Le système protéolytique de *Penicillium roqueforti*

I. CONDITIONS DE PRODUCTION ET NATURE DU SYSTEME PROTEOLYTIQUE (1)

par

J.-C. GRIPON et J.-L. BERGERE

Station Centrale de Recherches Laitières et de Technologie des Produits Animaux,
I.N.R.A., Jouy-en-Josas (Yvelines)

INTRODUCTION

Parmi les phénomènes biochimiques qui dominent les processus de maturation des fromages la dégradation des protéines est l'un des principaux. La flore microbienne, par l'intermédiaire des enzymes protéolytiques qu'elle produit, est à l'origine de transformations qui affecteront la saveur, l'arôme, les qualités rhéologiques et l'aspect du produit final. Au cours de la maturation des fromages à pâte persillée, *Penicillium roqueforti* joue un rôle important non seulement par son action lipolytique mais aussi par l'action de ses enzymes protéolytiques (Proks et *al.*, 1959 ; Salvadori et *al.*, 1962). Une meilleure connaissance du système protéolytique de *Penicillium roqueforti* permettrait de mieux comprendre et éventuellement de mieux contrôler les phénomènes de protéolyse dans les pâtes persillées. Nos connaissances sur ce point se limitent à des propriétés déterminées dans des extraits non purifiés. Naylor et *al.* (1930), Thibodeau et Macy (1942) ont montré l'existence d'une activité protéolytique intracellulaire de pH optimum compris entre 5 et 6. Ultérieurement des études portant sur des extraits intra et extracellulaires (Nishikawa, 1957 ; Imamura, 1960 ; Niki et *al.*, 1966) ont confirmé ces données. C'est pourquoi nous avons entrepris l'étude des protéases de *Penicillium roqueforti* en travaillant sur des fractions isolées et purifiées. Le présent travail constitue la phase préliminaire de cette étude : détermination des conditions de production du système protéolytique extracellulaire et, préalablement à toute purification, caractérisation sommaire de ses constituants.

(1) Travail réalisé dans le cadre d'un contrat passé avec la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique, Contrat n° 67 01 037, sur l'emploi d'enzymes d'origine microbienne dans l'affinage des fromages.

MATERIEL ET METHODES

1) Origine et caractères des souches

Les quatre souches étudiées ont été mises à notre disposition par la Société des Caves de Roquefort. Les souches 43, 608 et 493 appartiennent à l'espèce *Penicillium roqueforti*. Elles ont été isolées à partir de fromage (43) ou bien sont issues de prélèvements effectués dans l'air des Caves de Roquefort (608 et 493). La souche 10 a été identifiée comme appartenant à l'espèce *Penicillium frequentans*. Inoculée en souche pure à titre d'essai dans des fromages de Roquefort, ce *Penicillium* se développe et permet d'obtenir des fromages dont les qualités organoleptiques sont comparables à celles obtenues avec des souches de *Penicillium roqueforti*. Son étude a été incluse ici afin d'observer si l'analogie de comportement obtenue dans les fromages se reflétait au niveau des cultures en milieu agité.

Les souches sont conservées par repiquage sur milieu Potato Dextrose Agar Difco.

D'autre part un variant spontané (43 FP) faiblement protéolytique a été obtenu à partir de la souche 43. Il a été isolé par dilution d'une population de spores et ensemencement sur milieu Potato Dextrose Agar Difco.

2) Conditions de culture

a) CULTURE EN ERLNMEYER

Pour préparer l'inoculum une culture sporulée de *Penicillium roqueforti* est obtenue sur milieu Potato Dextrose Agar Difco. Environ 8 ml d'eau distillée stérile contenant 5 p. 1000 de Tween 80 sont introduits dans le tube contenant la culture sporulée. Après agitation le liquide de lavage est filtré sur gaze stérile. La suspension de spores ainsi obtenue est diluée afin d'obtenir un taux de 6.10^5 spores par ml.

Deux milieux de culture dérivés du milieu Czapek ont été utilisés :

Milieu A :

Glucose	10 g
Trypticase (Mérieux)	10 g
NaCl	11,5 g
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	6 g
HK ₂ PO ₄	1 g
KCl	0,5 g
Mg SO ₄ , 7 H ₂ O	0,5 g
Fe SO ₄ , 7 H ₂ O	0,01 g
Eau distillée	1 000 ml

Le pH est ajusté à 5,0 avant stérilisation.

