

## Purification et propriétés de deux ( $1 \rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-glucosidases *d'Aspergillus roseus* \*

Guilane Vodjdani, Paul Le Dizet et Fahrettin Petek

UPR-37, CNRS-UFR Biomédicale, 45, Rue des Saints Pères, F-75006 Paris (France)

(Reçu le 22 août 1991; accepté sous form revisée le 26 janvier 1992)

### ABSTRACT

Two constitutive ( $1 \rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-glucosidases from *Aspergillus roseus* were highly purified (275- and 1059-fold) on DEAE-Sepharose and hydroxyapatite columns. Electrophoresis on poly(acrylamide) gels showed for each enzyme, a single protein band containing an enzymic activity that hydrolyses 4-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside and cellulose. Classical cellulose hydrolysis was obtained by the combined action of three proteins, an endocellulase, an exocellulase, and a  $\beta$ -D-glucosidase. In the case of *A. roseus*, the purified  $\beta$ -D-glucosidases are able to hydrolyze the cellulose substrate giving D-glucose as the only end product. Physico-chemical features of these glycosylated enzymes such as optimum pH, molecular weight,  $K_m$ , and substrate specificity were determined.

### SOMMAIRE

Deux ( $1 \rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-glucosidases ( $\beta$ -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21) constitutives d'*Aspergillus roseus* ont été hautement purifiées (275 et 1059 fois) sur des colonnes de DEAE-Sepharose et d'hydroxyapatite. L'électrophorèse sur gel de poly(acrylamide) montre pour chaque enzyme, une seule bande protéique capable d'hydrolyser aussi bien le 4-nitrophénol- $\beta$ -D-glucopyranoside que la cellulose. L'hydrolyse de la cellulose est classiquement obtenue par l'action combinée de trois protéines: une endocellulase, une exocellulase et une  $\beta$ -D-glucosidase. Dans le cas d'*A. roseus*, les  $\beta$ -D-glucosidases purifiées hydrolysent le substrat cellulose et libèrent du D-glucose comme unique produit de la réaction. Les caractéristiques physico-chimiques de ces enzymes glycosylées, tels que pH optimum, poids moléculaire,  $K_m$  et spécificité de substrat sont déterminées.

### INTRODUCTION

La dégradation enzymatique de la cellulose est effectuée surtout par des microorganismes dits cellulolytiques, particulièrement chez les champignons *T. viride*<sup>1,2</sup>, *T. Koningii*<sup>3,4</sup>, *M. verrucaria*<sup>5</sup> et *S. pulverulentum*<sup>6</sup> et *A. niger*<sup>7</sup>, mais aussi chez les levures<sup>8</sup>. Les larves des insectes xylophages sont également capables

Correspondence to: Professor F. Petek, UPR-37, CNRS-UFR Biomédicale, 45, Rue des Saints Pères, F-75006 Paris.

\* Dédié au Professeur Jean Moutreuil.

de dégrader la cellulose<sup>9</sup>. L'hydrolyse de la cellulose par les champignons est la résultante de trois réactions combinées, successives, dues à des enzymes induites: les endo-cellulases, une exocellulase et une  $\beta$ -D-glucosidase. Un concept C<sub>1</sub>-C<sub>x</sub> a été proposé<sup>10</sup> où deux composantes enzymatiques sont distinguées. Il a été montré<sup>11</sup> que la composante C<sub>1</sub> est une (1 → 4)- $\beta$ -D-glucane cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91) qui attaque la cellulose par une extrémité en libérant du cellobiose. Cette observation est confirmée par d'autres auteurs<sup>12-15</sup> qui obtiennent l'enzyme sous une forme pure. La composante C<sub>x</sub> ou (1 → 4)- $\beta$ -D-glucane glucanohydrolase (EC 3.2.1.4), une endoglucanase, agit sur la cellulose en hydrolysant au hasard des liaisons internes, libérant ainsi des fibres courtes de cellulose<sup>16-18</sup>. Enfin, les  $\beta$ -D-glucosidases (EC 3.2.1.21) libèrent le D-glucose à partir du cellobiose et des cellodextrines de faibles poids moléculaires<sup>1,19-22</sup>. L'hypothèse d'un synergisme enzymatique dans la dégradation de la cellulose a été émise par plusieurs auteurs<sup>1,2,21,23</sup>: l'activité de base de chacune des enzymes pures étant faible cette activité réapparaît lorsque chaque composante est redistribuée dans les proportions de l'extrait brut. Enfin plus récemment, il a été montré qu'une quatrième composante enzymatique intervient également dans la dégradation de la cellulose<sup>24,26</sup>: la (1 → 4)- $\beta$ -D-glucane glucohydrolase ou exo-(1 → 4)- $\beta$ -D-glucosidase (EC 3.2.1.74) qui est capable de libérer du D-glucose à partir de chaînes de (1 → 4)- $\beta$ -D-glucane.

