

Des levures probiotiques présentant une activité des phytases, découvertes dans l'appareil digestif d'holothuries

Nalini Yasoda Hirimuthugoda^{1,*}, Zhenming Chi¹ et Longfei Wu¹

Résumé

Les levures sont des micro-organismes couramment présents dans l'appareil digestif des animaux, et plusieurs souches de levure produisent des phytases. La présente étude a tout particulièrement porté sur l'isolement d'espèces de levures d'holothuries et sur la capacité des levures de produire des phytases. Deux souches de phytases ont été isolées et répertoriées : *Yarrowia lipolitica* et *Candida tropicalis*. Ces souches ont produit de grandes quantités de phytases extracellulaires et de phytases liées aux cellules. Ces phytases pourraient être utilisées comme levures probiotiques par la filière de l'holothuriculture.

Introduction

Les intestins des animaux contiennent de grandes quantités de micro-organismes qui ont des fonctions précises telles que la décomposition catabolique des fibres et de nutriments complexes ainsi que la production de vitamines. Raibaud (1992) a signalé que les micro-organismes intestinaux jouaient un rôle contre les microbes pathogènes, et que le déséquilibre des micro-organismes de l'intestin pouvait conduire à une croissance rapide des pathogènes opportunistes susceptibles d'être dangereux pour l'animal hôte. Hirimuthugoda et al. (2006) ont signalé la possibilité d'utiliser les microbiotes peuplant l'intestin comme probiotiques. Cette étude visait à mieux comprendre les micro-organismes présents dans l'intestin des holothuries et à mettre au point des micro-organismes probiotiques destinés à l'holothuriculture.

En tant que composante principale de l'ADN, le phosphore est un élément essentiel. Les céréales, les légumes, les plantes fourragères et les cultures racines emmagasinent les phosphores comme les phytates et les phytines, qui ne peuvent être digérées que par les ruminants. Chez les autres animaux, les phosphores non digérés sont réintroduits dans l'environnement. L'accumulation de phosphores non digérés dans les sols et les os est toxique.

Les phytases peuvent jouer un rôle non négligeable dans la lutte contre la pollution par les phosphates en raison de leur capacité de catalyser l'émission de phosphates provenant des phytates et des phytines. Récemment, des phytases provenant de végétaux microbiens et d'animaux ont été mis à disposition comme compléments alimentaires. Ils sont devenus les enzymes les plus prisés et les plus répandus dans les systèmes d'élevage d'animaux. Cependant, les scientifiques n'ayant pas encore étudié les phytases microbiennes marines, nous avons essayé d'isoler des espèces microbiennes peuplant l'intestin des holothuries afin d'étudier leur capacité de sécréter des phytases.

Matériels et méthodes

L'échantillonnage et l'isolement des levures

Les holothuries provenant des zones côtières du Sri Lanka et de la Chine ont été ramassées de manière aléatoire et disséquées dans des conditions aseptiques. Les intestins ont été mis de côté et homogénéisés, et 2 mL d'échantillons homogénéisés ont été placés dans 20 mL de bouillon YPD contenant 2 % de glucose, 2 % de polypeptone, 1 % d'extrait de levure et de l'eau de mer, bouillon de culture qui a été traité aux antibiotiques et maintenu à 28°C pendant cinq jours. Au bout de cinq jours, les cultures cellulaires ont été disposées sur des lamelles de gellose YPD et des colonies de levures ont été placées dans des préparations colorées.

Détermination de l'activité des phytases

Des souches de levure ont été introduites dans des flacons de 250 mL remplis d'une solution contenant 0,5 % de phytate de sodium, 1 % de sulfate d'ammonium, des vitamines, des sels minéraux et elles ont poussé pendant cinq jours à une température de 28°C. Celles qui ont surnagé ont été titrées en mesurant la quantité de sulfate émis (Fiske et Subbarow 1925) à l'aide de phytases de sodium comme substrat (Vohara et Satyanarayana 2001). Une unité de phytases est définie comme la quantité d'enzymes qui libère 1 mU de phosphates inorganiques par minute, à température ambiante. L'effet de la température et le pH sur l'activité des phytases a été étudié en incubant l'enzyme à 4–9 pH (les solutions tampon utilisées ont été de 0,2 M d'acétate pour 4–6 et 0,2% M de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O} \cdot \text{HBr}_3$ pour 7–9) et à des températures de 37°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C et 70°C.

L'extraction d'ADN, la PCR et l'analyse phylogénétique

Toute l'ADN du génome des souches de levure a été isolée et purifiée en suivant la méthode décrite par Sambrook et

1. UNESCO Chinese Center of Marine Biotechnology, Ocean University of China, No. 5, Yushan Road, Qingdao, Chine
2. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Ruhuna, Mapalana, Kamburupitiya, Sri Lanka

* Auteur correspondant : nyhirimuthugoda@yahoo.com

al. (1989). Le fragment d'ADNr 18S et le fragment ITS, insérés sur le vecteur, ont été séquencés par la Shanghai Sangon Company. Les séquences obtenues ci-dessus ont été alignées au moyen de l'analyse BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). L'identification systématique des levures a été réalisée grâce à la méthode décrite par Kurtzman et Fell (1998).

