

CHROM. 12,418

## FRACTIONNEMENT D'UNE PRÉPARATION CELLULASIQUE DE *TRICHODERMA VIRIDE* PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ SUR CELLULOSE RÉTICULÉE

M. WEBER, M. J. FOGLIETTI et F. PERCHERON

Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 4 Avenue de l'Observatoire, 75006 Paris (France)

(Reçu le 6 juillet 1979)

---

### SUMMARY

*Affinity chromatography of a cellulase complex from Trichoderma viride on cross-linked cellulose*

A procedure involving affinity chromatography on cross-linked cellulose was developed for separating enzymatic components of a cellulase complex from *Trichoderma viride*. The exoglucanases [ $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-D-glucane cellobiohydrolase and cellobiase] passed through the column in the equilibrating buffer, whereas the endoglucanases were fixed in the same conditions. Five endo- $\beta$ (1  $\rightarrow$  4)-glucanases were fractionated by elution with stepwise increasing concentrations of carboxymethylcellulose added to the buffer. These endoglucanases were differentiated by their substrate specificities and by their reaction pattern toward carboxymethylcellulose, cellulose, insoluble celloextrins and oligosaccharides.

---

### INTRODUCTION

La dégradation de la cellulose est réalisée par des systèmes enzymatiques hétérogènes comprenant un certain nombre d'enzymes cellulolytiques agissant en synergie: endo- $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-glucanases ou 1  $\rightarrow$  4- $\beta$ -D-glucane 4-glucanohydrolases (EC 3.2.1.4), exo- $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-glucanases ou 1  $\rightarrow$  4- $\beta$ -D-glucane glucosylhydrolases (EC 3.2.1.74) et 1  $\rightarrow$  4- $\beta$ -D-glucane cellobiohydrolase<sup>1-4</sup>. Le plus souvent, ces cellulases sont associées à une cellobiase (EC 3.2.1.21). La grande hétérogénéité des préparations cellulases rend complexe le fractionnement de leurs différents composants et la plupart des techniques nécessitent la mise en oeuvre de nombreuses étapes faisant appel, soit à la filtration sur gel, soit à la chromatographie sur échangeurs d'ions.

Au cours de précédents travaux, nous avons décrit la séparation de deux types de polysaccharidases par chromatographie d'affinité sur leur substrat réticulé: endopolygalacturonase<sup>5</sup> et  $\alpha$ -amylases<sup>6</sup>. Nous décrivons ici l'application de cette technique au fractionnement d'une préparation cellulase de *Trichoderma viride*.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

### *Préparation enzymatique*

Cellulase de *Trichoderma viride* (Boehringer, Mannheim, R.F.A.).

### *Substrats*

Cellulose microcristalline en poudre (Whatman, Maidstone, Grande Bretagne); Carboxyméthylcellulose très polymérisée et peu substituée (Blanose R 195, Novacel, France); D-(+)-cellobiose (Sigma, St-Louis, Mo., États-Unis).

### *Cellodextrines insolubles et solubles*

Après acétolyse de la cellulose pendant une nuit à la température du laboratoire selon le procédé de Hess et Dziengel<sup>7</sup> et désacétylation par le méthylate de sodium, les oligosaccharides de degré de polymérisation élevé sont précipités par l'éthanol. Les oligosaccharides solubles sont fractionnés par chromatographie sur colonne de Séphadex G-15.

### *Détermination de l'activité enzymatique*

Une solution de carboxyméthylcellulose à 0.2% ou de cellobiose 0.05 M en tampon acétate 0.02 M, pH 4.6, est utilisée comme substrat. L'activité enzymatique est déterminée, après incubation à 30°, par dosage des sucres réducteurs libérés (exprimés en glucose) au moyen de la technique de Nelson et Somogyi<sup>8,9</sup>. L'activité enzymatique est exprimée en unités correspondant à la quantité d'enzyme libérant 1  $\mu$ mole de glucose/min.

L'estimation du glucose libéré est effectuée par la méthode à la glucose-oxydase<sup>10</sup>.

Lorsqu'un substrat insoluble est utilisé (cellulose microcristalline, cellodextrines insolubles), 5 mg de substrat sont ajoutés au milieu et l'incubation est effectuée sous agitation à 30°.

### *Identification des produits d'hydrolyse enzymatique*

La séparation des produits d'hydrolyse enzymatique est effectuée par chromatographie sur couche mince de silice, à l'aide du solvant: *n*-propanol-acétate d'éthyle-éthanol absolu-acide acétique-pyridine-eau (7:3:3:2:2:4). La révélation est effectuée par chauffage après pulvérisation d'acétone sulfurique à 5%.

### *Support chromatographique*

La réticulation de la cellulose est effectuée par action de l'épichlorhydrine en milieu alcalin suivant une modification de la technique de Kuniak et Marchessault<sup>11</sup>.

