

**PURIFICATION ET PROPRIETES DE DEUX OSIDASES  
PRODUITES PAR DES BACTERIES  
ISOLEES A PARTIR DU TRACTUS DIGESTIF  
DE *CEPHALOTERMES RECTANGULARIS*  
(ISOPTERA, TERMITIDAE)**

**Fabienne LENOIR-LABE et Corinne ROULAND**

*Laboratoire d'Ecophysiologie des Invertébrés, Université Paris XII-Val de Marne,  
Avenue de Général de Gaulle, 94 010 Créteil Cédex.*

**Résumé :** Compte tenu du peu de connaissances sur le rôle et l'importance des divers symbiontes intestinaux dans le métabolisme cellulolytique du termite, il est apparu intéressant d'effectuer une recherche systématique de souches bactériennes cellulolytiques chez une espèce de termites supérieurs, non encore étudiée à l'heure actuelle, *Cephalotermes rectangularis*. L'étude approfondie de ce nouveau biotope doit nous permettre de trouver de nouvelles souches cellulolytiques, utilisant des voies métaboliques originales susceptibles de conduire à des applications intéressantes en biotechnologie.

Une souche cellulolytique et une souche xylanolytique ont été isolées. Les enzymes produites par ces bactéries et responsables de la dégradation de la cellulose et de la xylane, ont été purifiées, et certaines de leurs propriétés biochimiques déterminées.

**Mots-clés :** *purification, osidase, bactérie, termite.*

**Abstract :** Purification and properties of two osidases produced by bacteria isolated from the gut of *Cephalotermes rectangularis* (Isoptera, Termitidae).

Because of the lack of knowledge about the role and the importance of intestinal microflora in the termite cellulolytic metabolism, it is interesting to research cellulolytic bacteria isolated from the digestive tract of a not yet studied termite species, *Cephalotermes rectangularis*. An extensive research on the gut should allow us to find new cellulolytic strains which use original metabolic ways inducing biotechnological applications.

One cellulolytic and one xylanolytic strains were isolated. The enzymes produced by the bacteria and responsible of the cellulose and xylane degradation were purified. Some of their biochemical properties were determined.

**Key words :** *purification, osidase, bacteria, termite.*

## INTRODUCTION

La biomasse végétale est constituée pour 50% de cellulose, les autres composants majeurs sont les hémicelluloses (20-30%) et la lignine (18-30%) (Thompson 1983). La cellulose est la molécule organique la plus abondamment synthétisée sur Terre, sa production annuelle par la biomasse végétale est estimée à 150.10<sup>6</sup> tonnes (Rosnay 1979).

L'intérêt porté actuellement aux nouvelles sources d'énergie donne à la cellulose un rôle fondamental. En effet, la plus grande partie de la biomasse n'est pas valorisée à l'heure actuelle. Les produits ligno-cellulosiques et la cellulose sont utilisés dans l'industrie chimique. Les celluloses peu lignifiées sont utilisées dans l'alimentation des ruminants. La valorisation de la biomasse utilise des techniques souvent polluantes, grandes consommatrices d'énergie, qui ne permettent d'obtenir que des sous-produits difficiles à commercialiser. Les voies biotechnologiques conduisent aujourd'hui à des produits dont le prix de revient n'est pas compétitif sur le marché.

Il devient donc important de trouver de nouvelles voies enzymatiques utilisant des microorganismes, pour recourir à des techniques de remplacement.

Chez les Isoptères, l'utilisation de la cellulose comme substrat nutritif ne peut se réaliser qu'en faisant appel à des microorganismes. Ainsi, le tube digestif des termites contient une grande abondance de microorganismes symbiotiques dont la diversité est en relation avec l'évolution de ces insectes (Grassé et Noirot, 1959). Chez les termites supérieurs xylophages, peu de travaux ont été effectués. Néanmoins, des bactéries cellulolytiques ont été isolées (Potts et Hewitt, 1973 ; Krelinova et coll., 1977 ; Pasti et Belli, 1985), mais elles n'ont pas fait l'objet de quantifications. Leur rôle est encore à l'heure actuelle controversé. Les données enzymatiques indiquent que l'importance de la microflore dans le phénomène de cellulolyse varie en fonction des espèces et des régimes alimentaires (Rouland et coll., 1986 a).