Résultats et discussion

Deux souches de levure ont été isolées et les deux souches ont été prélevées sur l'intestin d'*Holothuria scabra*. De manière générale, les animaux ont un grand nombre de micro-organismes qui colonisent l'intestin dans leur appareil digestif. Nos résultats montrent que les micro-organismes ont été isolés du contenu de l'intestin et, par conséquent, à notre connaissance, ces souches ne peuvent pas être classées comme des levures colonisant l'intestin. Des travaux de recherche supplémentaires s'imposent sur cet aspect. Les souches ont été étiquetées comme suit : W2B (pour celles qui proviennent de Chine) et YF12C (pour celles qui proviennent du Sri Lanka). À partir des caractéristiques biochimiques et d'informations analogues concernant le type de souches énumérées par Kurtzman et Fell (1998), nous avons constaté que la souche W2B et la souche YF12C étaient semblables à *Yarrowia lipolitica* et à *Candida tropicalis*. L'analyse des séquences ADN de phylogénie confrontées à celles qui figurent dans la base de données du *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), a en outre confirmé que les souches de levure obtenues dans cette étude étaient étroitement liées à *Yarrowia lipolitica* (W2B) et *Candida tropicalis* (YF12C). Les séquences d'ADNr 18S des souches de levure ont été déposées auprès du NCBI sous les numéros d'entrée suivants : DQ 438177 –W2B et DQ 515959- YF12C.

Tableau 1. Activité des phytases de deux souches de levure

Souche	activité des phytases (mU min ⁻¹)	température optimale (°C)	pH optimal
W2B	61 ± 0,011 ^a	60	8
YF12C	49 ± 0,008 ^a	55	8
	28 ± 0,045 ^b	65	6

^aphytases extra cellulaires

^bphytases liées à la cellule

Il est intéressant d'indiquer que les levures marines sécrétant des phytases sont présentes dans les intestins de l'holothurie. Un petit nombre de souches de levure qui mettent en évidence des sécrétions de phytases ont été observées (Pandy et al. 2001), mais c'est la première fois que des phytases de levures provenant d'holothuries sont signalées. La souche W2B n'a pu produire que des phytases extra cellulaires tandis que la souche YF12C a pu produire des phytases extra cellulaires et des phytases liées à la cellule. Vohara et Satyanarayana (2004) ont

étudié les phytases liées aux cellules à partir de levures du type *Pichia anomala*, qui peuvent être utilisées dans la filière de l'alimentation du bétail afin de réduire la pollution par les phosphates.

Dans tous les travaux, il a été relevé que la température et le pH sont les facteurs qui influent le plus sur la production d'enzymes. Dans la présente étude, une forte activité de phytases a été observée entre 55°C et 60°C. S'agissant de la souche W2B, la température optimale a été 60°C. Quant à la souche YF12C, la température optimale a été de 55°C pour la production d'enzymes extra cellulaires et de 65°C pour la production d'enzymes liées à la cellule. Un pH de 8 a été optimal pour la production d'enzymes extra cellulaires pour les deux souches, tandis qu'un pH de 6 l'a été pour la synthèse des enzymes liées à la cellule de YF12C. En général, le pH et la température optima sont de l'ordre 4,5-6 et de 45-60°C, respectivement (Pandy et al. 2001). Cela étant, nous avons observé dans cette étude des valeurs de pH plus importantes, probablement parce que ces souches provenaient de l'environnement marin.

Yarrowia lipolitica a plusieurs propriétés physiologiques présentant un intérêt industriel. L'espèce est abondante dans l'environnement marin et elle est bien connue pour la production de protéases, de lipases et pour l'utilisation de paraffine *n*- (Kurtzman et Fell 1998). Bien que *Yarrowia lipolitica* ait fait l'objet de nombreuses recherches, cet article rend compte de ses phytases. Cette espèce peut être utilisée commercialement pour la production de phytases marines. *Candida tropicalis* est une espèce de levure bien connue, présente partout dans le monde, et c'est une souche pathogène courante chez les humains. En conséquence, l'application industrielle de cette espèce est limitée, bien que les phytases extraites puissent être utilisées comme produit industriel. Au vu des tendances actuelles du marché, il apparaît clairement qu'il existe une forte demande de phytases en tant que complément alimentaire, divers produits étant disponibles sous des noms commerciaux différents. Par exemple, Cenzyme, Natu-phos, et Gist-Brocades sont les produits les plus vendus sur le marché (Pandy et al. 2001).