Milieu B :

Glucose	10 g
Trypticase (Mérieux)	10 g
HK_2PO_4	1 g
KCl	0,5 g
$\text{MgSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,5 g
$\text{FeSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,01 g
Solution tampon 0,1 M	1 000 ml
Solution d'oligo-éléments	1 ml

Suivant le pH désiré il s'agit soit de tampon succinate-phosphate (pH 4,0 et pH 6,0) soit de tampon phosphate (pH 6,0 et pH 8,0). La solution d'oligo-éléments est celle proposée par Meyers et Knight (1958). Sa composition est la suivante :

CuCl_2	15,5 mg
$\text{ZnSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$	175,6 mg
$\text{MnCl}_2, 4 \text{ H}_2\text{O}$	36,0 mg
$\text{CaCl}_2, 2 \text{ H}_2\text{O}$	183,4 mg
$(\text{NH}_4)_6 \text{ Mo}_7\text{O}_{24}, 4 \text{ H}_2\text{O}$	10,2 mg
Eau distillée	100 ml

Les milieux de culture sont répartis dans des erlenmeyers de 250 ml à raison de 60 ml par erlenmeyer, puis stérilisés à 120° C pendant 20 mn. Un ml de suspension de spores préparée extemporanément est ajouté à chaque erlenmeyer ce qui correspond à un taux d'ensemencement de 10^4 spores par ml. Les erlenmeyers sont ensuite incubés à 25° C dans une étuve à plateau agitant (New Brunswick, Modèle R 26). Le plateau supportant les erlenmeyers est animé d'un mouvement de va-et-vient de 5 cm d'amplitude. La vitesse d'agitation est de 120 allers et retours par minute.

b) CULTURE EN FERMENTEUR

Des cultures ont été réalisées en fermenteur de 14 l (New Brunswick, Modèle FS 314) contenant 10 l de milieu B en tampon phosphate à pH 6.

Après stérilisation le milieu estensemencé avec 500 ml d'une suspension provenant du lavage d'une culture sporulée obtenue en boîte de Roux. L'inoculum est d'environ 5.10^8 spores par ml de milieu de culture. Les cultures ont lieu à la température de 25° C, la vitesse d'agitation est de 240 t/mn et le débit d'air injecté de 2 l/mn.

3) Mesure du poids sec du mycélium

Après divers temps de culture le contenu total d'un erlenmeyer est filtré sur filtre Durieux n° 111 préalablement desséché puis taré. L'ensemble mycélium et filtre est placé à l'étuve à 90° C pendant 24 h, puis pesé.

4) Mesure de l'activité protéolytique

La mesure de l'activité protéolytique est effectuée sur le filtrat de culture recueilli au moment de la détermination du poids sec. Le pH du filtrat est ajusté avec de la soude ou de l'acide chlorhydrique environ N à la valeur du pH réactionnel.

a) MESURE DE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE A pH ACIDE (pH 3,0)

2,5 ml d'une solution d'hémoglobine (NBC) dans du tampon glycine-HCl 0,1 M à pH 3 sont ajoutés à 2,5 ml du filtrat. Après incubation à 40° C pendant 1 h, la réaction est arrêtée par addition de 5 ml d'une solution d'acide trichloracétique à 5 p. 100 (concentration finale 2,5 p. 100). Après 20 mn de contact le mélange est filtré sur filtre Durieux n° 111. La teneur en peptides de la fraction soluble est mesurée par absorption à 280 nm selon la méthode de Kunitz (1947). L'unité d'activité protéolytique est définie comme la variation de 0,01 unité de densité optique en 1 h dans les conditions décrites ci-dessus.

b) MESURE DE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE A pH VOISIN DE LA NEUTRALITÉ (pH 6,0)

— Méthode utilisant la caséine

L'activité protéolytique est déterminée de la même manière qu'à pH 3 sauf que le substrat est constitué par une solution de caséine à 2,5 p. 100 en tampon phosphate 0,1 M à pH 6,0 et le temps d'incubation est de 3 h. L'unité d'activité protéolytique est définie comme la variation de 0,01 unité de densité optique en 3 h dans les conditions définies ci-dessus.

