

Cercetări Marine	I.R.C.M.	Nr.11	203 - 213	1978
------------------	----------	-------	-----------	------

ACTIVITÉ AMYLASIQUE CHEZ *Mya arenaria* L.

Natalia Roşoiu¹⁾ et Steliana Stoica²⁾

^{1/} Institut Roumain de Recherches Marines - Constanţa

^{2/} Institut de Recherches Chimico-Pharmaceutiques - Bucureşti

ABSTRACT:

The paper presents results of amylase extraction from hepatopancreas and whole soft tissue of *Mya arenaria* L., as well as biochemical characterization of the extract. Experimental data attest remarkable amylase activity at pH 6.9 - 7.15 and 33°C temperature.

Les premières données sur certaines activités amylasiques chez *Mytilus galloprovincialis* IAM. et *Rapana thomasiana* GROSSE du littoral roumain de la mer Noire étaient obtenues il y a quelques années (4; 8; 9). C'est pourquoi nous nous sommes proposé d'étudier aussi l'amylase chez *Mya arenaria* L. (espèce abondante au littoral roumain). Pour le début, l'ouvrage ci-présent veut révéler les conditions d'extraction de l'amylase du hépatopancreas et du corps entier, ainsi que quelques paramètres enzymatiques.

Bien que d'autres espèces de mollusques bivalves soient

fréquemment étudiées à ce point de vue (1-3; 5), en littérature les données concernant l'activité amylasique chez Mya arenaria manquent.

MATERIEL ET METHODES

On a effectué les expérimentations sur l'extrait protéique obtenu en faisant macérer le hépatopancréas ou l'entier corps mou, provenant au moins de 10 exemplaires de mollusques, dans un mélangeur Potter (1 g tissu par 10 ml milieu d'extraction), maintenu pendant 1 heure à 4°C, puis mis au centrifugeur 15 minutes à 10.000 t.p.m.

Le dosage de l'activité enzymatique fut effectué par la méthode de METAIS et BIETH (7). Le milieu de réaction contient 4 mg amidon soluble préparé en tampon phosphate 0,2 M, pH 6,9 et 0,040 - 0,100 mg protéine extraite. On conduit la réaction à 33°C pendant 10 minutes, après on l'arrête avec 5 ml CH₃COOH 6%. Ensuite on réalise la photocolométrie à 540 nm, après réaction à iode, solution N/1.500.

L'activité enzymatique fut calculée de même façon que dans l'article antérieur (8), en s'exprimant en mU/ml/min, et l'activité spécifique en mU/mg/min.

La concentration protéique fut déterminée par la méthode de LOWRY et al. (6).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Afin d'établir les meilleures conditions d'extraction des protéines à activité amylasique du corps entier ou du hépatopancréas, on a testé plusieurs milieux d'extraction et la conclusion en fut que la solution de CaCl₂ 0,15 M et l'eau de mer sont aptes à extraire sélectivement la plus grande quantité de protéine à activité amylasique (à petite concentration protéique et grande capacité catalytique (Tableau 1).

En étudiant l'influence des solutions de CaCl₂ de différentes concentrations, utilisées comme milieux d'extraction, sur l'activité amylasique, on a observé une augmentation proportionnelle de l'activité enzymatique jusqu'à 0,4%, suivie d'une faible diminution et d'un palier (Fig.1). IORDACHESCU et coll. (4)

Activité amylasique à un pH de 6,9 et à 33°C, dans les extraits protéiques totaux de Mya arenaria, réalisés en divers milieux d'extraction (substrat: 4 mg amidon soluble dans le milieu de réaction)

