

EXTRACTION, PURIFICATION ET CARACTERISATION DE DEUX CELLULASES DU TERMITE, *Macrotermes subhyalinus* (Termideae)

T. B. SEA, S. J. SAKI, A. COULYBALY, A. F. YEBOUA et K. J. DIPOH

Laboratoire de Biotechnologie, U.F.R Biosciences, Université de Cocody ; 22 B.P. 582 Abidjan 22 (Côte d'Ivoire)

RESUME

Deux cellulases C1 et C2 extraites des ouvriers du termite *Macrotermes subhyalinus* ont été purifiées et homogénéisées en combinant les chromatographies de basse et de haute pression [HPLC]. L'électrophorèse sur gel sds polyacrylamide a montré une seule bande pour chaque cellulase purifiée. La cellulase C1 a eu un pH optimum de 4,5, une température optimale de 45 °C et un poids moléculaire de 63 KDa, tandis que la cellulase C2 a eu un pH optimum de 4, une température optimale de 40 °C et un poids moléculaire de 27 KDa. L'effet des effecteurs a montré que l'ion Mn^{2+} est très activateur des deux formes de cellulase. L'activité spécifique de la cellulase C1 a été de 14,71 UI/mg de protéine et celle de la cellulase C2 de 8,83 UI/mg de protéine.

Mots clés : *Macrotermes subhyalinus*, cellulases, purification, protéines, Côte d'Ivoire.

ABSTRACT

ISOLATION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF TWO CELLULASES OF TERMITE
macrotermes subhyalinus (Termideae)

Two cellulases C1 and C2 isolated of the workers of the termite *Macrotermes subhyalinus* have been purified to homogeneity while combining the different chromatographic techniques of low and high pressure [HPLC]. Polyacrylamide gel electrophoresis shows only one strip for every purified cellulase. The cellulase C1 has an optimum pH of 4.5, an optimal temperature of 45 °C and a molecular weight of 63 KDa while the cellulase C2 has an optimal pH of 4, an optimal temperature of 40 °C and a molecular weight of 27 KDa. The effect of the ions showed that the Mn^{2+} ion is a lot of activator of the two shapes of cellulases. The specific activity of the cellulase C1 is of 14.71 UI/mg of protein and the one of the cellulase C2 is of 8.83 UI/mg of Protein.

Key words : *Macrotermes subhyalinus*, cellulases, purification, protein, Côte d'Ivoire.

INTRODUCTION

Dans la recherche de nouvelles sources d'énergie renouvelable, des polysaccharides tels que l'amidon et la cellulose ont été testés pour produire des sucres simples fermentescibles. La fiabilité technique et économique des processus d'utilisation de ces polymères dépend de l'optimisation des différents paramètres d'hydrolyse tel que la production des enzymes, la nature des substrats, le prétraitement et les conditions d'hydrolyse (Martin *et al.*, 1987).

L'hydrolyse de la cellulose nécessite l'action synergique de l'endocellulase, l'exocellulase et la β -glucosidase, à cause de sa cristallinité, son complexe avec la lignine et les autres composés qui lui sont associés (Arunik *et al.*, 1988).

Pour pouvoir hydrolyser les polymères naturels, nous avons entrepris l'extraction, la purification, l'homogénéisation et la détermination des propriétés physico-chimiques de deux cellulases des ouvriers du termite

Macrotermes subhyalinus, un termite supérieur, champignoniste appartenant à la famille des Termitidae.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL BIOLOGIQUE

Les ouvriers du termite *Macrotermes subhyalinus* ont été récoltés dans la région d'Abidjan (Côte d'Ivoire).

METHODES

Extraction des enzymes

Vingt grammes des ouvriers du termite *Macrotermes subhyalinus* ont été broyés dans un bain de glace dans 50 ml d'une solution de NaCl 0,9 % à l'aide d'un microbroyeur Ultraturrax de type tp 10/18. Le broyat obtenu est centrifugé à 20.000 g pendant 30 min dans une centrifugeuse Sigma 3k20 à 4 °C. Les protéines du surnageant ont été précipitées à l'acétone à froid jusqu'à 70 % de saturation. Après centrifugation comme précédemment, le culot séché sous vide constitue l'extrait brut enzymatique.

Dosage des sucres réducteurs, des protéines et activité cellulosique sur la carboxyméthyl cellulose (C.M.C)

Les sucres réducteurs ont été dosés selon la méthode de Miller (1959) en utilisant le D.N.S. Les protéines ont été dosées par la méthode de Lowry et al. (1951).

