Les caractères du système lipolytique de l'espèce *Penicillium caseicolum*

PURIFICATION ET PROPRIETES DE LA LIPASE MAJEURE

par

G. LAMBERET et J. LENOIR

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

INTRODUCTION

La purification des enzymes produites par les micro-organismes révèle souvent l'existence de plusieurs fractions. Un micro-organisme peut en effet produire différentes protéines enzymatiques ayant une même fonction. Ainsi, *Penicillium caseicolum* synthétise plusieurs enzymes protéolytiques (Glenza, 1969 ; Kikuchi et Takafugi, 1971). Deux enzymes se distinguant notamment par leur pH optimal d'action ont été caractérisées, l'une s'apparente au groupe des métalloprotéases, l'autre à celui des protéases acides (Lenoir, communication personnelle). Le système protéolytique de *P. roqueforti* comprend également au moins deux composants (Zevaco et al., 1973 ; Gripon et Hermier, 1974).

Le système lipolytique exocellulaire de *P. roqueforti* ne paraît posséder qu'une seule fraction enzymatique (Fournet, 1971) et aucune lipase à pH optimal d'action en milieu acide n'a été mise en évidence chez *P. caseicolum* (Lamberet et Lenoir, 1976). Cependant, certains systèmes lipolytiques peuvent être formés de plusieurs fractions actives. Oi et al. (1967) ont séparé par chromatographie sur DEAE cellulose trois fractions lipolytiques à partir d'une culture de *Penicillium crustosum*. Ces enzymes ont le même pH optimal d'action, elles se distinguent par leur poids moléculaire et par leur spécificité. Iwai et Tsujisaka (1974 a, b) ont isolé, par précipitation et chromatographie d'échange d'ions, trois fractions lipolytiques à partir de cultures de *Rhizopus delemar*. Deux de ces fractions sont constituées par la même molécule protéique, la troisième, qui représente une faible proportion de l'activité totale, se distingue des autres par une plus grande stabilité et un poids moléculaire plus élevé.

L'étude des caractères d'action et de stabilité des enzymes synthétisées par diverses souches de *P. caseicum* a montré que cette espèce produit un seul système lipolytique. Afin de préciser l'identité de ce système, il a été procédé à sa purification et, sur la préparation purifiée, à la détermination de certaines de ses propriétés caractéristiques.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

1° Matériel d'étude et conditions de culture

La souche PN 28, d'origine Neuchâtel et figurant parmi les plus actives, a été retenue pour cette étude. La culture de la moisissure est réalisée en boîte de Roux de 1 l contenant 250 ml de milieu Czapek-trypticase additionné d'extrait de levure et réglé à pH 7,5 (Lamberet et Lenoir, 1972). La durée de l'incubation est de 12 j à 20° C sans agitation.

2° Mesures des activités lipolytiques

Dans la partie relative à la purification de l'enzyme, les activités lipolytiques ont été déterminées par la méthode de mesure des variations de pH ou la méthode au pH-stat selon les modalités décrites antérieurement (Lamberet et Lenoir, 1972, 1976).

Pour la détermination des propriétés caractéristiques de l'enzyme purifiée, les activités ont été mesurées au pH-stat, mais certaines corrections ont été apportées au mode opératoire en tenant compte de la nature des préparations enzymatiques et des essais à réaliser et seules les modifications seront mentionnées ci-après.

2.1. PRÉPARATION DES SUBSTRATS

Le substrat de référence est la tributyrine (Schuchardt) en émulsion. Pour les contrôles de l'influence de la nature du substrat, cette émulsion a été remplacée, dans le mélange de digestion, par les solutions et émulsions aqueuses suivantes :

- Solutions de Tween 20 et de Tween 80 (Prolabo) à 2 et 10 p. 100.
- Emulsion d'huile de beurre* à 25 p. 100 contenant 0,1 p. 100 de Tween 20, obtenue par agitation du mélange eau-huile à l'Ultra-Turrax, à une température de 50° C-60° C.
- Emulsion de trioléine (Prolabo) à 25 p. 100, contenant 0,1 p. 100 de Tween 20. Après l'élimination de l'acide oléique libre par précipi-

* L'huile de beurre est préparée comme suit : un volume de beurre, additionné d'environ deux volumes d'eau distillée, est fondu en portant le mélange à ébullition. Après décantation, l'huile de beurre est filtrée et additionnée de 10 p. 100 de gel de silice (Merck). Le mélange est agité à 60° C pendant 1 h, sous azote, puis centrifugé. L'huile de beurre ainsi traitée est conservée sous azote à 4° C.

tation en présence de calcium et en milieu alcalin, les concentrations en sodium et en calcium dans l'émulsion sont respectivement proches de 60 et 20 mM.

2.2. RÉALISATION DU TITRAGE

Le mélange de digestion est constitué par :

- 5 ml de substrat en émulsion ou en solution,
- 4,95 ml de solution tampon Tris-HCl 0,005 M contenant du chlorure de calcium (2 mM),
- 0,05 ml de solution d'enzyme.

Ce mélange est ajusté au pH de consigne (en général 8,5 ou 9) à 30° C ou 35° C. Le titrage proprement dit a été réalisé par de la soude 0,05 N.

La solution d'enzyme purifiée, en tampon Tris-HCl, pH 7,5, titre environ 600 unités lipase au ml. Lorsque la solution enzymatique a dû être diluée, pour les essais de stabilité ou l'étude de l'influence des effecteurs, la prise d'essai a été de 0,5 ml, le volume final du mélange de digestion étant maintenu à 10 ml.

Pour l'étude de l'influence des métaux et des agents chélatants, le calcium a été supprimé dans la composition du mélange de digestion.

Lors du contrôle de l'influence du pH sur l'activité**, le tampon Tris-HCl a été utilisé pour les pH supérieurs à 7, le tampon maléate pour les pH inférieurs à 7 ; les deux tampons donnent les mêmes résultats aux pH 6,5 et 7.

