

# Synthèses enzymatiques de néoglucoconjugués catalysées par l' $\alpha$ -glucosidase purifiée de la blatte *Periplaneta americana* (Linnaeus)

Lucien Patrice Kouamé <sup>(1)</sup>, Edmond Ahipo Dué <sup>(1)</sup>, Sébastien Lamine Niamké <sup>(2)</sup>,  
Françoise Akissi Kouamé <sup>(1)</sup>, Alphonse Kamenan <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Laboratoire de Biochimie et Technologie des Aliments. Unité de Formation et de Recherche en Sciences et Technologie des Aliments. Université d'Abobo-Adjamé. 02 BP 801 Abidjan 02 (Côte d'Ivoire).

E-mail : kouame\_patrice@yahoo.fr

<sup>(2)</sup> Laboratoire de Biotechnologie. Unité de Formation et de Recherche en Biosciences. Université d'Abidjan-Cocody. 22 BP 582 Abidjan 22 (Côte d'Ivoire).

Reçu le 7 mai 2004, accepté le 23 décembre 2004.

La blatte *Periplaneta americana* (Linnaeus) possède dans son tube digestif une  $\alpha$ -glucosidase mésophile (50 °C) ayant une activité hydrolytique maximale à pH 5,0. Cette enzyme, purifiée à homogénéité électrophorétique sur gel de polyacrylamide 12 % (P/V), hydrolyse activement le maltose, le saccharose et le p-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside. Nous avons testé l'aptitude de cette enzyme à catalyser les réactions de synthèse de néoglucoconjugués lorsque le maltose et le saccharose sont utilisés comme donneurs de glucosyle, le 2-phényléthanol et le phénol comme accepteurs de glucosyle (aglycones). Les conditions expérimentales ont été optimisées au niveau du temps de réaction, du pH et des concentrations de donneurs et d'accepteurs de glucosyle. Les pourcentages de réaction de transglucosylation [donnés par le rapport quantité de néoglucoconjugués synthétisés (mM)/quantité de produit d'hydrolyse (mM)] à 37 °C sont très élevés et ont pu atteindre 67 % et 48 % respectivement avec le 2-phényléthanol et le phénol comme accepteurs de glucosyle. Cette  $\alpha$ -glucosidase hydrolyse les produits de synthèse lorsque les concentrations de ceux-ci deviennent importantes dans le milieu réactionnel. Ce qui signifie que ces produits sont le phényléthyl- $\alpha$ -D-glucoside et le phényl- $\alpha$ -D-glucoside. Ces résultats suggèrent que cette enzyme fonctionne par un mécanisme de rétention de configuration anomérique. À partir de ce constat, l' $\alpha$ -glucosidase de la blatte *Periplaneta americana* apparaît comme une bonne source pour la préparation des  $\alpha$ -néoglucoconjugués.

**Mots-clés.**  $\alpha$ -glucosidase, transglucosylation, blatte, *Periplaneta americana*.

**Enzymatic synthesis of neoglucoconjugates by purified  $\alpha$ -glucosidase from cockroach *Periplaneta americana* (Linnaeus).** Cockroach *Periplaneta americana* (Linnaeus) contains in his digestive tract an acid (pH 5,0) and mesophile (50°C)  $\alpha$ -glucosidase. This enzyme, purified to homogeneity, hydrolyses highly maltose, sucrose and p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside. The ability of  $\alpha$ -glucosidase from cockroach purified to homogeneity to catalyse transglucosylation reactions was tested using maltose and saccharose as glucosyl donors and 2-phenylethanol and phenol as acceptors. The experimental conditions were optimized in relation to the time course of the reaction, pH and concentrations of glucosyl donors and acceptors. The yields in transglucosylation reactions at 37 °C were very high and could attain 67% and 48% with 2-phenylethanol and phenol respectively as glucosyl acceptors. This  $\alpha$ -glucosidase hydrolyzed the products formed. It seems that the products formed were the phenylethyl- $\alpha$ -D-glucoside and phenyl- $\alpha$ -D-glucoside. These results suggest that  $\alpha$ -glucosidase from cockroach is an exoglucosidase which catalyse the splitting of the  $\alpha$ -glucosyl residue from the non reducing terminal of the substrate to liberate  $\alpha$ -glucose. This comportment indicates that this enzyme operated by a mechanism involving the retention of the anomeric configuration. On the basis of this work,  $\alpha$ -glucosidase from *P. americana* appears to be a valuable tool for the preparation of  $\alpha$ -neoglucoconjugates.

**Keywords.**  $\alpha$ -glucosidase, transglucosylation, cockroach, *Periplaneta americana*.

## 1. INTRODUCTION

L'intérêt de l'utilisation des enzymes comme catalyseurs dans les procédés industriels est lié à leur spécificité et à leur efficacité catalytique (Potus, Drapron, 1997). Ces caractéristiques cinétiques sont à l'origine du développement des stratégies originales de modification des macromolécules. Parmi celles-ci, se trouvent la dépolymérisation et la glycosylation.