— Méthode utilisant l'azocaséine

Cette méthode est dérivée de la méthode de Charney et Tomarelli (1947). Un ml d'une solution d'azocaséine (Fluka, lot n° 562 309) en tampon phosphate 0,1 M à pH 6,0 est ajouté à 1 ml de filtrat de culture. Après 1 h d'incubation à 40° C, 2 ml d'acide trichloracétique à 5 p. 100 sont additionnés pour arrêter la réaction. Après filtration du mélange sur filtre Durieux n° 111, 1,5 ml de filtrat est ajouté à 1,5 ml de soude environ 0,5 N. La densité optique du mélange est mesurée à 440 nm. L'unité d'activité protéolytique est définie comme la variation de 0,01 unité de densité optique en 1 h dans les conditions définies ci-dessus.

c) MESURE DE L'ACTIVITÉ A pH ALCALIN (pH 9,0)

L'activité protéolytique est mesurée et définie de la même façon qu'à pH neutre sauf que l'azocaséine est préparée en tampon Tris-HCl 0,1 M à pH 9,0.

fig. 1

Evolution des cultures en milieu A (non tamponné)

- Poids sec.
- ▲—▲ Activité protéolytique (substrat caséine 2,5 p. 100 en tampon phosphate 0,1 M pH 6,0).
- pH du milieu de culture.

a) souche 43.

b) souche 10.

c) souche 608.

RESULTATS

I. — Etude préliminaire de quatre souches de *penicillium*

Les quatre souches ont été cultivées en erlenmeyer sur milieu A. L'activité protéolytique mesurée sur la caséine à pH 6,0, la croissance, le pH du milieu ont été déterminés chaque jour du 2^{me} au 6^{me} jour pour les souches 43, 608 et 10 et du 4^{me} au 6^{me} jour pour la souche 493.

La croissance de la souche 43 (fig. 1 a) s'effectue surtout au cours du 2^{me} et 3^{me} jour d'incubation, puis s'arrête. La décroissance ultérieure du poids sec est due à une lyse progressive du mycélium, lyse que l'on peut observer au microscope. Les spores commencent à apparaître au cours du 3^{me} jour. Le pH diminue d'environ une unité pH et demie pendant la phase de croissance, puis remonte pour atteindre une valeur supérieure à 8 après l'arrêt de la croissance. L'activité protéolytique à pH 6,0 suit une évolution inverse de celle du pH. Elle est maximale au 3^{me} jour, puis diminue ensuite brutalement entre le 3^{me} et le 4^{me} jour.

Le comportement de la souche 608 (fig. 1 c) diffère de celui de la souche 43 par une croissance plus lente, une variation du pH également plus lente et une activité protéolytique plus faible et dont la diminution après la fin de la croissance est moins accusée. Une étude complète du comportement de la souche 493 n'a pas été effectuée en raison de sa faible activité protéolytique. Cette activité représente moins d'un dixième de celle de la souche 43 et se maintient sensiblement constante pendant la période d'alcalinisation.

Le comportement de la souche de *Penicillium frequentans* (fig. 1 b) diffère de celui de la souche 43 par une augmentation plus lente du pH (en fin de culture le pH ne dépasse pas 6,5). L'activité protéolytique est moins importante, elle apparaît plus lentement et ne diminue pas lorsque la croissance s'arrête.

De la comparaison des résultats obtenus avec les trois souches 43, 608 et 10, il résulte que le phénomène principal est la corrélation entre l'alcalinisation du milieu et la diminution de l'activité protéolytique à pH 6,0.

II. — Propriétés d'un variant faiblement protéolytique de la souche 43

Les propriétés d'un variant faiblement protéolytique isolé à partir de la souche 43 ont été étudiées. Lorsque ce variant est cultivé dans le milieu liquide B en tampon phosphate à pH 6,0, l'évolution du pH au cours des cultures est sensiblement la même que celle de la souche

d'origine (tab. 1). Cependant l'activité protéolytique reste beaucoup plus faible que celle de la souche d'origine. Ce variant présente les mêmes caractères morphologiques et le même aspect de colonies que la souche 43 lorsqu'il est cultivé sur différents milieux gélosés : Potato Dextrose Agar, Malt Agar et milieu de Czapek gélosé.

