Greffage covalent d'acides aminés essentiels sur les protéines alimentaires

Conséquences nutritionnelles

par

H. GAERTNER, Nina LUPI et A. PUIGSERVER*

Résumé

La valeur nutritionnelle d'une protéine alimentaire pauvre en acides aminés essentiels peut être améliorée par supplémentation avec des acides aminés libres ou fixés de façon covalente sur ses groupements aminés. Des méthodes enzymatiques ou chimiques sont généralement utilisées pour greffer les acides aminés sur des squelettes protéiques.

Des protéases telles que la pepsine, la chymotrypsine ou la papaïne sont susceptibles, dans certaines conditions de pH et à concentration élevée en substrat (protéines) et en nucléophile (acides aminés), de catalyser l'incorporation d'acides aminés. Suivant les enzymes utilisées, le greffage résulte d'une réaction de transpeptidation ou de condensation. La stéréospécificité des enzymes permet d'utiliser des mélanges racémiques d'acides aminés et, comme toutes les liaisons formées sont exclusivement de type peptidique, la disponibilité des acides aminés greffés est généralement bonne.

Le greffage d'acides aminés par voie chimique se fait en présence d'un agent de condensation sur les chaînes latérales des résidus d'acide aspartique ou glutamique ou par action d'un acide aminé activé sur les groupements ϵ -NH₂ des lysines. Si la première méthode aboutit uniquement à une mono/addition de l'acide aminé par site de fixation, avec la seconde, il peut y avoir polyaddition du réactif sur les groupements aminés des protéines.

* Centre de Biochimie et de Biologie moléculaire du C.N.R.S., 31, chemin Joseph-Aiguier - 13009 Marseille.

Des expériences de digestibilité *in vitro* et *in vivo* montrent une bonne disponibilité des aminoacides fixés par liaison isopeptidique. Cependant, celle-ci n'est pas établie lorsque l'acide est hautement polycondensé sur la protéine. L'intérêt du greffage covalent d'acides aux protéines dépasse le seul plan nutritionnel pour atteindre celui des propriétés fonctionnelles des protéines modifiées.

Mots clés

Méthionine - Polyméthionine - Supplémentation - Condensation - transpeptidation - Isopeptide.

Titre abrégé

Greffage covalent d'acides aux protéines.

Summary

COVALENT ATTACHMENT OF ESSENTIAL AMINO-ACIDS TO FOOD PROTEINS: NUTRITIONAL SIGNIFICANCE.

The nutritional value of food proteins limited by their low content of essential amino-acids may be improved by supplementation with free or covalently bound amino-acids. There are chemical and enzymatic methods available for linking amino-acids to proteins in an aqueous medium.

Proteolytic enzymes such as pepsin, chymotrypsin or papain may catalyze amide or peptide bond synthesis when provided substrates (proteins) and nucleophiles (amino-acids) are present in large amounts. Depending on enzyme and experimental conditions, the covalent attachment of amino-acids occurs through a condensation or a transpeptidation reaction. Because of their stereospecificity, enzymes can only incorporate L-amino-acids and lead to peptide bond formation exclusively making the modified protein biologically available.

Chemical methods for attaching amino-acids to proteins always give rise to isopeptide bond formation between the side chains of aspartic acid, glutamic acid or lysine, on one hand, and the added amino-acid, on the other hand. Depending on how the amino-acid is activated, a single or multiple addition per site of the protein occurs.

In vitro and in vivo digestibility experiments are consistent with a good availability of amino-acids covalently attached to ϵ -amino group of lysyl residues through an isopeptide bond. More studies are still needed for polymers covalently grafted to proteins.

In addition to the nutritional improvement resulting from the attachment of essential amino-acids to proteins, the modification may also improve their functional properties.

Key words

Methionine - Polymethionine - Supplémentation - Condensation - transpeptidation - isopeptide.

INTRODUCTION

La valeur nutritionnelle d'une protéine alimentaire est dans une large mesure le reflet de sa composition en acides aminés et en particulier de sa teneur en acides aminés essentiels. Ainsi, pour améliorer la qualité de protéines pauvres en un ou plusieurs aminoacides indispensables on a généralement recours à la supplémentation en acides aminés libres (Harper et Hegsted, 1974 ; Benevenga et Cieslak, 1978 ; Sikka et Johari, 1979 ; Hernandez-Infante *et al.*, 1979). Il faut cependant noter que l'acide aminé ajouté est souvent à l'origine de réactions secondaires défavorables ou peut être perdu au cours des traitements technologiques divers que pourra subir la protéine. L'addition, par exemple, de l'acide aminé soufré méthionine entraîne souvent une modification importante des propriétés organoleptiques de l'aliment considéré et, par chauffage, conduit à la production de méthional et de diméthyl disulfure (Hippe et Warthesen, 1978). De plus, il est bien admis aujourd'hui que l'absorption intestinale d'un aminoacide libre ou au sein d'un peptide est réalisée par des mécanismes différents (Ugolev *et al.*, 1977). Le transport intestinal des aminoacides sous forme d'oligopeptides se fait plus rapidement que celui de quantités équivalentes d'acides aminés libres (Matthews *et al.*, 1968 ; Lis *et al.*, 1972). Pour toutes ces raisons, différents auteurs ont pensé que la fixation covalente d'acides aminés sur une protéine pouvait permettre d'éviter ces inconvénients tout en augmentant sa qualité nutritionnelle, voire même ses propriétés fonctionnelles.

