Etude de L'Acétonitrilase D'une Souche de *Brevibacterium*

Alain ARNAUD, Pierre GALZY et Jean Claude JALLAGEAS*

Chaire de Génétique et Microbiologie, Ecole Nationale Supérieure Agronomique,
34060—Montpellier Cedex, France

*Laboratoire de Chimie Organique,
Université des Sciences et Techniques du Languedoc,
34060—Montpellier Cedex, France

Received May 16, 1977

The acetonitrilase from *Brevibacterium* R 312 has an activity between pH 5 and 10, with an optimum pH of 7, the optimum temperature is between 30° and 35°C. It is a thermolabile enzyme and the temperature denaturation starts at 35°C. The Michaelis constant is near $2,5 \cdot 10^{-2}$ M. The enzyme is localized in the 180 000 g supernatant. It is an non adaptative enzyme.

Des souches bactériennes métabolisant l'acétonitrile ont été isolées par culture sur milieu sélectif.^{1,2)} Ces souches, qui appartiennent à des groupes taxonomiques très divers, hydrolysent tous les nitriles solubles dans l'eau. Nous avons montré^{1~3)} que l'hydrolyse s'effectue en deux étapes: le nitrile est converti en amide puis en acide. Ces premiers résultats ne permettent pas de savoir s'il existe une ou plusieurs nitrilases.

Très peu d'études sur les nitrilases présentes chez d'autres organismes ont été entreprises. Les rares données bibliographiques semblent indiquer une spécificité plus ou moins grande de ces enzymes qui peuvent catalyser l'hydrolyse d'un seul nitrile,^{4~10)} d'un seul^{11~14)} ou de plusieurs types de nitriles.^{15~19)}

Notons que dans quelques cas des réactions stéréospécifiques ont été obtenues: transformations d' α -aminonitriles DL en acides α -aminés L^{20~22)} et des α -hydroxy isovaleronitrile et isocapronitrile DL en acides α -hydroxylés L correspondants.¹⁹⁾ Dans le cas de notre souche de *Brevibacterium* les acides α -aminés et α -hydroxylés obtenus à partir des nitriles correspondants sont racémiques.

Dans un premier stade, nous avons étudié ici l'activité acétonitrilase d'une de nos souches de *Brevibacterium*. Ultérieurement, nous tenterons de vérifier si tous les nitriles

sont hydrolysés par cette enzyme.

MATERIEL ET METHODES

Matériel biologique. Nous avons utilisé une souche de *Brevibacterium* appelé R 312. Les conditions d'isolement et la détermination ont déjà été décrites.^{1,2)}

Conditions de culture. Le milieu de base est constitué par du yeast carbon base Difco à la concentration de 1,17%. La source azotée est soit l'acétonitrile, soit l'acétamide, soit l'acétate d'ammonium. Ces trois composés sont à la concentration finale de 0,5% (p/v). Le pH du milieu est amené à 6,5 au moyen de potasse. Le yeast carbon base, après ajustement, est stérilisé par autoclavage 30 mn à 110°C. La source azotée en solution dans le yeast carbon base, à la concentration de 10% et ajustée à pH 6,5, est stérilisée par filtration puis additionnée au yeast carbon base autoclavé.

Les cultures sont faites en erlenmeyers remplis au dixième de leur volume; elles sont soumises à l'agitation à 28°C (80 oscillations/mn, amplitude 8 cm). L'ensemencement est effectué au moyen d'une pré-culture sur le même milieu. Le milieu de conservation utilisé est un milieu complet appelé YMPG, dont la composition est la suivante: 3 g d'extrait de levure Difco, 3 g d'extrait de malt Difco, 5 g de Bactopeptone Difco, 1 g de glucose et 25 g de gélose par litre.

Techniques de broyage et de fractionnement. Les cellules sont centrifugées, lavées avec du tampon phosphate 20 mM pH 7,3 et remises en suspension dans ce même milieu. Le mélange est refroidi entre 0° et 5°C. Le broyage est effectué sur 10 ml de la suspension (300 à 700 mg de protéines cellulaires) au

moyen d'un broyeur à ultrasons MSE. Le traitement est de huit périodes de 15 secondes en laissant refroidir la préparation entre chaque période.

