

Caractérisation de l'activité protéolytique et fractionnement des dipeptidases et des aminopeptidases de *Streptococcus Thermophilus*

par

M. J. DESMAZEAUD et Maryse JUGE

*Laboratoire de Biochimie Microbienne,
Institut National de la Recherche Agronomique, C.N.R.Z.
78350 Jouy-en-Josas (France)*

INTRODUCTION

La dégradation progressive des protéines du caillé constitue l'ensemble des phénomènes les plus importants de l'affinage des fromages, permettant l'évolution de la texture et le développement de l'arôme ou de ses précurseurs. Cette protéolyse résulte principalement, à la fois de l'action de la présure (Gripon et *al.*, 1975) et de celle des enzymes microbiennes (Desmazeaud et *al.*, 1975). Dans le cas particulier des fromages à pâte cuite, en plus d'une action fondamentale comme producteurs d'acide lactique peut-on attribuer aux streptocoques thermophiles un rôle de source potentielle d'enzymes protéolytiques ou peptidasiques ? Or, malgré leur large utilisation en fromagerie, la caractérisation approfondie du système protéolytique de *Streptococcus thermophilus* n'a pas été effectuée. Cependant, la présence de protéases ou de peptidases intracellulaires a déjà été signalée chez *S. thermophilus* notamment par Poznanski et *al.* (1965), Bottazi (1965), Carini et Resmini (1968), Carini et *al.* (1969) et Choisy (1974). D'autre part, lors de l'étude des peptides stimulant la croissance de *S. thermophilus* sur le lait (Desmazeaud, 1974 a) nous avons mis en évidence et caractérisé chez une souche de cette espèce, une aminopeptidase et une dipeptidase (Rabier et Desmazeaud, 1973) ainsi qu'une métalloprotéase à faible activité protéolytique (Desmazeaud, 1974 b). Ainsi, la richesse en enzymes de cette souche rend particulièrement intéressante la recherche de la nature du système protéolytique et peptidasique chez l'espèce *S. thermophilus*, dans le but de caractériser l'aptitude à la protéolyse de ces bactéries.

Ce mémoire décrit donc la caractérisation de l'activité caséinolytique et le fractionnement électrophorétique des dipeptidases et des aminopeptidases intracellulaires de sept souches de *S. thermophilus*.

MATERIELS ET METHODES

Organisme

Les sept souches de *S. thermophilus* utilisées dans ce travail proviennent de la collection du C.N.R.Z. Elles étaient numérotées : CNRZ 7, 21, 22, 25, 160 (= TJ), 302 et 310. Elles étaient maintenues par repiquage sur lait écrémé stérile et conservées par congélation à -30°C .

Cultures et extraits cellulaires. Dosage des protéines

Le milieu utilisé pour la croissance des souches de *S. thermophilus* avait la composition suivante : tryptone (Difco) 20 g ; extrait de levure (Difco) 7 g ; lactose 40 g ; tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH 6,50, 1 000 ml. Il était stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 mn.

Les cellules étaient obtenues par centrifugation à 10 000 g pendant 30 mn de 2 l d'une culture de chaque souche, incubée 16 h à 40°C . Elles étaient lavées deux fois par du tampon phosphate de sodium 0,066 M à pH 7,0. Les cellules remises en suspension dans ce même tampon étaient broyées par des microbilles de verre pendant 10 mn dans un appareil Vibrogen réfrigéré à 4°C . L'extrait brut (60 ml) était récupéré par filtration sous vide sur verre fritté G-2 et la moitié de cet extrait était conservée par congélation à -30°C . L'autre moitié était centrifugée à 30 000 g pendant 30 mn à 4°C , le surnageant (29 ml) seul étant conservé (= fraction soluble) par congélation à -30°C .

La concentration en protéines de l'extrait brut et de la fraction soluble était déterminée selon la méthode de Lowry et *al.* (1951) avec le réactif de Folin et Ciocalteu (Merck). La sérum-albumine bovine (Sigma) était employée comme protéine étalon.

Electrophorèses en gel de polyacrylamide en tube des extraits bactériens

Les électrophorèses des fractions solubles étaient effectuées sous une tension de 220 volts en utilisant le bleu de bromophénol comme traceur, dans un appareil Pleuger comportant huit tubes de verre de $7 \times 0,5$ cm dans lesquels avait été préparé selon la technique décrite par Ornstein (1964) et Davis (1964), un gel de polyacrylamide à 7 p. 100 en tampon Tris-Borate, 0,1 M à pH 9,20. Après achèvement de l'électrophorèse, les protéines étaient révélées sur un tube par coloration au bleu de Coomassie (Serva) selon la technique décrite par Chrambach et *al.* (1967). Les autres tubes servaient à la détermination des différentes activités peptidasiques.

Electrophorèses en gel double d'acrylamide-agarose des hydrolysats de caséine

Préalablement à l'électrophorèse, les hydrolysats de caséine isoélectrique étaient dénaturés en présence d'urée 9 M contenant 1 p. 100 de β -mercaptoéthanol. L'électrophorèse était réalisée en gel double d'acrylamide-agarose selon la technique d'Uriel (1966) modifiée par l'utilisation d'urée. Les plaques de gel (Sebia) étaient auparavant réhydratées pendant 16 h en tampon Tris-glycine (Uriel, 1966) contenant de l'urée 4,5 M et 0,1 p. 100 de β -mercaptoéthanol. L'échantillon d'hydrolysats de caséine était mélangé avec un volume égal d'agarose 4 p. 100 préalablement fondu, puis introduit dans un réservoir creusé dans le gel. La présence d'urée 4,5 M dans le mélange échantillon-agarose empêche à la température ambiante la gélification de l'agarose. Celle-ci était réalisée par incubation préalable des plaques à 4° C pendant 15 mn. L'électrophorèse avait lieu à 4° C pendant 3 h sous une tension de 13 volts/cm. Les protéines étaient colorées par le bleu de Coomassie R 250 (Uriel, 1966), puis les gels décolorés dans le mélange méthanol, acide acétique, glycérol, eau (200/50/30/720 ; v/v/v/v) contenant de la résine Dowex 1 $\times$ 2. Une analyse quantitative des plaques était effectuée sur un densitomètre enregistreur (Vernon). La surface de chaque pic a été mesurée et exprimée en p. 100 de la surface de l'ensemble des pics.

Recherche et dosage des activités protéolytiques

1. UTILISATION DE LA CASÉINE COMME SUBSTRAT

1.1. Dosage des groupements aminés libérés

L'activité protéolytique était dosée à 37° C et à pH 7,0 en tampon phosphate de sodium 0,066 M en employant la caséine isoélectrique (qualité Hammersten, N.B.C.) comme substrat. Le mélange réactionnel avait la composition suivante : caséine (2 g dans 100 ml de tampon phosphate) 11,5 ml ; extrait enzymatique 1 ml, merthiolate à une concentration finale de 0,05 p. 100. Après différents intervalles de temps les acides aminés et les peptides libérés étaient séparés des protéines du mélange réactionnel par filtration après précipitation de celles-ci par l'acide trichloracétique (TCA) à une concentration finale de 6 p. 100. Ils étaient estimés par coloration de 1 ml de ce filtrat trichloracétique par 1 ml du réactif à la ninhydrine selon Moore et Stein (1948). Après dilution par 8 ml d'alcool à 50 p. 100 on mesurait la variation d'absorbance à 570 nm. Des témoins suivant l'évolution de la caséine seule et de l'extrait enzymatique seul étaient aussi dosés.

