

# Les polymères de mannose en production animale.

## 2. Les enzymes de dégradation des mannanes dans l'alimentation des porcs et des volailles

Estelle BONNIN<sup>1</sup>, Michel LESSIRE<sup>2</sup>, Nathaële WACRENIER<sup>3</sup>, Fabien ALLEMAN<sup>4</sup>

<sup>1</sup>INRAE, UR BIA, 44316, Nantes, France

<sup>2</sup>INRAE, Université de Tours, BOA, 37380, Nouzilly, France

<sup>3</sup>INRAE, UE EASM, 17700, Surgères, France

<sup>4</sup>ELANCO, 92317 Sèvres, France

Courriel : [fabien.alleman@elancoah.com](mailto:fabien.alleman@elancoah.com)

■ Ce second article consacré aux polymères de mannose présente une revue exhaustive des propriétés des enzymes susceptibles de dégrader les mannanes végétaux, et donc de limiter les effets négatifs de ces polysaccharides chez les animaux monogastriques.

### Introduction

Le premier article a montré la grande diversité des polymères de mannose dans le monde vivant (Chateigner-Boutin *et al.*, 2020). Type de liaisons, longueur de la chaîne principale et nature des ramifications sont autant de facteurs de variation qui sont à l'origine de propriétés physicochimiques et biologiques très variées, et qui induisent souvent des effets négatifs sur les performances des animaux. Ainsi, limiter leurs effets conduit à envisager le rôle des enzymes susceptibles de les hydrolyser. Les mannanes végétaux sont les plus fréquemment rencontrés dans ce contexte, car ils sont naturellement présents dans les matières premières végétales utilisées dans les aliments : tourteaux et céréales. Du fait de la forte variabilité de leur structure chimique, leur dégradation nécessite l'intervention d'une ou de plusieurs d'enzymes différentes :  $\beta$ -mannanases,  $\beta$ -mannosidases et  $\beta$ -glucosidases,

$\alpha$ -galactosidases et mannane acétyl-estérases. Nous verrons dans cet article que la combinaison de ces enzymes peut générer une action synergique permettant d'améliorer significativement l'efficacité de cette dégradation. Ces enzymes ne font pas partie des enzymes digestives des animaux, elles sont produites par une grande variété de bactéries, champignons, plantes et animaux et peuvent agir dans une large gamme de pH et de température. Cela leur confère des applications dans de nombreux secteurs, comme les industries des pâtes et papiers, pharmaceutiques, fourragères, pétrolières, textiles et alimentaires, et en particulier dans le secteur de l'alimentation animale.

Dans une première partie, cette revue présente la diversité des enzymes impliquées dans la dégradation des mannanes, leurs propriétés physico-chimiques et leur spécificité. La seconde partie sera consacrée à l'utilisation de ces enzymes en alimentation des porcs et des volailles.

### 1. Biochimie des enzymes de dégradation des mannanes

#### ■ 1.1. Nomenclature

Comme toutes les enzymes actives sur les polysaccharides, les enzymes de dégradation des mannanes sont classées à la fois par l'« Enzyme Commission » (EC) ([enzyme.expasy.org](http://enzyme.expasy.org)), et par la base de données CAZY (*Carbohydrate Active enZymes*, [www.cazy.org](http://www.cazy.org)). La nomenclature EC, publiée par l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUBMB), répertorie les enzymes selon les réactions qu'elles catalysent. En particulier, les enzymes référencées EC 3.2.1.xx sont des hydrolases (EC 3.) qui coupent des liaisons glycosidiques (EC 3.2.) portées sur un atome d'oxygène (EC 3.2.1.). Le quatrième numéro est spécifique du substrat de chaque type d'enzyme. À l'inverse, la classification CAZY (*Carbohydrate Active enZymes*) est

**Tableau 1.** Nomenclature des enzymes impliquées dans la dégradation des [galacto][gluco]mannanes.

	$\beta$ -mannanases	$\beta$ -mannosidases	$\beta$ -glucosidases	$\alpha$ -galactosidases
EC	3.2.1.78	3.2.1.25	3.2.1.21	3.2.1.22
Familles CAZy	GH5, GH26, GH45, GH113, GH134	GH1, GH2, GH5, GH164	GH1, GH3, GH5, GH9, GH30, GH116	GH4, GH27, GH31, GH36, GH97

basée sur les similarités de séquences des protéines (Lombard *et al.*, 2014). Concernant les glycoside-hydrolases (GH), cela conduit à la définition de 171 familles (mars 2021).

### ■ 1.2. Les différents types d'enzymes capables de dégrader les mannanes

Les principales connaissances sur les  $\beta$ -mannanases,  $\beta$ -mannosidases et  $\beta$ -glucosidases,  $\alpha$ -galactosidases et mannane acétyl-estérases sont ici résumées. Le [tableau 1](#) donne les nomenclatures des enzymes actives sur les [galacto][gluco]mannanes et la [figure 1](#) montre les sites de coupure de chaque enzyme sur le substrat.

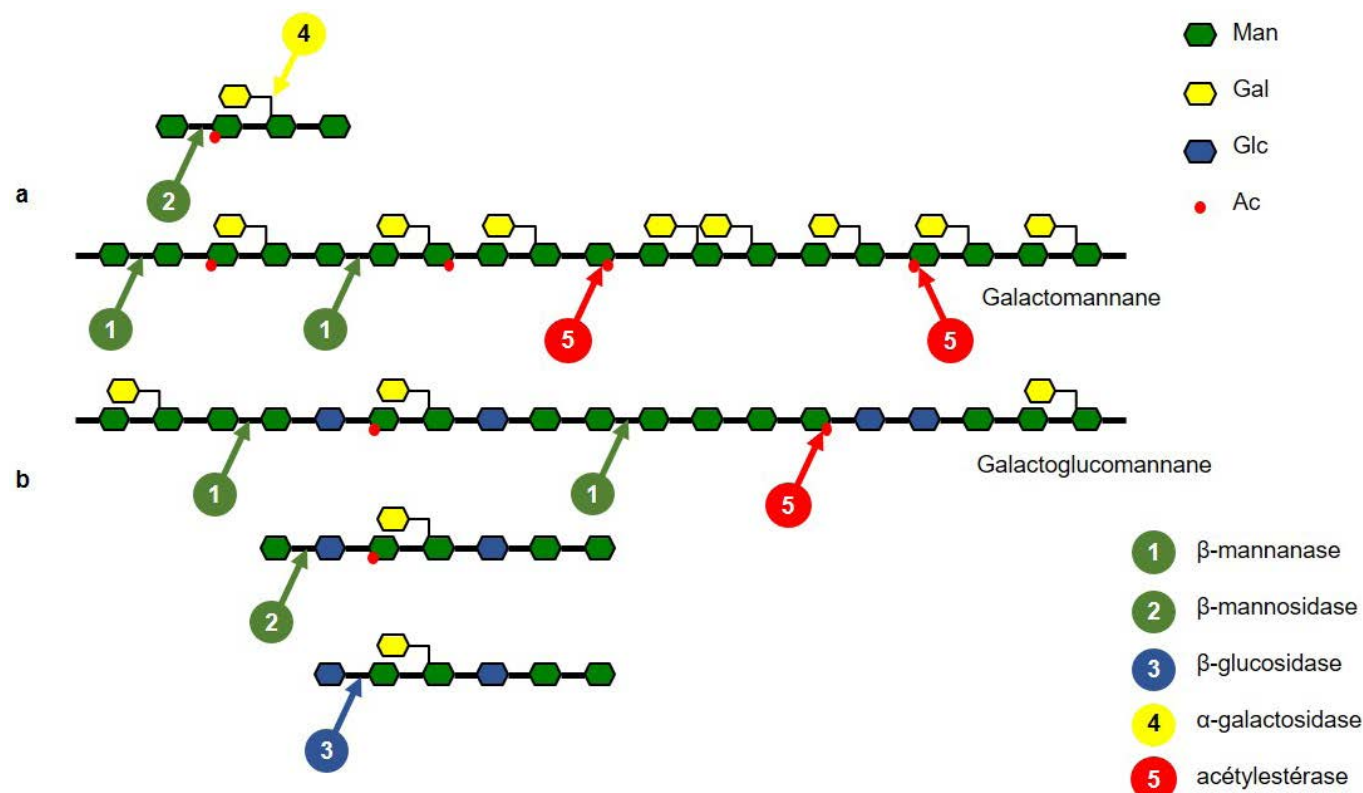
#### a. Les $\beta$ -mannanases

Les  $\beta$ -mannanases (EC 3.2.1.78) catalysent l'hydrolyse aléatoire des liaisons  $\beta$ -(1,4)-D mannosidiques dans les mannanes linéaires, les galactomannanes et les glucomannanes à l'intérieur de la chaîne (mode endo, [figure 1](#)). Ainsi, elles provoquent la chute rapide de la masse molaire et de la viscosité de ces polysaccharides et libèrent des manno-oligosaccharides à courte chaîne, les produits finaux étant le plus souvent le mannobiose (degré de polymérisation = 2) et le mannotriose (degré de polymérisation = 3). Quelle que soit leur origine, les  $\beta$ -mannanases décrites dans la littérature appartiennent très majoritairement aux familles GH5 et GH26, plus rarement aux familles GH113 et

GH134 de la base de données CAZy. Elles sont très répandues, autant chez les microorganismes que chez les plantes où elles participent notamment au processus de germination des graines (Carrillo-Barral *et al.*, 2018). Dans une moindre mesure, elles sont également décrites dans le règne animal, comme chez le ver de terre auquel elles permettent de digérer la matrice végétale contenue dans le sol (Ueda *et al.*, 2018).