L'extrait S_1 est ensuite obtenu par centrifugation au froid (4°C) à 13000 *g*, 10 minutes. Une ultracentrifugation à 180 000 *g*, 90 minutes permet de séparer une fraction soluble (S_2) d'une fraction particulaire (C_2).

Méthodes analytiques

Spectrométrie RMN (Spectromètre Varian EM 360). L'analyse quantitative de l'acétonitrile et de ses produits d'hydrolyse est basée sur la différence des déplacements chimiques de leurs protons méthyliques en RMN du proton. (Température de la sonde: 30°C). Les singulets obtenus pour le mélange de ces trois produits sont bien séparés pour des valeurs du pH égales ou supérieures à 5. Le rapport des hauteurs des pics permet de suivre quantitativement l'hydrolyse de l'acétonitrile. Cette méthode convient bien pour des concentrations en acétonitrile égales ou supérieures à 10^{-1} M.

Chromatographie en phase gazeuse. Les analyses en chromatographie en phase gazeuse de l'acétonitrile sont faites au moyen d'un chromatographe Girdel série 300, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme.

La colonne utilisée est une colonne inox d'une longueur de 1 mètre et d'un diamètre de 1/8 de pouce. Elle est garnie de Porapak Q, 80~100 mesh. Les conditions de température sont: détecteur, 300°C; injecteur, 210°C; four, 155°C; gaz vecteur: azote. Des courbes d'étalonnage ont été établies dans le domaine des concentrations en acétonitrile utilisées.

Dosage des protéines. Les protéines ont été dosées au moyen de la réaction du biuret selon Strickland.²³⁾

Détermination de la matière vivante. Une correspondance a été établie entre la densité optique, la matière sèche, le nombre de cellules et les protéines. Elle a été effectuée sur des cellules prélevées en phase exponentielle de croissance sur le milieu yeast carbon base additionné d'acétonitrile à la concentration de 0,5%, pH 6,5. Le nombre de cellules est déterminé par comptage des colonies obtenues après dilution et étalement. La densité optique est mesurée à l'aide d'un colorimètre Klett-Summerson (filtre bleu; longueur d'onde comprise entre 400 et 450 nm).

La matière sèche est déterminée par séchage à 108°C et pesée jusqu'à poids constant.

La correspondance est la suivante: 1 mg de matière sèche correspond à 570.10^8 cellules et à 0,28 mg de protéines. Une suspension contenant 1 mg de matière sèche par ml donne une densité optique de 1,3.

RESULTATS

A. Action du pH

Les mesures sont effectuées directement dans le tube de RMN à 30°C. La réaction est réalisée en milieu tamponné. Les tampons utilisés sont les suivants:

- tampon citrate-phosphate M/15 pH 4;5 et 6.
- tampon phosphate M/15 pH 6; 6,5; 7; 7,5; 8.
- tampon Tris-KH₂PO₄ 0,2 M pH 8 et 9.
- tampon Tris-NaOH 0,2 M pH 10.

L'utilisation de deux tampons différents à un même pH permet de vérifier la non-interférence du tampon sur l'activité.

L'hydrolyse enzymatique de l'acétonitrile est suivie en continu sur 8 mn. Chaque minute, la comparaison des pics donnés par les groupements méthyle de l'acétonitrile, de l'acétamide et de l'acétate d'ammonium, donne les quantités de chacun des produits. Nous avons ainsi déterminé l'activité spécifique en fonction du pH pour deux types d'extraits enzymatiques:—un broyat brut, qui est le surnageant d'une centrifugation à 13 000 *g*: S_1 ;

—un surnageant d'ultracentrifugation à 180 000 *g*: S_2 . Les résultats obtenus dans plusieurs expériences indépendantes sont identiques. La figure 1 donne les courbes d'activité en fonction du pH pour les deux extraits enzymatiques étudiés. Dans les deux cas, pH 7 est le pH optimum et les pH d'arrêt sont 5 et 10. L'examen des courbes fait apparaître des épaulements entre 6 et 6,5 et, à un moindre degré, à pH 8; ces épaulements ne sont probablement pas significatifs et sont de l'ordre de grandeur des erreurs d'expérience. La centrifugation à 180 000 *g* augmente l'activité spécifique mais ne change pas fondamentalement le phénomène.

