



HAL
open science

Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. III. Caractérisation d'une protéase acide

J. Lenoir, B. Auburger, J. C. Gripon

► To cite this version:

J. Lenoir, B. Auburger, J. C. Gripon. Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. III. Caractérisation d'une protéase acide. *Le Lait*, 1979, 59 (585_586), pp.244-268. hal-00928823

HAL Id: hal-00928823

<https://hal.science/hal-00928823>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*

III. Caractérisation d'une protéase acide

par

J. LENOIR*, B. AUBERGER* et J. C. GRIPON*

La présence de deux enzymes, au sein du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*, a été mise en évidence par filtration sur gel d'une préparation exocellulaire produite en milieu neutre (Lenoir et Auberge, 1977 a). La fraction majeure, de pH optimal voisin de 6,0, a été identifiée à une endopeptidase appartenant au groupe des métallo-protéases (Lenoir et Auberge, 1977 b). La fraction mineure, de pH optimal proche de 5 sur la caséine et stable en milieu acide, pouvait être apparentée à une protéase acide.

La présente étude confirme cette hypothèse et elle situe les niveaux de production de l'enzyme par la mise en œuvre de conditions de culture et de fractionnement compatibles avec ses caractères de stabilité.

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel d'étude. Conditions de culture

La souche retenue, PL 21, est cultivée en boîtes de Roux de 1 l contenant 250 ml de milieu ou en fioles d'ermeneyer de 150 ml avec 40 ml de milieu. Le taux d'ensemencement est de 10 000 spores par ml et l'incubation est réalisée à 20° C sans agitation des fioles pendant 10 à 12 j.

* Laboratoire de Recherche de la Chaire de Technologie (I.N.R.A.), Institut National Agronomique Paris-Grignon - 78850 Thiverval-Grignon.

** Laboratoire de Biochimie et de Technologie Laitières, I.N.R.A., C.N.R.Z. - 78350 Jouy-en-Josas.

Le milieu de base utilisé a la composition suivante : Trypticase (Mérieux) 5 g ; autolysat de levure (Difco) 0,5 g ; extrait de levure (Difco) 0,5 g ; extrait de malt (Difco) 1 g ; glucose 50 g ; KCl 0,5 g ; Mg SO₄, 7 H₂O 0,5 g ; Fe SO₄, 7 H₂O 0,01 g ; solution d'oligo-éléments (Meyers et Knight, 1958) 10 ml ; solution de succinate de sodium 0,5 M et de phosphate de sodium 0,1 M 1 000 ml ; pH final 4,0 ; stérilisation après répartition, 20 mn à 120° C.

Après incubation le milieu est séparé du mycélium par filtration sur papier et le filtrat centrifugé pendant 10 mn à 3 000 g à la température de 4° C. Le surnageant représente la préparation enzymatique brute.

2. Séparation et purification de l'enzyme

La préparation brute ajustée à pH 4,0 éventuellement conservée à -30° C, est soumise à un schéma de purification comportant une concentration par ultrafiltration, une filtration sur gel Séphadex G 75 et une chromatographie sur DEAE cellulose.

2.1. Concentration par ultrafiltration

La concentration de la préparation est réalisée par filtration sur membranes Diaflo UM 10, avec une cellule modèle 402 de 400 ml, sous pression de 3 kg par cm², à la température de 4° C. Un volume de 500 ml est ainsi amené à 50 ml en un temps voisin de 10 h.

2.2. Filtration sur gel Séphadex G 75

Les 50 ml de concentrat sont appliqués au sommet d'une colonne de Séphadex G 75 de 90 × 5 cm équilibrée en tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 4,0. Le débit d'éluion est de 50 ml par heure et l'éluat est collecté par fractions de 10 ml. Sur chaque fraction sont déterminées l'absorbance à 280 nm et l'activité protéolytique. Les fractions actives regroupées représentent un volume de solution d'environ 140 ml.

2.3. Chromatographie sur DEAE cellulose

La solution précédente est concentrée cinq fois par ultrafiltration sur membrane Diaflo UM 10. 28 ml de solution concentrée sont appliqués sur une colonne de DEAE cellulose de 40 × 2,5 cm équilibrée avec une solution d'acétate de sodium 0,05 M pH 4,0. L'éluion est réalisée avec un gradient linéaire de Na Cl pH 4,0, de 0 à 2 M. Le débit est réglé à 40 ml par heure et l'éluat collecté par fractions de 10 ml. L'absorbance à 280 nm et l'activité protéolytique sont déterminées sur chacune des fractions.

Les fractions actives rassemblées représentent un volume voisin de 70 ml. La préparation enzymatique purifiée est concentrée quatre fois ; la solution ainsi obtenue contient 1 mg de protéine par ml. Elle est conservée à -30° C.

3. Contrôle de pureté de la préparation purifiée

3.1. *Electrophorèse en gel de polyacrylamide*

Les essais ont été réalisés avec des prises d'essai de 5 µl d'une solution concentrée vingt cinq fois par filtration sur membrane Minicon B 15. L'électrophorèse est conduite à pH 8,4 en tampon Tris-glycine 0,02 M, à pH 6,0 en tampon phosphate 0,1 M et 0,01 M, à pH 4,0 en tampon acétate 0,025 M. Une tension de 200 volts est appliquée pendant 2 h. Les protéines sont révélées par coloration au noir amido et rinçage au bain d'acide acétique à 2 p. 100 pendant 10 mn. L'activité protéolytique est mise en évidence par immersion du gel dans un solution de caséine à pH 5,5.

3.2 *Filtration sur gel de Séphadex G 100*

Une prise d'essai de 1,5 ml correspondant à 1,5 mg de protéines est appliquée sur une colonne de Séphadex G 100 de 90 × 2,5 cm équilibrée en tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,0. Le débit d'éluion est réglé à 20 ml/h et l'éluat collecté par fractions de 5 ml. Les absorbances à 280 et 260 nm sont mesurées en continu à l'aide d'un densitomètre enregistreur Seive et l'activité protéolytique est déterminée sur chaque fraction collectée.

4. Détermination de l'activité protéasique

Lors des essais de mise au point des conditions de culture, l'activité des préparations enzymatiques brutes a été déterminée sur un substrat hémoglobine avec un mélange de digestion de composition suivante :

— hémoglobine (NBC) - solution à 2,5 p. 100 en citrate 0,02 M pH 7	2,5 ml
— préparation enzymatique	0,5 à 1 ml
— tampon mixte acétate-borate-phosphate 0,25 M réglé au pH voulu	1 ml
— eau distillée q.s.p.	5 ml

Après incubation 1 h à 40° C, le mélange est déféqué par addition d'acide trichloracétique à la concentration finale de 2 p. 100 et les composés azotés solubles sont dosés sur les filtrats par colorimétrie avec le réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode de Anson (1938). Les résultats sont exprimés en unités d'activité protéolytique (UP) une UP équivalant à 1 µg de tyrosine libérée par heure de digestion.

Aux différentes étapes de la purification et lors des essais de caractérisation, les activités protéolytiques ont été également déterminées sur substrat caséine dans les conditions déjà décrites (Lenoir et Choisy, 1971 ; Lenoir et Auberger, 1977 b), la composition du mélange de digestion étant identique à celle précédemment indiquée.

Dans l'étude de la cinétique de l'action enzymatique l'influence de la concentration en substrat a été éprouvée par mise en œuvre

de 12,5 à 200 mg de caséine pour une quantité d'enzyme de 4 μg . L'influence de la concentration en enzyme a été estimée sur des quantités de 0,4, 1, 2, 3 et 4 μg d'enzyme avec une concentration en caséine de 125 mg. L'influence du temps de digestion a été déterminée dans l'intervalle 15 mn/2 h avec 2 μg d'enzyme et 125 mg de caséine.

Dans l'étude de l'influence du pH de digestion, réalisée sur les substrats caséine et hémoglobine, les composés solubles dans le filtrat trichloracétique ont été dosés simultanément avec le réactif de Folin-Ciocalteu, selon la méthode de Anson (1938), et par réaction à la ninhydrine, selon Moore et Stein (1954), à l'aide d'un analyseur automatique Technicon.

