

CARACTERISATION DES ENZYMES AMYLOLYTIQUES DE *Macrotermes subhyalinus* (TERMITIDAE, MACROTERMITINAE)

L.P. KOUAME¹, A. YEBOUA², Y.R. SORO², K.J. DIPOH KORE²

¹Université d'Abobo-Adjamé, U.F.R. en Sciences et Technologie des Aliments
22 B P 1297 Abidjan 22 (Côte d'Ivoire).

²Université de Cocody Abidjan, U.F.R. en Biosciences - 04 BP 322 Abidjan 04 (Côte d'Ivoire).

RESUME

L'extrait brut de termite *Macrotermes subhyalinus* révèle des activités amylasiques, phosphatasiques acides et phosphorylasiques. Les pH et les températures optimums d'activité de ces enzymes sont respectivement de ; 5,6 à 45 °C ; 4,5 à 55 °C et, 6 à 40 °C. L'activité phosphatasique acide reste stable pendant 9 h de préincubation dans le tampon citrate 21 mM et phosphate 58 mM, pH 5,6 à 37 °C, tandis que celles de l'amylase et de la phosphorylase, dans leurs tampons respectifs et à cette même température, diminuent. L'action de cet extrait brut sur l'amidon soluble à 37 °C, dans les mêmes tampons et pH citrate, a permis d'obtenir du glucose. Aucun des ions métalliques étudiés n'active à la fois les activités amylasiques, phosphatasiques acides et phosphorylasiques.

Mots clés : Terme, *Macrotermes subhyalinus*, Phosphatase acide, amylase et phosphorylase, Côte d'Ivoire.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF AMYLOLYTIC ENZYMES OF *Macrotermes subhyalinus* TERMITE (TERMITIDAE MACROTERMITINAE)

A crude extracts of *Macrotermes subhyalinus* termite revealed the activities of amylase, acid phosphatase and phosphorylase enzymes. Optimum temperatures and pH of these enzymes were 5.6 at 45 °C ; 4.5 at 55 °C and, 6 at 40 °C, respectively. Acid phosphatase activity remained stable in 21 mM citrate and 58 mM phosphate buffers (pH 5,6) upon preincubation at 37 °C for 9 h. This was not the case for amylase and phosphorylase activities. The effect of crude extracts on soluble starch at the same temperature, buffer and pH allowed to obtain a glucose molecule. Among the metal ions tested none was able to activate the three enzymes all together.

Keywords : Termite, *Macrotermes subhyalinus*, acid phosphatase, amylase and phosphorylase, Côte d'Ivoire.

INTRODUCTION

L'isoptère *Macrotermes subhyalinus* est un termite champignoniste. Des études comparatives sur les activités cellulolytiques de trois espèces de termites

supérieurs ont montré que cet insecte possède une activité cellulasique importante (Kamayan, 1989). Kouamé (1994) a montré que chez *Macrotermes subhyalinus*, les ouvriers sont plus actifs que les soldats. Ces ouvriers possèdent un équipement osidasique très varié dont

l'activité spécifique est très intéressante. Kouadio (1994) a purifié et caractérisé une α -glucosidase de *Macrotermes subhyalinus* présentant une forte activité à un pH optimum de 5,6 et une température optimale de 45 °C. Ces résultats montrent que cet isoptère peut constituer une source enzymatique de dégradation des sous-produits agricoles (bois, banane, taro, etc.) en sucres simples. La production de méthane, d'éthanol, etc., par fermentation à partir de ces oses pourrait être d'un intérêt économique important pour la Côte d'Ivoire où cette espèce de termite est abondante.

Cette étude vise à caractériser les enzymes amylolytiques autre que l' α -glucosidase afin de cerner leurs conditions optimales d'activité et leurs modes d'action.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL BIOLOGIQUE

Les ouvriers du termite *Macrotermes subhyalinus* étudiés proviennent de l'Insectarium de l'Université de Cocody Abidjan (Côte d'Ivoire).

Extraction des glycosidases

Dix grammes d'ouvriers du termite *Macrotermes subhyalinus* ont été broyés et centrifugés selon la méthode décrite par Rouland (1986). Le surnageant obtenu a été filtré (filtre millipore SARTORIUS) pour éliminer les débris de pattes. Les protéines du filtrat ont été précipitées à l'acétone à 75 % (V / V). La solution a été maintenue à 4 °C pendant 20 h, puis centrifugée à nouveau dans les mêmes conditions que précédemment. Le culot obtenu a été repris dans 20 ml d'acétone et centrifugé puis séché sous vide. La poudre protéique obtenue a été dissoute

dans un tampon citrate-phosphate à pH 6,5 et a constitué l'extrait brut.