B. Localisation de l'enzyme

Le tableau 1, qui représente également plusieurs expériences indépendantes montre que l'activité enzymatique est située dans le surnageant d'ultracentrifugation à 180 000 *g*. Par conséquent, l'enzyme est une enzyme soluble qui n'est liée ni aux parois ni aux

FIG. 1. Action du pH sur L'Acétonitrilase à 30°C.

TABLEAU I. LOCALISATION DE L'ACÉTONITRILASE

Valeurs de l'activité spécifique (μ moles d'acétonitrile transformé/mn/mg de protéines) à pH 7 et à 30°C.

Broyage		Résultats de l'ultracentrifugation à 180 000 g			
Rendement en % de protéines	Activité spécifique du broyat brut	Surnageant S ₂		Culot C ₂	
		% de protéines	Activité spécifique	% de protéines	Activité spécifique
39	2,6	60	5,1	40	0
50	2,7	66	4,5	34	0
50	2,1	66	3,4	34	0

ribosomes.

Pour compléter cette étude nous avons comparé l'activité dans le broyat brut S₁ et le surnageant S₂ d'ultracentrifugation à 180 000 g, à pH 6, 7 et 8.

L'activité dans le surnageant S₂ est toujours très légèrement supérieure (10% environ) à l'activité dans le broyat brut. Cette stimulation liée probablement à l'élimination des ribosomes et de débris cellulaires est générale à tous les pH. Cette différence est faible, mais semble significative.

Tous les essais ultérieurs ont donc été effectués sur le surnageant S₂ (180 000 g).

C. Etude des températures de dénaturation

Notons tout d'abord qu'aucune baisse d'activité enzymatique n'est observée en dix jours à 4°C. De plus, par congélation, l'activité se conserve plusieurs mois.

L'expérience de dénaturation est effectuée au moyen d'un bain thermostaté. L'enzyme en suspension dans du tampon phosphate 20 mM pH 7,3 est chauffée à une température donnée. Des prélèvements sont effectués à des intervalles de temps réguliers. La dénaturation est arrêtée en plongeant le récipient contenant l'enzyme dans la glace. L'activité résiduelle est ensuite déterminée par mesure directe en RMN. L'hydrolyse enzymatique de l'acétonitrile est suivie en continu sur 8 mm pour trois valeurs du pH: 6,7 et 8.

La figure 2 montre l'action de deux températures: 35° et 40°C. Elle donne en coordonnées semi-logarithmiques l'activité en fonction du temps de chauffage à une température donnée.

A 35° et 40°C, la destruction est linéaire en coordonnées semi-logarithmiques. Au bout de 30 minutes, à 40°C, il ne reste que

FIG. 2. Denaturation de L'Acetonitrilase par la Chaleur.

E_0 = activité au temps zéro.

E = activité après un certain temps de chauffage.

27% de l'activité initiale contre 80% à 35°C.

D'autre part, quel que soit le pH, la température de 45°C détruit très rapidement l'enzyme: l'activité est nulle après 5 minutes de chauffage.

Nous avons vérifié que la linéarité continue très longtemps: 240 mn à 35°C. Les pentes de destruction de l'enzyme sont identiques à pH 6,7 et 8; nous n'avons observé aucun décrochement dans les courbes de dénaturation. Ces différents résultats sont en faveur de l'existence d'une seule acétonitrilase.

D. Détermination de la température optimale

La détermination de la température optimale est effectuée au pH optimum de l'enzyme, c'est-à-dire à pH 7. La cinétique est faite en vase thermostaté et en milieu tamponné. Des prélèvements sont effectués toutes les minutes.