Aux pH inférieurs à 4, l'ionisation est trop faible pour permettre une détermination de l'activité au pH-stat. Aussi celle-ci a été réalisée en laissant l'enzyme agir pendant un temps de 5 à 10 mn. La réaction a été arrêtée par addition de 10 ml d'éthanol à 95 p. 100 (Laboureur et Labrousse, 1966) et l'acide libéré au cours de l'hydrolyse titré à

pH	Proportion d'acide ionisé (en p. 100)
6,5	97,9
5,95	93
5,45	80,7
4,95	55,2
4,4	27,1
3,9	10,5

** Pour tenir compte de la dissociation incomplète de l'acide butyrique aux valeurs de pH acides, les coefficients de correction ont été calculés d'après le pKa de cet acide à 30° C :

pH 8,5 par de la soude 0,05 N. Un essai à blanc a été effectué pour chaque mesure dans les mêmes conditions, l'éthanol étant ajouté avant l'extrait enzymatique.

Les activités sont exprimées en unités lipase par ml d'extrait enzymatique ; 1 unité équivaut à 1 microéquivalent acide libéré par minute.

3° Purification

3.1. PRÉPARATION DE L'EXTRAIT ENZYMATIQUE BRUT

Après 12 j de culture, le milieu est séparé du mycélium par filtration sur toile. Le filtrat est centrifugé à 4° C pendant 30 mn à 2 000 g. Le surnageant constitue l'extrait enzymatique brut.

3.2. PRÉCIPITATION AU SULFATE D'AMMONIUM

4 l d'extrait brut sont additionnés de 6 l de solution saturée de sulfate d'ammonium. Après contact de 24 h à 4° C, le mélange est centrifugé à cette température pendant 2 h à 2 000 g. Le surnageant écarté, le précipité est recueilli, puis dissous dans un volume suffisant de solution tampon Tris-HCl 0,05 M à pH 8,0 pour amener à 100 ml.

Après repos pendant 24 h à 4° C, la solution est centrifugée à 6 000 g pendant 15 mn. Le surnageant représente le nouvel extrait enzymatique.

3.3. FILTRATION SUR GEL SEPHADEX G 75

L'extrait précédent est appliqué par fractions de 50 ml au sommet d'une colonne de 83 × 5 cm, équilibrée en tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 et maintenue à 15° C. Le débit est d'environ 30 ml/h ; les éluats sont collectés par fractions de 10 ml et la densité optique est mesurée à 280 nm à l'aide d'un ensemble densitomètre - collecteur Seive.

Les fractions enzymatiques principales rassemblées représentent 420 ml de solution contenant 115 mg de protéine.

3.4. CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE SEPHADEX A 50

Elle est réalisée sur une colonne de 67 × 2,5 cm de DEAE Sephadex A 50 gonflé et équilibré à la température ambiante dans une solution de tampon Tris-HCl 0,025 M à pH 8,5. Le débit est réglé à 20 ml/h environ et l'éluat est collecté par fractions de 10 ml.

La solution enzymatique précédemment recueillie est amenée à un pH de 8,5 par addition de soude N puis diluée au 1/2, avec de l'eau distillée, pour obtenir une concentration en tampon de 0,025 M. Après passage de cette solution sur la colonne et rinçage avec 200 ml du tampon de départ, l'élution est réalisée par un premier palier à pH 7,8 (720 ml) puis un second à pH 7,2 (1 500 ml) en tampon Tris-HCl 0,025 M.

La fraction active représente 420 ml de solution contenant 39 mg de protéine. Cette solution constitue la préparation purifiée retenue pour l'étude de la lipase. Elle a été conservée à 4° C pendant la durée des essais.

4° Contrôle de la stabilité

4.1. STABILITÉ EN FONCTION DU pH

Une gamme de pH, de 2,5 à 11, est réalisée à l'aide d'une solution tampon mixte acétate (0,1 M) - borate (0,05 M) - Tris-maléate (0,05 M), ajustée au pH voulu par addition de soude ou d'acide chlorhydrique 10 N. A 0,8 ml de solution tampon portée à la température désirée, on ajoute 0,2 ml de la solution d'enzyme et le mélange est conservé soit 24 h à 20° C, soit 30 mn à 30° C. L'étude de l'inactivation en fonction du temps aux pH de 10,3 et 5,6 a été réalisée en maintenant à 30° C la solution diluée d'enzyme pendant des temps de 1 à 60 mn.

Une fois le temps de conservation écoulé, le pH du mélange est ramené à 7,6 par addition de 1 ml de la solution tampon de pH adéquat refroidie à 4° C. La mesure de l'activité résiduelle est réalisée à pH 8,5 sur une prise d'essai de 0,5 ml.

4.2. STABILITÉ THERMIQUE

La dénaturation thermique de la lipase a été contrôlée en solution tampon mixte à pH 8,5 par maintien à 40° C pendant 1 à 60 mn et par conservation 15 mn à des températures comprises entre 4° C et 50° C.

5° Influence de divers effecteurs

L'action de divers cations, agents complexant les métaux et inhibiteurs spécifiques, a été recherchée sur la solution d'enzyme diluée vingt fois, en tampon Tris-maléate 0,05 M à pH 7,0. Chaque effecteur est utilisé à trois concentrations : 10⁻¹ et 0,1 mM. Le mélange enzyme-effecteur est incubé 1 h à 25° C avant la mesure d'activité. Les résultats sont exprimés en p.100 de l'activité du témoin non additionné d'effecteur et placé dans les mêmes conditions.

Les solutions aqueuses (tampons et effecteurs) ont été réalisées dans l'eau bi-distillée. Les sels (chlorures, sulfates et nitrates) sont de qualité « pour analyse ».

Parmi les agents chélatants essayés, l'acide éthylènediamine-trétra-acétique (E.D.T.A.), le ferrocyanure de potassium, l'oxalate de sodium ont été dissous dans l'eau à la concentration M/5. La 1,10-phénanthroline a été dissoute à la concentration M/5 en tampon Tris-maléate 0,05 M à pH 7,0. Le 8-quinolinol et le diéthylthiocarbamate ont été mis en solution dans l'alcool éthylique à la concentration M/50.

