

PURIFICATION DE LA  $\beta$ -(1-4)-N-ACÉTYLHEXOSAMINIDASE  
SÉCRÉTÉE PAR *STREPTOMYCES ALBUS* G ET ACTIVE SUR LES  
PAROIS DE *MICROCOCUS LYSODEIKTICUS*

L. DIERICKX ET J. M. GHUYSEN

Centre National de Production et d'Etude des Substances d'origine Microbienne,  
et Laboratoire de Microbiologie générale et médicale, Université de Liège (Belgique)

(Reçu le 3 juillet, 1961)

SUMMARY

*Purification of  $\beta$ -(1-4)-N-acetylhexosaminidase secreted by Streptomyces albus G.  
and active on cell walls of Micrococcus lysodeikticus*

The N-acetylhexosaminidase (referred as Str) secreted by *Streptomyces albus* G. has been purified by zone electrophoresis. It is slightly less basic than egg-white lysozyme. Its isoelectric point is close to pH 10.3. It has no action on the  $\alpha$ - and  $\beta$ -phenylglycosides of N-acetylglucosamine and on the disaccharides  $\beta$ -(1-4)-di-N-acetylglucosamine (di-N-acetylchitobiose) and  $\beta$ -(1-6)-N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramic acid but it splits the tetrasaccharide  $\beta$ -(1-4)-tetra-N-acetylglucosamine (tetra-N-acetylchitotetraose) in di-N-acetylchitobiose. Contrary to lysozyme, it does not split the tetrasaccharide O- $\beta$ -N-acetylglucosaminyl-(1-6)-O- $\beta$ -N-acetylmuraminyl-(1-4)-O- $\beta$ -N-acetylglucosaminyl-(1-6)- $\beta$ -N-acetylmuramic acid in disaccharide by hydrolyzing the  $\beta$ (1-4) linkage. In those conditions the disaccharide liberated, as well as the tetrasaccharide, from *Micrococcus lysodeikticus* cell walls after incubation with the N-acetylhexosaminidase Str, can not be put down to a further digestion of some tetrasaccharidic fragments.

A chitobiase only active on the  $\beta$ -phenyl-glycoside of N-acetylglucosamine and on the di-N-acetylchitobiose is also present in concentrated culture filtrates. It is a protein acid at pH 6.6.

INTRODUCTION

Le lysozyme du blanc d'oeuf et la préparation F1 obtenue<sup>1</sup> par fractionnement sur Amberlite IRC-50 du filtrat de culture du *Streptomyces albus* G, ont en commun un certain nombre d'activités enzymatiques. Ils libèrent des parois de *Micrococcus lysodeikticus* plusieurs fragments dialysables<sup>1,2</sup> parmi lesquels le disaccharide  $\beta$ -(1-6)-AG-AAM et son dimère, le tétrasaccharide O- $\beta$ -AG-(1-6)-O- $\beta$ -AAM-(1-4)-O- $\beta$ -AG-(1-6)- $\beta$ -AAM. Ils sont également capables de dégrader certains N-acétylglucosaminides de structure connue<sup>2</sup>.

L'une et l'autre de ces préparations enzymatiques présentent cependant certaines

Abréviations: AG, N-acétylglucosamine; AAM, acide N-acétylmuramique.

caractéristiques qui leur sont propres<sup>3</sup>. Le disaccharide AG-AAM est insensible au lysozyme et à FI. Mais, le tétrasaccharide AG-AAM-AG-AAM est un excellent substrat du lysozyme, qui en libère 60 à 70 % de disaccharide, tandis qu'il est très peu sensible à FI.

Le présent travail a eu pour objet de voir si le système responsable des diverses activités N-acétylhexosaminidasiques que manifestent les filtrats de culture du streptomycète, est constitué d'un ou de plusieurs enzymes et d'en préciser certaines caractéristiques physiques et biochimiques.

Dans ce but, le lysozyme du blanc d'oeuf, une préparation concentrée, mais non fractionnée, d'un filtrat de culture du streptomycète et la préparation FI qui en dérive, ont été soumis à des fractionnements par électrophorèse de zone.

#### Technique de l'électrophorèse de zone

Les électrophorèses de zone ont été effectuées en veine aqueuse stabilisée par un gradient de densité en sucrose, au moyen d'une colonne à électrophorèse (Fig. 1) d'un type en U, assez semblable à celle décrite par PARTRIDGE ET ELSDEN<sup>4</sup> qui elle-même, dérive de celle proposée par SVENSSON *et al.*<sup>5</sup>.