FIG. 3. Détermination de la Température Optimale de L'Acetonitrilase.

La réaction est arrêtée par addition des 0,5 ml de prélèvements à 0,5 ml d'acétone 10^{-1} M dans l'acide chlorhydrique 10^{-1} M. L'opération est effectuée dans un mélange glace—NaCl pour éviter les évaporations. Après blocage de la réaction, le dosage de l'acétonitrile est effectué par RMN. L'acétone est utilisée comme référence interne et permet de déterminer l'évaporation éventuelle de l'acétonitrile. La figure 3 donne l'activité en fonction de la température. A 45°C, nous avons donné l'activité déterminée par la pente à l'origine; ainsi nous éliminons de la valeur donnée l'influence de la dénaturation de l'enzyme due à la chaleur. La température optimale est 35°C mais l'activité varie peu entre 30° et 40°C. Par contre, l'activité chute brutalement à 45°C. Le Q_{10} entre 20° et 30°C est environ de 1,45.

E. Essais de précipitation au sulfate d'ammonium et de dialyse

Des essais de purification par précipitation au sulfate d'ammonium ont été effectués.

TABLEAU II. PRECIPITATION DES PROTEINES AU $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$

Nombre d'expériences=3. Activités à pH 7.

% de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ par rapport à la saturation	% des protéines précipitées	% d'activité par rapport à l'activité du S_2	Activité spécifique à 30°C	% d'activité par rapport à l'activité retrouvée
40	32	6	0,6	9
50	21	42	5,0	70
60	17	13	1,8	21

TABLEAU III. PRECIPITATION DES PROTEINES AU $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$

Nombre d'expériences=4. Activités à pH 7.

% de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ par rapport à la saturation	% des protéines précipitées	% d'activité par rapport à l'activité du S_2	Activité spécifique à 30°C	% d'activité par rapport à l'activité retrouvée
35	22	6	0,9	10
45	14	23	5,1	30
55	24	45	6,1	60
65	10	0	0	0

Il convient tout d'abord de noter que l'on ne retrouve que 75 % de l'activité initiale. Les tableaux 2 et 3 donnent les résultats obtenus. A 40 %, on élimine un tiers des protéines avec des traces d'activité. L'activité acétonitrilase se s'obtient entre 40 et 55 % en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. Dans cette fraction qui contient 30 % des protéines du surnageant S_2 90 % environ de l'activité retrouvée sont recueillis.

Notons que le pigment jaune orangé caractéristique de la souche de *Brevibacterium* utilisée^{1,2)} se retrouve dans la fraction précipitée à 40 % de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

Nous avons dialysé le surnageant d'ultra-centrifugation S_2 et la fraction précipitée entre 40 et 55 % dans les trois conditions suivantes:

- Contre de l'eau distillée
- Contre du tampon phosphate 1 mM pH 7,3
- Contre du tampon phosphate 20 mM pH

7,3 identique au tampon dans lequel se trouve l'enzyme

Dans les deux premiers cas, l'activité est totalement perdue au bout de 24 heures. Dans le troisième cas, il ne reste que 10 à 20 % de l'activité initiale au bout de 24 heures.

Ces résultats semblent indiquer que l'activité nécessite la présence d'une petite molécule (coenzyme, cation ou anion) ou que l'enzyme est constituée de plusieurs unités se dissociant à la dialyse.

F. Mesure de la constante de Michaelis: K_m

Les déterminations sont réalisées en vase thermostaté à pH 7 et à 25°C, température choisie pour éviter l'évaporation du substrat. Des parties aliquotes de solution sont prélevées toutes les deux minutes au moyen d'une seringue de chromatographie et injectées directement dans le chromatographe en phase gazeuse. La sensibilité élevée de cette technique nous a permis de suivre l'hydrolyse de solutions d'acétonitrile de concentrations égales ou supérieures à $8 \cdot 10^{-4}$ M.

Les variations de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat pour une expérience particulière sont exprimées en coordonnées inverses selon Lineweaver et Burk

FIG. 4. Détermination du K_m à 25°C.