5. Etude des caractères de l'activité enzymatique

L'influence du pH sur l'activité a été estimée en amenant le mélange de digestion à des valeurs de pH comprises entre 2,0 et 9,5. L'influence de la température a été déterminée par digestion à pH 5,0 sur substrat caséine pendant 1 h dans l'intervalle 10-60° C.

Les essais de stabilité à différentes températures ont été réalisés dans l'intervalle 10-60° C par maintien de la préparation à pH 4,0 pendant 1 h, l'activité résiduelle étant mesurée à pH 5,0 sur substrat caséine. La stabilité thermique a été éprouvée à la température de 60° C et pH 4,0 selon le protocole déjà décrit (Lenoir et Auberge, 1977 b), l'activité résiduelle étant mesurée à pH 5,0 sur substrat caséine.

Les essais de stabilité en fonction du pH ont été réalisés comme il est indiqué dans la note précédente, la concentration du tampon mixte étant 0,025 M et l'activité résiduelle, après maintien 1 h à 40° C, étant mesurée à pH 5,0.

L'aptitude à la libération des composés de poids moléculaire plus ou moins élevé a été estimée, selon la méthode utilisée dans l'étude de la métallo-protéase (Lenoir et Auberge, 1977 b).

L'activation du trypsinogène a été appréciée selon la méthode de Sodek et Hofmann (1970), en solution tampon citrate de sodium 0,1 M, pH 3,4 avec une concentration en substrat de 375 μg et une concentration en enzyme de 8 μg .

L'activité coagulante sur lait a été éprouvée selon la méthode de Berridge (1945), 10 ml de substrat étant additionnés d'une quantité d'enzyme équivalant à 0,16 mg de protéine.

L'action des ions métalliques, des agents chélateurs et des inhibiteurs classiques a été recherchée sur une solution d'enzyme à 0,08 mg par ml en tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 4,0. Les effecteurs en solution dans ce tampon sont ajoutés aux concentrations finales de 10, 1 et 0,1 mM. Après maintien 1 h à 20° C l'activité résiduelle est mesurée à pH 5,0 sur caséine.

L'action des inhibiteurs spécifiques des protéases acides a été déterminée dans les conditions ci-après, l'activité résiduelle de l'enzyme étant, sauf indications contraires, mesurée sur substrat hémoglobine à 2,5 p. 100 en tampon acétate 0,1 M pH 4,0.

— *Diazoacétyl-DL-norleucine méthyl ester (DAN) (I.C.N.)*

A la préparation d'enzyme purifiée (1 mg/ml) en tampon acétate 0,1 M pH 4,0 sont ajoutées une solution d'acétate de cuivre à 5 mg/ml puis une solution méthanolique de DAN à 5 mg/ml de façon à obtenir un rapport molaire entre la protéase, les ions cuivre et le DAN de 1/80/80. Après incubation 15 mn à 14° C l'activité résiduelle est mesurée sur des fractions aliquotes de 10 µl.

— *1,2, époxy-3-(p-nitrophénoxy) propane (EPNP) (Eastman)*

Le mélange réactionnel, formé de 8 ml de solution d'enzyme à 0,4 mg/ml en tampon citrate 0,1 M pH 4,5, et 40 mg d'EPNP ajoutés sous forme solide, est maintenu à 25° C et soumis à une agitation magnétique modérée pendant 96 h. A différents intervalles de temps l'activité résiduelle est mesurée sur des fractions aliquotes de 10 µl. Après incubation, le milieu réactionnel est centrifugé afin d'éliminer l'EPNP non solubilisé, puis dialysé pendant 4 jours contre un tampon acétate 0,01 M pH 4,0 renouvelé à plusieurs reprises. Le nombre de molécules d'EPNP fixées sur la protéine a été calculé selon Mains et Hofmann (1974) à partir des densités optiques à 280 et 315 nm de la solution ainsi obtenue. Un coefficient d'extinction molaire à 280 nm de 48 000 a été adopté, et il a été observé que la densité optique à 315 nm de la solution d'enzyme utilisée représentait 0,074 fois sa densité optique à 280 nm.

L'équation utilisée pour le calcul est la suivante. Nombre de résidus d'EPNP fixés/molécule d'enzyme :

$$\frac{DO_{315} - (DO_{280} \times 0,074)}{DO_{280} - (DO_{315} \times 0,438)} \times 3,91$$

— *Pepstatine**

A 1 ml de solution de protéase à 0,25 mg/ml en tampon acétate 0,1 M pH 4,0 ont été ajoutés 100 µl de diverses solutions méthanoliques de pepstatine (de 0 à 12,5 mg/ml). Le mélange est incubé 10 mn à 35° C, puis l'activité résiduelle est estimée sur une fraction aliquote. Le même procédé a été utilisé pour la pepsine sauf que l'activité résiduelle a été mesurée sur de l'hémoglobine à 1 p. 100 en tampon glycine-HCl 0,1 M pH 2,0.

* La pepstatine a été mise aimablement à notre disposition par le Dr Hofmann.

— *p-bromophénacyle bromure* (Aldrich)

L'incubation a été réalisée suivant la méthode d'Erlanger *et al.* (1955) en tampon citrate-phosphate 0,1 M pH 3,5 avec un rapport enzyme/inhibiteur de 1/15.

— *Butanedione* (Eastman)

5 μ l de butanedione sont ajoutés à une solution enzymatique (0,25 mg/ml) en tampon acétate 0,1 M pH 4,0. Le mélange est incubé à 25° C, soit exposé à la lumière du laboratoire, soit mis à l'obscurité totale.

Des fractions aliquotes sont prélevées à différents intervalles de temps pour mesurer l'activité résiduelle.

6. Etude des caractères physico-chimiques de la protéine

Le poids moléculaire de l'enzyme a été estimé selon la méthode de Whitaker (1963) par filtration sur une colonne de Séphadex G 100 de $95 \times 1,6$ cm, équilibrée en tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,0; le débit étant réglé à 15 ml/h. L'étalonnage de la colonne a été réalisé avec les protéines suivantes : sérum albumine, pepsine, trypsine, α chymotrypsine, lysozyme.

La composition en acides aminés a été déterminée après hydrolyse d'échantillons d'enzyme de 0,5 mg par l'acide chlorhydrique 6 N en tube scellé sous vide pendant 24, 48 et 72 h à 105° C. L'analyse des acides aminés a été réalisée sur un autoanalyseur Beckman Multi-chrom selon le procédé de Moore et Stein (1951). Le tryptophane a été dosé par la méthode colorimétrique de Messineo et Mussara (1972).

La cystine et la cystéine ont été oxydées selon la méthode de Spencer et Wold (1969) et la teneur en acide cystéique a été mesurée à l'aide de l'auto-analyseur.

RESULTATS

1. Conditions de production

Les essais préliminaires ont montré l'influence du facteur pH sur le niveau de production du composant stable en milieu acide (Lenoir et Auberger, 1977 a) ; celui-ci est optimal par culture aux environs de pH 4,0. Le milieu de base retenu a été tamponné avec une solution succinate phosphate. Les deux facteurs susceptibles de modifier le pH final des cultures, la concentration en succinate et la quantité de glucose, ont été éprouvés.

Les résultats, groupés dans le tableau 1, montrent qu'une concentration en succinate 0,5 M permet de stabiliser le pH au voisinage de 4,6 et d'éviter ainsi une inactivation de l'enzyme en fin de culture. La concentration en glucose a peu d'influence sur le pH de fin de culture et sur le niveau de production d'enzyme active à pH 4,0. La

TABLEAU 1. — Influence des conditions de culture sur le niveau de production d'enzyme

Essai	Mode de culture	Concentration du tampon en succinate	Teneur en glucose (g/l)	pH et activité* après incubation		
				6 j	9 j	12 j
1	Erlenmeyer	0,2 M	20 g	4,3 - 780	4,8 - 900	6,9 - 650
2	—	0,5 M	20 g	4,2 - 600	4,8 - 1200	4,65 - 1560
3	—	0,5 M	50 g	4,15 - 790	4,5 - 1110	4,6 - 1950
4	Fiolle de Roux	0,5 M	50 g	4,35 - 1380	4,85 - 1500	6,3 - 1410

* Activité exprimée en Unités protéase (UP) déterminée sur substrat hémoglobine à pH 4,0.