#### Caractéristiques de l'appareil

Longueur utile de la veine liquide dans chacune des branches: 54 cm; longueur

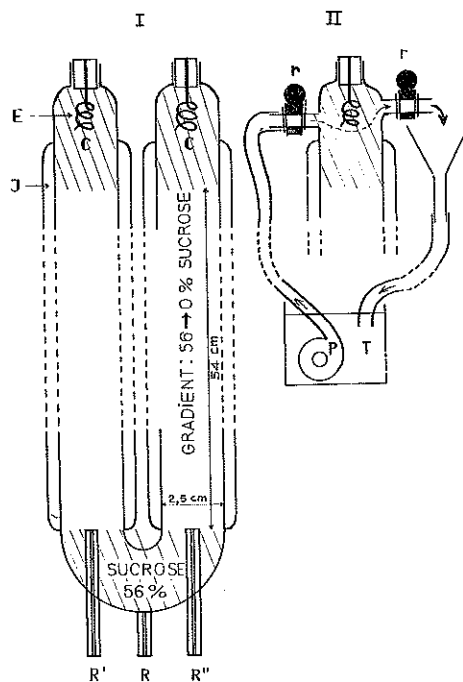


Fig. 1. Schéma de l'appareil à électrophorèse de zone en gradient de sucrose. I. Schéma, vu de face, des deux colonnes. II. Schéma, vu de profil, d'un compartiment à électrode et du système de circulation du tampon. R, R', R'' = robinets de remplissage et de vidange; J, jaquette de thermostatisation; E, électrode de platine; C, compartiment à électrode; r, robinets réglant la circulation du tampon et assurant l'étanchéité des branches lors de leur vidange; T, tampon; P, pompe centrifuge.

totale: 126 cm; diamètre interne: 2.5 cm; gradient en sucrose: de 56 à 0% (p/v); thermostatisation: par circulation externe d'eau maintenue à 4°; électrodes: fil de platine plongeant dans la partie supérieure de chacune des branches du tube en U. A travers celle-ci, une solution aqueuse de tampon s'écoule dans une direction perpendiculaire à l'axe du tube à une vitesse réglable par l'intermédiaire d'une micropompe. Après passage dans chacun des compartiments à électrodes, le tampon est ramené dans un récipient commun, circulant ainsi en circuit fermé.

#### *Dépôt de la substance à analyser*

Celle-ci (jusque 20 mg) est dissoute dans 0.5 à 1.5 ml du tampon. On y ajoute une quantité de sucrose telle qu'après injection au moyen d'une micropipette plongeant dans une des branches du tube, la solution se stabilise à un niveau donné de la veine liquide.

#### *Vidange*

Après électrophorèse, 54 aliquots de 5 ml ont généralement été recueillis au moyen d'un dispositif approprié disposé à la base de la veine liquide utilisée. Le niveau atteint par la substance après électrophorèse a été déterminé par un dosage chimique ou enzymatique effectué sur les aliquots recueillis, chacun de ceux-ci correspondant à une coupe de 1 cm d'épaisseur dans la veine liquide.

#### *Conditions d'électrophorèse*

V/cm, 5 à 8; mA, 50 à 55; durée, 45 h environ; tampons, acide acétique-acétate Na (pH 4-5.5);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH 6-7.5); véronal Na-HCl (pH 8); glycine-NaOH (pH 9);  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  (pH 10). Lorsque l'influence du pH sur la mobilité d'une substance a été étudiée, et afin de réduire les effets éventuellement dus à la nature des électrolytes, les divers tampons ont été utilisés à  $\mu$  0.025 et additionnés de KCl (0.075 M), exception faite cependant pour le tampon pH 10:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  0.025 M, KCl 0.035 M. Lorsque l'électrophorèse a été utilisée comme méthode préparative, le tampon  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ - $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6.6,  $\mu$  0.1 a parfois été utilisé.

#### *Détermination des migrations électrophorétiques*

Le contrôle à la fin de l'électrophorèse du niveau auquel la substance avait été injectée, a été effectué soit indirectement par coélectrophorèse avec une substance standard de migration nulle (glycine) ou connue (colorant) dans les conditions choisies, soit directement par l'établissement d'un repère. Celui-ci a été obtenu en réalisant, dans une des branches du tube en U, le gradient en sucrose de 56 à 0% contenant le tampon choisi et en remplissant l'autre branche, d'abord et jusqu'à mi-hauteur par une solution aqueuse du tampon contenant 56% de sucrose, ensuite et jusqu'en haut par la même solution de tampon dépourvue de sucrose. Le ménisque ainsi formé reste net au moins pendant 48 h d'électrophorèse et tout déplacement qu'il pourrait avoir subi est égal et de signe opposé au déplacement du niveau d'injection dans l'autre branche du tube. Ce procédé a été appliqué en soumettant le méthylorange, qui a servi ultérieurement de substance de référence, à des électrophorèses de 45 h à des pH variant de 2 à 10 (Fig. 2). Dans chaque cas, le colorant a été injecté dans la veine liquide à un niveau correspondant à 20-30% de sucrose et a migré dans le sens des

concentrations décroissantes en sucrose (excepté à pH 2 où la migration est nulle). A chaque pH, la mobilité a été calculée en se basant sur le niveau atteint par la fraction contenant la plus forte concentration en colorant. On observe une brusque variation de densité de charges électriques dans un domaine étroit de pH (3 à 4.5) qui correspond à la zone de virage du colorant et l'existence d'un pK de 3.6 et d'un point isoélectrique à pH inférieur à 2.5.

