

RECHERCHE D'ENZYMES PECTINOLYTIQUES CHEZ CINQ SOUCHES DE STREPTOMYCES ISOLEES D'UN SOL SAHARIEN (BISKRA)

B. Saoudi, D. Kirane, Z. Taibi & A. Ladjama

Département de Biochimie, Faculté des Sciences,
Université Badji-Mokhtar-Annaba, BP12, Annaba, 23000, Algérie.

ABSTRACT

From an isolate of 23 strains, five strains of filamentous bacterium belonging to the Streptomyces genus have been isolated from a Saharian soil of the region of Biskra. The primary results showed that these different strains secreted extracellular lyases acting on esterified pectin with 72% and on the polygalacturonic acid (0% of esterification) by mechanism of β elimination.

According to the strains, which have been tested. Streptomyces sp_{c10} proved to be the most potent which produced highly active pectate lyase. These lyases having an optimal pH of 9.5, inhibited by EDTA, and activated by CaCl₂ to 1 mM. The production of pectate lyase is optimal at the sixth days; inducible by the pectic substrate and repressed by glucose.

The different studies permitted also to get a possible the products of depolymerization, while the finale product of degradation is the unsaturated dimer which is metabolized by bacteria. The monomer of galacturonic acid was not be detected, which is due to transfer reaction.

Key Words: Streptomyces, pectate lyases.

RESUME

A partir d'un isolat de 23 souches, cinq souches appartenant au genre Streptomyces ont été isolées d'un sol saharien de la région de Biskra (Est d'Algérie). Les différents souches de Streptomyces secrètent des lyases extracellulaires agissant sur la pectine estérifiée à 72% et sur l'acide polygalacturonique 0% d'estérification par mécanisme de β élimination.

La souche de Streptomyces Sp_{c10} s'est montrée la plus active dans les mêmes conditions de culture (dans les conditions de culture utilisées). Celle-ci synthétise une pectate lyase extracellulaire, ayant un pH optimum de 9.5, et qui peut être activée par le CaCl₂ à 1 mM et inhibée par l'EDTA. La production de la pectate lyase est optimale au sixième jour; inductible par le substrat pectique et réprimée par le glucose.

L'analyse des produits finaux de dégradation montre que le produit terminal est le dimère insaturé. Le monomère d'acide galacturonique n'apparaît pas dans le milieu réactionnel.

Mots clés : Streptomyces, pectate lyases.

ملخص

ثلاثة وعشرون سلالة بكتيرية منتمية الى جنس Streptomyces تم عزلها من محطة صحراوية للتنمية الفلاحية بناحية وادي بن النوي "بسكرة" بالجنوب الجزائري .

أبدت مختلف هذه السلالات نشاطا محلا للبكتين وذلك بإفرازها لانزيمات pectinases المتمثلة في الليباز التي تهاجم الجزئي بطريقة الاستبعاد β elimination

خمس سلالات كانت محل الدراسة المعمقة , وقد تبين أن هذه الإنزيمات هي عبارة عن pectate lyases المحرصة بواسطة الجوهر , حساسة للتثبيط الهدمي بواسطة الجلوكوز , تنشط بواسطة أيونات الكالسيوم . كما تثبط في وجود الـ EDTA , ودرجة الحموضة المثلى لعمل هذه الإنزيمات pH=9.5.

أوضحت الأبحاث أن الناتج النهائي لعملية الهدم عبارة عن ثنائي جزئي غير مشبع . وهذا ما يدل على وجود خليط من الإنزيمات الداخلية والخارجية التأثير . لم يتم الكشف عن وجود جزئي الجلاكتورونيك وهذا يدل على حدوث تفاعلات الانتقال.

الكلمات المفتاحية : pectate lyase, Streptomyces

INTRODUCTION

Parmi les polymères végétaux, les substances pectiques se présentent comme des macromolécules glucidiques constituées essentiellement par des polygalacturonanes de degré d'estérification variable [1]. Ces biopolymères sont largement répandus dans le règne végétal où ils constituent avec l'hémicellulose et la cellulose, l'un des composants majeurs de la paroi des cellules végétales [2].

Des enzymes de dépolymérisation secrétés presque exclusivement par les microorganismes (bactéries ou champignons), sont capables de scinder le polymère en oligomères de faible degré de polymérisation, assimilables par ces mêmes microorganismes [3].

Ces dépolymérasas comprennent des hydrolases et des lyases qui catalysent la scission des liaisons osidiques par mécanismes de β élimination [4].

Un grand nombre de ces enzymes a été isolé depuis les années 60.

Chez les Actinomycètes les travaux de Kaiser [5] ont montré que plus de 70% de ces espèces étaient pectinolytiques dont la grande majorité dans le genre *Streptomyces*.

Quelques autres espèces de *Streptomyces* sécrétant des pectates lyases ont été étudiées [6] [7] [8] [9] [10] [11].

Ces enzymes sont également mises en évidences chez les bactéries phytopathogènes du genre :*Erwinia* [12] [13] *Xantomonas* [14] et *Pseudomonas* [15] et chez des champignons du genre *Aspergillus* [16].

