

Reçu le 31 mai 1958.

RECHERCHES SUR LES CHITINASES

I. — DOSAGE NÉPHÉLOMÉTRIQUE
ET PRODUCTION DE CHITINASE
PAR DES STREPTOMYCÈTES

PAR

Ch. JEUNIAUX (*)

Institut Léon Fredericq, Chimie Physiologique, Université de Liège)

(7 figures)

L'existence de bactéries capables de digérer la chitine est connue depuis 1905. KARRER et ses collaborateurs (1929) décelèrent l'hydrolase spécifique de cette digestion dans le liquide intestinal de l'escargot et la dénommèrent chitinase. La chitinase fut ensuite retrouvée dans des extraits aqueux d'*Aspergillus niger* (GRASSMAN et RUBENBAUER, 1931) et de peaux d'amandes (GRASSMAN, ZECHMEISTER, BENDER et TOTH, 1934). On sait actuellement que de nombreux filtrats de cultures bactériennes sont riches en chitinase (JEUNIAUX, 1950, 1954; MIURA, 1954; REYNOLDS, 1954; CLARKE et TRACEY, 1956) ainsi que le liquide exuvial sécrété par les insectes au moment de la mue (PASSONNEAU et WILLIAMS, 1953; JEUNIAUX et AMANIEU, 1955; JEUNIAUX, 1956). Les sucs digestifs de divers invertébrés en contiennent également, bien qu'elle soit, chez les mollusques au moins, d'origine bactérienne (JEUNIAUX, 1954). Enfin, certains champignons Basidiomycètes, notamment trois espèces de *Lycoperdon*, peuvent en fournir en grande quantité (TRACEY, 1955).

La chitinase peut être séparée des β -glucosidases et des β -galactosidases par chromatographie sur colonne de bauxite (GRASSMAN, ZECHMEISTER, BENDER et TOTH, 1934; ZECHMEISTER, TOTH et BALINT, 1938).

(*) Chargé de Recherches du Fonds National Belge de la Recherche Scientifique.

REYNOLDS (1954) des *Streptomyces* sp. le filtrat de culture pendantment de cel source de chitinas chitinolytique (JEU mycètes sont en el des exochitinasas da organique autre qu en chitinase, ces fil ce qui facilite la procédés mis au p permettent la pro condition prélimin procédé de purific.

I. -

1)

La chitine « nat divers Crustacés Beneke (1905).

2) PRÉPARATION

On obtient une dissolvant la chit en la reprécipitar BUCHERER, 1935). scission partielle 1936).

Pour préparer la de préférence des c Les carapaces sont moyen d'un puissan tant environ 40 g de 50 ml., 640 ml. en maintenant un de la manipulation rique 21 N est fil.

Reçu le 31 mai 1958.

CHITINASES
MÉTRIQUE
CHITINASE
MYCÈTES

ue. Université de Liège)

de digérer la chitine est
collaborateurs (1929)
cette digestion dans le
nommèrent chitinase. La
extraits aqueux d'*Asper-*
ER, 1931) et de peaux
BENDER et TOTH, 1934).
filtrats de cultures bacté-
EUNIAUX, 1950, 1954 ;
E et TRACEY, 1956) ainsi
insectes au moment de
53 ; JEUNIAUX et AMA-
digestifs de divers inver-
n qu'elle soit, chez les
enne (JEUNIAUX, 1954).
mycètes, notamment trois
rnir en grande quantité

s β -glucosidases et des
sur colonne de bauxite
et TOTH, 1934 ; ZECH-

elge de la Recherche Scientifique.

REYNOLDS (1954) a étudié la production d'exochitinase par des *Streptomyces* spp. en cultures submergées, et a concentré le filtrat de culture par ultrafiltration et lyophilisation. Indépendamment de cet auteur, nous avons également choisi, comme source de chitinase, un filtrat de culture de streptomycète chitinolytique (JEUNIAUX, 1951). Certaines souches de streptomycètes sont en effet capables de se développer et d'élaborer des exochitinases dans des milieux dépourvus de toute substance organique autre que la chitine. En regard de leur haute teneur en chitinase, ces filtrats sont relativement pauvres en protéines, ce qui facilite la purification de l'enzyme. D'autre part, les procédés mis au point pour la culture de ces microorganismes permettent la production de grandes quantités de filtrat actif, condition préliminaire indispensable à l'utilisation pratique d'un procédé de purification.

I. — Préparation de la chitine

1) ISOLEMENT DE LA CHITINE

La chitine « native » a été isolée, à partir d'exosquelettes de divers Crustacés décapodes, par le procédé classique de Beneke (1905).

2) PRÉPARATION DES SUSPENSIONS DE CHITINE PULVÉRISÉE

On obtient une suspension de chitine en fines particules en dissolvant la chitine native dans un acide fort et concentré, et en la reprécipitant par dilution (KARRER et HOFMANN, 1929 ; BUCHERER, 1935). La dissolution dans l'acide s'accompagne d'une scission partielle des chaînes moléculaires (CLARK et SMITH, 1936).

Pour préparer la chitine pulvérisée de façon reproductible, on utilise de préférence des carapaces purifiées de crevettes (*Leander serratus* L.). Les carapaces sont broyées mécaniquement dans de l'eau distillée, au moyen d'un puissant mixer, jusqu'à obtention d'une « purée » contenant environ 40 g. de chitine sèche par litre. On ajoute, par portions de 50 ml., 640 ml. d'acide sulfurique glacé, 36 N, à 500 ml. de purée, en maintenant une température inférieure à 10° C (durée minimum de la manipulation : 12 h.). La solution de chitine dans l'acide sulfurique 21 N est filtrée sur laine de verre et précipitée par dilution dans

10 fois son volume d'eau distillée. On lave par décantations et centrifugations jusqu'à ce que le pH de la suspension soit inférieur à 4.

Après stérilisation à l'autoclave, la chitine est conservée en suspension aqueuse à 0° C. On en détermine la concentration par pesée du résidu sec d'une prise d'essai de 5 ml.

3) CARACTÉRISATION DES SUSPENSIONS DE CHITINE

Les suspensions de chitine pulvérisée sont utilisées : a) pour doser la chitinase par la méthode néphélométrique ; b) pour préparer les milieux de culture ; c) comme adsorbant, au cours de la première étape de purification de la chitinase. Les suspensions de chitine pulvérisée ne conviennent pas toutes à ces différents usages ; les critères suivants permettent de trier les suspensions en fonction du but poursuivi (tableau 1).

Stabilité de la suspension : un tube contenant une suspension titrant 0.3 mg. de chitine/ml. est agité et observé dans le faisceau lumineux du néphélomètre de Pulfrich ; on mesure le temps pendant lequel la suspension reste homogène.

Sédimentation : 5 ml. de suspension titrant 5 g./litre sont abandonnés dans une éprouvette calibrée (diamètre : 9 mm.). On mesure la hauteur du culot après 24 h. de sédimentation à +1° C.

Concentration en particules de chitine : la quantité de lumière diffusée par une suspension de chitine pulvérisée est proportionnelle au nombre de particules, pour des concentrations comprises entre 0.01 et 0.4 mg./ml. (fig. 1). La quantité de lumière diffusée est mesurée au moyen du dispositif néphélométrique de Zeiss, adapté au photomètre de Pulfrich (filtre vert L 2). Les résultats sont exprimés en Trouble relatif, en % de la quantité de lumière diffusée par un verre dépoli étalon (trouble absolu : 0.0142).