GREFFAGE D'AMINOACIDES PAR VOIE ENZYMATIQUE

Les enzymes protéolytiques peuvent dans certaines conditions catalyser la synthèse de liaisons peptidiques. Ce phénomène, observé presque simultanément avec la papaïne et l' α -chymotrypsine (Bergmann et Fraenkel-Conrat, 1937 ; Bergman et Fruton, 1938) a été appliqué à la synthèse peptidique en milieu aqueux et à l'incorporation d'acides aminés aux protéines afin d'en étudier les relations structure-fonction.

Synthèse d'une liaison peptidique

La formation d'une liaison peptidique par une hydrolase étant thermodynamiquement défavorisée en phase aqueuse (Homandberg *et al.*, 1978), il faudra déplacer l'équilibre chimique vers la synthèse par différents artifices. On abaissera, par exemple, les PK respectifs des groupements COOH- et NH₂- terminaux en ajoutant des solvants organiques (Moriyama *et al.*, 1979) ou on protégera certaines des fonctions impliquées dans la synthèse de telle sorte que la solubilité des produits de synthèse soit inférieure à leur concentration à l'équilibre (Moriyama et Oka, 1977), ce qui entraînera leur précipitation dans le milieu réactionnel. Une approche cinétique de la synthèse peptidique par voie enzymatique a été réalisée en étudiant l'hydrolyse par la chymotrypsine de l'ester éthylique de la N-acétyl-phényl alanine en présence de différents amides d'acides aminés (Fastrez et Ferscht, 1973). Comme le montre la figure 1, le rapport

fig. 1

Synthèse d'une liaison peptidique catalysée par l' α -chymotrypsine d'après Fastrez et Ferscht, 1973. R-NH₂ représente un amide d'acide aminé.

Peptide bond synthesis catalyzed by α -chymotrypsin (adapted from Fastrez and Ferscht, 1973). R-NH₂ stands for an amino acid amide.

aminolyse : hydrolyse ne dépend que du rapport k_4/k_3 si $k_3 \gg k_3$ et $k_4 \gg k_4$ et par suite de la seule concentration du nucléophile. Ainsi, l'alanine amide 1 M à pH 10 est capable d'entrer en compétition avec l'eau et former le N-acétyl-dipeptide amide avec un rendement voisin de 95 %.

Cas des protéines alimentaires

La synthèse de nouvelles liaisons peptidiques sera possible avec des protéases à spécificité large afin d'augmenter le rendement de

la réaction. En utilisant un hydrolysats protéique concentré (20-40 %), afin d'avoir une forte concentration de nucléophile, on aboutit à la formation de plastéines (Fujimaki *et al.*, 1977). Suivant qu'il y a ou qu'il n'y a pas hydrolyse d'une liaison peptidique lors de l'incorporation de l'acide aminé, le greffage procède par une réaction de transpeptidation ou par condensation (fig. 2). Dans le premier cas,

fig. 2

Les deux voies d'incorporation d'acides aminés dans une protéine par voie enzymatique.

Two ways for the attachment of amino acids to proteins by enzymatic methods.

il y a une diminution de la masse moléculaire de la protéine alors que dans le second cas, celle-ci augmente. La plus grande probabilité d'un des deux types réactionnels dépend des conditions expérimentales et en particulier de la nature de l'enzyme utilisée. Ainsi, le phénomène de transpeptidation est prédominant avec la papaïne alors que la chymotrypsine catalyse essentiellement des réactions de condensation (Yamashita *et al.*, 1974). La figure 3 explicite les réactions de synthèse peptidique par condensation ou transpeptidation.

Récemment, un procédé simple a été développé pour incorporer directement la méthionine à un mélange de protéines de soja (Yamashita *et al.*, 1979a et b). L'incubation pendant 24 h à pH alcalin

Mécanismes de synthèse de liaisons peptidiques catalysée par une protéase au sein d'un hydrolysats.

Proposed mechanisms for a protease-catalyzed synthesis of peptide bonds in a protein hydrolysate.

et 37° C d'une solution à 20 % en poids de protéines de soja en présence de papaïne (E/S = 1/100) et d'ester éthylique de la méthionine (2 %), permet d'augmenter de 1,2 à 8,8 % la teneur en méthionine des protéines. Le rendement d'incorporation est voisin de 80 %.

Polymérisation de la méthionine

Si le rapport méthionine-protéine est trop élevé, la papaïne catalyse la polymérisation de l'acide aminé. Comme le montre la figure 4, la désacylation de la méthionyl-papaïne peut conduire à la méthionine libre ou au dipeptide si une seconde molécule d'acide aminé intervient comme nucléophile. Cette réaction en chaîne entraîne la formation de polymères d'une longueur moyenne de sept acides aminés, limite de solubilité du produit (Arai *et al.*, 1979). Lorsque la concentration en protéine est plus importante, le phénomène de polymérisation ne se produit plus et l'incorporation de méthionine se fait essentiellement à l'extrémité C-terminale de la

fig. 4

Polymérisation de l'ester méthylique de la méthionine en présence de papaïne.

Polymerization of methionine methyl ester in the presence of papain.

protéine comme pendant la formation des plastéines (Yamashita *et al.*, 1972).

Cas particulier de la transglutaminase

La transglutaminase hydrolyse la liaison amide en γ des résidus glutaminyl d'une protéine et peut transférer le groupement acyl sur un aminoacide (fig. 5). Lorsque le ϵ -NH₂ des résidus de lysine d'une protéine joue le rôle de substrat, il y a formation d'un pont intra- ou intermoléculaire du type ϵ -(γ -glutamyl) lysine. Les propriétés de la transglutaminase peuvent être utilisées pour fixer des acides aminés essentiels par une liaison isopeptidique à une protéine alimentaire. La caséine et les protéines 7S et 11S de soja ont été enrichies en méthionine et le gluten de blé en lysine (Ikura *et al.*, 1981). L'acide aminé, ajouté en grand excès et incorporé à des taux variables (2 % avec la méthionine, 32 % avec la lysine), n'empêche pas la formation de liaisons ϵ -(γ -glutamyl) lysine qui se traduit par l'obtention de protéines de haut poids moléculaire.