1.2. Fractionnement des hydrolysats par électrophorèse

Après 0, 24 et 48 h d'incubation, 50 μ l des mélanges réactionnels ci-dessus (§ 1.1.) étaient aussi soumis à l'électrophorèse en gel double d'acrylamide agarose décrite précédemment. Les électrophorégram-

mes des produits d'hydrolyse étaient comparés à ceux obtenus avec la caséine incubée seule en mesurant la variation de la surface des différents pics selon la technique décrite précédemment.

1.3. *Dosage des résidus tyrosyles modifiés*

1.3.1. Utilisation de l'azocaséine

L'activité protéolytique a été mesurée sur l'azocaséine (Sigma) par une modification de la méthode de Charney et Tomarelli (1947). A 11,5 ml d'azocaséine (2 g pour 100 ml de tampon phosphate de sodium 0,066 M, pH 7,0) on ajoutait 1 ml d'extrait enzymatique. Après différents temps d'incubation à 37° C la réaction était arrêtée par addition de 2 ml de TCA à 12 p. 100 à 2 ml du mélange réactionnel. Après filtration on ajoutait 1,5 ml de NaOH 0,5 N à 1,5 ml du filtrat. La variation d'absorbance était mesurée à 440 nm.

1.3.2. Utilisation de la caséine radioactive

L'activité protéolytique a été mesurée par hydrolyse de la caséine (I 125) selon la méthode de Régnier et Thang (1972). Les résidus tyrosyles de la caséine étaient marqués à l'I 125 par l'intermédiaire de la peroxydase (cette caséine nous a été fournie par le docteur Régnier de l'Institut de Biologie Physico-chimique, Paris). La caséine avait une activité spécifique de 9 000 coups par minute (cpm)/ μ g et elle était préparée à une concentration de 4 μ g/ μ l. Le mélange réactionnel avait la composition suivante : caséine marquée : 20 μ l ; extrait enzymatique 20 à 50 μ l (200 μ g de protéines environ) ; tampon TRIS-HCl 0,1 M pH 7,5 q.s. 150 μ l. Après différents temps d'incubation à 37° C la réaction était arrêtée par addition de 30 μ l de TCA à 50 p. 100. Les protéines précipitées étaient éliminées par centrifugation à 5 000 t/mn pendant 20 mn (centrifugeuse Jouan), puis 100 μ l du surnageant étaient mélangés à 10 ml du liquide de scintillation de Bray. La radioactivité des peptides libérés était finalement mesurée à l'aide d'un scintillateur (Intertechnique) réglé pour le tritium.

2. UTILISATION DE LA CHAÎNE B DE L'INSULINE CARBOXYMÉTHYLÉE

L'activité protéolytique a été dosée sur la chaîne B de l'insuline carboxyméthylée (Schwarz-Mann) en mesurant les groupements α -aminés libérés après leur coloration au réactif à la ninhydrine selon Moore et Stein (1948). Le mélange réactionnel avait la composition suivante : 5 ml de B-insuline (à une concentration de 0,03 p. 100) en tampon phosphate de sodium 0,006 M à pH 7,0 ; 0,5 ml d'extrait enzymatique ; 4,5 ml de tampon phosphate. Après différents intervalles de temps d'incubation à 37° C la réaction était arrêtée par addition de 1 ml de TCA 12 p. 100 à 1 ml de mélange réactionnel. Après filtration et coloration à la ninhydrine, on mesurait la variation d'absorbance à 570 nm de filtrat.

3. UTILISATION DE SUBSTRATS SYNTHÉTIQUES

L'activité protéolytique sur l' α -N-Benzoyl-DL-Arginine-p-nitroanilide (BANA) (Sigma) substrat de la trypsine et de la papaïne et sur la N-Benzoyl-L-Tyrosine-p-nitroanilide (BTNA) (Sigma) substrat de la chymotrypsine a été recherchée selon la méthode de Erlanger et al. (1961). Le mélange réactionnel avait la composition suivante : 0,5 ml du substrat synthétique (à une concentration de 5 mg/ml de méthanol) ; 1 ml d'extrait enzymatique ; 11 ml de tampon phosphate de sodium 0,066 M à pH 7,0. Après différents intervalles de temps d'incubation à 37° C la réaction était arrêtée par addition de TCA à une concentration finale de 12 p.100. Après filtration, on mesurait la variation d'absorbance à 410 nm du filtrat, provoquée par la libération de nitroanilide de couleur jaune.

Recherche et dosage des activités aminopeptidasiques

Les activités de type aminopeptidase ont été dosées par mesure du taux d'hydrolyse de la L-leucine-para-nitroanilide (LNA) (Sigma) et localisées après électrophorèse en gel d'acrylamide par l'étude de l'hydrolyse de la LNA et de différents L-acides aminés- β -naphtylamides (Serva).

1. HYDROLYSE DE LA LNA

Le mélange réactionnel avait la composition suivante : 0,5 ml du substrat LNA (6,4 mg en solution dans 1 ml de méthanol) ; 11 ml de tampon phosphate de sodium 0,066 M à pH 7,0 ; 1 ml d'extrait enzymatique. Après différents intervalles de temps d'incubation à 37° C la réaction était arrêtée par addition de TCA (à une concentration finale de 12 p.100). Après filtration, on mesurait la variation d'absorbance à 410 nm provoquée par la libération de nitroanilide de couleur jaune.

Pour la localisation après électrophorèse, les gels étaient incubés à 25° C directement dans la solution de LNA tamponnée décrite ci-dessus. On notait la position de l'anneau coloré sitôt son apparition sur le gel.

2. HYDROLYSE DES L-ACIDES AMINÉS- β -NAPHTYLAMIDES (x- β NA)

Après électrophorèse les aminopeptidasés ont été aussi localisées en étudiant l'hydrolyse de la L-alanine- β NA, L-leucine- β NA, glycine- β NA, L-arginine- β NA, α -L-acide aspartique- β NA selon la méthode de Miller et Mackinnon (1974). Les gels étaient incubés à 25° C directement dans le mélange suivant : 0,1 ml de substrat (10 mg de l'acide aminé- β NA en solution dans 1 ml de diméthylformamide, Sigma) ; 5 ml d'une solution de Fast Garnet GBC (Sigma) (10 mg dans 5 ml de tampon Tris-HCl 0,2 M à pH 7,50). On notait les positions relatives des anneaux colorés apparaissant sur les gels.