Parmi les inhibiteurs spécifiques, l'acide iodoacétique, le N-éthyl-maléimide (N.E.M.), le thiosulfate de sodium, l'acide ascorbique, le thioglycolate de sodium ont été mis en solution dans l'eau à la concentration M/5. Les solutions de 1-fluoro-2, 4-dinitrobenzène ont été réalisées dans l'acétone aux concentrations de M/5, M/25 et M/250 et le diisopropylfluorophosphate (D.F.P.) est dissous dans l'isopropanol à la concentration M/5. Les solutions de para-chloromercu-ribenzoate (p-CMB) et de chlorhydrate de cystéine sont préparées directement aux concentrations 10 et 1 mM en tampon Tris-maléate 0,05 M, pH 7.

6° Estimation des teneurs en protéines

Les teneurs en protéines des diverses solutions ont été estimées selon la méthode de Warburg et Christian (1941) par mesure de l'absorbance à 280 et 260 nm avec un spectrophotomètre Beckman DU.

7° Chromatographie sur gel Sephadex G 100

L'estimation du poids moléculaire a été réalisée selon le principe de la méthode de Whitaker (1963) sur une colonne de Sephadex G 100 de $85 \times 1,5$ cm, en tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 8,5. Le débit est réglé à 15 ml/h. L'enregistrement des chromatogrammes a été effectué par un ensemble densitomètre-collecteur Isco modèle UA 2. L'étalonnage de la colonne a été réalisé à l'aide de diverses protéines : sérum-albumine, albumine d'œuf, chymotrypsinogène A, α -chymotrypsine, myoglobine et cytochrome C.

L'homogénéité de la lipase a été contrôlée par filtration sur une colonne identique, en tampon Tris-HCl 0,05 M à pH 8,0, le débit étant réglé à 6 ml/h ; l'échantillon, d'un volume de 3 ml, est représenté par la préparation purifiée concentrée environ huit fois par ultrafiltration sur membrane de collodion.

8° Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en tube

Les essais électrophorétiques ont été effectués sur gel de polyacrylamide à 7,5 p. 100, à pH 7,2 en tampon phosphate 0,01 M et à pH 9,2 en tampon glycine-NaOH 0,01 M. Les protéines ont été révélées par coloration au noir amido B10 (Merck) et rinçage pendant 24 h dans l'acide acétique à 2 p. 100.

RESULTATS

1° Purification

Le bilan de la purification est donné dans le tableau 1.

TABLEAU 1. — Bilan de purification

	Volume (ml)	Activité (unités lipase)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique*	Rendements	
					Activité p. 100	Protéine p 100
Filtrat de culture	4 000	540 000	12 640	42,7	100	100
Précipité sulfate d'ammonium à 60 p. 100 de saturation	100	462 500	780	593	85,6	6,2
Fraction active principale de la filtration sur Sephadex G 75	440	323 700	115	2 800	59,9	0,91
Fraction active principale de la chromatographie sur DEAE Se- phadex A 50	420	260 600	39	6 660	48,2	0,31

Activités mesurées à pH 8,0 au pH-stat sur substrat tributyrine.

* Activité spécifique exprimée en unités lipase par mg de protéine.

fig. 1

Filtration sur gel Sephadex G 75

Colonne : 83×5 cm. Echantillon : 50 ml de solution, en tampon Tris-HCl 0,05 M à pH 8,0, du précipité obtenu par relargage au sulfate d'ammonium. Débit : 40 ml/h. Volume des fractions : 10 ml.

———— Absorbance à 280 nm.
 - - - - - Activité lipolytique (unités/ml).

fig. 2

Chromatographie sur colonne de DEAE Sephadex A 50

Colonne : $67 \times 2,5$ cm. Tampon de départ : Tris-HCl 0,025 M à pH 8,5. Elution : variation du pH par paliers à 7,8 et 7,2. Débit : 60 ml/h. Volume des fractions : 10 ml.

Echantillon : solution contenant environ 111 mg de protéines correspondant à la fraction principale séparée sur Sephadex G 75.

———— Absorbance à 280 nm.
 - - - - - Activité lipolytique (unités/ml).

La précipitation au sulfate d'ammonium permet d'accroître l'activité spécifique de près de 14 fois avec un rendement de 85 p. 100. La chromatographie sur Sephadex G 75 (fig. 1) élimine les pigments et environ 85 p. 100 des protéines non enzymatiques ; une fraction, correspondant à 70 p. 100 de l'activité appliquée sur la colonne, est éluée avec un rapport V/Vo de 1,90. Le diagramme montre que près de 2 p. 100 de l'activité se trouvent dans la fraction exclue. La chromatographie d'échange d'ions (fig. 2) sépare un pic représentant le 1/3 des protéines totales et 80 p. 100 de l'activité. Une fraction lipolytique mineure (2 à 5 p. 100 de l'activité) accompagne les protéines éluées par le tampon additionné de NaCl (M).

Le bilan concernant la fraction lipolytique majeure se concrétise par un rendement final de 0,3 p. 100 en protéine représentant 48 p. 100 de l'activité initiale. L'activité spécifique de la préparation enzyma-

fig. 3

Filtration sur colonne de Sephadex G 100 de la lipase purifiée

Colonne : $85 \times 1,5$ cm. Tampon Tris-HCl 0,05 M - pH 8,0. Débit : 6 ml/h. Volume des fractions : 2,1 ml.

L'échantillon est constitué par la solution de lipase concentrée par dialyse à une teneur en protéine de 0,73 mg/ml.

Volume d'échantillon : 3 ml.

———— Teneur en protéine.

----- Activité lipolytique (unités/ml).

tique, qui traduit le degré de purification, se trouve ainsi multiplié par le facteur 156.