TABLEAU 1. — *Caractérisation des suspensions de chitine pulvérisée*

Stabilité Persistence du trouble en secondes	Sédimentation	Concentration en particules	Utilisation
	Hauteur culot, en mm.	Trouble relatif en % du trouble étalon	
plus de 60 sec. 10 à 60 sec.	moins de 24 mm.	1,539-2,500	Néphélométrie Adsorption ou Cultures
	24 à 48 mm.	980-1,190	
moins de 10 sec. moins de 10 sec.	24 à 48 mm.	769-980	Cultures à rejeter
	plus de 48 mm.	moins de 769	

4) JUSTIFICATION

La chitine pulvérisée est caractérisée par la longueur de ses chaînes de chitine « natif » (teneur en agents chimiques) et par la chitine pulvérisée de la chitine « natif » (KARRER et HOPMANN, JEANLOZ et FORCENOS, de l'état physique) (CHIELLI, l. c.).

Nous avons vérifié que les suspensions de chitine pulvérisée, capables de maintenir le même pouvoir réducteur (JEANLOZ, 1955). Une chitine pulvérisée de même type, et su... enzymatiques su... d'hydrolyser la c...

I.

1) EXAMEN

On mesure généralement les produits d'hydrolyse, le pouvoir réducteur du tyloglucosamine par rapport à celle d'Elson et...

Par fractionnement des chitinases, ZER... ont mis en évidence un complémentarisme : les hauts polymères hydrolyser les trimes sur la chitine et d'hydrolyser les glucosamine. C'es

4) JUSTIFICATION DE L'EMPLOI DE CHITINE PULVÉRISÉE

La chitine pulvérisée diffère de la chitine « native » par la longueur de ses chaînes moléculaires. BENEKE (1905) a montré que cette chitine partiellement dépolymérisée est « restée de la chitine » (teneur en azote, réactions de coloration, résistance aux agents chimiques). En fait, les réactions chimiques auxquelles la chitine pulvérisée peut donner lieu sont identiques à celles de la chitine « native », mais elles se déroulent plus rapidement (KARRER et HOFMANN, 1929; ZECHMEISTER et TOTH, 1939, *b*; JEANLOZ et FORCHIELLI, 1950). Ces différences semblent résulter de l'état physique des agrégats de chitine (JEANLOZ et FORCHIELLI, *l. c.*).

Nous avons vérifié que les bactéries et les solutions enzymatiques, capables d'hydrolyser la chitine pulvérisée, manifestent le même pouvoir sur des fragments de chitine native (JEUNIAUX, 1955). Une chitinase microbienne élaborée en présence de chitine pulvérisée, concentrée par adsorption sur une chitine du même type, et suivie au cours de la purification par des tests enzymatiques sur chitine pulvérisée, est finalement capable d'hydrolyser la chitine « native ».

II. — Dosage des chitinases

1) EXAMEN CRITIQUE DES MÉTHODES DE DOSAGE

On mesure généralement l'activité des chitinases en dosant les produits d'hydrolyse dans le milieu réactionnel (dosage du pouvoir réducteur des sucres aminés libérés, ou dosage de l'acétylglucosamine par des méthodes colorimétriques dérivées de celle d'Elson et Morgan).

Par fractionnement chromatographique de diverses solutions de chitinases, ZECHMEISTER et ses collaborateurs (1938, 1939) ont mis en évidence l'intervention de deux enzymes à action complémentaire : une α -mucopolysaccharase, capable d'attaquer les hauts polymères d'acétylglucosamine, mais incapable d'hydrolyser les trimères et les dimères, et une β -oligase, inactive sur la chitine et ses dérivés à longue molécule, mais capable d'hydrolyser les dérivés à courte chaîne jusqu'au stade acétylglucosamine. C'est évidemment au premier de ces enzymes qu'il

ve par décantations et centri-
suspension soit inférieur à 4.
tine est conservée en suspen-
la concentration par pesée du

DIMENSIONS DE CHITINE

sées sont utilisées : a) pour
néphélométrique ; b) pour
comme adsorbant, au cours
de la chitinase. Les suspen-
nent pas toutes à ces diffé-
mettent de trier les suspen-
(tableau 1).

e contenant une suspension
et observé dans le faisceau
on mesure le temps pendant

ant 5 g./litre sont abandonnés
9 mm.). On mesure la hauteur
à +1° C.

ne : la quantité de lumière
pulvérisée est proportionnelle
concentrations comprises entre
e lumière diffusée est mesurée
e de Zeiss, adapté au photo-
résultats sont exprimés en
lumière diffusée par un verre

Dimensions de chitine pulvérisée

Concentration particules	Utilisation
Tableau relatif à % du tableau étalon	
539-2,500	Néphélométrie Adsorption ou Cultures
80-1,190	
69-980	Cultures
as de 769	à rejeter

faut réserver le nom de *chitinase* ; celui de *chitobiase* a été proposé pour le second (ZECHMEISTER et TOTH, 1939, a).

Les méthodes consistant à doser les produits d'hydrolyse permettent donc certainement de déceler la présence d'une chitinase, l'action de la chitobiase étant nécessairement consécutive à une première série de dépolymérisations catalysées par la chitinase proprement dite. Mais ces méthodes ne pourraient permettre un dosage quantitatif rigoureux de la chitinase que si la concentration en cet enzyme était toujours inférieure à la concentration en chitobiase. Or, cette condition n'est pas toujours vérifiée, même pour un même type de solution enzymatique, tel que le liquide stomacal de l'escargot (ZECHMEISTER, TOTH et VAJDA, 1939).

Lorsqu'il s'agit de doser quantitativement la chitinase, il est donc préférable de mesurer la disparition du substrat plutôt que l'apparition des produits d'hydrolyse. Les deux méthodes suivantes (JEUNIAUX, 1951) ⁽¹⁾ permettent de doser les chitinases en mesurant la quantité de chitine non hydrolysée après un temps d'incubation déterminé :

a) méthode néphélométrique (voir ci-dessus).

b) dosage de l'azote chitineux par la méthode de Kjeldahl, après lavage de la chitine résiduelle, traitement par NaOH N à 100° C pendant 30 minutes, lavages à l'eau distillée et minéralisation.

2) MÉTHODE NÉPHÉLOMÉTRIQUE

a) Principe.

Le dispositif néphélométrique de Zeiss, adapté au photomètre de Pulfrich, permet de comparer la quantité de lumière diffusée par certaines suspensions troubles à celle transmise par un verre dépoli étalon. Entre certaines limites de concentration, la quantité de lumière diffusée (ou « trouble ») est proportionnelle au nombre de particules en suspension, c'est-à-dire à la concentration, dans le cas de suspensions homogènes de substances inso-

⁽¹⁾ D'autres méthodes ont été proposées, qui consistent à mesurer la solubilisation du substrat par viscosimétrie. Mais les substrats utilisés (chitosane : TRACEY, 1955 ; carboxyméthyl-chitine : HULTIN, 1955) sont chimiquement plus différents de la chitine « native » que la chitine pulvérisée que nous utilisons.

lubles. L'utilisation de la mesure d'activité

b) Matériel.

Pour toutes les mesures effectuées avec un matériel équipé du filtre n° 1, on utilise des tubes parallèles, on utilise des tubes sans défauts, en verre de diamètre des tubes de 10 mm. Le diamètre des tubes est cunéiforme. Les mesures sont faites dans des tubes enzymatiques car le rapport au trou

c) Proportionnalité du trouble.