A l'isolement des enzymes et leur caractérisation ont succédé dès les années 70 avec le développement des techniques de la biologie moléculaire, le clonage et la caractérisation des gènes correspondants [17] [18] [19] [20] [21] [22].

A l'intérêt fondamental constitué par l'étude des enzymes pectolytiques de *Streptomyces* au point de vue biochimique et génétique s'ajoute la possibilité de les utiliser dans un but industriel.

En effet, les pectinases ont une application importante dans l'industrie agroalimentaire pour la clarification des jus de fruit à la suite du pressage des fruits [23] [24].

Les pectinases de *Streptomyces* sont également intéressantes à étudier dans le cadre de leur participation à la dégradation de la biomasse végétale contribuant ainsi à l'équilibre de l'environnement.

Ce travail vise à isoler des souches *Streptomyces* d'un sol saharien et à étudier l'équipement enzymatique.

MATERIEL ET METHODES

1. Isolement et identification des souches

Les prélèvements des échantillons de sol pour la recherche de *Streptomyces* à activité pectinolytique ont été effectués au niveau de deux stations de palmeraies de la wilaya de Biskra, l'une étant une station privée à environ 10Km de Sour El Khizlane, et l'autre la station technique de développement agricole saharien « Oued Ben El Noui ». Les prélèvements sont effectués au niveau de la couche rizosphérique (riche en matière organique) à une profondeur 7 à 10cm [25] et de manière aléatoire. Une série de dilution au 1/10 est réalisée [10^{-1} à 10^{-8}].

Après purification des souches, celles ci sont repiquées sur milieu complet (CM) en gélose inclinée puis incubées 14 jours à 30°C, et stockées à 4°C.

Une fois purifiée les souches sont identifiées en se basant sur leurs critères cultureux et morphologiques sur des milieux de culture gélosés spécifiques [26] [27].

Cette méthode permet ainsi de déterminer le genre de chaque souche [28].

Une souche de référence, *Streptomyces coelicolor* ATCC 10147 est utilisée pour la comparaison des activités pectinolytiques.

2. Recherche de l'activité pectinolytique des souches isolées

Pour la recherche des activités pectinolytiques, les cinq souches de *Streptomyces* isolées sont d'abord repiquées sur milieu solide complet (Hopwood) à base de glucose. Ce milieu permet d'activer les souches de *Streptomyces* en vue de les repiquer sur un autre milieu plus spécifique pour la production des pectinases.

Après 2 à 3 passages sur milieu complet (CM), les souches sont repiquées sur milieu minérale de Hankin [29] auquel on ajoute une seule source de carbone la pectine de citrus estérifiée à 72 % à 5 g/l (sigma P 9135). Le milieu est gélosé, ajusté à pH 7.2, stérilisé et coulé dans des boîtes de pétrie. Après ensemencement, l'incubation des boîtes se fait à +30°C pendant 7 jours avec 2 à 3 passages.

A partir d'une colonie sur milieu solide, le milieu liquide à base de pectine ensemencé et incubé à +30°C pendant 7 jours pour la production des pectinases.

3. Extraction des pectinases

Au bout de 7 jours de culture à pH 7.2 et à la température 30°C, la culture est arrêtée.

Pour chaque souche le milieu de culture liquide est filtré sous vide (verre fritté Numéro 0). Le filtrat clarifié obtenu représente la préparation enzymatique brute. Cet extrait servira pour la recherche des polygalacturonases et /ou lyases chez les cinq souches de Streptomyces.

4. Méthodes analytiques

L'activité des pectinases est recherchée directement dans le filtrat de culture clarifiée.

Les dépolymérasés (polygalacturonases et / ou lyases) sont mises en évidence par la mesure de pouvoir réducteur par la méthode de Nelson [30] et Somogyi [31].

L'activité est exprimée en μM de sucres réducteur par minute et calculée à partir de la courbe d'étalonnage du polygalacturonate. L'activité spécifique est exprimée en UI par mg de protéine.

L'activité des polygalacturonases et /ou des lyases peut être également mise en évidence par la méthode spécifique à l'acide thiobarbiturique (TBA) [32] qui détecte les lyases à 550nm et les polygalacturonases à 515 nm.

Une autre méthode spécifique aux lyases se fait par mesure de l'absorbance à UV 232 nm [4].

5. Choix d'une souche de Streptomyces pour la production de l'enzyme

Les cinq souches sont cultivées en milieu liquide de Hankin à base de pectine comme source de carbone unique à 5g/l à pH 7.2 et température d'incubation 30°C. Pour chaque souche, les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford [33] et l'activité spécifique est calculée.

La comparaison des activités spécifiques permet de sélectionner une souche pour la production de l'enzyme.

6. Propriétés de l'enzyme isolée

6.1 Choix du temps de culture

La souche de sélectionnée est cultivée sur milieu Hankin liquide en tube à essai non agitée à 30°C et pH 7.2 (de 1 à 7 j) .Pour chaque tube l'activité spécifique est mesuré ou bout de 5h de réaction.