TABLEAU IV. EFFETS DES EFFECTEURS SUR
L'ACTIVITE ACETONITRILASIQUE
La concentration en acétonitrile est 2×10^{-1} M.

Effecteur	Concentration	% inhibition
Acide iodoacétique	$4 \cdot 10^{-2}$	30
	$4 \cdot 10^{-3}$	0
Amino-5 tétrazole-1H	$4 \cdot 10^{-2}$	0
N-Bromosuccinimide	$4 \cdot 10^{-3}$	100
	$4 \cdot 10^{-4}$	10
N-Éthylmaléimide	$4 \cdot 10^{-2}$	70
	$4 \cdot 10^{-3}$	25
Acrylonitrile	$4 \cdot 10^{-2}$	0
Acrylamide	$4 \cdot 10^{-2}$	0
Réactif de Woodward	$4 \cdot 10^{-2}$	0
Diisopropylfluorophosphate	$4 \cdot 10^{-2}$	100
	$4 \cdot 10^{-3}$	30
Pyridoxal, HCl	$4 \cdot 10^{-2}$	0
	$4 \cdot 10^{-3}$	0
Glutaraldéhyde	$4 \cdot 10^{-2}$	60
	$4 \cdot 10^{-3}$	25
Dimethoxy-2,5 tétrahydrofuranne	$8 \cdot 10^{-2}$	70
	$4 \cdot 10^{-2}$	40
Acétylacétone	$4 \cdot 10^{-2}$	50
	$4 \cdot 10^{-3}$	5
Anhydride trifluoroacétique	$4 \cdot 10^{-2}$	0
EDTA	$8 \cdot 10^{-2}$	0

dans la figure 4. Cinq expériences indépendantes indiquent que le K_m est compris entre $1,3$ et $4 \cdot 10^{-2}$ M, la moyenne étant $2,5 \cdot 10^{-2}$ M.

G. Action des effecteurs

Nous avons testé l'action de quelques inhibiteurs classiques des réactions enzymatiques (tableau 4).

Notons tout d'abord l'absence totale d'action de l'EDTA: ce résultat semble indiquer que l'enzyme n'a pas besoin de cations bivalents; ce point est à rattacher aux observations effectuées à propos de la dialyse. L'inhibition par le diisopropylfluorophosphate paraît montrer que la fonction OH de la sérine intervient dans la réaction, ce qui est assez fréquent dans les hydrolases. Il est possible également que certaines fonctions NH_2 , autres que les $\varepsilon\text{-NH}_2$ et $\omega\text{-NH}_2$, interviennent dans le site actif. Par contre, les autres résultats sont beaucoup plus difficilement interprétables.

H. Etude de l'action du milieu sur l'activité acétonitrilasique

Dans le but de voir si l'enzyme est adaptative, nous avons testé l'activité enzymatique pendant la phase de croissance exponentielle en présence soit d'acétonitrile, soit d'acétamide, soit d'acétate d'ammonium. Les résultats sont donnés dans le tableau 5 ainsi que le temps de génération sur les milieux correspondants.

Il apparaît que l'activité spécifique des cellules cultivées sur acétonitrile n'est pas significativement différente de celle des cellules cultivées sur acétate d'ammonium ou sur acétamide. L'enzyme n'est donc pas adaptative.

Il est intéressant de constater que les temps de génération sont identiques sur les divers

TABLEAU V. ETUDE DE L'ACTION DU MILIEU SUR L'ACTIVITE ACETONITRILASIQUE

Milieu de croissance	Temps de génération en heures	Activité spécifique (μ moles de produit transformé/mn/mg de protéines)		
		Moyenne	Ecart-type	N
YCB+ acétonitrile 0,5 % pH=6,5	3	3,6	0,9	14
YCB+ acétamide 0,5 % pH=6,5	3	2,5	0,3	3
YCB+ acétate d'ammonium 0,5 % pH=6,5	3	2,1	0,4	3

milieux.

L'hydrolyse de l'acétonitrile n'est pas le facteur limitant la croissance: il y a accumulation d'ammonium au cours de la croissance sur acétonitrile.