Dosage des activités des enzymes amylolytiques

Pour doser l'activité pNP-phosphatasique acide, la méthode de Kouamé (1994) a été utilisée. Le milieu réactionnel est constitué de : 25 μ l de tampon citrate 21 mM, 58 mM phosphate pH 5,6 ; 50 μ l de préparation enzymatique et 50 μ l de pNPphosphate 20 mM. Le mélange a été incubé pendant 15 min à 37 °C. La réaction enzymatique a été arrêtée par l'addition de 3 ml d'une solution de carbonate de sodium à 2 %. La quantité de paranitrophénol (pNP) libéré a été dosée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 400 nm. L'activité phosphorylasique a été dosée comme précédemment par la méthode de Kouamé (1994). Le milieu réactionnel composé de : 100 μ l de tampon acétate 20 mM à pH 5,6 ; 100 μ l de préparation enzymatique et 300 μ l de glucose-1-phosphate 5 mM contenant de l'amidon à 1 %, a été incubé pendant 15 min à 30 °C. La réaction a été arrêtée par addition de 3 ml d'acide trichloroacétique à 2,5 %. La quantité de phosphate inorganique libéré a été dosée selon la méthode décrite par Taussky et Shoor (1953). L'activité amylasique a été dosée dans le milieu réactionnel comme précédemment : 50 μ l de tampon citrate 21 mM, phosphate 58 mM pH 5,6 ; 100 μ l d'amidon 1% (P/V) et 100 μ l de solution enzymatique. L'incubation a eu lieu à 37 °C pendant 20 min. La quantité de sucre réducteur libéré a été dosée selon la méthode de Bernfeld (1955). Pour déterminer la température et le pH optimums d'activité des enzymes amylolytiques, la température et le pH ont été variés respectivement de 30 à 75 °C et de 4 à 7.

Dosage des protéines et thermostabilité

Les protéines ont été dosées suivant la méthode décrite par Lowry *et al.*, (1951). Le sérum albumine bovine a été utilisé comme protéine de référence.

Pour évaluer le degré de stabilité des enzymes amylolytiques de *Macrotermes subhyalinus*, la méthode de Kouamé (1994) a été utilisée. L'extrait brut a d'abord été préincubé à différentes températures (30 °, 37 °, 45 ° et 55 °C) puis les activités résiduelles des enzymes dans les conditions habituelles ont été ensuite dosées dans chaque zone.

Analyse de l'hydrolysat

L'hydrolysat de l'amidon soluble obtenu avec l'extrait brut de *Macrotermes subhyalinus* a été analysé par chromatographie liquide à haute pression. La colonne utilisée est de type Sephadex (elle dispose d'une pré-colonne de même type). L'eau déionisée a été utilisée comme solvant à un débit de 0,8 ml / min. L'intégrateur-enregistreur (Spectra-physics) a permis de suivre l'évolution des produits d'hydrolyse.

Action des ions métalliques sur les activités amylolytiques

L'étude de l'action des ions métalliques sur les activités catalytiques des enzymes amylolytiques a été réalisée dans les conditions habituelles avec ajout au milieu réactionnel, d'un volume d'effecteur correspondant à celui de la préparation enzymatique.

RESULTATS

DETERMINATION DES PH ET DES TEMPERATURES OPTIMUMS

Le pH optimum d'activité de chacune des solutions (amylasique, phosphatasique acide, et phosphorylasique) est respectivement de 5,6 ; 4,5 et 6 (figure 1).

Les températures optimales d'activités amylasique, phosphatasique acide et phosphorylasique de l'extrait brut de *Macrotermes subhyalinus* sont respectivement de 45 ° ; 55 ° et 40 °C (figure 2).