La méthionine et la lysine incorporées par la transglutaminase sont utilisées *in vivo* : la ϵ (γ -glutamyl) lysine peut être utilisée comme source de lysine par des rats en croissance (Mauron, 1970). Par ailleurs, deux enzymes (capables d'hydrolyser la liaison isopeptidique), la γ -glutamyl aminoacide cyclotransférase et la γ -glutamylamine cyclotransférase, ont été trouvées au niveau du rein et de

fig. 5

Synthèse peptidique catalysée par la transglutaminase et hydrolyse de la liaison isopeptidique résultante (Folk et Finlayson, 1977 ; Fink *et al.*, 1980).

Transglutaminase-catalyzed synthesis of peptide bonds and hydrolysis of the resulting isopeptide bond (Folk and Finlayson, 1977 ; Fink et al., 1980).

certaines tissus (Fink *et al.*, 1980). La liaison isopeptidique est hydrolysée avec transformation de l'acide glutamique en 5-oxo-proline (fig. 5).

GREFFAGE D'AMINOACIDES PAR VOIE CHIMIQUE

Les chaînes latérales des résidus lysyl, aspartyl et glutamyl sont avec les extrémités NH_2 - et COOH -terminales les points de fixation d'un aminoacide sur une protéine. On appellera liaison isopeptidique toute liaison amide mettant en jeu la chaîne latérale d'un ou de deux aminoacides. La fixation par voie chimique fait appel aux techniques utilisées en synthèse peptidique (Fridkin et Patchornik, 1974 ; Katsoyannis et Schwartz, 1977) et se fera en présence d'un agent de condensation ou par étapes en utilisant des aminoacides activés. Dans la réaction de condensation (fig. 6) le carboxylate activé de la protéine réagira avec le groupement aminé de l'acide aminé ajouté. La fixation de l'acide aminé aura lieu sur les résidus glutamyl et aspartyl et à l'extrémité C-terminale de la protéine. La synthèse par étapes passe par la protection du groupement aminé

fig. 6

Schéma général de fixation covalente d'acides aminés aux protéines par voie chimique.

General scheme for covalent attachment of amino acids to proteins by chemical methods.

de l'acide aminé que l'on veut fixer et l'activation de son carboxylate. L'acide aminé activé se fixera sur les groupements α et ϵ -NH₂ de la protéine.

Condensation en présence d'un carbodiimide

La fixation d'un acide aminé sur le carboxylate d'une protéine en présence d'un carbodiimide soluble passe par un intermédiaire O-acylisourée très instable. Il faut donc une forte concentration de nucléophile pour former une liaison peptidique. La méthode au carbodiimide a été appliquée à la fixation d'acides aminés essentiels sur des protéines de soja et de blé (Voutsinas et Nakai, 1979 ; Li-Chan *et al.*, 1979). Comme l'indique le tableau 1, le contenu en méthionine

TABLEAU 1 - TABLE 1

Composition en acides aminés (% en poids) de protéines de soja enrichies en méthionine ou en tryptophane (VOUTSINAS et NAKAI, 1979)

Amino acid composition (% weight) of soy proteins modified by covalent binding of methionine or tryptophan (VOUTSINAS and NAKAI, 1979)

Acides aminés	Isolat protéique de soja		
	Témoin	(+) Met	(+) Trp
Asp	11,4	10,8	10,3
Glu	19,4	18,3	18,5
Met	0,9	5,9	0,8
Tyr	3,5	3,3	3,1
Lys	5,8	5,7	5,2
Trp	0,9	0,9	10,7

et tryptophane d'un isolat de soja est multiplié respectivement par 6 et 12. Une hydrolyse ménagée préalable de la protéine augmente le nombre de groupements réactionnels et par suite, la quantité d'acide aminé fixé. Il faut cependant noter que la réaction nécessite des concentrations élevées de carbodiimide et d'acide aminé et que son rendement est inférieur à 10 %.

L'utilisation d'un acide aminé dont le carboxylate est libre donne toujours une multiplicité de produits d'addition et peut conduire

à un certain degré de polycondensation. Le groupement aminé de l'acide aminé ajouté peut réagir avec les groupements α , β , γ -COOH de la protéine, d'une part, et son carboxylate avec les groupements α et ϵ -NH₂ de la protéine, d'autre part. La fixation de la lysine sur le gluten de blé entraîne encore une plus grande hétérogénéité car le groupement ϵ -NH₂ peut se condenser avec les carboxylates de la protéine et former des liaisons isopeptidiques de type α - ϵ , β - ϵ et γ - ϵ .

Des expériences préliminaires de digestibilité *in vitro* des protéines ainsi modifiées semblent indiquer que la disponibilité des acides aminés fixés est bonne. Bien que l'on dispose déjà de quelques informations sur l'utilisation des acides aminés engagés dans des isopeptides du type ϵ - α et ϵ - γ (Finot *et al.*, 1977 ; Puigserver *et al.*, 1979a), il faut encore vérifier que les autres liaisons isopeptidiques sont aussi hydrolysées *in vivo*.

