

**Premières étapes de purification d'une chitinase microbienne**, par C. JEUNIAUX, Aspirant du Fonds National de la Recherche Scientifique (*Laboratoires de Biochimie, Université de Liège*).

Cultivés en milieu liquide, contenant de la chitine pure comme unique source de carbone et d'azote, de nombreux *Streptomyces* spp. libèrent une exochitinase (JEUNIAUX, 1951, 1954; REYNOLDS, 1954). Nous avons isolé du sol une souche

particulièrement active (A1) et avons défini les conditions optimales pour la production de chitinase (JEUNIAUX, 1955).

La purification de l'enzyme à partir du filtrat de culture ne peut être abordée sans une concentration préalable. La chitinase étant rapidement détruite, même à des températures relativement basses (20° C.), la concentration par évaporation est pratiquement irréalisable.

Nous avons observé que l'affinité de l'enzyme pour son substrat est très élevée. Elle est maximum au pH 5.2, à force ionique très faible. Au contraire, les autres protéines de la solution enzymatique, en particulier les protéases, n'ont qu'une affinité médiocre pour l'adsorbant chitine. Par adsorptions successives sur chitine pulvérisée, on peut concentrer la chitinase 7 à 8 fois, avec un rendement de 90 % environ, et la purifier environ 10 fois, l'activité étant rapportée aux protéines de la solution, dosées par la microméthode de Folin-Ciocalteu (LOWRY *et al.*, 1951).

La chitinase adsorbée ne peut être éluée que partiellement (15 %), même à pH 9 et à force ionique élevée. La meilleure façon de récupérer l'enzyme est de permettre la lyse enzymatique de l'adsorbant, en l'occurrence le substrat, après quelques heures d'incubation à 36° C. et à pH 5.2. Les produits d'hydrolyse de la chitine sont facilement éliminés au cours des étapes de fractionnement ultérieures.

Celles-ci consistent en :

a) Une précipitation par addition de sulfate ammonique jusqu'à 55 % de la saturation, à 0° C. et à pH 5.2. Le précipité est remis en solution dans un tampon, mélange d'acide citrique 0.1 M et de phosphate bisodique 0.2 M, de pH 7.

b) Une légère dénaturation, à 50° C. pendant 5 minutes, en présence de sulfate ammonique (21 % de la saturation) suivie de précipitation par addition de sulfate ammonique saturé à 0° C. et à pH 5.2, pour atteindre 50 % de la saturation.

La solution enzymatique ainsi obtenue est 40 fois plus riche en chitinase que le filtrat de culture initial. Le rendement est de 50 %. La purification est de 25 fois (par rapport aux protéines) et de 130 fois (par rapport aux protéases).

JEUNIAUX, C. (1955)  
JEUNIAUX, C. (1955)  
JEUNIAUX, C. (1955)  
LOWRY, O. H., ROS  
    *J. biol. Chem.*  
REYNOLDS, D. M.

défini les conditions opti-  
se (JEUNIAUX, 1955).

ir du filtrat de culture ne  
ation préalable. La chiti-  
me à des températures  
centration par évaporation

e l'enzyme pour son sub-  
au pH 5.2, à force ionique  
protéines de la solution  
ases, n'ont qu'une affinité  
ar adsorptions successives  
trer la chitinase 7 à 8 fois,  
la purifier environ 10 fois,  
nes de la solution, dosées  
ocalteu (LOWRY *et al.*,

e éluée que partiellement  
ique élevée. La meilleure  
mettre la lyse enzymatique  
rat, après quelques heures  
Les produits d'hydrolyse  
s au cours des étapes de

de sulfate ammonique  
et à pH 5.2. Le précipité  
, mélange d'acide citrique  
M, de pH 7.

° C. pendant 5 minutes,  
(21 % de la saturation)  
de sulfate ammonique  
dre 50 % de la saturation.

nue est 40 fois plus riche  
initial. Le rendement est  
(par rapport aux protéines)  
éases).

## BIBLIOGRAPHIE

- JEUNIAUX, C. (1951). — *Arch. internat. Physiol.*, **59**, 242.  
JEUNIAUX, C. (1954). — *Mémoires Cl. Sci. Acad. roy. Belg.*, **20**, fasc. 7.  
JEUNIAUX, C. (1955). — *C. R. Soc. Biol., Paris*, **149**, 1307.  
LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. et RANDALL, R. J. (1951). —  
*J. biol. Chem.*, **193**, 265.  
REYNOLDS, D. M. (1954). — *J. gen. Microbiol.*, **11**, 150.