Dans le cas de la mesure du trouble, le dosage néphélométrique du trouble est u... sous de 0.6 mg. vérifiée en liqui

d) Stabilité des

La valeur de... On évite cette... suspensions et... d'incubation, et

La valeur du... de variation en

3) D

PA.

D

a) Cinétique de

Lorsque la... 0.4 mg./ml., l'... comme une ré... males de pH et... (T₀ étant le tro

lui de *chitobiase* a été pro-
jet TOH, 1939, a).

les produits d'hydrolyse
celer la présence d'une chi-
nécessairement consécutive
isations catalysées par la
s méthodes ne pourraient
poureux de la chitinase que
ait toujours inférieure à la
e condition n'est pas tou-
type de solution enzyma-
e l'escargot (ZECHMEISTER,

ivement la chitinase, il est
ion du substrat plutôt que
e. Les deux méthodes sui-
ent de doser les chitinases
non hydrolysée après un

ci-dessus).

la méthode de Kjeldahl,
traitement par NaOH N à
à l'eau distillée et minéra-

OMÉTRIQUE

eiss, adapté au photomètre
quantité de lumière diffusée
elle transmise par un verre
de concentration, la quan-
e) est proportionnelle au
c'est-à-dire à la concentra-
ogènes de substances inso-

ni consistent à mesurer la solubi-
les substrats utilisés (chitosane :
, 1955) sont chimiquement plus
e pulvérisée que nous utilisons.

lubles. L'utilisation de méthodes néphélométriques pour la
mesure d'activités lytiques a été discutée par WELSCH (1947).

b) Matériel.

Pour toutes les mesures néphélométriques, le photomètre est
équipé du filtre vert L2. Au lieu de cuves de verre à faces
parallèles, on utilise simplement des tubes à essai cylindriques,
sans défauts, en verre Pyrex ou Iena. De petites variations de
diamètre des tubes sont sans importance, car le faisceau lumi-
neux est cunéiforme (diaphragme de Kadisch). Les différentes
mesures sont faites dans les tubes où se déroule la réaction
enzymatique car les variations de trouble sont exprimées par
rapport au trouble initial, mesuré dans le même tube.

c) Proportionnalité entre la concentration en chitine et la mesure du trouble.

Dans le cas des suspensions de chitine pulvérisée utilisées pour
le dosage néphélométrique des chitinases (tableau 1), la mesure
du trouble est une fonction linéaire de la concentration, en des-
sous de 0.6 mg. de chitine/ml. (fig. 1). Cette propriété peut être
vérifiée en liquide incolore comme en liquides colorés.

d) Stabilité des suspensions de chitine.

La valeur de trouble varie légèrement avec la température.
On évite cette source d'erreur en amenant préalablement les
suspensions et les solutions enzymatiques à la température
d'incubation, et en faisant toutes les lectures à cette température.

La valeur du trouble est largement indépendante du pH (pas
de variation entre pH 3 et pH 9) et de la concentration saline.

3) DOSAGE QUANTITATIF DES CHITINASES PAR LA MÉTHODE NÉPHÉLOMÉTRIQUE. DÉFINITION D'UNITÉS ARBITRAIRES

a) Cinétique de la chitinolyse.

Lorsque la concentration en substrat est inférieure à
0.4 mg./ml., l'hydrolyse enzymatique de la chitine progresse
comme une réaction d'ordre 1. En effet, aux conditions opti-
males de pH et de température, le logarithme du rapport T_0/T_t
(T_0 étant le trouble initial et T_t le trouble final) est une fonction

linéaire de la durée d'incubation (t) pendant les premières heures de la réaction (fig. 2). Pour une concentration constante en enzyme c_E , la constante de vitesse de la lyse enzymatique (k) obéit donc à la relation :

$$k \cdot c_E = \frac{1}{t} \log \frac{T_0}{T_t} \quad (1)$$

Cette relation est une variante de l'équation classique caractéristique des réactions d'ordre 1 : la valeur du trouble initial T_0 est en effet proportionnelle à la concentration initiale en substrat, et la valeur du trouble T_t est proportionnelle à la concentration finale en substrat après un temps t d'incubation.

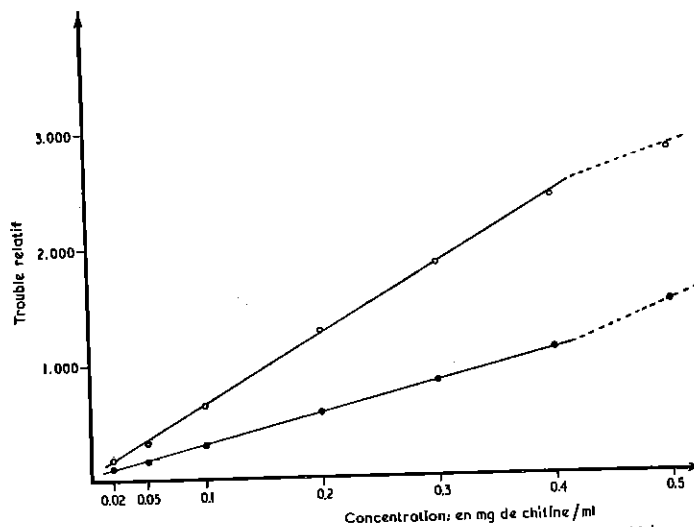


Fig. 1: Proportionnalité entre le trouble relatif et la concentration en chitine de deux suspensions différentes.

Le tableau 2 montre la constance de la valeur k en fonction du temps et du logarithme de T_0/T_t . Ces valeurs expérimentales ont été obtenues à l'aide d'une solution très diluée de chitinase purifiée. On voit que k est bien une constante pendant les deux premières heures d'incubation, lorsque la concentration en enzyme est suffisamment faible pour que la diminution de

trouble n'excède
reste inférieure :

1.250
1.000
0.750
0.500
0.250
0.000

Log. T_0/T_t

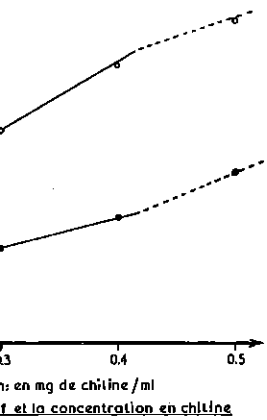
b) Proportionnalité
en enzyme

La figure 3
minée, le log
concentration

ndant les premières heures
concentration constante en
e la lyse enzymatique (k)

$$\frac{T_0}{T_t} \quad (1)$$

'équation classique caracté-
valeur du trouble initial
concentration initiale en
est proportionnelle à la
un temps t d'incubation.



e la valeur k en fonction
es valeurs expérimentales
m très diluée de chitinase
nstante pendant les deux
que la concentration en
r que la diminution de

trouble n'excède pas 75 % (soit tant que la valeur de $\log \frac{T_0}{T_t}$ reste inférieure à 0.6).