6.2 pH optimum

L'activité enzymatique globale à chaque pH a été étudiée par incubation des surnageants de cultures filtrées sur le polygalacturonate à 0.2% pour une gamme de pH allant de 7 à 11 en tampon Tris-Hcl. L'activité lyase est mesurée par détermination directe de l'absorbance en UV à 232nm après un temps d'incubation +30°C par rapport à un blanc traité dans les même conditions mais avec un

surnageant inactivé au préalable par chauffage à l'ébullition.

6.3 Effet du calcium et l'EDTA

L'effet du CaCl_2 a été étudié au pH optimum de l'enzyme. Le substrat est l'acide polygalacturonique à 0.2% additionné de CaCl_2 à des concentrations variant de 0 à 2 mM [34]. L'activité est mesurée en UV à 232 nm.

L'effet de L'éthylène diamine tétraacétique (EDTA) sur de l'enzyme a été également étudiée. Une concentration de 10mM d'EDTA [13] [34] est additionnée au milieu réactionnel et l'activité est mesurée en UV 232nm.

6.4 Nature adaptative ou constitutive et répression catabolique par le glucose

La souche à activité pectinolytique est cultivée sur milieu minéral d'Hankin auquel est ajouté une source de carbone unique (D-mannose) qui est différente du substrat naturel de l'enzyme. Après 6 jours d'incubation à 30°C, l'activité pectinolytique est recherché dans les surnageant par mesure de l'absorbance UV 232nm par rapport à un blanc.

La répression catabolique par le glucose a été également étudiée. La souche de Streptomyces est alors cultivée sur milieu liquide de Hankin contenant de la pectine à la concentration 5g/l additionnée de glucose à une concentration de 5g/l final [35].

L'activité pectinolytique est mesurée après six jours de culture à +30°C en UV à 232nm.

6.5 Nature des produits de dépolymérisation

Après six jours de culture en milieu liquide (Milieu d'Hankin) l'activité pectinolytique est recherchée directement dans les filtrats de culture par chromatographie sur couche mince (Schleicher et Schöll F-1500) dans un cuve de migration contient un mélange des solvants : acide formique-n.butanol- H_2O (3 : 2 : 1) V/V. Après révélation à l'acide sulfurique 5% dans l'éthanol à 95% et chauffage à 100°C [36]. La mesure du RgalUA du digalacturonate insaturé (rapport entre la distance de migration du composé à celle de la migration du monogalacturonate saturé) permet d'identifier les produits finaux de dépolymérisation [37].

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. Isolement et identification

Parmi les souches Actinomycétales isolées, 5 souches ont été sélectionnées et purifiées en vue de les identifier et tester leurs activités pectinolytiques. L'identification basée essentiellement sur des testes biochimiques et morphologiques à permis de

sélectionner cinq souches. Les résultats obtenus sont représentés sur le tableau (I).

Ces différentes souches présentent un mycélium végétatif ramifié, non fragmenté, et ne donnent pas de sporange ou de sclérote, et sont toutes Gram+ [38] [39]. Ce qui les rattache au genre Streptomyète [28].

Ces résultats concordent avec ceux de Sabaou N de l'INRA d'Alger et qui a étudié la microflore des sols sahariens [25].

2. Recherche de pectinases en milieu liquide

Les pectinases peuvent être des polygalacturonases ou des lyases ou un mélange d'estérase et de dépolymérase. Dans un premier temps la recherche de dépolymérase a été effectuée par la mesure de pouvoir réducteur.

L'examen des résultats montre que les cinq souches cultivées sur la pectine en milieu liquide sont actives sur leur substrat (Tableau II).

Cependant les souches Streptomyces sp_{c10}, Streptomyces sp_{c5} semblent être plus actives que les trois autres souches et particulièrement la souche de référence Streptomyces coelicolor ATCC10147. Ces différentes souches secrètent des lyases ou des polygalacturonases (enzymes extracellulaires) capables de scinder le polymère en oligomères de petites tailles assimilables par les microorganismes.

En effet les travaux de Kaiser sur les Actinomycètes ont montré que plus de 70% des espèces étaient pectinolytiques dans plus de 80% dans le genre Streptomyces [5].

Les travaux de Ladjama ont montré également que des souches de Streptomyces SK et G isolées d'un sol tunisien Gabes (sud de la Tunisie) et Skanes sont actives sur leur substrat pectique par sécrétion de pectate lyases [44] [45].

Les dépolymérase secrétées peuvent être des polygalacturonases ou des lyases.

Pour rechercher ces enzymes, un test à l'acide thiobarbiturique (TBA) a été utilisé. L'examen de la courbe (figure 1) montre qu'il y a un maximum d'absorption situé à 550nm et cela pour toutes les souches, ce test montre que les souches de Streptomyces secrètent des lyases (pectate lyases ou pectines lyases).

Les pectate lyases attaquent préférentiellement l'acide polygalacturonique ou la pectine moyennement estérifiée. Le milieu de culture de production contient comme source de carbone, pectine hautement estérifiée à 72.8% ce qui normalement favorise les pectines lyases [34] [46]. Cependant, les différentes souches peuvent synthétiser un mélange d'estérase et de pectate lyases ; ainsi, l'estérase déméthyle la pectine

hautement estérifiée et la pectate lyase attaque l'acide polygalacturonique.