Méthode des esters actifs

Lors de la protection du groupement aminé de l'acide aminé, seuls les groupements qui éviteront la racémisation de l'acide aminé seront utilisés pour son activation : groupements benzyloxycarbonyl, *ter*-butyloxycarbonyl (t-Boc) et O-nitrophénylsulfényle. Le carboxylate est généralement estérifié par le *p*-nitrophénol ou le N-hydroxysuccinimide (OSu). Les t-Boc-acides aminés OSu ont été utilisés pour préciser l'importance de la région N-terminale de certaines enzymes pour leur activité (Wicker et Puigserver, 1982 ; Robinson *et al.*, 1973 ; Slotboom et de Haas, 1975).

Le schéma général d'action des esters actifs sur les protéines est donné dans la figure 7. La fixation par cette méthode d'acides aminés essentiels sur les résidus de lysine d'une protéine alimentaire augmente sa valeur nutritionnelle (Puigserver *et al.*, 1979a et b). Avec trois excès molaires de réactif par rapport aux groupements aminés, il est possible de modifier toutes les lysines de la caséine. L'élimination du groupement protecteur t-Boc est nécessaire après fixation de l'acide aminé pour une utilisation effective de l'acide aminé engagé dans une liaison isopeptidique. Protégée par un groupement acétyl, la méthionine est par contre utilisée, la désacylation étant sans doute réalisée par des acylases intestinales, hépatiques ou rénales (Endo, 1978 ; Boggs *et al.*, 1975).

Méthode des N-carboxy-anhydrides

Ces réactifs, utilisés pour la synthèse de peptides et surtout de copolymères d'acides aminés, présentent un intérêt tout particulier dans la modification des protéines car le groupement aminé de l'acide aminé est engagé dans un cycle et n'a donc pas besoin d'être protégé. Les N-carboxyanhydrides d'acides aminés encore appelés anhy-

Schéma général de fixation d'un aminoacide à une protéine par la méthode des esters actifs.

General scheme for attaching amino acids to proteins through the active esters methods.

drides de Leuchs ou NCA sont généralement obtenus par cyclisation directe sous l'action du phosgène de l'acide aminé en suspension dans un solvant anhydre comme le tétrahydrofur ou le dioxane (Hirschmann *et al.*, 1971).

Suivant les conditions opératoires, la synthèse peptidique se fait par étape ou conduit à une polymérisation directe du réactif sur les groupements aminés des protéines (fig. 8). Dans le premier cas, l'acide aminé fixé ayant son groupement aminé libre après décarboxylation du carbamate intermédiaire pourra réagir avec une autre molécule d'anhydride. Cette méthode nécessite le maintien du pH

le pH à 3-4 afin de décarboxyler le carbamate formé et de faire apparaître un nouveau groupement aminé capable de réagir. On arrive ainsi en 3 à 4 étapes successives à modifier tous les résidus de lysine mais le rendement global de l'opération est plus faible (25-40 %) que dans le cas d'une polyaddition. Le tableau 2 donne les degrés de modification obtenus dans le cas de la caséine et de la β -lactoglobuline.

TABLEAU 2 - TABLE 2

Modification de la caséine et de la β -lactoglobuline par l'anhydride de la N-carboxyméthionine (GAERTNER, 1981)

Modification of casein and β -lactoglobulin by N-carboxymethionine anhydride (GAERTNER, 1981)

Protéines	Composition en aminoacides (1)			NH ₂	
	Lys	Met	Met fixée	Libres (2)	Modification (%)
Caséine	12	5	0	11,4	5
Polymet-caséine (3)	12	60	55	4,9	59
Polymet-caséine (4)	12	36	31	traces	> 98
β -lactoglobuline	15	4	0	14,6	< 5
Polymet-lactoglobuline (3)	15	85	81	5,7	62
Polymet-lactoglobuline (4)	15	52	48	traces	> 98

(1) Nombre de résidus/mole de protéine.

(2) Déterminé après guanidination de la protéine par action du 0-méthylisourée.

(3) Modifiée par une seule addition de N-carboxyanhydride (réactif/NH₂ = 5) à pH 6,5.

(4) Modifiée par cinq additions successives de N-carboxyanhydride (Réactif/NH₂ = 1,5) à pH 10,2.

PROPRIETES NUTRITIONNELLES DES PROTEINES MODIFIEES

Digestibilité in vitro

Le tableau 3 donne les degrés relatifs de digestion par les enzymes pancréatiques de quelques échantillons de caséine modifiés

TABLEAU 3 - TABLE 3

Digestion « *in vitro* » de quelques dérivés de la caséine par les enzymes du tractus digestif (PUIGSERVER *et al.*, 1979 b)

«*In vitro*» digestion of casein derivatives by enzymes of the intestinal tract (PUIGSERVER *et al.*, 1979 b)

Protéine	Modification (1) (%)	Degré d'hydrolyse (%)	
		Suc pancréatique de rat	Pancréatine de bœuf
Caséine	0	100	100
Glycyl-caséine	90	80	81
Boc-méthionyl-caséine (2)	59	54	67
Méthionyl-caséine	59	95	90
Méthionyl-caséine	90	71	78
N-acétyl-méthionyl-caséine	57	71	84

(1) Déterminé par estimation des groupements aminés et composition en aminoacide.

(2) Boc = tert-butyloxycarbonyl.

par la méthode des esters actifs. On constate que la digestion diminue d'autant plus que la modification est importante et que l'acide aminé greffé est encombrant. Il est toutefois intéressant de noter que la modification de tous les résidus de lysine élimine l'action de la trypsine et, qu'à ce titre, une baisse de l'hydrolyse par le suc pancréatique est inévitable quand on sait que cette enzyme représente environ 20 % des protéines de la sécrétion exocrine de la glande.