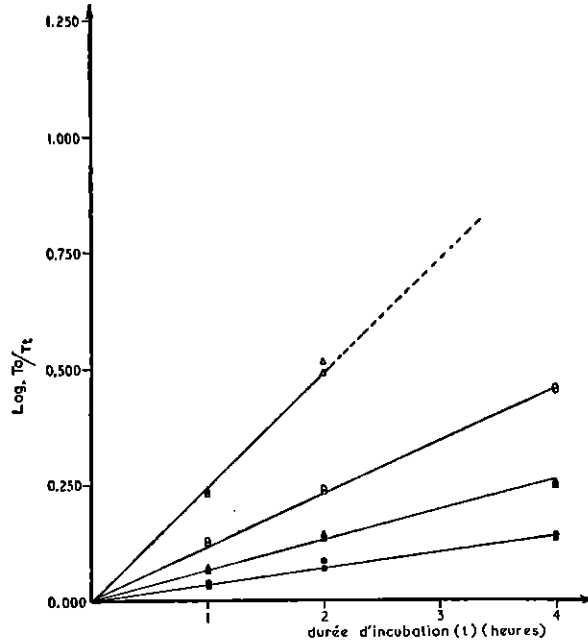


Fig.2 : Cinétique de la chitinolyse pendant les 4 premières heures de la réaction.
1,8 mg de chitine, en présence de filtrat de culture (FB) de Streptomyces A1
Concentration en enzyme [0.5 ml (circles), 1 ml (triangles), 2 ml (squares), 4 ml (diamonds)] dans 6 ml de milieu réactionnel
température: 37°C; pH 5.3

b) Proportionnalité entre la variation de trouble et la concentration en enzyme.

La figure 2 montre que, pour une durée d'incubation déterminée, le logarithme de T_0/T_t est une fonction linéaire de la concentration en enzyme, c'est-à-dire que

$$\log \frac{T_0}{T_t} = k \cdot c_E \cdot t \quad (2)$$

TABLEAU 2. — Vitesse de la chitinolyse de 1.8 mg. de chitine provoquée par 0.005 et 0.01 ml. de chitinase purifiée.

(C _E) : Volume de chitinase dans 6 ml. de milieu réactionnel	Temps (en h.)	T _t	log $\frac{T_0}{T_t}$	k C _E	k (valeur moyenne) (1)
0.005 ml.	0	1828(T ₀)	—	—	$\frac{0.1843}{0.005} = 36.86$
	1/2	1470	0.0947	0.1894	
	1	1190	0.1864	0.1864	
	1.1/2	980.4	0.2705	0.1803	
	2	793.7	0.3623	0.1811	
0.01 ml.	0	1667 (T ₀)	—	—	$\frac{0.3602}{0.01} = 36.02$
	1/2	1111	0.1762	0.3524	
	1	714.3	0.3680	0.3680	

(1) La concentration absolue en enzyme n'étant pas connue, nous donnons à C_E une valeur correspondant au volume (en ml.) de la solution de chitinase purifiée dans 6 ml. de milieu réactionnel.

Cette relation n'est vérifiée que pendant les premières heures de la réaction, et avec des concentrations en enzyme suffisamment faibles pour que la diminution de trouble n'excède pas 75 %, soit pour des valeurs de $\log \frac{T_0}{T_t}$ inférieures à 0.6.

e) Définition d'Unités arbitraires de chitinase.

Nous proposons d'accorder la valeur arbitraire de 10 Unités chitinase (10 U. C.) à la quantité de chitinase présente dans une solution limpide, qui provoque une réduction de 50 % du trouble d'une suspension de chitine pure pulvérisée, contenant 0.3 mg. de chitine par ml., après 2 heures d'incubation à pH 5.3 (tampon acide citrique 0.1 M — Na₂HPO₄ 0.2 M), à 37.5° C, en tubes bouchés (volume total du milieu réactionnel : 6 ml.) (1) (2).

(1) Pendant l'incubation, une agitation mécanique continue ne favorise pas la réaction. On se contente de remettre la chitine en suspension en retournant simplement chaque tube toutes les 20 minutes.

(2) Les mesures néphélométriques peuvent être effectuées avec une précision de plus ou moins 2 %.

La chitine utilisée carapaces de crustacés BENEKE, solubilisée, précipitée et suscitée qu'une suspension stable dans un tube de verre

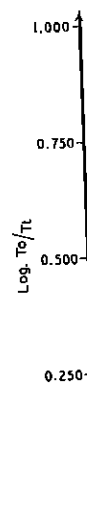


Fig. 3 : Cinétique de la chitinolyse (1.8 mg de chitine par volume de milieu réactionnel)

trouble relatif Pulfrich, filtre cunéiforme par dépôt étalon

Une chitinase ration déterminée d'une autre manière d'être énoncée

se de 1.8 mg. de chitine
le chitinase purifiée.

$\frac{0}{t}$	$k C_E$	k (valeur moyenne) (¹)
7	0.1894	$\frac{0.1843}{0.005} = 36.86$
4	0.1864	
5	0.1803	
3	0.1811	
2	0.3524	$\frac{0.3602}{0.01} = 36.02$
0	0.3680	

ant pas connue, nous donnons
(ml.) de la solution de chitinase

dant les premières heures
ions en enzyme suffisam-
de trouble n'excede pas

0 inférieures à 0.6.

ilinase.

r arbitraire de 10 Unités
itinase présente dans une
réduction de 50 % du
ure pulvérisée, contenant
res d'incubation à pH 5.3
PO₄ 0.2 M), à 37.5° C, en
réactionnel : 6 ml.) (¹) (²).

que continue ne favorise pas la
n suspension en retournant sim-

e effectuées avec une précision

La chitine utilisée comme substrat est préparée à partir de carapaces de crustacés, purifiée deux fois par la méthode de BENEKE, solubilisée à 0° C dans H₂SO₄ (conc. finale : 21 N), reprécipitée et suspendue dans de l'eau bidistillée, de telle sorte qu'une suspension titrant 0.3 mg./ml. présente un trouble uniforme, stable pendant 60 secondes minimum, et donnant, dans un tube de verre Iena de 13 mm. de diamètre, une valeur de

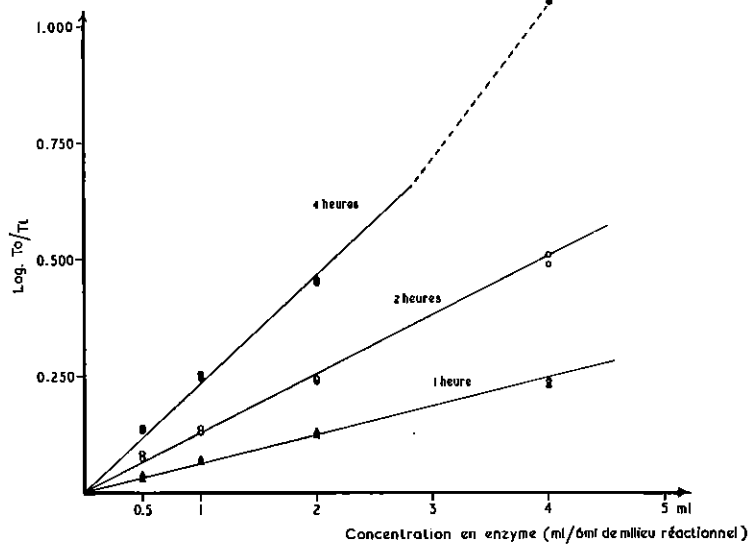


Fig. 7 : Cinétique de la chitinolyse, en fonction de la concentration en enzyme

1.8mg de chitine, en présence de filtrat de culture (FB) de Streptomyces A1
(volume final: 6ml)
température 37°C; pH 5.3

trouble relatif comprise entre 1500 et 2500 (Néphélomètre de Pulfrich, filtre vert L 2, faisceau lumineux incident rendu cunéiforme par utilisation d'un diaphragme de Kadisch, verre dépoli étalon n° 4 de trouble absolu = 0.0142).