Le degré de réticulation de la cellulose, dont dépendent les qualités du support chromatographique, est conditionné par les quantités de cellulose, de soude et d'épichlorhydrine présentes dans le milieu réactionnel ainsi que par la température et la durée de la réaction. Les conditions opératoires retenues doivent permettre d'obtenir un polysaccharide suffisamment réticulé pour ne pas être hydrolysé par les endo- $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-glucanases mais possédant encore des séquences de résidus glycopyranosyles non substitués, susceptibles d'être reconnus par ces enzymes qui se fixeront spécifiquement sur le support insoluble.

Différentes préparations se sont révélées efficaces quant à la fixation de l'activité endocellulase. Pour des raisons pratiques (gonflement, vitesse d'écoulement), nous avons retenu le protocole décrit ci-dessous.

La cellulose microcristalline est traitée par de la soude en solution aqueuse à 10% (rapport molaire soude/cellulose = 0.6, calculé d'après la concentration en anhydroglucose) et par de l'épichlorhydrine (rapport molaire épichlorhydrine/cellulose = 5). Le mélange est maintenu sous agitation continue 15 min à la température du laboratoire, puis 1 h à 50°. Le milieu réactionnel est ensuite neutralisé par de l'acide acétique. Le polysaccharide réticulé est ensuite lavé à l'eau puis déshydraté par l'acétone et pulvérisé en fines particules.

#### Fractionnement du mélange cellulasique

Une colonne (28 cm × 2 cm) constituée par 10 g de cellulose réticulée est équilibrée avec un tampon acétate 0.02 M, pH 4.6 à 4°. 1 ml de solution tamponnée contenant 50 mg de préparation enzymatique et 5 mg de sérum albumine destinée à simuler des protéines contaminantes, est adsorbé sur la colonne. Un lavage de la colonne est réalisé avec le tampon d'équilibre jusqu'à ce que l'éluat ne présente plus d'absorption à 280 nm.

Le fractionnement des activités endo- $\beta$ -(1 → 4)-glucanasiques est ensuite réalisé grâce à une élution par palier avec des solutions de carboxyméthylcellulose de concentrations croissantes = 0.5, 1.75, 2 g·l<sup>-1</sup> dans le tampon d'équilibre de la colonne (pH 4.6) et 3 g·l<sup>-1</sup> dans un tampon pH 5.6 correspondant au pH optimum de l'activité enzymatique retrouvée dans cette fraction.

#### RÉSULTATS

La chromatographie de la préparation cellulasique de *Trichoderma viride* sur cellulose réticulée (Fig. 1) nous a permis: (1) de séparer les activités exo- et endoglucanasiques; (2) de fractionner les activités endoglucanasiques retenues sur la colonne.



Fig. 1. Chromatographie d'une préparation cellulasique de *Trichoderma viride* sur cellulose réticulée. Colonne de 28 × 2 cm. Elution par Tampon d'équilibre (A) et par solution tamponnée de carboxyméthylcellulose à: 0.5 g·l<sup>-1</sup> (B); 1.75 g·l<sup>-1</sup> (C); 2 g·l<sup>-1</sup> (D) et 3 g·l<sup>-1</sup> (E). D.O. à 280 nm, ● = pouvoir réducteur apparu après incubation sur carboxyméthylcellulose; ▲ = pouvoir réducteur apparu après incubation sur cellulose.

### Séparation des activités *exo-* et *endoglucanasiques*

La fixation de l'activité endo- $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-glucanasique est maximale à pH 4.6, pH voisin du pH optimum des endocellulases.

La cellulose réticulée constitue un support spécifique pour la fixation des endo- $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-glucanasases. En effet, les activités *exo-* $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-glucanasique et cello-biasique présentes dans la préparation de *Trichoderma viride* sont éluées lors du lavage de la colonne par le tampon d'équilibrage, en même temps que les protéines contaminantes.

Ceci a pu être vérifié par incubation sur cellulose, cellodextrines et cellobiose en présence du premier pic d'éluion, incubation suivie de l'estimation du pouvoir réducteur apparu, de celle du glucose libéré et d'une chromatographie des milieux réactionnels.

Cette première fraction conduit avec chacun des substrats à la seule libération de glucose. Ce type d'hydrolyse pouvant être obtenu, soit par action d'une  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-D-glucane glucohydrolase, soit par action d'une  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-D-glucane cellobiohydrolase et d'une cellobiase associées, nous avons soumis cette première fraction à une filtration sur Ultrogel AcA-34 (LKB, Stockholm, Suède). Ceci nous a permis de séparer une glucane cellobiohydrolase, hydrolysant la cellulose avec libération de cellobiose, et une cellobiase; l'action simultanée de ces deux enzymes conduisant à la libération de glucose.