L'hydrolyse enzymatique de quelques polyméthionyl-protéines, résultant donc de modifications par la méthode des N-carboxyanhydrides, est traitée par Gaertner *et al.* dans ce même volume.

Disponibilité *in vivo* des aminoacides greffés

En nourrissant de jeunes rats à l'aide de rations alimentaires contenant 10 % de caséine totalement modifiée par fixation d'un résidu de méthionine par résidu de lysine, il a été possible de démontrer que la liaison isopeptidique ϵ -méthionyl-lysine est clivée dans

TABLEAU 4 - TABLE 4

Concentration plasmatique de quelques aminoacides chez des rats nourris à l'aide de méthionyl-caséine (PUIGSERVER *et al.*, 1978)

Plasma concentration of some free amino acids in rats fed methionyl casein (PUIGSERVER et al., 1978)

Protéines	μmoles/100 ml plasma	
	Lysine	Méthionine
Caséine témoin	60,5 ± 8,3	4,1 ± 1,2
Boc-méthionyl-caséine	5,7 ± 1,4	4,0 ± 1
Méthionyl-caséine	72,4 ± 4,8	39,3 ± 3,5
N-acétyl-méthionyl-caséine	34,5 ± 6,5	4,5 ± 1,7

Les dérivés de la caséine sont modifiés à plus de 90 %.

Boc = tert-butyloxy-carbonyl.

l'organisme. En effet, après un régime alimentaire de 3 jours, le niveau de la lysine plasmatique n'est pas changé (tab. 4). Les autres acides aminés sont également représentés à des taux normaux tout-à-fait comparables à ceux d'animaux témoins. Si l'expérience est poursuivie pendant 3 semaines, la courbe de poids des rats nourris à l'aide de méthionyl-caséine est directement superposable à celle du groupe témoin dont la ration contient la même quantité de méthionine libre (Puigserver *et al.*, 1978). La méthionine liée de façon covalente par liaison isopeptidique aux résidus de lysine de la protéine est parfaitement utilisable par l'organisme.

Comme le montre le tableau 5, nous avons recherché l'activité enzymatique responsable de l'hydrolyse de la liaison isopeptidique au niveau de différents organes : pancréas, intestin, foie et reins. Grâce à la synthèse au Laboratoire de l'isodipeptide radioactif ε-N-méthionyl-lysine, nous avons pu montrer que seule l'aminopeptidase intestinale est capable de réaliser cette réaction efficacement. Une étude cinétique de l'hydrolyse comparée de l'isopeptide et de son homologue par les aminopeptidases A et N de lapin et de porc (tab. 6), montre que ces enzymes reconnaissent aussi bien la liaison peptidique normale que la liaison isopeptidique (Gaertner *et al.*, 1981). Ce résultat explique probablement la bonne utilisation *in vivo* de la méthionine greffée.

TABLEAU 5 - TABLE 5

Hydrolyse de la liaison isopeptidique par les enzymes protéolytiques
du tube digestif (PUIGSERVER *et al.*, 1979 b)

Isopeptide bond hydrolysis by the protelolytic enzymes of alimentary tract
(PUIGSERVER *et al.*, 1979 b)

Enzymes		Hydrolyse du substrat (%)	E/S poids/poids
Porc	Pepsine	2	1 : 1
	Suc pancréatique	3	1 : 6
	Aminopeptidase solubilisée	95	1 : 500
	Aminopeptidase membranaire	91	1 : 500
Rat	Aminopeptidase membranaire	93	1 : 500

Un ml d'une solution de substrat 5 mM dans du tampon phosphate monosodique 50 mM à pH 7,0 est incubé en présence d'enzymes pendant 3 h à 37° C.

TABLEAU 6 - TABLE 6

Constantes cinétiques de l'hydrolyse par les aminopeptidases N et A
d'un isopeptide et du dipeptide correspondant (GAERTNER *et al.*, 1981)

Kinetic parameters of the hydrolysis of a dipeptide and its related isodipeptide
by aminopeptidases N and A (GAERTNER *et al.*, 1981)

Enzyme	α -Met-Lys		ϵ -Met-Lys	
	Km (mM)	kcat (S ⁻¹)	Km (mM)	kcat (S ⁻¹)
Aminopeptidase N de lapin	0.35	45	0.17	22
Aminopeptidase N de porc	0.05	70	0.17	31
Aminopeptidase A de lapin	0.58	5.9	0.70	1.5
Aminopeptidase A de porc	0.33	8.5	2.20	2.6

CONCLUSION GENERALE

L'incorporation enzymatique d'acides aminés dans des chaînes polypeptidiques a été utilisée pour étudier les relations structure-fonction de plusieurs enzymes. Les travaux portant sur le remplacement d'un acide aminé précis du site actif de l'inhibiteur trypsique

de soja (Sealock et Laskowski, 1969) ou de l'inhibiteur de la kallikréine (Jering et Tschesche, 1976) sont une bonne illustration de conditions limites particulièrement intéressantes d'utilisation de ce type d'incorporation. En ce qui concerne les protéines alimentaires, il est important de souligner le fait que toutes les chaînes polypeptidiques ne sont pas équivalentes comme substrat des enzymes protéolytiques lors des expériences de greffage. Comme le montre le tableau 7, en comparant trois protéines du lait, on voit que l'incorporation dépend non seulement du caractère hydrolysable de la chaîne polypeptidique mais aussi de sa masse moléculaire et de la présence de ponts disulfures reliant entre elles différentes parties des molécules (Lupi, 1982). Cependant, l'utilisation de mélanges racémiques d'acides aminés pour l'enrichissement des protéines alimentaires constitue l'un des avantages principaux de la méthode enzymatique. Les potentialités des enzymes protéolytiques pour catalyser des synthèses peptidiques sont certainement importantes comme en témoigne notamment une revue récente qui leur est consacrée (Fru-ton, 1981).