Pour la détermination de l'activité cellulosique, le milieu réactionnel est composé de 100 µl d'une solution de CMC à 1 % (P/V) préparé dans du tampon acétate 20 mM pH 4,5 et de 100 µl d'extrait brut enzymatique. Après 20 min de réaction à 37 °C, les sucres réducteurs libérés ont été dosés selon la méthode de Miller (1959) en ajoutant 100 µl de D.N.S au mélange réactionnel pour arrêter la réaction. Le milieu a ensuite été porté au Bain-Marie bouillant pendant 5 min, puis refroidi à 0 °C dans un bain de glace. L'intensité de la coloration a été déterminée à 540 nm contre le témoin contenant tous les réactifs, exceptée l'enzyme. La solution

étalon pour le dosage des sucres réducteurs est une solution de glucose à 1mg/ml.

L'Unité Internationale est définie comme étant la quantité d'enzyme libérée par une micromole de sucres réducteurs par minute dans les conditions standards.

Chromatographie et électrophorèse

Concernant la chromatographie sur DEAE-sephadex A50, 5 ml de la solution enzymatique colorée ont été déposés sur le gel (2 x 6 cm) qui a été lavé et équilibré avec le tampon acétate 40 mM pH 4,5. Un gradient continu de NaCl 1M a été appliqué pour éluer les protéines. Les différentes fractions (5ml/fraction) ont été recueillies par un collecteur Gilson avec un débit de 2 ml/min. Les fractions actives ont été toutes décolorées.

La chromatographie sur colonne MonoQ H5-5/5 Pharmacia a été réalisée comme suit : les fractions actives collectées sur DEAE-sephadex A50 sont dialysées à l'aide d'un appareil Sartorius Membran Filter. L'élution des protéines sur cette colonne échangeuse d'anions (0,5 x 5 cm) a été faite avec un gradient linéaire de 0 à 0,5 M de NaCl préparé dans du tampon acétate 40 mM pH 4,5. Le débit a été de 1 ml/min. Pour la chromatographie sur la colonne supérose 12 qui est une colonne d'exclusion moléculaire (1 x 30 cm), l'élution des protéines a été faite dans le tampon acétate 40 mM pH 4,5 avec un débit de 0,5 ml/min. L'électrophorèse sur gel sds polyacrylamide est réalisée selon la méthode de Laemmli (1970) en utilisant un appareil de type Bio-rad protean 2 slab cell.

Préparation des gels et migration

Le gel de résolution 12,5 % (p/v) est coulé sur 0,5 cm d'agarose 1 % (p/v). Il a été par la suite recouvert de n-butanol pour le dégazer. Après sa polymérisation, le gel de résolution a été rincé à l'eau distillée (H₂O). Le gel de concentration 5 % (p/v) est coulé et un peigne y a été inséré. Après sa polymérisation, le peigne a été retiré du gel en y laissant des avéoles dans lesquelles des échantillons vont être déposés. La migration a été réalisée durant 12 h sous une intensité de 9,8 mA dans le gel de

concentration et de 12 mA dans le gel de résolution avec le tampon tris 0,25 M, glycine 194 mM et SDS 0,1 % (p/v) pH 8,7.

Révélation, pH optimum, température optimale, détermination du poids moléculaire et effet des ions

La révélation a été faite au nitrate d'argent selon la méthode décrite par Helmut *et al.* 1987. Le gel est traité avec une solution de nitrate d'argent 0,02 % (p/v) et de formaldéhyde 37 % (v/v) pendant 20 min sous agitation. Il a été ensuite rincé avec de l'eau déionisée pendant 40 min. La coloration du gel a été développée en 10 min dans une solution contenant 6 % (p/v) de carbonate de sodium, 0,4 % de thiosulfate de sodium (p/v) et de 0,018 % (v/v) de formaldéhyde. Le gel est à nouveau rincé avec de l'eau déionisée pendant 4 min. Sa coloration a été stoppée par immersion pendant 10 min dans une solution éthanol / acide acétique / eau déionisée (5/3/1,2). Il est lavé avec une solution d'éthanol / eau déionisée (1/1) pendant 20 min. La détermination du pH optimum a été faite dans un intervalle de pH allant de 2 à 7. La température optimale a été étudiée entre 30 °C et 70 °C. La gel filtration sur la colonne supérose 12 a été utilisée, pour la détermination des poids moléculaires des deux cellulases. Les protéines de référence utilisées ont été la catalase (240 KD), l'albumine bovine (66 KD), l'ovalbumine (45 KD), le cytochrome c (12,4 KD).