TABLEAU 1

Comparaison de la souche 43 et d'un variant faiblement protéolytique
(Activité protéolytique exprimée en unité azocaséine à pH 6,0)

Temps en h	Souche 43		Variant 43 FP	
	pH	Activité protéolytique	pH	Activité protéolytique
64	6,05	12	6,00	0
88	6,05	23	6,00	0
112	6,50	40	6,40	1
136	6,70	30	6,55	1
160	6,71	29	6,55	2

III. — Influence du pH du milieu de culture sur la production du système protéolytique de *Penicillium roqueforti* souche 43

Cette étude a été conduite sur la souche 43 qui a été choisie pour une étude plus approfondie du système protéolytique en raison du niveau et de la rapidité de sa production. Étant donnée l'influence du pH sur la production de l'activité protéolytique en milieu non tamponné les cultures ont été réalisées sur milieu tamponné à différents pH : 4,0, 6,0 et 8,0. Pour cette étude le glucose est stérilisé à part en solution concentrée et ajouté extemporanément au milieu de culture.

1) Evolution du pH

Les tampons phosphate à pH 6,0 et 8,0 stabilisent correctement le pH du milieu de culture. L'amplitude de la variation est de l'ordre de 0,5 unité pH (fig. 2).

fig. 2

Evolution du pH des cultures en milieu tamponné B

- Milieu en tampon succinate phosphate 0,1 M pH 4,0.
- Milieu en tampon succinate phosphate 0,1 M pH 6,0.
- Milieu en tampon phosphate 0,1 M pH 6,0.
- Milieu en tampon phosphate 0,1 M pH 8,0.

fig. 3

Croissance de la souche 43 en milieu tamponné

- Tampon succinate phosphate 0,1 M pH 4,0.
- Tampon succinate phosphate 0,1 M pH 6,0.
- Tampon phosphate 0,1 M pH 6,0.
- Tampon phosphate 0,1 M pH 8,0.

Les tampons succinate-phosphate à pH 4,0 et 6,0 sont débordés après le 5^{me} jour de culture. La cause principale est vraisemblablement la libération des produits alcalins du métabolisme comme on l'observe en milieu non tamponné (milieu A). De plus la variation du pH peut être accentuée par la disparition du composant acide du tampon si le succinate est métabolisé par le mycélium.

2) Evolution de la croissance et sporulation

Comme on peut le voir sur la figure 3 la croissance maximale est obtenue avant que le pH initial du milieu varie. Plus ce pH est bas et plus la croissance maximale est élevée. Le pH optimal de croissance se situe donc aux environs de 4 comme cela avait été montré par Taha et Knight (1960) pour une autre souche de *Penicillium roqueforti*.

3) Evolution de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique du milieu de culture de *Penicillium roqueforti* souche 43 a été mesurée en fonction du temps d'incubation à trois pH : 3,0, 6,0 et 9,0.

a) ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE A pH 3,0 (fig. 4 a)

L'activité maximale à pH 3,0 diminue quand on augmente le pH initial du milieu de culture. A pH 6,0 et 8,0 on obtient respectivement la moitié et le dixième de la production à pH 4,0. D'autre part au cours des cultures à pH 4,0 et 6,0 on observe une diminution de l'activité quand le pH du milieu devient supérieur à 6,5, cette diminution est d'autant plus marquée que la variation de pH est plus brutale et plus importante. A pH 8,0 l'activité protéolytique reste stable malgré le pH élevé du milieu de culture.

b) ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE A pH 6,0 (fig. 4 b)

Dans les cultures à pH initial de 4,0 et de 6,0 les courbes de production de l'activité mesurée à pH 6,0 ont la même allure que les courbes de production de l'activité mesurée à pH 3,0. La production maximum la plus importante est obtenue dans le milieu à pH 4,0 et on observe une diminution de l'activité lorsque le pH augmente. En milieu tamponné à pH 8,0, l'activité mesurée à pH 6,0 augmente régulièrement jusqu'au 7^{me} jour en dépit du pH qui est aussi élevé que les pH de fin de culture des milieux précédents.

c) ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE A pH 9,0 (fig. 4 c)

L'apparition d'une activité protéolytique à pH 9,0 n'est détectable que dans les cultures en tampon phosphate à pH 6,0 et 8,0 et seulement en fin de culture. Cette activité est par ailleurs très faible.

fig. 4

Evolution de l'activité protéolytique en milieu tamponné B à pH 4,0, 6,0 et 8,0

- Tampon succinate phosphate 0,1 M pH 4,0.
- Tampon succinate phosphate 0,1 M pH 6,0.
- Tampon phosphate 0,1 M pH 6,0.
- Tampon phosphate 0,1 M pH 8,0.

a) Activité protéolytique mesurée à pH 3,0.

b) Activité protéolytique mesurée à pH 6,0.

c) Activité protéolytique mesurée à pH 9,0.