TABLEAU 2. — Bilan de purification de la protéase acide

	Volume (en ml)	Activité protéolytique totale (UP)	Protéine totale* (en mg)	Activité spécifique**	Rendements p. 100	
					en protéine	en activité
Filtrat de culture (A)	500	1 100 000	1 175	940	100	100
Concentration sur membrane Diaflo UM 10 (B)	50	950 000	1 080	880	92	86
Fraction active séparée sur Séphadex G 75 (C)	140	588 000	22,4	26 250	1,9	53
Fraction active séparée sur DEAE cellulose (D)	70	475 000	17,4	27 200	1,5	43

* Teneur estimée selon la méthode spectrophotométrique de Warburg et Christian (1941).

** Activité spécifique : UP par mg de protéine.

UP : Unité d'activité protéolytique. Nombre de μg de tyrosine libérée en 1 h à 40° C sur substrat caséine à pH 5,0 par 1 ml de préparation.

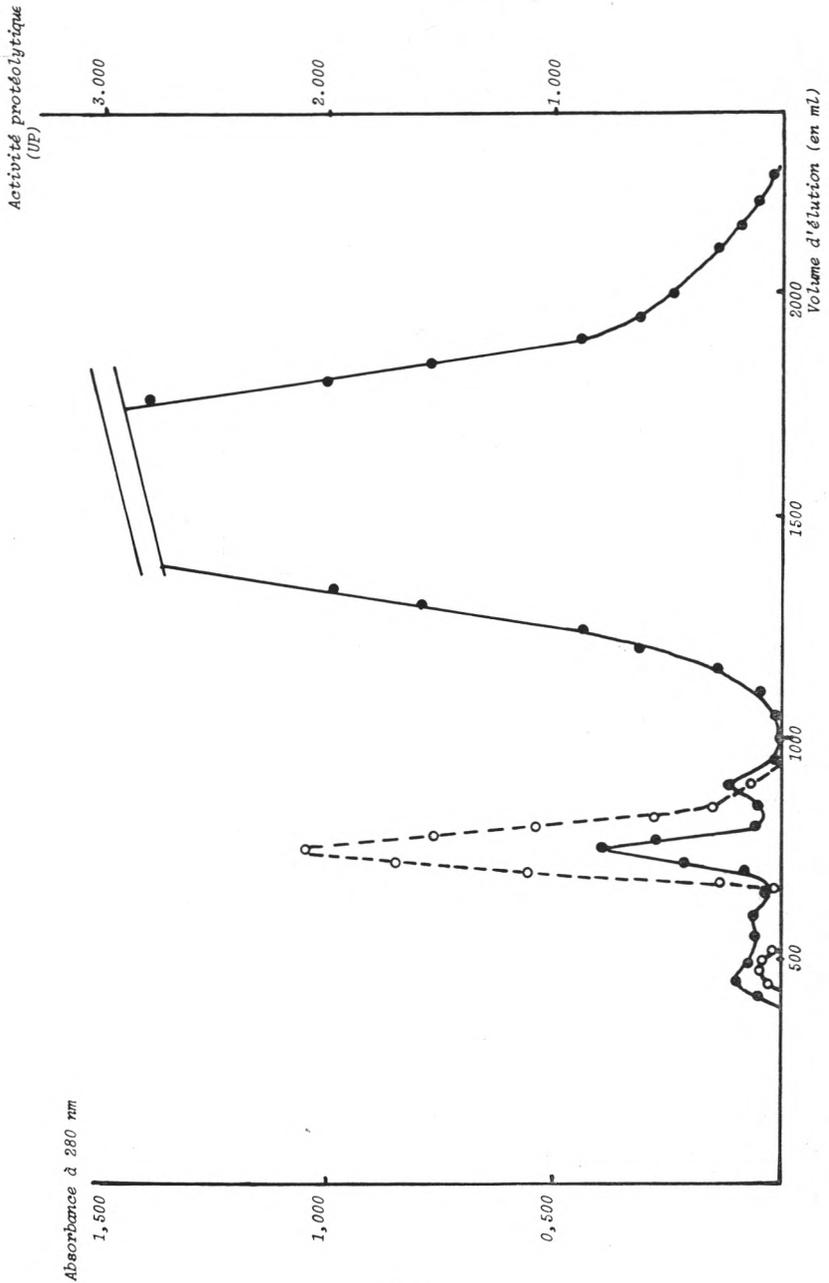


fig. 1

Diagramme de filtration sur gel de Séphadex G 75 du système protéolytique exocellulaire de *Penicillium caseicola* produit à pH 4

- Préparation initiale : filtrat de culture concentré sur Diaflo.
- Passage sur colonne 90 × 5 cm.
- Elution par tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 4,0.
- Vitesse d'élution 50 ml/h, fractions de 10 ml.
- — ● courbe d'élution des protéines (absorbance à 280 nm).
- - - - ○ courbe d'activité protéolytique mesurée à pH 5,0 sur caséine.

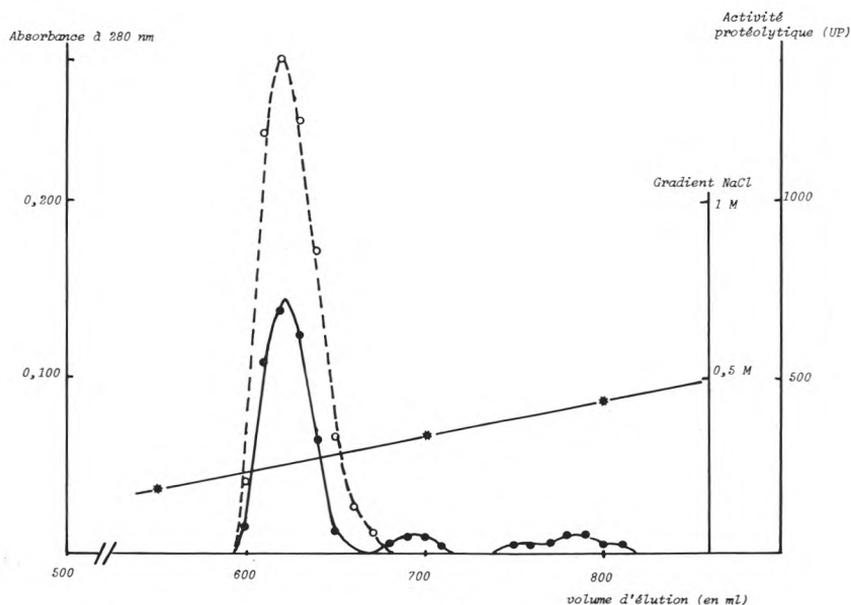


fig. 2

Diagramme de chromatographie sur DEAE cellulose de la préparation enzymatique purifiée

- Colonne de $40 \times 2,5$ cm.
- Tampon de départ : acétate 0,05 M, pH 4,0.
- Elution avec un gradient de NaCl de 0 à 2 M.
- Débit 40 ml/h, fractions de 10 ml.
- Echantillon : 22 mg de protéines en solution dans 28 ml de tampon.
- Absorbance à 280 nm.
- - - - ○ Activité protéolytique mesurée à pH 5,0 sur caséine.

culture en fiole de Roux, comparée à celle en erlenmeyer permet une croissance plus rapide et une production d'enzyme plus précoce.

Le milieu de culture utilisé finalement dans tous les essais contient 50 g de glucose par litre et le tampon est une solution succinate 0,5 M-phosphate 0,1 M ajusté à pH 4,0. L'incubation des cultures est arrêtée lorsque le pH du milieu atteint 5,8.

2. Purification

Le bilan de la purification de la préparation enzymatique est précisé dans le tableau 2.

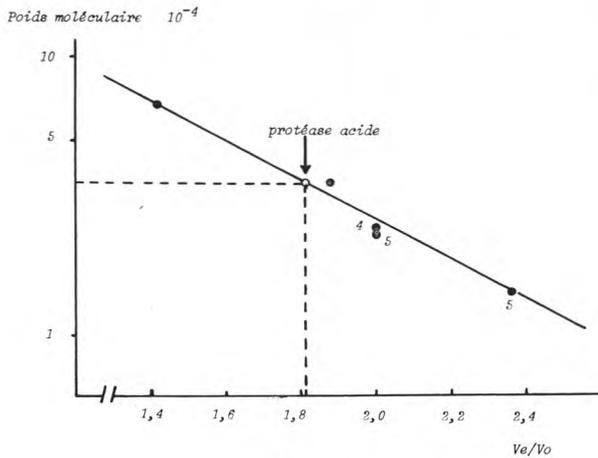


fig. 3

Détermination du poids moléculaire par filtration sur gel de Séphadex G 100

- Colonne $95 \times 1,6$ cm, débit 15 ml/h, fraction de 3 ml.
- Elution en acétate de sodium 0,1 M, pH 4,0.
- 1. Sérum albumine (Boehringer). 4. α chymotrypsine (Sigma).
- 2. Pepsine (Sigma). 5. Lysozyme (Sigma).
- 3. Trypsine (Sigma).