Au cours de nos recherches nous avons remarqué que les extraits d'*Aspergillus roseus* dégradaient la cellulose en ne libérant que des résidus de D-glucose. Il nous a donc paru intéressant d'étudier les enzymes responsables de cette dégradation, à savoir les  $\beta$ -D-glucosidases qui sont largement répandues parmi les végétaux, les champignons, les levures, les bactéries et les tissus animaux. Ces enzymes se sont révélées être la plupart du temps des glycoprotéines<sup>27</sup>. Ainsi dans les deux  $\beta$ -D-glucosidases d'*Aspergillus niger* (p. mol.: 340 000 et 40 800) la fraction glycanique représente 8% de la molécule<sup>28,29</sup>. Le travail présenté décrit la purification de deux  $\beta$ -D-glucosidases d'*Aspergillus roseus*, leurs propriétés physico-chimiques et leurs spécificités enzymatiques.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Culture d'Aspergillus roseus*.—Le développement de la culture s'effectue d'abord à 29° pendant 48 h en milieu solide (peptone 10 g, D-glucose 40 g, Agar 20 g/L), puis à la température ambiante pendant quelques jours. La conservation à 4° pendant un mois est suivie de repiquages sur milieu frais. Les cultures en milieu liquide se font dans le milieu de Perlman<sup>30</sup> contenant 3% (p/v) de D-glucose. La culture d'*A. roseus* se développe à 29° pendant 7 jours sur milieu additionné de D-glucose (24 g/L, p/v).

*Préparation des substrats naturels*.—Les oligosaccharides sont préparés à partir de la poudre de cellulose Whatman (CF11). Une étude exhaustive concernant l'action des différents acides en fonction du temps, de la température et de la

concentration a permis de déterminer les conditions optimales nécessaires pour l'obtention du plus grand nombre possible d'oligosaccharides en quantités relativement importantes. Ainsi, la poudre de cellulose Whatman (200 g) est dispersée dans 2,5 M HCl (2 L) maintenu sous agitation pendant 3 h à 30°. Après dilution au demi avec de l'eau distillée, la suspension est filtrée puis neutralisée par NaHCO<sub>3</sub>; elle est concentrée à 60° sous pression réduite, le NaCl est éliminé par passage de la solution partiellement concentrée, sur une colonne de charbon-Célite (1:1, p/p) avec l'eau comme effluent. Les oligosaccharides sont élusés par l'éthanol à 20% (v/v), puis concentrés à quelques mL, et déposés sur une colonne de Sephadex G-15 (2,7 × 140 cm). La séparation des oligosaccharides réalisée par l'eau distillée, en utilisant un collecteur de fraction, est contrôlée avec le réactif à l'anthrone-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,2% dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pur p/v). Les oligosaccharides apparaissent à la sortie de la colonne en fonction de leurs p. mol. décroissants. Ainsi, ont été séparés successivement: les cellobextrines solubles mélangées à des heptasaccharides et les hexa-, penta-, tétra- et tri-saccharides. La pureté des différentes fractions est contrôlée par chromatographie sur couche mince (ccm).

Pour l'obtention de la cellulose partiellement dégradée, la poudre de cellulose Whatman (CF11, 100 g) est dispersée dans 0,5 M HCl (1 L) maintenu sous agitation à 30° pendant 1, 8, 34 et 100 h. Après centrifugation des différents hydrolysats, les culots sont lavés à l'eau distillée et séchés sous vide.

*Mesure des activités enzymatiques.*—*Dosage du 4-nitrophénol.* Le milieu réactionnel comprend le 4-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside ( $\beta$ -D-Glc<sub>p</sub>O4NP) (concentration finale de 8 mM; 50 μL) du tampon McIlvaine<sup>31</sup> (pH 4,5) et l'extrait enzymatique (50 μL). L'incubation est faite à 37° puis la réaction est arrêtée en alcalinisant le milieu par addition de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 mL) à 0,2 M. La libération du 4-nitrophénol s'accompagne d'une coloration dont l'intensité est mesurée à 400 nm. L'unité  $\beta$ -glucosidasique est définie par la quantité d'enzyme qui libère 1 μmol de glucose/min à 37°.

*Dosage des sucres réducteurs*<sup>32,33</sup>. La cellulose (partiellement dégradée ou non) (5 mg) est ajoutée (125 μL) au milieu contenant le tampon McIlvaine<sup>31</sup> (25 μL; pH 4,5) et l'extrait enzymatique (50 μL). L'incubation est faite à 37° sous agitation magnétique pendant des temps variables et arrêtée par addition d'eau (250 μL), puis le milieu est centrifugé pendant 4 min à 12 000 rpm. Une portion (250 μL) du surnageant est prélevée pour le dosage (10–50 μg d'hexose libérés) selon la technique modifiée dans notre laboratoire. Dans des tubes à essai contenant la solution à doser, on introduit le réactif de Somogyi dilué au demi (0,5 mL). Les tubes sont agités, bouchés et chauffés pendant 20 min dans un bain-marie bouillant. Après refroidissement, le réactif de Nelson (0,25 mL) et l'eau distillée (4 mL) sont ajoutés. L'intensité de la coloration est évaluée au spectrophotomètre à 650 nm 10 min plus tard.

*Dosage du D-glucose par la D-glucose oxydase.* L'incubation est effectuée à 37° pendant des durées variables dans les conditions suivantes: le substrat (40 μL), le tampon McIlvaine<sup>31</sup> (20 μL), le pH variant selon la fraction enzymatique et la

solution enzymatique ( $40 \mu\text{L}$ ). La réaction est arrêtée par chauffage et addition d'une solution de D-glucose oxydase<sup>34</sup> (3 mL). La coloration se développe entre 30 et 40 min à la température ambiante et l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 610 nm. L'unité  $\beta$ -D-glucosidasique est définie par la quantité d'enzyme qui libère une  $\mu\text{mol}$  de D-glucose/min à 37°.

*Dosages des protéines.* La technique de Sedmak et Grossberg<sup>35</sup> a été employée avec la sérum-albumine bovine comme standard.