Recherche et dosage des activités dipeptidasiques

Les activités de type dipeptidasique ont été dosées par mesure du taux d'hydrolyse de la L-Leucyle-L-Leucine (Leu-Leu, Sigma) et localisées après électrophorèse en gel d'acrylamide par l'étude de l'hydrolyse de différents LL-dipeptides (Sigma, exceptée la L-Lysyle-L-Tyrosine, Cyclo).

1. HYDROLYSE DE LA LEU-LEU

Le mélange réactionnel avait la composition suivante : 4 ml de Leu-Leu (2,1 mg en solution dans 10 ml de tampon phosphate de sodium 0,066 M à pH 7,0) ; 0,5 ml d'extrait enzymatique. Après différents intervalles de temps d'incubation à 37° C, la réaction était arrêtée par addition de TCA (à une concentration finale de 12 p. 100). Après filtration, et coloration à la ninhydrine on mesurait la variation d'absorbance à 570 nm du filtrat.

2. SÉPARATION DES DIPEPTIDASES PAR ÉLECTROPHORÈSE

Après électrophorèse les dipeptidases ont été localisées en étudiant l'hydrolyse de huit dipeptides selon la méthode de Lewis et Harris (1967). Les gels étaient incubés à 25° C directement dans le mélange suivant : 5 mg de dipeptide dans 2 ml de tampon phosphate de sodium 0,066 M à pH 7,0 ; L-amino-acide oxydase (Sigma) 0,5 mg ; peroxydase (Boehringer) 0,8 mg ; O-dianisidine dihydrochloride (Sigma) 0,08 ml (d'une solution aqueuse à 5 mg/ml). Afin de solidifier le milieu pour éviter la diffusion de la coloration traduisant l'hydrolyse du dipeptide, 2 ml de gélose à 2 p. 100 étaient de plus additionnés au mélange réactionnel ci-dessus.

RESULTATS

1. TENEUR EN PROTÉINES DES EXTRAITS

Afin de comparer les souches de *S. thermophilus* selon les activités spécifiques de leurs différentes enzymes les teneurs en protéines des extraits bruts et des fractions solubles des broyats ont été déterminées. Les taux de protéines des extraits bruts sont assez voisins (tab. 1) excepté celui de la souche 302 qui présente une teneur en protéines plus élevée. De même, les concentrations en protéines des fractions solubles sont assez proches, exceptée celle de la souche 160 qui est beaucoup plus faible (tab. 1) bien que le taux de broyage contrôlé au microscope soit tout à fait satisfaisant.

2. CARACTÉRISATION DES AMINOPEPTIDASES

L'incubation des gels après électrophorèse, en présence de LNA révèle pour chacune des souches une seule zone d'activité aminopep-

TABLEAU 1

Teneur en protéines des extraits cellulaires des différentes souches de *S. thermophilus*

Souche (n° CNRZ)	Teneur en protéines de l'extrait brut (mg/ml)	Teneur en protéines de la fraction soluble (mg/ml)
302	14,8	6,8
21	10,5	7,2
7	10	8
160	10	3,7
310	9,3	6,2
25	9	7,8
22	8	7,2

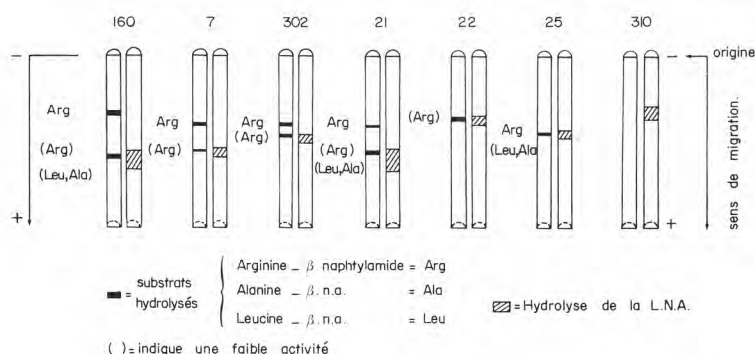


fig. 1

Fractionnement de l'activité aminopeptidasique de la fraction soluble des broyats de *S. thermophilus* et caractérisation des amino-peptidases, après électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

tidasique de mobilité électrophorétique assez voisine selon les souches bien que celle des souches 160 et 21 ait une mobilité assez forte, celle des souches 22 et 310 ayant un caractère cationique plus marqué (fig. 1).

Les différents substrats acide-aminé- β NA permettent de révéler deux aminopeptidases de spécificité différente chez les souches 160, 7, 302 et 21 (fig. 1). En effet, une aminopeptidase de faible mobilité électrophorétique hydrolyse fortement l'arginine- β NA chez ces quatre souches et une deuxième aminopeptidase plus faiblement active est aussi révélée grâce à l'arginine- β NA (souches 7 et 302) et à l'arginine- β NA, leucine- β NA ou alanine- β NA (souches 160 et 21). Aucune activité sur ces substrats - β NA n'est mise en évidence chez la souche 310 (fig. 1). D'autre part, aucune des souches n'hydrolyse ni la glycine- β NA, ni l'acide aspartique- β NA.

Ces déterminations ayant été effectuées comparativement sur chacun des demi-gels après section longitudinale du cylindre d'acry-

lamide montrent sans ambiguïté qu'il y a au plus deux aminopeptidases chez les souches 160, 7, 302 ou 21 et une seule chez les souches 22 et 25 puisque la zone active sur la LNA coïncide strictement avec une des zones actives sur les acides aminés- β NA (fig. 1).

Le substrat LNA étant hydrolysé par toutes les souches de *S. thermophilus* a été utilisé pour effectuer le classement de celles-ci. Les résultats exprimés en activité spécifique indiquent que l'aminopeptidase de la souche 160 est fortement active alors que les souches 310 et 22 n'hydrolysent que faiblement la LNA (fig. 2). D'autre part, seule la souche 302 présente une cinétique non linéaire après seulement 20 mn d'incubation.

3. CARACTÉRISATION DES ACTIVITÉS DIPEPTIDASQUES. MISE EN ÉVIDENCE DE DIPEPTIDASES VRAIES.

L'hydrolyse de certains dipeptides permet de mettre en évidence différentes activités dipeptidasiques plus ou moins spécifiques parmi les souches de *S. thermophilus*. Les souches 160, 302 et 25 présentent même deux zones d'activité (fig. 3). Les souches 302 et 25 possèdent des activités dipeptidasiques de faible mobilité électrophorétique particulièrement spécifiques, puisque seul le dipeptide lysyle-tyrosine (souche 25) ou les dipeptides lysyle-tyrosine, leucyle-leucine ou propyle-leucine (souche 302) sont hydrolysés (fig. 3).