L'ultrafiltration sur membranes Diaflo UM 10 permet de concentrer le milieu de culture dans le rapport 10/1 et d'éliminer l'essentiel de la fraction azotée non protéique du milieu avec un rendement proche de 90 p. 100 de l'activité initiale.

La filtration sur gel de Séphadex G 75 (fig. 1) élimine 98 p. 100 de protéines non actives et elle isole une fraction enzymatique principale avec un rendement en activité supérieur à 50 p. 100.

La chromatographie sur colonne DEAE cellulose de cette fraction principale permet d'éliminer une petite quantité de protéines, l'activité protéolytique étant éluée en un seul pic pour une molarité en Na Cl comprise entre 0,2 et 0,3 M (fig. 2).

Le bilan de la purification se traduit finalement par l'obtention d'une préparation ayant une activité spécifique de 27 200, soit un rapport de purification voisin de 29, avec un rendement en activité supérieur à 40 p. 100.

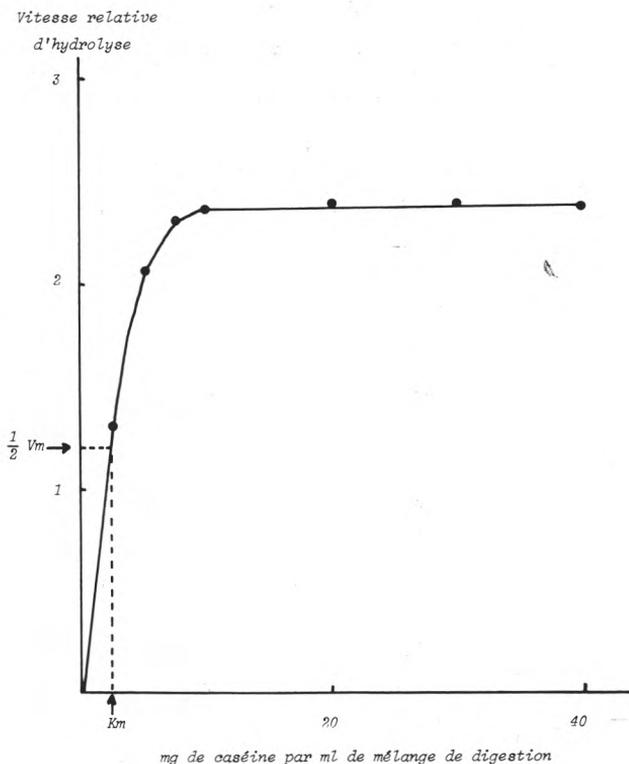


fig. 4

Influence de la concentration en caséine sur la vitesse d'hydrolyse par la protéase acide

- Concentration en enzyme : 0,8 $\mu\text{g/ml}$ de mélange de digestion.
- Température d'action : 40° C, pH 5,0, durée d'incubation 1 h.

3. Caractères physico-chimiques de la protéine

L'enzyme séparée sur colonne de DEAE cellulose présente les caractères d'une protéine homogène. Les diagrammes d'électrophorèse en gel de polyacrylamide aux pH de 4,0-6,0 et 8,4 révèlent la présence d'une seule bande au niveau de laquelle l'activité protéolytique a pu être révélée.

Le poids moléculaire de la protéine, déterminé par filtration sur gel, peut être estimé à 35 000 daltons (fig. 3). Calculé sur la base de la composition en acides aminés il est de 34 300.

TABLEAU 3

Composition en acides aminés de la protéase acide de *Penicillium caseicolum* comparaison avec les protéases acides de *Penicillium janthinellum* et *Penicillium roqueforti*

Acide aminé	<i>Penicillium roqueforti</i> (1)	<i>Penicillium janthinellum</i> (2)	<i>Penicillium caseicolum</i>
Lysine	15	5	18
Histidine	2	3	4
Arginine	1	0	1
Tryptophane	5	3	2
Acide aspartique	33	41	39
Thréonine	27	30	32
Sérine	37	46	37
Acide glutamique	16	29	22
Proline	10	12	19
Glycine	40	43	38
Alanine	25	24	28
Cystéine	2	2	3
Valine	21	22	27
Méthionine	0	0	0
Isoleucine	20	14	13
Leucine	21	20	20
Tyrosine	14	14	10
Phénylalanine	19	19	19
Total	308	327	332

(1) D'après Zevaco *et al.*, 1973.

(2) D'après Cunningham *et al.*, 1976.

La composition en acides aminés (tab. 3) est très comparable à celle des autres protéases acides déjà étudiées. Comme les enzymes de *Penicillium janthinellum* (Cunningham *et al.*, 1976) et *P. roqueforti* (Zevaco *et al.*, 1973) elle présente une forte proportion de résidus acides par rapport aux résidus basiques, elle ne contient pas de méthionine et le nombre de résidus cystéine ou 1/2 cystine est faible comparé à celui des protéases acides d'origine animale, pepsine et présure. La protéase de *P. caseicolum* se distingue cependant des enzymes des autres *Penicillia*, notamment par le nombre des résidus proline.

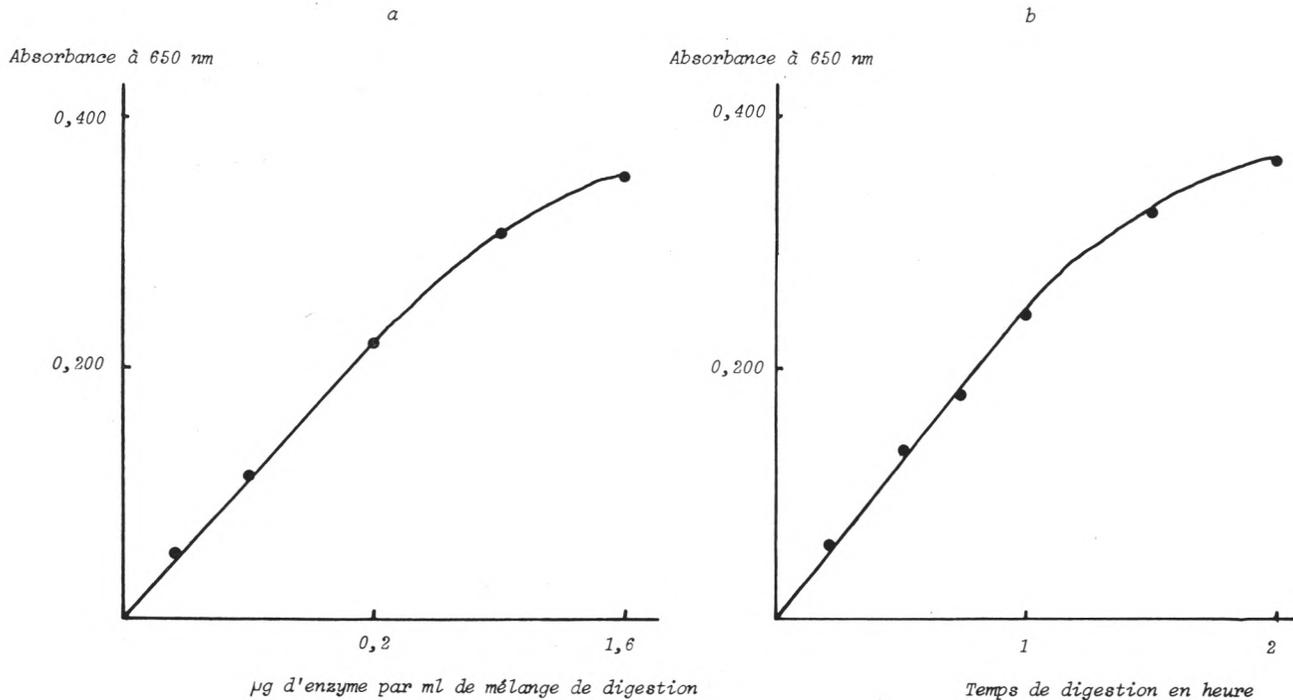


fig. 5. — Cinétique de l'action de la protéase acide sur la caséine

- a) Influence de la quantité d'enzyme : substrat : 25 mg de caséine/ml de mélange de digestion ; incubation de 1 h à 40° C et pH 5,0.
- b) Influence du temps de digestion : substrat : 25 mg de caséine/ml de mélange de digestion ; concentration en enzyme de 0,8 μg /ml de mélange de digestion ; incubation à 40° C et pH 5,0.