IV. — Caractérisation sommaire du système protéolytique de *Penicillium Roqueforti* souche 43

Les essais ont été effectués sur des filtrats de culture bruts de la souche 43 cultivée sur milieu A pour les déterminations des pH optimaux d'activité et de stabilité, sur milieu B en tampon phosphate à pH 6,0 pour les essais concernant la température.

a) pH OPTIMAL D'ACTIVITÉ (fig. 5)

Les deux courbes établies avec la caséine et l'hémoglobine comme substrats font apparaître deux maximums d'activité, l'un qui est au plus égal à 3,0 et l'autre qui se situe au voisinage de 5,0 sur l'hémoglobine et de 5,5 sur la caséine. Un décalage des pH optimums suivant le substrat a déjà été observé par plusieurs auteurs pour des protéases de moisissures (Bergkvist, 1963 ; Brunner et *al.*, 1971).

fig. 5

Influence du pH sur l'activité protéolytique

- Caséine 2,5 p. 100 en tampon citrate phosphate 0,1 M.
 - Caséine 2,5 p. 100 en tampon Tris HCl 0,1 M.
 - Hémoglobine 2,5 p. 100 en tampon citrate phosphate 0,1 M.
 - Hémoglobine 2,5 p. 100 en tampon Tris HCl 0,1 M.
- Temps de réaction : 3 h.

b) pH OPTIMAL DE STABILITÉ A DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES (fig. 6)

Quand la préparation d'enzymes est maintenue 24 h à 24° C ou 5 j à 4° C la zone de stabilité maximale de l'activité à pH 6,0 est voisine de pH 5,0.

L'activité décroît très rapidement quand le pH augmente au-dessus de 6,0. Au-dessous de pH 5,0, l'activité reste stable à 4° C alors qu'elle décroît à 24° C. Quand la préparation d'enzymes a subi une

congélation à -25°C suivie d'une décongélation sa stabilité s'étend de pH 4,0 à pH 6,0. Notons que l'activité résiduelle est encore de 85 p. 100 à pH 7,0 et à pH 3,5.

fig. 6

Influence du pH sur la stabilité de l'activité protéolytique mesurée à pH 6,0

—□—□— 24 h à 25° C.

—▲—▲— 5 jours à 4° C.

—○—○— 5 jours à -25°C .

Substrat : caséine 2,5 p. 100 en tampon phosphate 0,1 M pH 6,0.

Temps de réaction : 3 h.

c) TEMPÉRATURE OPTIMALE (fig. 7)

La température optimale de l'activité protéolytique à pH 6,0 est voisine de 40°C .

fig. 7

Influence de la température sur l'activité protéolytique

Substrat : caséine 2,5 p. 100 en tampon phosphate 0,1 M pH 6,0.

Temps de réaction : 3 h.

d) STABILITÉ A LA TEMPÉRATURE (fig. 8)

L'activité protéolytique à pH 6,0 est stable jusqu'à 40° C. A 45° C et 50° C l'activité résiduelle est respectivement de 85 p. 100 et 20 p. 100. A 62° C l'activité est totalement détruite.

fig. 8

Influence de la température sur la stabilité de l'activité protéolytique

Substrat : caséine 2,5 p. 100 en tampon phosphate 0,1 M pH 6,0.

Temps d'incubation : 3 h.

Temps de réaction : 3 h.

V. — Culture en fermenteur

Dans les conditions choisies pour la culture en fermenteur, l'évolution des cultures est plus rapide qu'en erlenmeyer tant en ce qui concerne la variation du pH, la production de protéase qu'en ce qui concerne le début de la sporulation. Le maximum d'activité protéolytique mesuré à pH 6,0 est obtenu entre le 2^{me} et le 3^{me} jour (fig. 9).

fig. 9

Culture en fermenteur

—■—■— pH en milieu de culture.

—▲—▲— Activité protéolytique.

Substrat : Azocaséine 4 p. 100 en tampon phosphate 0,1 M pH 6,0.

Temps de réaction : 1 h.