Les pectines lyases sont produites beaucoup plus par les champignons tel que Aspergillus et Penicillium [47] [48] avec comme site spécifique de fixation la présence de groupements méthoxylés.

La présence de lyases est confirmée également par l'absorbance en UV 232nm des composés insaturés (tableau III).

3. Choix de la souche pour la production et la caractérisation de l'enzyme

L'étude comparative des activités spécifiques des souches a montré que la souche de Streptomyces sp_{c10} présente une activité supérieure à celles des autres souches (tableau II).

La souche de Streptomyces sp_{c10} a été donc choisie pour une étude plus complète (temps de culture, pH optimum, activation par le chlorure de calcium, nature adaptative ou constitutive, répression catabolique par le glucose et nature des produits de dépolymérisation)

3.1. Choix du temps de culture

L'examen de la courbe (figure 2) montre que l'activité spécifique croît en fonction du temps jusqu'au cinquième jour, et décroît par la suite progressivement.

Le temps de culture choisi est donc de six jours.

3.2. Nature constitutive ou adaptative répression catabolique par le glucose

L'examen du tableau IV montre qu'en absence de pectine l'enzyme n'est pas synthétisé. Le mannose n'induit pas donc la synthèse de la pectate lyase. Également l'addition du glucose au polymère pectique n'induit pas la synthèse de l'enzyme.

Ces phénomènes sont connus chez la plupart des microorganismes [13] [35] [49].

Actuellement sur le plan économique ; il est devenu possible par génie génétique d'obtenir des enzymes à l'état constitutif, c'est le cas de Penicillium occitanis [21] [22] [48] ainsi que Pseudomonas syringae [20].

3.3. pH optimum d'action de l'enzyme

L'examen de la courbe (Figure 3) représente l'évolution de l'activité de l'enzyme en fonction du pH. L'étude de la courbe montre que le maximum d'activité est atteint au pH 9.5.

Ce résultat concorde avec ceux obtenues chez d'autres souches secrétant des lyases et c'est le cas de Streptomyces SK [44] [45] Streptomyces coelicolor A (3)2 [50] et Streptomyces fradiae [6] le pH optimum d'action des lyases est de 9.

3.4. Effet du CaCl₂ et l'EDTA sur l'activité de l'enzyme

L'effet du chlorure de calcium et l'EDTA ont été étudiés au pH optimum de l'enzyme.

Sur la figure (4) on remarque que l'activité est optimale à 1mM de CaCl₂. Ces résultats ont été observés chez des souches de *Streptomyces* SK [44] [45] et *Streptomyces nitrosporeus*, [7] [8].

En effet le calcium active l'enzyme par pontage entre le polymère pectique et l'enzyme [51].

Dans le cas de l'EDTA agent chélateur, on remarque (tableau V) que l'addition de l'EDTA à 10mM inhibe complètement l'activité de l'enzyme. L'EDTA inhibe essentiellement les pectates lyases et non les pectines lyases [34] [51] ce qui montre que l'enzyme secrétée serait un mélange d'endopectate lyases et d'exopectate lyases.

3.5. Détection des produits de dépolymérisation par CCM

L'examen du chromatogramme (figure 5) fait apparaître une seule tâche pour toutes les souches.

Le calcul des R_galUA donne une valeur de 0,86 proche de celle de la littérature [37][52] [53].

Ce composé serait donc un dimère insaturé. Le monomère n'apparaît pas dans le milieu de culture et cela est dû à des réactions de transfert [54]. Ces résultats sont comparables à ceux de Sato [6] [7] [8] [9] [10] Ladjama et Collmer [13] [18] [20] qui ont travaillé sur d'autres souches de *Streptomyces* ou d'*Erwinia* et qui ont montré que ces souches sécrètent des lyases attaquant le polymère par mécanisme de β élimination et libèrent dans le milieu le dimère insaturé métabolisable par la bactérie.

CONCLUSION

Ce travail de recherche a permis à partir d'un sol saharien d'isoler 23 souches appartenant au genre *Streptomyces*. L'étude de l'activité pectinolytique des 23 souches a montré que cinq souches sont très actives sur le substrat. La comparaison des activités spécifiques a montré que la souche *Streptomyces* sp_{c10} est la plus active et secrète dans le milieu liquide une pectate lyases (mélange d'endo et d'exo pectate lyase). Cette enzyme inductible (préparation brute) est activée par le calcium, inhibé par l'EDTA et agit à pH alcalin (9.5), ce qui corrobore avec d'autres travaux de recherche.

L'action de l'enzyme sur la pectine libère un dimère insaturé et aucun autre composé intermédiaire n'apparaît dans le milieu réactionnel ce qui est en faveur d'une attaque endopectate lyase et exopectate lyase d'où la nécessité de purifier ces enzymes. Le monomère d'acide galacturonique

n'apparaît pas également dans le milieu et cela est dû à des réactions de transfert.

