

Reçu le 25 juin 1959.

RECHERCHES SUR LES CHITINASES
II. — PURIFICATION DE LA CHITINASE
D'UN STREPTOMYCÈTE,
ET SÉPARATION ÉLECTROPHORÉTIQUE
DE PRINCIPES CHITINOLYTIQUES DISTINCTS

PAR

Ch. JEUNIAUX

(Institut Léon Fredericq, Biochimie, Université de Liège, et
Centre National de Production et d'Etude de Substances d'origine microbienne
(C. P. E. M.))

(6 figures)

Les conditions de culture permettant d'obtenir des solutions enzymatiques riches en chitinase, à l'aide du *Streptomyces* sp., souche A 1, ont été décrites dans un premier mémoire (JEUNIAUX, 1958) (1). L'objet du présent travail (2) est de décrire un procédé de concentration et de purification des principes enzymatiques responsables de la première étape de la chitinolyse, c'est-à-dire de la dépolymérisation de la chitine en produits de dégradation solubles. Pour le dosage quantitatif de ces chitinases, la méthode néphélométrique (JEUNIAUX, 1951) présente l'avantage d'être plus rapide, aussi sensible et plus spécifique que les méthodes classiques ; elle a été systématiquement utilisée au cours de ce travail. La concentration en enzyme est exprimée en Unités arbitraires de chitinase (en abrégé : U. C.) (JEUNIAUX, 1958).

La purification de la chitinase a été également réalisée par GLASER et BROWN (1957) à partir de préparations commerciales d'émulsine, et par BERGER et REYNOLDS (1958) à partir de filtrats de culture de Streptomycètes.

(1) Nous remercions vivement le professeur M. WELSCH qui nous a permis de préparer tous les filtrats de culture de streptomycètes dans les laboratoires de Microbiologie médicale générale de l'Université de Liège et du Centre National de Production et d'Etude de substances d'origine microbienne (C. P. E. M.).

(2) Voir aussi les notes préliminaires suivantes : JEUNIAUX, 1956, 1957a, 1957b.

I. — Méthodes : teneur en protéines et propriétés enzymatiques des filtrats de culture

Lorsque les cultures en milieu-chitine du *Streptomyces* sp., souche A1, ont atteint le stade de concentration maximum en chitinase, on centrifuge et on filtre sur laine de verre (les filtres en papier retiennent une partie de l'activité chitinolytique).

Le pH des filtrats varie entre 7.9 et 8.5. Pour les filtrats de cultures contenant au départ 10 mg. de chitine/ml., le pouvoir réducteur est égal à celui d'une solution de glucose à 0.2 mg./ml., et la teneur en azote total est en moyenne de 0.4 mg./ml. (Kjeldahl).

1. — PROTÉINES

Les protéines ont été dosées par la réaction du biuret-phénol de Folin-Ciocalteu, modifiée par LOWRY, ROSEBROUGH, FARR et RANDALL (1951); les résultats sont exprimés en mg. de sérum-albumine/ml.

Le développement de la coloration est entravé par le sulfate ammonique, pour des concentrations supérieures à 0.2 %; les solutions tampons de phosphates, de citrates et de véronal, aux concentrations utilisées, ne présentent pas d'inconvénients.

Cette méthode n'est pas spécifique des protéines : des substances non protéiques, présentes dans les filtrats de culture, développent en présence du réactif de Folin-Ciocalteu une coloration identique à celle des protéines; toutefois, au cours de la purification de la chitinase, ces substances parasites sont progressivement éliminées : au terme des étapes de purification, la coloration obtenue est entièrement imputable aux protéines en solution (comparaison avec la teneur en azote du précipité trichloracétique). Le manque de spécificité de la méthode sera souligné, dans ce travail, par l'utilisation de la notation « protéines », entre guillemets.

La teneur en « protéines » des différents filtrats de culture peut varier du simple au triple, indépendamment de la teneur en chitinase.

2. — PEPTIDASES

a) Méthodes.

Les peptidases ont été recherchées à l'aide des méthodes de BELOFF et PETERS (1944) (substrat : caséine) ou de ANSON (1938) (substrat : hémoglobine). Leur activité est maximum aux environs du pH 8.

Les filtrats de culture ne contiennent pas d'acides.

L'activité protéolytique de GHUYSEN (1957) : à K₂HPO₄ 0.2 M, on ajoute la caséine dans 4.5 ml. d'eau d'équilibration, on mesure l'activité (filtre vert L 2). Une durée d'incubation correspondante est utilisée pour les protéolytiques.

b) Présence d'inhibiteurs

L'acidification des filtrats provoque un trouble; la solution est précipitée et l'activité protéolytique est éliminée. Cette augmentation de l'élimination d'inhibiteurs (cf. : certains inhibiteurs) provoque une diminution du pH optimum des protéolytiques. L'élimination de ces inhibiteurs est obtenue par l'ajout de 3 mg. de NaOH.

Les filtrats des cultures de chitinase, mais possèdent une activité protéolytique filtrat libéré 0.2 mg. de glucose. Le pH 5.4; substrat : caséine; réducteurs libérés par l'ajout de 3 mg. de NaOH.

4. — CINÉT

Mesurée par la méthode de FOLIN-CIOCALTEU, la teneur des filtrats est maximum à la fin de la durée d'incubation, à un pH 4.7. L'allure de la courbe est plus raide que celle de la teneur en chitinase (1951). Le pH optimum de l'enzyme est de 8.

(1) La cellulase, comme on le sait, est une enzyme qui agit sur le sucre. Cette observation est à l'origine de la découverte de l'enzyme *oryzae* et *Stachybotrys* a été utilisée comme source de carbone pour l'hydrolyse de la cellulose.

protéines filtrats de culture

de du *Streptomyces* sp.,
concentration maximum en
d'une lame de verre (les filtres
activité chitinolytique).

3.5. Pour les filtrats de
chitine/ml., le pouvoir
de glucose à 0.2 mg./ml.,
de yenne de 0.4 mg./ml.

action du biuret-phénol
ROSEBROUGH, FARR et
mesurés en mg. de sérum-

lavé par le sulfate ammo-
0.2 %; les solutions tam-
ponal, aux concentrations

protéines : des substances
de culture, développent en
une coloration identique à
la purification de la chiti-
nisivement éliminées : au
la obtenue est entièrement
raison avec la teneur en
nque de spécificité de la
l'utilisation de la notation

ents filtrats de culture
damment de la teneur

des méthodes de BELOFF
ANSON (1938) (substrat :
aux environs du pH 8.

Les filtrats de culture ne contiennent pas de peptidases actives aux pH acides.

L'activité protéolytique a été dosée par la méthode néphélométrique de GHUYSEN (1957) : à 2 ml. de solution à 0.2 % de caséine dans K_2HPO_4 0.2 M, on ajoute 0.5 ml. de solution enzymatique. Après incubation on prélève 0.5 ml. de milieu réactionnel et on en précipite la caséine dans 4.5 ml. d'acide trichloracétique 1.1 %. Après 15 minutes d'équilibration, on mesure le trouble au néphélomètre de Pulfrich (filtre vert L 2). Une diminution de trouble de 50 % après 10 minutes d'incubation correspond à une activité arbitraire de 100 Unités protéolytiques.

b) Présence d'inhibiteurs de peptidases.

L'acidification des filtrats de culture (pH 5) fait apparaître un trouble; la solution clarifiée par centrifugation possède, à pH 8, une activité protéolytique 3 à 5 fois plus élevée que la solution non acidifiée. Cette augmentation d'activité est vraisemblablement due à l'élimination d'inhibiteurs instables ou insolubles en milieu acide (cf. : certains inhibiteurs naturels de la trypsine : LASKOWSKI, 1955). Le pH optimum des peptidases des filtrats n'est pas modifié après élimination de ces inhibiteurs.