La glycosylation permet de modifier les propriétés fonctionnelles des macromolécules. L'amélioration de ces propriétés dépend à la fois du degré de glycosylation de ces composés et de la nature des résidus glycosidiques greffés (Caer *et al.*, 1990a ; 1990b). Ainsi, la fixation par alkylation réductrice de glucides neutres sur la légumine du pois *Pisum sativum* L. permet d'améliorer de façon spectaculaire sa solubilité et ses propriétés moussantes alors que la fixation de dérivés glucidiques chargés entraîne avant tout de meilleures propriétés émulsifiantes (Baniel *et al.*, 1992). L'utilisation des méthodes chimiques pour modifier les caractéristiques physico-chimiques et fonctionnelles des protéines reste limitée car ces méthodes présentent des inconvénients majeurs pour des applications médicales et/ou agro-alimentaires du fait de la toxicité des réactifs utilisés, l'hétérogénéité des préparations, des produits secondaires difficiles à éliminer formés lors de la réaction, de la réduction de la valeur nutritionnelle des protéines, des traitements chimiques mettant souvent en jeu des acides aminés essentiels, comme la lysine, qui ne sont plus nutritionnellement disponibles. Elle exige des dispositions rigoureuses de protection et de dé-protection. C'est pourquoi, la méthode enzymatique est de plus en plus valorisée (Toone *et al.*, 1989 ; Cote, Tao, 1990 ; Ishikawa *et al.*, 1993). Parmi les enzymes utilisées, se trouvent les glycosidases qui, en plus de leur action hydrolytique réversible, catalysent des réactions de transglycosylation. Ces enzymes greffent un résidu glycosyle sur un groupement hydroxyle d'un composé autre que l'eau. La transglycosylation constitue donc une approche cinétique de la synthèse enzymatique de la liaison osidique. Les rendements de synthèse sont souvent modérés (10 à 30 %) en milieu aqueux du fait de l'équilibre de la réaction qui est largement en faveur de la réaction d'hydrolyse. Pour améliorer l'activité de transglycosylation, des dispositions expérimentales peuvent être envisagées comme par exemple l'utilisation d'une grande quantité de solvant organique (Finch, Yoon, 1997 ; Becker, Kuhl, 1999) et de donneur de glycosyle (Vulfson *et al.*, 1990) dans le milieu réactionnel pour limiter l'apport d'eau. Hormis les conditions de contrôle cinétique de transglycosylation, les rendements sont largement dépendants de la nature et de l'origine de l'enzyme (Leparoux, Colas, 1994 ; Yoon, Ajsaka, 1996). C'est pour cette raison que la recherche de nouvelles glycosidases possédant une

grande activité de transglycosylation s'avère nécessaire.

Dans ce travail, notre choix s'est porté sur l' $\alpha$ -glucosidase de la blatte *Periplaneta americana* (Linnaeus). Cette enzyme a été purifiée à homogénéité électrophorétique sur gel de polyacrylamide (12 %). Son pH et sa température optimale d'hydrolyse d'une part et sa spécificité d'action d'autre part, ont été déterminés. Sa activité transglucosidasique a été évaluée en l'essayant dans des réactions de synthèse de néoglucoconjugués.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1. Produits chimiques

Le *p*-nitrophényl- $\beta$ -D-glucopyranoside (N 7006), le *p*-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (N 1377), le *p*-nitrophényl- $\alpha$ -D-galactopyranoside (N 0877), le *p*-nitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside (N 1252), le *p*-nitrophényl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (N 2127), le *p*-nitrophényl- $\beta$ -D-mannopyranoside (N 1268), le *p*-nitrophényl- $\alpha$ -D-xylopyranoside (N 1895), le *p*-nitrophényl- $\beta$ -D-xylopyranoside (N 2132), le *p*-nitrophényl- $\alpha$ -L-arabinopyranoside (N 3512), le *p*-nitrophényl- $\beta$ -L-arabinopyranoside (N 0520), le *p*-nitrophényl- $\beta$ -D-fucopyranoside (N 3378), le *p*-nitrophényl- $\alpha$ -L-fucopyranoside (N 3628), le saccharose (S 1888), le maltose (M 5895), le melibiose (M 5500), le lactose (L 1768), le cellobiose (C 7252), l'amidon (S 9765), le pullulane (P 4516), le phényl- $\beta$ -D-glucopyranoside (P 6876), le phényléthyl- $\beta$ -D-galactoside (P 3443), le glucose (G 5500), le xylose (X 2126), le phényléthanol (P 6134), le phénol (P 7766), la sérum albumine bovine (A 4503) et la tyrosine (T 3379) sont des produits de chez Sigma-Aldrich. Les gels chromatographiques DEAE-Sephrose CL-6B (17-0710-01) et Phényl-Sephrose CL-4B (17-1082-01) sont de chez Pharmacia Biotech tandis que Sephacyl S-100 HR est de chez Fluka (84936). Les produits d'électrophorèse et les protéines de référence sont respectivement de chez Merck et Bio-Rad. Les autres produits sont de qualité analytique.

### 2.2. Extraction et purification de l' $\alpha$ -glucosidase

Environ 6 g de blattes entières *P. americana* sont lavées à l'eau distillée, essorées sur papier filtre puis placées dans un bac à glace. Elles sont broyées dans 20 ml de NaCl 0,9 % (P/V) à l'aide d'un microbroyeur Ultraturrax (type TP 10/18). Le broyat obtenu est centrifugé pendant 20 min à 7000 g à 4 °C dans une centrifugeuse ALRESA. Les protéines du surnageant obtenu ont été précipitées avec du sulfate d'ammonium (80 % de saturation) pendant plus de 12 heures. Le culot obtenu après centrifugation dans les mêmes conditions que précédemment a été dissous dans 1 ml de tampon acétate 20 mM à pH 5,0. Cet extrait brut enzymatique

est déposé sur une colonne de Sephacryl-S-100 HR (1,6 × 64 cm) préalablement équilibrée avec ce même tampon. Les protéines sont éluées avec le tampon acétate 20 mM à pH 5,0. Des fractions de 1 ml sont collectées avec un débit de 16,8 ml par heure. Les fractions actives sont réunies et déposées sur une colonne DEAE Sepharose CL 6B (2,4 × 6,5 cm) préalablement équilibrée avec du tampon acétate 20 mM à pH 5,0. La colonne est lavée avec 60 ml du même tampon. Les protéines accrochées sont éluées grâce à l'application d'un gradient croissant de NaCl (0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,6 ; 1 M) préparé dans du tampon acétate 20 mM à pH 5,0. La vitesse d'éluion est de 21 ml par heure et le volume de chaque fraction est de 1 ml. La concentration en sulfate d'ammonium de la solution  $\alpha$ -glucosidasique issue de la chromatographie d'échanges d'anions, après être ramenée à 1,7 M par ajout de sulfate d'ammonium solide, est déposée sur une colonne Phényl-Sepharose CL-4B (1,4 × 4,5 cm) préalablement équilibrée avec du tampon acétate 20 mM à pH 5,0 contenant du sulfate d'ammonium 1,7 M. Après avoir lavé trois fois la colonne avec ce même tampon, les protéines accrochées sont éluées avec un gradient décroissant de sulfate d'ammonium (1,7 ; 1 ; 0,5 ; 0 M). La vitesse d'éluion est de 16,8 ml par heure et le volume de chaque fraction est de 1 ml. Les fractions actives sont réunies et dialysées pendant 12 heures contre l'eau distillée puis contre le tampon acétate 20 mM à pH 5,0.