REFERENCES

[1]Thibault J.F. (1980) "Les substances pectiques" dans : "Les polymère végétaux, polymère pariétaux et alimentaires non azotés", B. Monties Ed Gauthier-Villars Paris. pp232-251.

[2] Chamier A.C., Dixon P.A.(1982)."Pectines in leaf degradation by aqate Hyphomycetes" *J.Microbiol.*128; 2469-2483.

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

[4] Albersheim P., Killias U. (1962) "studies relating to the purification and properties of pectin transesterase ", *archives of biochemistry and biophysics* .97; 107-115.

[5] Kaiser P. (1971)"L'activité Pectinolytique des *Actinomycetes*" *Ann. Inst. Pasteur.*121; 389-404

[6] Sato M., Kaji A. (1975)." Purification and properties of pectate lyase produced by *Streptomyces fradiae*", *IFO3439. Agric. Biol. Chem.* 39, 819-824.

[7] Sato M., Kaji A. (1977a). " Purification and properties of pectate lyase produced by *Streptomyces nitrosporeus*", *Agric.Biol. Chem.* 41, 2193-2197.

[8] Sato M., Kaji A. (1977b)."action pattern of pectate lyase produced by *Streptomyces nitrosporeus*", *Agric. Biol. Chem.*41; 2199-2203.

[9] Sato M., Kaji A. (1980a). "Exopolygalacturonate lyase produced by *Streptomyces massaporeus*", *Agric. Biol. Chem.*44:717-721.

[10] Sato M., Kaji A. (1980b)." Another pectate lyase from *Streptomyces nitrosporeus*", *Agric. Biol. Chem.*4';1345-1349.

[11] Ladjama A., Taibi Z. (2004)"Isolement, Purification, Caractérisation d'une pectate lyase d'une souche de *Streptomyces*", Quatrième journées biotechnologique de l'association Tunisienne de biotechnologie Sfax Tunisie.

- [12] Collmer A., Keen N.T. (1986) "The role of pectic enzymes in plant pathogenesis", *Annu.Rev.Phytopathol.* 24; 383-409.
- [13] Collmer A., Bateman D.F. (1981) "Impaired induction and self-catabolite repression of extracellular pectate lyase in *Erwinia chrysanthemi* mutants deficient in oligogalacturonide lyase", *Microbiology*.78;3920-3924.
- [14] Nasuno S., Star M.P (1967) "Polygalacturonic Acid trans-eliminases of *Xantomonas campestris*" *Biochem.J.*104;178-185.
- [15] Liao C H. (1989) "Analysis of pectate lyases produced by soft rot bacteria associated with spoilage of vegetables." *Appl. Environ. Microbiol.*55 ;1677-1683.
- [16] Fenghour H., Ladjama A., Taibi Z. (2002) "Recherche de l'activité pectinolytique chez des souches de champignons microscopiques isolées d'un sol de la région d'el kala", *Technologies Avancées*.14 ; 55-60.
- [17] Keen N.T., Dahlbeck B., Staskawicz B., Belsler W (1984) "Molecular cloning of pectate lyase genes from *Erwinia chrysanthemi* and their Expression in *Escherichia coli* ", *J. Bacteriol.* 159;825-831.
- [18] Collmer A., Schoedel C., Roeder D.L Ried J.L., & Rissler J. (1985). "Molecular cloning in *Escherichia coli* of *Erwinia chrysanthemi* genes encoding multiple forms of pectate lyase", *J. Bacteriol.* 161;913-920.
- [19] Liao C H. (1991) "Cloning of pectate lyase gene *pel* from *Pseudomonas fluorescens* and detection of sequences homologous to *pel* in *Pseudomonas viridiflava* and *Pseudomonas putida*", *J. Bacteriol.*173; 4386-4393.
- [20] Bauer D.W., Collmer A. (1997) "Molecular Cloning, Characterization, and Mutagenesis of a *pel* Gene from *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* Encoding a Member of the *Erwinia chrysanthemi* PelADE Family of Pectate Lyases" *MPMI.* 10; 369-379.
- [21] Hadj-Taïeb N., Ayadi M., Trigui S., Bouabdallah F., Gargouri A. (2002) "Hyperproduction of pectinase activities by a fully constitutive mutant (CT1) of *Penicillium occitanis*" *Enz. Microbiol Biotechnol.* 30, 662-666.
- [22] Trigui-Lahiani H., Gargouri A. (2004) "Analyse moléculaire du gène codant pour une pectine lyase fongique et analyse comparative des protéines intracellulaires entre la souche sauvage et le mutant CT1", *Abst, Quatrième journées biotechnologique de l'association Tunisienne de biotechnologie Sfax.*
- [23] Reymond D., Bush D.A. (1972) "Les pectines trans-éliminases et leurs possibilités d'application en technologie des jus de fruits", *Ann.Technol.Agric.* 21 ; 545-553.
- [24] Ducroo P. (1982) "Utilisation industriel des enzymes", *Ind. Alim. Agric.* 99; 401-416.
- [25] Sabaou N., Boudjella H., Mostafaoui A., Zitouni A., Lamari L., Bouti K., Nekhili H., Nouasri A., Zebiri S., Badji B., Bennadji A (1998). "Rétrospective sur les actinomycètes des sols du Sahara algérien : sélection, écologie, taxonomie et antibiotiques ", Séminaire Zones Arides "Rétrospectives, enjeux et stratégies" ADRAR-Avril1998.
- [26] Shirling E.B., Gottlieb D. (1966). "Methods for characterization of *Streptomyces* species", *Int J Syst Bacteriol* 16; 313-340.
- [27] Shirling E.B., Gottlieb D. (1969). "Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. IV. Species descriptions from the second, third and fourth studies. *Int J Syst Bacteriol* 19 ; 391-512.
- [28] Williams S. T., Goodfellow M., Alderson G., Wellington E. M. H., Sneath P. H. A., Sackin M. J. (1983) "Numerical classification of *Streptomyces* and related genera", *J. Gen. Microbiol* 129; 1743-1813.
- [29] Hankin L., Zucker M., Sands D.C. (1971). "Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria", *Applied Microbiology*.22;204-209.
- [30] Nelson N. (1944) "A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose", *J.Biol.Chem.* 153; 375-380.
- [31] Somogyi M. (1945). "A new reagent for the determination of sugars", *J.Biol.Chem.* 160;61-73.
- [32] Moran F., Nasuno S., Mortimer B., Starr P. (1967) "Extracellular and Intracellular Polygalacturonic Acid trans-eliminases of *Erwinia carotovora*." *Archives of biochemistry and biophysics* .123, 298-306.
- [33] Bradford M. (1976) "rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal.Biochem.*92; 248-254.