Hydrolyse de la caséine estimée par dosage de la tyrosine avec le réactif de Folin et Ciocalteu sur le filtrat trichloracétique à 2 p. 100.

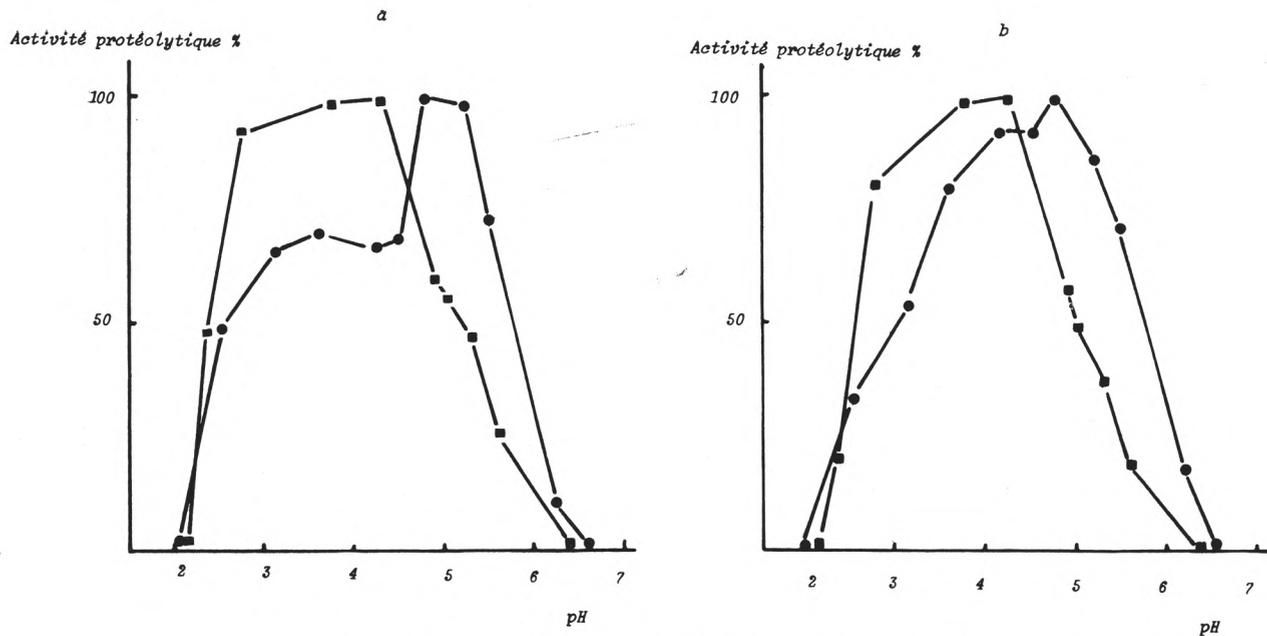


fig. 6. — Influence du pH sur l'activité de la protéase acide

a : activité estimée par dosage de la tyrosine avec le réactif de Folin et Ciocalteu.

b : activité estimée par dosage des groupements NH₂ libres par réaction à la ninhydrine.

- —● Substrat caséine.
- —■ Substrat hémoglobine.

4. Caractères de l'activité enzymatique

4.1. Cinétique de l'action enzymatique

La vitesse maximale de la réaction enzymatique sur caséine est obtenue avec une concentration en substrat de 10 g/l pour une quantité d'enzyme correspondant à 0,8 μg de protéine par ml de mélange réactionnel ; la valeur de K_m peut être estimée à 2,5 g/l (fig. 4).

L'activité protéolytique est proportionnelle à la concentration en enzyme, dans l'intervalle correspondant à 0,16-0,8 μg de protéase/ml de mélange réactionnel, et au temps de digestion, dans l'intervalle 15-60 mn (fig. 5).

4.2. Influence du pH

L'influence du pH sur l'activité de l'enzyme est représentée sur la figure 6. L'allure des courbes varie avec la nature du substrat et la méthode d'estimation du degré de protéolyse.

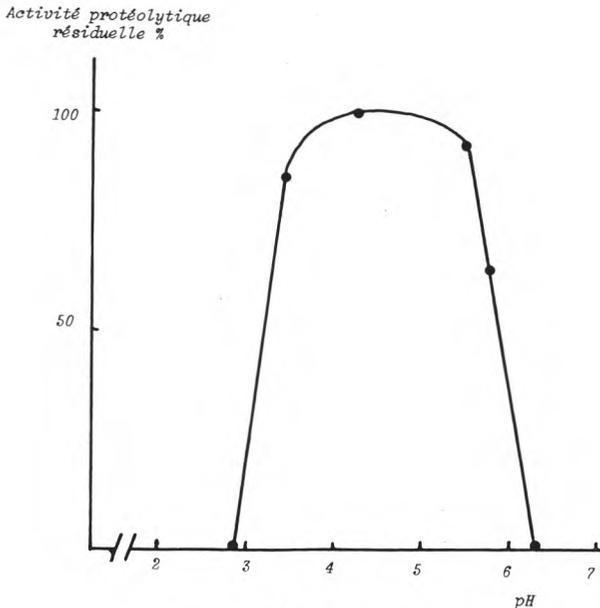


fig. 7

Influence du pH sur la stabilité de la protéase acide

- Incubation à 40° C pendant 1 h en tampon mixte acétate-phosphate-borate 0,025 M.
- Activité résiduelle mesurée à pH 5,0 sur caséine, exprimée en p. 100 de l'activité d'un témoin conservé à 4° C et pH 4,0.

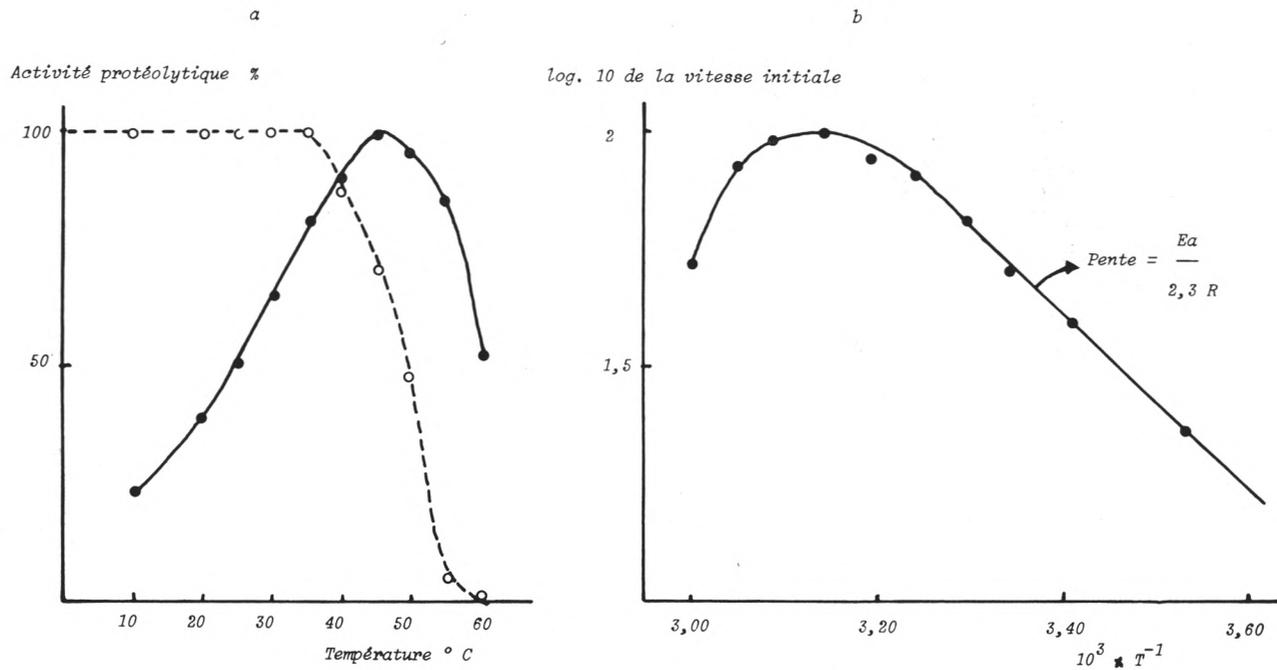


fig. 8. — Influence de la température sur l'activité et la stabilité de la protéase acide

- a) Influence sur l'activité ●——●
 Influence sur la stabilité ○- - -○
- b) Représentation selon Arrhenius de l'influence de la température sur la vitesse initiale d'hydrolyse de la caséine.
 R = constante des gaz parfaits.
 Ea = énergie apparente d'activation.