L'objet de cette étude consiste, après l'isolement de souches bactériennes cellulolytiques et xylanolytiques à partir du tube digestif de *Cephalotermes rectangularis*, termite xylophage, en la purification et la détermination de certaines propriétés des enzymes produites par ces souches.

## MATERIEL ET METHODES

### *Matériel biologique*

L'espèce de termite étudiée, *Cephalotermes rectangularis*, provient de la forêt du Mayombe en République du Congo. Son nid entièrement épigé est construit en carton de bois dur et très noir. Il est caractérisé par la présence de plusieurs cheminées qui assurent la régulation de la température du nid. Cette espèce est xylophage. Elle se nourrit essentiellement de bois à différents niveaux de décomposition.

Les insectes sont ramenés vivants au laboratoire.

### *Isolement des bactéries du tube digestif et cultures bactériennes*

Après dissection stérile des termites, dix intestins prélevés dans leur totalité sont broyés à l'aide d'un potter dans 2 ml de milieu de base et constituent l'inoculum mis dans 10 ml de milieu enrichi (milieu de base + levure et peptone à 0,5 g/l). Le milieu de base est constitué de :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 g -  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2,1 g -  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  1,3 g -  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1,0 g -  $\text{CaCl}_2$  0,15 g -  $\text{FeSO}_4$  (5%) 0,5 ml -  $\text{H}_2\text{O}$   $\Delta$  1000 ml. Après dissolution le pH est ajusté à 7,1.

L'isolement de la souche cellulolytique (Ce2b) a été réalisé en utilisant la technique du roll-tube (Hungate, 1969) avec comme substrat de la cellulose microcristalline sous des conditions d'aérobiose. Après six jours d'incubation à 30°C, des colonies apparaissent en surface. Ces bactéries isolées sont maintenues en culture dans 25 ml de milieu enrichi liquide à 44°C sous une agitation de 150 rpm dans des fioles de 50 ml.

L'isolement de la souche xylanolytique (Ce1b) a été réalisé en gélose semi solide en tube avec du cellobiose comme source de carbone. Dans ces conditions, la croissance des bactéries est de 24 heures à 30°C. Cette souche pure est repiquée en milieu enrichi sous les mêmes conditions que la souche cellulolytique.

### *Mesure des activités enzymatiques*

Les concentrations protéiques sont déterminées par la méthode de Bradford (1976).

Les sucres réducteurs présents dans le milieu ou produits par l'hydrolyse de la carboxyméthylcellulose (CMC) ou de la xylane sont dosés selon la méthode de Somogyi (1945) et Nelson (1944). Les activités enzymatiques sont exprimées en microgramme de sucres réducteurs libérés par milligramme de protéine et par minute.

Tous les dosages sont réalisés en double. Si les résultats obtenus diffèrent de plus de 10% le dosage est de nouveau effectué.

### *Chromatographie*

L'hydroxyapatite est préparée au laboratoire selon la méthode de Tiselius, Hjerten et Levin (1956) modifiée par Levin (1962). Une colonne anionique DEAE Sepharose a été nécessaire pour purifier les enzymes.

Les oligosaccharides libérés par l'hydrolyse enzymatique de la cellulose et de la xylane sont identifiés par chromatographie ascendante sur gel de silice Polygram SIL G (Macherey-Nagel).

### *Electrophorèse sur gel de polyacrylamide*

Elle est réalisée avec des gels à 7,5% (p/v) selon la technique de Maizel (1964). La migration et la coloration des gels se font selon une technique précédemment décrite (Rouland et coll., 1986 b).

L'évaluation des poids moléculaires a été faite selon la méthode d'Hedrick et Smith (1968) en utilisant des gels de polyacrylamide en tube de 5,5 ; 6,5 ; 7,5 ; 8,5 %, les oligomères de la sérum albumine servant de référence.

Des électrophorèses sur gel de polyacrylamide en présence de SDS sont réalisées selon la technique de Weber et Osborn (1969). La migration, la coloration des gels et la comparaison avec des protéines de référence se font selon la technique précédemment citée.

## RESULTATS

### *Purification de la cellulase produite par la souche Ce 2b*

Le milieu de culture de Ce 2b est prélevé stérilement de manière homogène après agitation des flacons de culture, puis il est centrifugé pendant 20min à 15 000 t/min à +4°C. Le surnageant constitue la solution enzymatique. L'extrait brut est obtenu après dialyse et concentration de la solution enzymatique dans des boyaux de naturin, résistants aux cellulases.