THERMOSTABILITE

L'activité phosphatasique acide reste stable à 37 °C pendant 9 h de préincubation dans le tampon citrate 21 mM, phosphate 58 mM pH 5,6. A 55 °C et à 45 °C, une activation de l'activité phosphatasique acide pendant respectivement 5 et 3 h de préincubation dans le même tampon (figure 3) a été observée. Au niveau de l'activité amylasique, à 55 °C, après 3 h de préincubation dans le tampon citrate 21 mM, phosphate 58 mM, pH 5,6, l'activité résiduelle est nulle. A 37 °C et à 45 °C, après une stabilisation pendant une heure dans le même tampon, l'activité résiduelle a chuté lentement pour atteindre 59,25 % et 30 % après 9 h de préincubation (figure 4). L'activité phosphorylasique reste stable à 30 °C pendant 9 h de préincubation dans le tampon acétate 20 mM pH 5,6. A 37 °C, après 30 min de stabilité, l'activité phosphorylasique décroît lentement pour atteindre, après 9 h de préincubation dans le tampon acétate 20 mM, pH 5,6, une activité résiduelle de 42 % (figure 5).

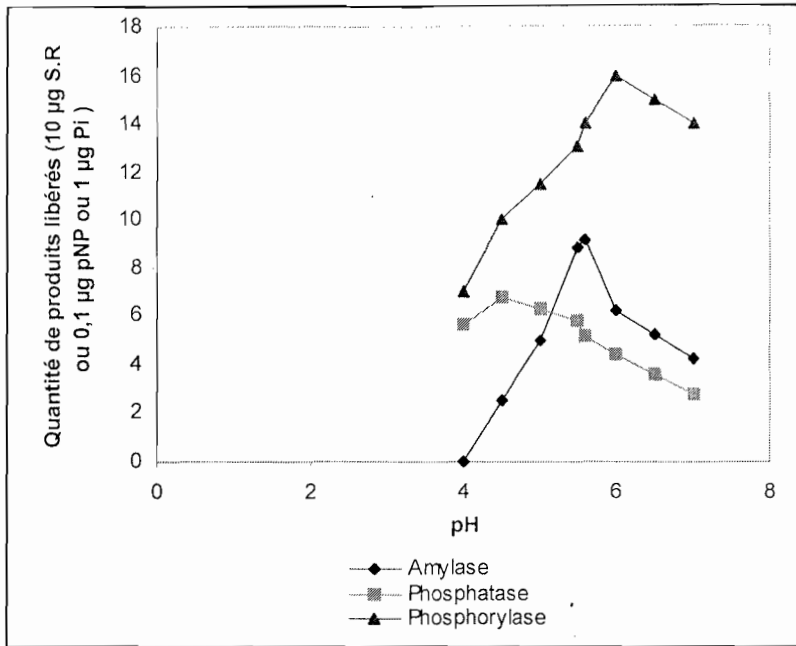


Figure 1: Influence du pH sur l'activité des enzymes amylolytiques de *M. subhyalinus*.

pH effect on amylolytic enzyme activities of M. subhyalinus.

S.R.: Sucre Réducteur
 PNP: para-Nitrophénol
 Pi : Phosphate inorganique

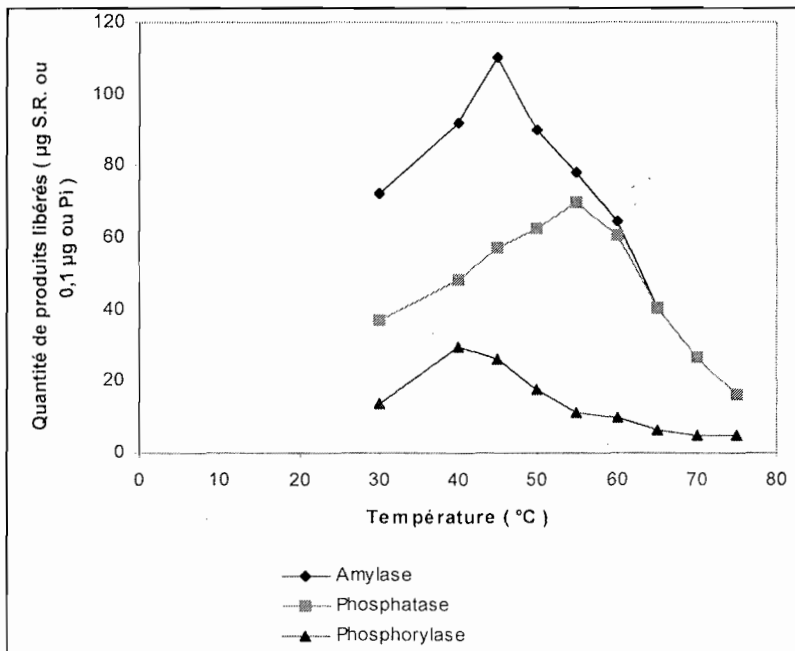


Figure 2: Influence de la température sur les activités des enzymes amylolytiques de *M. subhyalinus*.