### 2.3. Activités enzymatiques

Dans les conditions standards, l'activité  $\alpha$ -glucosidasique est mesurée à 37 °C pendant 10 minutes dans un volume final de 250  $\mu$ l de tampon acétate 100 mM à pH 5,0 contenant 1,5 mM de *p*-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside et 15 UI d' $\alpha$ -glucosidase. La réaction est arrêtée par addition de 2 ml de carbonate de sodium 1 M. La quantité de l'anion nitrophénoxyde (pNP) libéré est déterminée au spectrophotomètre (GENESIS 5) à 420 nm. La courbe d'étalonnage de pNP a été réalisée dans les mêmes conditions de pH et de température (Fourage *et al.*, 1999).

Pour la détermination des activités oligosaccharidasiques, le glucose libéré est dosé par la méthode de la glucose-oxydase (Kunst *et al.*, 1984) après chauffage du milieu réactionnel à 100 °C pendant cinq minutes. L'activité peroxydasique est mesurée à 436 nm.

L'influence du pH et de la température sur l'activité hydrolytique de l' $\alpha$ -glucosidase a été déterminée en mesurant l'hydrolyse du *p*-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside dans une série de tampons à différents pH allant de pH 3,6 à 8,0. Les tampons utilisés sont le tampon acétate 20 mM pour les pH allant de 3,6 à 5,4 et le tampon phosphate 20 mM pour les pH allant de 5,7 à 8,0.

Les paramètres cinétiques tels que les constantes de Michaelis et Menten (KM) et les vitesses maximales, sont déterminés à l'aide de la représentation de Lineweaver et Burk en utilisant différentes concentrations de *p*-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (1–20 mM), de maltose et de saccharose (2–50 mM) à 37 °C et à pH 5,0.

L'unité enzymatique (UE) est définie comme étant la quantité d'enzyme catalysant l'hydrolyse d'une micromole de substrat par minute dans les conditions standards décrites ci-dessus. L'activité spécifique est exprimée en unité enzymatique par milligramme de protéine (UE/mg).

### 2.4. Dosage des protéines

La teneur en protéine est déterminée par la méthode de Lowry *et al.* (1951). Le sérum albumine bovine a été utilisée comme protéine standard.

### 2.5. Méthode analytique

Le degré de pureté de l'enzyme a été déterminé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. L'échantillon enzymatique purifié est mélangé avec du tampon Tris-HCl pH 6,8 contenant 4 % (p/v) de SDS, 1 % (v/v) de  $\beta$ -mercaptoéthanol, 20 % (p/v) de glycérol et 0,025 % (p/v) de bleu de bromophénol. Ce mélange est chauffé au bain-marie bouillant (100°C) pendant cinq minutes. L'électrophorèse est réalisée selon la méthode décrite par Laemmli (1970) sur un gel (7 × 8 cm) contenant 12 % (p/v) d'acrylamide. L'appareil utilisé est de type Bio-Rad protean slab cell. Les protéines ont été colorées avec le bleu R-250 de Coomassie.

### 2.6. Les réactions de transglycosylation

Les réactions de synthèse enzymatique de néoglucoconjugués ont été réalisées à 37 °C dans 5 ml d'un mélange réactionnel contenant du tampon acétate 100 mM (3,6  $\leq$  pH  $\leq$  5,6) ou phosphate 100 mM (6  $\leq$  pH  $\leq$  8), 0,22 UE d' $\alpha$ -glucosidase de la blatte *P. americana*, des concentrations diverses (50 à 800 mM) de donneurs de glucosyle (maltose et saccharose) et d'accepteurs (25 à 600 mM) de glucosyle (phényléthanol et phénol). Les évolutions des réactions de synthèse ont été suivies à différents temps entre 1 h et 48 h par prélèvement d'aliquotes (0,4 ml). La réaction est arrêtée par chauffage de cette aliquote au bain-marie bouillant pendant cinq minutes.

### 2.7. Analyse chromatographique des produits de transglycosylation

Les aliquotes prélevées sont filtrées sur une membrane hydrophile 0,2  $\mu$ m (Sartorius). Les produits des réactions

sont analysés et quantifiés par chromatographie liquide à haute performance (Spectra system) équipée d'une pompe quaternaire (Spectra system, A0099-586, Rev. C), de deux détecteurs (UV/VIS, A0099-540 et réfractométrique, A0099-050, Rev. A), d'un système de dégazage automatique (Spectra system, A0099-507) et d'un enregistreur intégrateur (Spectra system, A0099-274E 12/96).

Pour la séparation des sucres, nous avons utilisé le détecteur réfractométrique et une colonne Supercosyl LC-NH2 5  $\mu$ m (0,46  $\times$  25 cm) de Supelco. La phase mobile est un mélange acétonitrile-eau (75/25; V/V) et le débit maintenu à 0,75 ml/min. Le xylose a été utilisé comme étalon interne. Quant aux néoglucoconjugués synthétisés, c'est-à-dire le phényléthylglucoside et le phénylglucoside, leur évolution a été suivie par absorption en ultraviolet (UV) à 257 nm. La phase mobile est le mélange méthanol-eau (35/65 ; V/V) et un débit de 0,45 ml/min est appliqué. La colonne utilisée est du type Hypersil 5  $\mu$ m (0,46  $\times$  25 cm) de Shandon. La tyrosine a été utilisée comme étalon interne. Des échantillons de 20  $\mu$ l sont injectés.