Au cours de la purification il a été noté une augmentation de la stabilité thermique de l'enzyme. Les activités résiduelles, à pH 8,0, après incubation 15 mn à 37° C, passent de 5-7 p. 100, avant filtration sur gel, à 28 p. 100 et 46 p. 100 après les deux dernières étapes de la purification.

2° Homogénéité et propriétés physiques

La chromatographie sur Sephadex G 100 de la fraction lipolytique majeure (fig. 3) révèle la présence d'un composant pour lequel les pics d'activité et de teneur en protéine ne sont pas rigoureusement concordants. Cette fraction paraît encore être légèrement contaminée par des protéines de poids moléculaires très voisins qui ne sont cependant pas décelées par électrophorèse aux pH 7,2 et 9,5.

fig. 4

Estimation du poids moléculaire par filtration sur gel Sephadex G 100

Colonne : 85 × 1,5 cm. Elution en tampon Tris-HCl 0,05 M à pH 8,5. Débit de 15 ml/h :

1. Sérum albumine (Boehringer).	4. α-chymotrypsine (Merck).
2. Albumine d'œuf (Boehringer).	5. Myoglobine de cheval (NBC).
3. Chymotrypsinogène A (Boehringer).	6. Cytochrome C (Boehringer).

Le volume mort (V_0) de la colonne est déterminé par filtration de Dextrane bleu (Pharmacia).

V : Volume d'élution des échantillons.

Le poids moléculaire de la lipase peut être estimé à $24\,000 \pm 1\,000$ daltons (fig. 4). Le spectre d'absorption en ultra-violet présente un maximum à 278 nm et un minimum à 252 nm.

3° Propriétés enzymatiques

3.1. INFLUENCE DU pH

En solution dans un tampon mixte acétate-borate-Tris-maléate, l'enzyme apparaît stable à 30° C pendant 30 mn entre les pH 8 et 9 (fig. 5) ; aux pH 6 et 10, l'activité résiduelle est encore égale à 80 p. 100 de l'activité initiale. A pH 11, l'enzyme paraît présenter un

fig. 5

Influence du pH sur la stabilité de la lipase purifiée de *P. caseicolum*

Incubation en tampon acétate-borate-Tris-maléate à 30° C pendant 30 mn (●—●) et 20° C pendant 24 h (○—○).

Activité résiduelle déterminée à pH 8,5 - 30° C et résultats exprimés en p. 100 d'un témoin conservé à 4° C.

(La courbe +.....+ est celle du filtrat de culture de la souche PN 28 conservé 30 mn à 30° C).

fig. 6

Inactivation à 30° C de la lipase purifiée de *P. caseicolum*

Incubation en tampon acétate-borate-Tris-maléate, à 30° C aux pH 10,3 (○—○) et 5,6 (●—●).

Activité résiduelle déterminée à pH 8,5 - 30° C ; résultats exprimés en p. 100 de l'activité initiale.

fig. 7

Influence du pH sur l'activité de la lipase purifiée de *P. caseicolum*

Activité déterminée à 30° C ; tampon maléate pour les pH inférieurs à 7 ; tampon Tris-HCl pour les pH supérieurs à 7. Résultats exprimés en p. 100 de l'activité maximale.

second maximum de stabilité, mais celui-ci n'est pas observé sur la courbe relative à la conservation 24 h à 20° C.

La figure 6 donne l'allure de l'inactivation de l'enzyme en fonction du temps, aux pH 10,3 et 5,6 à 30° C. Les courbes présentent deux pentes, l'une relativement forte, l'autre plus faible. Dans la première phase, les temps théoriques pour obtenir un taux de dénaturation de 90 p. 100 sont de l'ordre de 45 et 41 mn ; dans la seconde phase, ces temps sont de 128 et 119 mn.

L'influence du pH sur l'activité de l'enzyme est représentée sur la figure 7. L'activité maximale se situe dans l'intervalle 8,5-9,6. Aux valeurs de pH 3,5 et 11,5 l'enzyme a une activité égale à 5 p. 100 de l'activité maximale. La courbe présente une certaine dissymétrie qui doit être due à la proximité du pH optimal et de la zone alcaline d'inactivation (fig. 5 et 7).

3.2. INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE

A pH 8,5, l'inactivation thermique se manifeste aux températures supérieures à 35° C (fig. 8). A 40° C, la dénaturation en fonction du

fig. 8

Influence de la température sur la lipase purifiée de *P. caseicolum*

1) Sur la stabilité de l'enzyme (O---O) :

Incubation pendant 30 mn à pH 8,5 en tampon acétate-borate-Tris-maléate ; activité résiduelle déterminée à pH 8,5 à 30° C ; résultats exprimés en p. 100 de l'activité initiale.

2) Sur l'activité de l'enzyme (●---●) :

Activité déterminée à pH 9,0. Résultats exprimés en p. 100 de l'activité maximale.

fig. 9

Représentation selon Arrhenius de l'influence de la température sur la vitesse initiale d'hydrolyse de la tributyrine

R = constante des gaz parfaits.

E_a = énergie apparente d'activation.

temps se traduit, en coordonnées semi-logarithmiques, par une courbe à deux pentes (fig. 10). La déstabilisation est très rapide pendant les 5 premières minutes, plus lente ensuite, les temps théoriques d'inactivation à 90 p. 100 étant 12 mn 30 s et 103 mn.

La température optimale d'action paraît être voisine de 35° C-40° C (fig. 8). A 1° C, l'activité est égale à 50 p. 100 de l'activité maximale et dans l'intervalle 1° C-30° C, le Q_{10} est voisin de 1,2.

La figure 9 présente l'influence de la température sur l'activité enzymatique selon la représentation d'Arrhenius. L'énergie apparente d'activation, entre 1° C et 30° C, est d'environ 3,4 Kcal.mole⁻¹.

3.3. SPÉCIFICITÉ D'ACTION

L'enzyme purifiée hydrolyse les différents substrats essayés avec les vitesses initiales relatives suivantes : tributyrine 100, huile de beurre 87, trioléine 22, triacétine en solution 10.