Milieu d'extraction	CORPS ENTIER			HÉPATOPANCRÉAS		
	Protéine mg/ml	Activité enzymatique mU/ml/min	Activité enzymatique mU/mg/min	Protéine mg/ml	Activité enzymatique mU/ml/min	Activité enzymatique mU/mg/min
eau distillée	<u>2,03</u>	<u>154</u>	<u>75,9</u>	<u>2,43</u>	<u>295</u>	<u>121,3</u>
eau potable	1,94	143	52,4	2,40	205	85,4
eau de mer	<u>2,78</u>	<u>210</u>	<u>75,5</u>	<u>2,95</u>	<u>317</u>	<u>107,4</u>
KBr 0,15 M	2,30	131	57,0	2,61	222	85,0
KCl 0,15 M	2,35	145	61,7	2,94	256	87,0
NaCl 0,15 M	2,16	133	61,6	2,38	264	110,9
CaCl ₂ 0,15 M	<u>2,00</u>	<u>233</u>	<u>116,5</u>	<u>2,30</u>	<u>334</u>	<u>145,2</u>
CH ₃ COOK 0,15 M	2,45	81	33,0	2,61	146	55,9
CH ₃ COONa 0,15 M	1,85	61	33,0	2,31	138	59,7
NaHCO ₃ 0,15 M	3,48	70	20,1	3,63	89	24,5
Natrium tetraboratum 0,15 M	3,20	70	21,9	3,23	95	29,4
Natrium taurocholicum 0,1%	2,31	114	49,4	2,75	130	47,2
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0,15 M	2,53	70	27,7	2,89	124	42,9
Tampon Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ 0,01 M, pH 7	2,39	143	59,8	3,25	186	57,2
Tampon Tris-HCl 0,01 M, pH 7	2,90	4	1,4	3,54	49	13,8

ont également trouvé que les solutions de CaCl_2 solubilisent le mieux l'amylase du hépatopancréas de la moule, la température d'extraction n'ayant pas une influence significative sur l'activité de la préparation obtenue.

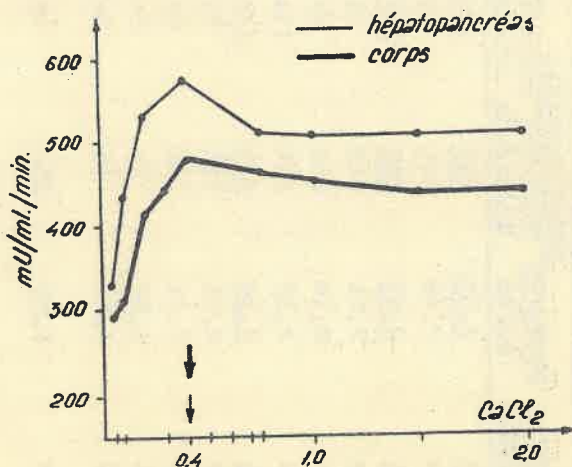


Fig. 1 - Influence des solutions de CaCl_2 de différentes concentrations sur l'activité amylasique de Mya arenaria.

En testant aussi l'influence du temps d'extraction et de la température sur la solubilisation de l'amylase de Mya, nous avons constaté qu'à 4°C on extrait, pendant une heure, le maximum de protéine à activité catalytique.

Quant à l'activité amylasique de l'extrait protéique total obtenu du corps entier de Mya en utilisant l'eau distillée comme milieu d'extraction, elle augmente directement proportionnelle à la concentration d'enzyme dans le domaine 0,12-0,48 mg/ml protéine (Fig.2).

En réalisant une série de valeurs du pH comprises entre 3 et 9,5 en divers tampons (tampon $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ $5 \times 10^{-3}\text{M}$, tampon $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,2M et Tris-HCl 0,2 M), on a testé l'activité amylasique ainsi dans les préparations enzymatiques obtenues par l'extraction avec de l'eau distillée, que dans celles obtenues par l'extraction des protéines solubles en CaCl_2 0,4%. Nos don-