Les activités enzymatiques de l'extrait brut sont de 42,3 µg de sucres réducteurs/mn.mg de protéines sur CMC et de 7,73 µg de sucres réducteurs/mn.mg de protéines sur cellulose microcristalline. Aucune activité β-glucosidase n'est détectée.

Avant le dépôt sur la colonne d'hydroxyapatite (HA), l'extrait brut est dialysé une nuit contre le tampon d'équilibration de la colonne soit un tampon phosphate mono et dipotassique 2mM pH=5,3. Après dépôt de 6 ml de l'extrait brut, la colonne est éluée par des molarités croissantes du même tampon (2 mM, 5 mM, 10 mM, 50 mM,...). Toutes les fractions recueillies sont testées sur CMC. Il apparaît alors que la cellulase n'est pas retenue sur cette colonne puisqu'elle est éluée avec le tampon 2mM. Le découpage de gel montre qu'il n'existe qu'une seule bande protéique présentant une activité cellulastique de 244,2 µg de sucres réducteurs/mn.mg de protéines sur CMC. Cette bande migre avec un Rm de 0,86. La cellulase a donc pu être purifiée en une seule colonne avec un rendement de 24,05% (Tableau 1).

Etapes	Volume (ml)	Activité totale ( $\mu\text{g SR/mn.ml}$ )	Protéines (mg)	Activité spécifique ( $\text{mg SR/mn.ml}$ )	Rendement (%)	Purification
Extrait brut	6	50,76	1,2	42,3	100	1
Colonne d'HA	3,6	12,21	0,05	244,2	24,05	5,8

**Tableau 1 : Etapes de purification de la cellulase.**  
*Steps of cellulase purification.*

Purification de la xylanase produite par la souche Ce1b

Le milieu de culture de la souche Ce1b subit les mêmes traitements que celui de la souche cellulolytique.

L'activité xylanolytique de l'extrait brut ainsi obtenu est de 54,23  $\mu\text{g}$  de sucres réducteurs/mn.mg de protéines.

Après dépôt de 6 ml de l'extrait brut, la colonne est éluée par des molarités croissantes du même tampon (2 mM, 5 mM, 10 mM, 50 mM...). Toutes les fractions recueillies sont testées sur la xylane. La xylanase est peu retenue par cette colonne. Elle est éluée avec le tampon 2mM. Le découpage du gel montre qu'il n'existe qu'une seule bande protéique active sur la xylane, cette bande présente un  $R_m$  de 0,90. Les fractions contenant la xylanase n'étant pas pures une deuxième colonne s'est avérée nécessaire.

On utilise une colonne de DEAE Sepharose (DEAE Seph.) équilibrée avec un tampon phosphate mono et dipotassique 2mM de pH=7,0. La xylanase est éluée avec le tampon 2mM. L'activité maximale détectée est de 282,2  $\mu\text{g}$  de sucres réducteurs/mn.mg de protéines et apparaît électrophorétiquement pure. La xylanase a donc été purifiée avec un rendement de 9,8 % (Tableau 2).

Etapes	Volume (ml)	Activité totale ( $\mu\text{g SR/mn.ml}$ )	Protéines (mg)	Activité spécifique ( $\text{mg SR/mn.ml}$ )	Rendement (%)	Purification
Extrait brut	6	65,07	1,2	54,23	100	1
Colonne d'HA	7	23,64	0,09	257,31	36,33	4,7
Colonne DEAE Seph.	3,6	6,35	0,022	282,2	9,8	5,2

**Tableau 2 : Etapes de purification de la xylanase.**  
*Steps of xylanase purification.*

Propriétés de la cellulase purifiée

*Poids moléculaire*

Le poids moléculaire de la cellulase a été déterminé par la méthode d'Hedrick et Smith (1968), les polymères de la SAB servant de référence. La valeur ainsi obtenue est de 67500 Da, plus ou moins 10%.

La cellulase a été soumise à une électrophorèse en présence de SDS selon la technique de Weber et Osborn (1969). Une seule bande a été obtenue, la cellulase est donc une protéine monomérique de  $PM=67000$  Da.