Avec ce dernier substrat, l'hydrolyse n'a plus lieu lorsqu'après saturation de la solution, une fraction importante de la triacétine se trouve en émulsion dans le mélange.

L'hydrolyse des Tween 20 et 80 en solution à 1 p. 100 ou 5 p. 100 n'est pas décelable dans les conditions habituelles des essais avec des quantités d'enzymes équivalentes à 30 unités.

TABLEAU 2

Influence des métaux sur l'activité de la lipase purifiée de *P. caseicolum*

Ions métalliques	Activité résiduelle aux concentrations molaires suivantes :		
	0,1 mM	1 mM	10 mM
Sn++	107,5	113	
Al+++	106	90	105
Fe++	105,5	101	103,5
Ca++	101	95	96,5
K+	90	100	96
Cu++	108	100,5	87,5
Fe+++	97	91	84,5
Mg++	99,5	94	78,5
Zn++	94,5	88	48
Co++	95,5	96,5	46
Pb++	102,5	78	41
Mn++	103	79	35
Cd++	40,5	28	23
Hg++	86	26	1,3
Ag++	81,5	37	0

Incubation 1 h à 25° C du mélange enzyme-métal (2 ml) en tampon Tris-maléate 0,05 M à pH 7,0.

Activité déterminée à pH 9,0 - 35° C sur une prise d'essai 0,5 ml, le mélange de digestion étant exempt de calcium.

Résultats exprimés en p. 100 par rapport à l'activité d'un témoin placé dans les mêmes conditions.

3.4. INFLUENCE DES EFFECTEURS

3.4.1. Influence des cations et des agents complexants

Le tableau 2 regroupe les résultats obtenus avec les différents cations essayés. Seul l'étain apparaît être légèrement activateur. On peut ensuite distinguer un groupe de métaux qui n'ont pratiquement pas d'action : exemples le calcium, le fer ferreux ; des métaux faiblement inhibiteurs : exemples le fer ferrique et le cuivre ; ou nettement inhibiteurs : exemples le zinc, le cobalt. Enfin, le mercure et l'argent sont capables d'inhiber complètement la lipase. Le cadmium se remarque par un fort pouvoir inhibant à la concentration 0,1 mM mais son efficacité n'est guère accrue à la concentration 10 mM.

La plupart des agents complexants étudiés ont, à l'exception de l'E.D.T.A., une action faible ou nulle à la concentration 1 mM. On peut cependant signaler la légère activation de la lipase par le réactif complexant du cuivre, le diéthylthiocarbamate et la faible inhibition par la 1,10-phénanthroline, complexant le fer. En présence d'E.D.T.A., la lipase perd 80 p. 100 de son activité (tab. 3).

Après inhibition par l'E.D.T.A., le calcium et le fer ferreux, aux concentrations de 5 mM, sont capables de réactiver l'enzyme à des taux respectifs de 88 p. 100 et 81 p. 100. L'aluminium et le cuivre ont également un effet réactivant notable ; le cobalt et le magnésium sont moins efficaces ; le fer ferrique, le potassium et l'étain sont pratiquement sans action (tab. 3).

3.4.2. Influence des inhibiteurs spécifiques

Parmi les agents spécifiques, le p-CMB et le DFP exercent une action inhibitrice à la concentration de 10 mM, mais celle-ci n'est que

TABLEAU 3

Action de l'E.D.T.A. sur la lipase purifiée de *P. caseicolum*
et réactivation en présence de cations

		Activité relative	p. 100 de réactivation*
Témoin		100	
E.D.T.A. 0,1 mM		97	
1 mM		19	
E.D.T.A. 1 mM Cation 5 mM	Ca++	90,5	88,5
	Fe++	85	81,5
	Al+++	78	73
	Cu++	68	60,5
	Co++	47	34,5
	Mg++	44	31
	Sn++	24	6,5
	K+	23	5
Fe+++		19	0

Le mélange enzyme - E.D.T.A. et cation (2 ml) est réalisé en tampon Tris-maléate 0,05 M à pH 7,0.

Activités déterminées à pH 9,0, 35° C, sur une prise d'essai de 0,5 ml, le mélange de digestion étant exempt de calcium.

Résultats exprimés en p. 100 de la valeur du témoin.

* Réactivation (en p. 100) =
$$\frac{\text{Essai métal} - \text{essai E.D.T.A. seul}}{\text{Témoin} - \text{essai E.D.T.A. seul}}$$

TABLEAU 4

Influence des agents spécifiques sur l'action de la lipase purifiée de *P. caseicolum*

Nature de l'agent	Activité résiduelle aux concentrations molaires suivantes		
	0,1 mM	1 mM	10 mM
P-CMB	102,5	103	37
Acide iodo-acétique	97	104	93
N.E.M.	103	96,5	94
Anhydride arsénieux	98	102,5	98
D.F.P.*	102	101	44
1-fluoro-2,4-dinitrobenzène*	112	90,5	94,5
Mercapto-éthanol	91	91	96,5
Thiosulfate de sodium	95,5	96,5	91
Cystéine-HCL	101	101,5	100,5
Acide ascorbique	93	94,5	95,5
Thioglycolate	97,5	96	92,5

Incubation 1 h à 25° C du mélange enzyme-inhibiteur (2 ml) en tampon Tris-maléate 0,05 M à pH 7,0.

Activités déterminées à pH 9,0 - 35° C, sur une prise d'essai de 0,5 ml.

Résultats exprimés en p. 100 d'un témoin placé dans les mêmes conditions.

* Remarque : Il a été vérifié que les solvants utilisés pour ces agents étaient sans influence sur la mesure d'activité.

partielle. Le 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène et les agents réducteurs sont inactifs ou très peu actifs (moins de 10 p. 100 d'inhibition) (tab. 4).