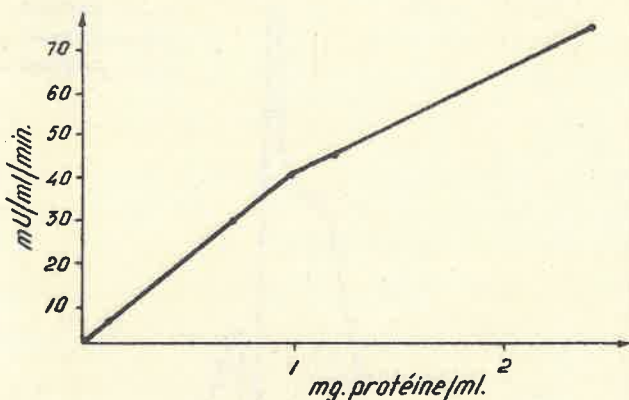


Fig.2 - Evolution de la réaction enzymatique en fonction de la concentration protéique (extrait protéique obtenu du corps entier de Mya arenaria en utilisant l'eau distillée comme milieu d'extraction).

nées révèlent que le pH optimum d'action de l'extrait protéique obtenu du corps entier de Mya réalisé en eau distillée est de 6,9 et de celui réalisé en CaCl_2 0,4% est de 7,15 (Figs. 3-4). D'un autre côté, l'extrait protéique provenant du hétopancreas de Mya en utilisant l'eau distillée comme milieu d'extraction, présente la meilleure activité toujours à un pH de 6,9, tandis que celui réalisé en CaCl_2 0,4% présente deux maxima d'activité amylasique, le premier à un pH de 6,2 et le second, réduit comme valeur, à un pH de 6,9 (Figs. 5-6). Tous les extraits enzymatiques étudiés ont une activité amylasique durant l'entier intervalle de pH testé.

ALLEMANY et al. (1) détermine chez Mytilus edulis deux activités amylasiques différentes, à pH acide (4,9) et neutre (7), toutes les deux étant du type α , tandis que d'autres (5) démontrent la présence, chez la même espèce, d'une amylase de pH 6,2.

En déterminant la température optimale d'action de l'enzyme, en mettant à l'incubateur le mélange de réaction à diverses températures, on a établi que l'amylase extraite en eau

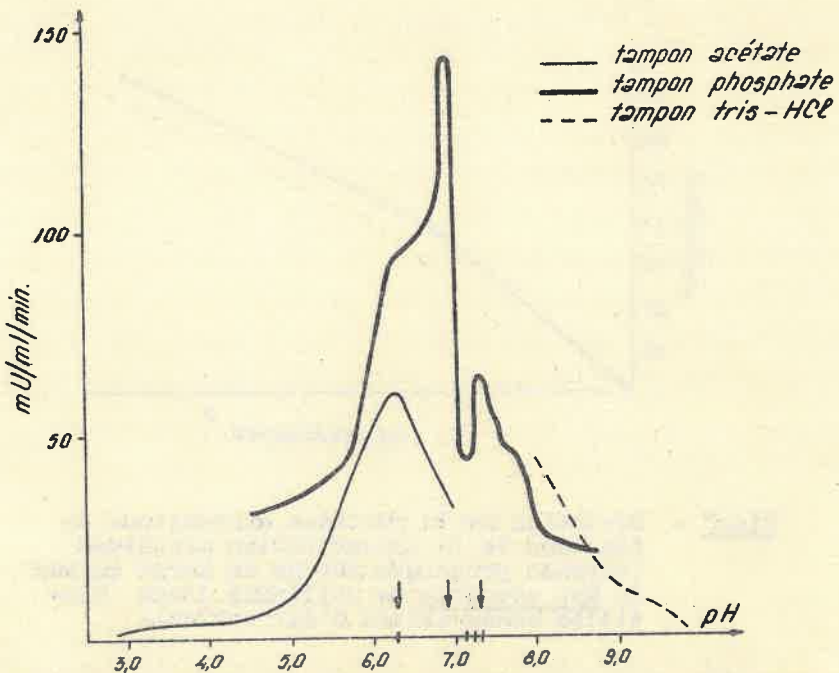


Fig. 3 - Influence du pH sur la vitesse de la réaction catalysée par l'amylase extraite du corps entier de Mya arenaria (milieu d'extraction: eau distillée).