- [34] Rexova-Benkova L., Markovic O. (1976). "Pectic enzymes", *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 38; 323-385.
- [35] Zucker M., Hankin L. (1970) "Regulation of pectate lyase synthesis in *Pseudomonas fluorescens* and *Erwinia carotovora*", *Jornal of Bacteriology*.10; 13-18.
- [36] Taibi Z., Ladjama A., Fenghour H (2002)." Isolation and caracterrization of a polygalacturonase activity in five local strains of microscopic fungi", *Synthèse* 11;126-131.
- [37] Zink R. T., Chatterjee A. K. (1985) "Cloning and Expression in *Escherichia coli* of Pectinase Genes of *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora*", *Appl. Environ. Microbiol.*49; 714-717.
- [38] Larpent J.P., Larpant-Gourgand M. (1997) "Memento technique de microbiologie" Tech & documentation Lavoisier 3^e Edition pp 596-621.
- [39] Theillieux J. (1997) "les actinomycètes" dans : "Microbiologie industriel : les microorganismes d'intérêt industriel" JY Levau, M Bouix, JL Multon .Tec.Doc. Lavoisier.APRIA pp423-487.
- [40] Mehling A., Wehmeier U F., Piepersberg W. (1995) "Nucleotide sequences of streptomycete 16S ribosomal DNA: towards a specific identification system for streptomycetes using PCR", *Microbiology*. 141; 2139-2147.
- [41] Chun J. (1995). "Computer-assisted classification and identification of actinomycetes." PhD thesis, University of Newcastle upon Tyne.
- [42] Kim E., Kim H., Kang K. H., Kho Y. H., Park, Y. H. (1991)"Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Streptomyces griseus* subsp. *griseus*", *Nucleic. Acids. Res.*19, 1149.
- [43] Kim D., Chun J., Sahin N., Hah Y. C., Goodfellow M. (1996)"Analysis of thermophilic clades within the genus *Streptomyces* by 16S ribosomal DNA sequence comparisons", *Int. J. Syst. Bacteriol* 46, 581-587.
- [44] Ladjama A., (1991)"Isolement, purification ,et caractérisation d'une endopectate lyase d'une souche de streptomycetes", Thèse doctorat . Université René Descartes de paris, 168p
- [45] Ladjama A., Chardron-Loriaux I., Foglietti M.J. (1991) " On the pectolytic activity of two streptomycetes strains "FEMS. *Microbiol. Lett.* 79;279-284.
- [46] Baron A., Thibault J.F. (1985)"Les enzymes pectolytiques " dans : "hydrolases et dépolymérase, enzymes d'intérêt industriel " A.Moranche, C.Costes.eds.Gauthier-Villars, Paris, pp143-164.
- [47] Edstrom R.D., Phaf H.J. (1964)."Eliminative cleavage of pectin and of oligogalacturonide methyle ester by pectin transesterases" , *J.Biol.Chem.*239 ; 2409-2415.
- [48] Trigui-Lahiani H., Gargouri A. (2004) " Analyse moléculaire du gène codant pour une pectine lyase fongique et analyse comparative des protéines intracellulaires entre la souche sauvage et le mutant CT1", *Abst, Quatrième journées biotechnologique de l'association Tunisienne de biotechnologie Sfax.*
- [49] Zucker M, Hankin L. (1971) "Inducible pectate lyase synthesis and phytopathogenicity of *Pseudomonas fluorescens*", *Can. J. Microbiol.* 17;1313-1318.
- [50] Bentley S. D, Chater K. F., Cerdeno-Tarraga A.M., Challis G. L., & 40 other Authors. (2002) "Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2)" *Nature* 417,141-147.
- [51] Vitali J., Brian S., Kester H.C.M., Visser J., Jurnak F.(1998)"The three-Dimensional Structure of *Aspergillus niger* Pectin Lyase B at 1.7-Å Resolution" *Plant.Physiol.*116;69-80
- [52] Ried J L., Collmer A. (1986)."Comparaison of Pectic enzymes Produced by *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*" *Applied and Environmental Microbiology.*52; 305-310.
- [53] Schoedel C., Collmer A (1986)."Evidence of Homology between the Pectate lyase-Encoding *pelB* and *pelC* Genes in *Erwinia chrysanthemi* " *J.Bacteriol.*167; 117-123.
- [54] Coulombel C., Foglietti M.J., Percheron F. (1972) " Identification and Kinetic of an inductible mannokinase from a *Streptomyces* strain", *Biochem Biophys Acta.*, 706;117-122.