*Techniques chromatographiques.* — *Chromatographie sur couche mince (ccm).* Les oligosaccharides obtenus par hydrolyse enzymatique et chimique ont été identifiés par chromatographie ascendante sur gel de silice F 1500 (Schleicher et Schüll) en utilisant le solvant propanol–éthanol–acétate d'éthyle–pyridine–acide acétique–eau (7:3:3:2:2:3, v/v). La révélation des chromatogrammes est réalisée par pulvérisation du réactif à la  $\beta$ -naphtylamine suivie, après séchage à 100° pendant 5 min, d'une nouvelle pulvérisation d'une solution à 2% (v/v) de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré dans l'éthanol absolu.

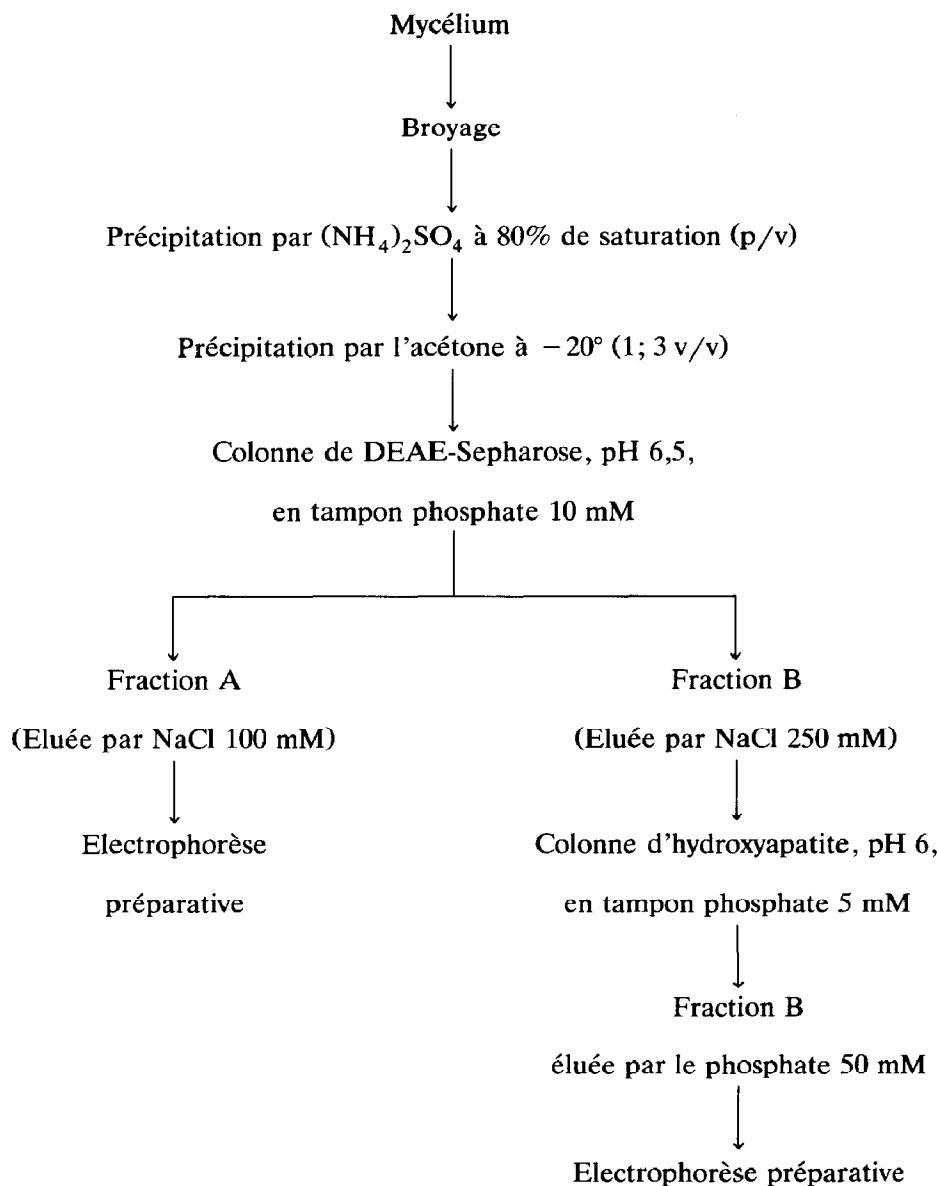
*Chromatographie sur colonne.* Une colonne de DEAE-Sépharose précyclée (2,5 × 15 cm) est équilibrée par un tampon  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10 mM de pH 6,5. L'élution se fait en utilisant un gradient discontinu de force ionique croissante de NaCl. Les fractions sont recueillies à 4°. Un enregistreur permet de suivre l'apparition des différents pics.

De petites colonnes d'hydroxyapatite (1,8 × 7 cm) sont préparées, puis équilibrées avec du tampon phosphate de potassium 5 mM à pH 6. La capacité de charge maximale de la colonne est de 4 mg de protéine/mL d'hydroxyapatite. Un gradient discontinu de tampon (5, 50, et 300 mM) permet l'élution des protéines. Les fractions sont recueillies comme pour le DEAE-Sépharose.

*Techniques électrophorétiques.* — *Electrophorèse analytique sur gel de poly(acrylamide).* Des gels d'acrylamide à 7,5% ont été utilisés<sup>36</sup>. Pour repérer la bande active, un des gels est découpé en segments de 1 ou 2 mm (selon les gels) et l'activité  $\beta$ -glucosidasique est déterminée par incubation avec  $\beta$ -D-Glc pO4NP. Un autre gel est coloré par une solution de Bleu de Coomassie à 0,25% dans méthanol–acide acétique–eau (9:2:9, v/v), puis décolorée dans méthanol–acide acétique–eau (25:7:68, v/v). On peut ainsi localiser la bande protéique active.