DISCUSSION

Le schéma de purification adopté met en évidence une fraction enzymatique majeure qui paraît correspondre à l'essentiel de l'activité des filtrats de culture bruts de *Penicillium caseicolum*. Les deux autres fractions séparées par filtration sur Sephadex G 75 et chromatographie sur DEAE Sephadex A 50 ne représentent guère plus de 6 p. 100 à 7 p. 100 de l'activité totale récupérée. Ces fractions mineures diffèrent peu de la fraction principale par les rapports des activités à pH 6 et pH 8 ainsi que par la spécificité d'action sur trioléine et

tributyryne. La fraction exclue sur colonne de Sephadex G 75 présente cependant une plus grande stabilité thermique mais il pourrait s'agir de la lipase majeure associée à des protéines non enzymatiques, de telles associations ayant déjà été observées (Downey et Andrews, 1965). Toutefois, l'hypothèse d'une autre lipase n'est pas à écarter ; Sugiura et al. (1974) ont caractérisé, chez *Chromobacterium viscosum* une lipase à haut poids moléculaire, éluée sur colonne de Sephadex G 75 avec le volume mort. Quant à la seconde fraction mineure, séparée sur DEAE Sephadex A 50, elle se rapproche de la « lipase III » de *P. crustosum* par les conditions de son élution sur colonne anionique (Oi et al., 1967).

Au cours de la purification un accroissement progressif de la stabilité thermique des préparations enzymatiques a été observé. Une telle modification de la thermorésistance est également signalée par Liu et al. (1973) pour une lipase de la moisissure *Humicola lanuginosa*.

La préparation purifiée finalement obtenue se comporte à l'électrophorèse comme une protéine homogène ; en revanche, par filtration sur gel Sephadex G 100, elle semble légèrement contaminée par de petites quantités de protéines. Le poids moléculaire, estimé à 24 000 daltons, est proche de celui des lipases I et II de *P. crustosum* (Oi et al., 1967). Il est plus faible que celui trouvé pour d'autres lipases, 53 à 55 000 pour la lipase de *Geotrichum candidum* (Tsujisaka et al., 1973), 45 à 50 000 pour la lipase pancréatique de porc (Verger et al., 1969).

Caractéristiques d'action

La lipase de *P. caseicolum*, par son pH optimal d'action, se rapproche des lipases de nombreuses autres moisissures telles *P. crustosum* (Oi et al., 1967), *P. roqueforti* (Eitenmiller, 1968), *G. candidum* (Marks et al., 1968). Elle se distingue des lipases des deux premières par sa capacité d'agir dans une zone étendue de pH (4 à 11). Notons cependant que chez *G. candidum* Tsujisaka et al. (1973) ont caractérisé une lipase dont le pH optimal d'action est compris entre 5 et 7.

L'influence du pH sur l'activité de la lipase purifiée apparaît sensiblement différente de celle observée sur les préparations brutes. Ces dernières présentent une perte d'activité à pH supérieur à 8,5, tandis que l'activité maximale est obtenue à pH 9-9,6 avec la lipase purifiée. Les activités en zone acide sont relativement importantes pour les préparations brutes ; aux pH 4,5, 6,5 et 8,5 elles étaient respectivement 45 - 72 et 100 ; avec l'enzyme purifiée, les valeurs correspondantes atteignent 20 p. 100 - 64 p. 100 et 98 p. 100 de l'activité maximale. Il est peu probable que cette différence soit due à la présence d'une lipase à pH optimal acide dans les préparations brutes car les courbes de stabilité de ces préparations, établies par mesure aux pH 5,5 et 8,5 des activités résiduelles sont identiques

fig. 10

Inactivation à 40° C de la lipase purifiée de *P. caseicolum*

Incubation en tampon acétate-borate-Tris-maléate à pH 8,5.

Activité déterminée à pH 8,5 - 30° C. Résultats exprimés en p. 100 de l'activité initiale.

(Lamberet et Lenoir, 1976) ; elle pourrait s'expliquer par une certaine inactivation des préparations non purifiées dans la zone de pH 8-9. Cette hypothèse est étayée par la comparaison des courbes de stabilité qui fait apparaître une nette augmentation de celle-ci à pH 9,5 après purification.

Les droites relatives aux deux phases de l'inactivation thermique à pH 8,5 présentent deux pentes très différentes. D'après les résultats de stabilité à 40° C rapportés par Eitenmiller (1968), la lipase de *P. roqueforti*, partiellement purifiée, présente un comportement semblable à la dénaturation. Les lipases non purifiées de diverses bactéries Gram-négatif isolées à partir du lait sont également inactivées en deux temps : la première phase pourrait correspondre à une dénaturation de protéine, la seconde à une inactivation chimique (Driessen et Stadhouders, 1974). En ce qui concerne le système purifié de *P. caseicolum*, la présence de deux enzymes étant exclue, il pourrait y avoir, par chauffage, modification de conformation de la molécule.

L'énergie d'activation, estimée à 3,4 Kcal./mole est faible si on la compare aux valeurs trouvées pour d'autres lipases : 5,2 pour la lipase de *Pseudomonas fluorescens* dans l'intervalle de température 25° C-37° C (Driessen et Stadhouders, 1974) ; 7,3 pour la lipase du blé (Caillat, 1970) ; 5,4 pour la lipase pancréatique en présence de taurochlorate (Desnuelle, 1961). Une faible influence de la température sur la vitesse d'hydrolyse a été également signalée par Marks et al. (1968) pour la lipase de *G. candidum* et par Liu et al. (1973)

pour celle de *Humicola lanuginosa*, avec comme substrat la trioléine ou l'huile d'olive. Avec la lipase de *P. roqueforti*, l'influence de la température sur la vitesse de la réaction apparaît au contraire relativement grande (Eitenmiller, 1968). Cependant, dans ce cas, les modifications de l'état physique de l'huile de beurre employée comme substrat, pourraient expliquer en partie les différences importantes de la vitesse d'hydrolyse (Jensen, 1971).

La température optimale d'action (35° C) est sensiblement plus faible que celles observées sur les lipases de *G. candidum*, *P. crustosum* et *P. roqueforti*. Ceci pourrait être lié à la plus grande sensibilité du système à l'inactivation thermique.