3. — POLYSACCHARIDASES

Les filtrats des cultures en milieux-chitine ne contiennent pas d'amylase, mais possèdent une nette activité cellulolytique ⁽¹⁾ : 1 ml. de filtrat libère 0.2 mg. de glucose, après 1 h. d'incubation à 37° C. et à pH 5.4; substrat : carboxyméthylcellulose 0.5 %; dosage des sucres réducteurs libérés par la méthode de SOMOGYI (1952).

4. — CINÉTIQUE DE L'ACTIVITÉ CHITINOLYTIQUE

Mesurée par la méthode néphélométrique, l'activité chitinolytique des filtrats est maximum à pH 5.2; le pH optimum est indépendant de la durée d'incubation. L'activité est fortement réduite en dessous du pH 4.7. L'allure de la courbe est celle d'une courbe en cloche dont la pente est plus raide du côté des valeurs acides du pH (JEUNIAUX, 1951). Le pH optimum n'est pas modifié au cours de la purification de l'enzyme.

⁽¹⁾ La cellulase, comme la chitinase, serait donc un enzyme « constitutif », en ce sens qu'il pourrait être sécrété par les streptomycètes en l'absence du substrat. Cette observation est à rapprocher de celle de JERMYN (1952) concernant *Aspergillus oryzae* et *Stachybotrys atra*, qui, dans des milieux ne contenant que du sucrose et du tartrate comme sources de carbone organique, synthétisent des enzymes capables d'hydrolyser la carboxyméthylcellulose.

La température optimum est voisine de 40° C. L'hydrolyse de la chitine n'est pas complètement inhibée à 0° C. (bain de glace fondante). La quantité de chitine solubilisée à 0° C. représente encore environ 20 % de celle hydrolysée à la température optimum de 40° C.

II. — Description du procédé de purification

La chitinase présente peu d'affinité pour les adsorbants usuels (bauxite, terre d'infusoires, kaolin, gels de phosphate tricalcique). Son affinité pour son propre substrat, la chitine, est très élevée : nous en avons décrit les conséquences sur le mécanisme de l'apparition d'exochitinase dans les cultures en milieu de chitine (JEUNIAUX, 1958). Nous avons adopté un procédé d'adsorption sur chitine pulvérisée qui constitue une première étape efficace de concentration et de purification de la chitinase. Cette étape est précédée d'un ajustement au pH 5.2 (optimum pour l'adsorption de l'enzyme sur la chitine). Elle est suivie de deux fractionnements successifs par le sulfate ammonique. Le tableau I présente le bilan de la concentration et de la purification de la chitinase au cours de ces différentes manipulations.

1. — ADSORPTION SUR CHITINE PULVÉRISÉE ET ÉLUTION PAR DIGESTION SPONTANÉE DE L'ADSORBANT

Le filtrat de culture brut (« FB »), de pH 7.9 à 8.5, est amené au pH 5.2 par addition de H₂SO₄ 0.2 N, la solution étant maintenue à 0° C. ; on filtre ensuite sur laine de verre.

La chitinase du filtrat acidifié (« FA ») est adsorbée en masse sur chitine pulvérisée⁽¹⁾ (4.4 mg. de chitine en suspension pour 200 U. C. ; durée du brassage : 10 minutes). On centrifuge (2500 tours/minute pendant 10 minutes) et on décante. Le culot de chitine est lavé par une solution de tampon acide citrique-Na₂HPO₄ 0.02 M de pH 5.2, centrifugé et décanté à nouveau.

Le culot de chitine lavée est mis en suspension dans un tampon acide citrique-Na₂HPO₄ 0.1 M de pH 5.2 (8 ml. pour 100 mg. de chitine). On ajoute un peu de thymol comme antiseptique, on porte la suspension à 36° C. et on agite de temps en temps jusqu'à solubilisation des 4/5 de la chitine. On laisse alors s'achever l'hydrolyse de l'adsorbant à +1° C. On centrifuge après digestion complète (solution « CD »).

⁽¹⁾ Pour la préparation des suspensions de chitine pure pulvérisée et la sélection des suspensions les plus favorables à l'adsorption de la chitinase au cours de ce procédé, voir JEUNIAUX, 1958.

Justification du procédé :

a) *Adsorption sur chitine* : que celle sur colonnes de rendement est au moins a observé à pH 5.2-5.3 et à de la force ionique est tou soit superflu de soumettre

b) *Élution de la chitinase* : les conditions de pH et de désorber plus de 20 % de tine pulvérisée. L'hydrolyse l'effet de la chitinase adsorbable de l'enzyme (60 à 80 s'accomplit rapidement à mique de l'enzyme, celui- Lorsque la proportion de est indiqué de laisser s'a laquelle l'activité de la ch

c) *Résultats* : La solubilité des pigments du filtrat la solution « CD » est 7 à par rapport aux « protéines peptidases du filtrat acidifié (tableau I).

2. — PRÉCIPITATION

La solution « CD » est solution saturée en (NH₄)₂SO₄. Le précipité est recueilli sur un tampon acide citrique correspond au 1/6 de la

3. — FRACTIONNEMENT

Le précipité formé à la fraction en sulfate ammonique contre une solution très diluée (solution « SA₂-50 »).

4. — ÉLUTION

Au terme des manipulations tinolytique de la solution que celle du filtrat

40° C. L'hydrolyse de la chitine (bain de glace fondante). Le rendement est encore environ 50 % à l'optimum de 40° C.

de purification

Pour les adsorbants usuels tels que le phosphate tricalcique, la chitine, est très efficace. Les séquences sur le mécanisme des cultures en milieux liquides ont adopté un procédé qui constitue une première étape de purification de la chitinase. Elle est suivie de la purification au pH 5.2 (optimum de la chitine). Elle est suivie de la purification au sulfate ammonique. Le rendement et de la purification sont les mêmes après différentes manipulations.

CHITINE PULVÉRISÉE

PRÉPARATION DE L'ADSORBANT

La solution à 8.5, est amené au pH 5.2 et maintenue à 0° C. ; on

est adsorbée en masse sur une suspension pour 200 U. C. ; centrifuge (2500 tours/minute) de chitine est lavé par une solution 0.02 M de pH 5.2, centri-

suspension dans un tampon citrique 0.05 M pour 100 mg. de chitine antiseptique, on porte la solution à 37° C. pendant 24 heures jusqu'à solubilisation complète. On s'achève l'hydrolyse de la chitine par la digestion complète (solution

pure pulvérisée et la sélection de la chitinase au cours de ce

Justification du procédé :

a) *Adsorption sur chitine* : L'adsorption « en masse » est plus aisée que celle sur colonnes de chitine, qui se colmatent rapidement ; le rendement est au moins aussi bon. Le maximum d'adsorption a été observé à pH 5.2-5.3 et à force ionique très faible (0.01). L'influence de la force ionique est toutefois suffisamment peu marquée pour qu'il soit superflu de soumettre les filtrats à une dialyse préalable.

b) *Elution de la chitinase* : En modifiant, même considérablement, les conditions de pH et de force ionique des suspensions, on ne peut désorber plus de 20 % de la quantité de chitinase adsorbée sur la chitine pulvérisée. L'hydrolyse enzymatique spontanée de la chitine, sous l'effet de la chitinase adsorbée, permet seule une récupération appréciable de l'enzyme (60 à 80 % de la quantité adsorbée). Cette hydrolyse s'accomplit rapidement à 36° C., sans risques de dénaturation thermique de l'enzyme, celui-ci étant stable en présence de son substrat. Lorsque la proportion de chitine solubilisée est de 80 % environ, il est indiqué de laisser s'achever l'hydrolyse à +1° C., température à laquelle l'activité de la chitinase est encore appréciable (voir ci-dessus).

c) *Résultats* : La solution « CD » est à peine colorée : la presque totalité des pigments du filtrat a été éliminée. Par rapport au filtrat brut, la solution « CD » est 7 à 8 fois plus riche en chitinase ; la purification par rapport aux « protéines » totales est de 4 à 9 fois ; par rapport aux peptidases du filtrat acidifié « FA », la purification est de 12 à 75 fois (tableau I).