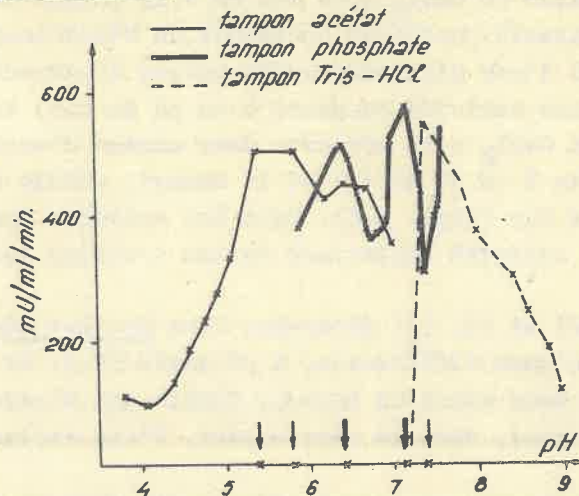


Fig. 4 - Influence du pH sur la vitesse de la réaction catalysée par l'amylase extraite du corps entier de Mya arenaria (milieu d'extraction: CaCl_2 0,4%).

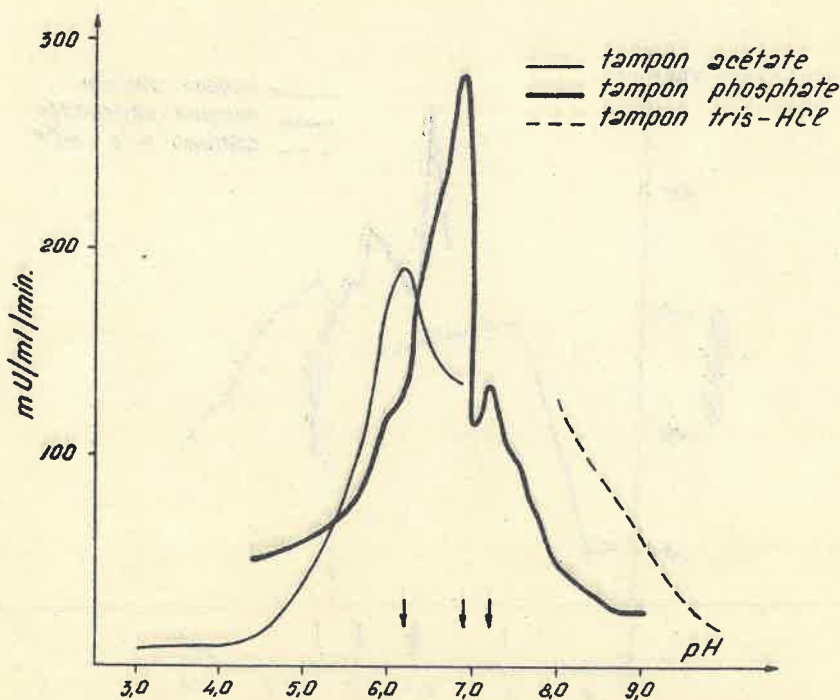


Fig. 5 - Influence du pH sur la vitesse de la réaction catalysée par l'amylase extraite du hépatopancréas de Mya arenaria (milieu d'extraction: eau distillée).

distillée, ainsi celle du hépatopancréas que celle du corps entier de Mya arenaria, a une activité maxima à 33°C et un haut degré de thermostabilité (Fig.7). Les données obtenues par ALEMANY et al. (1) sont intéressantes elles-aussi à ce point de vue, en constatant les activités amylasiques chez Mytilus edulis avec l'optimum d'activité aux températures de 25°C (amylase de pH 4,9) et 32°C (amylase de pH 7-8).