Activités protéolytiques mesurées à pH 5,0 sur caséine.

Avec l'hémoglobine le pH optimal d'action se situe dans un intervalle de 3 à 4,5. Avec la caséine entière on observe un premier optimum vers pH 3,5 et un optimum principal proche de pH 5,0 (fig. 6 a). L'infléchissement de la courbe entre ces deux optima, qui correspond au point isoélectrique de la caséine, apparaît cependant beaucoup moins marqué lorsque l'activité protéolytique est estimée par le dosage des groupements NH_2 libres avec le réactif à la ninhydrine (fig. 6 b).

Après maintien à 40° C pendant 1 h en tampon mixte 0,025 M, l'enzyme présente une zone de stabilité maximale dans l'intervalle de pH 3,5-5,5 (fig. 7). Aux pH 3,2 et 5,8 les activités résiduelles sont réduites à 50 p. 100 de l'activité initiale. Aux pH 3 et 6 l'inactivation devient à peu près totale.

4.3. Influence de la température

La température optimale d'action de l'enzyme est proche de 45° C (fig. 8 a). Dans l'intervalle 25-40° C, le Q 10 est voisin de 1,6 ; il est proche de 2 dans la zone 10-20° C. La courbe traduisant l'influence de la température sur l'activité de l'enzyme selon la représentation d'Arrhenius (fig. 8 b) permet d'estimer l'énergie apparente d'activation à une valeur de 8,7 Kcal mole⁻¹. L'inactivation thermique en 1 h à pH 4,0 se manifeste aux températures supérieures à 35° C, à 50° C elle atteint 50 p. 100 et elle devient totale à 60° C (fig. 8 a).

À la température de 60° C l'inactivation de l'enzyme en fonction du temps se traduit, en coordonnées semi-logarithmiques, par une droite (fig. 9). Le temps nécessaire à une inactivation de 90 p. 100 est proche de 13 mn.

5. Action des effecteurs

Les cations métalliques (Ca^{++} , Fe^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} , Co^{++} ...) sont sans effet sur l'activité de l'enzyme. De même, les agents chélateurs, inhibiteurs des métallo-protéases, les réactifs des enzymes à groupe SH et les composés actifs sur les protéases à sérine ne produisent aucune inhibition.

En revanche l'enzyme est rapidement inactivée par le DAN (tab. 4) un réactif spécifique des protéases acides (Rajagopalan *et al.*, 1966). Un autre réactif spécifique de ces enzymes, l'EPNP (fig. 10 a) inhibe la protéase de *Penicillium caseicolum* suivant une cinétique comparable à celle présentée par la pepsine (Tang, 1971) et par d'autres protéases d'origine fongique (Mains et Hofmann, 1974 ; Takahashi et Chang, 1973).

Par spectrophotométrie il est constaté qu'un seul résidu EPNP se fixe sur la molécule de protéine, la fixation de ce réactif étant moindre à la suite d'une inactivation préalable de l'enzyme par le DAN.

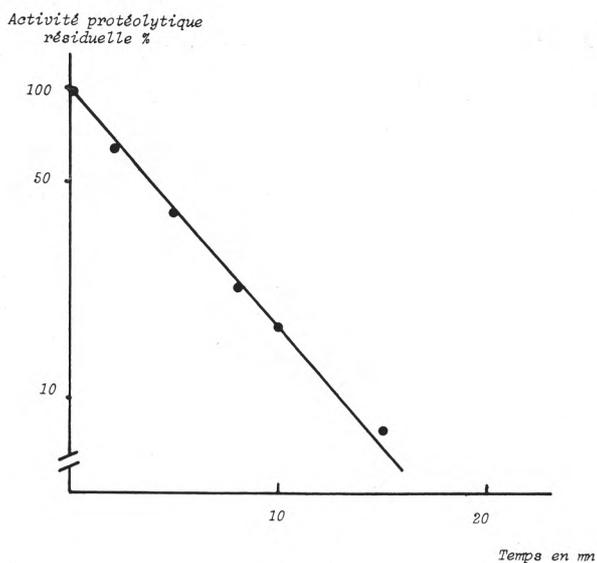


fig. 9

Inactivation thermique de la protéase acide

- Incubation à 60° C et pH 4,0 en tampon acétate 0,1 M.
- Activité résiduelle mesurée à pH 5,0 sur caséine.

TABLEAU 4

Action des inhibiteurs spécifiques des protéases acides

Inhibiteur	Conditions d'incubation		Activité résiduelle (p. 100)
	Temps (h)	Température (°C)	
DAN	0,25	14	0
EPNP	72	25	6
p-bromophénacyle Bromure	1	25	100
	24	25	100
Butanedione (lumière)	2	25	4
	24	25	0
Butanedione (obscurité)	2	25	100
	24	25	100
Pepstatine*	0,16	35	47

* Rapport molaire enzyme/inhibiteur : 1/3.

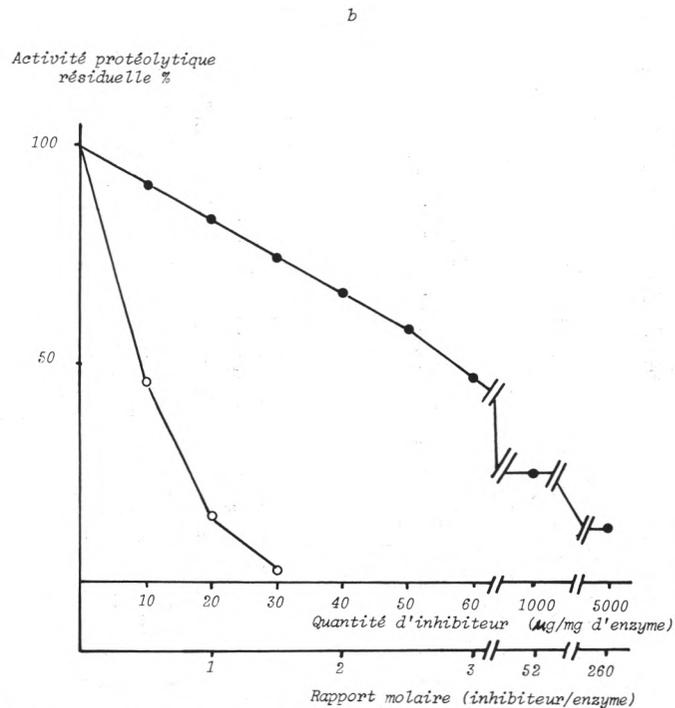
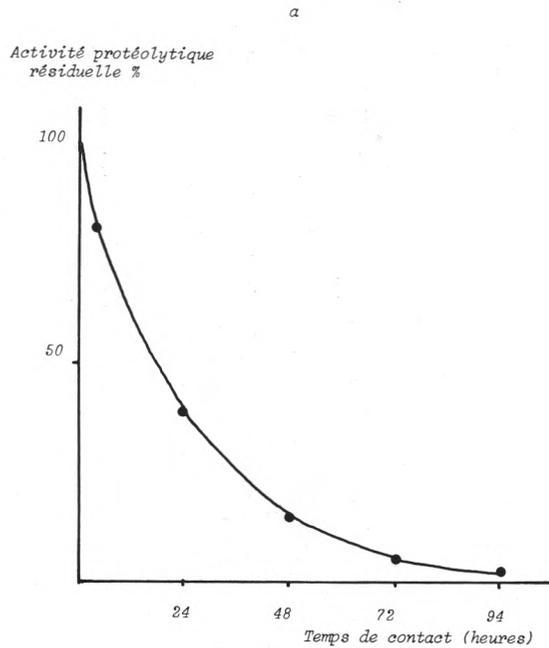


fig. 10. — Action des inhibiteurs des protéases acides sur l'activité de la protéase acide de *Penicillium caseicolum*

- a) Inactivation de la protéase acide par l'EPNP.
 b) Inactivation de la protéase acide par la pepstatine.