TABLEAU 7 - TABLE 7

Incorporation de méthionine catalysée par la papaine (LUPI, 1982)

Papain-catalyzed incorporation of methionine (LUPI, 1982)

Protéine	Poids moléculaire × 10 ³ daltons	Met incorporée (%)	Teneur en Met (%)	Rendement (%)
Ovalbumine	43	4.5	7.5	34
β-lactoglobuline	19	3.1	5.8	25
Caséine	23	3.0	5.0	18

La formation de liaisons amides en présence d'un carbodiimide a permis de modifier les carboxylates des enzymes dans des conditions douces. Aussi cette réaction a-t-elle été utilisée pour étudier le centre actif des enzymes. D'autre part, la fixation de polylysine (poids moléculaire moyen 6 700) sur les carboxylates de l'albumine ou de la peroxydase augmente la charge positive de la protéine et favorise son passage à travers la membrane de fibroblastes de souris en culture (Shen et Ryser, 1978). Comparée aux protéines natives, l'absorption de la polylysyl-albumine est multipliée par 11 et celle de la polylysyl-peroxydase par 200. Dans ce dernier cas, la perte d'activité (50 %) liée à la modification d'un carboxylate proche du

site actif est largement compensée par l'augmentation de son absorption. L'absence de tout signe de toxicité cellulaire s'explique par le fait que la polylysine, normalement hydrolysée par la trypsine, peut être dégradée par les enzymes protéolytiques intracellulaires. Dans le cas des protéines alimentaires, la méthode au carbodiimide semble avoir peu de potentialités intéressantes.

L'introduction à l'aide du N-carboxyanhydride de l'acide glutamique d'un résidu glutamyl supplémentaire au niveau du site actif de l'inhibiteur tryptique de soja est un exemple intéressant d'utilisation de cette méthode pour l'étude des interactions spécifiques entre une protéine et son inhibiteur (Kowalski et Laskowski, 1976). Les N-carboxyanhydrides ont aussi été utilisés pour fixer des chaînes de poly- α -aminoacides sur les groupements aminés d'enzymes ou de protéines biologiquement actives. Les polypeptidyl-enzymes préparées conservent le plus souvent leur activité, mais diffèrent de la protéine native par leurs propriétés physico-chimiques telles que la solubilité, la mobilité électrophorétique ou l'aptitude à l'aggrégation (Epstein *et al.*, 1962 ; Nishikawa *et al.*, 1968).

Ce type de modification peut également présenter des applications thérapeutiques intéressantes (Uren et Ragin, 1979). Dans le traitement des leucémies lymphocytaires, la fixation de polyalanyl-peptides sur la L-asparaginase d'*Escherichia coli* ou d'*Erwinia carotovora* permet de minimiser les réactions immunitaires et les phénomènes d'allergie et aussi d'augmenter la stabilité de l'enzyme injectée. La demi-vie de l'enzyme modifiée injectée à une souris est 7 fois plus grande que celle de la forme native. La fixation de polymères sur une protéine diminue sa réaction avec les anticorps dirigés contre la forme native (Sela, 1966 ; Arnon et Neurath, 1970). Les polymères jouent le rôle d'une barrière stérique qui empêche ou retarde l'interaction de la protéine avec les autres macromolécules, protéases, anticorps ou récepteurs immunogènes. Par contre, les substances de faible poids moléculaire, comme le substrat, gardent une bonne accessibilité.

Appliquée à la fixation d'acides aminés essentiels aux protéines alimentaires, la méthode des N-carboxyanhydrides présente des potentialités intéressantes qui ont déjà été discutées (Puigserver *et al.*, 1982). Enfin, le greffage covalent d'acides aminés sur les résidus de lysine des protéines est certainement de nature à prévenir des réactions chimiques de détérioration des protéines lors des traitements technologiques et peut être également utilisé à améliorer leurs propriétés fonctionnelles.

Bibliographie

- ARAI (S.), YAMASHITA (M.), FUJIMAKI (M.) (1979). — A one step process for incorporation of L-Methionine into soy protein by treatment with papain. *Agric. Biol. Chem.*, 43, 1069-1074.