### 3. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

#### 3.1. Résultats

La chromatographie d'exclusion moléculaire a permis d'obtenir une seule activité  $\alpha$ -glucosidasique. Cette chromatographie est intéressante parce qu'elle a permis non seulement d'améliorer de façon considérable le facteur de purification (13,85) mais aussi d'éliminer la plupart des pigments présents dans l'extrait brut des fractions enzymatiques d'intérêt.

L' $\alpha$ -glucosidase retenue par le gel DEAE Sepharose CL-6B est décrochée avec du NaCl 0,3 M. L'activité spécifique  $\alpha$ -glucosidasique est de 11,56 UI/mg de protéine tandis que le facteur de purification est de 20 après cette étape de purification (**Tableau 1**).

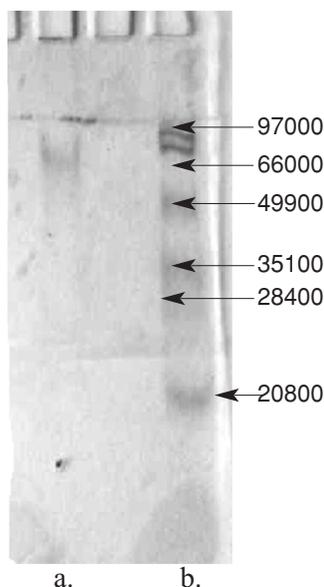
L' $\alpha$ -glucosidase fixée sur le gel Phényl Sépharose CL-4B est éluée par une concentration de sulfate d'ammonium de 0,3 M. Cette dernière étape chromatographique a permis d'obtenir un facteur de purification de 79 avec une activité spécifique de 45,14 UI/mg de protéine (**Tableau 1**). L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12 %) en présence de SDS, a permis d'obtenir une seule bande protéique traduisant une bonne pureté de la solution enzymatique obtenue (**Figure 1**).

**Température et pH optimum d'hydrolyse.** Le pH et la température optima d'hydrolyse de l' $\alpha$ -glucosidase sont respectivement de 5,0 et 50 °C (**Figures 2 et 3**).

**Spécificité de substrat.** L' $\alpha$ -glucosidase purifiée de *P. americana* hydrolyse le pNP- $\alpha$ -D-glucopyranoside, le maltose et le saccharose mais n'a aucune activité catalytique sur l'amidon, le phényl- $\beta$ -D-glucoside, le

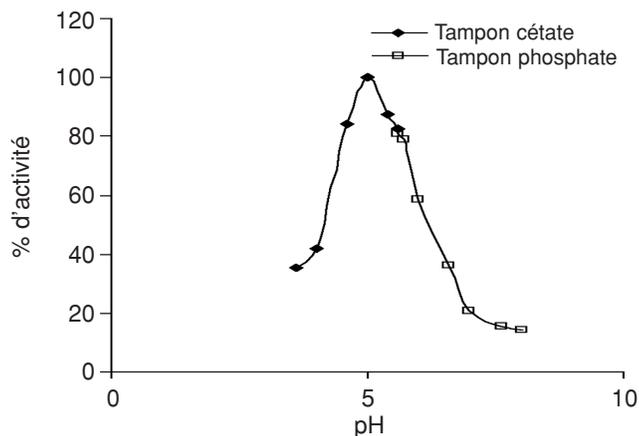
**Tableau 1.** Purification de l' $\alpha$ -glucosidase de la blatte *Periplaneta americana* — Purification of cockroach *Periplaneta americana*  $\alpha$ -glucosidase.

Étape	Activité totale (UI)	Protéine (mg)	Activité spécifique (UI/mg)	Facteur de purification	Rendement (%)
Extrait brut	35,71	62,50	0,57	1	100
Extrait précipité au sulfate d'ammonium (80 % de saturation)	24,19	2,70	0,71	1,24	67,68
Sephacryl S-100 HR	19,60	2,42	7,90	13,85	54,84
D.E.A.E Sepharose CL 6B	11,8	1,02	11,56	20,28	33,84
Phényl Sepharose CL 4B	8,12	0,18	45,14	79,19	22,73

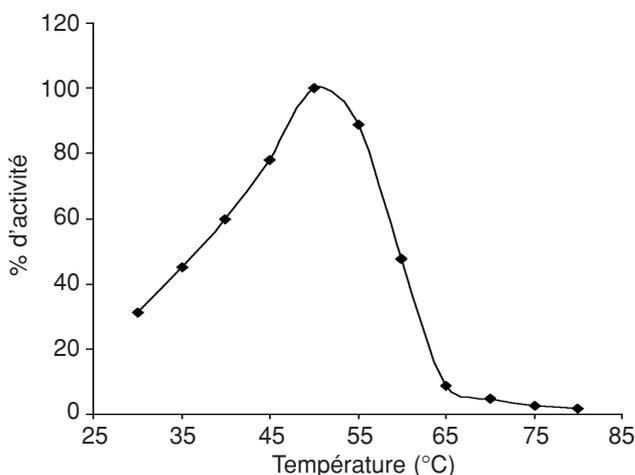


**Figure 1.** Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12 %) en présence de SDS a.  $\alpha$ -glucosidase purifiée de la blatte *P. americana* b. Markers — Electrophoresis in SDS-12% polyacrylamide gel a.  $\alpha$ -glucosidase purified from cockroach *P. americana* b. Markers.

melibiose, le lactose, le cellobiose, le pullulane et les *p*-nitrophényl glycopyranosides suivants :  $\beta$ - et  $\alpha$ -galactosides,  $\beta$ - et  $\alpha$ -mannosides,  $\beta$ - et  $\alpha$ -arabinosides,  $\beta$ - et  $\alpha$ -xyloside,  $\beta$ - et  $\alpha$ -fucoside et  $\beta$ -glucoside. Ces résultats montrent une spécificité de substrat pour l' $\alpha$ -D-glucose (**Tableau 2**). Selon la représentation de Lineweaver et Burk, la valeur de  $K_M$  de l' $\alpha$ -glucosidase obtenue avec le pNP- $\alpha$ -D-glucopyranoside est de 0,23 mM tandis que la vitesse maximale ( $V_{max}$ ) est de 65,12 UI/mg de protéines. Pour le maltose et le saccharose, les valeurs des  $K_M$  sont respectivement de 1,31 mM et de 0,92 mM, avec des vitesses maximales respectives de 14,17 UI/mg et 25,22 UI/mg de protéines. L'efficacité catalytique donnée par le rapport  $V_{max}/K_M$  est plus élevée pour le pNP- $\alpha$ -D-glucopyranoside que pour le saccharose et le maltose (**Tableau 2**).