L'effet des ions a été apprécié par la détermination de l'activité résiduelle des enzymes après leur incubation en présence de ces ions. Cette activité résiduelle a été déterminée dans les conditions expérimentales déjà décrites plus haut.

RESULTATS ET DISCUSSION

PURIFICATION

L'extrait brut enzymatique des ouvriers du termite *Macrotermes subhyalinus* a eu une

activité spécifique de 0,75 UI/mg de protéine. Le passage de cet extrait sur le gel DEAE-sephadex A50 après un gradient continu de NaCl de 0 à 1 M, a donné une large fraction protéique, décolorée et active sur le CMC. L'activité spécifique de cette fraction est de 1,6 UI/mg de protéine. La chromatographie sur la colonne Mono Q a donné plusieurs pics protéiques dont deux ont une activité cellulosique (Figure 1).

Les fractions correspondantes F1 et F2 sont collectées et les protéines qu'elles contiennent sont appelées C1 et C2. La protéine C1 a une activité spécifique de 5,35 UI/mg de protéine tandis que celle de la protéine C2 est de 2,7 UI/mg de protéine. Les protéines C1 et C2 sont injectées séparément sur la colonne Supérose 12 (Figure 2).

A cette dernière étape de la purification, l'activité spécifique de la cellulase C1 est de 14,71 UI/mg de protéine et celle de la cellulase C2 est de 6,83 UI/mg de protéine.

L'activité spécifique de la cellulase C1 est supérieure à celle de la cellulase de *Clostridium josui* (Fujino *et al.*, 1990) et inférieure à celle de *Bacillus sp* (Ozaki et Ito, 1991). L'activité spécifique de la cellulase C2 est supérieure à celle de la cellulase d'*Aspergillus japonicus* (Kundu *et al.*, 1988) et inférieure à celle des cellulases de *Bacillus Sp* KSM 635 (Yoshimatsu *et al.*, 1990).

A la fin de la purification, nous obtenons deux formes de CMCases des extraits bruts enzymatiques des ouvriers du termite *Macrotermes subhyalinus*. Cette multiplicité de formes des enzymes du complexe cellulosique est variable et dépend de la souche étudiée. Ceci a été mis en évidence chez des organismes comme les escargots (Colas, 1977) et les micro-organismes (Garcia *et al.*, 1989).

L'électrophorèse sur gel polyacrylamide a confirmé les résultats de la purification (Figure 3).

Le bilan de la purification est consigné dans le tableau 1.