### Spécificité enzymatique

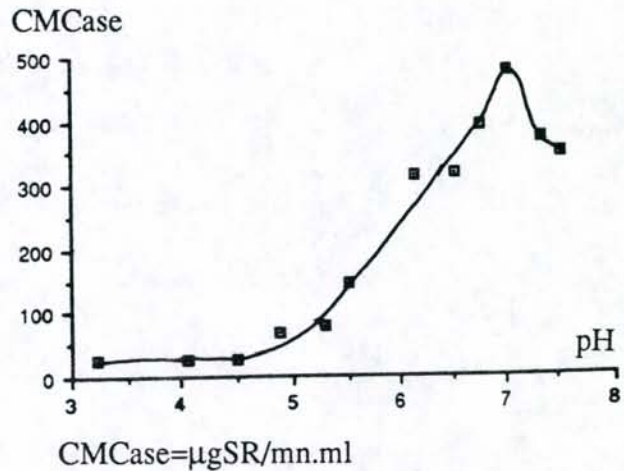
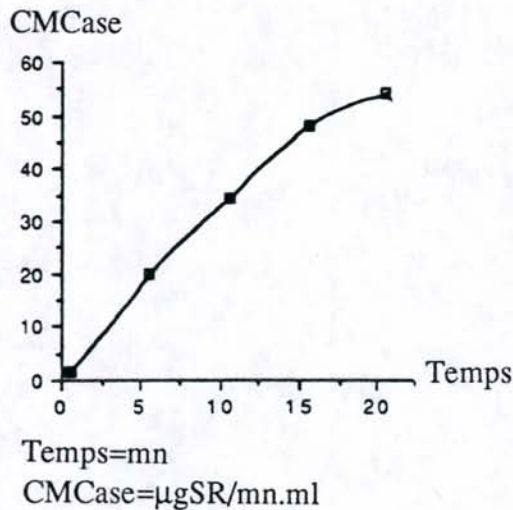
L'enzyme est incubée pendant 24 heures sur 20 mg de cellulose microcristalline. Une chromatographie sur couche mince sur gel de silice est réalisée en déposant 100 gouttes du surnageant. Lors de cette hydrolyse, la cellulase libère des oligosaccharides (cellotriose, cellotétraose, cellopentaose,...), et même du cellobiose. La cellulase est donc une **endocellulase** dégradant la cellulose jusqu'au cellobiose.

### Propriétés cinétiques

La dégradation de la CMC par la cellulase (Fig. 1) est linéaire de 0 à 20 minutes environ. Un temps d'incubation de 20 mn est donc choisi pour les expériences suivantes.

### Effet du pH sur la vitesse d'hydrolyse du substrat

L'effet du pH a été étudié sur l'activité enzymatique (Fig. 2) avec du tampon Mac Ilvaine (1921) dans une gamme s'étendant de 3,14 à 7,45 unités pH, en utilisant comme substrat de la CMC à 1%. L'intensité d'hydrolyse de la CMC reste faible jusqu'à pH=5,5, est très importante dans les pH neutres (6 à 7,5) en atteignant son maximum à pH=6,94.



**Fig 1 :** *Cinétique de la cellulase purifiée*  
*Kinetic of the purified cellulase*

**Fig 2 :** *Effet du pH sur la vitesse d'hydrolyse de la CMC*  
*Effect of pH on rates of CMC hydrolysis*

### Effet de la concentration en substrat

La constante de Michaelis ( $K_m$ ) est calculée d'après la méthode de Lineweaver et Burk (1934). Le poids moléculaire de la CMC n'étant pas calculable, le  $K_m$  est donné en pourcentage et est égal à 0,41%.

### Propriétés de la xylanase purifiée

#### Spécificité enzymatique

Compte tenu de la forte activité xylanasiq, la chromatographie sur couche mince sur gel de silice est réalisée en déposant uniquement 10 gouttes d'une suspension incubée pendant 24 heures sur 20 mg de xylane. La xylanase libère des oligosaccharides jusqu'au dimère du xylose. Il s'agit donc d'une **endoxylanase** dégradant la xylane jusqu'au xylobiose.

#### Propriétés cinétiques

L'hydrolyse de la xylane est stable de 0 à 30 mn (Fig. 3). Pour les expériences suivantes, nous choisissons un temps d'incubation de 20 min.