**Figure 2.** Effet du pH sur l'activité hydrolytique de l' $\alpha$ -glucosidase de la blatte *P. americana* — *Effect of pH on cockroach P. americana  $\alpha$ -glucosidase hydrolytic activity.*



**Figure 3.** Effet de la température sur l'activité hydrolytique de l' $\alpha$ -glucosidase de la blatte *P. americana* — *Effect of temperature on cockroach P. americana  $\alpha$ -glucosidase hydrolytic activity.*

**Tableau 2.** Propriétés cinétiques de l' $\alpha$ -glucosidase de la blatte *P. americana* — *Kinetic properties of cockroach P. americana  $\alpha$ -glucosidase.*

Substrat	$K_M$ (mM)	$V_{max}$ (UI/mg)	$V_{max}/K_M$ (UI/mg/mM)
<i>p</i> NP- $\alpha$ -D-glucopyranoside	0,23	65,12	283,13
Saccharose	0,92	25,22	27,41
Maltose	1,31	14,17	10,82

**Influence du temps d'incubation sur la réaction de transglucosylation.** Les taux maxima de transglucosylation (donnés par le rapport quantité de néoglucoconjugués synthétisés (mM)/quantité de produit d'hydrolyse (mM)) sont atteints en 16 heures de réaction quels que soient le donneur et l'accepteur de glucosyle. Avec le phényléthanol, nous avons obtenu le taux de transglucosylation le plus élevé (67 %). Le

phénol nous a permis d'obtenir un pourcentage de transglucosylation de 48 % (Figure 4).

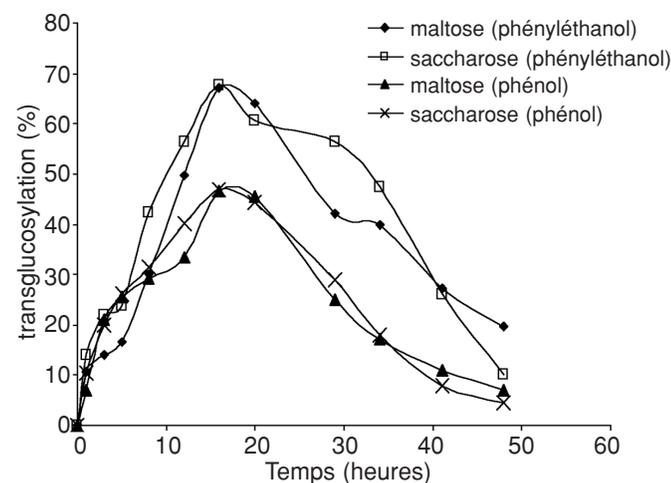
**Influence du pH sur la réaction de transglucosylation.** Le pH optimal de transglucosylation est identique pour tous les donneurs et les accepteurs de glucosyle utilisés. La valeur est de 6,0 (Figure 5).

**Influence de la concentration de l'accepteur sur la réaction de transglucosylation.** Les activités de transglucosylation sont intenses avec les concentrations d'accepteurs variant entre 25 et 100 mM lorsque la concentration des donneurs de glucosyle est de 400 mM (Figure 6).

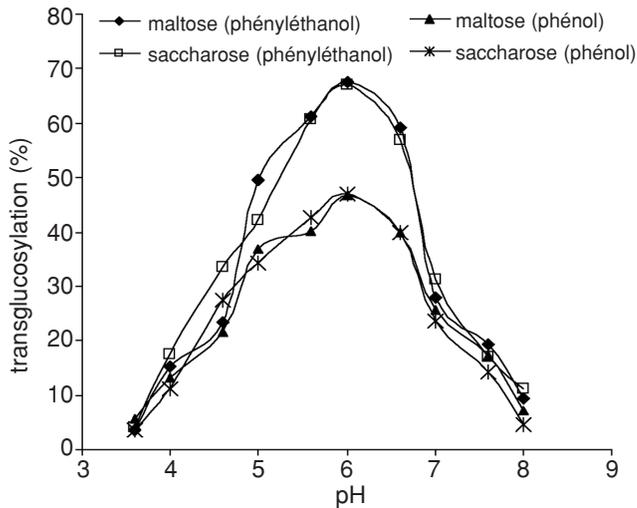
**Influence de la concentration du donneur sur la réaction de transglucosylation.** Les meilleurs pourcentages de transglucosylation sont obtenus avec des concentrations de donneur de glucosyle se situant entre 100 et 400 mM. Au-delà de 400 mM, ils diminuent considérablement (Figure 7). Cette situation peut être due à une hydrolyse des produits de synthèse.