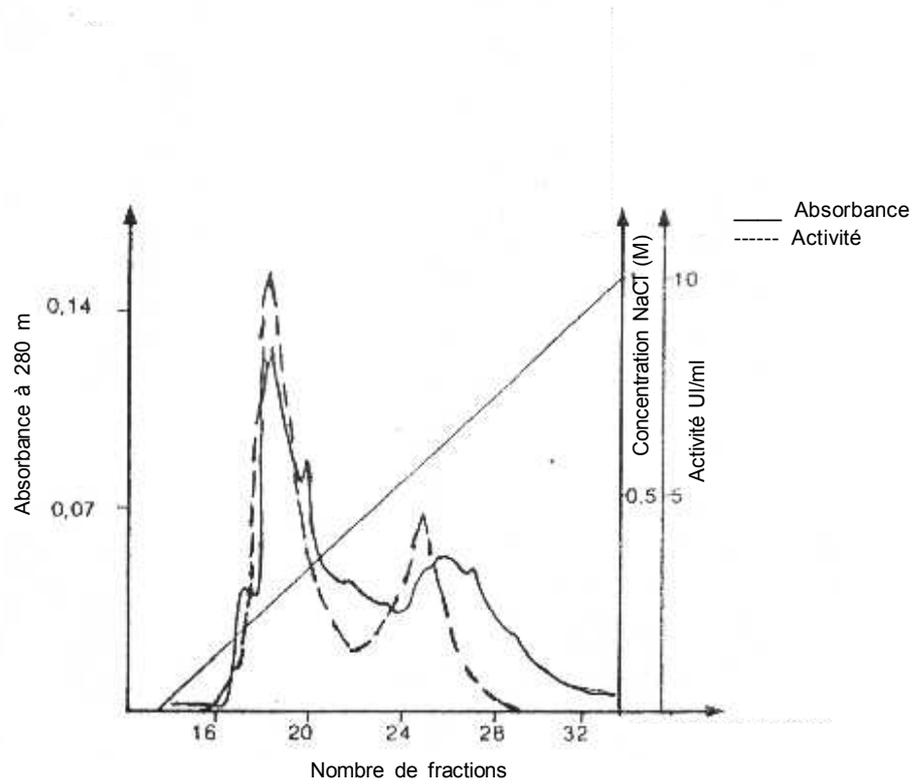


Figure 1 : Chromatographie sur colonne Mono Q de la fraction A-50 de *Macrotermes subhyalinus*.
Chromatography on Mono Q colonn of the A-50 fraction from Macrotermes subhyalinus.

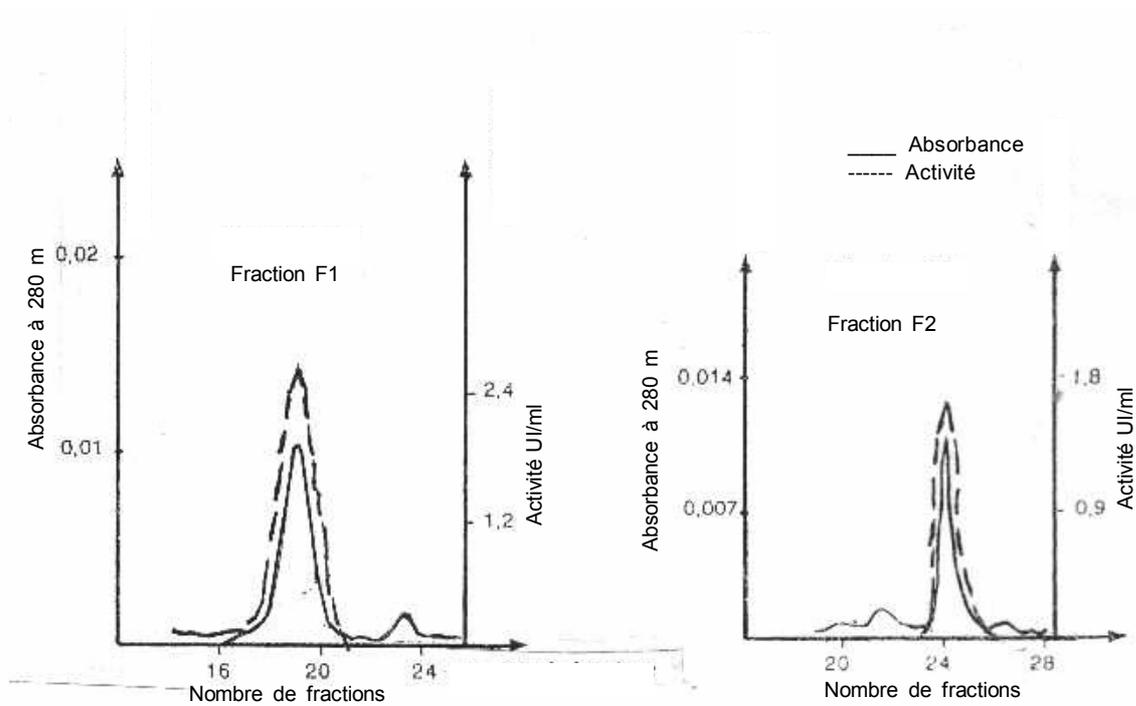
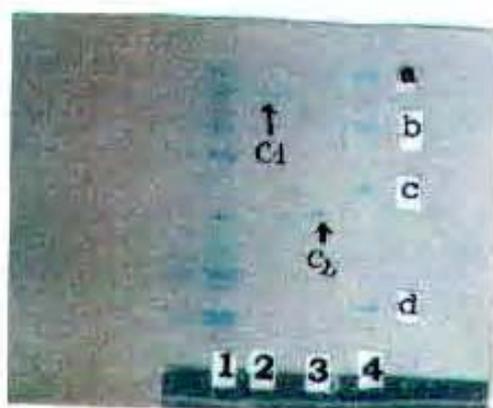


Figure 2 : Chromatographie sur colonne supérose 12 des fractions F1 et F2 de *Macrotermes subhyalinus*.
Chromatography on superose 12 colonn of the F1 and F2 fractions from Macrotermes subhyalinus.