### Effet du pH sur la vitesse d'hydrolyse du substrat

L'effet du pH a été étudié sur l'activité enzymatique avec du tampon Mac Ilvaine dans une gamme s'étendant de 3,14 à 7,45 unités pH, en utilisant de la xylane à 1% (Fig 4). Le pH optimum de la xylanase est supérieur à 7,45, pH le plus basique qu'il soit possible d'obtenir avec le système de tampon utilisé.

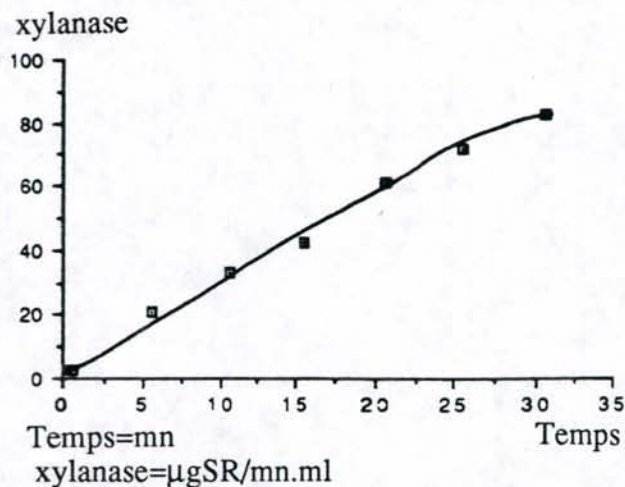


Fig 3 : Cinétique de la xylanase purifiée  
Kinetic of the purified xylanase

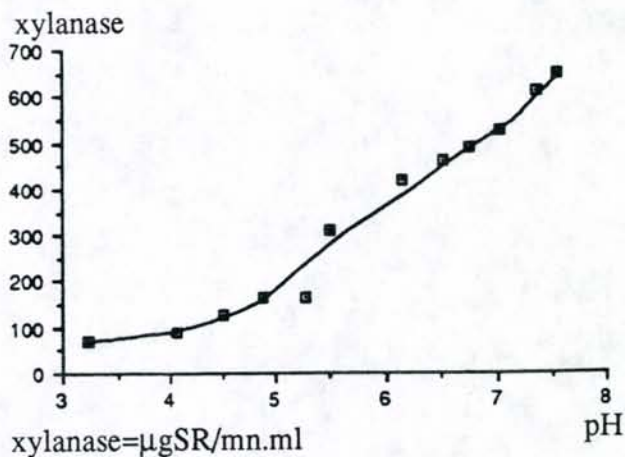


Fig 4 : Effet du pH sur la vitesse d'hydrolyse de la xylane  
Effect of pH on rates of xylane hydrolysis

### Effet de la concentration en substrat

Calculé d'après la méthode de Lineweaver et Burk (1934), le Km de la xylanase donné en pourcentage est de 0,2 %.

## DISCUSSION

La caractérisation de la cellulase produite par Ce2b a pu être faite. Cette enzyme dégrade fortement la CMC avec une activité de 244,2 μg de sucres réducteurs/mn.mg de protéines mais également les celluloses cristallines (activité de 9,23 μg de sucres réducteurs/mn.mg de protéines avec la cellulose microcristalline). La chromatographie sur couche mince indique que les produits de dégradation de la cellulose sont des oligosaccharides et même du cellobiose. Pourtant, produisant relativement peu de cellobiose, pas du tout de glucose et ayant un rapport élevé d'hydrolyse CMC/cellulose microcristalline (=26,5), cette cellulase peut être considérée comme une endocellulase.

Le pH optimum de cette enzyme est de 6,94; pH proche de la neutralité mais souvent rencontré pour les cellulases bactériennes. Groleau et Forsberg (1983) notent que la cellulase extracellulaire produite par *Bacteroides succinogenes* dans le rumen présente un pH optimum de 5,6-6,6. Les endoglucanases produites par *Sporocytophaga mixococcoides* (Goksoyr et Eriksen, 1980) possèdent un pH optimum 5,5-7,5 et 6,5-7,5. Les cellulases d'origine fongique ont des pH optimum plus acides de l'ordre de 3,5 à 5. Les pH optimum des cellulases endogènes produites par les insectes se situent entre 4,2 et 5,8; pour les cellulases produites par *Macrotermes mülleri*, ils sont de 4,2 à 4,5 (Rouland, 1986) et celle de *Trinervitermes trinervoïdes* présente son activité maximale à un pH de 5,8 (Potts et Hewitt, 1974).

