

Caractérisation des hydrolases sécrétées par les champignons anaérobies du rumen

M. HEBRAUD, M. FEVRE

Laboratoire de Différenciation fongique. U.A. C.N.R.S. 1127, Bâtiment 405, 43, bd du 11-Novembre-1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

Summary. Recent studies have shown that the microbial population of the rumen includes anaerobic phycomycetes in addition to bacteria and protozoa (1). The presence of fungi in the rumen of different herbivores where they colonize fibrous plant fragments suggests their active participation in cell-wall hydrolysis. The enzymatic equipment of these fungi was investigated and different parameters of the hydrolases characterized.

La très importante colonisation des fragments de plantes contenus dans le rumen de vaches ou de moutons par des champignons (zoospores, sporanges développant des rhizoïdes) suggère que ces microorganismes occupent une place importante dans la digestion des fibres (2). Des études ont montré la production par ces champignons de glycosidases (3) et de cellulases extracellulaires (4) dont l'action sur des fibres de coton est supérieure à celle du mutant hyperproducteur de cellulase *Trichoderma reesei* C30 (5).

L'isolement et l'identification par le laboratoire de microbiologie à l'I.N.R.A. de Theix de 3 souches de champignons anaérobies stricts du rumen de mouton : *Neocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas communis* et *Piromonas communis* nous a permis d'étudier l'équipement enzymatique de ces champignons, les propriétés et la production des glucanes hydrolases.

Matériel et méthodes. Les trois souches sont cultivées en anaérobie stricte à 39 °C dans des tubes contenant 5 ml de milieu additionné de paille et/ou de sisal (agave). La production des enzymes a été étudiée sur des milieux d'entretien des cultures contenant des polysaccharides (carboxyméthylcellulose = CMC, arabinogalactane, galactane, xylane) ou des sucres simples (glucose, galactose, xylose).

Les activités des cellulases (EC 3.2.1.4), β -1,3-glucanases (EC 3.2.1.6) et xylanases (EC 3.2.1.8) ont été testées en incubant 50 à 100 μ l d'échantillon avec respectivement de la CMC, de la laminarine ou du xylane comme substrat, dans un volume total de 1 ml, les sucres réducteurs libérés étant mesurés par la méthode à l'acide dinitrosalicylique (6).

La mesure des activités β -glucosidase (EC 3.2.1.21), β -galactosidase (EC 3.2.1.23), β -xylosidase (EC 3.2.1.37) et β -fucosidase (EC 3.2.1.38) a été réalisée en utilisant comme substrat, les dérivés para-nitrophényles du β -D-glucose, β -D-galactose, β -D-xylose et β -D-fucose respectivement. Les réactions sont stoppées par addition de 2 ml de Na₂CO₃M et la quantité de nitrophénols libérée est dosée par mesure de l'absorbance à 400 nm.

Résultats et discussion.

Propriétés des glucanes hydrolases. — Les dosages réalisés sur les fractions extracellulaire, intracellulaire et insoluble (parois + membranes) de champignons ont montré que 95 à 99 % des enzymes étaient sécrétées dans le milieu de culture, la fraction insoluble ne représentant qu'1 à 5 % de l'activité enzymatique totale. D'importantes activités β -glucosidase, β -fucosidase, β -xylosidase, C.M. Case, β -1,3-glucanase et xylanase et une faible activité β -galactosidase ont

été trouvées chez les 3 champignons. Les optimums de température, de pH et les Km ont été déterminés pour les 7 activités enzymatiques mises en évidence chez les 3 souches *N. frontalis*, *S. communis* et *P. communis*. A l'exception de la β -xylosidase dont les optimums de température et de pH sont de 40 °C et 6,5, les autres activités enzymatiques sont maximales à pH 6 et entre 50-55 °C. Les Km pour chaque enzyme des trois champignons ne sont pas significativement différents et correspondent en moyenne à 0,53 ; 0,35 ; 0,37 ; 1,45 ; 0,86 ; 2,70 et 1 mg.ml⁻¹ respectivement pour la β -glucosidase, β -fucosidase, β -xylosidase, β -galactosidase, β -1,3-glucanase, CMCase et la xylanase.