Temperature effect on amylolytic enzyme activities of M. subhyalinus.

S.R.: Sucre Réducteur
 PNP: para-Nitrophénol
 Pi : Phosphate inorganique

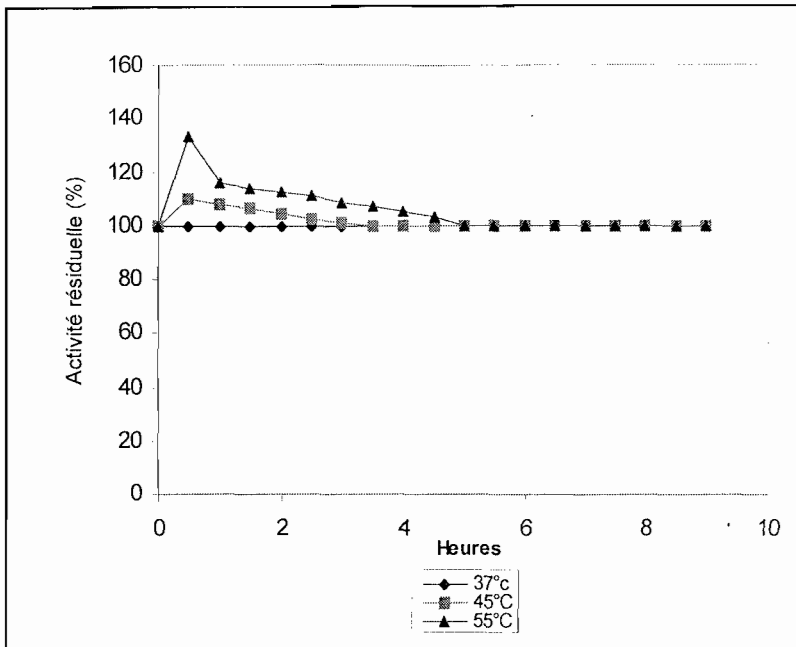


Figure 3: Thermostabilité de la phosphatase acide de *M. subhyalinus*.
The thermostability of acid phosphatase of M. subhyalinus.

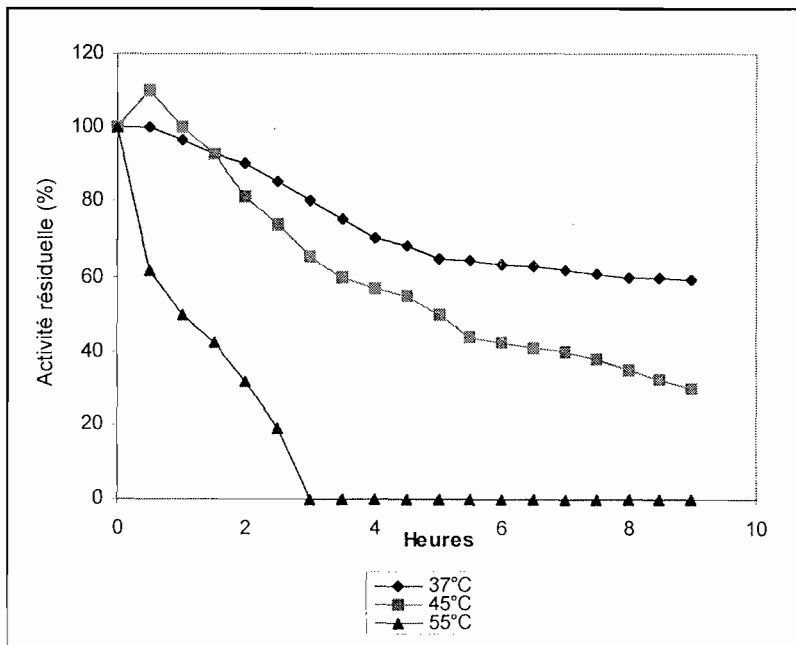


Figure 4 Thermostabilité de l'amylase de *M. subhyalinus*.
The thermostability of amylase of M. subhyalinus.