*Electrophorèse préparative sur gradient discontinu de poly(acrylamide)*<sup>37</sup>. Les gels sont formés d'un gradient discontinu d'acrylamide 7,5; 6% ou bien 8,5:7,5:6,5:5,5%, soit d'une concentration unique d'acrylamide 5,5 ou 9%, et ceci selon l'enzyme à étudier.

*Détermination des poids moléculaires.* L'évaluation du p. mol. des  $\beta$ -D-glucosidases est réalisée, d'une part par électrophorèse sur gel natif de poly(acrylamide)<sup>38</sup> (5,5:6,5:7,5:8,5%), la sérum-albumine bovine servant de référence, d'autre part sur gel de poly(acrylamide) en présence de SDS<sup>39</sup>. Dans ce dernier cas, le p. mol des enzymes a été estimé en comparant leurs migrations relatives à celles des marqueurs protéiques de p. mol connu: phosphorylase a (94 000); sérum-albumine bovine (68 000); trypsine (23 000).



Schema 1. Étapes de purification des  $\beta$ -D-glucosidases d'*A. roseus*.

*Purification des enzymes du mycélium* (Schéma 1).—Après 7 jours de culture à  $30^\circ$  sur milieu liquide, le mycélium est séparé par filtration puis lavé avec du  $\text{NaCl}$  (150 mM). Le mycélium ( $\sim 6$  g) est mis en suspension dans une solution de  $\text{NaCl}$  (150 mM; 100 mL), broyé (Ultra-Turrax) à  $4^\circ$  pendant des temps très courts (30 s) avec des intervalles de temps de refroidissement (10 min). Toutes les opérations ultérieures seront effectuées à  $4^\circ$ . Le broyat est centrifugé pendant 15 min à 19 000

rpm et le surnageant (extrait brut) est amené à 80% (p/v) de saturation en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Après centrifugation (20 min; 19 000 rpm), le précipité est dissous dans l'eau (10 mL) et additionné de l'acétone (3 vol) à  $-20^\circ$ . Après une nouvelle centrifugation (10 min; 19 000 rpm), le culot de la précipitation acétonique est repris par l'eau (15 mL) et dialysé pendant une nuit contre du tampon  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ – $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (10 mM; pH 7,5). Le trouble apparaissant au cours de la dialyse est éliminé par centrifugation. L'extrait brut est déposé sur colonne de DEAE-Sépharose. L'élution de la première activité  $\beta$ -glucosidasique est effectuée par passage de tampon phosphate (10 mM; pH 6,5) additionné de NaCl (100 mM) (fraction contenant l'enzyme A). Cette fraction correspond à 38% de l'activité  $\beta$ -glucosidasique totale récupérée. L'activité  $\beta$ -glucosidasique restante est éluee par le tampon  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (10 mM; pH 6,5) contenant du NaCl (250 mM) (fraction contenant l'enzyme B). La fraction A (37–40 mL), dialysée pendant une nuit contre de l'eau distillée, est concentrée dans des gaines de collodion (Ultra-Gaines, Schleicher et Schüll) jusqu'à quelques mL. La fraction B est dialysée contre le tampon d'équilibrage ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 5 mM; pH 6) puis elle est déposée sur une colonne d'hydroxyapatite comme indiqué dans la partie expérimentale. Un pic contenant une activité  $\beta$ -glucosidasique est élue à la concentration de 50 mM (fraction contenant l'enzyme B). Les contenus des tubes renfermant les activités, regroupés et dialysés pendant une nuit contre de l'eau distillée, sont concentrés dans des gaines de collodion jusqu'à un volume compris entre 3 et 5 mL.

A chaque étape de la purification, les dosages et vérifications suivants ont été effectués: mesure d'activité enzymatique avec  $\beta$ -D-Glc $p$ O4NP, avec la cellulose partiellement dégradée ("100 h") suivie d'une vérification du produit de la réaction par ccm, dosage des protéines, électrophorèse analytique et repérage des bandes à activité  $\beta$ -glucosidasique. Les enzymes A et B purifiées sont dépourvues de tout autre contaminant cellulolytique. Les résultats obtenus ont permis l'établissement du Tableau I de purification. Enfin une électrophorèse préparative a été réalisée sur les Fractions A et B. La fraction A a été déposée sur un gel en gradient discontinu d'acrylamide (7,5 et 6%). La bande protéique active a été repérée dans le gel à 6%. Après élution et concentration de cette enzyme, une électrophorèse analytique montre une seule bande protéique correspondant à l'activité  $\beta$ -glucosidasique (Fig. 1A). La purification de la Fraction B s'effectue en faisant un gel uniforme à 9%, et là également l'électrophorèse analytique ne montre qu'une seule bande active (Fig. 1B).

## RÉSULTATS

*Propriétés et caractéristiques des  $\beta$ -glucosidases d'*A. roseus*.*—Les propriétés de chacune des enzymes isolées du mycélium ont été étudiées et comparées. Les expériences ont été réalisées soit avec l'enzyme pure à la sortie de l'électrophorèse préparative, soit avec l'enzyme purifiée débarrassée de tout contaminant cellulolytique.