Production d'enzymes par *Sphaeromonas communis*. — La quantité d'hydrolases sécrétées dans le milieu de culture par *S. communis* a été étudiée sur des milieux d'entretien de la souche additionnés de différents polysaccharides. La production d'enzymes augmente régulièrement jusqu'à atteindre un plateau au bout de 7 jours environ (fig. 1). Seuls les milieux contenant un mélange de 4 polymères à 0,25 % chacun ou du xylane 1 % permettent une production d'enzymes supérieure à celle du milieu d'entretien. La présence de sucres simples dans le milieu influence très fortement la production d'enzymes ; des concentrations croissantes de glucose, xylose ou galactose diminuent les quantités sécrétées. Le galactose (1 %) est le répresseur le plus efficace.

Conclusion. Les champignons du rumen de mouton possèdent un important équipement enzymatique (endo et exo-enzymes) nécessaire à la dégradation des polysaccharides pariétaux, cellulose et hémicelluloses, en sucres simples. Ces enzymes sont extracellulaires et laissent supposer que ces chytridiomycètes peuvent jouer un rôle important dans la digestion des fibres dans le rumen. Les équipements enzymatiques et les propriétés des enzymes, identiques chez les trois champignons, témoignent ainsi d'une remarquable adaptation au biotope. L'éventail et la quantité des enzymes révélés par ces champignons anaérobies permettent d'envisager leur utilisation pour la production de complexes lytiques intéressant les industriels.

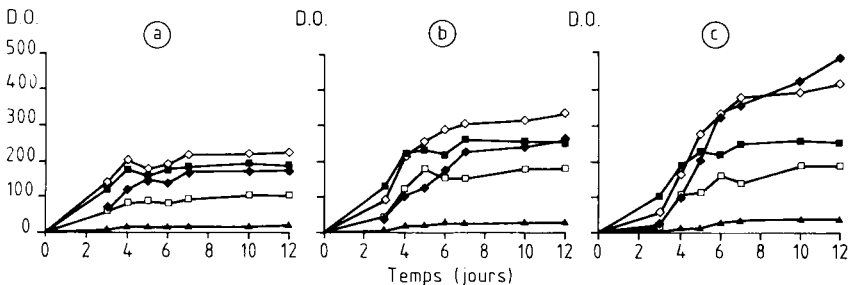


FIG. 1. — (a) milieu d'entretien (glucose 0,25 % + paille) — (b) milieu complétement avec 4 polymères : CMC 0,25 %, xylane 0,25 %, galactane 0,25 % et arabinogalactane 0,25 % — (c) milieu complétement avec du xylane 1 %.

◆ : β -xylosidase ; ◇ : β -glucosidase ; ■ : xylanase ; □ : CMCCase ; ▲ : β -galactosidase.

Remerciements. — Ce travail est réalisé en collaboration avec le laboratoire de Microbiologie (Gouet P. directeur) de l'I.N.R.A. de Theix et bénéficie du financement de l'ATP rumen.

- (1) Orpin C. G., 1975. *J. Gen. Microbiol.*, **21**, 249-262.
- (2) Bauchop T., 1979. *Appl. env. Microbiol.*, **38**, 148-158.
- (3) Pearce P. D., Bauchop T., 1985. *Appl. Env. Microbiol.*, **49**, 1265-1269.
- (4) Mountfort D. O., Asher R. A., 1985. *Appl. Env. Microbiol.*, **49**, 1314-1322.
- (5) Wood T. M. et al., 1986. *FEMS Microbiol. Lett.*, **34**, 37-40.
- (6) Miller G. L., 1959. *Anal. Chem.*, **31**, 426-428.