● — ● protéase acide de *Penicillium caseicolum*.
 ○ — ○ pepsine.

Activité résiduelle mesurée à pH 3,5 sur hémoglobine.

La pepstatine inhibe la protéase, toutefois cette inhibition est moins efficace que sur la pepsine. En incubant trois molécules de pepstatine par molécule d'enzyme l'activité résiduelle est de 47 p. 100 (fig. 10 b).

La butanedione entraîne une très forte perte d'activité mais seulement en présence de lumière, ce qui implique l'intervention d'une réaction photochimique dans le mécanisme de l'inactivation. Une telle dépendance vis-à-vis de la lumière a déjà été constatée pour d'autres protéases acides d'origine fongique ou animale (Hofmann et Gripon ; résultats non publiés). Le p-bromophénacyle bromure qui inactive la pepsine est sans action sur la protéase de *P. caseicolum*.

DISCUSSION

Le système protéolytique exocellulaire de *Penicillium caseicolum* est formé de deux composants. L'un a été identifié à une métallo-protéase. Le second présente les caractères d'une protéase acide.

Ce dernier composant est produit en proportions relativement faibles dans les cultures en milieu neutre. Son niveau de production est fortement dépendant du pH. Sur des cultures à pH 4,0 le niveau d'activité correspondant à cette fraction est beaucoup plus élevé, il est du même ordre de grandeur que celui de la protéase neutre sur les cultures à pH 6,5.

La préparation enzymatique produite en milieu acide a été purifiée par filtration sur gel de Séphadex et chromatographie sur colonne de DEAE cellulose et la protéine ainsi obtenue est homogène.

Les caractères généraux de l'enzyme sont très voisins de ceux des protéases acides déjà étudiées.

Son poids moléculaire est proche de 35 000 et sa composition en acides aminés révèle une forte proportion d'acides aminés dicarboxyliques par rapport aux résidus basiques. Son pH optimum d'action sur l'hémoglobine est voisin de 3,5-4,0 et sa zone de stabilité en fonction du pH se situe dans l'intervalle 3,5-5,5. En outre, elle coagule le lait, mais cette activité présurigène est faible, et elle active le trypsinogène de bœuf, une propriété qui a été reconnue chez les protéases acides de *Aspergillus oryzae* (Nakanishi, 1965), *A. satoï* (Galeboteau et Desnuelle, 1960), *P. janthinellum* (Sodek et Hofmann, 1970), *P. roqueforti* (Zevaco et al., 1973) et *Endothia parasitica* (Whitaker, 1972).

L'action des inhibiteurs confirme les conclusions tirées des propriétés générales. Pour certaines protéases acides il a été démontré que deux résidus acide aspartique interviennent dans le mécanisme catalytique. L'un de ces résidus est sous forme protonée et il réagit avec le DAN (Rajagopalan et al., 1966 ; Tang, 1971 ; Mains et Hofmann, 1974) ; l'autre, sous forme dissociée, réagit avec l'EPNP (Hofmann,

1974). L'enzyme de *P. caseicolum* a le même comportement que les autres protéases acides vis-à-vis du DAN et de l'EPNP, elle possède donc bien le mécanisme d'action propre à ce groupe d'enzymes.

De même, les inhibitions obtenues avec la pepstatine et la butanedione sont analogues à celles observées avec d'autres protéases acides (Satoï et Murao, 1973 ; Hofmann et Gripon, résultats non publiés). En revanche, le p-bromophénacyle bromure est sans effet. Ce réactif inhibe partiellement la pepsine mais est totalement inefficace sur d'autres protéases acides ; il ne peut donc être considéré comme un inhibiteur spécifique de ces enzymes.

L'enzyme de *P. caseicolum* est donc bien une protéase acide fongique classique.

Toutefois, il a été observé que la protéine fixe une seule molécule d'EPNP alors que la pepsine (Tang, 1971), la présure (Chang et Takahashi, 1973), et les protéases de *Rhizopus chimensis*, *A. satoï* et *Trametes sanguinea* (Takahashi et Chang, 1973) fixent deux molécules de ce réactif. Sur la pepsine, l'EPNP réagit avec l'un des deux résidus acide aspartique impliqués dans le site actif (Asp 32) et avec un résidu méthionine (Chen et Tang, 1972). La protéase acide de *P. caseicolum* ne contenant pas de méthionine il y a fixation d'une seule molécule d'EPNP. Après inactivation par le DAN, la quantité d'EPNP fixée est plus faible ; ce pourrait être parce que le DAN gêne la fixation de l'EPNP par empêchement stérique. Ce comportement n'est pas observé chez les autres protéases acides, à l'exception des enzymes de *P. janthinellum* (Mains et Hofmann, 1974) et *P. roqueforti* (Gripon, 1976) également dépourvues de méthionine et qui ne fixent qu'une seule molécule d'EPNP. Les protéases acides des *Penicillia* semblent ainsi être plus proches entre elles qu'elles ne le sont des autres protéases acides.

Les conditions de production, de stabilité et d'activité des deux protéases de *P. caseicolum* sont donc sensiblement différentes. La protéase neutre, stable dans l'intervalle de pH 5,5-9,0 est l'enzyme principale produite à pH 6-6,5. La protéase acide, stable dans la zone de pH 3,5-5,5, se trouve rapidement inactivée à pH 6. Dans les pâtes fromagères du type Camembert le pH en surface remonte rapidement à des valeurs supérieures à 5,5-6,0 (Lenoir, 1962). On peut donc penser que la participation de la protéase acide dans l'affinage du fromage doit être limitée, comparée à celle de la protéase neutre. Une détermination des activités respectives des deux enzymes, est cependant nécessaire pour confirmer cette hypothèse.

Remerciements

Nous adressons nos vifs remerciements à Mme Brignon et à M. Ribadeau-Dumas pour la réalisation des analyses d'acides aminés.

Résumé

Le deuxième composant du système protéolytique exocellulaire de *P. caseicolum*, produit en faible proportion dans les cultures en milieu neutre, est synthétisé en quantité nettement plus grande en milieu acide à pH 4,0.

L'enzyme a été purifiée par filtration sur gel de Séphadex G 75 et par chromatographie sur DEAE cellulose avec un rendement en activité de 43 p. 100. La préparation purifiée est homogène à l'électrophorèse à pH 4,0-6,0 et 8,4 et par filtration sur gel de Séphadex G 100. Le poids moléculaire de l'enzyme est proche de 35 000 daltons. Sa composition en acides aminés est la suivante : lys 18 ; his 4 ; arg 1 ; trp 2 ; asp 39 ; thr 32 ; ser 37 ; glu 22 ; pro 19 ; gly 38 ; ala 28 ; cys 3 ; val 27 ; ile 13 ; leu 20 ; tyr 10 ; phe 19. Le pH optimal d'action est voisin de 3,5-4,0 sur l'hémoglobine, de 5,0 sur la caséine. La stabilité est maximale dans l'intervalle de pH 3,5-5,5. La température optimale d'action est proche de 45° C et l'énergie apparente d'activation est de 8,7 Kcal mole⁻¹. La stabilité thermique de l'enzyme est faible. A pH 4,0 et 60° C l'activité se trouve réduite à 10 p. 100 de sa valeur initiale après un temps de 13 mn.

L'enzyme a une activité coagulante faible et elle est active sur le trypsinogène de bœuf.

Les cations métalliques, les agents chélateurs, les réactifs des groupes SH et le DFP n'exercent aucun effet sur l'activité de l'enzyme. En revanche les inhibiteurs spécifiques des protéases acides, notamment le DAN et l'EPNP, sont actifs.