- ARNON (R.), NEURATH (H.) (1970). — Immunochemical studies on bovine trypsin and trypsinogen derivatives. *Immunochemistry*, 7, 241-250.
- BENEVENGA (N. S.), CIESLAK (D. G.) (1978). — Some thoughts on amino acid supplementation of protein in relation to improvement of protein nutriture. *Adv. Exp. Méd. Biol.*, 105, 379-400.
- BERGMAN (M.), FRAENKEL-CONRAT (H.) (1937). — The role of specificity in the enzymatic synthesis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 119, 707-720.
- BERGMAN (M.), FRUTON (J. S.) (1938). — Some synthetic and hydrolytic experiments with chymotrypsin. *J. Biol. Chem.*, 124, 321-329.
- BJARNASON-BAUMANN (B.), PFAENDER (P.), SIEBERT (G.) (1977). — Enhancement of the biological value of whey protein by covalent addition into peptide linkage of limiting essential amino acids. *Nutr. Met.*, 21, 170-173.
- BOGGS (R. W.), ROTRUCK (J. T.), DAMICO (R. A.) (1975). — Acetyl-methionine as a source of methionine for the rat. *J. Nutr.*, 105, 326-330.
- ENDO (Y.) (1978). — N-acetyl-L-aromatic amino acid deacylase in animal tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, 523, 207-214.
- EPSTEIN (C. J.), ANFINSEN (C. B.), SELA (M.) (1962). — The properties of poly-DL-alanyl trypsin and poly-DL-alanyl chymotrypsin. *J. Biol. Chem.*, 237, 3458-3463.
- FASTREZ (J.), FERSCHT (A. R.) (1973). — Demonstration of the acyl enzyme mechanism for the hydrolysis of peptides and anilides by chymotrypsin. *Biochemistry*, 12, 2025-2034.
- FINK (M. I.), CHUNG (S. I.), FOLK (J. E.) (1980). — γ -glutamylamine cyclotransferase: specificity toward ϵ -(L- γ -glutamyl)-L-lysine and related compounds. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, 4564-4568.
- FINOT (P. A.), BUJARD (E.), MOTTU (F.), MAURON (J.) (1977). — Availability of the true Schiff's bases of lysine. Chemical evaluation of the Schiff's bases between lysine and lactose in milk. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 86 B, 343-365.
- FOLK (J. E.), FINLAYSON (J. S.) (1977). — The ϵ -(γ -glutamyl) lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases. *Adv. Prot. Chem.*, 31, 1-133.
- FRIDKIN (M.), PATCHORNIK (A.) (1974). — Peptide synthesis. *Ann. Rev. Biochem.*, 43, 419-443.
- FRUTON (J. S.) (1981). — Proteinase catalyzed synthesis of peptide bonds. *Adv. Enzymol.*, 53, 239-306.
- FUJIMAKI (M.), ARAI (S.), YAMASHITA (M.) (1977). — Enzymatic protein degradation and resynthesis for protein improvement. *Adv. Chem. Ser.*, 160, 156-184.
- GAERTNER (H.), PUIGSERVER (A.), MAROUX (S.) (1981). — Hydrolysis of the isopeptide bond of ϵ -N-L-methionyl-L-lysine by intestinal aminopeptidase N. *FEBS Lett.*, 133, 135-138.
- GAERTNER (H.) (1981). — Polyaddition de la L-méthionine sur des protéines alimentaires. Thèse de Docteur-Ingénieur, Université d'Aix-Marseille I.
- HARPER (A. E.), HEGSTED (D. M.) (1974). — Improvement of protein nutriture. NAS-NRC, Washington, DC.
- HERNANDEZ-INFANTE (M.), HERRADOR-PENA (G.), SOTELO-LOPEZ (A.) (1979). — Nutritive value of two different beans (*Phaseolus vulgaris*) supplemented with methionine. *J. Agric. Food. Chem.*, 27, 965-968.
- HIPPE (R. L.), WARTHESEN (J. J.) (1978). — Effect of methionine and N-acetyl-methionine fortification on the flavor of soy bread and soy milk. *J. Food Sci.*, 43, 793-799.
- HIRSCHMANN (R.), SCHWAM (H.), STRACHAN (R. G.), SCHOENEWALDT (E. F.), BARKE-MEYER (H.), MILLER (S. M.), CONN (J. B.), GARSKY (V.), VEBER (D. F.), DENKE-WALTER (R. G.) (1971). — The controlled synthesis of peptides in aqueous medium. VIII. The preparation and use of novel α -amino acid N carboxy-anhydrides. *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 2746-2754.

- HOMANDBERG (G. A.), MATTIS (J. A.), LASKOWSKI (M.) Jr. (1978). — Synthesis of peptide bonds by proteinases. Addition of organic cosolvents shifts peptide bond equilibria toward synthesis. *Biochemistry*, 17, 5220-5227.
- IKURA (K.), YOSHIKAWA (M.), SASAKI (R.), CHIBA (H.) (1981). — Incorporation of amino acids into food proteins by transglutaminase. *Agric. Biol. Chem.*, 45, 2587-2592.
- JERING (H.), TSCHESCHE (H.) (1976). — Replacement of lysine by arginine, phenylalanine and tryptophan in the reactive site of the bovine trypsin-kallikrein inhibitor (Kunitz) and change of the inhibitory properties. *Eur. J. Biochem.*, 61, 453-463.
- KATSOYANNIS (P. G.), SCHWARTZ (G. P.) (1977). — The synthesis of peptides by homogeneous solution procedures. *Meth. Enzymol.*, 47, 501-578.
- KOWALSKI (D.), LASKOWSKI (M.) Jr (1976). — Chemical-enzymatic insertion of an amino acid residue in the reactive site of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). *Biochemistry*, 15, 1309-1315.
- LI-CHAN (E.), HELBIG (N.), HOLBEK (E.), CHAU (S.), NAKAI (S.) (1979). — Covalent attachment of lysine to wheat gluten for nutritional improvement. *J. Agric. Food Chem.*, 27, 877-882.
- LIS (M. T.), CRAMPTON (R. F.), MATTHEWS (D. M.) (1972). — Effect of dietary changes on intestinal absorption of L-methionine and L-methionyl-methionine in the rat. *Br. J. Nutr.*, 27, 159-167.
- LUPI (N.) (1982). — Incorporation enzymatique de la L-méthionine aux protéines alimentaires. D.E.A. de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Université d'Aix-Marseille II.
- MATTHEWS (D. M.), CRAFT (I. L.), GEDDES (D. M.), WISE (I. J.), HYDE (C. W.) (1968). — Absorption of glycine and glycine peptides from the small intestine of the rat. *Clin. Sci.*, 35, 415-424.
- MAURON (J.) (1970). — Comportement chimique des protéines lors de la préparation des aliments et ses incidences biologiques. *J. Int. Vitaminol.*, 40, 209-227.
- MORIHARA (K.), OKA (T.) (1977). — α -chymotrypsin as the catalyst for peptide synthesis. *Biochem. J.*, 163, 531-542.
- MORIHARA (K.), OKA (T.), TSUZUKI (H.) (1979). — Semi-synthesis of human insulin by trypsin-catalyzed replacement of Ala B-30 by Thr in porcine pepsin. *Nature*, 280, 412-413.
- NISHIKAWA (A. H.), MORITA (R. Y.), BECKER (R. R.) (1968). — Effects of the solvent medium on polyvalylribonuclease aggregation. *Biochemistry*, 7, 1506-1513.
- PUIGSERVER (A. J.), SEN (L. C.), CLIFFORD (A. J.), FEENEY (R. E.), WHITAKER (J. R.) (1978). — A method for improving the nutritional value of food proteins: covalent attachment of amino acids. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 105, 587-612.
- PUIGSERVER (A. J.), SEN (L. C.), CLIFFORD (A. J.), FEENEY (R. E.), WHITAKER (J. R.) (1979 a). — Covalent attachment of amino acids to casein. 2. Bioavailability of methionine and N-acetylmethionine covalently linked to casein. *J. Agric. Food Chem.*, 27, 1286-1293.
- PUIGSERVER (A. J.), SEN (L. C.), GONZALES-FLORES (E.), FEENEY (R. E.), WHITAKER (J. R.) (1979 b). — Covalent attachment of amino acids to casein. 1. Chemical modification and rates of *in vitro* enzymatic hydrolysis of derivatives. *J. Agric. Food Chem.*, 27, 1098-1104.
- PUIGSERVER (A. J.), GAERTNER (H. F.), SEN (L. C.), FEENEY (R. E.), WHITAKER (J. R.) (1982). — Covalent attachment of essential amino acids to proteins by chemical methods: nutritional and functional significance. *Adv. Chem. Ser.*, 198, 149-167.
- ROBINSON (N. C.), NEURATH (H.), WALSH (K. A.) (1973). — The relation of the α -amino group of trypsin to enzyme function and zymogen activation. *Biochemistry*, 12, 420-426.