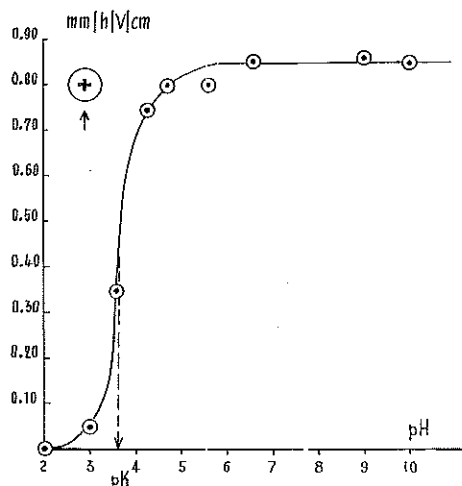


Fig. 2. Mobilité du méthylorange en fonction du pH.

#### *Reproductibilité des migrations électrophorétiques*

Une mobilité de  $0.85 \text{ mm/h/V/cm} \pm 0.05$  a été obtenue pour le méthylorange au cours de 10 électrophorèses à pH compris entre 5 et 10. Les migrations électrophorétiques sont reproductibles pour autant que non seulement l'ampérage, la température et les caractéristiques du gradient en sucrose, mais encore le sens de la migration de la substance et l'importance de son déplacement soient identiques. Une solution de méthylorange et de glycine a été injectée à un niveau correspondant à 31.5% de sucrose, dans les deux branches, contenant l'une et l'autre un gradient de 56 à 0% en sucrose, d'un appareil à électrophorèse similaire à celui décrit mais présentant les différences suivantes: longueur totale: 150 cm; longueur utile du gradient: 60 cm; diamètre interne: 3 cm. Après une électrophorèse de 40 h à pH 6.6 (tampon  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{K}_2\text{HPO}_4$   $\mu$  0.1) les migrations du colorant dans les deux branches ont été déterminées par rapport au niveau occupé par la glycine. Une mobilité de  $1.125 \text{ mm/h/V/cm}$  a été mesurée lorsque le colorant a migré vers des zones de densité décroissante (niveau atteint: 12.5% de sucrose) et de  $0.844 \text{ mm/h/V/cm}$  lorsque le colorant a migré vers des zones de densité croissante (niveau atteint: 46% de sucrose). On constate que (a) une modification même minime des caractéristiques du gradient altère la mobilité (1.125 contre 0.85 avec le premier type d'appareil) (b) que la mobilité est plus grande ou plus petite selon que la substance migre dans des zones de densité en sucrose décroissante ou croissante. Il s'en suit que, dans une courbe donnant les mobilités électrophorétiques en fonction du pH, seul le point isoélectrique a une valeur absolue. De part et d'autre de ce point, les mobilités sont différentes de celles qui

auraient été observées en l'absence de sucrose et devraient, pour être comparées sur cette base, être augmentées d'un terme correctif variable selon l'importance et le gradient en sucrose de la zone traversée.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

##### Dosage de protéines

Le contenu en protéines des fractions recueillies après électrophorèse a été déterminé en appliquant la méthode de Folin et Ciocalteu sur des aliquots de 0.3 à 1 ml. Les résultats sont exprimés en D.O. à 620 m $\mu$ , déduction faite de la coloration due au contenu en sucrose.

##### Enzymes

Ont été utilisés: le lysozyme du blanc d'oeuf, Armour, lot No. 20 793; la préparation Fr antérieurement décrite<sup>1</sup>; une préparation concentrée contenant toutes les activités enzymatiques décelables dans le filtrat de culture du streptomycète et obtenue de la façon suivante: le filtrat de culture (milieu peptone)<sup>6</sup> a été additionné de 0.5% (p/v) d'amberlite IRC-50 XE64 et le pH a été ajusté à 5.3 par addition d'acide acétique (à 0° sous agitation). La résine recueillie a été introduite dans une colonne thermostatée à 0°, puis traitée par passage d'une solution de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> à 15% (p/v). Au fur et à mesure de l'écoulement du tampon, un anneau brun est progressivement élué puis finalement recueilli. Cette fraction a été additionnée, toujours à 0°, de deux fois son volume d'une solution saturée de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Le précipité obtenu a été dialysé contre eau distillée. Le résidu insoluble a été recueilli et lyophilisé. Il constitue la préparation R1.

##### Substrats

Les parois de *M. lysodeikticus* sont celles utilisées lors de recherches antérieures<sup>1-3</sup>. Le disaccharide AG-AAM et le tétrasaccharide AG-AAM-AG-AAM ont été préparés selon la technique décrite<sup>1,3</sup> par élution des chromatogrammes réalisés à partir de la fraction dialysable obtenue après incubation des parois de *M. lysodeikticus* avec la préparation Fr. Les divers N-acétylglucosaminides: la  $\beta$ -phényle-N-acétyl-D-glucosamine ( $\beta$ -phényle-AG), l' $\alpha$ -phényle-N-acétyl-D-glucosamine ( $\alpha$ -phényle-AG), le di-N-acétylchitobiose ( $\beta$ -(1-4)-di-AG ou chitobiose) et le tétra-N-acétylchitotetraose ( $\beta$ -(1-4)-tétra-AG ou di-chitobiose) ont été préparés par le Professeur ROSEMAN. Nous les devons à l'obligeance du Dr. SALTON. Enfin, on a parfois aussi utilisé comme substrat une suspension aqueuse de cellules de *M. lysodeikticus* (cultures de 18 h à 37° sur gélose nutritive en boîte de Roux) et de *Bacillus megaterium* KM (cultures de 18 h à 30° en bouillon, sur machine à agiter).