Par ses propriétés générales et son comportement vis-à-vis des effecteurs l'enzyme s'identifie à une protéase acide. Elle est très proche des protéases acides de *P. janthinellum* et *P. roqueforti*.

Summary

The second component of the exocellular proteolytic system of *Penicillium caseicolum*, produced at low level by cultivation in neutral pH medium, was synthesized at a significantly greater amount in an acid medium at pH 4.0.

The enzyme was purified by means of a gel filtration on Sephadex G 75 and DEAE cellulose chromatography with an activity yield of 43 p. 100

The purified preparation was electrophoretically homogeneous at pH 4.0, 6.0 and 8.4 and was controlled by gel filtration on Sephadex G 100. The molecular weight of the enzyme was about 35,000 daltons. Its amino acid composition was as follows: lys 18; his 4; arg 1; trp 2;

asp 39; thr 32; ser 37; glu 22; pro 19; gly 38; ala 28; cys 3; val 27; ile 13; leu 20; tyr 10; phe 19.

The optimal pH of action was about 3.5-4.0 with hemoglobin and 5.0 with casein as substrates.

The maximal stability occurred between pH 3.5-5.5. The optimal temperature of activity was close to 45° C and the apparent activation energy was 8.7 Kcal mole⁻¹. The enzyme heat stability was weak: at 60° C and pH 4.0, the activity was reduced to 10 p. 100 of its initial value after 13 mn.

The enzyme exhibited a low milk clotting activity and was active on bovine trypsinogen.

Metallic cations, metal-complexing agents, specific SH reagent and DFP didn't have any effect on enzyme activity. The specific inhibitors of acid proteases, especially DAN and EPNP, were efficient.

Through its general properties and its behaviour towards inhibitors this enzyme could be identified to an acid protease. It was closely similar to acid protease of *P. janthinellum* and *P. roqueforti*.

Reçu pour publication en mars 1979.

Bibliographie

- ANSON (M. L.) (1938). — The estimation of pepsin, trypsin, papaïn and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen Physiol.*, 22, 79.
- BERRIDGE (N. J.) (1945). — The purification and cristallization of rennin. *Biochem. J.*, 39, 179-186.
- CHANG (W. G.) and TAKAHASHI (K.) (1973). — The structure and fonction of acid protease. II. Inactivation of bovine rennin by acid protease specific inhibitors. *J. Biochem.*, 74, 231-237.
- CHEN (K. C. S.) and TANG (J.) (1972). — Amino acid sequence around the epoxide reactive residues in pepsin. *J. Biol. Chem.*, 247, 2566-2574.
- CUNNINGHAM (A.), WANG (H. M.), JONES (S. R.), KUROSKY (A.), RAO (L.), HARRIS (C. I.), RHEE (S. H.) and HOFMANN (T.) (1976). — Amino acid sequence of penicillopepsin. IV. *Myxobacter* AL-1 protease II and *Staphylococcus aureus* proteases fragments and homology with pig pepsin and chymosin. *Can. J. Biochem.*, 54, 902-914.
- ERLANGER (B. F.), VRATSANOS (S. N.), WASSERMANN (N.) and COOPER (A. G.) (1965). — Specific and reversible inactivation of pepsin. *J. Biol. Chem.*, 240, 3447-3448.
- GABELOTEAU (C.) et DESNUELLE (P.) (1960). — Sur l'activation du trypsinogène de bœuf par une protéinase cristallisée d'*Aspergillus saitoi*. *Biochim. Biophys. Acta*, 42, 230-237.
- GRIPON (J. C.) (1976). — Inactivation of *Penicillium roqueforti* acid protease by specific pepsin inhibitor. *Biochimie*, 58, 747-749.
- HOFMANN (T.) (1974). — Structure, function and evolution of acid proteases. *Advances in Chemistry Series*, 136, 146-185.
- HUANG (W. Y.) and TANG (J.) (1972). — Modification of an arginyl residue in pepsin by 2-3 butanedione. *J. Biol. Chem.*, 247, 2704-2710.
- LENOIR (J.) (1962). — Sur la dégradation des protides au cours de la maturation du Camembert. *C.R. Acad. Agric.*, 48, 160-169.

- LENOIR (J.), CHOISY (C.) (1971). — Aptitude de l'espèce *Penicillium caseicolum* à la production d'enzymes protéolytiques. *Le Lait*, 51, (503-504), 138-157.
- LENOIR (J.), AUBERGER (B.) (1977 a). — Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. I. Précaractérisation de l'activité exocellulaire. *Le Lait*, 57, (563-564), 164-183.
- LENOIR (J.) et AUBERGER (B.) (1977 b). — Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. II. Caractérisation d'une protéase neutre. *Le Lait*, 57, (568), 471-491.
- MAINS (G.) and HOFMANN (T.) (1974). — The inactivation of penicillopepsin with 1,2-epoxy-3- (p-nitrophenoxy) propane, an active site directed reagent. *Can J. Biochem.*, 52, 1018-1023.
- MESSINEO (L.) and MUSARRA (E.) (1972). — A sensitive spectrophotometric method for the determination of free or bound tryptophan. *Int. J. Biochem.*, 3, 700-704.
- MEYERS (E.) and KNIGHT (S. G.) (1958). — Studies on the nutrition of *Penicillium roqueforti*. *Appl. Microbiol.*, 6, (3), 174-178.
- MOORE (S.) and STEIN (W. H.) (1951). — Chromatography of amino acids on sulfonates polystyrene resins. *J. Biol. Chem.*, 192, 663.
- MOORE (S.) and STEIN (W. H.) (1954). — A modified ninhydrin reagent of the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.*, 211, 907-913.
- NAKANISHI (Y.) (1965). — Trypsinogen-Kinase on *Aspergillus oryzae*. III. Purification of trypsinogen-Kinase and its relation to acid protease. *J. Biochem.*, 46, 1263-1269.
- RAJAGOPALAN (T. G.), STEIN (W. H.) and MOORE (S.) (1966). — The inactivation of pepsin by diazoacetyl norleucine methyl ester. *J. Biol. Chem.*, 241, 4295-4297.
- SATOI (S.) and MURAO (S.) (1973). — Inhibition of acid proteases by a pepsin inhibitor (S-PI). *Agr. Biol. Chem.*, 37, 2579-2587.
- SODEK (J.) and HOFMANN (T.) (1970). — Microbial acid proteases. Methods in Enzymology, vol. XIX, 372-397. Academic press, New York and London.
- SPENCER (R. L.) and WOLD (F.) (1969). — A new convenient method for estimation of total cystine-cysteine in proteins. *Anal. Biochem.*, 32, 185-190.
- TAKAHASHI (K.) and CHANG (W. J.) (1973). — Specific chemical modification of acid proteases in presence and absence of pepstatin. *J. Biochem.*, 73, 675-677.
- TANG (J.) (1971). — Specific and irreversible inactivation of pepsin by substrate like epoxides. *J. Biol. Chem.*, 246, 4510-4517.
- UMEZAWA (H.), AOYAGI (T.), MORISHIMA (H.), MATSUZAKI (M.), HAMADA (M.) and TAKEUCHI (T.) (1970). — Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by actinomycetes. *J. Antibio.*, 23, 259-262.
- WARBURG (O.) und CHRISTIAN (W.) (1941). — Isolierung und kristallisation des garungs ferment enolase. *Biochem. Z.*, 310, 384-421.
- WHITAKER (J. R.) (1963). — Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on Sephadex. *Anal. Chem.*, 35, (12), 1950-1953.
- WHITAKER (J. R.) (1972). — Activity assay for *Endothia parasitica* protease using trypsinogen as substrate. *J. Dairy Sci.*, 55, 719-725.
- ZEVACO (C.), HERMIER (J.) et GRIPON (J. C.) (1973). — Le système protéolytique de *P. roqueforti*. II. Purification et propriétés de la protéase acide. *Biochimie*, 55, 1353-1360.

Erratum

La figure 6 de la précédente publication (LENOIR et AUBERGER, 1977, *Le Lait*, 57, (568), 471-491) représentant la courbe de stabilité de la protéase neutre en fonction du pH comporte une erreur. En abscisses les valeurs de pH sont comprises dans l'intervalle 3-13 et non, comme il a été indiqué, 2-12.