### Fractionnement des activités endo- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glucanasiques

Différents essais d'éluion des activités endo- $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-glucanasiques par modification du pH (pH 3 à pH 7.5) ou par augmentation de la force ionique de l'éluant (tampons additionnés de KCl 0 à 2 M) se sont révélés inefficaces.

Lors d'un fractionnement d'une préparation cellulosique de *Trichoderma koningii* par chromatographie d'affinité sur colonne de cellulose, Halliwell et Griffin<sup>12</sup> ont pu utiliser avec succès une diminution de la force ionique de l'éluant (0.02 à 0 M). Ce protocole, appliqué pour l'éluion des activités endo- $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-glucanasiques fixées sur la cellulose réticulée s'est avéré inefficace.

L'utilisation de solutions tamponnées de cellobiose (2 M) permet l'éluion de l'activité endo- $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-glucanasique, mais en un pic très étalé sans séparation des diverses enzymes.

Des essais d'éluion par des solutions tamponnées d'hydroxyéthylcellulose se sont également révélés négatifs.

Par contre, le fractionnement de cinq activités endo- $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-glucanasiques a pu être réalisé grâce à une éluion par palier avec des solutions tamponnées de carboxyméthylcellulose de concentrations croissantes: 0.5, 1.75, 2 et 3 g·l<sup>-1</sup> (Fig. 1). Au cours de cette éluion, l'enzyme attaque partiellement la carboxyméthylcellulose et les oligosaccharides libérés doivent être séparés de la protéine enzymatique par passage de l'éluat sur une colonne de Séphadex G-25. Tous les pics élués par des solutions de carboxyméthylcellulose correspondent à des activités endo- $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-glucanasiques. En effet, chacun d'eux conduit à partir de la cellulose, de la carboxyméthylcellulose ou des cellodextrines, à la libération d'oligosaccharides de degré de polymérisation varié, dégradation caractéristique de celle réalisée par des endoglucanasases.

*Différenciation des activités endo- $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-glucanasiques*

Afin de différencier les cinq activités ( $F_1$  à  $F_5$ ) éluées par les solutions tamponnées de carboxyméthylcellulose, nous avons déterminé leur pH optimum d'action, leur spécificité de substrat et tenté de préciser leur mode d'action sur carboxyméthylcellulose, cellulose, cellodextrines insolubles ou solubles (degré de polymérisation de 2 à 5).

*pH optimum.* À l'exception de l'enzyme  $F_5$  qui possède un pH optimum de 5.6, les quatre autres enzymes ( $F_1$  à  $F_4$ ) ont le même pH optimum, égal à 5.

*Dégradation de la carboxyméthylcellulose.* Seule la fraction  $F_1$ , éluée par la plus faible concentration en carboxyméthylcellulose, attaque ce substrat avec libération d'oligosaccharides de degré de polymérisation supérieur ou égal à 2. Cette fraction correspondrait donc à la "carboxyméthylcellulase" identifiée dans les préparations de *Trichoderma viride* par Okada<sup>13</sup>.

*Dégradation de la cellulose microcristalline.* La fraction  $F_1$  ne présente aucune activité vis-à-vis de ce substrat.

Les fractions  $F_2$  à  $F_5$  hydrolysent la cellulose insoluble avec libération de cellobiose et d'oligosaccharides de degré de polymérisation plus élevé. Lors d'hydrolyses prolongées, on note la présence presque exclusive de cellobiose dans les hydrolysats obtenus avec les fractions  $F_2$  et  $F_3$ .

*Dégradation des cellodextrines insolubles.* L'hydrolyse des cellodextrines insolubles par les cinq fractions enzymatiques conduit à la libération préférentielle de cellobiose pour des temps d'hydrolyse élevés, mais l'étude de la cinétique de l'hydrolyse permet de signaler quelques différences dans le mode d'attaque de ces enzymes.

Les fractions  $F_1$ ,  $F_2$  et  $F_3$  entraînent la disparition rapide des oligosaccharides de degré de polymérisation élevé (supérieur à 6), alors que les fractions  $F_4$  et  $F_5$  ne les hydrolysent que très lentement.

*Dégradation des cellodextrines solubles.* Toutes les enzymes hydrolysent le cellopentaose avec libération de cellotriose. Les fractions  $F_2$  et  $F_3$  se révèlent les plus actives vis-à-vis de ce substrat alors que la fraction  $F_5$  n'a qu'une faible activité. De plus,  $F_2$  et  $F_3$  se différencient par le fait que dans les hydrolysats obtenus en présence de  $F_2$ , il y a apparition de cellotétraose, accompagné d'une faible quantité de glucose, quantité inférieure à celle du tétramère. Ceci pourrait s'expliquer par la mise en jeu, parallèlement à la réaction d'hydrolyse, d'une réaction de transfert. Le même type d'action peut également être attribué à la fraction  $F_4$ . Ces deux enzymes  $F_2$  et  $F_4$  seraient identiques aux cellulases IIA et IIB isolées par Okada<sup>13</sup> à partir de préparations cellulasiques de *Trichoderma viride* et catalysant la synthèse de cellotétraose à partir de cellobiose.