Seules les mannanases produites par les microorganismes sont exploitées pour des applications industrielles (voir partie 2). La production de  $\beta$ -mannanases a été répertoriée par Chauhan *et al.* (2012). Les  $\beta$ -mannanases micro-

**Figure 1.** Sites de coupure des enzymes impliquées dans la dégradation des galactomannanes (a), et des galactoglucomannanes (b).



biennes sont le plus souvent excrétées dans le milieu de culture et la sécrétion/production est induite par l'ajout de sources carbonées riches en mannanes telles que la gomme de konjac, de caroube ou de guar (Gübitz *et al.*, 1996 ; Kim *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2014). Le champignon *Athelia rolfsii*, précédemment dénommé *Sclerotium rolfsii*, produit ses enzymes en présence de glucomannane de konjac ou de galactomannane de caroube (Gübitz *et al.*, 1996). Chez le champignon thermophile *Thermoascus aurantiacus*, un niveau élevé d'activité  $\beta$ -mannosidase et  $\beta$ -mannanase est induit par l'ajout de gomme de caroube dans le milieu de culture (Gomes *et al.*, 2007). À l'inverse, la production de ces enzymes est réprimée en présence de mannose, produit ultime de la dégradation.

Le pic de production de ces enzymes intervient après 1-3 jours de culture des bactéries, alors qu'il faut souvent plus de 10 jours pour qu'un champignon atteigne sa production maximale, ce qui a des conséquences majeures pour les industriels producteurs d'enzymes. Les  $\beta$ -mannanases d'origine bactérienne sont surtout présentes chez les bactéries Gram +, notamment chez le genre *Bacillus*. Chez les champignons, elles sont décrites notamment chez *Trichoderma* (Stålbrand *et al.*, 1995), *Penicillium* (Cai *et al.*, 2011 ; Wang *et al.*, 2012), *Aspergillus* (Rosengren *et al.*, 2014) ou *Talaromyces* (Wang *et al.*, 2015a).

Qu'elles soient d'origine bactérienne ou fongique, ces enzymes sont souvent décrites comme étant résistantes à l'hydrolyse par les protéases telles que trypsine et chymotrypsine (Srivastava et Kapoor, 2015). Cette propriété est particulièrement intéressante pour leur utilisation, notamment en alimentation puisqu'elles seront résistantes aux protéases digestives du tractus intestinal.

Les pH optimaux des  $\beta$ -mannanases bactériennes sont souvent autour de la neutralité alors qu'ils sont plutôt acides pour les  $\beta$ -mannanases fongiques. *Bacillus* sp. N16-6 constitue une exception, c'est en effet une bactérie alcalophile dont la  $\beta$ -mannanase est la plus active à pH 10 (He *et al.*,

2008). Les températures optimales varient dans une gamme assez large, de 50°C à 90°C, quelle que soit l'origine bactérienne ou fongique de l'enzyme étudiée. Cela s'accompagne le plus souvent d'une bonne stabilité à des températures compatibles avec les procédés de granulation des aliments destinés aux animaux d'élevage. Par exemple, la température optimale de la  $\beta$ -mannanase de *Paenibacillus* sp. DZ3 est de 60°C et l'enzyme conserve 100 % de son activité après 1 h d'exposition à cette température (Chandra *et al.*, 2011). De même, la  $\beta$ -mannanase de *Talaromyces leycettanus* JCM12802 est active de façon optimale à 85-90°C et stable jusqu'à 1 h à 70°C (Wang *et al.*, 2015a). Cette thermostabilité est liée à la structure de l'enzyme, et notamment à la présence d'un module de fixation au polysaccharide (CBM pour Carbohydrate Binding Module). L'effet favorable d'un CBM sur la stabilité de la protéine a d'autre part été mis en évidence par la production d'une protéine de fusion recombinante : la  $\beta$ -mannanase d'*Aspergillus aculeatus* a été exprimée après y avoir adjoint le CBM1 de la cellobiohydrolase d'*Aspergillus niger*, et cette nouvelle enzyme est à la fois plus active et plus thermostable que la protéine native sans CBM (Pham *et al.*, 2010).

#### b. Les $\beta$ -mannosidases

Les  $\beta$ -mannosidases (EC 3.2.1.25) hydrolysent comme les  $\beta$ -mannanases la liaison  $\beta$ -(1,4) entre deux résidus  $\beta$ -mannose, mais elles libèrent spécifiquement le résidu situé à l'extrémité non-réductrice des mannoooligosaccharides (figure 1). Ainsi, elles complètent l'action des  $\beta$ -mannanases en hydrolysant en monomères les oligosaccharides libérés par ces dernières. Elles sont présentes dans tous les règnes, y compris chez l'homme (Alkhayat *et al.*, 1998), mais sont beaucoup moins décrites que les mannanases. Parmi les mannosidases caractérisées (et répertoriées dans la base de données CAZY, [www.cazy.org](http://www.cazy.org)), la majorité est classée dans la famille GH2. Cette famille ne contenait initialement que des mannosidases de mammifères, jusqu'à la description d'une mannosidase bactérienne issue de *Cellulomonas fimi* de la même famille (Stoll *et al.*, 1999).

Aujourd'hui encore, la famille GH2 ne contient aucune  $\beta$ -mannosidase végétale. Une GH2 de *Cellulomonas fimi* est décrite comme une exo-mannanase, c'est à dire une enzyme plus affine pour le polymère que pour les oligomères et libérant du mannose (Domingues *et al.*, 2018).

Malgré cette large distribution des  $\beta$ -mannosidases dans le monde vivant, peu de publications rapportent leur purification et leur caractérisation. Les travaux les plus nombreux ont porté sur les enzymes issues d'organismes thermophiles ou hyperthermophiles. Ainsi, l'activité de la  $\beta$ -mannosidase GH2 de *Thermobifida fusca* est optimale à 53°C et pH 7,17 (Béki *et al.*, 2003), tandis que l'activité de la GH1 de *Pyrococcus furiosus* est optimale à 105°C et pH 7,4 (Bauer *et al.*, 1996). Dans la majorité des cas, les pH optimaux des  $\beta$ -mannosidases bactériennes sont proches de la neutralité. Par contre, les mannosidases fongiques telles que celles de *Thermoascus aurantiacus* (Gomes *et al.*, 2007) et de *Athelia rolfsii* (Gübitz *et al.*, 1996) ont des pH optimaux très acides, de l'ordre de 2,5-3.

#### c. Les $\beta$ -glucosidases

Les  $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21) libèrent le glucose de l'extrémité non-réductrice à partir de substrats à courte chaîne. Celles qui sont impliquées dans l'hydrolyse des [galacto] glucomannanes hydrolysent la liaison  $\beta$ -(1,4) entre un résidu D-Glucose et un résidu D-Mannose d'oligosaccharides issus de l'action des  $\beta$ -mannanases sur des glucomannanes (figure 1). Ces enzymes sont très fréquentes dans tous les règnes. Elles sont présentes dans plusieurs familles de GH, surtout GH1 et GH3. Certaines des  $\beta$ -glucosidases GH1 issues de plantes (*Arabidopsis*, orge, riz, tomate) présentent une bi-fonctionnalité  $\beta$ -glucosidase/ $\beta$ -mannosidase (Kuntothom *et al.*, 2009). Les  $\beta$ -glucosidases bactériennes de la famille GH3 sont particulièrement représentées chez les bactéries de la microflore intestinale, notamment les genres *Bacteroides* et *Bifidobacterium* ([www.cazy.org](http://www.cazy.org)). Par contre, la majorité des études sur les  $\beta$ -glucosidases portent sur leur implication dans l'hydrolyse de la cellulose et de la biomasse lignocellulosique, où

elles produisent du glucose à partir de cellobiose. Ainsi, il est très difficile de trouver de l'information spécifique aux  $\beta$ -glucosidases impliquées dans l'hydrolyse des [galacto]glucomannanes. À titre d'exemple, les  $\beta$ -glucosidases GH1 d'*Agrobacterium* et de *Thermotoga maritima* sont respectivement 4 et 10 fois plus actives pour hydrolyser la liaison entre les deux résidus glucose du cellobiose que la liaison entre le résidu glucose et le résidu mannose du dimère 1,4- $\beta$ -D-glucosyl-D-mannose ([www.megazyme.com](http://www.megazyme.com)).