### 3.2. Discussion

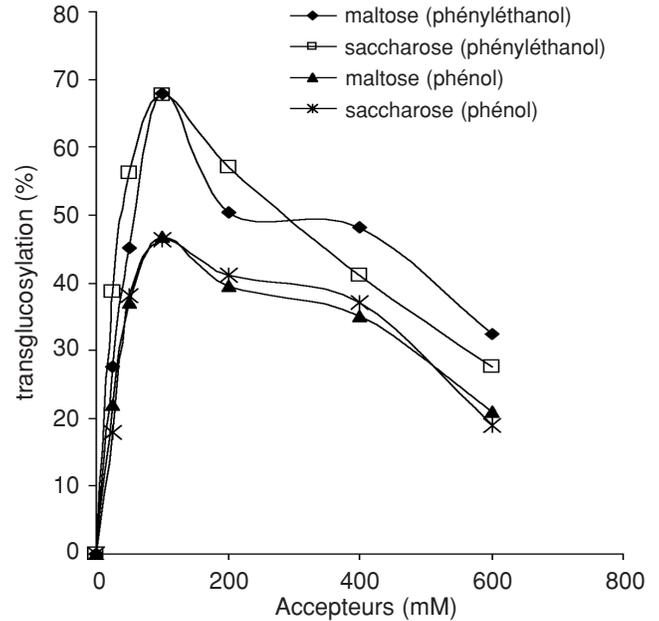
La blatte *Periplaneta americana* possède dans son tube digestif une  $\alpha$ -glucosidase. Cette enzyme a été purifiée en trois étapes chromatographiques utilisant



**Figure 4.** Influence du temps d'incubation sur la réaction de transglucosylation catalysée par l' $\alpha$ -glucosidase purifiée de la blatte *P. americana*. Donneurs de glucosyle : saccharose et maltose (400 mM) ; accepteurs de glucosyle : phényléthanol et phénol (100 mM) ; tampon phosphate 100 mM pH 6,0 ; enzyme 0,22 UE — *Influence of time course on transglucosylation reaction catalysed by  $\alpha$ -glucosidase purified from cockroach P. americana. Glucosyl donors: sucrose and maltose (400 mM); glucosyl acceptors: phenylethanol and phenol (100 mM); 100 mM phosphate pH 6.0 buffer; enzyme 0.22 UE.*



**Figure 5.** Influence du pH sur la réaction de transglucosylation catalysée par l' $\alpha$ -glucosidase purifiée de la blatte *P. americana*. Donneurs de glucosyle : saccharose et maltose (400 mM) ; accepteurs de glucosyle : phényléthanol et phénol (100 mM) ; tampon acétate 100 mM pH (3,6 à 5,6) et tampon phosphate 100 mM pH (6,0 à 8,0) ; enzyme 0,22 UE ; temps d'incubation : 16 heures — *Influence of pH on transglucosylation reaction catalysed by  $\alpha$ -glucosidase purified from cockroach P. americana. Glucosyl donors: sucrose and maltose (400 mM); glucosyl acceptors: phenylethanol and phenol (100 mM). Buffers; 100 mM acetate from pH 3.6 to 5.6, 100 mM phosphate from pH 6.0 to 8.0; enzyme 0.22 UE ; reaction time: 16 h.*



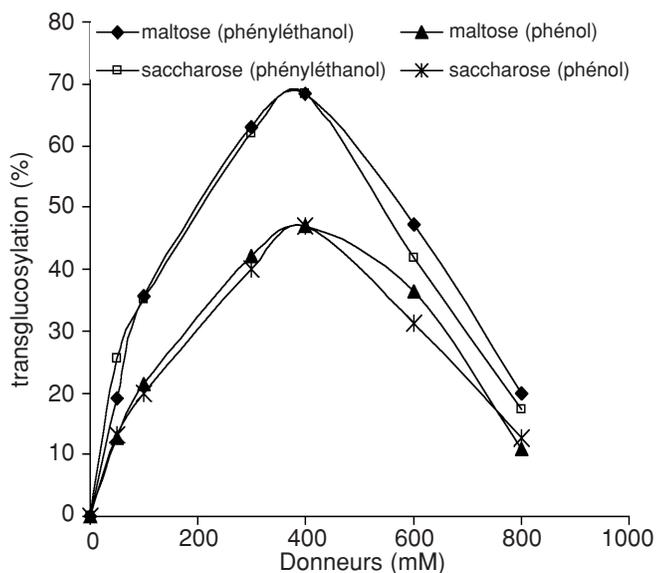
**Figure 6.** Influence de la concentration de l'accepteur de glucosyle (phényléthanol et phénol) sur la réaction de transglucosylation catalysée par l' $\alpha$ -glucosidase purifiée de la blatte *P. americana*. Donneurs de glucosyle : saccharose et maltose (400 mM) ; tampon phosphate 100 mM pH 6,0 ; enzyme 0,22 UE ; temps d'incubation : 16 heures — *Influence of the glucosyl acceptor concentration on transglucosylation reaction catalysed by  $\alpha$ -glucosidase purified from cockroach P. americana. Glucosyl donors: sucrose and maltose (400 mM); 100 mM phosphate buffer pH 6.0; enzyme 0.22 UE ; reaction time: 16 h.*

les chromatographies d'exclusion, d'échanges d'anions et d'interaction hydrophobe. La pureté satisfaisante obtenue a permis de caractériser cette enzyme. Elle a une activité maximale d'hydrolyse à pH 5,0. Cette valeur est proche de celles des  $\alpha$ -glucosidases du parasite *Trichomonas vaginalis* ( $5,5 < \text{pH} < 4,5$ ) (Ter *et al.*, 2000), de l'abeille *Apis mellifera* (L.) (pH 5,5) (Nishimoto *et al.*, 2001) et des granulocytes humains (pH 6) (Delque *et al.*, 1989). La température optimale d'hydrolyse (50 °C) de ce biocatalyseur est inférieure à celles des  $\alpha$ -glucosidases des champignons *Mortierella alliacea* (55 °C) (Tanaka *et al.*, 2002) et *Paccilomyces lilacinus* (65 °C) (Kobayashi *et al.*, 2003). Cette valeur est par contre supérieure à celle de l'une des deux formes d' $\alpha$ -glucosidase du microorganisme *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 (37 °C) (Van den Broek *et al.*, 2003). L' $\alpha$ -glucosidase de *P. americana* hydrolyse le *p*-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, le maltose et le saccharose comme les  $\alpha$ -glucosidases de l'abeille *Apis mellifera* (L.) (Nishimoto *et al.*, 2001) et *Thermus thermophilus* (Yang, Zhang, 1992).