Le poids moléculaire de la cellulase purifiée est de 67 500 Dalton. Cette valeur est légèrement supérieure à celles des cellulases bactériennes caractérisées mais reste du même ordre de grandeur (Goksoyr et Eriksen, 1980; Petré et coll., 1981; Groleau et Forsberg, 1983).

Le Km de l'endocellulase est de 0,41% (CMC), ce qui constitue une bonne affinité de l'enzyme pour ce substrat. Afin de mieux caractériser l'affinité de cette enzyme, il faudrait effectuer le Km sur des cellodextrines solubles comme le cellotriose, le cellotétraose, le cellopentaose.

L'activité spécifique de la cellulase sur CMC est de 1,36  $\mu\text{mol}$  de sucres réducteurs/mn.mg de protéines. Il est difficile de comparer cette valeur avec celles données dans la littérature en raison de l'hétérogénéité des unités employées par les auteurs. Néanmoins, l'endocellulase de *Bacteroides succinogenes* (Groleau et Forsberg, 1983) possède une activité spécifique de 3,9  $\mu\text{mol}$  de sucres réducteurs/mn.mg de protéines sur ce même substrat. Waldron et coll. (1986) précisent que l'activité de l'endocellulase produite par *Microbispora bispora* est de 4,3  $\mu\text{mol}$  de sucres réducteurs/mn.ml à partir d'un milieu de culture contenant 1% d'Avicellulose + 0,5% de galactose et de nombreux minéraux. Cette activité atteint 5,6  $\mu\text{mol}$  de sucres réducteurs/mn.ml si la source d'azote est l'urée et 4,62  $\mu\text{mol}$  de sucres réducteurs/mn.ml si l'incubation se déroule à 60°C. Ces données ne tiennent pas compte des protéines, elles dépendent donc de l'inoculum. L'endocellulase extracellulaire de Ce2b présente une activité de 0,05  $\mu\text{mol}$  de sucres réducteurs/mn.ml. Cette valeur semble être faible, mais aucune optimisation de culture n'a été entreprise et le milieu de croissance utilisé est relativement pauvre. Comme le précisent Robson et Chambliss (1984) qui ont comparé l'activité d'une endoglucanase de *Bacillus* avec celle de *Trichoderma reesei*, il semble que les performances cellulolytiques des bactéries soient toujours inférieures à celles de ce champignon utilisé actuellement en biotechnologies.

La purification de la xylanase produite par la souche Ce1b a pu être réalisée. Cette enzyme possède un Km de 0,2%, ce qui représente une très bonne affinité pour la xylane. Les Km obtenus avec diverses xylanases produites par *Bacillus sp.* varient entre 4,5 et 0,95% (Okazaki et coll., 1985). La valeur obtenue avec notre xylanase se rapprocherait de celle produite par le champignon *Trichoderma harzianum* dont le Km est de 0,66% (Tan et coll., 1985).

Le pH optimum d'activité de cette enzyme n'a pu être déterminé avec précision. Toutefois, il semble être supérieur à 7,54. Cette valeur relativement basique se rapproche de celles des xylanases produites par *Bacillus sp.* dont le maximum d'activité se situe entre 6 et 9,5 (Okazaki et coll., 1985).

Deux souches bactériennes ont été isolées à partir du tractus digestif de *Cephalotermes rectangularis*. Elles présentent des profils intéressants et peuvent nous permettre une meilleure compréhension du phénomène de la cellulolyse. Le tractus digestif du termite constitue donc un matériel de choix pour l'étude et la recherche de bactéries cellulolytiques. Des études plus approfondies méritent d'être entreprises sur ce biotope.

## REFERENCES

- BRADFORD M.N. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytic. Chem.*, **72** : 248-254.
- GOKSOYR J.S., ERIKSEN J. 1980. Microbial enzyme and bioconversion. *Economic microbiology*. Ed : Rose A.H., **5** : 283-329.
- GRASSE P.P., NOIROT C. 1959. L'évolution de la symbiose chez les Isoptères. *Experientia*, **10** : 365-372.
- GROLEAU D., FORSBERG C.W. 1983. Partial characterization of the extracellular carboxymethylcellulase activity produced by the rumen bacterium *Bacteroides succinogenes*. *Can. J. Microbiol.* **29** : 504-517.