1 : Extrait brut
 2 : Cellulase C1
 3 : Cellulase C2
 4 : Protéines de référence

a : Albumine bovine (66000 Da)
 b : Ovalbumine (45 KD)
 c : Anhydrase carbonique (29 KD)
 d : Cytochrome c (12,4 KD)

Figure 3 : Electrophorèse sur gel polyacrilamide des cellulases C1 et C2.

Electrophoresis on polyacrilamid gel of the C1 and C2 cellulase enzymes.

Tableau 1 : Bilan de la purification.

Purification balance sheet.

Etapes de la purification	Protéine (mg)	Activité Totale (UI)	Activité Spécifique (UI/mg)	Facteur de purification	Rendement
Extrait brut	120	90	0,75	1	100
Gel A-50	45,35	72,56	1,6	2,13	80,62
C1	10,84	57,99	5,35	7,13	64,43
Mono Q					
C2	13,65	36,85	2,7	3,6	40,49
C1	0,73	10,63	14,71	19,61	11,72
Superose 12					
C2	0,41	2,8	6,83	9,1	3,1

PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES CELLULASES PURIFIEES

Activité des cellulases C1 et C2 en fonction du pH

La cellulase C1 a un pH optimum de 4,5 et celui de la cellulase C2 est de 4 (Figure 4).

Le pH de la cellulase C1 est identique à celui de la β glucosidase d'*Aspergillus fumigatus* (Rudick et Elbein, 1975). Toutefois les cellulases

C1 et C2 ont des pH optimums supérieurs à celui de la cellulase purifiée de *Clostridium papyrosolvens* (Okada, 1975).

Activité des cellulases C1 et C2 en fonction de la température

La température optimale de la cellulase C1 est de 45 °C et celle de la cellulase C2 est de 40 °C (Figure 5).

La température optimale de la cellulase C2 est identique à celle de l'endoglucanase de *Bacillus Sp.* (Ozaki et Ito, 1991).

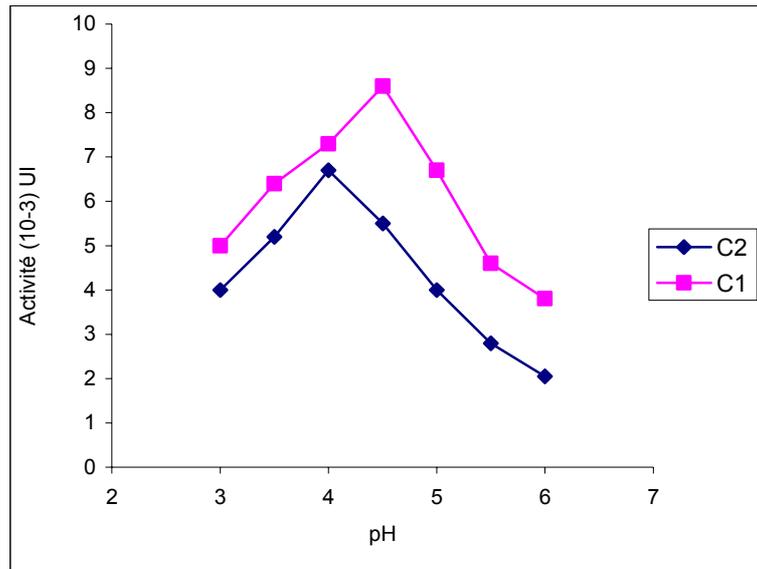


Figure 4 : PH optimum des cellulases C1et C2 de *Macrotermes subhyalinus*.

Optimum pHof the C1 and C2 cellulase enzymes extracted from Macrotermes subhyalinus.