#### d. Les $\alpha$ -galactosidases

La dégradation des chaînes latérales des galactoglucomannanes nécessite l'intervention de 1,6- $\alpha$ -D-galactoside galactohydrolases (EC 3.2.1.22), appelées plus communément  $\alpha$ -galactosidases. Ces enzymes libèrent le galactose terminal non-réducteur lié en chaînes latérales des galactomannanes par une liaison  $\alpha$ -(1,6) (figure 1). Elles sont généralement plus actives sur des oligosaccharides de faible degré de polymérisation. Ainsi, l'activité de l' $\alpha$ -galactosidase du champignon comestible hydne hérisson (*Hericium erinaceus*) sur le galactomannane de guar ou de caroube ne représente que 0,3 % à 0,5 % de l'activité mesurée sur le substrat synthétique *p*-nitrophényl-galactoside (Ye *et al.*, 2018). Ces enzymes ubiquistes sont regroupées dans plusieurs familles, principalement GH27 et GH36. Les  $\alpha$ -galactosidases actives sur les galactomannanes appartiennent plutôt à la famille GH27 (Ademark *et al.*, 2001). Elles sont très largement présentes chez les bactéries (Post et Luebke, 2005 ; Song *et al.*, 2018), les champignons filamenteux (Bauer *et al.*, 2006 ; Gürkök *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2015b), et les plantes (Bayer *et al.*, 2006), notamment dans les graines (Harpaz *et al.*, 1974) où elles jouent un rôle au moment de la germination (Guimarães *et al.*, 2001 ; Feurtado *et al.*, 2001). Les  $\alpha$ -galactosidases sont également présentes dans le règne animal. En effet, des gènes codant ces enzymes ont été identifiés dans le génome de l'homme et de la souris. Deux  $\alpha$ -galactosidases de la famille GH31 ont été récemment mises en évidence chez le genre bactérien *Pedobacter* (Miyazaki *et al.*, 2015).

Une  $\alpha$ -galactosidase de la famille GH97 n'est décrite que chez *Bacteroides thetaiotaomicron*, une bactérie de la microflore humaine (Okuyama *et al.*, 2009).

La production des  $\alpha$ -galactosidases par les microorganismes est induite par l'ajout dans le milieu de culture de gomme de caroube, simultanément aux autres enzymes impliquées dans l'hydrolyse des galactomannanes (Puchart *et al.*, 2000). Comme déjà mentionné pour les mannanases, certaines  $\alpha$ -galactosidase sont décrites comme particulièrement résistantes aux protéases, y compris aux protéases digestives telles que trypsine, chymotrypsine, ou pepsine (Liu *et al.*, 2018 ; Ye *et al.*, 2018). Les quelques enzymes dont les activités ont été caractérisées ont une température optimale souvent supérieure ou égale à 60°C et un pH optimal qui dépend de leur origine bactérienne ou fongique. Par exemple, les deux  $\alpha$ -galactosidases mises en évidence chez le champignon *Neosartorya fischeri* ont des températures optimales de 60°C et 75°C (Wang *et al.*, 2015b). Le galactose est souvent montré comme inhibant l'activité des  $\alpha$ -galactosidases, de même qu'un certain nombre d'ions ( $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ , Ye *et al.*, 2018).

#### e. Les mannane acétyl-estérases

Les mannane acétyl-estérases (EC 3.1.1.-) sont également importantes pour l'hydrolyse des [galacto][gluco]mannanes, car la présence de groupements acétyles sur la chaîne principale du polysaccharide gêne l'action de certaines mannanases (Gübitz *et al.*, 1996). Les mannane acétyl-estérases hydrolysent donc la liaison ester entre les oses de la chaîne principale des [galacto][gluco]mannanes et l'acétyle (figure 1) et fournissent ainsi un site de reconnaissance aux mannanases. Contrairement aux précédentes enzymes citées, les mannane acétyl-estérases sont des carbohydre estérases (CE, [www.cazy.org](http://www.cazy.org)). La famille CE17 a été créée au printemps 2020 suite à la publication de Michalak *et al.* (2020) qui démontre l'activité acétyl-estérase spécifique des mannanes d'une protéine de la bactérie commensale *Roseburia intestinalis*. Les 13 enzymes de cette famille sont d'origine bactérienne.

### ■ 1.3. Méthodes de mesure et spécificité des enzymes actives sur les galactoglucomannanes

Pour être détectées dans les milieux de culture des microorganismes, ces enzymes font l'objet de méthodes de criblage basées sur la détection soit de la disparition du substrat, soit de l'apparition des produits. Dans les méthodes en milieu solide sur boîte de Pétri, le substrat et un colorant spécifique sont mélangés au milieu de culture et la consommation de substrat est détectée grâce aux halos translucides que forme le colorant autour des colonies lorsque le polysaccharide disparaît. Le rouge Congo offre un contraste satisfaisant et le diamètre du halo permet une semi-quantification de l'activité (Downie *et al.*, 1994). Comme pour toutes les glycoside-hydrolases, l'activité des mannanases, mannosidases et galactosidases peut également être quantifiée par dosage des extrémités réductrices libérées par l'hydrolyse de la liaison glycosidique. Les méthodes les plus courantes utilisent, l'acide dinitrosalicylique (Wang *et al.*, 1997), le cyano-acétamide (Gross, 1982), le bichinchoninate (Waffenschmidt et Jaenicke, 1987) ou l'arsenio-molybdate d'ammonium (Nelson, 1944). Ces méthodes diffèrent par leur sensibilité et peuvent être miniaturisées pour limiter la consommation de réactifs ou s'adapter à des petits volumes de solution enzymatique ou à une robotisation de la méthode (Sturgeon, 1990 ; Fox et Robyt, 1991). L'activité des endo-mannanases peut également être suivie en mesurant la diminution de viscosité d'une solution de mannanes. Pour ces mêmes enzymes, des galactomannanes de caroube ont été colorés par liaison covalente au Rémozol Brilliant Blue, permettant de concevoir une méthode rapide semi-quantitative de mesure d'activité en lisant simplement la densité optique des fragments de faible poids moléculaire libérés par l'hydrolyse enzymatique (Fülöp et Ponyi, 1997). De nombreux polysaccharides, solubles ou insolubles, et oligosaccharides marqués ont été développés commercialement pour faciliter ces mesures d'activité (Megazyme.com). Les mannosidases et galactosidases peuvent être spécifiquement mesurées sur des substrats synthétiques



dérivés du *p*-nitrophénol (*p* NP). En effet, l'hydrolyse du *p* NP-mannoside ou du *p* NP-galactoside par une mannosidase ou une galactosidase respectivement, libère du *p* NP qui donne une coloration jaune en milieu alcalin (Rouau et Odier, 1986). Un dérivé *p*-nitrophénylé existe également pour les acétyl-estérases, le *p* NP-acétate. L'utilisation de ces substrats synthétiques n'est qu'indicative car l'affinité de l'enzyme pour de tels substrats peut être très différente de celle pour les substrats naturels.

Étant donné la structure complexe des [galacto][gluco]mannanes (Chateigner-Boutin *et al.*, 2020), les liaisons glycosidiques reliant différents monomères forment des sites de reconnaissance variés pour les enzymes (figure 1). Celles-ci se distinguent donc par leur spécificité et par leur site de coupure sur le substrat. Par ailleurs, les galactomannanes végétaux présentent des taux de substitution par le galactose différents selon la source. Les plus couramment utilisés pour tester l'activité des  $\beta$ -mannanases et enzymes accessoires sont le galactomannane de caroube dont le rapport Man/Gal = 4, et le galactomannane de guar, dont le rapport Man/Gal = 2. Ainsi, la comparaison des activités d'une enzyme sur ces deux substrats permet d'apprécier sa tolérance aux substituants galactose. Par exemple, la  $\beta$ -mannanase de la bactérie *Cellulosimicrobium* sp. HY-13 présente des activités spécifiques très élevées sur les deux substrats mais son activité sur galactomannane de caroube est 1,4 fois plus élevée que celle sur un galactomannane de guar (Kim *et al.*, 2011). De la même façon, les  $\beta$ -mannanases GH5 de *Chaetomium* sp. CQ31 et *Penicillium freii* (fongiques) montrent une affinité plus importante pour le galactomannane de caroube que pour celui de guar (Katrolia *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2012). Les auteurs montrent ainsi que ces enzymes ont une affinité plus élevée pour un substrat moins substitué.

Les glucomannanes comportent une chaîne principale mixte de glucose et mannose qui présente donc deux types différents de liaisons. Les deux  $\beta$ -mannanases du champignon *Athelia rolfsii* ont une affinité plus élevée pour les galactomannanes et glucomannanes

que pour les mannanes linéaires (Gübitz *et al.*, 1996). Cela signifie que le galactose ou le glucose est reconnu préférentiellement par le site actif de ces enzymes. Une étude détaillée de deux  $\beta$ -mannanases bactériennes du genre *Bacillus* appartenant aux familles GH5 et GH26 permet de formuler une hypothèse sur l'origine structurale de leur affinité vis à vis du mannose ou du glucose (Tailford *et al.*, 2009). En effet, *Ba* Man5A, issue de *Bacillus agaradhaerens* est affine soit pour le glucose soit pour le mannose de part et d'autre de la liaison coupée, alors que *Bs* Man26A, issue de *Bacillus subtilis*, a une affinité légèrement plus élevée pour le mannose à gauche de la liaison coupée. Cela semblerait être lié à la capacité du site catalytique de l'enzyme à interagir avec le groupement hydroxyle en C<sub>2</sub> de l'ose, que celui-ci soit en position axiale, comme dans le mannose, ou équatoriale, comme dans le glucose.

La majorité des  $\beta$ -mannosidases sont surtout actives sur les oligosaccharides. Celle du champignon *Athelia rolfsii* est également active sur les mannanes et glucomannanes linéaires ou substitués par le galactose (Gübitz *et al.*, 1996). L'oligomannoside de degré de polymérisation 5 est le substrat préférentiel de la  $\beta$ -mannosidase GH5 du champignon *Absidia corymbifera*, mais elle est toutefois active sur les mannanes linéaires (Li *et al.*, 2015).