2. — PRÉCIPITATION PAR LE SULFATE AMMONIQUE

La solution « CD » est ajustée au pH 5.2 ; on y ajoute, à 0° C., une solution saturée en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, jusqu'à atteindre 55 % de la saturation. Le précipité est recueilli par centrifugation et remis en solution dans un tampon acide citrique- Na_2HPO_4 0.05 M de pH 5.2, dont le volume correspond au 1/6 de la solution « CD » initiale (solution « SA₁-55 »).

3. — FRACTIONNEMENT PAR LE SULFATE AMMONIQUE

Le précipité formé à 0° C. et à pH 5.2 entre 30 et 50 % de la saturation en sulfate ammonique est recueilli par centrifugation et dialysé contre une solution très diluée de sulfate ammonique (0.1 %) à pH 6 (solution « SA₂-50 »).

4. — BILAN DE LA PURIFICATION

Au terme des manipulations décrites ci-dessus, l'activité chitinolytique de la solution finale « SA₂-50 » est 70 fois plus élevée que celle du filtrat brut (tableau I). 0.01 ml. de la solution

SA₂-50 hydrolyse complètement 1.8 mg. de chitine pulvérisée en 2 h. à 37° C. et à pH 5.2. Le rendement en enzyme est de 27.7 %. La purification par rapport aux « protéines » est de 9 à 25 fois (selon la teneur initiale, variable, en « protéines »).

La solution SA₂-50 présente encore une légère activité protéolytique. Par rapport aux peptidases, la chitinase a été purifiée 260 fois. La cellulase présente dans le filtrat brut a été complètement éliminée au cours de la purification. Quant aux sucres aminés, résultat de l'hydrolyse enzymatique de l'adsorbant-chitine, ils ont été éliminés au cours des fractionnements

TABLEAU I. — Bilan de la purification de la chitinase de *Streptomyces sp.*, souche A1 (culture en milieu de CZAPEK, sans glucose, contenant 12 g. de chitine/litre)

	Fractions (1)				
	FB	FA	CD	SA ₁ -55	SA ₂ -50
Volume (ml.)	6400	6800	375	60	25
Chitinase : U. C./ml.	34	28	260	1450	2410
Récupération	100 %	87.5 %	44.8 %	40 %	27.7 %
« Protéines » : mg./ml. (2) . . .	0.73	0.67	1.54	3.8	5.7
Activité spécifique (U.C./mg. « protéines »)	46.5	41.8	168.8	381.5	421.0
Peptidases : Unités/ml.	16	90	10	30	30
Activité spécifique (U.C./unités peptidases)	—	0.31	26	48.3	80
Cellulase (3)	40.0	—	—	—	0.0
Pouvoir réducteur (4)	200.0	—	—	—	0.0

(1) FB = Filtrat Brut initial; FA = Filtrat acidifié; CD = solution concentrée par adsorption sur chitine et lyse de l'adsorbant; SA₁-55 et SA₂-50 = premier et second fractionnements par (NH₄)₂SO₄ (détails dans le texte).

(2) Dosage par Folin-Ciocalteu; valeurs exprimées en mg. de sérumalbumine/ml.

(3) En µg. de glucose libérés par 0.2 ml. de solution après 1 h. d'incubation à 37° C. en présence de carboxyméthylcellulose.

(4) En µg. de glucose par ml.

par le sulfate ammoniacal, plus de pouvoir réducteur.

III. — Critères

1. — Essais

Des essais de dénaturation par le sulfate ammoniacal, d'adsorption sur chitine ou de fractionnement par précipitation au méthanol ont permis de constater que l'activité spécifique de la chitinase dans l'éthanol 50 volumes est rigoureusement identique (tableau II), ce qui confirme la pureté de la solution SA₂-50 constituée.

2. — SOLUBILITÉ DE LA CHITINASE EN PRÉSENCE DE PROTÉINES

La figure 1 montre la solubilité de la chitinase en présence de protéines, exprimée sur une échelle logarithmique.

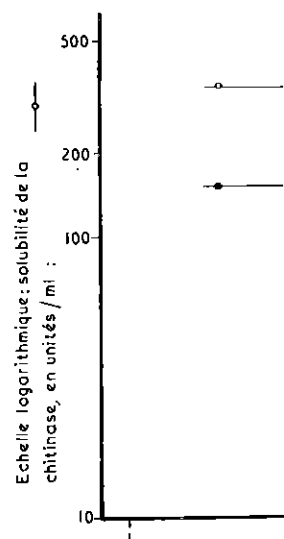


FIG. 1. — Solubilité de la chitinase en présence de protéines.

g. de chitine pulvérisée
ement en enzyme est de
aux « protéines » est de
variable, en « protéines »).
une légère activité pro-
, la chitinase a été puri-
ans le filtrat brut a été
purification. Quant aux
enzymatique de l'adsor-
ours des fractionnements

chitinase de *Streptomyces sp.*,
dans glucose, contenant 12 g.

Fractions (1)

	CD	SA ₁ -55	SA ₂ -50
	375	60	25
	260	1450	2410
%	44.8 %	40 %	27.7 %
	1.54	3.8	5.7
	168.8	381.5	421.0
	10	30	30
	26	48.3	80
	—	—	0.0
	—	—	0.0

ifié; CD = solution concentrée
SA₁-55 et SA₂-50 = premier et
s le texte).
s en mg. de sérumalbumine/ml.
tution après 1 h. d'incubation

par le sulfate ammonique, car la solution finale ne manifeste plus de pouvoir réducteur.

III. — Critères de pureté de la solution finale

1. — ESSAIS ULTÉRIEURS DE PURIFICATION

Des essais de dénaturation thermique en présence de sulfate ammonique, d'adsorption sur gels d'alumine à différents pH, ou de fractionnement par l'éthanol n'ont pas permis d'augmenter l'activité spécifique de la chitinase. La solubilité de la chitinase dans l'éthanol 50 vol. %, à -5° C., en fonction du pH, est rigoureusement identique à la solubilité des protéines totales (tableau II), ce qui suggère que chitinase et protéines de la solution SA₂-50 constituent une seule et même substance.