CONCLUSION

Les nombreux travaux effectués ces dernières années sur les enzymes protéolytiques des moisissures ont souvent mis en évidence la présence de plusieurs types d'enzymes protéolytiques chez le même organisme (Bergkvist, 1963). Ces enzymes se distinguent entre elles en particulier par leur pH optimum d'activité qui peut être acide, neutre ou alcalin. Chez *Penicillium roqueforti* souche 43, la courbe de l'activité protéolytique du milieu de culture en fonction du pH (fig. 5) présente deux optimums ce qui permet de supposer que cet organisme produit au moins deux systèmes protéolytiques : un système acide dont le pH optimal d'activité est inférieur ou égal à 3,0 et un système « semi-acide » de pH optimal voisin de 5,5. Cette hypothèse ne pouvait être déduite des courbes de l'activité protéolytique du milieu en fonction du temps de culture puisque ces courbes présentent la même évolution que l'activité mesurée à pH 3,0 ou à pH 6,0. Cependant une analyse plus poussée peut permettre de préciser les conditions de production et de stabilité de ces deux systèmes protéolytiques. L'activité protéolytique mesurée à pH 3,0 est maximale à la fin de la croissance. Sa disparition ultérieure dans les milieux à pH initial 4,0 et 6,0 coïncide avec l'augmentation du pH du milieu de culture et est due très probablement à une instabilité du système acide aux pH alcalins. On peut toutefois faire remarquer qu'il existe encore une activité mesurable à pH 3,0 dans les milieux de culture à pH initial 8,0. Cette faible activité pourrait résulter d'un équilibre entre la production du système acide et son inactivation en milieu alcalin si l'on suppose que le système acide est encore produit dans un milieu à pH 8,0.

L'activité protéolytique du milieu de culture quand elle est mesurée à pH 6,0 est obtenue quel que soit le pH initial du milieu de culture, mais son évolution en fonction du temps de culture dépend de ce pH initial. Dans le milieu initialement à pH 4,0 l'activité mesurée à pH 6,0 disparaît rapidement quand le pH augmente, alors qu'elle décroît plus lentement dans les milieux à pH 6,0 et qu'elle continue d'augmenter dans les milieux à pH 8,0. Il semble donc que le système « semi-acide » diffère suivant le pH du milieu de culture dans lequel il a été produit. On peut supposer qu'il est constitué de deux composants dont l'un serait stable aux pH supérieurs à 6,5-7,0 alors que l'autre ne le serait pas. Le pH initial du milieu de culture conditionnerait la synthèse préférentielle de l'un ou l'autre composant du système « semi-acide », les pH voisins de 8,0 favoriseraient la production du composant stable vis-à-vis du pH alors que les pH acides favoriseraient la production de l'autre composant. Ainsi, dans le milieu à pH 6,0, le composant instable aux pH alcalins serait produit principalement. C'est ce que l'on constate lorsque l'on étudie la stabilité en fonction du pH de l'activité protéolytique mesurée à pH 6,0 (fig. 6).

L'existence d'un système protéolytique à pH optimal alcalin pourrait être postulé à la vue des courbes de l'activité protéolytique du milieu mesurée à pH 9. Cependant il est plus vraisemblable que les faibles activités mesurables à pH 9 qui ont été détectées au cours des cultures à pH 6,0 et 8,0 sont dues au composant stable en milieu alcalin du système « semi-acide ».

En conclusion, les données présentées sur l'activité protéolytique de *Penicillium roqueforti* souche 43 permettent de postuler l'existence de deux systèmes protéolytiques, l'un à pH optimum 3,0, l'autre à pH optimum 5,5, ce dernier contenant deux composants dont l'un instable en milieu alcalin.

Nous avons souligné l'existence d'un variant de la souche 43 dont l'activité en milieu à pH initial 6,0, quand elle est mesurée à pH 6,0 est très faible et apparaît en fin de culture. Le composant stable vis-à-vis du pH pourrait être le seul responsable de la faible activité observée chez ce variant.

La comparaison des courbes de croissance et de production des systèmes actifs à pH 3,0 et 6,0 fait apparaître qu'il y a coïncidence entre les deux phénomènes pour les trois pH de culture étudiés. Cette remarque ne constitue pas un élément suffisant pour discuter de la relation éventuelle existant entre la croissance et la production d'enzymes. Cependant elle représente un argument en faveur de la nature exocellulaire des systèmes enzymatiques étudiés puisque ils apparaissent dans le milieu avant que le mycélium ne commence à se lyser.