Les données expérimentales concernant la saturation en substrat de l'amylase impurifiée, sont inscrites dans la Fig.8. La vitesse de réaction augmente après une fonction hyperbolique jusqu'à 4 mg amidon en milieu, en observant ensuite des phénomènes d'inhibition à de grandes concentrations de substrat. (Dans

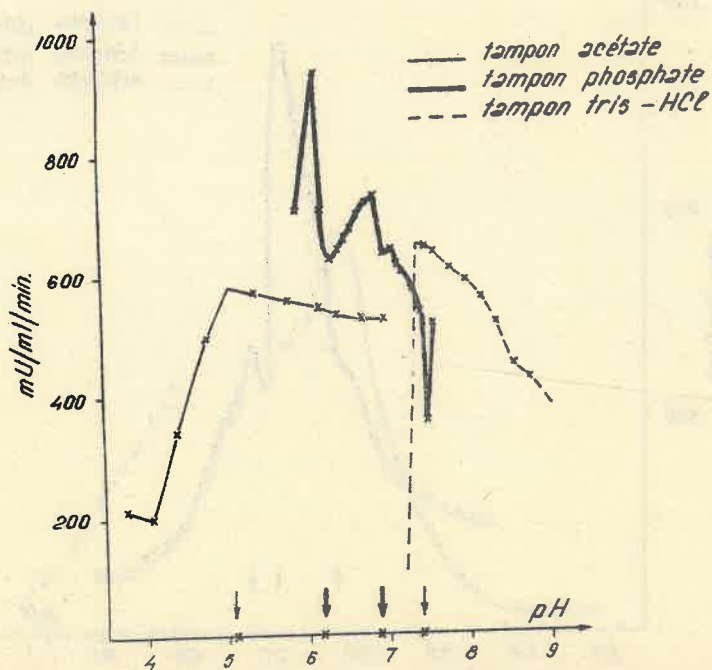


Fig.6 - Influence du pH sur la vitesse de la réaction catalysée par l'amylase extraite du hépatopancréas de *Mya arenaria* (milieu d'extraction: CaCl_2 0,4%).

le milieu de réaction, la concentration en amidon fut augmentée petit à petit depuis 0,4 mg à 12 mg).

Conformément à la méthode de dosage de l'activité amy-
lasique utilisée, on estime que chez *Mya arenaria*, de même que
chez *Mytilus galloprovincialis* et *Rapana thomasiana* (8; 9), l'a-
mylase qu'on a décellée est du type α .

En conclusion, on peut affirmer qu'on a mis en évi-
dence chez *Mya arenaria* une intense activité amy-
lasique. Les données obtenues par extraits protéiques réalisés du hépatopan-
créas et du corps entier, indiquent la présence, chez *Mya*, d'une
amylase du type α à un pH optimum d'action de 6,9-7,15 et tempé-
rature optimale de 33°C.