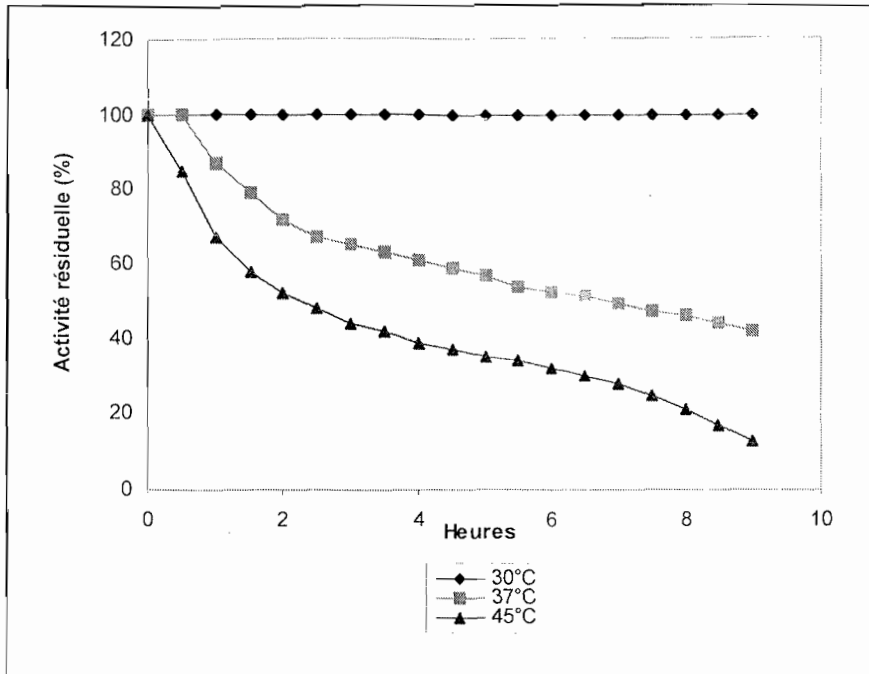


Figure 5: Thermostabilité de la phosphorylase de *M. subhyalinus*.

The thermostability of phosphorylase of M. subhyalinus.

HYDROLYSE DES SUBSTRATS EN FONCTION DU TEMPS ET ACTION DES IONS METALLIQUES

Les allures des courbes d'hydrolyse du glucose-1-phosphate par les phosphorylases et du paranitrophénylphosphate par les phosphatases acides de *Macrotermes subhyalinus* sont identiques, alors qu'elles sont différentes de celle de l'amidon soluble par les amylases de ce même termitte (figure 6).

L'analyse de l'hydrolysat obtenu a révélé la présence de glucose, de maltose et de malto-oligosaccharide. Le taux de glucose dans l'hydrolysat est plus élevé que celui du maltose avant 47 h d'hydrolyse. Les deux taux s'équilibrent à 47 h d'hydrolyse (tableau 1). Concernant l'action des ions métalliques sur les activités catalytiques des enzymes amylolytiques, aucun ion n'active à la fois les trois enzymes étudiées (tableau 2).

DISCUSSION

Ces résultats montrent que l'amylase et l' α -glucosidase possèdent les mêmes pH et températures optimums. Ce qui n'est pas le cas des activités phosphatasiques acides et phosphorylasiques de ce même extrait brut. Les activités amylicasques et phosphorylasiques ne sont pas assez stables au-delà d'une heure de préincubation dans leurs tampons respectifs aux températures inférieures où égales à leur température optimale. Quant à l'activité phosphatasique acide, elle ne présente aucune perturbation à 37, 45 et 55 °C pendant 9 h de préincubation dans le tampon citrate 21 mM, et phosphate 58 mM à pH 5,6.

L'analyse de l'hydrolysat de l'amidon obtenu par l'action de l'extrait brut de *Macrotermes subhyalinus* a révélé la présence de glucose. L'obtention du glucose dans l'hydrolysat peut être due à