Une chitinase titrant 10 Unités/ml. en présence d'une préparation déterminée de chitine a la même activité en présence d'une autre préparation, répondant aux critères qui viennent d'être énoncés.

d) *Calcul de la teneur en Unités-chitinase d'une solution enzymatique.*

D'après l'équation (2) dans laquelle t est une constante (2 heures), on peut calculer la valeur de k correspondant à une solution titrant 10 Unités-chitinase :

$$k = \frac{1}{10} \log \frac{100}{50} = \frac{0.3}{10} \quad (3)$$

Pour déterminer la concentration en chitinase d'une solution, on détermine, dans les conditions précisées dans la définition de l'Unité-chitinase, la valeur du trouble initial (T_0) et la valeur du trouble après 2 heures d'incubation (T_2). En vertu des équations (2) et (3), on obtient :

$$c_x = \frac{10}{0.3} \log \frac{T_0}{T_2}$$

où c_x représente le nombre d'Unités-chitinase contenues dans le milieu réactionnel.

III. — Production d'exochitinase par des Streptomycètes cultivés en milieux liquides

1) COMPOSITION DU MILIEU DE BASE

La composition minérale est celle du milieu classique de Czapek, sans nitrate, soit pour 1 litre de solution : KCl 0.5 g. ; K_2HPO_4 : 1g. ; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$: 0.5 g. ; $FeSO_4$: 0.01 g.

A ce milieu de base, on ajoute la chitine pulvérisée, et les autres substances éventuelles. Le milieu est ajusté au pH désiré (généralement 7) par addition de NaOH 0.1 N. Il est ensuite réparti dans les récipients *ad hoc* et stérilisé à l'autoclave. Les milieux de culture sont ensemencés soit au moyen de spores provenant d'une culture sur gélose-chitine âgée de 5 à 15 jours, soit au moyen d'une culture submergée, en milieu liquide à base de chitine, âgée de 48 h.

2) INFLUENCE DE LA VITESSE D'AGITATION SUR LA TENEUR EN EXOCHITINASE ET

a) Cultures stationnaires

Le milieu chitineux, pour 1 litre, est réparti en 100 ml. Après stérilisation à 121°C pendant 15 minutes, les cultures sont placées à l'étuve ; le mouvement de rotation est maintenu.

Le développement de l'exochitinase et la chitine sont plus élevés que dans la culture agitée qu'on obtient par le brassage continu. Ceci est probablement dû à une meilleure contact entre l'enzyme et le substrat.

b) Vitesse d'agitation

Si le milieu est agité, la production d'exochitinase est plus élevée lorsqu'elle varie de 100 à 200 tours par minute. Sensiblement le même résultat est obtenu dans des conditions particulières de culture. La production d'exochitinase est d'autant plus élevée que la vitesse d'agitation est plus élevée.

Le développement de l'exochitinase est plus élevé à 20°C. Lorsque la température est plus élevée, la teneur en exochitinase est plus élevée.

3) INFLUENCE DES SELS MINÉRAUX

a) Sels minéraux

Les milieux contenant des sels minéraux sont favorables à la production d'exochitinase. Les sels minéraux que $MgSO_4$ et K_2HPO_4 ont un effet sans effet sur la production d'exochitinase.

2) INFLUENCE DE FACTEURS PHYSIQUES
SUR LE DÉROULEMENT DES CULTURES
ET LA PRODUCTION DE CHITINASE

a) *Cultures stationnaires ou agitées.*

Le milieu chitine standard contenant 3 g. de chitine par litre, est réparti en boîtes de Roux ou en flacons Erlenmeyer. Après stérilisation et inoculation, les boîtes de Roux sont couchées à l'étuve ; les erlenmeyers sont placés sur agitateurs (mouvement de rotation circulaire, 120 rotations par min.).

Le développement du mycélium microbien et la digestion de la chitine sont plus rapides dans les cultures agitées. La teneur maximum en exochitinase est environ 10 fois plus élevée en culture agitée qu'en culture stationnaire. Les meilleurs résultats obtenus par le brassage des cultures sur agitateur sont vraisemblablement dus à une croissance plus rapide du mycélium grâce à une meilleure oxygénation du milieu, et à un contact accru entre l'enzyme élaboré et la chitine.

b) *Vitesse d'agitation et température.*

Si le milieu est suffisamment fluide, la vitesse d'agitation, lorsqu'elle varie entre 120 et 180 tours/min., ne modifie pas sensiblement le rendement des cultures. Avec certaines suspensions particulièrement visqueuses de chitine pulvérisée, la production d'exochitinase n'est satisfaisante que si la vitesse d'agitation est de 180 tours/min.

Le développement des cultures est plus rapide à 25° qu'à 20° C. Lorsque la température d'incubation dépasse 28° C, la teneur en exochitinase des filtrats est moins élevée.

3) INFLUENCE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE
DES MILIEUX DE CULTURE

a) *Sels minéraux.*

Les milieux contenant du KCl et du FeSO₄ sont plus favorables à la production d'exochitinase que ceux qui ne contiennent que MgSO₄ et K₂HPO₄. La présence de NaNO₃ (2 g./l.) est sans effet sur la quantité d'enzyme élaborée.

b) Glucose.

L'addition de glucose (0.5 %) au milieu de culture contenant 2 g. de chitine par litre retarde le moment d'apparition de la chitinase, en réduit sensiblement le titre maximum, et accélère la destruction subséquente de l'enzyme (fig. 4).

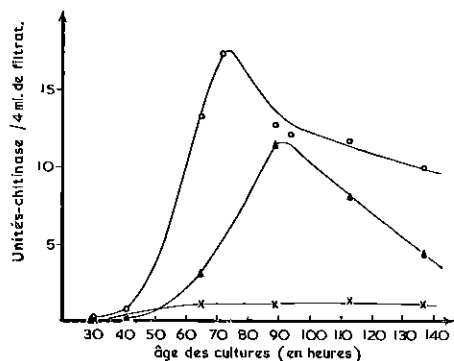


Fig. 4: Teneur en exochitinase des filtrats de culture de *Streptomyces* sp. souche A 1.

○—○ milieu de Czapek, + 2gr. de chitine/litre.
 ▲—▲ milieu de Czapek, + 2gr. de chitine/litre, + glucose 0.5 %
 x—x milieu de Czapek, sans chitine, + glucose 0.5 %
 + asparagine 0.5 %

c) Cultures en milieux sans chitine.

Si l'on remplace la chitine par d'autres substances organiques capables d'assurer le développement du mycélium, par exemple par du glucose et de l'asparagine, on constate que des filtrats de cultures âgées de plus de 60 h. modifient très légèrement le trouble des suspensions de chitine (fig. 4). Nous avons vérifié ce fait au cours de l'expérience suivante.

Quatre streptomycètes chitinolytiques (souches A 1, 9, 71 et *S. albus* souche G) sont repiqués de 3 en 3 jours sur bouillon gélosé. A partir de la 4^e subculture, on ensemence 250 ml. du milieu suivant : sels de la solution de Czapek, glucose 0.5 %, asparagine 0.5 %, de pH 7.15. Incubation à 29° C, sur agitateur, à 120 tours/min. On prélève aseptiquement 10 ml. de chaque culture après 50 et 72 h. d'incubation. Après centrifugation, on dose la chitinase par la méthode néphélométrique, et par dosage de l'azote chitineux (tableau 3).