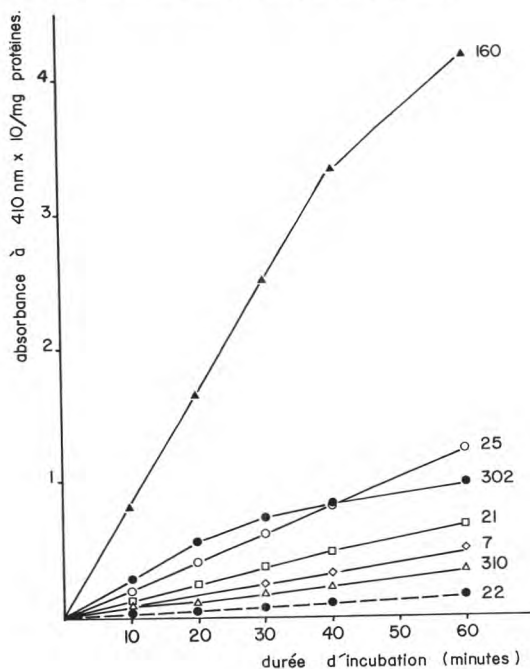


fig. 2

Dosage de l'activité aminopeptidasique de la fraction soluble des broyats de *S. thermophilus* (hydrolyse du substrat L.N.A.).

Les deux activités dipeptidasiques de la souche 160 ont une spécificité différente puisque celle de forte mobilité électrophorétique hydrolyse le prolyle-leucine contrairement à celle de faible mobilité. Cette dernière hydrolyse en plus la phénylalanyle-glycine ou la glycyl-tryptophane. De plus, il est tout à fait remarquable de noter que toutes les souches de *S. thermophilus* (à l'exception de la souche 7) sont capables d'hydrolyser la prolyle-leucine (fig. 3) liaison peptidique particulièrement résistante à l'hydrolyse enzymatique.

Afin de distinguer l'action hydrolytique sur ces dipeptides due aux aminopeptidases, de celle revenant aux dipeptidases vraies, une étude comparative de ces deux types d'enzyme a été effectuée sur chacun des demi-gels après section longitudinale du cylindre d'acrylamide. A titre de témoin, les protéines de chaque extrait ont été colorées afin de calculer sans ambiguïté les distances de migration exactes de ces différentes zones d'activité. Il apparaît ainsi que toutes

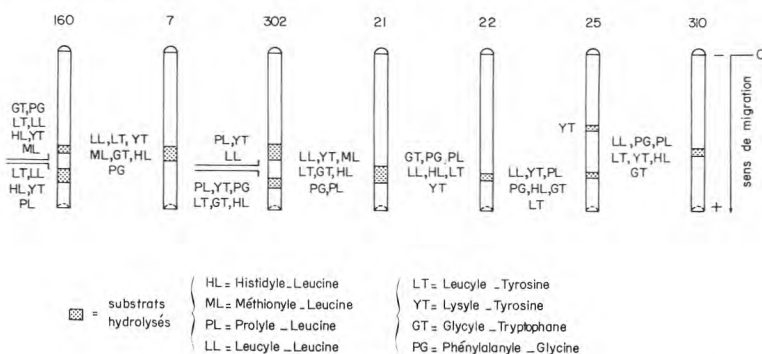


fig. 3

Fractionnement de l'activité dipeptidasique de la fraction soluble des broyats de *S. thermophilus* et caractérisation des dipeptidases après électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

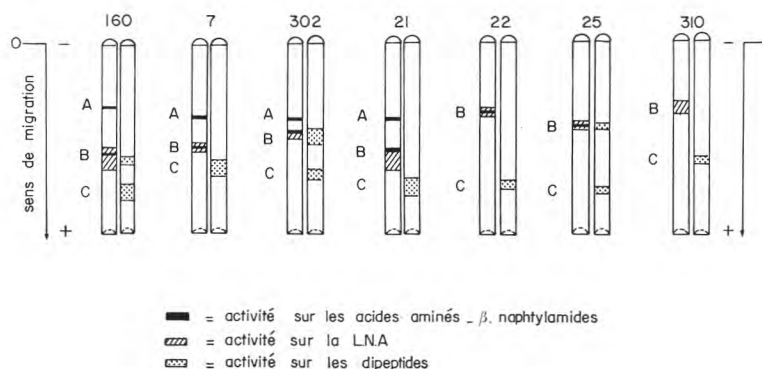


fig. 4

Mise en évidence des dipeptidases vraies dans la fraction soluble des broyats de *S. thermophilus*.

les souches de *S. thermophilus* possèdent une dipeptidase vraie (zone C des schémas électrophorétiques de la figure 4). La deuxième zone d'activité dipeptidasique des souches 160, 302 ou 25 est due, en fait, à une aminopeptidase (zone B des schémas électrophorétiques de la figure 4) et non à une dipeptidase vraie. Ces résultats confirment que les aminopeptidases de la zone A (fig. 4) des souches 160, 7, 302 et 21 ou celles de la zone B (fig. 4) des souches 7, 21, 22 et 310 sont particulièrement spécifiques puisqu'en fait elles sont incapables d'hydrolyser des dipeptides (fig. 4).

Le substrat leucyle-leucine étant hydrolysé par toutes les souches de *S. thermophilus* a été utilisé pour effectuer le classement de celles-ci. Les résultats exprimés en activité spécifique indiquent que la souche 160 est plus active (fig. 5) ceci pouvant être dû au fait que la leucyle-leucine est hydrolysée chez cette souche à la fois par une aminopeptidase et une dipeptidase. Cinq souches ont une activité moyenne (fig. 5) sur ce substrat attribuable pour quatre d'entre elles (souches 7, 25, 22 et 310) à des dipeptidases vraies, l'hydrolyse de la leucyle-leucine par la souche 302 étant due à son aminopeptidase (fig. 4). La dipeptidase de la souche 21 n'a qu'une activité faible (fig. 5) bien que détectable après électrophorèse.

4. CARACTÉRISATION DE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE

Dans nos conditions d'incubation aucune activité n'a été révélée en présence des substrats synthétiques des protéases, BANA ou BTNA. D'autre part, l'azocaséine n'est que très faiblement hydrolysée puisque après 48 h d'hydrolyse on observait des variations d'absorbance à 440 nm au plus égales à une valeur de 0,09, rendant cette méthode d'étude de la protéolyse inutilisable dans le cas des enzymes intracellulaires des bactéries lactiques.

Par contre, l'utilisation de la caséine I 125 permet d'obtenir des cinétiques très précises sur des temps d'hydrolyse particulièrement courts. D'autre part, la mise en œuvre de très petits volumes permet d'augmenter le rapport pondéral enzyme / substrat sans gaspillage excessif d'extrait enzymatique tout en augmentant considérablement la sensibilité et la précision de la méthode de mesure de l'activité protéolytique. Dans ces conditions, les souches 25 et 22 présentent les plus fortes activités protéolytiques, les souches 310 et 7 étant les plus faibles (fig. 6). Dès 15 mn d'hydrolyse on observe pour la plupart des extraits une cinétique non linéaire traduisant ainsi une diminution très précoce de la vitesse de libération des peptides. Ce fait peut traduire la présence de protéases spécifiques n'hydrolysant que quelques liaisons peptidiques. Cependant dans ces conditions, après 45 mn d'incubation les peptides radioactifs libérés par la souche 25 la plus protéolytique représentent déjà 6,6 p. 100 de la radioactivité présente dans la caséine intacte.