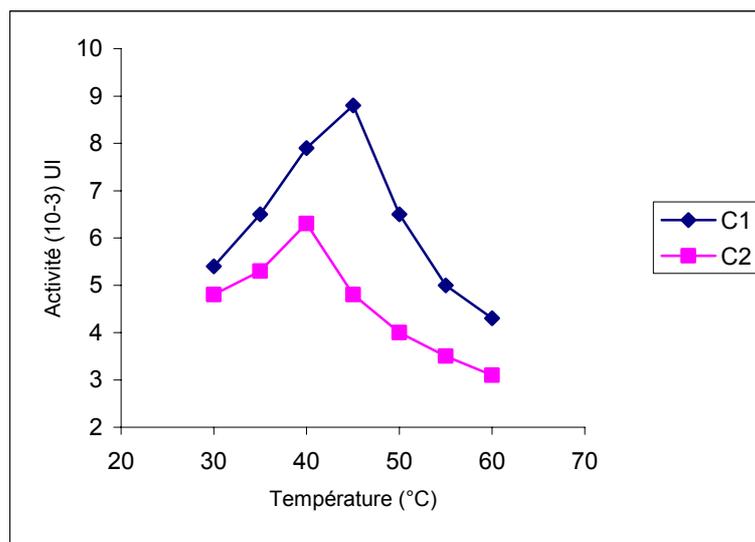


Figure 5 : Températures optimales des cellulases C1 et C2 *Macrotermes subhyalinus*.

Optimum temperatures of C1 and C2 cellulase enzymes extracted from Macrotermes subhyalinus.

Poids moléculaires des cellulases C1 et C2

La détermination des poids moléculaires par gel filtration a permis d'évaluer le poids moléculaire de la cellulase C1 à 63 KD et celui de la cellulase C2 à 27 KD (Figure 6).

Le poids moléculaire de la cellulase C1 est identique à celui de l'endoglucanase III de *Penicillium pinophilum* (Bhat et al., 1989) et supérieur à ceux des endoglucanase II-A et II-B de *Trichoderma viride* (Au et Chan, 1987). Le poids moléculaire de la cellulase C2 est inférieur à ceux estimés des CMCases de *Clostridium papyrosolvans* (Garcia et al., 1989).

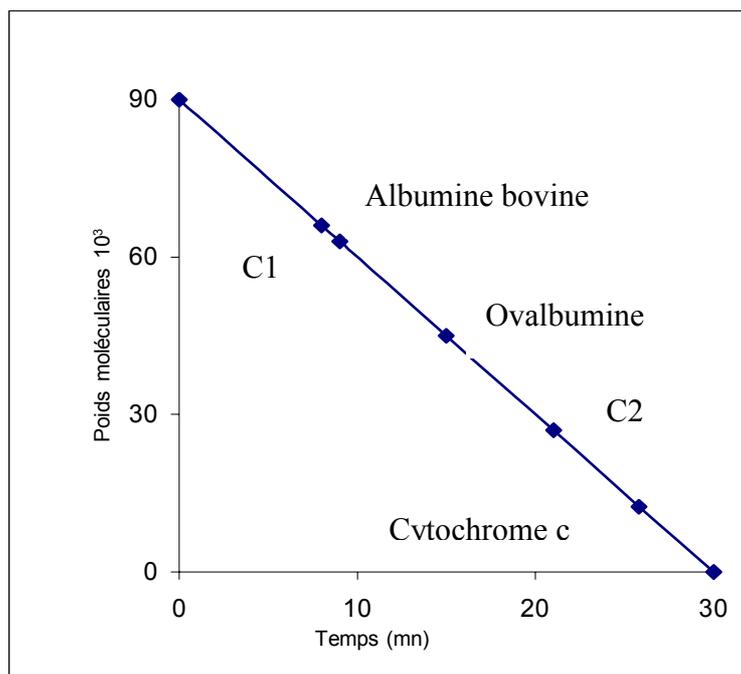


Figure 6 : Poids moléculaires des cellulases C1 et C2 *Macrotermes subhyalinus* en fonction du temps.
Molecular weight of C1 and C2 cellulase enzymes extracted from Macrotermes subhyalinus.

Détermination des constantes de Michaelis et actions des cations sur les cellulases C1 et C2

Les cellulases C1 et C2 ont respectivement des K_m de $3,84 \text{ (mg/ml)}^{-1}$ et de $6,66 \text{ (mg/ml)}^{-1}$ (Figure 7).

Le K_m de la cellulase C1 a été le même que celui de la cellulase de *Aspergillus japonicus* (Kundu *et al.*, 1988).

Les ions utilisés sont sous forme de chlorures. L'ion Mn^{2+} active les deux formes de cellulases, alors que l'ion Hg^{2+} les inhibe fortement. L'ion Sr^{2+} active la cellulase C1 et inhibe la cellulase C2. L'ion Ni^{2+} inhibe la cellulase C1 et active la cellulase C2 (Figures 8 et 9).

L'inhibition de l'activité cellulasique par l'ion Hg^{2+} s'expliquerait par sa fixation sur les groupements thiols essentiels de l'enzyme (Kundu *et al.*, 1988).