Souche	Filtrat
Témoin I (milieu non ensemencé)	
9	chauffé actif actif
71	chauffé actif actif
A 1	chauffé actif actif
<i>albus</i> G	chauffé actif actif

(*) Les signes + et — indiquent la présence ou l'absence de trouble par néphélogéométrie.
 (†) Soit environ 2 mg.

On constate que le trouble des suspensions de chitine augmente avec l'âge des cultures et diminue avec l'augmentation de la solubilité de la chitine. Les dosages d'azote chitineux du bouillon dépourvu de chitine par les mycéliotes étudiées sont dans des milieux

TABLEAU 3. — *Elaboration d'exochitinase dans les milieux sans chitine*

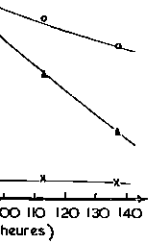
Souche	Filtrat	Age de la culture	Variation du trouble en % du trouble initial (1)		Azote chitineux restant après 72 h. d'incubation en µg.
			Durée d'incubation :		
			20 h.	72 h.	
Témoin I (milieu non ensemencé)		50 h. 72 h.	- 3.5 % + 2 %	- 2.5 % + 2.5 %	132.5 (2)
9	chauffé	(50 h.)	+ 6 %	0 %	132.6
	actif	50 h.	- 17 %	- 26 %	115.8
	actif	72 h.	- 13 %	- 28 %	106
71	chauffé	(50 h.)	+ 2 %	- 2.5 %	148
	actif	50 h.	- 24 %	- 37 %	100.5
	actif	72 h.	- 23 %	- 38 %	109
A 1	chauffé	(50 h.)	+ 5 %	+ 6 %	128
	actif	50 h.	- 20 %	- 32 %	106
	actif	72 h.	- 17.5 %	- 27 %	112
<i>albus G</i>	chauffé	(50 h.)	0 %	- 5 %	151
	actif	50 h.	- 14 %	- 20.5 %	122.6
	actif	72 h.	- 13 %	- 30 %	114.3

(1) Les signes + et - indiquent respectivement une augmentation ou une diminution de trouble par rapport au trouble au temps 0 h.

(2) Soit environ 2 mg. de chitine.

On constate que, en présence des filtrats de culture, les variations de trouble des suspensions de chitine sont importantes, augmentent avec la durée d'incubation, et correspondent réellement à une solubilisation de la chitine, comme en témoignent les dosages d'azote chitineux. Après 4 repiquages successifs en bouillon dépourvu de chitine, les quatre souches de streptomycètes étudiées sont donc capables d'élaborer une exochitinase dans des milieux ne contenant pas de chitine. Mais la teneur

milieu de culture contenant
moment d'apparition de la
titre maximum, et accélère
me (fig. 4).



Culture de *Streptomyces*

chitine/litre,
chitine/litre, + glucose 0.5 %
glucose 0.5 %
+ asparagine 0.5 %

autres substances organiques
du mycélium, par exemple
on constate que des filtrats
modifient très légèrement le
fig. 4). Nous avons vérifié
ante.

ques (souches A 1, 9, 71
3 en 3 jours sur bouillon
on ensemence 250 ml. du
de Czapek, glucose 0.5 %,
tion à 29° C, sur agitateur,
ement 10 ml. de chaque
. Après centrifugation, on
élimétrique, et par dosage

en enzyme est très faible et n'augmente guère au cours du développement de la culture.

e) *Concentration en chitine des milieux de culture.*

Différentes souches de streptomycètes ont été cultivées dans des milieux contenant des quantités variables de chitine pulvérisée. Nous avons suivi la production d'exochitinase en cultures agitées (120 tours/min.) à 28° C, au cours de 140 h. d'incubation (fig. 5).

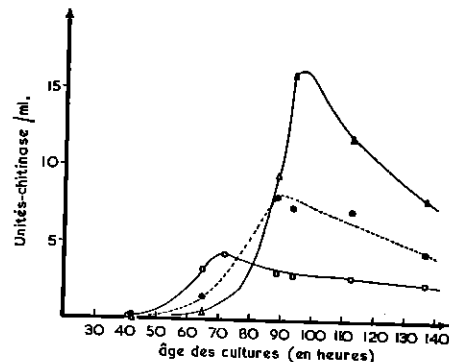


Fig. 5: Teneur en exochitinase des filtrats de culture de *Streptomyces* sp. souche A1.

Concentration en chitine des milieux :

- 2 gr./l.
- 5 gr./l.
- ▲—▲ 10 gr./l.

L'augmentation de la teneur en chitine retarde le moment d'apparition de l'exochitinase dans le filtrat, mais entraîne une augmentation presque proportionnelle de la teneur maximum en chitinase. Il n'est pas avantageux d'augmenter la concentration en chitine au-delà de 10 g./l. Dans les milieux contenant 20 g./l., l'apparition de l'exochitinase est fortement retardée, et le rendement en enzyme est moins bon (fig. 6).

f) *Mécanisme de l'apparition de chitinase dans les filtrats de culture.*

L'apparition de chitinase dans la phase liquide des milieux de culture n'est pas progressive (fig. 4, 5 et 6). La teneur en chitinase du filtrat est faible ou nulle pendant une première période d'assez longue durée, au cours de laquelle le mycélium

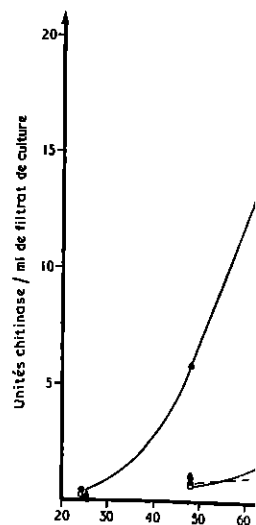


Fig. 6 : Production d'exochitinase.

Teneur en chitine
○—○
●—●
Teneur en chitine
▲—▲

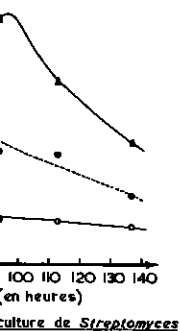
se développe abondamment pendant une période de courte durée, la teneur en chitinase augmente rapidement et atteint son maximum. La teneur en chitine du milieu est le stade de concentration de chitine chitinolytique du filtrat. Ces observations ont été faites avec plusieurs souches de *Streptomyces*.

Nous expliquons ce phénomène par le fait que, de son élaboration par le mycélium sur son substrat, la chitinase est capable d'adsorber de la chitine de la phase liquide restante. La teneur en chitine de la phase liquide restante est pratiquement nulle. Une production rapide s'ensuit, qui libère

ente guère au cours du déve-

ux de culture.