La sporulation est visible avant le 4^{me} jour pour les cultures à pH initial 6,0 et entre le 4^{me} et le 5^{me} jour pour les cultures à pH initial 4,0 et 8,0, c'est-à-dire pendant une période où l'activité protéolytique du milieu de culture croît. La coïncidence entre les deux phénomènes a déjà été observée chez les moisissures (Kunitz, 1938). Pour *Penicillium janthinellum*, Thangamani et Hofmann (1966) ont conclu qu'il n'existait pas de relation entre la production de protéase et la sporulation. Dans le cas de la souche de *Penicillium roqueforti* que nous avons étudiée on remarque que la sporulation est beaucoup plus importante en milieu à pH initial 6,0 qu'en milieu à pH initial 4,0 alors que la production des systèmes protéolytiques actifs à pH 3,0 et 6,0 est plus importante en milieu à pH initial 4,0 qu'en milieu à pH initial 6,0. Ces résultats sont en faveur d'une absence de corrélation entre la sporulation et la production de protéase. Toutefois une conclusion ne pourra être apportée que lorsque les systèmes protéolytiques de *Penicillium roqueforti* seront mieux connus et que l'on pourra doser spécifiquement dans le milieu de culture l'activité de chacun des composants.

Nous avons vu que la souche étudiée présente deux optimums d'activité dans la zone acide, l'un qui est égal ou inférieur à 3,0 et l'autre qui est proche de 5,5. La production de protéases acides actives entre pH 2,0 et 4,0 est un phénomène fréquent chez les moisissures et même chez les *Penicillium* (Shimada et Matsushima, 1968). Par

contre la présence d'un pH optimum voisin de 5,5 est plus rare. On l'a déjà observé pour d'autres souches de *Penicillium roqueforti* (Niki, 1966) et pour *Rhizopus oligosporus* (Wang et Hesseltine, 1965). En général les protéases des moisissures actives au voisinage de la zone neutre ont un pH optimum entre 6,0 et 7,5 qui est supérieur à celui de la souche de *Penicillium roqueforti* que nous avons étudiée. La purification et l'étude des propriétés de ce système « semi-acide » de *Penicillium roqueforti* permettra de confirmer ou d'infirmer son originalité par rapport aux propriétés des enzymes protéolytiques de moisissures déjà connues.

L'analogie de comportement observée dans les fromages entre la souche de *Penicillium frequentans* étudiée et *Penicillium roqueforti* ne se retrouve pas en culture agitée. Des différences au point de vue physiologique se manifestent par une alcalinisation du milieu en fin de culture moins forte chez *Penicillium frequentans*. Les éléments obtenus sont insuffisants pour comparer le système protéolytique de cette souche avec celui de *Penicillium roqueforti* souche 43.

Références bibliographiques

- BERGKVIST (R.) (1963). — The proteolytic enzymes of *Aspergillus oryzae*. I. : Methods for the estimation and isolation of the proteolytic enzymes. *Acta Chem. Scand.*, 17, 1521.
- BRUNNER (R.), RÖHR (M.) and BRUNNER (H.) (1971). — Evidence of an intracellular proteinase of *Penicillium chrysogenum*. *Enzymologia*, 40, 209.
- CHARNEY (J.) and TOMARELLI (R. M.) (1947). — Colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J. Biol. Chem.*, 171, 501.
- IMAMURA (T.) (1960). — Studies on the change of milk proteins by *Penicillium roqueforti*. II. Proteolysis by enzyme preparation and effect of lactic acid bacteria. *J. Agric. Chem. Soc. Japan*, 34, 375.
- KÜNITZ (M.) (1938). — Formation of trypsin from trypsinogen by an enzyme produced by a mold of the genus *Penicillium*. *J. Gen. Physiol.*, 21, 601.
- KÜNITZ (M.) (1947). — Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *J. Gen. Physiol.*, 30, 291.
- MEYERS (E.) and KNIGHT (S. G.) (1958). — Studies on the nutrition of *Penicillium roqueforti*. *Appl. Microb.*, 6, 174.
- NAYLOR (N. M.), WEISBRODT-SMITH (L.) and HELEN JO COLLINS (1929-1930). — The esterase and protease of *Penicillium roqueforti*. *Iowa St. Coll. J. Sci.*, 4, 465.
- NIKI (T.), YOSHIOKA (Y.) and ANIKO (K.) (1966). — Proteolytic and lipolytic activities of *Penicillium roqueforti* isolated from blue cheese. *XVII Int. Dairy Congr.*, D, 531.
- NISHIKAWA (I.) (1957). — Studies on the proteolytic decomposition in cheese. II. Characteristics of the proteolytic enzyme of *Penicillium roqueforti*. *Rep. Res. Lab., Snow Brand Milk Prod. Japan*, 36.
- PROKS (J.), DOLEZALEK (J.) and PECH (Z.) (1959). — The influence of different strains of *Penicillium roqueforti* upon the ripening of cheese of Roquefort type. *XV Int. Dairy Congr.*, 2, 742.