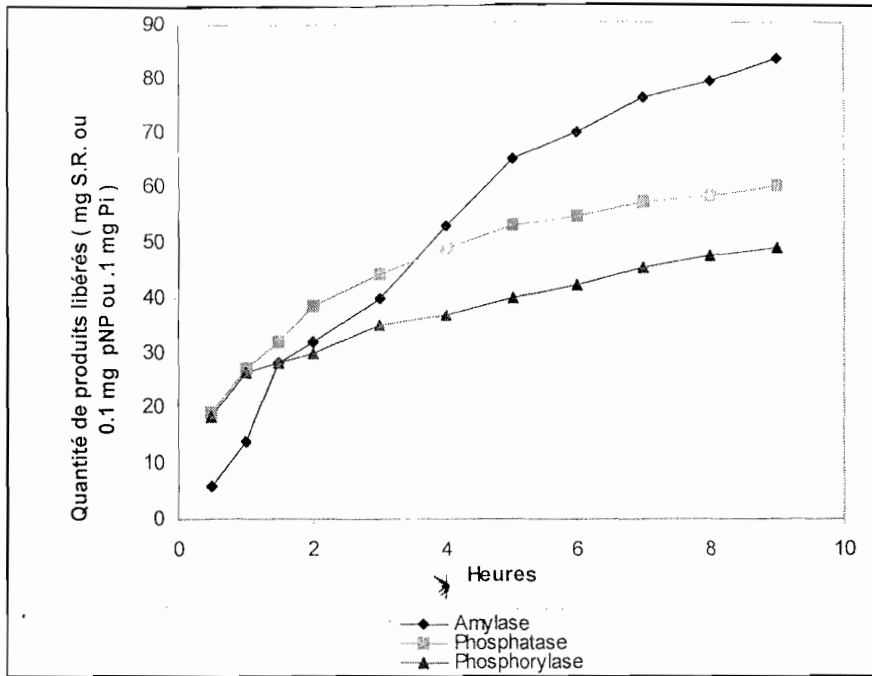


Figure 6 : Hydrolyse en fonction du temps de substrats par des enzymes de *M. subhyalinus*.
Substrates hydrolysis as a function of time by enzymes of M. subhyalinus.

Tableau 1 : Pourcentages des produits d'hydrolyse de l'amidon soluble et du rapport glucose / maltose en fonction du temps, chez *M. subhyalinus*.

The percentage of Macrotermes subhyalinus soluble starch hydrolysis products and glucose/maltose ratio as a function of time.

Temps (h) d'hydrolyse	Produits d'hydrolyse			
	Maltodextrine et amidon non hydrolysé	Maltose	Glucose	Glucose/maltose
2	75,54	4,35	20,1	4,62
5	71,5	5,22	23,18	4,44
9	69,82	6,05	24,12	3,88
24	54,08	16,76	29,11	1,73
47	40,65	29,20	30,15	1,03

Incubation de 5,34 mg d'extrait brut du termite *Macrotermes subhyalinus* à 37 °C avec 540 mg d'amidon soluble (MERCK) dans un volume final de 30 ml de tampon citrate 0,021 M, phosphate 0,058 M pH 5,6.

Tableau 2 : Effet de certains ions métalliques sur les activités des enzymes amylolytiques de *M. subhyalinus*

The effect of certain metallic cations on the activities of amylolytic enzymes of M. subhyalinus.

Ions métalliques (effecteurs 1mM)	Activité enzymatique (%)		
	Amylase	Phosphatase	Phosphorylase
Sans effecteur	100	100	100
Ba ²⁺	117	89	74
Cu ²⁺	53	37	100
Ni ²⁺	127	100	100
Cd ²⁺	68	87	106
Zn ²⁺	115	93	145
Mg ²⁺	94	100	42
Hg ²⁺	10	48	100
Co ²⁺	156	104	87
Na ²⁺	100	100	100

l'existence, dans l'extrait brut de cet isoptère, d'une α -glucosidase qui possède une très bonne activité spécifique (Kouadio, 1994). A 47 h d'hydrolyse, le taux de maltose a augmenté pour donner un rapport glucose / maltose égale à 1, alors qu'il était de 4,62 ; 4,44 ; 3,88 et 1,73, respectivement pour 2,5 ; 9 et 24 h d'hydrolyse. Ceci pourrait s'expliquer par une croissance de l'activité amylasique avec le temps. Nous n'avons pas pu mettre en évidence dans l'hydrolysate de l'amidon soluble, la présence de maltotriose et maltotétraose. Ceci est dû au fait que la colonne que nous avons utilisée pour l'identification des sucres dans l'hydrolysate ne nous a pas permis de le faire. En effet, cette colonne n'est pas capable de séparer les oses contenant plus de deux molécules de glucose. Toutes les molécules sortent à la fois et au même moment. Ce qui nous permet de dire que les taux de malto-oligosaccharides obtenus, ne représentent que l'ensemble des maltodextrines de faibles poids moléculaires et certainement de l'amidon non hydrolysé. Il n'est donc pas possible de connaître avec exactitude le pourcentage de l'amidon non hydrolysé.