ètes ont été cultivées dans
variables de chitine pulvé-
d'exochitinase en cultures
ours de 140 h. d'incubation



ux:

chitine retarde le moment
de filtrat, mais entraîne une
de la teneur maximum
d'augmenter la concen-
Dans les milieux contenant
se est fortement retardée,
ns bon (fig. 6).

linase dans les filtrats de

phase liquide des milieux
(4, 5 et 6). La teneur en
pendant une première
de laquelle le mycélium

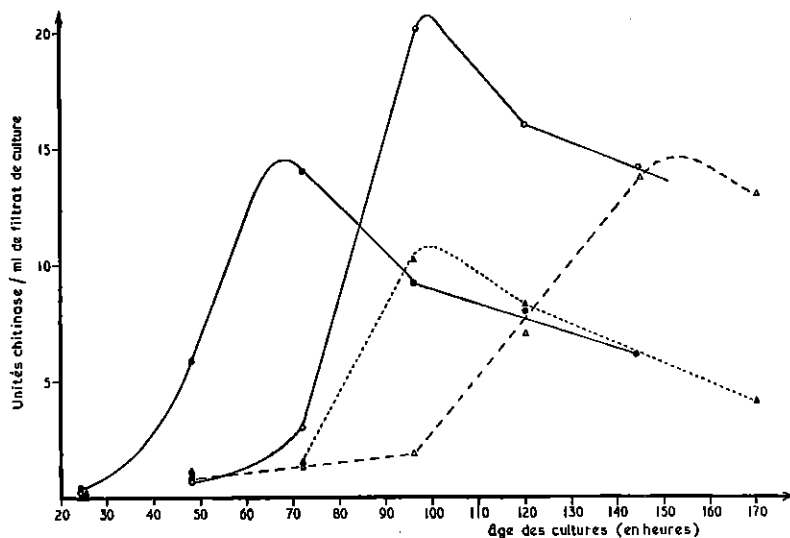


Fig. 6 : Production d'exochitinase par différents Streptomycètes, en cultures agitées.

Teneur en chitine : 10g/l :

○—○ Streptomyces sp., souche A1

●—● Streptomyces sp., souche 71

▲—▲ Streptomyces albus, souche G

Teneur en chitine : 20g/l :

△—△ Streptomyces sp., souche A1

se développe abondamment. Au cours d'une seconde période, de courte durée, la teneur en enzyme du filtrat augmente considérablement et atteint une valeur maximum, pendant que toute la chitine du milieu est rapidement solubilisée. Aussitôt après le stade de concentration maximum en enzyme, l'activité chitinolytique du filtrat diminue progressivement. Les mêmes observations ont été faites par REYNOLDS (1954) avec d'autres souches de *Streptomyces* spp.

Nous expliquons ce phénomène comme suit. Au fur et à mesure de son élaboration par le mycélium, la chitinase est adsorbée sur son substrat, la chitine. Tant que la chitine du milieu est capable d'adsorber de la chitinase, la concentration en enzyme de la phase liquide reste faible. Il vient un moment où toute la chitine est pratiquement saturée en chitinase ; une digestion rapide s'ensuit, qui libère l'enzyme dans la phase liquide.

A l'appui de cette interprétation, nous présentons les arguments suivants :

1) Si on augmente la concentration en chitine du milieu, le moment d'apparition de l'enzyme dans le filtrat est retardé, mais sa concentration finale est plus élevée (fig. 5).

2) A une culture agitée venant d'atteindre sa concentration maximum en chitinase libre, culture qui contenait au départ 0.5 g. de chitine pulvérisée, on incorpore de nouveau 0.5 g. de chitine pulvérisée en suspension stérile (fig. 7). Après un brassage

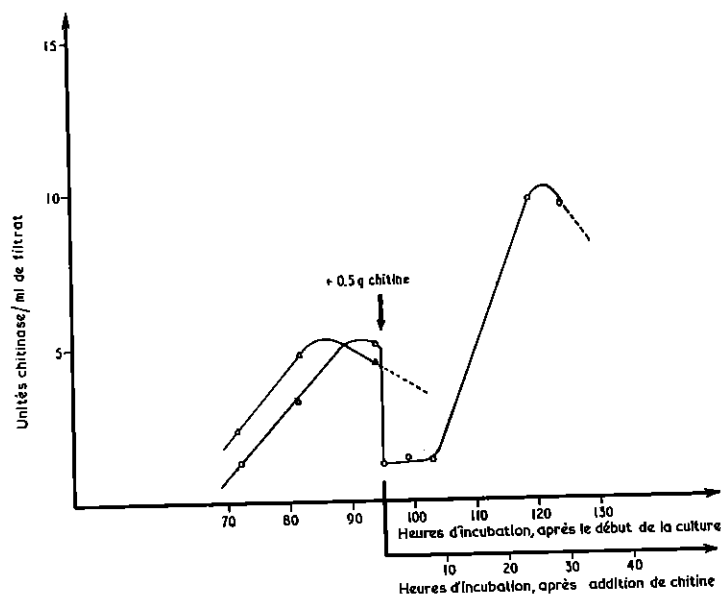


Fig. 7 Adsorption de la chitinase sur la chitine du milieu.

0.5 g de chitine par culture; organisme: *Streptomyces* sp., souche A1, en culture agitée à 27°C.

— : culture témoin.

— : culture à laquelle on ajoute 0.5 g de chitine après 94 h. d'incubation.

de 10 min., l'activité du filtrat a considérablement diminué. On laisse se poursuivre l'incubation sur agitateur. Après 10 h. environ, la teneur en chitinase du filtrat augmente de nouveau, pour atteindre rapidement une valeur presque deux fois plus élevée que la valeur maximum initiale.

3) Nous avons observé dans ces milieux, au cours de l'incubation. La teneur en chitinase du filtrat pendant les premières heures est chitinolytique du fait de la présence de chitinase.

Quant à la diminution de la teneur en chitinase du filtrat, après le début d'une destruction de la chitine par les protéases. Les filtrats sont chitinolytiques; d'autre part, à 37° C, en présence de chitine, la chitinolytique ne

4) CHOIX DE MILIEUX POUR LA CULTURE

Dix souches de *Streptomyces* ont été sélectionnées en vertu de leur activité chitinolytique. Nous avons cultivées ces souches dans des milieux favorables que nous avons trouvés pour l'exochitinase (1).

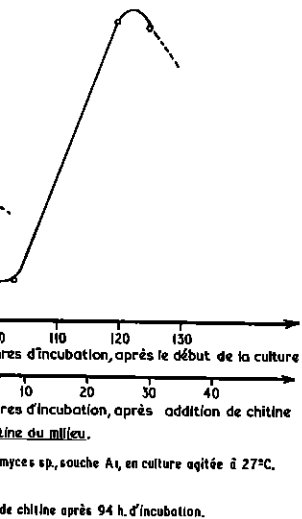
Le *Streptomyces* s'est révélé le plus actif sur la chitine, cette souche qui n'est gênée par la purification, et qui donne un bon déroulement

1. L'hydrolyse de la chitine est le résultat d'une action enzymatique différente de celle qui permet la chitine. L'hydrolyse de la chitine est que l'apparition de la chitine est chitinolytique, se fait par la mesure, au moment du trouble de la culture, du trouble de la culture au cours de la culture. L'hydrolyse est défini.

, nous présentons les argu-

on en chitine du milieu, le
ns le filtrat est retardé, mais
vée (fig. 5).

l'atteindre sa concentration
re qui contenait au départ
pore de nouveau 0.5 g. de
le (fig. 7). Après un brassage



considérablement diminué.
sur agitateur. Après 10 h.
filtrat augmente de nouveau,
leur presque deux fois plus
siale.

3) Nous avons dosé la chitinase adsorbée sur la chitine des milieux, au cours du développement de cultures stationnaires. La teneur en chitinase adsorbée augmente régulièrement pendant les premiers jours d'incubation, alors que l'activité chitinolytique du filtrat reste très faible.