##### Tests enzymatiques

La sensibilité enzymatique des parois ou des cellules bactériennes a été recherchée par mesure de la disparition de trouble de leurs suspensions selon les techniques habituelles.

La sensibilité enzymatique des hexosaminides a été mesurée par plusieurs procédés. Pour le dosage de l'AG libéré des divers N-acétylglucosaminides de synthèse, il a suffi d'appliquer au mélange incubé la réaction de Morgan et Elson, selon la

technique de REISSIG *et al.*<sup>17</sup>, après un chauffage de 3 min à 100° en borax 0.05 *M*. Aucun de ces substrats, à la dose de 200 µg, ne donne de coloration dans ces conditions, excepté le chitobiose pour lequel on a mesuré une D.O de 0.010 pour 200 µg, alors qu'une même D.O est obtenue à partir de 0.5 µg d'AG libre. Confirmation de la libération d'AG a été obtenue par chromatographie du mélange incubé, en *n*-butanol-acide acétique-eau (3:1:1, v/v/v). Les chromatogrammes ont été révélés par le test des N-acétylhexosamines selon SALTON<sup>8</sup>. Les β- et α-phényle-AG ne sont pas colorés. Le chitobiose et le di-chitobiose donnent une coloration faible (limite de la détection: environ 100 µg) mais leur  $R_F$  permet de les distinguer facilement de l'AG libre ( $R_{FAG} = 0.5$  pour le chitobiose et 0.045 pour le dichitobiose). Après révélation, la tache correspondant à l'AG a été extraite par le mélange acétate d'éthyle-acide acétique-eau proposé par SALTON<sup>8</sup> et la D.O de la solution, mesurée à 585 mµ, a été transformée en quantité d'AG en traitant de façon identique des quantités connues d'AG. Les résultats obtenus par ce procédé ou par application directe de la réaction de Morgan et Elson ont été identiques.

Pour la recherche de la présence éventuelle de chitobiose après incubation enzymatique du di-chitobiose, la solution a été chromatographiée en butanol acétique et les chromatogrammes révélés par le réactif à la diphenylamine-acide trichloroacétique-butanol-méthanol<sup>9,10</sup> (2:5:50:50, p/p/v/v).

Pour la recherche et le dosage du disaccharide AG-AAM libéré du tétrasaccharide AG-AAM-AG-AAM, on a appliqué les procédés déjà décrits<sup>2,3</sup>.

#### RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

##### *Electrophorèse de zone*

1. La Fig. 3 représente la distribution des protéines et de l'activité lytique sur les parois de *M. lysodeikticus*, dans les fractions de la préparation FI recueillies après une électrophorèse de 45 h (4.9 V/cm; 50 mA) à pH 6.45 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KCl). 75 % des protéines sont contenues dans les fractions situées entre les niveaux 15 et 32 cm. Seul le pic situé au niveau 25-29 cm contient l'enzyme actif (mobilité: 0.35 mm/h/V/cm). Il représente 35 % en poids de la préparation.

2. Les fractions contenant les protéines actives, obtenues après plusieurs électrophorèses identiques à celle représentée dans la Fig. 3, ont été réunies, dialysées, lyophilisées et soumises à une nouvelle électrophorèse, dans les mêmes conditions. La Fig. 4 montre que plus des 95 % des protéines se distribuent selon un pic presque parfaitement symétrique (mobilité: 0.35 mm/h/V/cm). Les fractions situées entre les niveaux 39-43 cm ont à nouveau été réunies, dialysées et lyophilisées. Cette préparation constitue la N-acétylhexosaminidase Str (de *Streptomyces*).

3. La Fig. 5 représente la courbe de mobilité de la N-acétylhexosaminidase Str en fonction du pH, obtenue après une série d'électrophorèses de 45 h réalisées à partir de 100 µg d'enzyme pur dans les divers tampons (µ 0.025 + KCl µ 0.075) décrits dans MATÉRIEL ET MÉTHODES. Les mobilités ont été déterminées en se basant sur l'activité enzymatique des fractions recueillies après électrophorèses. Celles-ci ont été effectuées dans une zone de pH où l'enzyme est stable ou n'est que partiellement inactivé (pH 4.7 et 10). Enfin, deux co-électrophorèses de N-acétylhexosaminidase Str et de lysozyme du blanc d'oeuf ont été effectuées aux pH 4.7 et 9 (Fig. 5). Les deux enzymes ont été spécifiquement dosés dans les fractions recueillies grâce à la