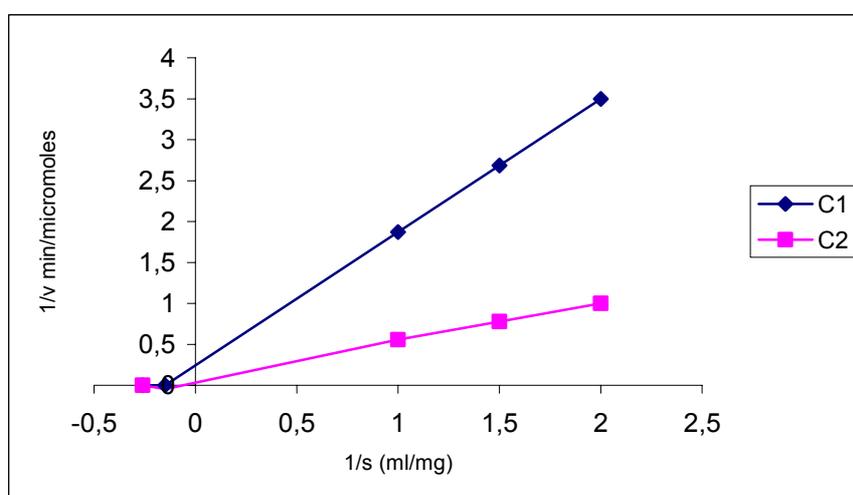


Figure 7 : Constante de Michaelis (K_m) des cellulases C1 et C2 sur le CMC.
Michaelis constant of C1 and C2 cellulase enzymes on the CMC.

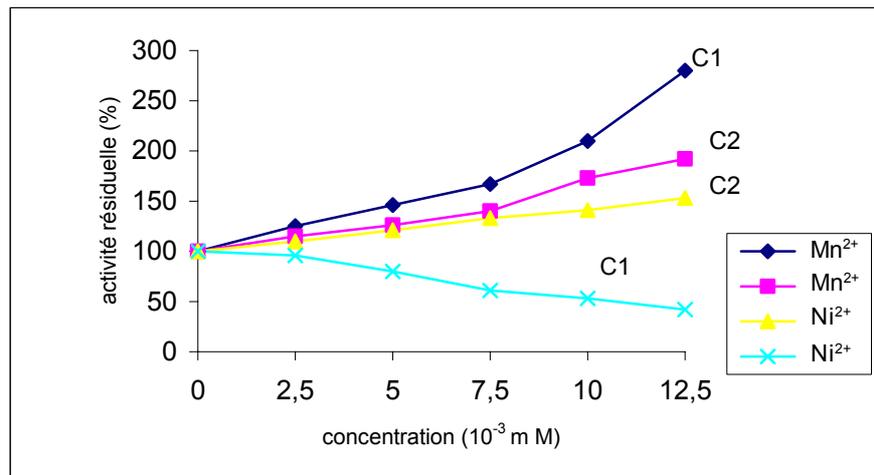


Figure 8 : Effets des ions Mn^{2+} et Ni^{2+} sur l'activité des cellulases C1 et C2.

Effects of Mn^{2+} and Ni^{2+} cations on the activities of C1 and C2 cellulase enzymes.

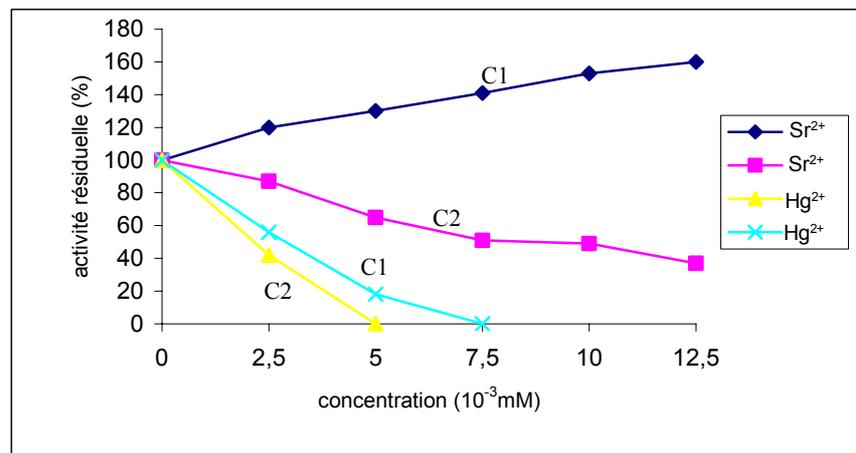


Figure 9 : Effet des ions Hg^{2+} et Sr^{2+} sur l'activité des cellulases C1 et C2.

