Appl Environ. Microbiol. 56: 3505-3510.

TEATHER, R.M. et P.J. WOOD. 1982. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Appl. Env. Microbiol. 43: 777-780.

TORRIE, J.P., D.J. SENIOR, et J.N. SADDLER. 1990. Production of β -mannanases by *Trichoderma harzianum* E58. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 303-307.

VIKARI, L., M. RANNA, A. KANTELINEN, J. SANDQUIST et M. LINKO. 1986. Bleaching with enzymes. 3rd Int. Conf. Biotechnology in the pulp and paper industry, Stockholm. June 16-19, 1986. Abstracts, pp. 67-69.

VIKARI, L., M. RANNA, A. KANTELINEN, M. LINKO et J. SANDQUIST. 1987. Proc. Int. Symp. Wood pulping Chem. 1: 151-154.

WATSON, M.E.E. 1984. Compilation of published signal sequences. Nucleic Acids Res. 12: 5145-5164.

YAMAURA, I., T. MATSUMOTO, F. MASARU and Y. FUNATSU. 1990. Purification and Some Properties of Endo-1,4- β -D-Mannanase from *Pseudomonas* sp. PT-5. Agric. Biol. Chem. 54: 2425-2427.

YAMAZAKI, N. et H.H. DIETRICH. 1979. Mode of action of a purified endo-1,4- β -mannanase on guar galactomannan. Holzforschung. 33: 36-42.