- SEALOCK (R. W.), LASKOWSKI (M.) Jr (1969). — Enzymatic replacement of the arginyl by a lysyl residue in the reactive site of soybean trypsin inhibitor. *Biochemistry*, 8, 3703-3710.
- SELA (M.) (1966). — Immunological studies with synthetic polypeptides. *Adv. Immunol.*, 5, 29-129.
- SHEN (W. C.), RYSER (H. J. P.) (1978). — Conjugation of poly-L-lysine to albumin and horseradish peroxidase: a novel method of enhancing the cellular uptake of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 1872-1876.
- SIKKA (K. C.), JOHARI (R. P.) (1979). — Comparative nutritive value and amino acid content of different varieties of sorghum and effect of lysine fortification. *J. Agric. Food Chem.*, 27, 962-965.
- SLOTBOOM (A. J.), DE HAAS (G. M.) (1975). — Specific transformations at the N- terminal region of phospholipase A2. *Biochemistry*, 14, 5394-5399.
- UGOLEV (A. M.), TIMOFEEVA (N. M.), SMIRNOVA (L. F.), DELAEY (P.), GRUZDKOV (A. A.), IEZUITOVA (N. N.), MITYUSHOVA (N. R.), ROSHCHINA (G. M.), GURMAN (E. G.), GUSEN (V. M.), TSVETKOVA (V. A.) SHCHERBAKOV (G. G.) (1977). — Membrane and intracellular hydrolysis of peptides: differentiation, role and inter-relations with transport. In «Peptide transport and hydrolysis, Ciba Foundation Symposium». Assoc. Sci. Publ., Amsterdam.
- UREN (J. C.), RAGIN (R. C.) (1979). — Improvement in the therapeutic, immunological and clearance properties of *Escherichia coli* and *Erwinia carotovora* L-asparaginase by attachment of poly-DL-alanyl peptides. *Cancer Res.*, 39, 1927-1933.
- VOUTSINAS (L. P.), NAKAI (S.) (1979). — Covalent binding of methionine and tryptophan to soy protein. *J. Food Sci.*, 44, 1205-1211.
- WHITAKER (J. R.), FUJIMAKI (M.) (1980). — Chemical deterioration of proteins. ACS, Washington, DC.
- WICKER (C.), GAERTNER (H.), PUIGSERVER (A.) (1982). — The specific conformational transition of subunit III of bovine procaryboxypeptidase A.
- YAMASHITA (M.), ARAI (S.), ASO (K.), FUJIMAKI (M.) (1972). — Plastein reaction as a method for enhancing the sulfur containing amino acid level of soybean protein. *Agr. Biol. Chem.*, 36, 1353-1360.
- YAMASHITA (M.), ARAI (S.), TANIMOTO (S. Y.), FUJIMAKI (M.) (1974). — Mode of action of α -chymotrypsin in its reverse reaction at pH 5.3. *Biochim. Biophys. Acta*, 358, 105-112.
- YAMASHITA (M.), ARAI (S.), IMAIZUMI (Y.), AMANO (Y.), FUJIMAKI (M.) (1979 a). — A one step process for incorporation of L-methionine into soy protein by treatment with papain. *J. Agric. Food Chem.*, 27, 52-56.
- YAMASHITA (M.), ARAI (S.), AMANO (Y.), FUJIMAKI (M.) (1979 b). — A novel one step process for enzymatic incorporation of amino acids into proteins: Application to soy protein and flour for enhancing their methionine levels. *Agric. Biol. Chem.*, 43, 1065-1068.