2. — SOLUBILITÉ EN PRÉSENCE DE SULFATE AMMONIQUE EN CONCENTRATION CROISSANTE

La figure 1 montre que le logarithme de la solubilité des protéines; exprimée en mg. d'azote protéique soluble, est une

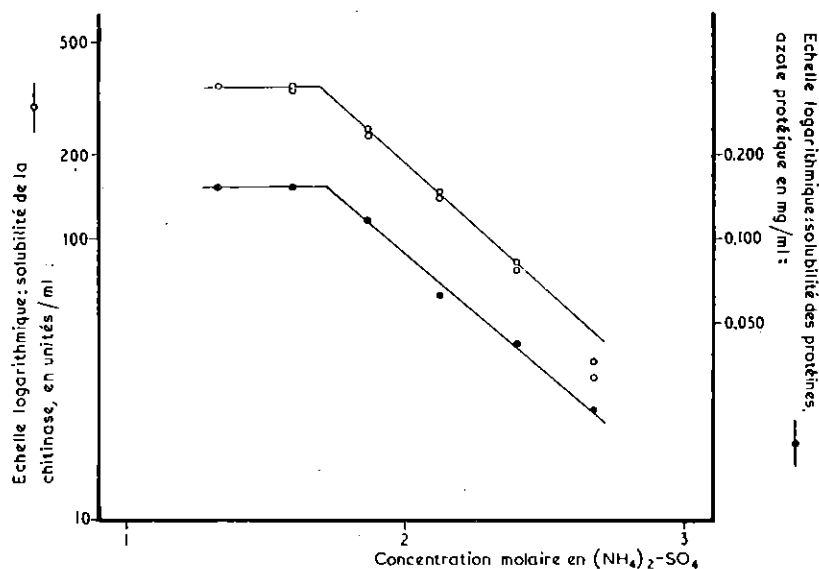


FIG. 1. — Solubilité de la chitinase et des protéines de la solution purifiée SA₂-50, en présence de sulfate ammonique, à 0° C. et à pH 5.2.

TABLEAU II. — Solubilité de la chitinase et des protéines de la solution purifiée SA₂-50 dans l'éthanol 50 vol. %, à —5° C à différents pH

	Distribution entre fraction soluble et précipité (1)							
	à pH 7.55		à pH 4.7		à pH 4.25		à pH 3.25	
	S.	C.	S.	C.	S.	C.	S.	C.
Protéines (2) : total (mg.) . . .	2.600	0.0	2.460	0.075	2.173	0.290	0.473	0.565
Répartition	100 %	0 %	94.5 %	3 %	83.6 %	11.1 %	18.2 %	21.8 %
Chitinase : total (U. C.)	850	0	820	27	697	108	129	187
Répartition	100 %	0 %	96.3 %	3 %	82 %	11.8 %	15 %	21.7 %

(1) S. = solution surnageante, après centrifugation.

C. = précipité soluble dans un tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 0.05M de pH 7 (une fraction, variable avec le pH auquel la précipitation a eu lieu, ne passe pas en solution).

(2) Valeurs exprimées en mg. de sérumalbumine (réaction de Folin-Ciocalteu).

fonction linéaire de la concentration des protéines de la solution. La courbe de solubilité. Le logarithme de la solubilité est également une fonction linéaire du pH ammoniacal. La valeur de la constante de précipitation est probablement la même pour l'enzyme. Les deux distributions de la chitinase et les protéines de la solution ont les mêmes propriétés de solubilité dans l'acide ammoniacal.

3. — U

La solution SA₂-50, contenant 5 mg. de protéines/ml., centrifugée à 20 000 tours pendant toute la durée de la centrifugation. Les protéines de la solution sont homogènes, au point de vue de la polydispersité apparente. La constante de précipitation est de 3.42 Unités Svedberg. Les courbes sont symétriques, le maximum est à 30 000.

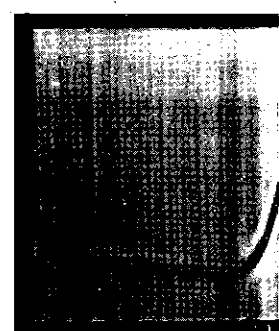


FIG. 2. — Ultracentrifugation des protéines de la solution SA₂-50 à gauche : ap

(4) Nous remercions vivement M. J. pour sa contribution à cette ultracentrifugation et

fonction linéaire de la concentration en sulfate ammonique. Les protéines de la solution SA₂-50 possèdent donc la même constante de solubilité. Le logarithme de solubilité de la chitinase est également une fonction linéaire de la concentration en sulfate ammonique. La valeur aberrante obtenue à la fin de la précipitation est probablement due à une inactivation partielle de l'enzyme. Les deux droites obtenues sont parallèles. La chitinase et les protéines de la solution SA₂-50 possèdent donc les mêmes propriétés de solubilité vis-à-vis des solutions de sulfate ammonique.

3. — ULTRACENTRIFUGATION ⁽¹⁾

La solution SA₂-50, dialysée, contenant 1950 U. C./ml. et 5 mg. de protéines/ml., est soumise à l'ultracentrifugation, en ultracentrifuge « Spinco », modèle E, à 59 780 tours/minute, à la température de 21.5-22° C. Les clichés photographiques montrent un pic d'ultracentrifugation qui reste symétrique pendant toute la durée de l'expérience, soit 88 minutes (fig. 2). Les protéines de la solution SA₂-50 se comportent donc de façon homogène, au point de vue de leur masse moléculaire, sans polydispersité apparente. La constante de sédimentation est de 3.42 Unités Svedberg. En admettant que les molécules sont symétriques, le poids moléculaire serait donc voisin de 30 000.

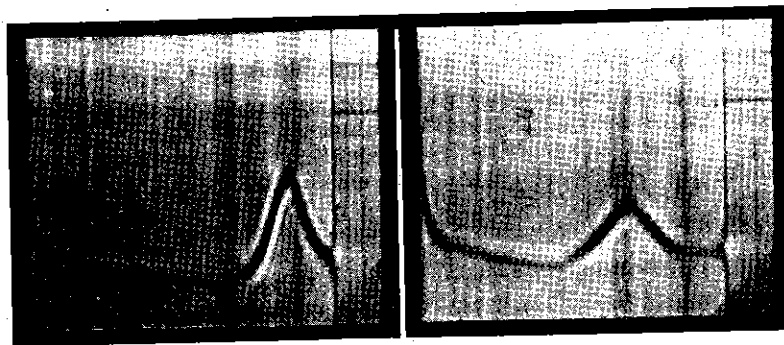


FIG. 2. — Ultracentrifugation de la solution de chitinase SA₂-50, à 59 780 tours/min. ; à gauche : après 32 min. ; à droite : après 88 min.

⁽¹⁾ Nous remercions vivement le Dr E. FREDERICQ, qui a bien voulu affectuer cette ultracentrifugation et en étudier les résultats.

⁽¹⁾ S. = solution surnageante, après centrifugation.
C. = précipité soluble dans un tampon KH₂PO₄-Na₂HPO₄ 0.05M de pH 7 (une fraction, variable avec le pH auquel la précipitation a eu lieu, ne passe pas en solution).

⁽²⁾ Valeurs exprimées en mg. de sérumbumaine (réaction de Folin-Ciocalteu).

Chitinase : total (U. C.)	100 %	0 %	96.3 %	3 %	82 %	11.8 %	15 %	21.7 %
Répartition								

IV. — Analyse électrophorétique en milieu gélifié

1. — MÉTHODES (1)

L'analyse électrophorétique en gélose de GORDON *et al.* (1950) permet d'isoler aisément les constituants séparés par électrophorèse, de les récupérer et de les caractériser.

La gélose à 1.5 %, contenant un tampon véronal sodique-HCl 0.051 M et du merthiolate de Na à 1/10 000, est coulée en plaques de 3 à 4 mm. d'épaisseur; des ponts gélifiés établissent le contact avec deux solutions du même tampon, entre lesquelles on établit une différence de potentiel de 60 volts (40 mA par plaque). La solution de protéines à analyser est préalablement introduite, sous forme de solution gélifiée, dans une « niche » de 3 × 10 mm., découpée à l'emporte-pièce dans l'épaisseur de la gélose (volume : 0.11 ml.).