L'aptitude de cette enzyme à catalyser les réactions de transglucosylation a été testée. Les substrats naturels tels que le saccharose et le maltose ont été utilisés comme donneurs de glucosyle, le 2-phényléthanol et le phénol comme accepteurs de

glucosyle. L'intérêt du choix de ces substrats naturels comme donneurs de glucosyle se situe non seulement au niveau de leur coût relativement peu élevé mais aussi au niveau de leur capacité d'être facilement et intensément hydrolysés par l' $\alpha$ -glucosidase de la blatte *P. americana*. Quant aux accepteurs de glucosyle, ils présentent également des avantages :

- le phényléthanol est un composé insoluble dans l'eau. Cette propriété est caractéristique de la plupart des macromolécules naturelles tandis que le phénol plus soluble que le phényléthanol représente les autres molécules solubles en milieu aqueux.
- le phényléthylglucoside ou le phénylglucoside, produits des réactions de transglucosylation, sont facilement quantifiables en chromatographie liquide à haute performance grâce au détecteur UV dont la longueur d'onde est fixée à 257 nm. Pour cette facilité de détection, le phényléthanol a été déjà utilisé pour étudier les activités de transglucosylation des  $\beta$ -galactosidases d'*Aspergillus oryzae* (Fortun, Colas, 1991) d'*Achatina achatina* (Leparoux *et al.*, 1997) de la  $\beta$ -glycosidase de *Thermus thermophilus* (Dion *et al.*, 1997) et des glycosidases du termitte *Macrotermes subhyalinus* (Rambour) (Kouamé *et al.*, 2001).



**Figure 7.** Influence de la concentration du donneur de glucosyle (maltose et saccharose) sur la réaction de transglucosylation catalysée par l' $\alpha$ -glucosidase purifiée de la blatte *P. americana*. Accepteurs de glucosyle : phényléthanol et phénol (100 mM) ; tampon phosphate 100 mM pH 6,0 ; enzyme 0,22 UE ; temps d'incubation : 16 heures — *Influence of the glucosyl donor (maltose and sucrose) concentration on transglucosylation reaction catalysed by  $\alpha$ -glucosidase purified from cockroach *P. americana*. Glucosyl acceptor: phenylethanol and phenol (100 mM) ; 100 mM phosphate buffer pH 6.0 ; enzyme 0.22 UE ; reaction time: 16 h.*

Les conditions expérimentales ont été optimisées au niveau de divers facteurs capables d'influencer le taux de transglucosylation. Dans ce contexte, le temps de réaction est un paramètre important tant que les produits formés durant les réactions de transglucosylation peuvent être utilisés comme substrats et être hydrolysés. Pour les glycosides étudiés, un taux maximum de transglucosylation a été obtenu dans un temps relativement court (environ 16 heures) sans qu'il n'y ait eu hydrolyse des produits formés au cours de la transglucosylation. Après 16 heures de réaction, une diminution du pourcentage de transglucosylation a été observée. Cette situation peut s'expliquer par une hydrolyse des produits issus de la synthèse. Or l' $\alpha$ -glucosidase n'hydrolyse pas les liaisons glycosidiques de type  $\beta$ . Ce qui suppose que cette enzyme agit par rétention de configuration anomérique.

L'effet du pH sur les taux de transglucosylation a été étudié entre pH 3,5 et pH 8. Les taux maxima de transglucosylation sont obtenus dans l'intervalle de pH se situant entre 5,0 et 6,5 selon le substrat et l'accepteur utilisés. Le rendement maximum de la production de néoglucoconjugués à 37 °C dépend de l'accepteur utilisé. Le pH optimum de transglucosylation de l' $\alpha$ -glucosidase de *P. americana* est de

6,0. Cette valeur est différente de celle du pH optimum d'hydrolyse (5,0). Cette situation a déjà été signalée chez les glycosidases de *Macrotermes subhyalinus* où les pH optima sus-cités sont différents (Kouamé *et al.*, 2001). Pour l' $\alpha$ -glucosidase de cette même espèce de termite, les pH optima de transglucosylation et d'hydrolyse sont respectivement de 5,6 et 6,6 (Kouamé *et al.*, 2001). Un pourcentage de transglucosylation plus élevé (67 %) avec le 2-phényléthanol qu'avec le phénol (48 %) a été obtenu. Cette différence de pourcentage de transglucosylation peut être due à la grande réactivité du groupement alcool primaire du phényléthanol par rapport à la fonction hydroxyle du phénol. Les meilleurs rendements ont été obtenus avec une concentration d'environ 400 mM en donneur de glycosyle et de 100 mM en accepteur de glycosyle. Le rendement maximum obtenu avec le phényléthanol est très intéressant. Ce pourcentage de transglucosylation est largement supérieur aux taux obtenus habituellement. Il est à peu près égal à celui de l' $\alpha$ -glucosidase de *Macrotermes subhyalinus* (63 %). Ces résultats font penser que les  $\alpha$ -glucosidases des insectes peuvent être considérées comme de très bonnes enzymes de transglucosylation capables de catalyser les réactions de synthèse de néoglucoconjugués.

#### 4. CONCLUSION

La blatte *Periplaneta americana* possède dans son tube digestif une  $\alpha$ -glucosidase qui a une activité maximale d'hydrolyse à pH 5,0 et à 50 °C. Cette enzyme hydrolyse le *p*-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, le maltose et le saccharose. Les pourcentages de transglucosylation de l' $\alpha$ -glucosidase de *P. americana* à 37°C sont très élevés et ont atteint 67 % et 48 % respectivement avec le 2-phényléthanol et le phénol comme accepteurs de glucosyle. Cette enzyme hydrolyse les produits formés c'est-à-dire le phényléthyl- $\alpha$ -D-glucoside et le phényl- $\alpha$ -D-glucoside. Cette situation montre que cette enzyme a opéré par un mécanisme de rétention de configuration anomérique. À partir de ces résultats, l' $\alpha$ -glucosidase de la blatte *P. americana* apparaît comme une enzyme importante dans la préparation des  $\alpha$ -néoglucoconjugués.