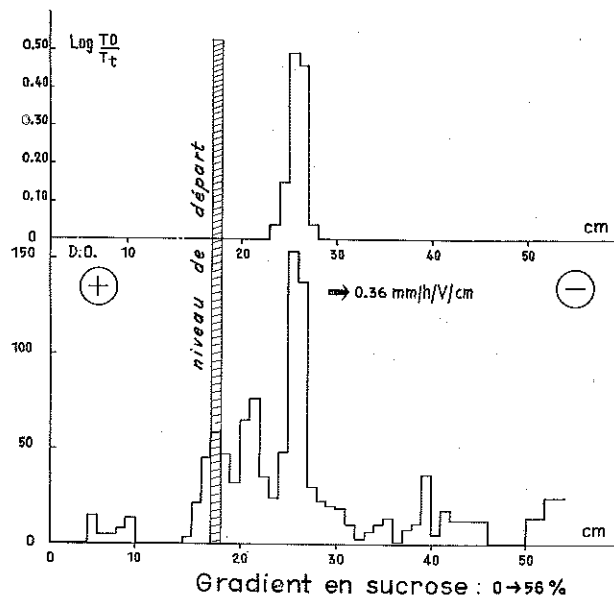


Fig. 3. Electrophorèse à pH 6.45 de 6 mg de la préparation F1, obtenue par fractionnement du filtrat de culture de *Streptomyces albus* G. Partie inférieure: distribution des protéines par fractions de 5 ml correspondant à une épaisseur de la zone liquide égale à 1 cm. Ordonnée: D.O. de la solution après application de la réaction de Folin et Ciocalteu (0.3 ml de chaque fraction, volume final: 3 ml). Abscisse: numéro d'ordre des fractions recueillies. De gauche à droite le gradient varie de 0 à 56% en sucrose. Partie supérieure: activité lytique des fractions correspondantes sur les parois de *M. lysodeikticus*.  $T_0$ , trouble final;  $T_t$ , trouble après 6 min d'incubation (0.05 ml de chaque fraction; volume final, 3 ml; acétate ammonique 0.05 M).

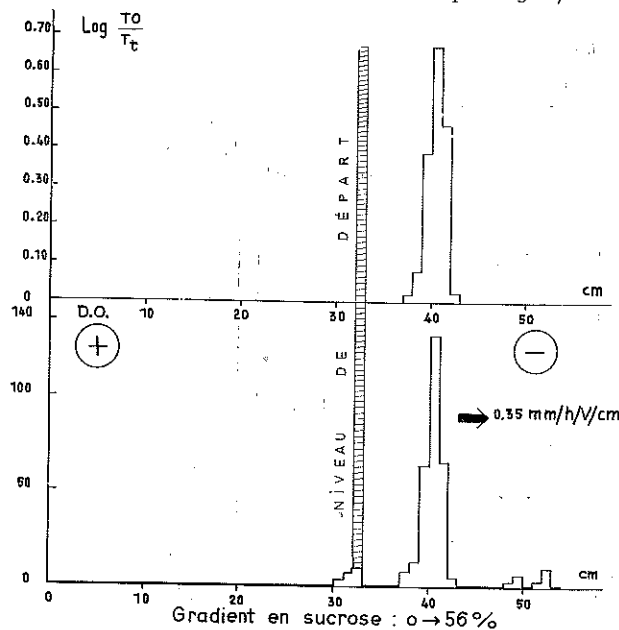


Fig. 4. Electrophorèse à pH 6.45 des fractions actives sur les parois de *M. lysodeikticus* recueillies après une première électrophorèse de la préparation F1. Voir Fig. 3. Le dosage enzymatique a été effectué à partir de 0.1 ml de chaque fraction.

plus grande sensibilité des cellules de *B. megaterium* KM vis-à-vis de la N-acétylhexosaminidase Str et de celles de *M. lysodeikticus* vis-à-vis du lysozyme. Quoique la courbe de la Fig. 5 doit être légèrement différente de celle qui serait obtenue en l'absence d'un gradient en sucrose, il apparaît que la N-acétylhexosaminidase Str est une protéine légèrement moins basique que le lysozyme du blanc d'oeuf, qu'elle exerce un pouvoir tampon élevé entre pH 6.5 et 9 et qu'elle possède un point isoélectrique aux environs de pH 10.3.

4. 20 mg de la préparation R1 (filtrat concentré de culture du streptomycète) ont été soumis à une électrophorèse de 45 h à pH 6.6 ( $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$ ,  $\mu$  0.1; 6.35 V/cm; 50 mA). La Fig. 6 montre la distribution des protéines obtenue dans ces conditions. La N-acétylhexosaminidase Str se situe entre les niveaux 40-43 cm (mobilité: 0.39 mm/h/V/cm). L'activité sur les parois de *M. Lysodeikticus* étant propor-

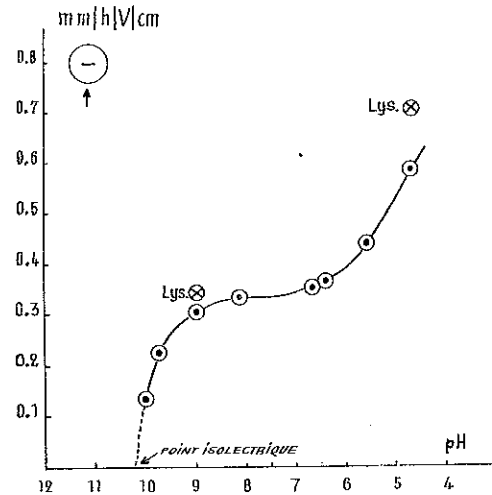


Fig. 5. Mobilité de la N-acétylhexosaminidase Str et du lysozyme du blanc d'oeuf,  $\otimes$ — $\otimes$ , en fonction du pH.