Après électrophorèse (6 à 8 heures, à 21-22° C.), on fixe les protéines par un bain d'acide acétique 0.2 M dans l'éthanol 60 vol. %. Les protéines précipitent en bandes opaques dont la position par rapport à la niche de départ permet de déterminer, sur une plaque de gélose identique, mais non fixée, la position des différents constituants; ceux-ci peuvent être isolés, en découpant la gélose au moyen d'un emporte-pièce calibré. Ces fragments de gélose non fixée sont dilacérés dans une solution tampon (homogénéiseur de Potter). Dans la solution surnageant après centrifugation, on dose la chitinase (méthode néphélométrique) et les protéines (réaction de Folin-Ciocalteu). Les bandes de gélose témoins, comme celles ayant servi au prélèvement des fractions isolées, sont enfin séchées, puis colorées à l'Amidoschwarz (URIEL et GRABAR, 1956).

L'électrophorèse en gélose affecte sensiblement l'activité enzymatique de la solution : on constate une perte de 38 % environ d'activité chitinolytique, perte due surtout à l'incorporation à la gélose maintenue fluide à 50° C., et à la station pendant 6 h. à 22° C. en présence de tampon véronal-HCl. La chitinase est, en effet, assez labile en l'absence de son substrat. Les électrophorèses en gélose contenant de la chitine ne présentent pas ces inconvénients (voir ci-dessous).

Les protéines de la solution purifiée SA₂-50 se comportent de façon approximativement homogène au cours de l'électrophorèse à pH 7.4, et migrent vers le pôle négatif. Au cours de l'électrophorèse à pH 8.2, les protéines de la solution purifiée se séparent en 4 bandes très voisines, d'importance inégale (fig. 3).

(1) Nos plus vifs remerciements vont au D^r J. SALMON, qui nous a aidé à réaliser toutes les électrophorèses en gélose.

FIG. 3. — Electrophorèse

2. — ANALYSE QUANTITATIVE

On analyse la teneur en protéines Q, L, M et N (fig. 3) prélevées à l'emporte-pièce de la gélose dans un tampon. D'autre part, afin d'apprécier l'effet consécutif à l'électrophorèse, on dilacère la gélose

Le tableau III montre

a) l'activité spécifique de la fraction L est identique; celle de la fraction M est celle de la fraction L.

b) la somme des protéines Q, L, M et N constitue 58 % de la chitine chitinolytique récupérée. La fraction N représente que 42 % de la chitine chitinolytique par électrophorèse et la fraction M est la fraction systématique des fractions enzymatiques.

Ces observations s'expliquent au point de vue de leur activité enzymatique serait l'électrophorèse. Cette méthode est la suivante.

e en milieu gélifié

(1)

de GORDON *et al.* (1950)
ents séparés par électro-
actériser.

pon véronal sodique-HCl
, est coulée en plaques de
établisent le contact avec
uelles on établit une diffé-
-laque). La solution de pro-
-ite, sous forme de solution
découpée à l'emporte-pièce
ml.).

1-22° C.), on fixe les pro-
ns l'éthanol 60 vol. %. Les
nt la position par rapport
, sur une plaque de gélose
es différents constituants;
la gélose au moyen d'un
gélose non fixée sont dila-
-éiseur de Potter). Dans la
dose la chitinase (méthode
n de Folin-Ciocalteu). Les
yant servi au prélèvement
colorées à l'Amidoschwarz

lement l'activité enzyma-
de 38 % environ d'activité
poration à la gélose main-
t 6 h. à 22° C. en présence
en effet, assez labile en
ses en gélose contenant de
nts (voir ci-dessous).

SA₂-50 se comportent de
au cours de l'électro-
-ble négatif. Au cours de
s de la solution purifiée
s, d'importance inégale

LMON, qui nous a aidé à réaliser

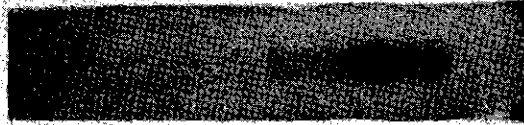


FIG. 3. — Electrophorèse de la solution de chitinase SA₂-50 en milieu gélifié, à pH 8.2.

2. — ANALYSE QUANTITATIVE DES FRACTIONS ISOLÉES A pH 8.2

On analyse la teneur en chitinase et en protéines des 4 fractions Q, L, M et N (fig. 4), isolées par électrophorèse à pH 8.2, prélevées à l'emporte-pièce, et mises en solution par dilacération de la gélose dans un tampon KH₂PO₄-Na₂HPO₄ 0.1 M de pH 7. D'autre part, afin d'apprécier le degré d'inactivation de l'enzyme, consécutif à l'électrophorèse, on prélève une « bande totale » B, qui, dilacérée de la même manière, constitue le témoin (fig. 4).

Le tableau III montre que :

a) l'activité spécifique des fractions M et N est à peu près identique; celle de la fraction Q est nettement plus basse; celle de la fraction L est intermédiaire.

b) la somme des protéines récupérées dans les quatre fractions constitue 58 % de la quantité de la « bande totale » B. L'activité chitinolytique récupérée dans la somme des 4 fractions ne représente que 42 % de l'activité totale B. Les fractions séparées par électrophorèse et extraites isolément ont une activité spécifique systématiquement inférieure à celle de l'ensemble des fractions enzymatiques.

Ces observations suggèrent que des chitinases, différentes au point de vue de leurs charges électriques, et dont l'activité enzymatique serait synergique, ont été séparées au cours de l'électrophorèse. Cette hypothèse est vérifiée dans l'expérience suivante.

TABLEAU III. — Analyse quantitative des fractions isolées par électrophorèse à pH 8.2

	« Bande totale » B (1)	Fractions isolées (1)			
		Q	L	M	N
Chitinase (activité totale) en U. C.	146	13.4	17.6	15.5	14.8
Protéines (total) en mg. ...	0.5880	0.0864	0.0992	0.0800	0.0752
Activité spécifique (en U.C./mg. protéines)	247	155	177	194	197
Récupération	B	Somme des fractions Q. L. M. et N			
Chitinase :					
(total) en U. C.	146		61.3		
en %	100 %		42 %		
Protéines :					
(total) en mg.	0.588		0.381		
en %	100 %		58 %		

(1) Toutes les valeurs ont été calculées pour un volume de 0.23 ml. de solution gélosée (ce qui correspond au volume de 2 fragments de gélose prélevés à l'emporte-pièce).

3. — SÉPARATION DES CHITINASES PAR ÉLECTROPHORÈSE ; MISE EN ÉVIDENCE D'UNE ACTION SYNERGIQUE

La solution SA₂-50 est soumise à l'électrophorèse à pH 8.2 pendant 6 h. ; on prélève les différentes fractions Q, L, M et N, ainsi qu'une « bande totale » B. On compare la teneur en protéines et l'activité chitinolytique de la « bande totale » à celles des fractions isolées, et à celles des mêmes fractions, mélangées expérimentalement deux à deux. L'examen du tableau 4 permet de tirer les conclusions suivantes :

a) Les activités spécifiques des fractions L, M et N sont pratiquement identiques. S'il y avait une impureté protéique dans ces fractions, il faudrait lui attribuer une distribution identique à celle de la chitinase, ce qui paraît improbable. Il semble plutôt que les trois fractions L, M et N sont constituées de chitinases isolées, dont l'activité spécifique est identique, mais dont la vitesse de migration électrophorétique est légèrement différente (tableau IV, A).

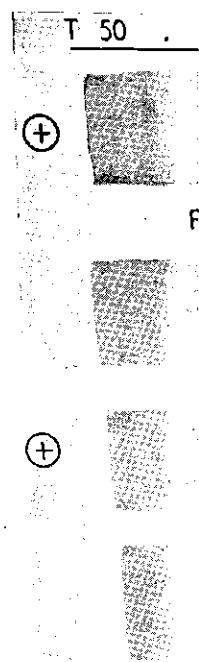


FIG. 4. — Électrophorèse de L, M

b) La fraction Q est plus basse que celle de la bande totale en l'absence d'une impureté protéique dans la solution totale.