Nous avons aussi suivi la variation de l'activité acétonitrilasique au cours de la croissance. Le taux différentiel de biosynthèse de l'enzyme est sensiblement constant au cours de la phase de croissance exponentielle et les valeurs de l'activité très voisines sur les trois milieux étudiés. Par contre, l'activité spécifique baisse dès que les cellules entrent en phase de ralentissement. Elle devient pratiquement nulle en phase stationnaire.

I. Remarques sur le métabolisme de l'acétonitrile chez *Brevibacterium*

La réaction que nous étudions ici est l'hydrolyse de l'acétonitrile en acétamide.

Une autre voie du métabolisme des nitriles a été décrite chez les végétaux,^{24~26)} la mouche domestique et la souris.²⁷⁾ Il a été montré que certains nitriles peuvent être transformés en cyanhydrines par α -hydroxylation et les aldéhydes correspondants oxydés en acides:

Nous avons vérifié avec des broyats comme avec des cellules intactes que nous avons une transformation quantitative de l'acétonitrile en acétamide. Il n'existe donc pas d'autre voie métabolique et l'enzyme ne donne pas d'équilibre. Par conséquent, il semble très probable que la seule voie présente chez notre souche de *Brevibacterium* est celle que nous avons étudiée ici, c'est-à-dire l'hydrolyse par l'acétonitrilase. En tout état de cause cette voie est largement prépondérante.

DISCUSSION ET CONCLUSION

La souche de *Brevibacterium* R 312 hydrolyse quantitativement l'acétonitrile en acétamide grâce à une acétonitrilase qui semble unique. Cette voie métabolique est comparable à celle trouvée par Digeronimo^{13,14)} chez *Nocardia*

rhodochrous, par Mimura et coll.¹²⁾ dans une souche de *Corynebacterium nitrilophilus* et par Firmin et Gray²⁸⁾ dans un *Pseudomonas*. Notons que nous avons également trouvé cette voie métabolique chez diverses souches bactériennes appartenant aux genres *Bacillus*, *Bacteridium*, *Micrococcus* et *Brevibacterium*.^{1~3)}

Cette enzyme semble "constitutive" puisqu'elle est présente après culture sur un milieu dépourvu d'acétonitrile. L'activité est pratiquement identique en présence ou en l'absence de ce nitrile.

Il faut noter que Fry et coll.^{29,30)} ont démontré chez deux champignons (*Stemphylium loti* et *Gloeocercospora sorghi*) le caractère adaptatif d'une formamide hydrolyase en présence d'acide cyanhydrique. Les résultats obtenus par Digeronimo et Antoine¹⁴⁾ concernant le caractère inductible d'une acétonitrilase chez *Nocardia rhodochrous* nous paraissent, par contre, beaucoup plus contestables. Ces auteurs n'ont pas effectué une étude enzymologique complète de l'acétonitrilase et de l'acétamidase; ils tirent simplement des conclusions à partir d'une étude de la croissance. Or, il est connu que les amidases sont très souvent inductibles.^{31~33)} D'ailleurs c'est le cas de l'acétamidase de notre souche *Brevibacterium* R 312.³⁴⁾ Il est donc possible que les résultats de Digeronimo et Antoine s'expliquent par le caractère inductible de l'acétamidase et non de l'acétonitrilase.

Nous avons montré que l'acétonitrilase n'est pas le facteur limitant la vitesse de croissance lorsque l'acétonitrile est la seule source d'azote. Dans ces conditions l'ammonium s'accumule dans le milieu. L'enzyme (acétamidase), qui catalyse ensuite l'hydrolyse de l'acétamide en acétate d'ammonium, n'est donc pas non plus limitante; son étude fera l'objet d'une note ultérieure.