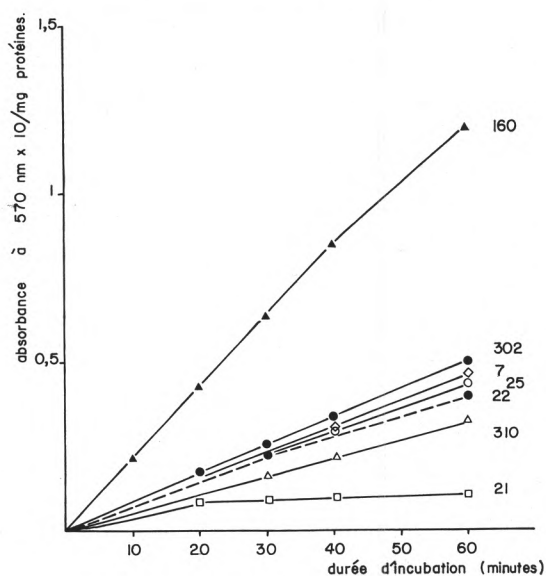


fig. 5

Dosage de l'activité dipeptidasique de la fraction soluble des broyats de *S. thermophilus* (hydrolyse du substrat Leu-Leu).

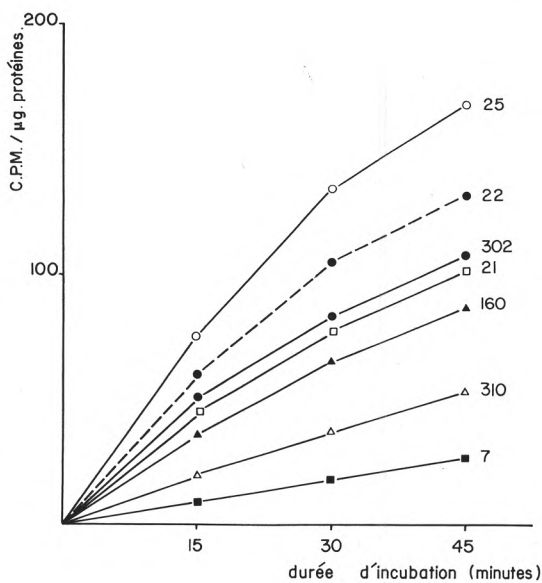


fig. 6

Activité protéolytique des broyats de *S. thermophilus* sur la caséine I 125.

L'activité protéolytique de *S. thermophilus* a été aussi recherchée sur une chaîne peptidique simple (la chaîne B de l'insuline) et sur la caséine entière, par dosage des groupements α -aminés libérés. Sur le premier substrat l'hydrolyse peut être analysée de façon satisfaisante dès 90 mn d'incubation (fig. 7) alors que l'utilisation de la caséine entière nécessite des temps d'incubation plus longs (fig. 8). Cependant les cinétiques d'hydrolyse obtenues sont complexes. Ceci traduit les effets additionnels des activités de type exopeptidasique à celui des protéases, les peptides libérés par ces dernières étant hydrolysés à leur tour par les aminopeptidases, entraînant une brusque augmentation du nombre des groupements aminés libres. Ce fait est particulièrement net dans le cas des souches 22, 160, 310 et 302 avec le substrat B-insuline (fig. 7) ou des souches 25, 160, 21 et 22 avec la caséine entière dans le cas d'une incubation prolongée (fig. 8). Cette méthode de dosage ne permet donc pas un classement précis des souches selon leurs activités spécifiques puisque celles-ci varient selon les temps d'incubation utilisés.

Cependant cette activité globale des extraits bruts des différentes souches de *S. thermophilus* sur la caséine entière, peut être caractérisée valablement par électrophorèse en gel double d'acrylamide-agarose. En comparant les électrophorégrammes des hydrolysats de caséine après 24 et 48 h d'incubation avec ceux obtenus avec de la caséine incubée seule, on constate essentiellement une forte hydrolyse de la caséine β (fig. 9). Par exemple, pour la souche 302, après 48 h d'hydrolyse le pic correspondant à la caséine β résiduelle ne représente plus que 63 p. 100 de la caséine β initiale (fig. 9). Une hydrolyse de la caséine γ se produit aussi ; sa valeur relative diminue de 52 p. 100. D'autre part deux nouveaux composés (X_1 , X_2) de mobilité électrophorétique supérieure à celle de la caséine β , sont aussi libérés par les protéases de *S. thermophilus* ainsi qu'en faible concentration, un composé X_3 très fortement anionique (fig. 9).

Les électrophorégrammes obtenus avec les autres souches de *S. thermophilus* sont tout à fait comparables à celui de la souche 302 présenté figure 9 à titre d'exemple et montrent pour toutes ces souches une forte hydrolyse des caséines β et γ , l'apparition des deux composés : X_1 et X_2 , aucune hydrolyse de la caséine α_{s1} . Ces résultats permettent ainsi de classer les souches de *S. thermophilus* en fonction du taux de disparition de la caséine β qu'elles entraînent. La souche 160 est la plus active puisque après 48 h d'hydrolyse la surface du pic correspondant à la caséine β a décru de 44 p. 100. Les souches 302, 25, 22 et 21 entraînent elles aussi un taux de disparition de la caséine β supérieur à 30 p. 100 (fig. 10). Les souches 7 et 310 sont les moins actives, hydrolysant respectivement 15 et 20 p. 100 de la caséine β (fig. 10).

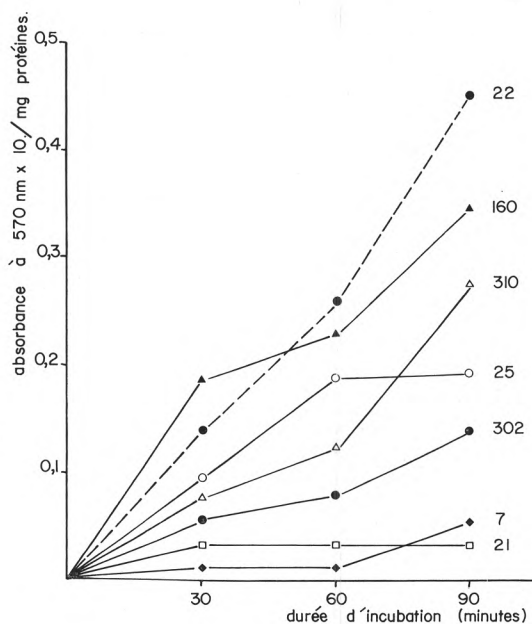


fig. 7

Dosage de l'activité peptidasique de la fraction soluble des broyats de *S. thermophilus* sur la chaîne B de l'insuline.