En effet (tableau I) le maximum des chitinases de protéines (valeur de 0.0437) correspondrait à 0.0237, ce qui représente 4.5 % de la

c) Comme dans l'analyse des fractions isolées, la teneur en protéines de la « bande totale » B.

Fractions isolées par électrophorèse

Fractions isolées (1)			
	L	M	N
4	17.6	15.5	14.8
54	0.0992	0.0800	0.0752
	177	194	197

ne des fractions Q. L. M. et N

61.3
42 %

0.381
58 %

volume de 0.22 ml. de solution
s de gélose prélevés à l'emporte-

PAR ÉLECTROPHORÈSE ;
ION SYNERGIQUE

électrophorèse à pH 8.2
fractions Q, L, M et N,
mpare la teneur en pro-
« bande totale » à celles
nes fractions, mélangées
nen du tableau 4 permet

ctions L, M et N sont
une impureté protéique
tribuer une distribution
ni paraît improbable. Il
M et N sont constituées
pécifique est identique,
rophorétique est légère-

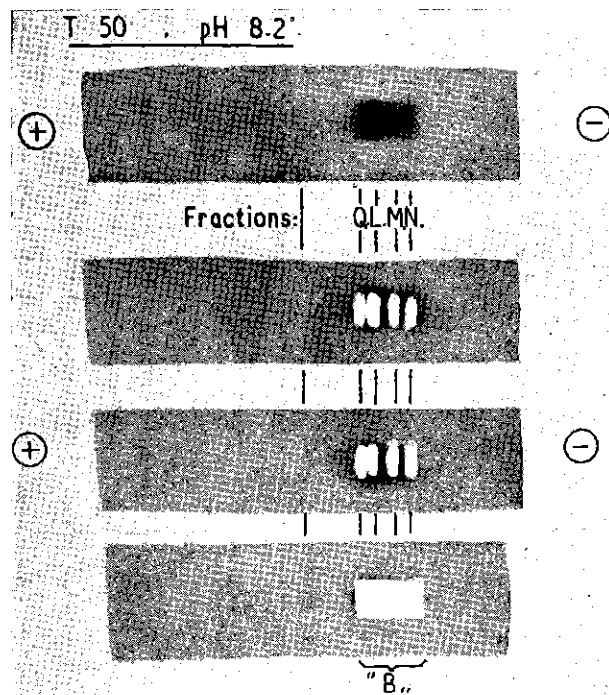


Fig. 4. — Electrophorèse en milieu gélatiné à pH 8.2. Prélèvement des fractions Q, L, M et N et de la « bande totale » B.

b) La fraction Q présente une activité spécifique nettement plus basse que celle des autres fractions, ce qui indique la présence d'une impureté protéique, dont la concentration relative, dans la solution totale, n'excède pas 4.5 %.

En effet (tableau IV, A), admettons que l'activité spécifique maximum des chitinases après électrophorèse soit égale à 265 U. C./mg. de protéines (valeur de M); dans ce cas, les 11.6 U. C. de la solution Q correspondent à 0.0437 mg. de protéines chitinolytiques. La solution Q contiendrait donc 0.0293 mg. de protéines non chitinolytiques, ce qui représente 4.5 % de la teneur totale en protéines de la solution B.

c) Comme dans l'expérience précédente, l'activité spécifique des fractions isolées est plus basse que celle de la « bande totale » B.

TABLEAU IV. — *Activité synergique des chitinases isolées par électrophorèse à pH 8.2* ⁽¹⁾

A. — *Analyse quantitative des fractions isolées* ⁽²⁾

	Bande totale B	Fractions isolées			
		Q	L	M	N
Chitinase (activité totale) en U. C.	180.0	11.6	30.0	22.6	16.5
Protéines (total) en mg.	0.642	0.073	0.119	0.085	0.069
Activité spécifique (en U. C./mg. protéines)	280	158	251	265	240

B. — *Activité et activité spécifique, après mélange des fractions isolées*

	Fractions mélangées, en parties égales					
	Q + M		L + M		L + N	
	calc. ⁽³⁾	exp. ⁽⁴⁾	calc. ⁽³⁾	exp. ⁽⁴⁾	calc. ⁽³⁾	exp. ⁽⁴⁾
Chitinase, U. C./ml.	6.34	6.74	9.73	10.30	8.61	10.70
Protéines, mg./ml.	0.0295		0.0378	273	0.0364	
Activité spécifique, U. C./mg. protéines ...	215	228	257	273	247	307

TABLEAU IV (suite). — *Activité synergique des chitinases isolées par électrophorèse à pH 8.2*

C. — *Récupération* ⁽²⁾

Bande totale B	Somme calculée des valeurs Q + L + M + N	Somme des valeurs expérimentales Q + M et L + N

	Q + M		L + M		L + N	
	calc. (3)	exp. (4)	calc. (3)	exp. (4)	calc. (3)	exp. (4)
Chitinase, U. C./ml.	6.34	6.74	9.73	10.30	8.61	10.70
Protéines, mg./ml.	0.0295		0.0378		0.0364	
Activité spécifique, U. C./mg. protéines ...	215	228	257	273	247	307

TABLEAU IV (suite). — *Activité synergique des chitinases isolées par électrophorèse à pH 8.2*

C. — *Récupération* (2)

	Bande totale B	Somme calculée des valeurs Q + L + M + N	Somme des valeurs expérimentales Q + M et L + N
Chitinase (activité totale) :			
en U. C.	180	80.7	94.1
en %	100 %	44.8 %	52.3 %
Protéines (total) :			
en mg.	0.642	0.346	
en %	100 %	53.9 %	

(1) Voir figure 4 pour la position relative des fractions isolées.

(2) Toutes les valeurs ont été calculées pour 0.22 ml. de solution gélosée.

(3) Valeurs calculées pour 1 ml., d'après celles du tableau A.

(4) Valeurs expérimentales pour 1 ml. de mélange de solutions.

d) En mélangeant deux à deux les fractions isolées, dont on a préalablement dosé la chitinase et les protéines, on constate une activité légèrement mais significativement plus élevée que l'activité théorique. Cette action synergique est particulièrement nette pour les mélanges L⁺M et L + N (tableau IV, B).

e) La partie C du tableau IV montre la récupération relative de l'activité chitinolytique et des protéines totales. Si l'on fait la somme des valeurs trouvées pour les 4 fractions, on constate une récupération de 53.9 % pour les protéines, et de 44.8 % seulement pour l'activité chitinolytique. Par contre, si l'on fait la somme des valeurs expérimentales obtenues pour les mélanges Q + M et L + N, on trouve 52.3 % de l'activité de la « bande totale » B, ce qui correspond bien à la proportion des protéines récupérées (53.9 %).

En conclusion, la diminution d'activité spécifique dans les fractions isolées est due à la séparation des différentes chitinases qui constituent la solution enzymatique purifiée. Ces chitinases, dont la vitesse de migration électrophorétique est légèrement différente catalysent de façon synergique la lyse de la chitine.

4. — ELECTROPHORÈSE EN MILIEU GÉLIFIÉ CONTENANT DE LA CHITINE

On soumet la solution SA₂₅₀ à l'électrophorèse à pH 8.2, mais dans une gélose à laquelle on a incorporé une suspension de chitine pulvérisée (conc. finale : 1 g./litre).

