

LES 4èmes JOURNEES DE BIOTECHNOLOGIES. 19-22 Décembre 2004, Hammamet, Tunisie.

Isolement et caractérisation d'une nouvelle tyrosinase fongique d'intérêt biotechnologique: de la protéine au gène.

Halaouli, S., Record, E., Asther, Mi., Sigoillot, J-C., Hamdi, M., Asther, M. & Lomascolo, A.
(oral presentation).

L'activité tyrosinase a été criblée sur vingt souches de *Pycnoporus cinnabarinus* et *Pycnoporus sanguineus*, appartenant à la Banque de Ressources Fongiques de Marseille. La souche *P. sanguineus* BRFM49 a montré le meilleur niveau d'activité tyrosinase et a été sélectionnée pour produire en masse afin de la caractériser. L'enzyme a été purifiée à partir d'un extrait brut de champignon, par trois étapes chromatographiques: une chromatographie échangeuse d'anions sur une colonne DEAE-Sépharose, une chromatographie par tamisage moléculaire sur une colonne Séphacryl S-200, et une dernière chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite. D'après les analyses effectuées (lectrophorèse SDS-PAGE, tamisage moléculaire) sur la protéine pure, la tyrosinase de *P. sanguineus* BRFM49 se présente sous la forme d'un monomère d'un poids moléculaire de 45 en conditions dénaturantes et de 38 en conditions natives. Les caractéristiques biochimiques de cette tyrosinase ont été déterminées: température et pH optima de fonctionnement, stabilité à la température, point isoélectrique, degré de glycosylation, nombre d'isoformes, constantes cinétiques, recherche d'activateurs. Un séquençage de son extrémité N-terminale par la réaction de dégradation d'Edman a permis de déterminer les 22 premiers acides aminés de sa séquence primaire et a permis de montrer une homologie de 61% avec la séquence de la tyrosinase du basidiomycète *Lentinus edodes*. Par la suite, huit séquences de peptides internes à la protéine ont été déterminées et ont permis d'isoler le gène codant pour la tyrosinase de *P. sanguineus* BRFM49, ainsi que l'ADNc correspondant. La tyrosinase de *P. sanguineus* BRFM49 est une enzyme cytosolique produite en faible quantité par rapport aux exigences imposées par les applications industrielles visées. L'expression hétérologue de la tyrosinase dans un système hyperproducteur de protéines tel que le champignon *Aspergillus niger* permettra de lever ce verrou technologique. Par ailleurs, les diverses expériences appliquées ont démontré l'efficacité de cette tyrosinase dans la bioconversion du p-tyrosol et de l'acide p-coumarique en hydroxytyrosol et en acide caféique, qui sont des molécules anti-oxydantes reconnues. Cette enzyme a également la capacité de réticuler un mélange de caséines commercial, d'où la possibilité de l'employer pour le développement de nouveaux bio-polymères.