Les  $\alpha$ -galactosidases peuvent elles aussi montrer des spécificités différentes. L' $\alpha$ -galactosidase GH27 du champignon acidophile *Bispora* sp. MEY-1 est plus active sur les galactomannanes de caroube et de guar que sur des galacto-oligosaccharides (Wang *et al.*, 2010). Les deux  $\alpha$ -galactosidases GH27 du champignon thermophile *Neosartorya fischeri* se distinguent par la longueur de leur substrat préférentiel, l'une (Gal27A) étant plus active sur les galactomannanes, et l'autre (Gal27B) sur des oligosaccharides (Wang *et al.*, 2015b). L'étude de leur structure respective par modélisation moléculaire montre sur Gal27A un site actif plus ouvert qui lui permet plus facilement d'accepter les résidus latéraux galactose des galactomannanes.

L'acétylation est également une source de variabilité de la structure des [galacto][gluco]mannanes. L'acétylation native est le plus souvent assez faible (Chateigner-Boutin *et al.*, 2020). Elle peut pourtant suffire à limiter l'activité de certaines  $\beta$ -mannanases, comme celles du champignon *Athelia rolfsii* (Gübitz *et al.*, 1996), tandis que d'autres ne sont pas affectées, comme celle de la bactérie *Cellvibrio japonicus* (Arnling Bååth *et al.*, 2018).

#### ■ 1.4. Synergie entre enzymes

Du fait de la structure complexe des polysaccharides associant différents monomères et différentes liaisons, et de la spécificité étroite des enzymes pour la reconnaissance d'un type de liaison et des résidus qu'elle relie, l'hydrolyse de chaque polysaccharide requiert l'action combinée de plusieurs enzymes. On parle de synergie lorsque l'action combinée de *n* enzymes assure une dégradation plus importante que la somme des *n* actions individuelles. Le degré de synergie est défini comme le rapport de l'activité combinée sur la somme des activités individuelles. On définit également deux types de synergie selon les enzymes considérées. L'homéosynergie est définie comme la coopérativité des deux enzymes spécifiques de la chaîne principale du polysaccharide (par exemple,  $\beta$ -mannanase et  $\beta$ -mannosidase) ou de deux enzymes spécifiques des chaînes latérales (par exemple,  $\alpha$ -galactosidase et mannan acétyl-estérase). À l'inverse, l'hétérosynergie est la synergie entre une enzyme dégradant la chaîne principale et une enzyme dégradant les chaînes latérales (par exemple,  $\beta$ -mannanase et  $\alpha$ -galactosidase). Dans tous les cas, la synergie nécessite que les enzymes soient actives dans des conditions physico-chimiques similaires. La synergie est étudiée en faisant agir les enzymes soit séquentiellement soit simultanément. L'étude séquentielle donne des informations sur la chronologie des événements et la spécificité respective des enzymes (par comparaison de la séquence enzyme A – enzyme B avec la séquence enzyme B – enzyme A).

Dans le cas particulier des [galacto][gluco]mannanes, de nombreuses

études portent sur les synergies entre les différentes enzymes impliquées dans leur dégradation (Malgas *et al.*, 2015). De nombreuses combinaisons ont été testées avec les  $\beta$ -mannanases et  $\beta$ -mannosidase de *Sclerotium rolfisii* (Gübitz *et al.*, 1996). Chaque  $\beta$ -mannanase voit son activité renforcée lorsque la  $\beta$ -mannosidase a agi préalablement. Par contre, les deux  $\beta$ -mannanases utilisées ensemble montrent une anti-synergie, c'est à dire une dégradation plus faible qu'avec chaque enzyme séparément. Ce phénomène est probablement lié à la reconnaissance par ces deux enzymes des mêmes sites de fixation sur le substrat. Le même type d'étude a été mené sur l'hydrolyse du galactomannane de caroube par la  $\beta$ -mannosidase et la  $\beta$ -mannanase du champignon *Lichtheimia ramosa* en suivant la libération du mannose (Xie *et al.*, 2019). L'incubation simultanée avec les deux enzymes apporte un degré de synergie de 2,9, et il est de 2,7 lors de l'incubation séquentielle  $\beta$ -mannanase puis  $\beta$ -mannosidase. Par contre, aucune synergie n'est observée avec la séquence inverse  $\beta$ -mannosidase puis  $\beta$ -mannanase. Cela est lié à la spécificité de la  $\beta$ -mannosidase GH5 qui n'est pas active sur le polymère et ne peut donc utiliser comme substrats que les oligomères préalablement libérés par l'action de la  $\beta$ -mannanase.

Le champignon acidophile *Bispora* produit une  $\beta$ -mannanase GH5 et une  $\alpha$ -galactosidase GH27 qui ensemble offrent un degré de synergie sur le galactomannane de guar de 1,8. L'hydrolyse de ce polysaccharide est légèrement plus efficace si l' $\alpha$ -galactosidase est appliquée avant la  $\beta$ -mannanase. Par contre, elle est deux fois moins poussée si la  $\beta$ -mannanase est appliquée avant l' $\alpha$ -galactosidase (Wang *et al.*, 2010). Ce résultat s'explique par la spécificité de l' $\alpha$ -galactosidase qui a une affinité plus élevée pour le polysaccharide que pour les oligosaccharides. L'hétérosynergie  $\beta$ -mannanase –  $\alpha$ -galactosidase semble être influencée par la famille à laquelle appartient la galactosidase. En effet, les  $\alpha$ -galactosidases GH27 semblent plus efficaces avec les  $\beta$ -mannanases, vraisemblablement parce qu'elles sont actives à la fois sur les poly- et les oligosaccharides (Malgas *et al.*, 2015).

Pour optimiser la synergie, les gènes codant pour les enzymes de dégradation d'un même polysaccharide sont parfois regroupés en clusters sur le génome de l'organisme producteur. Ces zones du génome sont appelées PUL pour Polysaccharide Utilization Locus chez les bactéries du genre *Bacteroidetes* (Grondin *et al.*, 2017). Chez *Bacteroides ovatus*, le locus dédié aux enzymes de dégradation des galactomannanes code pour deux  $\beta$ -mannanases GH26 (*Bo Man26A* et *Bo Man26B*) et une  $\alpha$ -galactosidase GH36 (*Bo Gal36A*) (Bågenholm *et al.*, 2019). *Bo Man26B* est plus tolérante à la présence des chaînes latérales de galactose sur le substrat. L'étude de la synergie avec *Bo Gal36A* suggère que *Bo Man26B* coupe les premières liaisons pour produire des oligosaccharides plus ou moins galactosylés qui sont ensuite hydrolysés par *Bo Gal36A*.

L'organisation des gènes en cluster est également observée chez *Bacillus* dont le génome porte un cluster d'utilisation des mannanes (Song *et al.*, 2018). Deux enzymes sont ainsi exprimées de façon coordonnée, une  $\alpha$ -galactosidase GH27 qui libère du galactose à partir de galactomannanes polymères ou oligomères, et une  $\beta$ -mannanase GH113, qui libère du mannose et du mannobiose à partir de mannanes, mais qui est peu active seule sur les galactomannanes. Ces enzymes assurent donc une synergie inversée par rapport à *Bacteroides ovatus* puisque l'élimination du galactose est ici la première étape.

## 2. Intérêt des enzymes de dégradation des galactoglucomannanes en alimentation animale

Comparé à la multiplicité des enzymes décrites dans la première partie de cet article, le nombre d'enzymes exploitées en alimentation animale est très limité. Les microorganismes producteurs sont principalement des bactéries (*Bacillus*, *Paenibacillus*) mais également quelques champignons, des genres *Thermomyces* ou *Trichoderma*, par exemple. Certains de ces microorganismes sont thermophiles, ce qui

permet d'assurer une bonne stabilité thermique des enzymes qu'ils produisent, propriété très utile si un aliment supplémenté en enzyme doit être granulé. Les températures atteintes lors de ce procédé technologique varient avec la nature des matières premières incluses dans les formules d'aliment et également avec le type de presse, mais elles sont souvent incluses dans une gamme 80-90°C. Selon les producteurs, les préparations enzymatiques utilisées contiennent des enzymes exprimant soit toutes la même activité, soit des activités complémentaires.

À l'heure où nous écrivons cet article, une seule  $\beta$ -mannanase est autorisée en Europe : une endo 1,4- $\beta$ -mannanase, thermotolérante (95 % d'activité résiduelle à 88°C), produite par *Paenibacillus lentus* et disponible pour la volaille (à l'exception de la poule pondeuse), le porcelet sevré et le porc en engraissement (Référence Européenne 4a29/ OJ L 262/24).