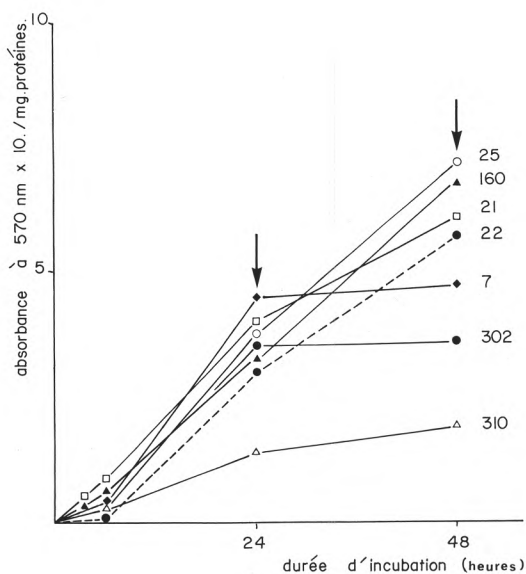


fig. 8

Hydrolyse de la caséine entière par les broyats cellulaires de *S. thermophilus*.

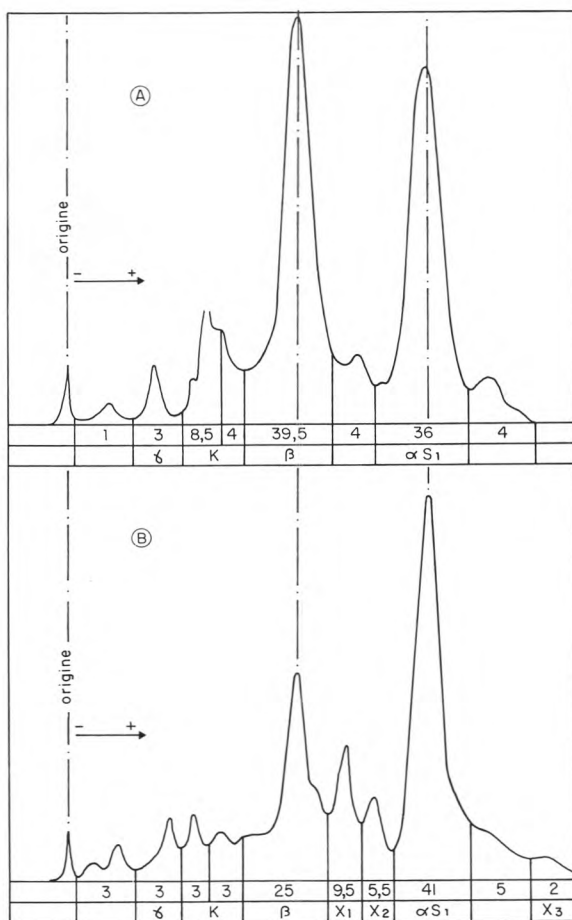


fig. 9

Etude électrophorétique de l'hydrolyse (48 h à 37° C) de la caséine entière par le broyat cellulaire de *S. thermophilus* 302 (Partie B). Partie A = caséine incubée seule 48 h à 37° C.

5. LOCALISATION CELLULAIRE DES ACTIVITÉS

Les activités aminopeptidasiques (substrat LNA), dipeptidasiques (substrat Leu-Leu) et protéolytiques (substrat caséine I 125) ont été dosées à la fois sur les extraits bruts et les fractions solubles des broyats cellulaires. En comparant ces résultats, le pourcentage de l'activité de chaque enzyme restant liée aux débris cellulaires a été calculé (fig. 10). L'activité protéolytique de la souche 160 est fortement liée aux débris cellulaires puisque l'activité de la fraction soluble ne représente que 22 p. 100 de celle de l'extrait brut. De même

63 p. 100 de l'activité dipeptidasique de la souche 310 restent adsorbés aux débris cellulaires. Par contre, il semble que pour la souche 7, les enzymes soient de localisation intracellulaire ou très faiblement liées aux enveloppes de la bactérie puisque la quasi-totalité des activités est retrouvée dans la fraction soluble du broyat cellulaire (fig. 10). Les autres souches selon les enzymes considérées présentent des répartitions intermédiaires.

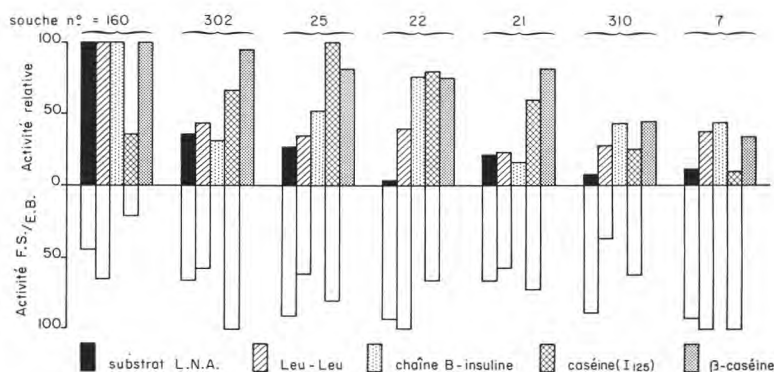


fig. 10

Répartition et localisation cellulaire des activités chez *S. thermophilus*.

Partie supérieure : les résultats sont exprimés, pour chaque enzyme, en pourcentage de l'activité spécifique de la souche la plus active.

Partie inférieure : les résultats sont exprimés, pour chaque enzyme, en pourcentage de l'activité dosée dans la fraction soluble par rapport à celle de l'extrait brut.

DISCUSSION

Seule la comparaison de résultats obtenus par plusieurs méthodes de détermination des activités de type peptide-hydrolase (EC 3.4.) peut permettre de rendre compte, chez *S. thermophilus*, de la nature exacte de son activité protéolytique générale. Cette espèce possède un système de type endopeptidasique vrai, mais les méthodes de détermination utilisées jusqu'à présent pour ces protéases (dosage des groupements aminés libérés, par le réactif à la ninhydrine, par exemple) ont été incapables de les caractériser de façon satisfaisante. Ces méthodes ne rendent compte que d'un effet global résultant de l'addition des activités exopeptidasiques aux activités endopeptidasiques vraies ne permettant pas de les distinguer valablement. Ainsi, l'utilisation de la méthode à la caséine radioactive doit être recommandée pour le dosage des protéases car elle permet de rendre compte d'une activité endopeptidasique sans interférence avec les activités exopeptidasiques. En effet, le marquage à l'I 125 se porte

essentiellement sur les résidus tyrosyles or ceux-ci se trouvent en position 60, 114, 180 ou 193 dans la caséine β par exemple (Ribadeau-Dumas et *al.*, 1973). Donc, la libération précoce que nous avons obtenue de résidus tyrosyles radioactifs si éloignés de la partie NH_2 -terminale des caséines, ne peut pas être due à l'action d'aminopeptidases mais bien seulement à celle de protéases vraies. Seule une telle méthode rend valable le classement de souches entre elles selon leur activité protéolytique. Les méthodes à l'azocaséine ou celles utilisant le réactif de Folin et Ciocalteu sont peu sensibles, nécessitent des durées d'incubation trop longues (risque de contamination microbienne) et sont trop dispendieuses en extrait enzymatique. Ainsi, une variabilité de 1 à 10 de l'intensité de la protéolyse existe entre les souches étudiées. Ce résultat est à rapprocher de ceux obtenus par Choisy (1974) lors de l'étude des aptitudes technologiques des streptocoques thermophiles, qui note que la distribution de l'activité protéolytique apparaît unimodale avec une amplitude de variation voisine de 1 à 6. Dépourvu d'activité protéolytique exocellulaire et comparé à de nombreuses espèces bactériennes (Matsubara et Feder, 1971) *S. thermophilus* doit être considéré comme une bactérie faiblement protéolytique. Elle est comparable en cela aux autres bactéries lactiques que ce soient les lactobacilles (Tourneur, 1972) ou les streptocoques du groupe N (Pearce et *al.*, 1974 ; Cowman et Speck, 1967 ; Kikuchi et *al.*, 1974).