Le cellotétraose est hydrolysé par les fractions  $F_1$ ,  $F_2$  et  $F_3$  avec attaque préférentielle de la liaison centrale et libération de cellobiose comme produit majeur d'hydrolyse. L'hydrolyse de ce substrat par les fractions  $F_4$  et  $F_5$  est nulle.

Aucune de ces enzymes n'hydrolyse le cellobiose.

L'ensemble de ces expériences est en faveur de l'existence d'entités enzymatiques différant par leur mode d'action. Les expériences d'électrofocalisation qui ont été tentées n'ont pas permis la détermination du point isoélectrique des protéines. Après l'éluion de la colonne d'affinité par la carboxyméthylcellulose, une partie de ce polysaccharide reste adsorbé sur la protéine et la filtration sur gel de l'ensemble ne

permet pas de dissocier le complexe. Ceci ne paraît pas gêner les activités enzymatiques mais entrave les migrations électrophorétiques.

## DISCUSSION

L'isolement des composants des complexes cellulasiques d'origines diverses nécessite en général une méthodologie longue et laborieuse. A notre connaissance, une seule technique de fractionnement d'activités cellulasiques par chromatographie d'affinité sur cellulose a été mise au point par Halliwell et Griffin<sup>12</sup>. Cependant cette technique ne permet la séparation de l'activité endoglucanasique de *Trichoderma koningii* qu'en deux fractions, une carboxyméthylcellulase et une endoglucanase, alors que ce complexe cellulasique semble contenir au moins quatre activités endoglucanasiques vraies<sup>15</sup>.

La chromatographie d'affinité des complexes cellulasiques sur cellulose réticulée constitue un moyen simple et rapide pour, d'une part, séparer les activités exo- et endocellulasiques associées et, d'autre part, fractionner les diverses activités endocellulasiques le plus souvent présentes dans les préparations, afin d'en étudier le mode d'action.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié d'une aide de la D.G.R.S.T. (No. 75 70 538 01).

## RÉSUMÉ

Un procédé de chromatographie d'affinité sur cellulose réticulée est mis en oeuvre pour séparer les différents composés enzymatiques d'un complexe cellulasique de *Trichoderma viride*. Les exoglucanases [ $\beta$ -(1 → 4)-D-glucane cellobiohydrolase et une cellobiase] sont éluées par le tampon d'équilibrage alors que les endoglucanases sont retenues par le support. Cinq endo- $\beta$ -(1 → 4)-glucanases sont fractionnées grâce à une élution par palier avec des solutions tamponnées de carboxyméthylcellulose de concentrations croissantes. Afin de différencier les activités endoglucanasiques, nous étudions leur spécificité de substrat et tentons de préciser leur mode d'action sur carboxyméthylcellulose, cellulose, cellodextrines insolubles et oligosaccharides solubles.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 T. M. Wood et S. I. McCrae, *Biochem. J.*, 128 (1972) 1183.
- 2 G. Halliwell et M. Griffin, *Biochem. J.*, 135 (1973) 587.
- 3 M. Streamer, K. E. Eriksson et B. Petersson, *Eur. J. Biochem.*, 59 (1975) 607.
- 4 T. M. Wood et S. I. McCrae, *Carbohydr. Res.*, 57 (1977) 117.
- 5 M. J. Foglietti, M. Girerd et F. Percheron, *Biochimie*, 57 (1975) 667.
- 6 M. Weber, M. J. Foglietti et F. Percheron, *Biochimie*, 58 (1976) 1299.
- 7 K. Hess et K. Dziengel, *Ber. Deut. Chem. Ges. B*, 68 (1935) 1594.
- 8 N. Nelson, *J. Biol. Chem.*, 153 (1944) 375.
- 9 M. Somogyi, *J. Biol. Chem.*, 160 (1945) 61.
- 10 J. B. Lloyd et W. J. Whelan, *Anal. Biochem.*, 30 (1968) 467.
- 11 L. Kuniak et R. H. Marchessault, *Starke*, 4 (1972) 110.
- 12 G. Halliwell et M. Griffin, *Biochem. J.*, 169 (1978) 713.
- 13 G. Okada, *J. Biochem. (Tokyo)*, 80 (1976) 913.
- 14 G. Okada, *J. Biochem. (Tokyo)*, 77 (1975) 33.
- 15 T. M. Wood et S. I. McCrae, *Biochem. J.*, 171 (1978) 61.