### ■ 2.1. Utilisation de la $\beta$ -mannanase chez la volaille

#### a. Utilisation en reformulation

Le premier article a décrit les propriétés inflammatoires de certains  $\beta$ -mannanes issus de la gomme de guar ou encore du soja. La conséquence directe de cette stimulation du système immunitaire par les volailles est une consommation excessive de nutriments en particulier énergétiques. C'est pour cette raison que la plupart des auteurs qui ont démontré l'efficacité des  $\beta$ -mannanases l'ont fait sur des régimes déficitaires en énergie. Le premier atout de l'utilisation de ces enzymes est donc une épargne énergétique. Ainsi, sur un régime céréales et tourteau de soja, Jackson (2013) montre que l'utilisation d'un additif enzymatique contenant une  $\beta$ -mannanase (0,03 % du régime) permet de récupérer 148 grammes de poids vif sur les 280 grammes perdus sur l'ensemble de la période de croissance lors que l'EM de l'aliment est réduite de 120 Kcal (2 415 g BW (contrôle) vs 2 135 BW (contrôle – 120 kcal) vs (2 283 BW (Contrôle-120 kcal+  $\beta$ -mannanases)). Sur le critère Indice de Consommation (IC) et du fait de l'amé-

lioration de la croissance, le groupe « enzymé » récupère 0,139 g/g sur les 0,146 g/g perdus avec la baisse d'EM. Dans une seconde expérience utilisant une enzyme à 0,02 ou 0,04 %, l'auteur montre une récupération supérieure à la perte générée par des réductions d'EM de 42 et 77 kcal sur les critères poids vif et IC. Ces 2 exemples parmi d'autres montrent que l'hydrolyse des  $\beta$ -mannanes par une enzyme spécifique permet à l'animal de récupérer 60 à 80 kcal d'EM/kg d'aliment, confirmant ainsi la préconisation courante de 90 kcal d'EM/kg. Ces expérimentations ne permettent pas de mesurer exactement le coût énergétique total associé aux seuls  $\beta$ -mannanes, mais elles permettent néanmoins d'en donner un minimum (celui « récupéré lors de l'utilisation d'une  $\beta$ -mannanase) qui équivaut selon les critères retenus (gain de poids, indice de consommation) à environ 3 % de l'énergie métabolisable totale contenue dans l'aliment.

Les régimes industriels ne sont certes pas tous du type céréales+tourteau de soja, mais selon Dale *et al.* (2008), les effets positifs sur les performances

lors de l'utilisation d'une  $\beta$ -mannanase s'observent dès lors que la teneur en  $\beta$ -mannanes totaux dépasse 0,2 % dans l'aliment, ce qui laisse penser que ces travaux peuvent très bien s'extrapoler à des régimes très différents. En conditions sanitaires défavorables, Jackson *et al.* (2003) montrent que l'utilisation d'une  $\beta$ -mannanase améliore significativement les performances tout en diminuant les scores lésionnels associés à un challenge *Eimeria Sp* et *Clostridium perfringens*. Cette observation irait dans le sens d'une amélioration de l'intégrité intestinale liée à l'hydrolyse des  $\beta$ -mannanes.

#### b. Effets sur la santé digestive

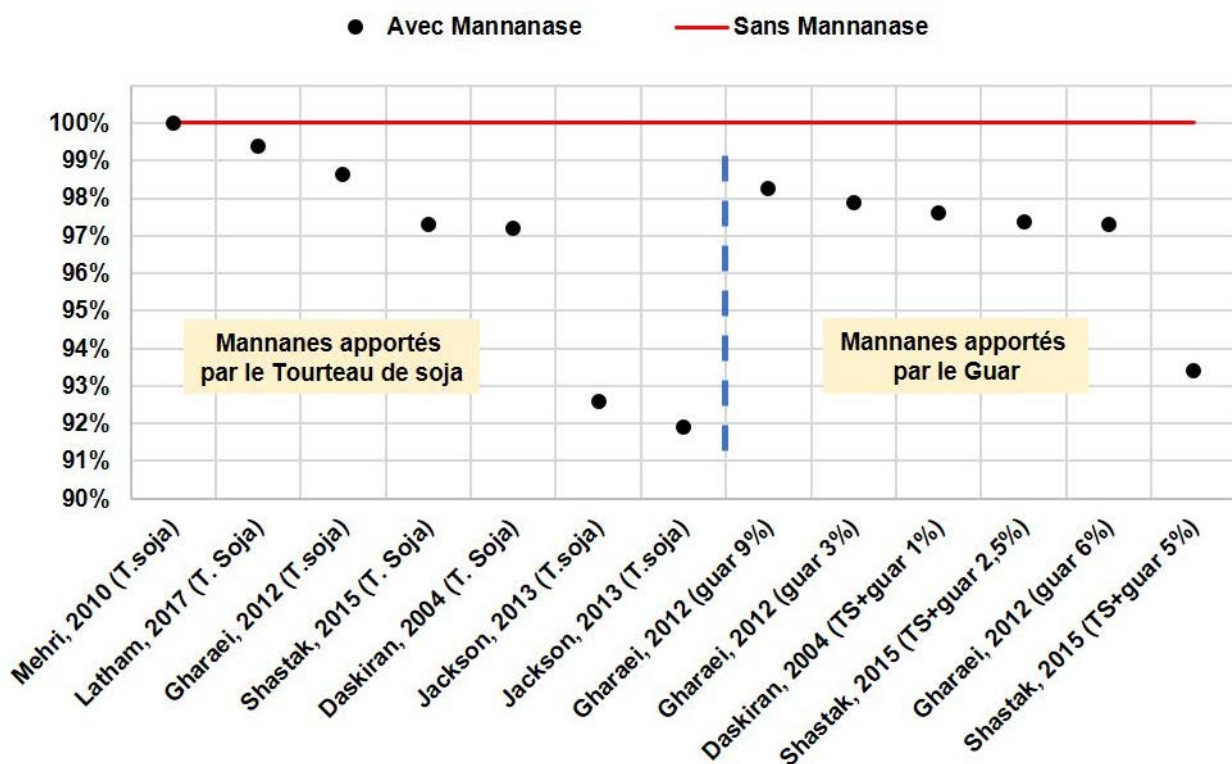
Certains auteurs ont exploré d'autres effets potentiels de la  $\beta$ -mannanase, en particulier les actions sur la santé intestinale des oiseaux. Ce type d'effet est difficile à démontrer sur de petits effectifs car les « paramètres santé » sont à la fois multifactoriels et très variables, rendant la puissance statistique des essais souvent insuffisante. Poulsen *et al.* (2019) ont réalisé une méta-analyse visant à évaluer l'effet d'une supplémentation en  $\beta$ -mannanase sur la santé digestive des poulets. Ont été

compilées 31 études issues de 27 sites d'essai et 14 pays Européens différents. Une réduction significative des scores lésionnels (ulcères du gésier et lésions liées à *E. acervulina*), des scores de pododermatite mais aussi de paramètres anatomo-pathologiques (fluides et mucus intestinaux, débris cellulaires) a été observée. L'Index synthétique d'Intégrité Intestinale I2 [0-100] calculé par l'auteur est significativement amélioré (92,6 % vs 93,6 % pour les groupes contrôle et enzyme respectivement). Ces travaux confirment avec une méthodologie très différente ceux de Jackson *et al.* (2003) (cf. 2.1.a).

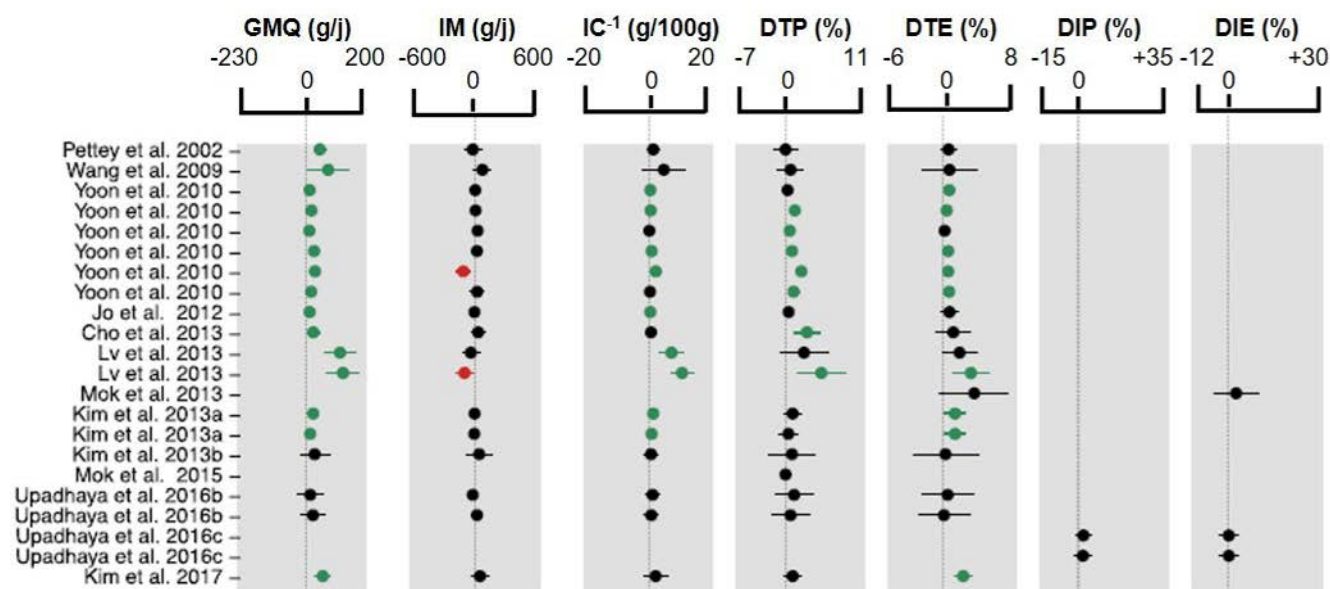
#### c. Utilisation « On Top »

Utiliser une  $\beta$ -mannanase sur des régimes équilibrés, sans carence énergétique, est beaucoup moins courant. Daskiran *et al.* (2004) présentent deux expériences sur des régimes supplémentés en gomme de guar. La première montre un effet positif de l'enzyme issue de *Paenibacillus lentus* (0,05 ou 0,15 % de l'aliment) avec une réduction numérique sur l'indice de consommation (de - 0,04 à - 0,05 g/g). Sur un régime plus Européen de type

**Figure 2.** Synthèse des améliorations d'Indices de Consommation chez le poulet de chair, exprimées en pourcentage de chaque témoin sans enzyme (ligne 100 % en rouge) observées par différents auteurs sur des régimes volontairement enrichis en  $\beta$ -mannanes (Tourteau de Soja (TS) et/ou Guar).