L'inhibition d'une activité enzymatique par l'ion Hg²⁺ traduit certainement la présence de groupements thiols accessibles dans le centre actif de cette enzyme. Les activités amylasique et phosphatasique acide de l'extrait brut de *Macrotermes subhyalinus* dans le tampon citrate 21 mM, phosphate 58 mM à pH 5,6 sont inhibées par cet ion. Ce qui n'est pas le cas de l'activité phosphorylasique dans le tampon acétate 20 mM à pH 5,6. Cela voudrait-il dire qu'il n'y a pas de groupements thiols accessibles au centre actif des phosphorylases de *Macrotermes subhyalinus* ? Cette question n'a pas été abordée dans le cadre de cette étude dans la mesure où Fischer et Hilpert (1953) cité par Ya-Pin-Lee (1960) ont montré que l'ion Hg²⁺ n'avait pas d'effet sur l'activité catalytique de la phosphorylase de patate. Ya-Pin-Lee (1960), en changeant de tampon (citrate 0,1 M), constate que cet ion exerce effectivement un effet inhibiteur sur l'activité catalytique de la phosphorylase de ce tubercule. Aucun des ions métalliques étudiés, n'a pu activer à la fois les activités amylasique, phosphatasique et phosphorylasique. Cette étude a révélé que Ni²⁺ exerce une activation sur l'activité amylasique et n'a, par contre, aucun

effet sur les activités phosphatasique acide et phosphorylasique. L'ion Na^+ n'a aucun effet sur les trois activités enzymatiques étudiées. L'ion Zn^{2+} active les activités amyliques et phosphorylasique et inhibe légèrement l'activité de la phosphorylase acide.

CONCLUSION

La caractérisation de l'extrait brut des ouvriers de *Macrotermes subhyalinus* a permis de révéler que les α -glucosidases

et amylases de ce termite sont très actives à des pH et températures optimums. Ceci n'est pas le cas des enzymes comme les phosphatases acides et phosphorylases. Aucun des ions testés (Ni^{2+} , Na^+ , Zn^{2+}) n'a pu activer à la fois toutes les enzymes amylolytiques. L'action de l'extrait brut sur l'amidon soluble a donné un pourcentage élevé de glucose dans l'hydrolysate. Ce qui permet de penser que le termite *Macrotermes subhyalinus* constitue une source enzymatique utilisable dans les processus de transformation biotechnologique.

REFERENCES

- BERNFELD (P.), 1955. Amylase a et b in Methods in enzymology 1.S.P. Colowick and N.O.K., Academic Press, inc., New-York, 149-154.
- KAMAYEN (C.), 1989 Etudes comparatives des activités cellulolytiques de trois espèces de termites supérieurs. D.E.A. Univ. Côte d'Ivoire, 60 P.
- KOUADIO (N.J.P.), 1994 Purification et étude des propriétés physico-chimiques d'une α -glucosidase du termite champignoniste *Macrotermes subhyalinus*. D.E.A Univ. Côte d'Ivoire, 33p.
- KOUAME (L.P), 1994. Purification et étude physico-chimique de deux glycosidases du termite *Macrotermes subhyalinus*. Thèse 3è cycle Univ. Côte d'Ivoire, 110P.
- LOWRY, (O.H.), (N.J.) ROSEBROUGH, (A.L.) FARR, and (R.J.) RANDALL. 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent J. Biol.Chem.,193, 265-275.
- NOIROT (C.), 1955. Recherches sur les polymorphismes des termites supérieurs (*Termitidae*). An. Sci. Nat. Zool. Biol., 17, 399-595.
- ROULAND (C.), 1986. Purification et caractérisation des cellulases et xylanases de *Macrotermes subhyalinus* (*Termitidae*, *Macrotermitinae*) et de son champignon symbiotique. Thèse doct., Es Sc. Univ. Paris Val-De-Marne, 210P.
- TAUSSKY (H.H.) and (E.) SHORR. 1953. A microcolometric method for determination of inorganic phosphorus. J. Biol. Chem., 202, 675-685.
- YA-PIN-LEE, 1960. Potato phosphorylase I. Purification, physicochemical properties and catalytic activity Biochem. Biophys. Acta, 43, 18-24.