Tab.I: Souches isolées à partir de sable de palmeraie appartenant au genre

<i>Echantillon du sol (1)</i>	<i>StreptomycesSp_{s9}</i> <i>StreptomycesSp_{s12}</i>
<i>Echantillon du sol (2)</i>	<i>StreptomycesSp_{c1}</i> <i>StreptomycesSp_{c5}</i>
<i>Echantillon du sol (3)</i>	<i>StreptomycesSp_{c10}</i>

Tab. II : Recherche des pectinases dans les filtrats de cultures par mesure du pouvoir réducteur à 650nm (Test Nelson-Somogyi)

Souches isolées du sol de la région de Biskra	Absorbance à 650nm Dilution 1/3
<i>StreptomycesSp_{s9}</i>	2.121
<i>StreptomycesSp_{s12}</i>	1.743
<i>StreptomycesSp_{c1}</i>	1.546
<i>StreptomycesSp_{c5}</i>	1.050
<i>StreptomycesSp_{c10}</i>	2.201
<i>Streptomyces coelicolorATCC10147</i>	1.320

Tab. III : Mise en évidence d'une activité pectate lyase chez les cinq souches les plus actives

Souches isolées du sol de la région de Biskra	Activité lyases Absorbance En UV à 232 nm
<i>Streptomyces sp_{s9}</i>	1.191
<i>Streptomyces sp_{s12}</i>	1.030
<i>Streptomyces sp_{c1}</i>	1.092
<i>Streptomyces sp_{c5}</i>	1.070
<i>Streptomyces sp_{c10}</i>	1.756
<i>Streptomyces coelicolor ATCC10147</i>	1.250

Tab.IV: Recherche de la nature constitutive ou adaptative des pectates lyases (Test TBA)
des 5 souches de *Streptomyces*

Souches isolées du sol de la région de Biskra	Absorbance à 550nm	
	Induction par le glucose	Induction par la pectine
<i>Streptomyces sp_{S9}</i>	0.00	1.886
<i>Streptomyces sp_{S12}</i>	0.036	1.495
<i>Streptomyces sp_{C1}</i>	0.067	0.400
<i>Streptomyces sp_{C5}</i>	0.00	0.235
<i>Streptomyces sp_{C10}</i>	0.040	2.200

Tab. V: Effet de l'EDTA sur l'activité pectates lyases
de *Streptomyces sp_{C10}*

Mesure de l'activité pectates lyases	En présence D'EDTA (10mM)	En absence D'EDTA
Absorbance à 232nm	0.013	0.615

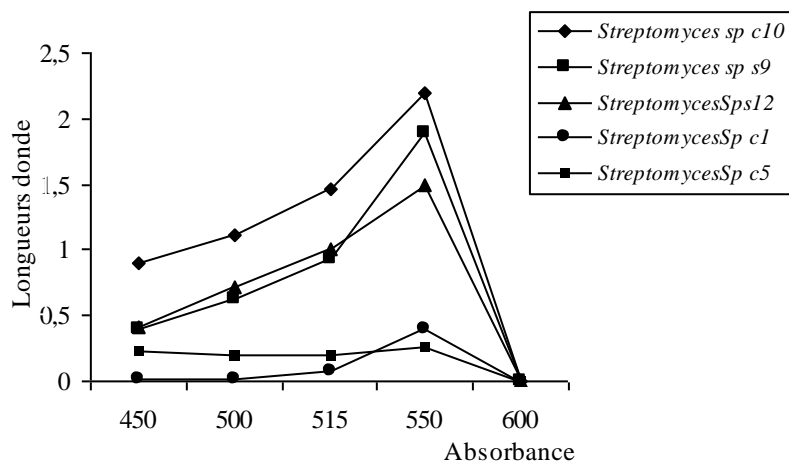


Fig.1: Mise en évidence d'une activité pectates lyases dans le filtrat de culture des cinq souches (Test TBA)