Quant à la diminution progressive de la teneur en chitinase du filtrat, après le stade de concentration maximum, elle résulte d'une destruction de l'enzyme, probablement sous l'effet des protéases. Les filtrats de cultures sont en effet nettement caséinolytiques; d'autre part, si on abandonne un filtrat de culture à 37° C, en présence de thymol comme antiseptique, l'activité chitinolytique ne tarde pas à diminuer.

4) CHOIX D'UNE SOUCHE DE STREPTOMYCES POUR LA PRODUCTION DE CHITINASE

Dix souches de *Streptomyces* spp. ont été sélectionnées en vertu de leur activité élevée sur gélose à la chitine. Nous les avons cultivées en milieu-chitine, dans les conditions les plus favorables que nous venons de définir, en vue de la production d'exochitinase (fig. 6).

Le *Streptomyces* spp. souche A 1, isolé d'un sol de jardin, s'est révélé le plus actif. Cultivée en milieu liquide à base de chitine, cette souche libère un pigment soluble jaune verdâtre, qui n'est gênant ni pour les dosages de chitinase, ni pour la purification, et dont l'intensité constitue un indice commode du bon déroulement des cultures.

IV. — Résumé

1. L'hydrolyse enzymatique de la chitine étant probablement le résultat d'une succession de réactions catalysées par des enzymes différents, il est préférable, pour doser quantitativement la chitinase, de mesurer la disparition du substrat plutôt que l'apparition des produits d'hydrolyse. Une méthode néphélométrique, sensible et rapide, est proposée. Elle consiste à mesurer, au moyen du néphélomètre de Pulfrich, la diminution du trouble de certaines suspensions de chitine pure pulvérisée au cours de la lyse enzymatique. Un système d'Unités arbitraires est défini.

2. Plusieurs souches de *Streptomyces* spp. isolées du sol ont été cultivées dans des milieux liquides. L'exochitinase qu'elles élaborent est de nature constitutive. Elle peut être synthétisée en l'absence de chitine, mais cette substance favorise considérablement l'élaboration et l'accumulation de la chitinase dans le milieu.

3. Dans les milieux de culture à base de chitine, l'exochitinase produite par le mycélium bactérien est adsorbée sur la chitine au fur et à mesure de son élaboration, et n'est libérée dans la phase liquide qu'au moment où toute la chitine est digérée. La chitinase est ensuite progressivement détruite, car elle est instable, en l'absence de son substrat, en présence des enzymes protéolytiques bactériens.

4. La quantité de chitinase obtenue en cultures agitées est environ 10 fois supérieure à celle obtenue en cultures stationnaires.

5. Tant que la viscosité du milieu reste compatible avec les conditions de brassage et d'oxygénation exigées pour un bon développement de la culture, l'augmentation de la concentration en chitine favorise la production de chitinase.

6. Le *Streptomyces* spp. souche A 1 est le plus favorable pour la production de chitinase.

BIBLIOGRAPHIE

- BENEKE, W. (1905). — *Botan. Zeit.*, **63**, 227.
 BUCHERER, H. (1935). — *Zbl. f. Bakt.*, **93**, 12.
 CLARCK, G. L. et SMITH, A. F. (1936). — *J. Physical Chem.*, **40**, 863.
 CLARKE, P. H. et TRACEY, M. V. (1956). — *J. Gen. Microbiol.*, **14**, 188.
 GRASSMAN, W. et RUBENBAUER, H. (1931). — *Munch. Med. Wschr.*, **78**, 1817.
 GRASSMAN, W., ZECHMEISTER, L., BENDER, R. et TOTH, G. (1934). — *Ber. Deutsch. Chem. Gesell.*, **B**, **67**, 1.
 HULTIN, E. (1955). — *Acta Chem. Scand.*, **9**, 192.
 JEANLOZ, R. et FORCHIELLI, E. (1950). — *Helv. Chim. Acta*, **33**, 1690.
 JEUNIAUX, C. (1950). — *Arch. internat. Physiol.*, **58**, 350.
 JEUNIAUX, C. (1951). — *Arch. internat. Physiol.*, **59**, 242.
 JEUNIAUX, C. (1954). — *Mém. Classe Sciences Acad. Roy. Belg.*, **28**, fasc. 7.
 JEUNIAUX, C. (1955). — *Bull. Soc. Roy. Sc. Liège*, **24**, 254.
 JEUNIAUX, C. (1956). — *Mém. Soc. Roy. Entom. Belg.*, **27**, 312.
 JEUNIAUX, C. et AMANIEU, M. (1955). — *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, **63**, 94.
 KARRER, P. et HOFMANN, A. (1929). — *Helv. Chim. Acta*, **12**, 616.

KARRER, P. et von FRANZ
 MIURA, O. (1954). — *To*
 PASSONNEAU, J. V. et W
 REYNOLDS, D. M. (1954)
 TRACEY, M. V. (1955). —
 WELSCH, M. (1947). —
 ZECHMEISTER, L. et TOT
 ZECHMEISTER, L. et TOT
 212.
 ZECHMEISTER, L., TOTH,
 ZECHMEISTER, L., TOTH,

- KARRER, P. et von FRANÇOIS, G. (1929). — *Helv. Chim. Acta*, **12**, 986.
 MIURA, O. (1954). — *Tohoku J. Exp. Med.*, **59**, 403.
 PASSONNEAU, J. V. et WILLIAMS, C. M. (1953). — *J. Exp. Biol.*, **30**, 545.
 REYNOLDS, D. M. (1954). — *J. Gen. Microbiol.*, **11**, 150.
 TRACEY, M. V. (1955). — *Biochem. J.*, **61**, 579.
 WELSCH, M. (1947). — *Rev. Belge Pathol. Med. Experim.*, **13**, suppl. 2.
 ZECHMEISTER, L. et TOTH, G. (1939, a). — *Enzymologia*, **7**, 165.
 ZECHMEISTER, L. et TOTH, G. (1939, b). — *Fortschr. Chem. Organ. Naturstoffe*, **2**, 212.
 ZECHMEISTER, L., TOTH, G. et BALINT, M. (1938). — *Enzymologia*, **5**, 302.
 ZECHMEISTER, L., TOTH, G. et VAJDA, E. (1939). — *Enzymologia*, **7**, 170.

es spp. isolées du sol ont
 es. L'exochitinase qu'elles
 Elle peut être synthétisée
 substance favorise considé-
 ration de la chitinase dans

ase de chitine, l'exochiti-
 érien est adsorbée sur la
 laboration, et n'est libérée
 t où toute la chitine est
 ressivement détruite, car
 substrat, en présence des

ae en cultures agitées est
 le obtenue en cultures

reste compatible avec les
 ion exigées pour un bon
 tation de la concentration
 chitinase.

est le plus favorable pour

E

- Physical Chem.*, **40**, 863.
Gen. Microbiol., **14**, 188.
Münch. Med. Wschr., **76**, 1817.
 TOTH, G. (1934). — *Ber. Deutsch.*
 , 192.
Chim. Acta, **33**, 1690.
L., **53**, 350.
L., **59**, 242.
Acad. Roy. Belg., **23**, fasc. 7.
ège, **24**, 254.
n. Belg., **27**, 312.
internal. Physiol. Bioch., **63**, 94.
Chim. Acta, **12**, 616.