**Figure 3.** Illustration des différences d'effets moyens observées chez le porc en présence de  $\beta$ -mannanase (d'après Torres-Pitarch et al., 2019).



Gain de poids Moyen Quotidien (GMQ), Ingéré alimentaire Moyen quotidien (IM), Gain de poids g/100 g d'aliment consommé (IC-1), Digestibilité apparente Totale des Protéines (DTP) et de l'Énergie (DTE), Digestibilité Iléale des Protéines (DIP) et de l'Énergie (DIE).

Les points verts ou rouges montrent des augmentations ou des diminutions significativement différentes, les points noirs pas de différence significative, les traits horizontaux les intervalles de confiance à 95 %.

céréales + tourteau de soja non reformulé, Latham *et al.* (2018) montrent peu d'effets de l'enzyme sur le poids vif et l'IC des animaux à 42 jours d'âge. Par contre, Balasubramanian *et al.* (2018) montrent un très net effet dose-réponse sur le GMQ et l'indice de consommation des poulets (1-35 jours) en utilisant une  $\beta$ -mannanase (extraite de *Trichoderma citrinoviride*). Ces effets contradictoires peuvent s'expliquer par les valeurs d'EM utilisées qui dépendent des contextes locaux.

Sans pour autant écarter une efficacité « On Top » souvent difficile à mettre en évidence du point de vue statistique sur l'IC, l'utilisation sur un régime sub optimal en énergie semble être plus intéressante, tant du point de vue technique que sur un plan économique, surtout à des périodes où les matières premières riches en énergie sont chères. La figure 2 regroupe les observations de quelques auteurs qui ont mesuré l'effet d'une  $\beta$ -mannanase chez le poulet recevant des régimes enrichis volontairement en  $\beta$ -mannanes (Tourteau de soja seul ou additionné de gomme de guar). Pour toutes ces publications (enzyme utilisée On Top sauf pour Jackson (2013) qui ont reformulé le régime de base), une amélioration de

l'indice de consommation est observée. Du fait de la nature des matières premières utilisées et des conditions expérimentales très contrôlées de ces essais, les efficacités démontrées dans la littérature se doivent d'être validées dans les différents contextes locaux rencontrés sur le terrain.

## ■ 2.2. Utilisation de la $\beta$ -mannanase chez le porc

### a. Efficacité zootechnique

L'utilisation de la  $\beta$ -mannanase en alimentation du porc est récente dans le contexte Européen puisque qu'elle n'a été autorisée qu'en 2018. La figure 3 est extraite de la publication de Torres-Pitarch *et al.* (2019). Cette méta-analyse compile les résultats de 13 publications permettant 19 comparaisons. Les points verts indiquent que l'utilisation de l'enzyme améliore significativement la digestibilité apparente de l'énergie (+ 1 %) et des protéines (+ 1 %), ainsi que le Gain de poids Moyen Quotidien (GMQ) (+ 19,4 g/j) et l'indice de consommation (- 0,7 %). Ces conclusions vont dans le même sens que celles de Pettey *et al.* (2002) obtenues chez le porcelet et le porc en engraissement qui montrent que l'utilisation d'une  $\beta$ -mannanase

(0,05 %) dans un régime à base de maïs et de tourteau de soja permet d'améliorer significativement le GMQ (+ 3,6 %) et l'IC (+ 4,1 %). L'auteur démontre également une valorisation de l'enzyme égale à 100 kcal d'EM. Suite à l'autorisation accordée par l'Union Européenne (2018) pour la seule  $\beta$ -mannanase du marché en porc, on observe sur le terrain une préconisation courante de 63 kcal d'énergie nette, ce qui semble cohérent à la vue des publications citées dans cet article.

Hors de l'Europe, l'utilisation d'une  $\beta$ -mannanase issue de *Bacillus subtilis* « on top » a permis à Kim *et al.* (2017) de démontrer, dans 2 expériences complémentaires [bas (0,61 %) et haut (2,52 %) en  $\beta$ -mannanes], l'effet dose-réponse de l'enzyme sur les performances (GMQ et IC) du porc en croissance nourri avec un régime traditionnel céréales+tourteau de soja (essai 1), ou enrichi avec 5 % de tourteau de palmiste (essai 2). Les  $\beta$ -mannanes du tourteau de palmiste et du tourteau de soja sont structurellement différents mais la complexité même de ces substrats (polysaccharide ramifié) et du modèle d'étude font qu'il est bien difficile d'aller plus loin dans la description de l'efficacité relative des enzymes sur telle ou telle matière première.



### b. Effets sur la santé

La littérature n'a que peu évoqué les effets sur la santé chez le porc à ce jour. Les études, déjà évoquées dans le premier article montrent néanmoins des effets négatifs clairs des  $\beta$ -mannanes sur la physiologie digestive tels que l'absorption intestinale de l'eau et du glucose, la sécrétion d'hormones pancréatiques et le métabolisme hépatique (Chateigner-Boutin *et al.*, 2020). L'autorisation de mise sur le marché d'une  $\beta$ -mannanase en Europe chez le porc étant récente, il est probable que de nouvelles études investiguant ces effets « santé » soient publiées à très court terme.

## Conclusion

Cet article a permis de compiler les connaissances scientifiques autour des

enzymes permettant de dégrader les polymères du mannose des végétaux, en particulier ceux contenus dans les matières premières destinées aux porcs et aux volailles. Même si du point de vue biologique les enzymes susceptibles de dégrader ces molécules sont nombreuses, seules les endo- $\beta$ -1,4-mannanases sont utilisées à ce jour en alimentation animale en Europe de façon plus ancienne chez la volaille, et très récente chez le porc. D'un point de vue fonctionnel, il semble établi que l'enzyme permet de réduire l'état inflammatoire du tractus digestif des animaux et ainsi de réduire les dépenses énergétiques liées à l'immunité donc à l'entretien. D'un point de vue économique, cela se traduit par des effets positifs sur les performances zootechniques (GMQ, Indice de consommation) mais également sur l'intégrité intestinale et de la santé digestive au sens large.

Les  $\beta$ -mannanases étant des catalyseurs biologiques spécifiques de leur substrat, elles ne sont pas capables d'agir sur les familles de NSP autres que les  $\beta$ -mannanes. Elles agissent en particulier sur les galactoglucomannanes qui sont responsables d'un accroissement de la viscosité intestinale. Les caractéristiques physicochimiques du contenu digestif sont ainsi modifiées. L'action des autres enzymes, endogènes ou apportées par l'aliment, peut alors être modifiée. La littérature ne documente pas ce type d'interaction chez le porc ou la volaille mais nous espérons que des travaux futurs nous éclaireront sur ce point.