TABLEAU I

Purification des  $\beta$ -D-glucosidases A et B d'*A. roseus* <sup>a</sup>

Étape	Volume (mL)	Activité totale (U)	Protéine totale (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Facteur de purification
Extrait brut	136	30,7	342,72	0,09	1
Précipitation (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 80%	10	57,4	78,9	0,73	8,1
Précipitation acétonique	21,5	208,2	27,3	7,63	84,8
Enzyme A (DEAE-Sepharose 100 mM NaCl)	2,05	18,8	0,978	19,22	274,6
Enzyme B (Hydroxyapatite 50 mM phosphate)	2,9	24,3	0,255	95,3	1058,9

<sup>a</sup> Les activités enzymatiques sont mesurées sur la cellulose partiellement dégradée ("100 h"); le D-glucose libéré est dosé par la réaction à la D-glucose oxydase. Une unité  $\beta$ -D-glucosidasique est la quantité d'enzyme qui libère une  $\mu$ mol de glucose/min à 37°.

**Poids moléculaire.** Les p. mol. déterminés par électrophorèse sur gel de poly(acrylamide)<sup>38</sup> sont pour l'enzyme A de 110 000 alors qu'il avoisine 68 000 pour B. L'électrophorèse en condition dénaturante<sup>39</sup> ne montre qu'une seule

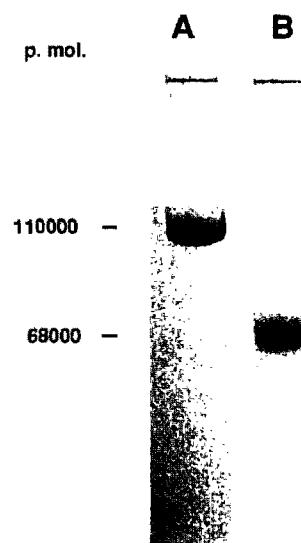


Fig. 1. Les  $\beta$ -glucosidases A et B d'*A. roseus*, purifiées, révélées par coloration au Bleu de Coomasie après migration électrophorétique en condition native. Le p. mol. de chacune des enzymes est indiqué à gauche de la photographie.

bande pour l'enzyme A correspondant à un p. mol. de ~ 96 000. Par contre, pour l'enzyme B on observe deux bandes correspondant à des p. mol. de 78 000 et ~ 66 000. La forme à 78 000 est majoritaire. Ces résultats permettent de supposer que les deux enzymes A et B sont monomériques. Par ailleurs, l'enzyme B semble constituée de deux enzymes identiques mais différents peut être par leur degré de glycosylation.

*pH optimum.* Les activités ont été déterminées entre pH 3,0 et 7,5 en utilisant comme substrat le  $\beta$ -D-Glc<sub>p</sub>O4NP et le cellobiose. La  $\beta$ -glucosidase A présente un pH optimum d'activité à 4 vis à vis du glucoside et 4,5 vis à vis du cellobiose. L'enzyme B quant à elle, a son pH optimum d'activité à 4,8 et à 5,2 respectivement selon les substrats.

*Nature glycoprotéïnique des  $\beta$ -glucosidases.* Celle-ci a été démontrée par affinité de fixation sur la concanavaline A-Ultrogel. Après 1 h de contact enzyme-Con A, le surnageant ne contient plus d'activité enzymatique vis à vis du  $\beta$ -D-Glc<sub>p</sub>O4NP. Le culot de l'enzyme-Con A est remis en suspension dans une solution de tampon phosphate 10 mM (pH 7,5) contenant du NaCl (0,15 M) et méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside 0,2 M. Après centrifugation, l'activité enzymatique ( $\beta$ -D-Glc<sub>p</sub>O4NP) est récupérée dans le surnageant. Les enzymes A et B ont été fixées puis libérées à 100%.

*Mesure de  $K_m$  pour les oligosaccharides.* Les constantes de Michaelis ( $K_m$ ) ont été calculées pour les deux enzymes<sup>40</sup>. Pour ces mesures nous avons utilisé les oligosaccharides isolés et purifiés à partir de la cellulose (voir partie expérimentale). Ces résultats sont mentionnés dans le Tableau II. Une baisse de la valeur des  $K_m$  est observée avec l'augmentation de la taille de l'oligosaccharide pour l'enzyme B. Avec l'enzyme A il n'y a pas de variations nettes des valeurs de  $K_m$  quelle que soit la taille des substrats. De plus, l'analyse des représentations graphiques a montré que l'enzyme B présente une légère activation avec les concentrations élevées en substrat  $\beta$ -D-Glc<sub>p</sub>O4NP (5 mM), alors que l'enzyme A est inhibée par les fortes concentrations en  $\beta$ -D-Glc<sub>p</sub>O4NP (jusqu'à 2,5 mM). Par contre, on

TABLEAU II

$K_m$  des  $\beta$ -glucosidases A et B d'*A. roseus* pour divers substrats<sup>a</sup>

Substrat	Enzyme A	Enzyme B
Cellobiose	4,7	2
Cellotriose	5	3,07
Cellotétraose	4,7	3,7
Cellopentaose	4	1,2
Oligosaccharides (dp 6–12)	3,3	1,3
4-Nitrophenyl- $\beta$ -D- glucopyranoside	1,33	0,5
Gentibiose	3,6	2,4

<sup>a</sup> Les valeurs sont exprimées en mM et calculées à partir de la représentation graphique de Lineweaver-Burk.