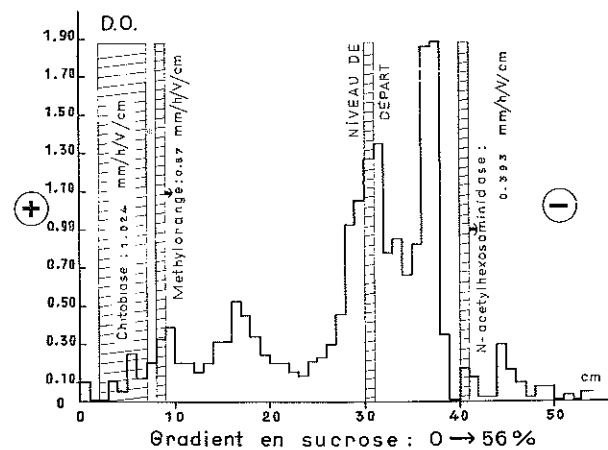


Fig. 6. Electrophorèse à pH 6.6 du filtrat concentré, mais non fractionné, de culture de *Streptomyces albus* G. Voir Fig. 3, partie inférieure.



tionnelle au contenu en protéines des trois fractions, cet enzyme représente, en poids, environ 1,5 % de la préparation.

5. 2 mg de lysozyme du blanc d'oeuf ont été soumis à une électrophorèse identique à celle subie par la préparation R1. Les fractions actives sur les parois de *M. lysodeikticus* ont été recueillies, réunies, dialysées et lyophilisées.

#### Activités N-acétylhexosaminidasiques des diverses préparations enzymatiques

Le Tableau I résume les activités des diverses préparations enzymatiques et indique la nature des produits de dégradation éventuellement formés.

1. Aucune des préparations n'est active sur l' $\alpha$ -phényle-AG, ni sur le disaccharide AG-AAM.

TABLEAU I

PRODUITS DE DÉGRADATION OBTENUS PAR ACTION SUR LES PAROIS DE *M. lysodeikticus* ET SUR DES HEXOSAMINIDES DE STRUCTURE CONNUE, DU LYSOZYME DU BLANC D'OEUF ET DE DIVERSES PRÉPARATIONS ENZYMATIQUES OBTENUES À PARTIR DES FILTRATS DE CULTURE DE *Streptomyces albus* G

Substrats	Préparations enzymatiques			
	Préparation R <sub>1</sub> (filtrat concentré)	N-acétylhexosami- nidase Str	Chitobiase	Lysozyme (avant ou après électrophorèse)
$\alpha$ -Phényle-AG	o	o	o	o
$\beta$ -Phényle-AG	AG	o	AG	o
Chitobiose	AG	o	AG	o
Di-chitobiose	AG et chitobiose	Chitobiose	o	Chitobiose
$\beta$ -(1-6)-AG-AAM*	o	o	o	o
$\beta$ -(1-6)-AG-AAM $\frac{\beta(1-4)}$	Di-saccharide (trace)	o	o	Di-saccharide
$\beta$ -(1-6)-AG-AAM**				
Parois de <i>M. lysodeikticus</i>	Di- et tétra-saccharide	Di- et tétra-saccharide	o	Di- et tétra-saccharide

\* Disaccharide.

\*\* Tétracaccharide.

2. 200  $\mu$ g de  $\beta$ -phényle-AG ou de chitobiose (0.02 ml) ont été incubés avec 30  $\mu$ g de la préparation R1 (0.02 ml) (volume final: 0.06 ml; acétate ammonique: 0.05 M). Après 18 h d'incubation à 37°, le dosage, direct ou après chromatographie, a montré que 80  $\mu$ g d'AG avaient été libérés à partir du  $\beta$ -phényle-AG et 15  $\mu$ g à partir du chitobiose. En examinant l'activité des 54 fractions recueillies après électrophorèse de la préparation R1 (Fig. 6), l'enzyme actif sur l'un et l'autre de ces substrats a été repéré, avec un étalement assez considérable, entre les niveaux 2-9 cm. Ces fractions ont été réunies, dialysées et lyophilisées et le résidu a été dissous dans 0.2 ml d'eau. En incubant 0.02 ml de cette solution avec 200  $\mu$ g des mêmes substrats (mêmes conditions que plus haut), 80  $\mu$ g et 15  $\mu$ g d'AG ont à nouveau été libérés, respectivement du  $\beta$ -phényle-AG et du chitobiose. L'enzyme responsable est désigné sous le nom de chitobiase. C'est une protéine acide à pH 6.6 avec une mobilité d'environ 1 mm/h/V/cm. L'activité des fractions comprises entre les niveaux 2-9 cm n'étant pas proportionnelle à leur teneur en protéines, la chitobiase ne peut pas être considérée comme pure et sa proportion, en poids de la préparation R1, n'a pu être calculée.

La N-acétylhexosaminidase Str et le lysozyme sont inactifs sur le chitobiose ou la  $\beta$ -phényle-AG (jusque 40  $\mu$ g d'enzyme pour 200  $\mu$ g de substrat; mêmes conditions d'incubation que ci-haut).