Au fur et à mesure que se déroule la migration électrophorétique, on voit la chitine se dissoudre sur le trajet suivi par la chitinase. Mais on distingue deux zones de lyse, bien individualisées : la zone de lyse complète est précédée d'une zone de lyse partielle (fig. 5). Après 6 h. d'électrophorèse, la fixation par le mélange d'acide acétique et d'alcool fait apparaître une bande de protéines précipitées, en forme de croissant, à une des extrémités de la zone de chitinolyse la plus intense, du côté du pôle négatif.

L'Amidoschwarz colore la chitine en bleu foncé, ainsi que les protéines ; on distingue (fig. 6), de la niche de départ vers le pôle négatif :

- 1) une zone de chitinolyse complète,

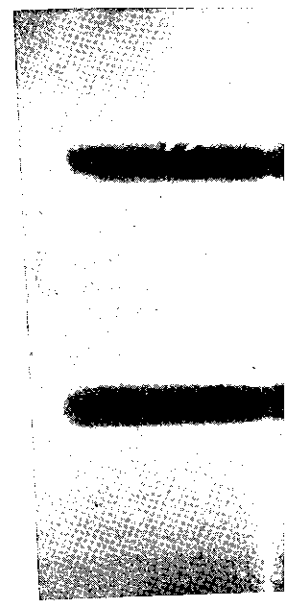


FIG. 5. — Electrophorèse en milieu gélosé contenant de la chitine.

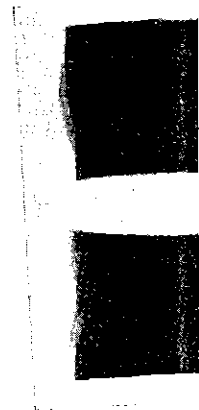


FIG. 6. — *Idem* : plaque de fixation (chitine seule) ; en l'absence de protéines.

fractions isolées, dont on
 es protéines, on constate
 ivement plus élevée que
 ergique est particulière-
 t L + N (tableau IV, B).
 e la récupération relative
 éines totales. Si l'on fait
 s 4 fractions, on constate
 protéines, et de 44.8 %
 e. Par contre, si l'on fait
 tenues pour les mélanges
 e l'activité de la « bande
 proportion des protéines

ivité spécifique dans les
 on des différentes chiti-
 matique purifiée. Ces chi-
 lectrophorétique est légè-
 synergique la lyse de la

MILIEU GÉLIFIÉ CHITINE

rophorèse à pH 8.2, mais
 ré une suspension de chi-
 re).

la migration électrophoré-
 sur le trajet suivi par la
 s de lyse, bien individua-
 scédée d'une zone de lyse
 horèse, la fixation par le
 ait apparaître une bande
 croissant, à une des extré-
 intense, du côté du pôle

bleu foncé, ainsi que les
 niche de départ vers le

e,

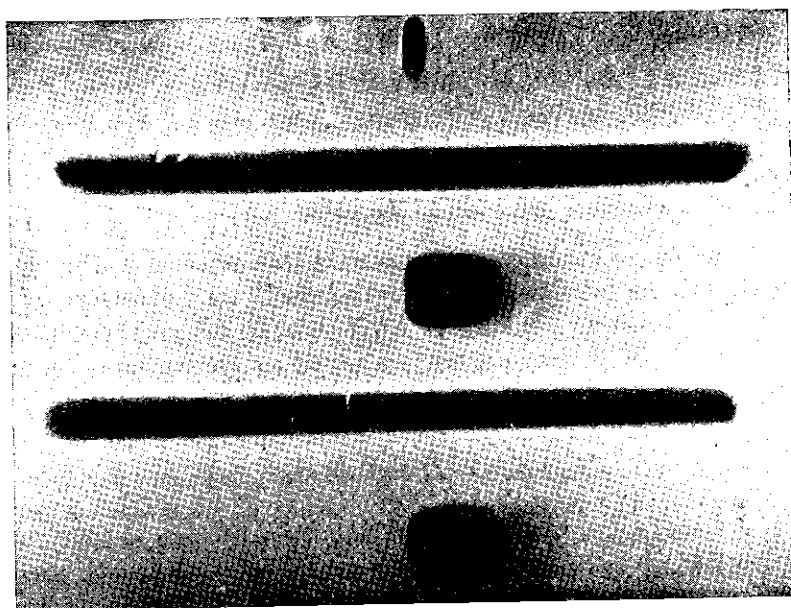


FIG. 5. — Electrophorèse de la solution de chitinases purifiées à pH 8.2 en milieu gélinifié contenant de la chitine pulvérisée ; après 6 h. : plaques de gélose non fixées et non colorées.

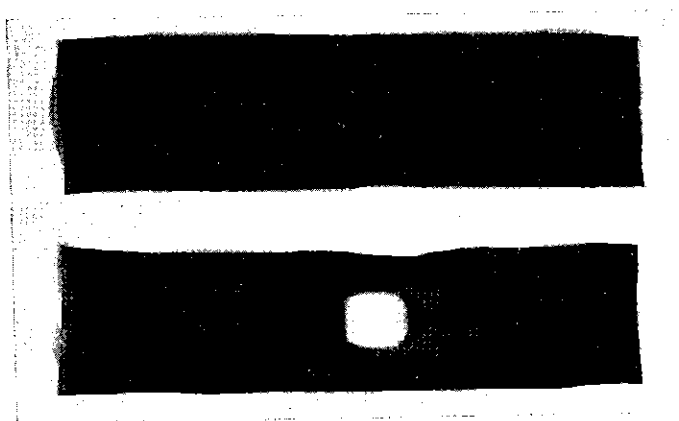


FIG. 6. — *Idem* : plaques fixées et colorées par l'Amidoschwarz. En haut : témoin (chitine seule) ; en bas : après migration électrophorétique des chitinases.

2) à l'extrémité de cette zone, le croissant de protéines précipitées,

3) une zone de chitinolyse partielle,

4) une nouvelle bande de protéines précipitées, mais beaucoup moins dense que la précédente, et

5) une deuxième zone de chitinolyse partielle.

En conclusion, même en présence de chitine, c'est-à-dire dans des conditions favorables à la protection de la chitinase contre toute dénaturation pendant l'électrophorèse, les protéines de la solution SA₂-50 se fragmentent en plusieurs constituants, doués d'activité chitinolytique, et migrant à des vitesses différentes.

V. — Conclusions

1) La méthode proposée pour la purification de la chitinase est rapide et nécessite peu de manipulations. Elle comprend deux étapes essentiellement sélectives : la technique de production de l'enzyme et le premier stade de sa purification. La source de chitinase est un filtrat de culture d'un micro-organisme à potentialités chitinolytiques particulièrement développées, cultivé dans un milieu ne contenant que de la chitine comme source d'azote et de carbone. La fraction protéique de ces filtrats de culture est constituée en grande partie par des chitinases, condition favorable à l'isolement de l'enzyme.

2) La première étape de purification, qui permet une concentration importante de l'activité, met à profit la grande affinité de la chitinase pour son substrat et le peu d'affinité des protéines des filtrats de culture pour les suspensions de chitine utilisées ⁽¹⁾. Il résulte de cette adsorption spécifique une purification importante de la chitinase.

L'éluion de la chitinase adsorbée est très malaisée ; de bons résultats sont obtenus en laissant simplement s'accomplir

⁽¹⁾ Ce n'est pas le cas de toutes les protéines : les arthropodines des cuticules d'insectes, par exemple, s'adsorbent sur la chitine (HACKMAN, 1955). Le maximum d'adsorption a été observé à pH 5 et à force ionique faible, comme pour la chitinase. Mais on obtient une éluion presque complète de ces protéines en lavant la chitine par un tampon de pH 9.

l'hydrolyse enzymatique adsorbé.

3) Après solubilisation, deux fractions sont obtenues pour éliminer les protéines des dernières impuretés et concentrer l'activité.