Comme les streptocoques du groupe N (Sørhaug et Solberg, 1973 ; Mou et *al.*, 1975) les streptocoques thermophiles ont un système exopeptidasique complexe composé de dipeptidases et d'aminopeptidases, mais dépourvu de carboxypeptidase. En particulier comme *S. cremoris* et *S. diacetilactis* (Mou et *al.*, 1975), *S. thermophilus* possède une prolyle-dipeptidase (EC 3.4.13.8)* et une aminopeptidase (de type leucine aminopeptidase EC 3.4.11.1)* cette répartition étant générale à toutes les souches. Par contre, la distribution de l'aminopeptidase de type arginine-aminopeptidase (EC 3.4.11.6)* n'est pas générale puisqu'elle n'est mise en évidence que dans 57 p. 100 des cas. Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus précédemment par Bottazi (1965) qui a démontré que des suspensions cellulaires de *S. thermophilus* étaient capables d'hydrolyser de nombreux peptides de synthèse en libérant préférentiellement la leucine, la glycine ou l'alanine.

L'effet global des activités exopeptidasiques et des protéases de *S. thermophilus*, d'une manière générale, se porte essentiellement sur la caséine β . Parmi les bactéries lactiques cet effet est assez remarquable puisqu'en général c'est la caséine α_{s1} qui est plutôt dégradée. C'est le cas par exemple, pour *Lactobacillus bulgaricus*,

* *Enzymes Nomenclature*. Recommendations (1972) of the International Union of Biochemistry. Elsevier Scientific Publ. Co. Amsterdam.

L. helveticus ou *S. lactis* (Ohmiya et Sato, 1968) ; *L. jugurti* (Anibaldi, 1969) ou *S. cremoris* (Ohmiya et Sato, 1969). Or les streptocoques thermophiles représentent dans les fromages à pâte cuite pressée à une certaine période de la fabrication une fraction importante de la flore microbienne (Langsrud et Reinbold, 1973). A cette phase de développement, succède une phase de lyse des bactéries lactiques libérant ainsi dans le caillé leurs enzymes intracellulaires devenant des agents potentiels de la maturation des fromages (Desmazeaud et al., 1975). Leur action sera d'autant plus forte que les caséines β et γ ont été déjà modifiées par la présure (Gripon et al., 1975) tel que l'ont précisé Poznanski et al. (1965).

D'autre part, du fait de leur richesse en exopeptidases certaines souches de *S. thermophilus* pourraient éventuellement être à l'origine de la disparition de certains peptides responsables de l'amertume de certains fromages. En effet, Mou et al. (1975) ont démontré que les souches de streptocoques du groupe N présentaient cette propriété du fait de leur capacité d'hydrolyse de la liaison peptidique prolyle-X.

Enfin, cette étude permet de mieux comprendre le fait que les streptocoques thermophiles soient en général fortement stimulés par des peptides (Desmazeaud et Hermier, 1972 et 1973). En effet, toutes les souches possèdent un système protéolytique capable d'hydrolyser totalement ces facteurs stimulants en donnant les différents acides aminés — y compris la proline — qui leur sont facteurs de croissance. Cependant nous n'avons pas pu établir de corrélation entre les activités spécifiques de telle ou telle enzyme des différentes souches et la valeur de leurs indices de stimulation respectifs (Desmazeaud, 1974 a).

Résumé

Le système protéolytique intracellulaire de sept souches de *Streptococcus thermophilus* a été caractérisé en comparant les résultats obtenus par plusieurs méthodes de détermination des activités de type peptide-hydrolase (EC 3.4) et en effectuant un fractionnement électrophorétique de celles-ci à partir des extraits solubles des broyats cellulaires.

Toutes les souches ont une aminopeptidase de type leucine-amino-peptidase (EC 3.4.11.1), certaines étant actives sur des dipeptides ou des acides aminés β -naphtylamides. Certaines souches possèdent aussi une seconde aminopeptidase de type arginine-amino-peptidase (EC 3.4.11.6) généralement inactive sur les dipeptides. Toutes les souches possèdent, d'autre part, une prolyle-dipeptidase (EC 3.4.13.8) capable d'hydrolyser de nombreux dipeptides. Aucune activité de type carboxypeptidase (EC 3.4.12) n'a été retrouvée. Les protéases ont été mises

en évidence et dosées pour toutes les souches sur la caséine radioactive I 125 ce qui permet un classement précis des souches entre elles.

L'effet global de ces différentes activités se traduit à l'électrophorèse chez toutes les souches de *S. thermophilus*, par une forte hydrolyse des caséines β et γ , sans hydrolyse de la caséine α_{s1} . On note aussi l'apparition de plusieurs composés de mobilité électrophorétique supérieure à celle de la caséine β .

Summary

CHARACTERIZATION OF THE PROTEOLYTIC ACTIVITY AND FRACTIONATION OF THE DIPEPTIDASES AND AMINOPEPTIDASES FROM *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*

The proteolytic activity of the intracellular enzymes from seven strains belonging to species *Streptococcus thermophilus* has been determined on various substrates and different activities separated by disc electrophoresis.

Each strain had a leucine-aminopeptidase (EC 3.4.11.1), some of them were active on dipeptides or amino-acids β -naphthyl-amides. Some strains had a second aminopeptidase (arginine-aminopeptidase type (EC 3.4.11.6) inactive on dipeptides. Each strain had a prolyle-dipeptidase (EC 3.4.13.8) which hydrolysed numerous dipeptides. Proteases were determined by hydrolysis of (125 I) casein allowing the differentiation of these strains by their activities from high to low (10:1).

From the results of electrophoresis of whole casein hydrolysates we have concluded that β - and γ -caseins could be hydrolysed by each strain of *S. thermophilus*. It seemed that α_{s1} -casein could not be hydrolysed by these lactic acid bacteria.

Remerciements

Nous remercions très vivement MM. P. Régner et M. N. Thang de l'Institut de Biologie Physico-chimique (Paris) pour leurs conseils et pour nous avoir fourni la caséine I 125 et mis à notre disposition l'appareillage de leur laboratoire.

Reçu pour publication en décembre 1975.