L'influence des effecteurs montre que l'enzyme est activée par certains cations, mais ceux-ci ne sont pas totalement indispensables à son action. Elle peut, de ce point de vue, être comparée à la lipase de *Mucor pusillus* (Somkuti et al., 1969) qui a un pH optimal d'action à 5-5,5 et qui n'est pas inhibée par les agents complexants et la lipase de *Rhizopus arrhizus* (Laboureur et Labrousse, 1966) qui est totalement inactivée par l'E.D.T.A. Lorsque la lipase de *P. caseicolum* est partiellement inactivée par l'E.D.T.A., la réactivation est maximale avec le calcium, mais non avec le magnésium ; d'autres cations divalents sont également actifs, mais à un moindre degré : exemples, le fer ferreux, le cuivre. L'étain, activateur à la concentration de 1 mM, ne réactive pas la lipase alors que le cobalt, assez fortement inhibiteur, réactive partiellement l'enzyme.

La lipase de *R. arrhizus* a le même comportement vis-à-vis du calcium après inactivation par l'E.D.T.A., mais se différencie par l'influence des autres métaux : le manganèse exerce un effet d'activation, le magnésium est sans action, et le cuivre, l'aluminium et l'étain sont inhibiteurs (Laboureur et Labrousse, 1966). La lipase de *P. roqueforti*, activée par le manganèse et le magnésium, paraît se distinguer un peu plus nettement de l'enzyme de *P. caseicolum*.

Les études réalisées sur l'influence des inhibiteurs spécifiques ne permettent pas de préciser la nature des groupes fonctionnels impliqués dans la réaction de catalyse. Certes l'enzyme est inhibée par le p-CMB et le DFP qui sont les réactifs des groupes —SH et —OH mais ceux-ci n'agissent que partiellement et à de fortes concentrations, aussi aucune conclusion définitive ne peut être tirée. L'enzyme se comporte différemment de la lipase du lait, qui est inhibée par le DFP et le diéthyl-p-nitrophényl-phosphate (E 600) pour des concentrations de 0,5 mM et 1 mM, mais non par p-CMB (10 mM) (Patel et al., 1968) ; elle se distingue aussi de la lipase de *Mucor pusillus*, également inhibée par le DFP à la concentration de 1 mM (Somkuti et al., 1969). L'absence de résultats positifs sur la lipase de *P. caseicolum* peut s'expliquer par les difficultés de l'étude de l'inhibition pour des enzymes agissant à l'interface huile-eau. Ainsi, la lipase pancréatique n'est pratiquement pas inhibée par le E 600

en solution, mais l'inhibition est forte et permanente lorsque celui-ci est en émulsion (Desnuelle et al., 1960) ou en solution en présence de sels biliaries (Maylie et al., 1969).

CONCLUSION

Le diagramme de purification a mis en évidence la présence d'une lipase majeure et de deux fractions mineures. La lipase majeure a été caractérisée. Elle est active de pH 3,5 à 11,5 avec action optimale à pH 8,5-9,6 et à la température de 35° C, en présence de calcium. Son activité sur tributyrine est cinq fois plus grande que sur trioléine. L'enzyme nécessite la présence d'ion calcium pour manifester son activité maximale ; elle n'est pas totalement inhibée par les réactifs spécifiques des groupes —OH et —SH, à la concentration 10 mM. La nature des fractions mineures, encore complexes, n'a pas été déterminée.

Résumé

Une lipase de *Penicillium caseicolum* isolée du milieu de culture et représentant apparemment l'essentiel de l'activité lipolytique de la moisissure, a été purifiée avec un rendement en activité de 48 p. 100. L'activité spécifique de la préparation, estimée sur tributyrine à pH 8, est d'environ 6 600 unités lipase. Le poids moléculaire de la protéine est 24 000 daltons.

Par rapport aux préparations brutes, l'enzyme purifiée manifeste une plus grande stabilité vis-à-vis de la température et du pH notamment dans la zone alcaline ; son pH optimal d'action est 9-9,6, sa température optimale de 35° C. L'énergie d'activation, entre 0° C et 30° C est 3,4 Kcal/mole. L'inactivation thermique de l'enzyme en fonction du temps s'effectue en deux étapes : à 40° C, pH 8,5, la perte d'activité atteint 60 p. 100 après 5 mn et 90 p. 100 après 1 h.

La lipase hydrolyse la tributyrine, l'huile de beurre et la trioléine, mais également la triacétine en solution à une vitesse non négligeable.

L'enzyme nécessite la présence d'ion calcium pour manifester son activité maximale ; elle n'est pas totalement inhibée par les réactifs spécifiques des groupes —OH et —SH, à la concentration 10 mM.

Summary

A *Penicillium caseicolum* lipase isolated from culture medium, which probably represents the main exocellular lipolytic activity of

the mould, has been purified by means of ammonium sulfate precipitation, gel-filtration on Sephadex G 75 and DEAE Sephadex A 50 chromatography, with about 48 p. 100 yield. The specific activity of the preparation on tributyrine as substrate at pH 8 is about 6,600 lipase units. The molecular weight is $24,000 \pm 1,000$ daltons.

The purified enzyme is more stable than the crude preparation; the former shows a higher stability at pH 6 and 10. The lipase has an optimal pH around 9-9,6 and an optimal temperature at 35°C ; its activation energy is $3.4\text{ Kcal/mole}^{-1}$. It is stable for 15 mn below 35°C and the inactivation occurs in two stages at 40°C and at pH 8.5: the loss of activity is 60 p. 100 after 5 mn and 90 p. 100 after 60 mn.

The relative activities on tributyrine, butter-oil and trioleine are 100, 87 and 22 respectively and the enzyme is also active at a non-negligible rate on triacetine in solution. The presence of Ca^{++} ions is required to attain maximum rate and the inhibition by specific reagents of $-\text{OH}$ and $-\text{SH}$ groups reaches only 50 to 63 p. 100 at the concentration of 10 mM.

Reçu pour publication en juin 1976.