3. 30  $\mu\text{g}$  de la préparation R<sub>1</sub> libèrent également 15  $\mu\text{g}$  d'AG à partir de 200  $\mu\text{g}$  de di-chitobiose. Après incubation, toujours dans les mêmes conditions, la solution a été chromatographiée. La révélation des chromatogrammes par le réactif diphénylamine-trichloracétique a montré la présence, outre d'AG libre, d'une certaine quantité de chitobiose. La digestion du di-chitobiose par la préparation R<sub>1</sub> jusqu'au stade AG libre est due à l'action successive de la N-acétylhexosaminidase Str qui le dégrade d'abord en chitobiose. Le chitobiose est ensuite hydrolysé en AG libre sous l'action de la chitobiase. Celle-ci, utilisée isolément, est sans action sur le di-chitobiose.

Le lysozyme, avant ou après électrophorèse, dégrade également le di-chitobiose en chitobiose, sans libération d'AG. Sur la base de l'intensité de la coloration rose donnée par le réactif diphénylamine-trichloracétique appliqué aux chromatogrammes, le di-chitobiose est plus sensible à la N-acétylhexosaminidase Str qu'au lysozyme.

4. En incubant 600  $\mu\text{g}$  du tétrasaccharide AG-AAM-AG-AAM avec 6  $\mu\text{g}$  de lysozyme (avant ou après électrophorèse) (volume final 0.12 ml; acétate ammonique 0.05 M; 37°; 18 h), 60 à 70% du disaccharide AG-AAM sont libérés. Dans les mêmes conditions, 90  $\mu\text{g}$  de la préparation R<sub>1</sub> libèrent 6.6% de disaccharide. Cette activité ne peut être attribuée à la N-acétylhexosaminidase Str. En effet, 12  $\mu\text{g}$  de cette préparation ne libèrent aucune quantité décelable de disaccharide (soit moins de 3  $\mu\text{g}$ ) à partir de 600  $\mu\text{g}$  de tétrasaccharide. De même, la chitobiase, ainsi que toutes les fractions recueillies après électrophorèse de la préparation R<sub>1</sub>, sont dépourvues d'activité vis-à-vis de ce substrat.

TABLEAU II

RENDEMENT EN DI- ET TÉTRA-SACCHARIDES LIBÉRÉS PAR MILLIGRAMME DE PAROIS DE *M. lysodeikticus* APRÈS INCUBATION AVEC LE LYSOZYME ET LA N-ACÉTYLHEXOSAMINIDASE Str

Enzyme	AG $\beta(1-6)$ AAM	AG $\beta(1-6)$ AAM $\beta(1-4)$ AG $\beta(1-6)$ AAM
Lysozyme	90 $\mu\text{g}$	66 $\mu\text{g}$
N-acétylhexosaminidase Str	44 $\mu\text{g}$	100 $\mu\text{g}$

5. 15 mg de parois de *M. lysodeikticus* ont été incubés avec 75  $\mu\text{g}$  de N-acétylhexosaminidase Str ou de lysozyme (volume final 1.5 ml; acétate ammonique: 0.05 M; 18 h; 37°). Le disaccharide AG-AAM et le tétrasaccharide AG-AAM-AG-AAM libérés ont été dosés sélectivement (Tableau II). On constate que les deux préparations enzymatiques libèrent des parois bactériennes du di- et du tétra-saccharide, que la somme des deux oligosaccharides représente dans chaque cas environ 15% en poids, des parois mises en oeuvre, que la proportion disaccharide/tétrasaccharide est proche de 0.5 après action de la N-acétylhexosaminidase Str et proche de 2 après action du lysozyme.

## CONCLUSIONS ET DISCUSSION

Les filtrats de culture du *Streptomyces albus* G. contiennent une chitobiase qui hydrolyse le  $\beta$ -phénylglucoside de la N-acétylglucosamine et le chitobiose mais non le di-chitobiose. C'est une protéine acide à pH 6.6. Des propriétés identiques ont été décrites par BERGER ET REYNOLDS<sup>11</sup> pour la chitobiase sécrétée par un *Streptomyces griseus* cultivé en présence de chitine. Les deux chitobiases ne sont cependant pas

identiques; celle de *S. griseus* étant plus active sur le chitobiose que sur le  $\beta$ -phénylglycoside alors que l'inverse est observé avec la chitobiase étudiée dans le présent travail. La chitobiase ne joue aucun rôle dans la digestion des parois de *M. lysodeikticus* par les filtrats de cultures de *Streptomyces albus* G.