TABLEAU III

Activités spécifiques des  $\beta$ -glucosidases A et B vis-à-vis de divers substrats oligosaccharidiques <sup>a</sup>

Substrat	Enzyme A	Enzyme B
4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside	10067	1107
Cellobiose	2163	615
Cellotriose	1370	756
Cellotétraose	1522	664
Cellopentaose	1300	968
Oligosaccharides (dp 6–12)	1346	825
Dextrines solubles	360	686
Cellulose "100 h"	60	100
Cellulose "34 h"	3,6	10,4
Cellulose "8 h"	1,8	4,4
Cellulose "1 h"	1,1	3,2
Cellulose microcristalline	1,04	3,4
Gentiobiose	4400	961
Amygdaline	3520	673
Laminarane	5250	496
Lichénane	279	885

<sup>a</sup> Les valeurs sont exprimées en U/mg de protéine. L'unité  $\beta$ -glucosidasique est la quantité d'enzyme qui libère une  $\mu$ mol de D-glucose/min à 37°.

observe toujours une inhibition des deux enzymes pour les fortes concentrations en substrats naturels, celle-ci variant graduellement en fonction de la taille de l'oligosaccharide. Ainsi avec le cellobiose les enzymes sont inhibées dans les zones de très grande concentrations (10 mM pour A; 4 mM pour B). Avec le cellotriose et ses homologues supérieurs, il faut opérer avec des concentrations plus faibles voire même avec de grandes dilutions (2 mM puis 1,6 mM pour A; 1 mM pour B). Avec les oligosaccharides (dp 6 à 12) les concentrations en substrat deviennent très faibles (0,8 mM pour A et 0,66 mM pour B) et se rapprochent des situations où l'enzyme se trouve au contact de substrats insolubles et n'est jamais saturée.

*Spécificité enzymatique sur divers substrats.* Les enzymes A et B ont été mises en présence de différents substrats: la cellulose et ses dérivés [liaisons  $\beta$ -D-Glc p-(1 → 4)-D-Glc p]; la laminarane [liaisons  $\beta$ -D-Glc p-(1 → 3)-D-Glc p]; la lichénane [30% de liaisons  $\beta$ -D-Glc p-(1 → 3)-D-Glc p et 70% de liaisons  $\beta$ -D-Glc p-(1 → 4)-D-Glc p] le gentiobiose [ $\beta$ -D-Glc p-(1 → 6)] et l'amygdaline (D-mandelonitrile-2-yl  $\beta$ -D-gentiobioside). Les activités spécifiques obtenues sont mentionnées dans le Tableau III. La  $\beta$ -glucosidase A hydrolyse préférentiellement les oligosaccharides de faible poids moléculaire alors que la  $\beta$ -glucosidase B attaque également la cellulose. Par ailleurs, l'enzyme A se montre très active sur des substrats tels que laminarane, amygdaline et gentiobiose. La fraction B hydrolyse ces substrats, mais dans de plus faibles proportions. Ces  $\beta$ -glucosidases présentent dans l'ensemble un large spectre de spécificité. Elles sont capables d'hydrolyser non seulement des liaisons osidiques  $\beta$ -D-(1 → 4), mais également des liaisons  $\beta$ -D-(1 → 6 et 1 → 3).

Les enzymes A et B hydrolysent facilement la liaison  $\beta$ -D-(1 → 6) du gentiobiose mais l'attaque est plus faible sur l'amygdaline, vraisemblablement, en raison de la présence du groupement aglycone. L'enzyme A est 10 fois plus active que la B sur la laminarane qui est constituée par des unités D-glucose liées en  $\beta$ -(1 → 3). Par contre, la lichénane qui renferme 70% de liaisons  $\beta$ -(1 → 4) et 30% de liaisons  $\beta$ -(1 → 3) est très peu attaquée par A et plus facilement attaquée par B. Il semble donc que l'enzyme B ait une préférence pour les liaisons de type  $\beta$ -(1 → 4). Tout en ayant une large spécificité, l'enzyme A est nettement plus active sur les substrats où les résidus de D-glucose sont liés en  $\beta$ -(1 → 3) et  $\beta$ -(1 → 6). Pour chaque réaction enzymatique nous avons vérifié par ccm la nature du produit libéré au cours de la réaction et seul le glucose a été détecté. D'autres substrats tels que la carboxyméthylcellulose (CMC) et la pectine de pomme n'ont été hydrolysés par aucune des deux enzymes étudiées. Enfin, une expérience de dégradation de la cellulose pure (microcristalline, Whatman) a été entreprise, en faisant agir l'extrait enzymatique purifié sous agitation à 37°. Après quelques jours de contact, le milieu réactionnel était centrifugé et la cellulose dégradée restante remise en suspension avec de l'extrait frais. Après une dizaine d'opérations, on note une dégradation de 50% par rapport au poids initial de cellulose. Dans cette expérience également nous avons montré que le seul produit de la réaction n'était effectivement que du D-glucose.

## DISCUSSION

La première partie de cette étude comprend l'isolement et la purification de deux  $\beta$ -glucosidases d'*Aspergillus roseus*. Les cultures ont été effectuées sur milieu contenant du D-glucose comme unique source de carbone. Lorsque la source de carbone était la cellulose ou la CMC, il n'y avait qu'une très faible croissance. Les  $\beta$ -glucosidases détectées dans l'extrait cytoplasmique sont constitutives. La  $\beta$ -glucosidase A représente plus du tiers de l'activité totale du milieu intracellulaire. Les facteurs de purification des  $\beta$ -glucosidases A et B, calculés par rapport à leur activité sur cellulose sont de 275 et 1059 respectivement. Tout au long des premières étapes de purification de ces enzymes nous avons remarqué que l'activité totale vis à vis de la cellulose augmentait, ce qui rendait impossible l'établissement de pourcentages de récupération de l'activité enzymatique avec la cellulose comme substrat. La faible valeur de l'activité totale de l'extrait brut peut être attribuée à l'existence d'inhibiteurs qui seraient éliminés au cours de la précipitation acétonique.