Références

- ANNIBALDI (S.) (1969). — Electrophoretic study on the caseinolytic activity of *Lactobacillus jugurti*. *Scienza tec. latt.-casear.*, 20, 103-109.
- BOTTAZI (V.) (1965). — Attività peptidasica in *Streptococcus thermophilus*. *Ann. Microbiol. Enzimol.*, 15, 197-201.

- CARINI (S.) e RESMINI (P.) (1968). — Differente andamento della caseinolisi operata da alcuni *Streptococcus thermophilus* e *Torulopsis*. *Ann. Microbiol. Enzimol.*, 18, 57-65.
- CARINI (S.), RESMINI (P.) and BOZZOLATI (M.) (1969). — Casein proteolysis by streptococci and lactic bacteria. *Scienza tec. latt.-casear.*, 20, 289-304.
- CHARNEY (J.) and TOMARELLI (R. M.) (1947). — A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J. Biol. Chem.*, 171, 501-505.
- CHOISY (C.) (1974). — Les aptitudes technologiques des streptocoques thermophiles. *XIX^e Congr. Int. Lait.*, 1F, 460-461.
- CHRAMBACH (A.), REISFELD (R. A.), WYCKOFF (M.) and ZACCARI (J.) (1967). — A procedure for rapid and sensitive staining of protein fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 20, 150-154.
- COWMAN (R. A.) and SPECK (M. L.) (1967). — Proteinase enzyme system of lactic streptococci. I. Isolation and partial characterization. *Appl. Microbiol.*, 15, 851-856.
- DAVIS (B. J.) (1964). — Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 404-427.
- DESMAZEAUD (M. J.) (1974 a). — Etude des peptides stimulant la croissance de *Streptococcus thermophilus* sur le lait. *Thèse Doctorat ès-Sci. Nat.*, Université de Caen.
- DESMAZEAUD (M. J.) (1974 b). — Propriétés générales et spécificité d'action d'une endopeptidase neutre intracellulaire de *Streptococcus thermophilus*. *Biochimie*, 56, 1173-1181.
- DESMAZEAUD (M. J.), GRIPON (J. C.), LE BARS (D.) et BERGÈRE (J. L.) (1975). — Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. III. Influence des micro-organismes (*S. lactis* et *Penicillium*). *Le Lait* (à paraître).
- DESMAZEAUD (M. J.) et HERMIER (J. H.) (1972). — Isolement et détermination de la composition qualitative de peptides issus de la caséine, stimulant la croissance de *Streptococcus thermophilus*. *Eur. J. Biochem.*, 28, 190-198.
- DESMAZEAUD (M. J.) et HERMIER (J. H.) (1973). — Effet de fragments peptidiques du glucagon vis-à-vis de la croissance de *Streptococcus thermophilus*. *Biochimie*, 55, 679-684.
- ERLANGER (B. F.), KOKOWSKY (N.) and COHEN (W.) (1961). — The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 95, 271-280.
- GRIPON (J. C.), DESMAZEAUD (M. J.), LE BARS (D.) et BERGÈRE (J. L.) (1975). — Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II. Influence de la présure commerciale. *Le Lait*, 55, 502-516.
- KIKUCHI (T.), DESMAZEAUD (M. J.) et BERGÈRE (J. L.) (1973). — Aptitude des streptocoques lactiques à la protéolyse. I. Etude de l'action de streptocoques lactiques mésophiles sur les constituants azotés du lait. *Le Lait*, 53, 369-385.
- LANGSRUD (T.) and REINBOLD (G. W.) (1973). — Flavor development and microbiology of Swiss cheese. A review. II. Starters, manufacturing processes and procedures. *J. Milk Food Technol.*, 36, 531-542.
- LANGSRUD (T.) and REINBOLD (G. W.) (1973). — Flavor development and microbiology of Swiss cheese. A review. III. Ripening and flavor production. *J. Milk Food Technol.*, 36, 593-609.
- LEWIS (W. H. P.) and HARRIS (H.) (1967). — Human red cell peptidases. *Nature*, 215, 351-355.
- LOWRY (O. H.), ROSEBROUGH (N. J.), FARR (A. L.) and RANDALL (R. J.) (1951). — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.

- MATSUBARA (H.) and FEDER (J.) (1971). — In *The Enzymes*, 3^e éd., vol. III (Boyer P. D., éd.), p. 721-795. Academic Press, New-York and London.
- MILLER (C. G.) and Mc KINNON (K.) (1974). — Peptidase mutants of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 120, 355-363.
- MOORE (S.) and STEIN (W. H.) (1948). — Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino-acids. *J. Biol. Chem.*, 176, 367-388.
- MOU (L.), SULLIVAN (J. J.) and JAGO (G. R.) (1975). — Peptidase activities in group N streptococci. *J. Dairy Res.*, 42, 147-155.
- OHMIYA (K.) and SATO (Y.) (1968). — Studies on the proteolytic action of dairy lactic acid bacteria. Part IV. Changes of the casein treated with *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* or *Streptococcus lactis*. *Agr. Biol. Chem.*, 32, 291-296.
- OHMIYA (K.) and SATO (Y.) (1969). — Studies on the proteolytic action of dairy lactic acid bacteria. Part VI. Action of intracellular protease of *Streptococcus cremoris* on casein. *Agr. Biol. Chem.*, 33, 662-668.
- ORNSTEIN (L.) (1964). — Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 321-349.
- PEARCE (L. E.), SKIPPER (N. A.) and JARVIS (B. D. W.) (1974). — Proteinase activity in slow lactic acid producing variants of *Streptococcus lactis*. *Appl. Microbiol.*, 27, 933-937.
- POZNANSKI (S.), LENOIR (J.) et MOCOUDOT (G.) (1965). — La protéolyse de la caséine par les enzymes intracellulaires de certaines bactéries. *Le Lait*, 45, 3-26.
- RABIER (D.) et DESMAZEAUD (M. J.) (1973). — Inventaire des différentes activités peptidasiques intracellulaires de *Streptococcus thermophilus*. Purification et propriétés d'une dipeptide-hydrolase et d'une amino-peptidase. *Biochimie*, 55, 389-404.
- REGNIER (P.) and THANG (M. N.) (1972). — Subcellular distribution and characterization of endo- and exocellular proteases in *E. coli*. *Biochimie*, 54, 1227-1236.
- RIBADEAU-DUMAS (B.), MERCIER (J. C.) and GROSCLAUDE (F.) (1973). — Amino-acid composition and sequence of bovine α_{S1} - and β -caseins. *Neth. Milk Dairy J.*, 27, 304-312.
- SØRHAUG (T.) and SOLBERG (P.) (1973). — Fractionation of dipeptidase activities of *Streptococcus lactis* and dipeptidase specificity of some lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol.*, 25, 388-395.
- TOURNEUR (C.) (1972). — Aptitude à la protéolyse des lactobacilles présents dans les fromages et les lactosérums de fromagerie. *Le Lait*, 52, 149-174.
- URIEL (J.) (1966). — Méthode d'électrophorèse dans des gels d'acrylamide-agarose. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 48, 969-982.
-