Il faut noter également que l'activité enzymatique diminue rapidement en phase stationnaire. L'enzyme est par ailleurs fragile, puisqu'elle donne un début de dénaturation à partir de 35°C et qu'elle ne résiste pas à la dialyse. Ce dernier résultat est contraire à ceux obtenus par différents auteurs^{5~30)} pour

d'autres nitrilases. Par contre, l'instabilité à la chaleur des nitrilases semble assez générale.^{15,30)}

L'acétonitrilase de *Brevibacterium* a un pH optimum de 7, valeur voisine de celles trouvées dans la littérature pour d'autres nitrilases.^{5,9-11,16,30)}

Les pH d'arrêt sont 5 et 10, donc identiques aux pH extrêmes trouvés pour la croissance sur un milieu complet. L'acétonitrilase est une enzyme soluble; elle ne semble liée ni aux parois, ni aux ribosomes. La constante de Michaelis est $2,5 \cdot 10^{-2}$ M.

Nous n'avons pas essayé de déterminer le spectre d'activité complet de l'acétonitrilase. Cette étude est impossible tant que la purification de l'enzyme n'est pas suffisamment poussée. La souche de *Brevibacterium* R 312 hydrolyse tous les nitriles solubles dans l'eau et peut utiliser le cyanure comme seule source d'azote. L'acétonitrilase pourrait donc être une nitrilase générale hydrolysant tous les nitriles. Il faut noter que quelques nitrilases précédemment décrites sont spécifiques d'un nitrile particulier ou d'un seul type de nitriles, mais dans ce cas les affinités de l'enzyme sont beaucoup plus grandes que pour notre nitrilase.

Ricinine nitrilase⁵⁾ $K_M = 2 \times 10^{-5}$ M

β -Cyanoalanine nitrilase⁹⁾ $K_M = 2 \times 10^{-3}$ M

Benzonitrile hydrolase¹¹⁾ $K_M = 4 \times 10^{-3}$ M

Indolacétonitrilase¹⁵⁾ $K_M = 5 \times 10^{-5}$ M

Toyomacine hydrolase¹⁰⁾ $K_M = 5 \times 10^{-4}$ M

S'il s'avérait que l'acétonitrilase de *Brevibacterium* R 312 est une enzyme générale, elle serait la seule décrite à ce jour. Une étude destinée à vérifier cette hypothèse est en cours.

Il est également permis de se demander quel est le rôle de l'acétonitrilase chez cette souche bactérienne. Si son rôle est de fournir de l'azote aux cellules pour la croissance, il est étonnant qu'elle ne soit pas adaptative car les nitriles sont rares dans la nature. Mais il ne faut pas perdre de vue que de nombreux organismes synthétisent certains nitriles.³⁵⁾ Par exemple, chez les protistes, des α -aminonitriles sont produits par une souche de Basidiomycete W₂ et par *Rhizoctonia solani*, la β -cyanoalanine par *Escherichia coli*, *Bacillus*

megaterium et *Chromobacterium violaceum*, l'acide γ -cyanobutyrique α -aminé par *Chromobacterium violaceum*, la cyanhydrine de l'acide glyoxylique chez des champignons et un nitrile polyacétylénique³⁶⁾ chez *Lepista diemii* et *Lepista glaucocana*.

Aussi, il serait intéressant de voir si les souches de *Brevibacterium* et des autres espèces à activité acétonitrilasique sont capables de synthétiser des nitriles. A ce propos, il n'est pas inutile de constater que toutes les nitrilases ont un pH optimum voisin de 7: en effet, le cyanure a des propriétés particulières au voisinage de la neutralité. Les nitrilases qui sont formamide hydrolyase ne peuvent agir efficacement qu'au voisinage de pH 7. Il faut également noter que certains nitriles se forment chez les microorganismes au cours du métabolisme cellulaire ont le cyanure comme précurseur.³⁵⁾ Il est donc possible que le rôle de l'acétonitrilase de *Brevibacterium* soit de participer à la transformation de nitriles issues du métabolisme cellulaire.