La deuxième partie du travail concerne les propriétés et les caractéristiques des  $\beta$ -glucosidases d'*A. roseus*. L'enzyme A est monomérique et elle correspond à une seule forme protéique. L'enzyme B ne présente qu'une seule bande en électrophorèse sur gel de poly(acrylamide) dans les conditions non dissociantes, mais deux bandes dans des conditions dénaturantes, dont les poids moléculaires excluent leur identification à des sous-unités. Il existerait donc, deux formes moléculaires

distinctes de l'enzyme B, toutes deux actives sur les mêmes substrats. Ces isoenzymes étant glycosylées, cela pourrait modifier leur migration soit sur colonne, soit sur gel de poly(acrylamide), comme l'ont déjà observé Willcox et Renwick<sup>41</sup>. Leurs pH optimaux se situent entre 4–4,5 et 4,6–5,2 respectivement (avec les substrats  $\beta$ -D-Glc pO4NP et cellobiose). Bien que les pH optimaux varient selon les sources de  $\beta$ -glucosidases, dans la plupart des cas, ces valeurs se situent entre pH 4 et 6<sup>25,26</sup>.

Lorsque les différentes fractions enzymatiques sont mises en présence de concentrations variables en oligosaccharides solubles (dérivés de la cellulose), nous obtenons une série de valeurs de  $K_m$  qui diminuent avec l'augmentation de la taille de l'oligosaccharide pour l'enzyme B. Avec la  $\beta$ -glucosidase A nous n'observons pas de variations importantes des valeurs de  $K_m$  quelle que soit la taille des substrats. Il en est de même lorsque la  $\beta$ -glucosidase de *T. viride* est mise en présence d'oligosaccharides de tailles croissantes, mais à partir du cellopentaose la valeur du  $K_m$  augmente<sup>42</sup>. Quand le degré de polymérisation dépasse 6–12 il n'est plus possible de mesurer des valeurs de  $K_m$ , l'inhibition se manifestant même dans des zones de grande dilution en substrat. Les  $\beta$ -glucosidases d'*A. roseus* ayant la particularité de pouvoir hydrolyser des substrats cellulosiques insolubles, les inhibitions observées sont en accord avec le fait que ces enzymes ne sont jamais saturées par leurs substrats insolubles. Ces inhibitions ont été également signalées pour la  $\beta$ -glucosidase de *B. theobromae* avec  $\beta$ -D-Glc pO2NP jusqu'à 0,2 mM<sup>20</sup>, et pour la  $\beta$ -glucosidase de *T. viride*<sup>43</sup> avec le cellobiose et le cellotétratraose. Dans notre cas, la différence d'inhibition constatée fait apparaître, pour la  $\beta$ -glucosidase B, un caractère plus "cellulolytique" que pour la  $\beta$ -glucosidase A. Ce caractère est confirmé par les expériences de spécificité effectuées sur divers substrats. Nous avons remarqué, en effet, que l'enzyme B hydrolysait plus facilement la cellulose.

Du point de vue des spécificités, les glucosidases présentent, en général, une spécificité anomérique stricte. Cette spécificité existe également en fonction de la nature de l'ose. Toutefois des exceptions existent; ainsi, la  $\beta$ -glucosidase de l'émulsine d'amande hydrolyse aussi bien les  $\beta$ -D-glucopyranosides que les  $\beta$ -D-galactopyranosides<sup>44</sup>. Par contre, la spécificité vis-à-vis des liaisons osidiques est moins restrictive. Ainsi une même glucosidase peut attaquer une ou plusieurs des liaisons (1 → 2), (1 → 3), (1 → 4) et (1 → 6). C'est ce que l'on observe dans le cas des  $\beta$ -glucosidases d'*A. roseus* où l'enzyme A hydrolyse préférentiellement la liaison  $\beta$ -D-(1 → 3) de la laminarane et la liaison  $\beta$ -D-(1 → 6) du gentiobiose et de l'amygdaline, mais attaque faiblement la lichénane où 70% des liaisons sont  $\beta$ -D-(1 → 4). Quant à la  $\beta$ -glucosidase B elle hydrolyse mieux la lichénane que la laminarane. Etant plus spécifique des liaisons  $\beta$ -(1 → 4), il est donc compréhensible qu'elle attaque plus aisément la cellulose.

L'hydrolyse de la cellulose et de ses dérivés, par les  $\beta$ -glucosidases d'*A. roseus* ne libère que du D-glucose; il en est de même pour l'exoglucanase de *T. viride*<sup>1</sup> qui hydrolyse 10% de la cellulose, en libérant uniquement du D-glucose. Cette enzyme, d'un poids moléculaire de 76 000, et d'un pH optimum de 4,9, est l'enzyme qui se

rapprocherait le plus d'une des isoenzymes B (p. mol. 78 000) d'*A. roseus*. Nous avons désigné les enzymes purifiées d'*A. roseus* comme des  $\beta$ -glucosidases sur la base de leur produit d'hydrolyse qui est le D-glucose. Contrairement aux exocellulases qui ne sont pas capables d'hydrolyser le cellobiose ni le  $\beta$ -D-Glc pO4NP, les  $\beta$ -glucosidases que nous décrivons possèdent une très forte affinité pour ces substrats. Néanmoins ces  $\beta$ -glucosidases ne correspondent pas à l'enzyme qui intervient classiquement dans la dernière étape d'hydrolyse de la cellulose, puisqu'elles sont capables à elles seules de libérer du D-glucose à partir de la cellulose.

#### REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Madame J. Doly pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail, et Madame F. Maugain pour son aide dans la préparation du manuscrit.

#### RÉFÉRENCES

- 1 L.H. Li, R.M. Flora et K.W. King, *Arch. Biochem. Biophys.*, 111 (1965) 439–447.
- 2 K. Selby et C.C. Maitland, *Biochem. J.*, 104 (1967) 716–724.
- 3 G. Halliwell, *Biochem. J.*, 95 (1965) 270–281.
- 4 T.M. Wood, *Biochem. J.*, 109 (1968) 217–227.
- 5 G. Halliwell, *Biochem. J.*, 79 (1961) 185–192.
- 6 M. Steamer, K.-E. Eriksson et B. Pettersson, *Eur. J. Biochem.*, 59 (1975) 607–613.
- 7 P.L. Hurst, J. Nielsen, P.A. Sullivan et M.R. Shepherd, *Biochem. J.*, 165 (1977) 33–41.
- 8 A.T.H. Abd-El-Al et H.J. Phaff, *Biochem. J.*, 109 (1968) 347–360.
- 9 C. Chararas, R. Eberhard, J.-E. Courtois et F. Petek, *Insect Biochem.*, 13 (1983) 213–218.
- 10 E.T. Reese, R.G.H. Siu et H.S. Levinson, *J. Bacteriol.*, 59 (1950) 485–497.
- 11 T.M. Wood et S.I. McCrae, *Biochem. J.*, 128 (1972) 1183–1192.
- 12 G. Halliwell et M. Griffin, *Biochem. J.*, 135 (1973) 587–594.
- 13 L.E.R. Berghem et L.G. Pettersson, *Eur. J. Biochem.*, 37 (1973) 21–30.
- 14 T. Kanda et K. Nisizawa, *Methods Enzymol.*, 160 (1988) 403–408.
- 15 M.G. Shepherd, A.L. Cole et C.C. Tong, *Enzymol.*, 160 (1988) 300–307.
- 16 G. Halliwell et M. Riaz, *Biochem. J.*, 116 (1970) 35–42.
- 17 G. Halliwell et N. Halliwell, *Biochim. Biophys. Acta*, 992 (1989) 223–229.
- 18 T. Yamanobe et Y. Mitsuishi, *Agric. Biol. Chem.*, 54 (1990) 301–307.
- 19 G.M. Umezurike, *Biochim. Biophys. Acta*, 227 (1971) 419–428.
- 20 G.M. Umezurike, *Biochem. J.*, 145 (1975) 361–368.
- 21 T.M. Wood, *Biochem. J.*, 115 (1969) 457–464.
- 22 V. Deshpande et K.E. Eriksson, *Methods Enzymol.*, 160 (1988) 424–431.
- 23 M. Tanaka, M. Taniguchi, R. Matsuno et T. Kamikubo, *Methods Enzymol.*, 160 (1988) 251–259.
- 24 A.P. Sinitsyn et A.A. Klösov, *Biokhimiya*, 46 (1981) 202–213.
- 25 T.M. Wood et S.I. McCrae, *Carbohydr. Res.*, 110 (1982) 291–303.
- 26 N.A. Rodionova, I.M. Tavobilov, L.I. Martinovich, T.S. Buachidze, G.I. Kvesitadze et A.M. Bezbordov, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 9 (1987) 239–250.
- 27 R.A. Ugalde, R.J. Staneloni et L.F. Leloir, *Eur. J. Biochem.*, 113 (1980) 97–103.
- 28 M.J. Rudick et A.D. Elbein, *J. Biol. Chem.*, 248 (1973) 6506–6513.
- 29 M.J. Rudick et A.D. Elbein, *J. Bacteriol.*, 124 (1975) 534–541.
- 30 D. Perlman, *Methods Enzymol.*, 22 (1971) 70–80.
- 31 T.C. Mac Ilvaine, *J. Biol. Chem.*, 49 (1921) 183–188.
- 32 N. Nelson, *J. Biol. Chem.*, 153 (1944) 375–380.

- 33 M. Somogyi, *J. Biol. Chem.*, 160 (1945) 61–68.
- 34 W. Werner, H.G. Rey et H. Wielinger, *Z. Anal. Chem.*, 252 (1970) 224.
- 35 J.J. Sedmak et S.E. Grossberg, *Anal. Biochem.*, 79 (1977) 544–552.
- 36 J.V. Maizel, Jr., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121 (1964) 382–390.
- 37 J. Doly et F. Petek, *J. Chromatogr.*, 137 (1977) 69–81.
- 38 J.L. Hedrick et A. Smith, *Arch. Biochem. Biophys.*, 126 (1968) 155–165.
- 39 K. Weber et M. Osborn, *J. Biol. Chem.*, 244 (1969) 4406–4412.
- 40 H. Lineweaver et D. Burk, *J. Am. Chem. Soc.*, 56 (1934) 658–666.
- 41 P. Willcox et A.G.C. Renwick, *Eur. J. Biochem.*, 73 (1976) 579–590.
- 42 K.W. King, *Hakko Kogaku Zasshi (J. Ferment. Technol.)*, 43 (1965) 79–94.
- 43 L.E.R. Berghem et L.G. Petterson, *Eur. J. Biochem.*, 46 (1974) 295–305.
- 44 A.K. Grover et R.J. Cushley, *Biochim. Biophys. Acta*, 482 (1977) 109–124.