## Références

- Ademark P., Larsson M., Tjerneld F., Stålbrand H., 2001. Multiple  $\alpha$ -galactosidases from *Aspergillus niger*: purification, characterization and substrate specificities. *Enzyme Microb. Technol.*, 29, 441–448.
- Alkhatay A.H., Kraemer S.A., Leipprandt J. R., Macek M., Kleijer W. J., Friderici K.H., 1998. Human  $\beta$ -Mannosidase cDNA Characterization and First Identification of a Mutation Associated with Human  $\beta$ -Mannosidosis. *Hum. Mol. Genet.*, 7, 75–83.
- Arnling Bååth J., Martínez-Abad A., J. Berglund, Larsbrink J., Vilaplana F., Olsson L., 2018. Mannanase hydrolysis of spruce galactoglucomannan focusing on the influence of acetylation on enzymatic mannan degradation. *Biotechnol. Biofuels*, 11,114.
- Bågenholm V., Wiemann M., Reddy S.K., Bhattacharya A., Rosengren A., Logan D.T., Stålbrand H., 2019. A surface-exposed GH26  $\beta$ -mannanase from *Bacteroides ovatus*: Structure, role, and phylogenetic analysis of Bo Man26B. *J. Biol. Chem.*, 294, 9100–9117.
- Balasubramanian B., Ingale S.L., Park J.H., Rathi P.C., Shanmugam S., Kim I.H., 2018. Inclusion of dietary beta-mannanase improves performance and ileal digestibility and reduces ileal digesta viscosity of broilers fed corn-soybean meal based diet. *Poult. Sci.*, 97, 3097–101.
- Bauer M.W., Bylina E.J., Swanson R.V., Kelly R.M., 1996. Comparison of a  $\beta$ -Glucosidase and a  $\beta$ -Mannosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* purification, characterization, gene cloning, and sequence analysis. *J. Biol. Chem.*, 271, 23749–23755.
- Bauer S., Vasu P., Persson S., Mort A.J., Somerville C.R., 2006. Development and application of a suite of polysaccharide-degrading enzymes for analyzing plant cell walls. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103, 11417–11422.
- Bayer E.M., Bottrill A.R., Walshaw J., Vigouroux M., Naldrett M.J., Thomas C.L., Maule A.J., 2006. Arabidopsis cell wall proteome defined using multidimensional protein identification technology. *Proteomics*, 6, 301–311.
- Béki E., Nagy I., Vanderleyden J., Jäger S., Kiss L., Fülöp L., Hornok L., Kukolya J., 2003. Cloning and Heterologous Expression of a  $\beta$ -D-Mannosidase (EC 3.2.1.25)-Encoding Gene from *Thermobifida fusca* TM51. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 1944–1952.
- Cai H., Shi P., Luo H., Bai Y., Huang H., Yang P., Yao B., 2011. Acidic  $\beta$ -mannanase from *Penicillium pinophilum* C1: Cloning, characterization and assessment of its potential for animal feed application. *J. Biosci. Bioeng.*, 112, 551–557.
- Carrillo-Barral N., Matilla A.J., Rodríguez-Gacio M del C., Iglesias-Fernández R., 2018. Mannans and endo- $\beta$ -mannanase transcripts are located in different seed compartments during Brassicaceae germination. *Planta*, 247, 649–661.
- Chandra M.R.S., Lee Y.S., Park I.H., Zhou Y., Kim K.K., Choi Y.L., 2011. Isolation, purification and characterization of a thermostable  $\beta$ -mannanase from *Paenibacillus* sp. DZ3. *J. Korean Soc. Appl. Bi.*, 54, 325–331.
- Chateigner-Boutin A.L., Saulnier L., Lessire M., Wacrenier N., Alleman F., 2020. Les polymères de mannose en production animale. 1. Focus sur les structures chimiques rencontrées dans les aliments et les propriétés biologiques. *INRAE Prod. Anim*, 33, ce numéro 283-294.
- Chauhan P.S., Puri N., Sharma P., Gupta N., 2012. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. *Appl. Environ. Microbiol.*, 93, 1817–1830.
- Dale N.M., Anderson D.M., Hsiao H., 2008. Identification of an inflammatory compound for chicks in soybean meal. *Poult. Sci.*, 87, Suppl. 1, p153
- Daskiran M., Teeter R.G., Fodge D., Hsiao H.Y., 2004. An evaluation of endo- $\beta$ -D-mannanase (Hemicell) effects on broiler performance and energy use in diets varying in  $\beta$ -mannan content. *Poult. Sci.*, 83, 662-668.
- Domingues M.N., Souza F.H.M., Vieira P.S., de Moraes M.A.B., Zanphorlin L.M., dos Santos C.R., Pirolla R.A. S., Honorato R.V., de Oliveira P.S.L., Gozzo F.C., Murakami M.T., 2018. Structural basis of exo- $\beta$ -mannanase activity in the GH2 family. *J. Biol. Chem.*, 293, 13636–13649.
- Downie B., Hilhorst H.W.M., Derek Bewley J., 1994. A new assay for quantifying endo- $\beta$ -D-mannanase activity using congo red dye. *Phytochemistry*, 36, 829–835.
- Feurtado J.A., Banik M., Bewley J.D., 2001. The cloning and characterization of  $\alpha$ -galactosidase present during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed. *J. Exp. Bot.*, 52, 1239–1249.
- Fox J.D., Robyt J.F., 1991. Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader. *Anal. Biochem.*, 195, 93–96.
- Fülöp L., Ponyi T., 1997. Rapid screening for endo- $\beta$ -1,4-glucanase and endo- $\beta$ -1,4-mannanase activities and specific measurement using soluble dye-labelled substrates. *J. Microbiol. Methods*, 29, 15–21.

- Gomes J., Terler K., Kratzer R., Kainz E., Steiner W., 2007. Production of thermostable  $\beta$ -mannosidase by a strain of *Thermoascus aurantiacus*: Isolation, partial purification and characterization of the enzyme. *Enzyme Microb. Technol.*, 40, 969–975.
- Grondin J.M., Tamura K., Déjean G., Abbott D.W., Brumer H., 2017. Polysaccharide Utilization Loci: Fueling Microbial Communities (G O'Toole, Ed.). *J. Bacteriol.*, 199, e00860-16.
- Gross K.C., 1982. A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-cyanoacetamide. *Hortic. Sci.*, 17, 933-934
- Gübitz G.M., Hayn M., Sommerauer M., Steiner W., 1996. Mannan-degrading enzymes from *Sclerotium rolfsii*: characterisation and synergism of two endo  $\beta$ -mannanases and a  $\beta$ -mannosidase. *Bioresour. Technol.*, 58, 127–135.
- Guimarães V.M., de Rezende S.T., Moreira M.A., de Barros E.G., Felix C.R., 2001. Characterization of  $\alpha$ -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. *Phytochemistry*, 58, 67–73.
- Gürkök S., Söyler B., Biely P., Ögel Z.B., 2010. Cloning and heterologous expression of the extracellular alpha-galactosidase from *Aspergillus fumigatus* in *Aspergillus sojae* under the control of *gpdA* promoter. *J. Mol. Catal., B Enzym.*, 64, 146–149.
- Harpaz N., Flowers H.M., Sharon N., 1974. Purification of coffee bean  $\alpha$ -galactosidase by affinity chromatography. *BBA – Enzymology*, 341, 213–221.
- He X., Liu N., Li W., Zhang Z., Zhang B., Ma Y., 2008. Inducible and constitutive expression of a novel thermostable alkaline  $\beta$ -mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5 in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Enzyme Microb. Technol.*, 43, 13–18.
- Jackson M.E., 2013. The effect of  $\beta$ -mannanase on broiler performance and uniformity. In 24 The Annual Australian Poultry Science Symposium, 5, 92.
- Jackson M.E., Anderson D.M., Hsiao H.Y., Mathis G.F., Fodge D.W., 2003. Beneficial effect of  $\beta$ -mannanase feed enzyme on performance of chicks challenged with *Eimeria* sp. and *Clostridium perfringens*. *Avian Dis.*, 47, 759-763.
- Katrolia P., Zhou P., Zhang P., Yan Q., Li Y., Jiang Z., Xu H., 2012. High level expression of a novel  $\beta$ -mannanase from *Chaetomium* sp. exhibiting efficient mannan hydrolysis. *Carbohydr. Polym.*, 87, 480–490.
- Kim D.Y., Ham S.J., Lee H.J., Kim Y.J., Shin D.H., Rhee Y.H., Son K.H., Park H.Y., 2011. A highly active endo- $\beta$ -1,4-mannanase produced by *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13, a hemicellulolytic bacterium in the gut of *Eisenia fetida*. *Enzyme Microb. Technol.*, 48, 365–370.
- Kim J.S., Ingale S.L., Hosseindoust A.R., Lee S.H., Lee J.H., Chae B.J., 2017. Effects of mannan level and  $\beta$ -mannanase supplementation on growth performance, apparent total tract digestibility and blood metabolites of growing pigs. *Animal*, 11, 2, 202-208.
- Kuntothom T., Luang S., Harvey A.J., Fincher G.B., Opasiri R., Hrmova M., Ketudat Cairns J.R., 2009. Rice family GH1 glycoside hydrolases with  $\beta$ -D-glucosidase and  $\beta$ -D-mannosidase activities. *Arch. Biochem. Biophys.*, 491, 85–95.
- Latham R.E., Williams M.P., Walters H.G., Carter B., Lee J.T., 2018. Efficacy of  $\beta$ -mannanase on broiler growth performance and energy utilization in the presence of increasing dietary galactomannan. *Poult. Sci.*, 97, 549-556.
- Li Y.F., Calley J.N., Ebert P.J., Helmes E.B., 2014. *Paenibacillus lentus* sp. nov., a  $\beta$ -mannanolytic bacterium isolated from mixed soil samples in a selective enrichment using guar gum as the sole carbon source. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64, 1166–1172.
- Li Y., Liu Y., Yan Q., Yang S., Jiang Z., 2015. Characterization of a novel glycoside hydrolase family 5  $\beta$ -mannosidase from *Absidia corymbifera* with high transglycosylation activity. *J. Mol. Catal., B Enzym.*, 122, 265–274.
- Liu Y., Yang S., Yan Q., Liu J., Jiang Z., 2018. High-level expression of a novel protease-resistant  $\alpha$ -galactosidase from *Thielavia terrestris*. *Process Biochem.*, 71, 82–91.
- Lombard V., Golaconda Ramulu H., Drula E., Coutinho P.M., Henrissat B., 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.*, 42, D490–D495.
- Malgas S., van Dyk J.S., Pletschke B.I., 2015. A review of the enzymatic hydrolysis of mannans and synergistic interactions between  $\beta$ -mannanase,  $\beta$ -mannosidase and  $\alpha$ -galactosidase. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 1167–1175.
- Michalak L., La Rosa S.L., Leivers S., Lindstad L.J., Röhr Å.K., Lillelund Aachmann F., Westereng B., 2020. A pair of esterases from a commensal gut bacterium remove acetylations from all positions on complex  $\beta$ -mannans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 117, 7122-30.
- Miyazaki T., Ishizaki Y., Ichikawa M., Nishikawa A., Tonozuka T., 2015. Structural and biochemical characterization of novel bacterial  $\alpha$ -galactosidases belonging to glycoside hydrolase family 31. *Biochem. J.*, 469, 145–158.
- Nelson N., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 15, 375–380.
- Okuyama M., Kitamura M., Hondoh H., Kang M.S., Mori H., Kimura A., Tanaka I., Yao M., 2009. Catalytic mechanism of retaining  $\alpha$ -galactosidase belonging to Glycoside Hydrolase Family 97. *J. Mol. Biol.*, 392, 1232–1241.
- Pham T.A., Berrin J.G., Record E., To K.A., Sigoillot J.C., 2010. Hydrolysis of softwood by *Aspergillus* mannanase: Role of a carbohydrate-binding module. *J. Biotechnol.*, 148, 163–170.
- Petty L.A., Carter S.D., Senne B.W., Shriver J.A., 2002. Effects of  $\beta$ -mannanase addition to corn-soybean meal diets on growth performance, carcass traits, and nutrient digestibility of weanling and growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.*, 80, 1012-1019.
- Post D.A., Luebke V.E., 2005. Purification, cloning, and properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Saccharopolyspora erythraea* and its use as a reporter system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67, 91–96.
- Poulsen K., Baker K.T., Kwiatkowski T., 2019. Evaluation on the effects of  $\beta$ -mannanase on intestinal health in broilers, based on 31 trials. Third International Symposium on Alternatives to Antibiotics - Challenges and Solutions in Animal Health and Production, 16-18 December 2019, Bangkok, Thailand.
- Puchart V., Vršanská M., Bhat M.K., Biely P., 2000. Purification and characterization of  $\alpha$ -galactosidase from a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, 1524, 27–37.
- Rosengren A., Reddy S.K., Sjöberg J.S., Aurelius O., Logan D.T., Kolenová K., Stålbrand H., 2014. An *Aspergillus nidulans*  $\beta$ -mannanase with high transglycosylation capacity revealed through comparative studies within glycosidase family 5. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98, 10091–10104.
- Rouau X., Odier E., 1986. Purification and properties of two enzymes from *Dichomitus squalens* which exhibit both cellobiohydrolase and xylanase activity. *Carbohydr. Res.*, 145, 279–292.
- Song Y., Sun W., Fan Y., Xue Y., Liu D., Ma C., Liu W., Mosher W., Luo X.Z., Li, Ma W. Zhang T., 2018. Galactomannan degrading enzymes from the Mannan Utilization Gene Cluster of alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5 and their synergy on galactomannan degradation. *J. Agric. Food Chem.*, 66, 11055–11063.
- Srivastava P.K., Kapoor M., 2015. Recombinant GH-26 endo-mannanase from *Bacillus* sp. CFR1601: Biochemical characterization and application in preparation of partially hydrolysed guar gum. *LWT*, 64, 809–816.
- Stålbrand H., Saloheimo A., Vehmaanperä J., Henrissat B., Penttilä M., 1995. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a *Trichoderma reesei* beta-mannanase gene containing a cellulose binding domain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61, 1090–1097.
- Stoll D., Stålbrand H., Warren R.A.J., 1999. Mannan-degrading enzymes from *Cellulomonas fimi*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 2598–2605.
- Sturgeon R.J., 1990. Monosaccharides. In: *Methods in plant biochemistry*. Dey P.M., Harborne J.B. (Eds). Academic Press, London, p 1–38
- Tailford L.E., Ducros V.M.A., Flint J.E., Roberts S.M., Morland C., Zechel D.L., Smith N., Bjornvad M.E., Borchert T.V., Wilson K.S., Davies G.J., Gilbert H.J., 2009. Understanding how diverse  $\beta$ -mannanases recognize heterogeneous substrates. *Biochemistry*, 48, 7009–7018.
- Torres-Pitarch A., Manzanilla E.G., Gardiner G.E., O'Doherty J.V., Lawlor P.G., 2019. Systematic review and meta-analysis of the effect of feed enzymes on growth and nutrient digestibility in grow-finisher