Le rôle ou l'effet des levures dans l'appareil digestif des holothuries n'est pas clairement établi mais, à l'évidence, la synthèse importante des phytases est favorable à la digestion des phosphores de phytases et c'est aussi une forme probiotique. Au cours des dernières décennies, l'holothuriculture a progressé de manière remarquable et des composés riches en phytases ont été utilisés. Cette levure de synthèse des phytases joue un rôle majeur dans la digestion des aliments ingérés par les holothuries. L'excrétion du phosphore non digéré conduit à l'eutrophisation et provoque une baisse de la qualité de l'eau dans les fermes holothuricoles. Cette situation est favorable à l'apparition de micro-organismes pathogènes et les phytases de levure observées chez les holothuries présentent donc un grand intérêt dans la filière holothuricole, toutes les phytases découvertes jusqu'à présent ne provenant pas de sources marines. Les auteurs de cet article mènent de nouvelles recherches sur l'application de ces deux souches de levure dans l'holothuriculture et sur la purification des enzymes dans un milieu optimisé.

Remerciements

Ces travaux de recherche ont pu être menés grâce au concours du *Chinese Scholarship Council*.

Bibliographie

- Fiske C.H and Subbarow Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorous. *Journal of Biological Chemistry* 66:376–400.
- Hirimuthugoda N.Y., Chi Z.M. Zhu K.L. 2006. Les probiotiques et l'élevage d'holothuries. *La Bêche-de-mer, Bulletin de la CPS* 24:45–48.
- Kurtzman C.P. and Fell J.W. 1998. *The yeasts, a taxonomic study*, fourth edition. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier. p. 915–947.
- Pandy A., Szakas G., Soccol R.C., Rodriguez-Leon J.A. and Soccol, T.V. 2001. Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Technology* 77:203–204.
- Raibaud P. 1992. Metabolic interactions in the gut. p. 29–53. In: Fuller R. (ed). *Probiotics, the scientific basis*. London: Chapman and Hall.
- Sambrook J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Vohara A. and Satyanarana T. 2001. Phytase production by the yeast *Pichia anomala*. *Biotechnology Letters* 23:551–554.
- Vohara A. and Satyanarayana T. 2004. A cost effective molasses medium for enhanced cell bound phytase production by *Pichia anomala*. *Journal of Applied Microbiology* 97:471–476.

Observation de l'effet des conditions environnementales sur la scission induite de l'holothurie des sables méditerranéenne, *Holothuria arenicola* (Semper, 1868) en Égypte

F.A. Abdel Razek¹, S.H. Abdel Rahman¹, M.H. Mona, M.M. El-Gama² et R.M. Moussa^{1*}

Introduction

Holothuria arenicola est l'espèce d'holothurie la plus importante et la plus abondante en mer Méditerranée, sur la côte égyptienne (figure 1A). Sa présence a été signalée pour la première fois sur la côte méditerranéenne de l'Égypte en 1984 (Shoukr et al. 1984). Son habitat s'étend de la région indo pacifique à l'Atlantique occidental tropical. Elle atteint une taille avoisinant les 26 cm. Actuellement, *H. arenicola* est surexploitée dans les eaux égyptiennes en raison de la forte demande en provenance des marchés asiatiques. Le déclin des stocks d'holothuries risque d'avoir un effet négatif important sur l'écosystème et sur l'environnement marin adjacent, dans son ensemble. Il est donc nécessaire et urgent d'entreprendre des études approfondies sur la biologie, l'élevage et la gestion de la pêche d'*Holothuria arenicola*.

Certaines holothuries sont connues pour leur capacité de se reproduire de manière asexuée par scission. La plupart des espèces se reproduisant de la sorte le font suivant le mode de torsion et d'étirement (Uthicke 2002). Le premier essai d'induction de la reproduction asexuée de *H. arenicola* a été réalisé par Kilada et al. (2000), qui a étudié l'induction de la reproduction asexuée en utilisant un ruban de caoutchouc. Les présents travaux visent à décrire les stades de reproduction asexuée par scission et l'effet des facteurs environnementaux sur les taux de division et de survie.

Méthode

La reproduction asexuée de *H. arenicola* a été induite par l'application d'un ruban de caoutchouc juste à l'avant (les 45% correspondant à la partie supérieure) du milieu du corps (figure 1B). Les spécimens ont été entreposés dans un réservoir tapissé d'une fine couche de sable fin. La salinité de l'eau était de 36 ppt. L'eau du réservoir a été changée quotidiennement, et le nombre d'animaux divisés, non divisés et morts a été signalé chaque jour.

Discussion et conclusion

Les observations ont montré que le corps était plus étranglé au point de constriction. La partie postérieure était enflée et allongée. Les parties postérieure et antérieure effectuent une rotation dans des directions opposées ce qui a conduit à une constriction encore plus forte jusqu'à l'allongement des deux parties (figure 1C) et leur séparation finale, bien que ces parties aient été encore reliées l'une à l'autre par l'intestin. Au bout d'une journée, les parties antérieure et postérieure se sont complètement désolidarisées l'une de l'autre (figures 1D et 1E). Le taux de survie de la partie postérieure a été plus élevé que celui de la partie antérieure. L'ensemble du processus de scission a duré de un à cinq jours.

En raison de problèmes électriques qui ont compromis l'aération de l'eau, de faibles taux de survie ont été ob-

1. National Institute of Oceanography and Fisheries (NIOF), Alexandrie, Égypte.

2. Tanta University, Zoology Department, Tanta, Égypte

* Auteur correspondant : ragiamoussa@yahoo.com.au