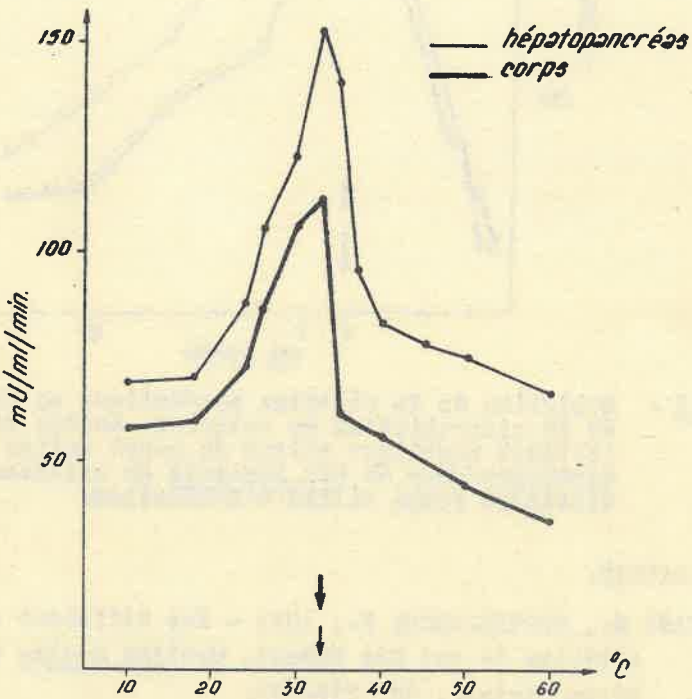


Fig.7 - Influence de la température sur la vitesse de la réaction catalysée par l'amylase extraite du corps entier et du hépatopancréas de *Mya arenaria* (milieu d'extraction: eau distillée).

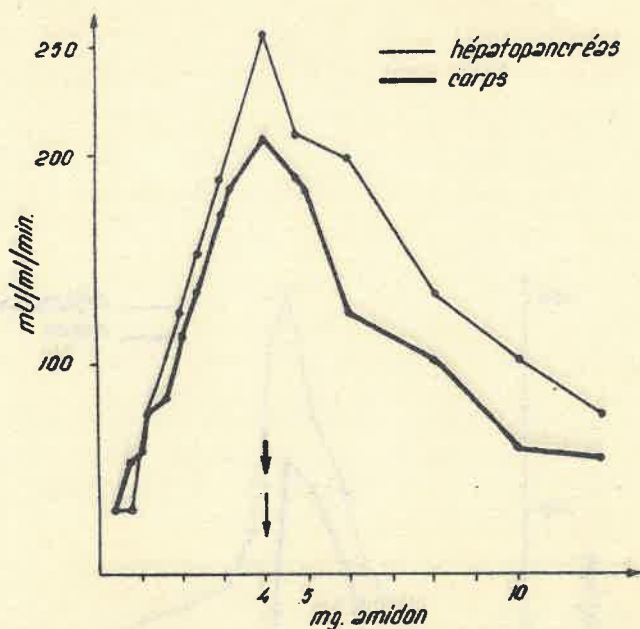


Fig. 8 - Evolution de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat: amidon soluble (extrait protéique obtenu du corps entier et du hépatopancréas de Mya arenaria en utilisant l'eau distillée comme milieu d'extraction).

BIBLIOGRAPHIE:

1. ALEMANY M., ROSSEL-PÉREZ M., 1973 - Two different amylase Activities in the Sea Mussel, Mytilus edulis L., Rev. Espan.Fisiol., 29: 217-222.
2. GOROMOSOVA S.A., 1973 - Rapport des activités amylasique et phosphorylasique dans les muscles des invertébrés (en russe), Zh.Evol.Biochim.Fiziol.: 48-51.
3. GOROMOSOVA S.A., SHAPIRO A.Z., 1970 - L'activité amylasique dans le hépatopancréas et le muscle chez la moule (en russe), Biol.Moria, 18: 89-98.
4. IORDACHESCU D., NICULESCU S., DUMITRU I.F., 1975 - Amylase extraction from the hepatopancreas of Mytilus Gallo-provincialis, Recherches marines, 8: 155-161.
5. KRISTENSEN J.H., 1972 - Carbohydrases of some marine inverte-

brates with notes on their food and the natural occurrence of carbohydrases studied, Marine Biology, 14: 130-142.

6. LOWRY O.H., ROSENBROUGH L.A., FARR R.J., RANDALL R.J., 1951 Protein measurement with Folin reactiv, J.Biol.Chem. 193: 265-275.
7. METAIS P., BIETH J., 1968 - Determination de l'alpha amylase par une microtehnique, Ann.Biol.Clin., 26: 133-142.
8. ROSOIU N., 1976 - Dynamique de l'activite amylasique chez la moule, pendant son cycle biologique annuel, Recherches marines, 9: 261-266.
9. ROSOIU N., 1977 - Activite amylasique chez Rapana thomasi GROSSE, Recherches marines, 10.