- HEDRICK J.L., SMITH A. 1968. Size and charge isomer separation of molecular weights of proteins by disk gel electrophoresis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **126** : 155-165.
- HUNGATE R.E. 1969. A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. In : Norris J.R. and Ribbon D.W.(Eds), *Methods in Microbiology*, **3B**, pp 117-132, Academic Press Inc : London, New-York.
- KRELINOVA O., KIRKU V., SKODA J. 1977 . The cellulolytic activity of some intestinal bacteria of termites. *J. Int. Biodeterior. Bull.*, **13** : 81-87.
- LEVIN O. 1962. Protein chromatography on calcium phosphate columns. *Methods Enzymol.*, **5** : 27-32.
- LINEWEAVER H., BURK K. 1934 - The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* **56** : 658-666.
- MAC ILVAINE T.C. 1921. A buffer solution for colorimetric comparison. *J. Biol. Chem.* **49** : 183-188.
- MAIZEL J.V. 1964. Preparative electrophoresis in acrylamide gels. *Ann. N.Y. Acad. Sc.*, **121** : 381-390.
- NELSON N. 1944. Photometric adaptation of Somogyi method for determination of glucose. *J. Biol. Chem.* , **1953** : 373-380.
- OKASAKI W., AKIBA T., HORIKOSHI K., AKAHOSHI R. 1985. Purification and characterization of xylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus sp. Agric. Biol. Chem.* **49**, 7 : 2033-2039.
- PASTI M.B., BELLI M.L. 1985 . Cellulolytic activity of actinomycetes isolated from termite (Termitidae) gut. *FEMS Microbiology Letters.*, **26** : 107-112.
- PETRE J., LONGIN R., MILLET J. 1981 . Purification and properties of an endo  $\beta$ -1,4 glucanase from *Clostridium thermocellum*. *Bioch. J.*, **63** : 629-639.
- POTTS R.C., HEWITT P.H. 1973 . The distribution of intestinal bacteria and cellulase activity in the harvester termite *Trinervitermes trinervoïdes* (Nasutitermitinae). *Insectes sociaux*, **20**, 3 : 215-220.
- POTTS R.C., HEWITT P.H. 1974 . Some properties and reaction characteristic of the partially purified cellulase from the termite *Trinervitermes trinervoïdes*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **47B** : 327-337.
- ROBSON L.M., CHAMBLISS G.H. 1983 . Characterization of the cellulolytic activity of a *Bacillus* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 5 : 1039-1046.
- ROSNAY de J. 1979 . Biotechnologies et bio-industrie. Ed Seuil. 344 p.
- ROULAND C. 1986 . Contribution à l'étude des osidases digestives de plusieurs espèces de termites africains. Thèse Doctorat Etat, Paris XII, 210 p.
- ROULAND C., CHARARAS C., RENOUX J. 1986 a . Etude comparée des osidases de trois espèces de termites africains à régime alimentaire différent. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **302** : 341-345.
- ROULAND C., CIVAS A., RENOUX J., PETEK F. 1986 b . Purification and properties of cellulases from the termite *Macrotermes mülleri* (Termitidae, Macrotermitinae) and its symbiotic fungus *Termitomyces sp.* *Comp. Biochem. Physiol.*, **91B**, n° 3 : 449-458.
- SOMOGYI M. 1945. Determination of blood sugar. *J. Biol. Chem.*, **160** : 61-68.
- TAN L.U.L., WONG K.K.Y., YU E.K.C., SADDLER J.N. 1985 . Purification and characterization of two xylanases from *Trichoderma harzianus*. *Enzyme Microbiol. Technol.* **7** : 425-430.
- THOMPSON N.S. 1983 . Hemicellulose as a biomass resource. *Wood and Agricultural Residues* ( Ed E.J. Soltes) 101-119. Academic Press New York.
- TISELIUS A., HJERTEN S., LEVIN O. 1956 . Protein chromatography on calcium phosphate columns. *Ann. Biochem. Biophys.*, **65** : 132-155.
- WALDRON C.R., BECKER-VALLONE C.A., EVELEIGH D.E. 1986 . Isolation and characterization of a cellulolytic actinomycete *Microbispora bispora*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24** : 477-486.
- WEBER K., OSBORN M. 1969 . The reliability of molecular weight determinations by Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**, 16 : 4406 - 4412.