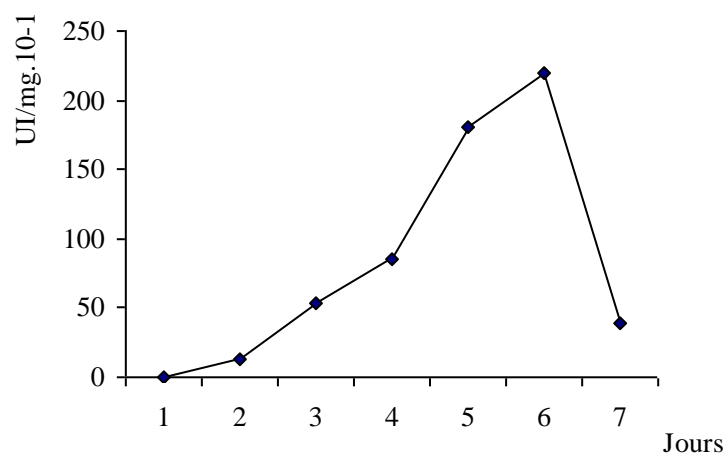


Fig.2: Mesure de l'activité spécifique de l'enzyme (UI/mg) de *Streptomyces spc10*

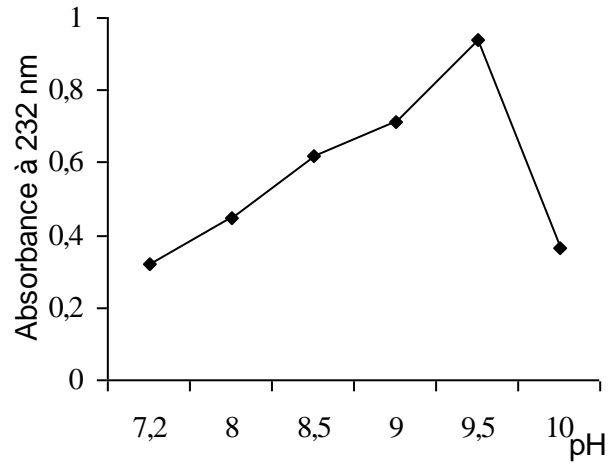


Fig.3: pH optimum d'action de l'enzyme.

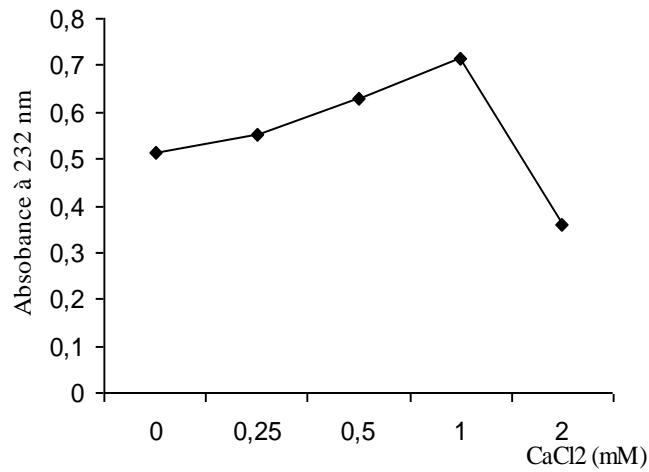


Fig.4: Influence du Chlorure de Calcium sur l'activité pectates lyases de *Streptomyces sp c10*

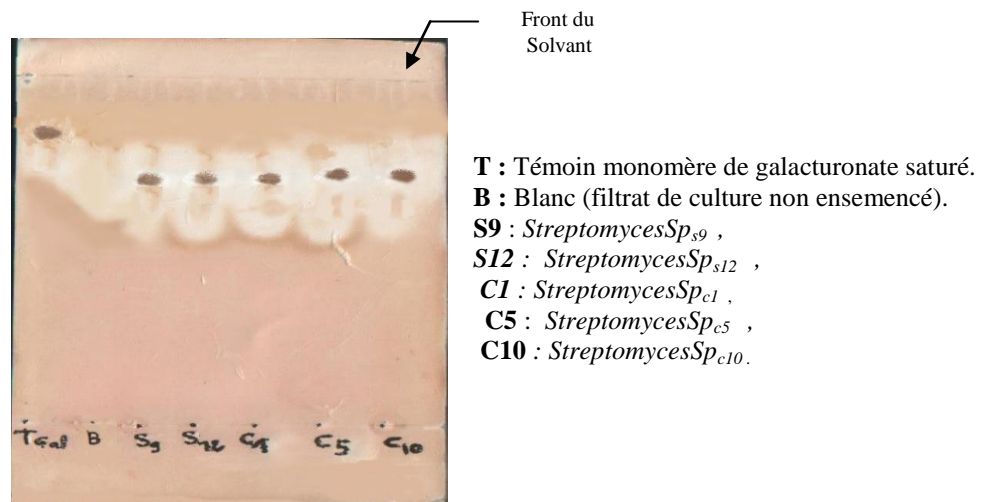


Fig .5 : Mise en évidence des produits de dépolymérisation chez les 5 souches par CCM