Effects of Hg^{2+} and Sr^{2+} cations on the activities of C1 and C2 cellulase enzymes.

CONCLUSION

Les différentes chromatographies de basse et de haute pressions ont conduit à la purification totale de deux cellulases dont les activités spécifiques ont été considérablement améliorées. La caractérisation de ces enzymes a montré, qu'elles sont différentes par leurs propriétés physico-chimiques. La cellulase C1 a plus d'affinité vis à vis de la carboxy-méthylcellulose

et un poids moléculaire plus élevé que la cellulase C2.

La purification peut permettre de comprendre mieux le mécanisme d'action de ces enzymes par l'étude des acides aminés de leurs structures et surtout de leurs sites actifs.

En perspective, une étude plus approfondie des osidases de l'extrait brut du termitier *Macrotermes subhyalinus*, doit être envisagée

pour la bioconversion des polysaccharides naturels.

REFERENCES

- Arunik (S.), Ramendra (K.), Kundu, Sandip (N.), Sinha and Dipak (K.), Dube. 1988. Extracellular cellulolytic enzyme system of *Aspergillus japonicus* : Effect of different carbon sources. *Enz, Microb, Technol.* 10 : 85 - 90.
- Au (K. S.) and (Y.) Chan. 1987. Purification and properties of the endo 1, 4- β glucanase from *Bacillus subtilis*. *Journal of general microbiology.* 133 : 2155 - 2159.
- Bhat (M. C.), Crae (S. I.), (T. M.) Wood. 1989. The end 1-4 B-D glucanase system of *Penicillium pinophilum* cellulase : isolation, purification and characterization of five major endoglucanase components. *Carb, Res.* 190 : 279 - 297.
- Colas (B.). 1977. Purification, propriétés cinétiques et moléculaires de deux Glucosidases du suc digestif *Achatina balteata*. Thèse doct ES-SC-Phy Univ. Province, (France), 155p.
- Fujino (T.), Sukhu (M.), Sasaki (T.), Ohmiya (K.) and (S.) Shimizsu. 1990. Purification and properties of an endo 1,4- β D glucanase from *Clostridium josui*. *J. Bacteriol.* 171 : 4076 - 4082.
- Garcia (V.), Alejo (M.), Jose (L.), Pena, Fracisco (P.), Salvador (V.) and (F.) Agusti. 1989. Purification and characterization of cellulases from *Clostridium papyrosolven*. *J. Chem, Tech , Biotechnol.* 46 : 49 - 60.
- Kundu (R. K.), Dube (S.) and (D. K) Dube. 1988. Extracellular cellulolytic enzyme system of *Aspergillus japonicus* : Isolation, Purification and characterization of multiple forms of endoglucanases. *Enz. Micro, Technol.* 10 : 100 - 109.
- Laemmli (K.). 1970. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227, 680 - 685.
- Lowry (O. H.), Rosenbroug (N. J.), Farr (A. L.) and (R. J.) Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol Chem.* 193 : 265 - 275.
- Martin (C.), Negro (M. J.), Alfonsel (M.), and (R.) Saez. 1987. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass from *Onopordum nervosum*. *Biotech. Bioeng.* 32 : 341 - 344.
- Miller (G. L.). 1959. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugars. *Chem.* 31 : 426 - 428.
- Okada (G.). 1975. Enzymatic studies on a cellulase system of *Trichoderma viriea* : Purification and properties of two cellulases. *J. Biochem.* 77 : 33 - 42.
- Ozaki (K.) and Ito (S.). 1991. Purification and properties of and acid endo 14 β glucanase from *Bacillus sp* KSM-330. *J. Micro.* 137 : 41 - 48.
- Rudick (M. J.) and Elbein (A. D.). 1975. Glycoprotein enzymes sareted by *Aspergillus fumigatus* : Purification and properties of a second β -glucosidase. *J. Bacteriol.* 124 : 534 - 541.
- Yoshimatsu (T.), Ozaki (K.), Shikata (S.), Ohta (Y.), Koike (K.), Kawai (S.) and (S.) Ito. 1990. Purification and characterization of alkaline endo 1,4 b-D glucanases from alkalophilic *Bacillus sp* KSM-635-J. *Gen, Microb.* 136 : 1973 - 1984.