pigs: Effect of enzyme type and cereal source. Anim. Feed Sci. Technol., 251, 153–165.

Ueda M., Hirano Y., Fukuhara H., Naka Y., Nakazawa M., Sakamoto T., Ogata Y., Tamada T., 2018. Gene cloning, expression, and X-ray crystallographic analysis of a  $\beta$ -mannanase from *Eisenia fetida*. Enzyme Microb. Technol., 117, 15–22.

Union Européenne, 2018. Règlement d'exécution (UE) 2018/1565 de la commission du 17 octobre 2018, concernant l'autorisation d'une préparation d'endo-1,4-bêta-mannanase produite par *Paenibacillus lentus* (DSM 28088) en tant qu'additif pour l'alimentation des poulets d'engraissement, des poulettes élevées pour la ponte et des espèces mineures de volailles autres que les volailles de ponte, des dindes d'engraissement, des dindes élevées pour la reproduction, des porcelets sevrés, des porcs d'engraissement et des espèces porcines mineures. J. Officiel Union Européenne, L262, 24.

Waffenschmidt S., Jaenicke L., 1987. Assay of reducing sugars in the nanomole range with 2,2'-bichinchoninate. Anal. Biochem., 165, 337–340.

Wang H., Luo H., Li J., Bai Y., Huang H., Shi P., Fan Y., Yao B., 2010. An  $\alpha$ -galactosidase from an acidophilic *Bispora* sp. MEY-1 strain acts synergistically with  $\beta$ -mannanase. Bioresour. Technol., 101, 8376–8382.

Wang C., Luo H., Niu C., Shi P., Huang H., Meng K., Bai Y., Wang K., Hua H., Yao B., 2015a. Biochemical characterization of a thermophilic  $\beta$ -mannanase from *Talaromyces leycettanus* JCM12802 with high specific activity. Appl. Microbiol. Biotechnol., 99, 1217–1228.

Wang H., Ma R., Shi P., Huang H., Yang P., Wang Y., Fan Y., Yao B., 2015b. Insights into the substrate specificity and synergy with mannanase of family 27  $\alpha$ -galactosidases from *Neosartorya fischeri* P1. Appl. Microbiol. Biotechnol., 99, 1261–1272.

Wang G., Michailides T.J., Bostock R.M., 1997. Improved detection of polygalacturonase activity due to *Mucor piriformis* with a modified dinitrosalicylic acid reagent. Phytopathology, 87, 161–163.

Wang Y., Shi P., Luo H., Bai Y., Huang H., Yang P., Xiong H., Yao B., 2012. Cloning, over-expression and characterization of an alkali-tolerant endo- $\beta$ -1,4-mannanase from *Penicillium freii* F63. J. Biosci. Bioeng., 113, 710–714.

Xie J., He Z., Wang Z., Wang B., Pan L., 2019. Efficient expression of a novel thermophilic fungal  $\beta$ -mannosidase from *Lichtheimia ramosa* with broad-range pH stability and its synergistic hydrolysis of locust bean gum. J. Biosci. Bioeng., 128, 416–423.

Ye F., Geng X., Xu L., Chang M., Feng C., Meng J., 2018. Purification and characterization of a novel protease-resistant GH27  $\alpha$ -galactosidase from *Hericium erinaceus*. Int. J. Biol. Macromol., 120, 2165–2174.

## Résumé

Les enzymes capables de dégrader les mannanes appartiennent à plusieurs familles d'hydrolases qui se distinguent par les sites de coupure sur ces polysaccharides. La plus connue est de loin la «  $\beta$ -mannanase », seule autorisée en alimentation animale en Europe et qui est spécifique des liaisons  $\beta$ -(1,4) entre deux mannoses. Si on ne se limite pas aux seules enzymes aujourd'hui homologuées pour l'alimentation animale, les mannosidases, les  $\beta$ -glucosidases, les  $\alpha$ -galactosidases, et les mannane acétyl-estérases peuvent participer, seules ou en association, à l'hydrolyse des polymères de mannose. L'ajout d'une  $\beta$ -mannanase dans les aliments des volailles et des porcs permet de réduire en grande partie les effets antinutritionnels, en particulier inflammatoires, des  $\beta$ -mannanes. L'épargne de nutriments qui en résulte peut alors être directement valorisée en formulation en déconcentrant l'énergie du régime. Au-delà de l'économie réalisée sur le coût de l'aliment, des améliorations de la performance (indice de consommation en particulier) et de la santé digestive sont très souvent observées.

## Abstract

### **Mannose-based polymers in livestock production : the glucomannan-degrading enzymes in swine and poultry feeds**

Enzymes capable of degrading mannans belong to several families, which are distinguished by their cleavage site on the polysaccharide. The best known by far is the " $\beta$ -mannanase", the only one authorized as feed additive in Europe and which is specific to  $\beta$ -(1,4) linkages between mannose moieties. Outside the animal feed context, mannosidases,  $\beta$ -glucosidases,  $\alpha$ -galactosidases, and acetyl-mannan esterases may participate, alone or in combination, in the hydrolysis of mannose polymers. Adding  $\beta$ -mannanase to poultry and swine feeds largely reduces the anti-nutritional effects, especially inflammatory, of  $\beta$ -mannans. The nutrients sparing can then be directly valued in feed formulation by deconcentrating the diet. Beyond the cost saving made, improvements in performance (feed consumption ratio in particular) and digestive health are very often observed.

BONNIN E., LESSIRE M., WACRENIER N., ALLEMAN F., 2020. Les polymères de mannose en production animale. 2. Les enzymes de dégradation des mannanes dans l'alimentation des porcs et des volailles. INRAE Prod. Anim., 33, 295-306.

<https://doi.org/10.20870/productions-animales.2020.33.4.4634>



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY 4.0).

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.fr>

La citation comme l'utilisation de tout ou partie du contenu de cet article doit obligatoirement mentionner les auteurs, l'année de publication, le titre, le nom de la revue, le volume, les pages et le DOI en respectant les informations figurant ci-dessus.