#### Bibliographie

- Baniel A., Caer D., Colas B., Gueguen J. (1992). Functional properties of glycosylated derivatives of the 11 S storage protein from Pea (*Pisum sativum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **41**, p. 544–546.
- Becker KC., Kuhl P. (1999). Synthesis of O- $\beta$ -galactopyranosyl-L-serine derivatives using  $\beta$ -galactosidase in aqueous-organic reaction systems. *J. Carbohydr. Chem.*

- 18, p. 121–129.
- Caer D., Baniel A., Gueguen J., Colas B. (1990a). *In vitro* glycosylation of *Pea legumin*. Effects on some functional properties. *Sci. Aliments* **10**, p. 465–472.
- Caer D., Baniel A., Suribade M., Gueguen J., Colas B. (1990b). Preparation and physicochemical properties of glycosylated derivatives of *Pea legumin*. *J. Agric. Food Chem.* **38**, p. 1700–1706.
- Cote GL., Tao BY. (1990). Oligosaccharide synthesis by enzymatic transglycosylation. *Glycoconjugate J.* **7**, p. 145–162.
- Delque BP., Vittori C., Sudaka P., Giudicelli J. (1989). Purification and properties of neutral maltase from human granulocytes. *Biochem. J.* **256** (3), p. 647–652.
- Dion M., Fourage L., Hallet JN., Colas B. (1999). Cloning and expression of a  $\beta$ -glycosidase gene from *Thermus thermophilus*. Sequence and biochemical characterization of the encoded enzyme. *Glycoconjugate J.* **16**, p. 27–37.
- Finch P., Yoon JH. (1997). The effects of organic solvents on the synthesis of galactose disaccharides using  $\beta$ -galactosidases. *Carbohydr. Res.* **303**, p. 339–345.
- Fortun Y., Colas B. (1991). Lithium chloride effect on phenylethyl- $\beta$ -D-galactoside synthesis by *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -D-galactosidase in the presence of high lactose concentration. *Biotechnol. Lett.* **13**, p. 863–866.
- Fourage L., Helbert M., Nicolet P., Colas B. (1999). Temperature dependence of the ultraviolet-visible spectra of ionized and un-ionized forms of nitrophenol: consequence for the determination of enzymatic activities using nitrophenyl derivatives. A warning. *Anal. Biochem.* **270**, p. 184–185.
- Ishikawa K., Kimura S., Kanaya S., Morikawa K., Nakamura H. (1993). Structural study of mutants of *Escherichia coli* ribonuclease HI with enhanced thermostability. *Protein Eng.* **6**, p. 85–91.
- Kobayashi I., Tokuda M., Hashimoto H., Konda T., Nakano H., Kitahata S. (2003). Purification and characterization of a new type of  $\alpha$ -glucosidase from *Paccilomyces lilacinus* that has transglycosylation activity to produce  $\alpha$ -1,3- and  $\alpha$ -1,2-linked oligosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67** (1), p. 29–35.
- Kouamé LP., Niamké S., Diopoh J., Colas B. (2001). Transglycosylation reactions by exoglycosidases from the termite *Macrotermes subhyalinus*. *Biotechnol. Lett.* **23**, p. 1575–1581.
- Kunst A., Draeger B., Ziegenhorn J. (1984). Colometric methods with glucose oxidase and peroxidase. In Bergmeyer HU. (ed.). *Methods of enzymatic analysis* **6**. Weinheim: Verlag Chemie, p. 178–185.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, p. 680–685.
- Leparoux S., Colas B. (1994). Digestive juice of *Achatina achatina* as a potential source of transglycosylation enzymes. *Int. J. Biochem.* **26**, p. 247–254.
- Leparoux S., Padrines M., Placier G., Colas B. (1997). Characterization of a strictly specific acid  $\beta$ -galactosidase from *Achatina achatina*. *Biochim. Biophys. Acta* **1336**, p. 525–532.
- Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL., Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Biochem.* **193**, p. 265–275.
- Nishimoto M., Kubota M., Tsuji M., Mori H., Kimura A., Matsui H., Chiba S. (2001). Purification and substrate specificity of honeybee, *Apis mellifera* L.,  $\alpha$ -glucosidase III. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65** (7), p. 1610–1616.
- Potus J., Drapron R. (1997) Enzymes en agro-alimentaires : les enzymes dans les industries de cuisson des céréales. Paris : Lavoisier Tec Doc., p. 380.
- Tanaka Y., Aki T., Hidaka Y., Furuya Y., Kawamoto S., Shigeta S., Ono K., Suzuki O. (2002). Purification and characterization of a novel fungal  $\alpha$ -glucosidase from *Mortierella alliacea* with high starch hydrolytic activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66** (11), p. 2415–2423
- Ter KBH., Hrdy I., Sanchez LB., Muller M. (2000). Purification and specificity of two  $\alpha$ -glucosidase isoforms of the parasitic protist *Trichomonas vaginalis*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **47** (5), p. 440–442.
- Toone EJ., Simon ES., Bednarski MD., Whitesides GM. (1989). Enzyme-catalyzed synthesis of carbohydrates. *Tetrahedron* **45**, p. 5365–5422.
- Van den Broek L., Struijs K., Verdoes JC., Beldoes JC., Beldman G., Voragen AG. (2003). Cloning and characterization of two  $\alpha$ -glucosidases from *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61** (1), p. 55–60.
- Vulfson EN., Patel R., Beecher JE., Andrews AT., Lawba A. (1990). Glycosidases in organic solvents: I. Alkyl- $\beta$ -glucoside synthesis in a water-organic two-phase system. *Enzyme Microbiol. Tech.* **12**, p. 950–954.
- Yang S., Zhang S. (1992). Purification and characterization of  $\alpha$ -glucosidase from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **32** (1), p. 125–131.
- Yoon JH., Ajisaka K. (1996). The synthesis of galactopyranosyl derivatives with  $\beta$ -galactosidases of different origins. *Carbohydr. Res.* **292**, p. 153–163.

(27 réf.)