La digestion de ces parois bactériennes est due à la présence d'un enzyme basique à pH neutre, et dont le point isoélectrique se situe aux environs de pH 10.3. Il est désigné sous le nom de N-acétylhexosaminidase Str. Comme le lysozyme du blanc d'oeuf, la N-acétylhexosaminidase Str est inactive sur le  $\beta$ -phénylglycoside, sur le chitobiose et le disaccharide AG-AAM, et elle hydrolyse le di-chitobiose en chitobiose, ce qui confirme sa nature  $\beta$ -(1-4)-N-acétylhexosaminidasique<sup>2</sup>. Contrairement au lysozyme, cependant, la N-acétylhexosaminidase Str est complètement inactive sur le tétrasaccharide dans lequel deux unités disaccharidiques  $\beta$ -(1-6)-AG-AAM sont réunis par une liaison  $\beta$ (1-4). Cependant, le lysozyme et la N-acétylhexosaminidase Str libèrent des parois de *M. lysodeikticus* presque la même quantité totale de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique, sous forme d'unités di- et tétrasaccharidiques en proportions différentes. La purification de la N-acétylhexosaminidase Str, dépourvue de toute trace d'activité sur le tétrasaccharide, vérifie, sans équivoque possible, l'hypothèse émise antérieurement<sup>3</sup> selon laquelle le disaccharide et le tétrasaccharide sont les produits finaux de la digestion des troncs poly-N-acétylhexosaminidiques constitutifs des parois de *M. lysodeikticus*. Ceci pourrait suggérer une "hétérogénéité", dont la nature reste à préciser, dans la structure de ces troncs poly-N-acétylhexosaminidiques pour laquelle une répétition d'unités tétra-saccharidiques a été proposée<sup>2</sup>.

La faible activité du filtrat de culture concentré de *Streptomyces albus* G. sur le tétrasaccharide AG-AAM-AG-AAM suggère la présence d'une troisième N-acétylhexosaminidase dont l'activité serait comparable à celle du lysozyme du blanc d'oeuf. Elle n'a pu être retrouvée après électrophorèse, soit qu'elle ait migré en dehors des limites du gradient en sucrose, soit, plus vraisemblablement, qu'étant présente à l'état de trace dans la préparation originale, elle ne soit plus décelable lorsqu'elle a diffusé dans un certain volume de la veine liquide. La chitobiase et la N-acétylhexosaminidase Str, reconcentrées après électrophorèse, restent en tous cas dépourvues de toute trace d'activité de ce type.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions le Dr. M. R. J. SALTON pour son don généreux de N-acétylglucosaminides. L'un de nous (J. M. G.) est associé du Fonds National de la Recherche Scientifique, Belgique.

#### RÉSUMÉ

La N-acétylhexosaminidase (désignée par Str), secrétée par *Streptomyces albus* G, a été purifiée par électrophorèse de zone. C'est une protéine légèrement moins basique que le lysozyme du blanc d'oeuf. Son point isoélectrique est proche de pH 10.3. Elle est dépourvue d'action sur les  $\alpha$ - et  $\beta$ -phényl-glycosides de la N-acétylglucosamine et sur les disaccharides  $\beta$ -(1-4)-di-N-acétylglucosamine (di-N-acétylchitobiose) et  $\beta$ -(1-6)-N-acétylglucosaminyle-acide N-acétylmuramique, mais elle dégrade le tétrasaccharide

$\beta$ -(1-4)-tétra-N-acétylglucosamine (tétra-N-acétylchitotétraose) en di-N-acétylchitobiose. Contrairement au lysozyme, elle ne dégrade pas le tétrasaccharide O- $\beta$ -N-acétylglucosaminyle-(1-6)-O- $\beta$ -N-acétylmuramyle-(1-4)-O- $\beta$ -N-acétylglucosaminyle-(1-6)- $\beta$ -N-acide N-acétylmuramique en disaccharide par hydrolyse de la liaison  $\beta$ (1-4).

Ces deux derniers tétra- et di-saccharides sont cependant libérés des parois de *Micrococcus lysodeikticus* lors de leur digestion par la N-acétylhexosaminidase Str. Le disaccharide ne peut donc provenir d'une hydrolyse plus poussée de certains fragments tétrasaccharidiques préalablement libérés.

Une chitobiase uniquement active sur le  $\beta$ -phényle-glycoside de la N-acétylglucosamine et le di-N-acétylchitobiose a été décelée dans les filtrats de culture concentrés du streptomycète. C'est une protéine acide à pH 6.6.

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> J. M. GHUYSEN ET M. R. J. SALTON, *Biochim. Biophys. Acta*, 40 (1960) 462.
- <sup>2</sup> M. R. J. SALTON ET J. M. GHUYSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 45 (1960) 355.
- <sup>3</sup> J. M. GHUYSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 40 (1960) 473.
- <sup>4</sup> S. M. PARTRIDGE ET D. F. ELSDEN, *Biochem. J.*, 79 (1961) 26.
- <sup>5</sup> H. SVENSSON, L. HAGDAHL ET K. B. LERMER, *Sci. Tools*, 4 (1957) 1.
- <sup>6</sup> J. M. GHUYSEN, *Arch. intern. physiol. et biochim.*, 65 (1957) 174.
- <sup>7</sup> J. L. REISSIG, J. L. STROMINGER ET L. F. LÉLOIR, *J. Biol. Chem.*, 217 (1955) 959.
- <sup>8</sup> M. R. J. SALTON, *Biochim. Biophys. Acta*, 34 (1959) 308.
- <sup>9</sup> L. HOUGH, J. K. N. JONES ET W. H. WADMAN, *J. Chem. Soc.*, (1950) 1702.
- <sup>10</sup> J. M. GHUYSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 50 (1961) 413.
- <sup>11</sup> L. R. BERGER ET D. M. REYNOLDS, *Biochim. Biophys. Acta*, 29 (1958) 522.

*Biochim. Biophys. Acta*, 58 (1962) 7-18