4) La solution finale de protéines non précipitées est toutefois pas 4.5 %.

5) A part cette fraction, la solution est constituée de trois fractions distinctes, de poids moléculaires élevés, sédant les mêmes conditions de sulfate ammonique. Ces chitinases diffèrent électrophorétiquement à pH 5. Les chitinases étudiées séparément ont une activité est sensible à la chitine agissent simultanément (synergie).

6) Cette solution de chitinase cellulolytique ou chitinase « pulvérisée » de chitine après purification ne peut pas *in situ* la chitine altérer les constituants de la chitine purifiées a été utilisée pour la chitine pour la couche membranaire (JEUNIAUX, inédit 1959) et, comme en évidence de (JEUNIAUX, inédit)

L'auteur décrit la technique de concentrer l'exochitinase essentiellement

l'hydrolyse enzymatique de l'adsorbant sous l'effet de l'enzyme adsorbé.

3) Après solubilisation de la chitine utilisée comme adsorbant, deux fractionnements par le sulfate ammonique suffisent pour éliminer les produits d'hydrolyse de la chitine et la plupart des dernières impuretés protéiques, tout en permettant de concentrer l'activité enzymatique.

4) La solution finale n'est pas tout à fait pure : la proportion de protéines non douées d'activité chitinolytique ne dépasse toutefois pas 4.5 %.

5) A part cette impureté protéique, la solution finale est constituée de trois protéines douées de propriétés chitinolytiques, de poids moléculaire identique, voisin de 30 000 et possédant les mêmes propriétés de solubilité dans les solutions de sulfate ammonique, et dans l'éthanol 50 vol. % à différents pH. Ces chitinases diffèrent légèrement par leurs propriétés électrophorétiques à pH 8.2. L'activité spécifique de ces trois chitinases étudiées séparément est identique ; l'activité chitinolytique est sensiblement plus élevée lorsque ces trois enzymes agissent simultanément sur la même suspension de chitine (synergie).

6) Cette solution de chitinases purifiées est dénuée d'activité cellulolytique ou amylolytique ; elle permet d'hydrolyser la chitine « pulvérisée » et les structures cuticulaires chitineuses après purification (« chitine native ») ; elle peut également attaquer *in situ* la chitine des endocuticules d'insectes, sans en altérer les constituants protéiques. Cette solution de chitinases purifiées a été utilisée avec succès comme réactif spécifique de la chitine pour la détermination de la composition chimique de la couche membraneuse des cuticules de crabes (JEUNIAUX, 1959) et, comme nouvelle méthode histochimique, pour la mise en évidence de chitine sur coupes de tissus d'invertébrés (JEUNIAUX, inédit).

VI. — Résumé

L'auteur décrit un procédé permettant de purifier et de concentrer l'exochitinase d'un streptomycète. Ce procédé consiste essentiellement en une adsorption « en masse » sur chitine col-

loïdale, suivie de lavage et d'hydrolyse enzymatique de l'adsorbant, puis de deux fractionnements successifs par le sulfate ammonique. L'activité chitinolytique a été ainsi concentrée 70 fois avec un rendement de 27 %.

La solution purifiée est homogène à l'ultracentrifugation (poids moléculaire = environ 30 000) et aux tests de solubilité dans les solutions de sulfate ammonique ou d'éthanol.

L'électrophorèse en gélose à pH 8.2 permet de séparer, outre une impureté protéique (4.5 % de la concentration totale en protéines), trois chitinases distinctes. Ces trois chitinases possèdent des propriétés électrophorétiques légèrement différentes, mais présentent la même activité spécifique; lorsqu'on les recombine, elles catalysent de façon synergique la lyse des suspensions de chitine.

Summary

The purification and concentration of the exochitinase of a streptomycete are described. The procedure consists essentially of a « mass » adsorption on colloidal chitin, followed by washing out and enzymic hydrolysis of the adsorbant, and of two consecutive fractionations by ammonium sulfate. The chitinolytic activity has been concentrated 70 times, with a yield of 27 %.

The purified solution is homogeneous in the ultracentrifuge (molecular weight = 30 000) and also during the tests of solubility in ethanol or ammonium sulfate solutions.

By electrophoresis at pH 8.2 in agar-agar plates, it has been possible to isolate three different chitinases, besides a small fraction of a non-chitinolytic protein (4.5 %). These three chitinases show slightly different electrophoretic patterns; they have however the same specific activities, but, when they are recombined, a synergistic effect on chitin hydrolysis is observed.

BIBLIOGRAPHIE

- ANSON, M. L. (1958). — *J. Gen. Physiol.*, **22**, 79.
 BELOFF, A. and PETERS, R. A. (1945). — *J. of Physiol.*, **103**, 461.
 BERGER, L. R. and REYNOLDS, D. M. (1958). — *Bioch. Bioph. Acta*, **29**, 522.
 GLASER, L. and BROWN, D. H. (1957). — *J. Biol. Chem.*, **228**, 729.
 GORDON, A. H., KEIL, B., SEBESTA, K., KNESSL, O. et SORM, F. (1950). — *Coll. Trav. Chim. Tcheosl.*, **15**, 1.

- GHUYSEN, J. M. (1957).
 HACKMAN, R. H. (1955).
 JERMYN, M. A. (1952).
 JEUNIAUX, Ch. (1951).
 JEUNIAUX, Ch. (1956).
 JEUNIAUX, Ch. (1957).
 JEUNIAUX, Ch. (1957b).
 JEUNIAUX, Ch. (1958).
 JEUNIAUX, Ch. (1959).
 LASKOWSKI, M. (1955). — *Enzymology*, **II**, A.
 LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J. — *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
 SOMOGYI, M. (1952). — *Biochem. J.*, **52**, 107.
 UBIEL, J. et GRABAR, P. (1957).

zymatique de l'adsorption successifs par le sulfate été ainsi concentrée

racentrifugation (poids solubilité dans les manol.

met de séparer, outre concentration totale en s trois chitinases possiblement différentes, cifique; lorsqu'on les rgique la lyse des sus-

the exochitinase of a ure consists essentially n, followed by washing ant, and of two conse- fate. The chitinolytic with a yield of 27 % in the ultracentrifuge during the tests of ate solutions.

gar plates, it has been nases, besides a small (4.5 %). These three phoretic patterns; they es, but, when they are hydrolysis is observed.

ol., 103, 461.

h. Bioph. Acta, 29, 522.

em., 228, 729.

et SORM, F. (1950). — Coll.

GHUYSEN, J. M. (1957). — *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, **65**, 173.

HACKMAN, R. H. (1955). — *Austr. J. Biol. Sc.*, **8**, 530.

JERMYN, M. A. (1952). — *Austr. J. Scient. Res.*, B, **5**, 409 et 433.

JEUNIAUX, Ch. (1951). — *Arch. internat. Physiol.*, **59**, 242.

JEUNIAUX, Ch. (1956). — *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, **64**, 522.

JEUNIAUX, Ch. (1957). — *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, **65**, 135.

JEUNIAUX, Ch. (1957b). — *Biochem. J.*, **66**, 29 p.

JEUNIAUX, Ch. (1958). — *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, **66**, 408.

JEUNIAUX, Ch. (1959). — *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, **67**, 516.

LASKOWSKI, M. (1955). — In COLOWICK, S. P. and NATHAN, N. O., *Methods in Enzymology, II*, Academic Press, New York.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J. (1951). — *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.

SOMOGYI, M. (1952). — *J. Biol. Chem.*, **195**, 19.

LABIEL, J. et GRABAR, P. (1955). — *Ann. Inst. Pasteur*, **90**, 427.