- SALVADORI (P.), BIANCHI (B.) et CAVALLI (C.) (1962). — Etude biochimique de trois souches de *Penicillium roqueforti* destinées à la production du fromage Gorgonzola et ayant des activités protéolytiques différentes. XVI Int. Dairy Congr., B, 455.
- SHIMADA (K.) and MATSUSHIMA (K. I.) (1968). — Studies on the production of protease inhibitor by mold : Examination of the ability of molds to produce protease inhibitor. J. Agr. Chem. Soc. Japan, 42, 325.
- TAHA (E. E.) and KNIGHT (S. G.) (1961). — Physiological and chemical studies on mould proteins. I. Growth and cell proteins of *Penicillium roqueforti* as influenced by culture conditions. Arch. Microbiol., 39, 22.
- THANGAMANI (A.) and HOFMANN (T.) (1966). — The role of a protease in sporulation of *Penicillium janthinellum*. Can. J. Biochem., 44, 579.
- THIBODEAU (R.) and MACY (H.) (1942). — Growth and enzyme activity of *Penicillium roqueforti*. Minn. Univ. Agr. Exp. Station Techn. Bull., 152.
- WANG (H. L.) and HESSELTINE (C. W.) (1965). — Studies on the extracellular proteolytic enzymes of *Rhizopus oligosporus*. Can J. Microb., 11, 727.

Résumé

En culture agitée à 25° C la croissance de 3 souches de *Penicillium roqueforti* dans un milieu trypticase-glucose-sel minéraux tamponné à pH 6,0 est maximale entre les 3^{me} et 5^{me} jours de culture suivant les souches. Le pH du milieu de culture diminue pendant la croissance puis augmente. L'activité protéolytique du milieu de culture mesurée à pH 6,0 est maximale à la fin de la croissance. En culture submergée l'activité protéolytique maximale est obtenue entre le 2^{me} et le 3^{me} jour de culture. Pour une souche le système protéolytique de *P. roqueforti* présente deux maximums d'activité sur la caséine en fonction du pH (3,0 et 5,5). L'évolution de l'activité protéolytique mesurée à 3 pH différents (3,0, 6,0 et 9,0) en fonction du temps de culture dépend du pH initial du milieu de culture. De ces données on peut distinguer dans le système protéolytique de cette souche de *P. roqueforti* 3 composants :

- a) un composant avec un pH optimum d'activité sur la caséine d'environ 3,0,
- b) un composant avec un pH optimum d'activité sur la caséine d'environ 6,0 et instable aux pH alcalins,
- c) un composant avec un pH optimum d'activité sur la caséine d'environ 6,0 et stable aux pH alcalins.

Summary

Proteolytic system of Penicillium roqueforti

I. Cultural conditions and nature of the proteolytic system

Three strains of *Penicillium roqueforti* were grown in a trypticase-glucose-minerals medium buffered at pH 6.0 and shaken at 25° C. Mycelial growth was maximum after 3 to 5 days, depending on the

strain. The pH of the culture medium decreases during mycelial growth and then increases. When assayed at pH 6.0 the proteolytic activity of the culture medium was maximum at the end of mycelial growth. In submerged culture proteolytic activity was maximum after 2-3 days of culture. The properties of a strain were further investigated. The proteolytic system exhibited two pH optima (3 and 5.5) for casein digestion. The evolution of the proteolytic activity during incubation depends on the initial pH of the culture medium and on the pH value (3.0, 6.0, 9.0) choiced for the proteolytic activity assay. From the results it could be suggested that the proteolytic system of this strain contained three components :

- a) a component with optimum pH for casein digestion at about 3,0,
- b) a component unstable a alkaline pH, with optimum pH for casein digestion at about 6,0,
- c) a component stable at alkaline pH, with optimum pH for casein digestion at about 6,0.

Remerciements

Nous remercions vivement le Laboratoire de la Société des Caves de Roquefort qui a bien voulu mettre les souches étudiées à notre disposition.

Reçu pour publication en avril 1972.