REFERENCES

- 1) A. Arnaud, P. Galzy et J. C. Jallageas, *C. R. Acad. Sc. Paris*, **287**, 571 (1976).
- 2) A. Arnaud, P. Galzy et J. C. Jallageas, *Rev. Ferment. Ind. Aliment.*, **31**, 39 (1976).
- 3) A. Arnaud, P. Galzy et J. C. Jallageas, *Folia Microbiol.*, **21**, 178 (1976).
- 4) R. H. Hook et W. G. Robinson, *J. Biol. Chem.*, **239**, 4257 (1964).
- 5) R. H. Hook et W. G. Robinson, *ibid.*, **239**, 4263 (1964).
- 6) L. Fowden et E. A. Bell, *Nature*, **206**, 110 (1965).
- 7) C. Lauinger et C. Ressler, *Biochem. Biophys. Acta*, **198**, 316 (1970).
- 8) R. C. Jackson et R. E. Handschumacher, *Biochemistry*, **9**, 3585 (1970).
- 9) P. A. Castric, K. J. F. Farnden et E. C. Conn, *Arch. Biochem. Biophys.*, **152**, 62 (1972).
- 10) T. Uematsu et R. J. Suhadolnik, *ibid.*, **162**, 614 (1974).
- 11) D. B. Harper, *Biochem. Soc. Trans.*, **4**, 502 (1976).
- 12) A. Mimura, T. Kawano et K. Yamaga, *J. Ferment. Technol.*, **47**, 631 (1969).
- 13) M. J. Digeronimo, Thèse, Université du New Jersey (1975).

- 14) M. J. Digeronimo et A. D. Antoine, *Appl. Environnement Microbiol.*, **31**, 900 (1976).
 - 15) K. S. Thimann et S. Mahadevan, *Arch. Biochem. Biophys.*, **105**, 133 (1964).
 - 16) S. Mahadevan et K. S. Thimann, *ibid.*, **107**, 62 (1964).
 - 17) S. Mahadevan, *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 557 (1963).
 - 18) Y. Fukuda, M. Fukui, T. Harada et Y. Izumi, *J. Ferment. Technol.*, **49**, 1011 (1971).
 - 19) Y. Fukuda, T. Harada et Y. Izumi, *ibid.*, **51**, 393 (1973).
 - 20) G. A. Strobel, *J. Biol. Chem.*, **241**, 2618 (1966).
 - 21) G. A. Strobel, *ibid.*, **242**, 3265 (1967).
 - 22) B. P. Mundy, F. H. S. Liu et G. A. Strobel, *Can. J. Biochem.*, **51**, 1440 (1973).
 - 23) L. H. Strickland, *J. Gen. Microbiol.*, **5**, 698 (1951).
 - 24) C. H. Fawcett, R. C. Seeley, H. F. Taylor, R. L. Wain et F. Wightman, *Nature*, **176**, 1026 (1955).
 - 25) H. F. Taylor et R. L. Wain, *ibid.*, **184**, 1142 (1959).
 - 26) K. Chamberlain et R. L. Wain, *Ann. Appl. Biol.*, **75**, 409 (1973).
 - 27) H. Ohkawa, R. Ohkawa, I. Yamamoto et J. E. Casida, *Pest. Biochem. Physiol.*, **2**, 95 (1972).
 - 28) J. L. Firmin et D. O. Gray, *Biochem. J.*, **158**, 223 (1976).
 - 29) W. E. Fry et R. L. Millar, *Arch. Biochem. Biophys.*, **151**, 468 (1972).
 - 30) W. E. Fry et D. C. Munch, *Physiol. Plant. Pathol.*, **7**, 23 (1975).
 - 31) P. A. Clarke, *Adv. Microbiol. Physiol.*, **4**, 179 (1970).
 - 32) M. J. Hynes, *J. Bacteriol.*, **103**, 482 (1970).
 - 33) B. Thalenfeld et N. Grossowicz, *J. Gen. Microbiol.*, **94**, 131 (1976).
 - 34) A. Arnaud, P. Galzy et J. C. Jallageas, Résultats non publiés.
 - 35) C. J. Knowles, *Bacteriol. Reviews*, **40**, 652 (1976).
 - 36) E. R. H. Jones, V. Thaller et J. L. Turner, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, **5**, 434 (1975).
-