Références bibliographiques

- CAILLAT (J. M.) (1970). — Contribution à l'étude de la lipase du blé : isolement, caractéristiques de son action en milieux aqueux et peu hydraté. Thèse de Docteur-Ingénieur. Faculté des Sciences de Paris.
- DESUELLE (P.) (1961). — Pancreatic lipase. *Advenc. Enzymol.*, 23, 129-161.
- DESUELLE (P.), SARDA (L.) et AILHAUD (1960). — Inhibition de la lipase pancréatique par le diéthyl-p-nitrophénylphosphate en émulsion. *Biochim. Biophys. Acta*, 37, 570-571.
- DOWNY (W. K.) and ANDREWS (P.) (1965). — Gel filtration applied to the study of lipases and other esterases. *Biochem. J.*, 94, 642-650.
- DRIESSEN (F. M.) and STADHOUDERS (J.) (1974). — Thermal activation and inactivation of exocellular lipases of some Gram-negative bacteria common in milk. *Neth. Milk Dairy J.*, 28 (1), 10-22.
- EITENMILLER (R. R.) (1968). — Production and properties of a *Penicillium roqueforti* lipase. Thèse pour le « Degree of Master of Science », Department of Food Science and Technology, University of Nebraska, Lincoln.
- FOURNET (G. P.) (1971). — Etude de l'hétérogénéité des *Penicillia roqueforti* et de son influence sur l'affinage des fromages de Roquefort. Thèse de Docteur de Spécialité en Biochimie. Université des Sciences et Techniques du Languedoc. Académie de Montpellier.
- GLENZA (A.) (1969). — Etude du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. Facteurs de production. Purification partielle et propriétés de la protéase principale. Thèse pour le grade de Docteur de Spécialité Nutrition, Université de Caen.

- GRIPON (J. C.) et HERMIER (J.) (1974). — Le système protéolytique de *Penicillium roqueforti*. III. Purification, propriétés et spécificité d'une protéase inhibée par l'E.D.T.A. *Biochimie*, 55 (10), 1323-1332.
- IWAI (M.) and TSUJISAKA (Y.) (1947 a). — The purification and the properties of three kinds of lipases from *Rhizopus delemar*. *Agr. Biol. Chem.*, 38 (6), 1241-1247.
- IWAI (M.) and TSUJISAKA (Y.) (1974 b). — Interconversion of two lipases from *Rhizopus delemar*. *Agr. Biol. Chem.*, 38 (6), 1249-1254.
- JENSEN (R. G.) (1971). — Lipolytic enzymes. *Progr. Chem. Fats.*, 11 (3), 347-394.
- KIKUCHI (T.) and TAKAFUGI (S.) (1971). — Studies on the microorganisms of Camembert cheese. II. Experiments on protease of Camembert cheese mould. *Jap. J. Zootech. Sci.*, 42 (5), 205-209.
- LABOUREUR (P.) et LABROUSSE (M.) (1966). — Lipase de *Rhizopus arrhizus*. Obtention, purification et propriétés de la lipase de *Rhizopus arrhizus* var. *delemar*. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 48 (6), 747-770.
- LAMBERET (G.) et LENOIR (J.) (1972). — Aptitude de l'espèce *Penicillium caseicolum* à la production d'enzymes lipolytiques. *Le Lait*, 52 (513-514), 175-192.
- LAMBERET (G.) et LENOIR (J.) (1976). — Les caractères du système lipolytique de l'espèce *Penicillium caseicolum*. Nature du système. *Le Lait*, 56 (553-554), 119-134.
- LIU (W. H.), BEPPU (T.) and ARIMA (K.) (1973). — Purification and general properties of the lipase of thermophilic fungus *Humicola lanuginosa* S-38. *Agr. Biol. Chem.*, 37 (1), 157-163.
- MARKS (T. A.), QUINN (J. G.), SAMPUGNA (J.) and JENSEN (R. G.) (1968). — Studies of a lipase system from *Geotrichum candidum*. *Lipids*, 3 (2), 143-146.
- MAYLIE (M. F.), CHARLES (M.), SARDA (L.) and DESNUELLE (P.) (1968). — Action of organophosphates on pancreatic lipase. *Biochim. Biophys. Acta*, 178, 196-198.
- OI (S.), SAWADA (A.) and SATOMURA (Y.) (1967). — Purification and some properties of two types of *Penicillium* lipase, I and II, and conversion of types I and II under various modification conditions. *Agr. Biol. Chem.*, 31 (11), 1357-1366.
- PATEL (C. V.), FOX (P. F.) and TARASSUK (N. P.) (1968). — Bovine milk lipase. II. Characterization. *J. Dairy Sci.*, 51 (13), 1879-1886.
- SOMKUTI (G. A.), BABEL (F. J.) and SOMKUTI (A. C.) (1969). — Lipase of *Mucor pusillus*. *Appl. Microbiol.*, 17 (4), 606-610.
- SUGIURA (M.), ISOBE (M.), MUROYA (N.) and YAMAGUCHI (T.) (1974). — Purification and properties of a *Chromobacterium* lipase with a high molecular weight. *Agr. Biol. Chem.*, 38 (5), 947-952.
- TSUJISAKA (Y.), IWAI (M.) and TOMINAGA (Y.) (1973). — Purification, crystallization and some properties of lipase from *Geotrichum candidum* Link. *Agr. Biol. Chem.*, 37 (6), 1457-1464.
- VERGER (R.), DE HAAS (G. H.), SARDA (L.) and DESNUELLE (P.) (1969). — Purification from porcine pancreas of two molecular species with lipase activity. *Biochim. Biophys. Acta*, 188, 272-282.
- WARBURG (O.) et CHRISTIAN (W.) (1941). — *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.
- ZEVAO (C.), HERMIER (J.) et GRIPON (J. C.) (1973). — Le système protéolytique de *Penicillium roqueforti*. II. Purification et propriétés de la protéase acide. *Biochimie*, 55 (11-12), 1353-1360.
-