

## Etude électrophorétique du système protéolytique exocellulaire de *Penicillium roqueforti*

par

J. C. GRIPON et Brigitte DEBEST

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

### INTRODUCTION

Les processus d'affinage des fromages sont dominés par deux grands phénomènes biochimiques : l'hydrolyse de la matière grasse et la dégradation des protéines. Ce dernier phénomène a été peu étudié dans les fromages à pâte persillée. On sait toutefois que la protéolyse y est forte, l'azote soluble représentant 40 à 50 p. 100 de l'azote total en fin d'affinage. En outre la production d'acides aminés est élevée [1] et témoigne de la présence d'exopeptidases. Cette hydrolyse profonde est généralement attribuée à *Penicillium roqueforti*. Nous avons montré [2] à l'aide d'un caillé modèle « monoxénique » que cette moisissure est effectivement capable de dégrader profondément les caséines des caillés en produisant de grandes quantités d'azote soluble et d'acides aminés.

Nos connaissances sur le système protéolytique de *P. roqueforti* portent sur un très petit nombre de souches. Une protéase acide a été purifiée et étudiée par nous-mêmes [3] et pour une autre souche par Molder et al. [4]. Ces enzymes coagulent le lait et leurs propriétés générales ressemblent nettement à la pepsine. Une protéase inhibée par l'EDTA a été également étudiée par Gripon et Hermier [5] ainsi qu'une carboxypeptidase acide et une aminopeptidase alcaline [6]. Ces données nous apportent de nombreuses informations sur le système protéolytique de *P. roqueforti* mais ne concernent que deux souches et ne permettent pas de conclure quant à l'ensemble des souches de cette espèce.

---

Abréviations : EDTA = acide éthylènediamine-tétra-acétique ; DFP = diisopropyle fluorophosphate ; Z-Glu-Tyr = benzyloxycarbonyl glutamyl tyrosine ; LNA = leucine-para-nitroanilide.

Nasuno [7] a montré que l'étude de la mobilité électrophorétique des enzymes (qui dépend de la charge, des dimensions et de la forme de la molécule) permet de comparer ces dernières entre elles et par conséquent les systèmes protéolytiques de différentes souches. Dans le présent travail nous utiliserons cette méthode pour comparer entre eux les systèmes protéolytiques de différents *Penicillium* et observer si les souches de l'espèce de *P. roqueforti* synthétisent des enzymes identiques.

## MATERIEL ET METHODES

### 1. Origine et caractères des souches

L'identification taxonomique de toutes les souches a été effectuée selon la classification de Raper et Thom [8]. Huit des souches étudiées appartiennent à l'espèce *P. roqueforti*, quatre d'entre elles sont utilisées comme levains fongiques commerciaux (L, G<sub>2</sub>, E et K<sub>2</sub>), les quatre autres (m973, 272, 1173, 431) ont été isolées de fromages. A titre de comparaison deux autres souches appartenant aux espèces *P. cyclopium* et *P. frequentans*, ainsi qu'une souche de *P. caseicolum* représentant l'autre espèce de *Penicillium* utilisée en fromagerie ont été introduites dans l'étude. Notons que le système protéolytique de la souche 431 a été étudié de façon détaillée [3, 5, 6] et servira de référence en ce qui concerne la nature et les propriétés des enzymes mises en évidence.

### 2. Conditions de culture et production des enzymes

La production d'enzymes était effectuée en culture agitée dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 60 ml de milieu. Ce dernier était dérivé du milieu de Czapeck et tamponné à 6,0. Sa composition était la suivante :

Glucose	10 g
Trypticase (Mérieux)	10 g
HK <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
KCl	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	0,01 g
Tampon phosphate 0,1 M pH 6,0	1 000 ml
Solution d'oligo-éléments selon Meyers et Knight [9]	1 ml
pH ajusté à 6,0 avec HCl concentré.	

Chaque erlenmeyer étaitensemencé à une concentration finale de 2.10<sup>4</sup> spore par ml de milieu puis incubé à 25° C dans une étuve à plateau agitant (New Brunswick, Modèle R 26) animé d'un mouvement de va-et-vient (120 allers et retours par mn). L'évolution des cultu-

res était suivie par la mesure du pH et de l'activité protéolytique sur l'azocaséine à pH 6,0. Après 5 j d'incubation les cultures étaient récoltées. Le pH du milieu était alors, selon les souches, compris entre 5,9 et 6,7. Ces conditions de culture ont été choisies car on avait préalablement observé [3, 5, 6, 10] pour la souche 431 que les enzymes de son système protéolytique restaient stables dans ces conditions de production et de pH.

### 3. Préparation des extraits utilisés pour les électrophorèses

On recueillait environ 500 ml de milieu par souche après avoir éliminé le mycélium par filtration sur filtre en fibre de verre (Whatman GF/A). Les protéines étaient concentrées par précipitation au sulfate d'ammonium à 80 p.100 de saturation. Le précipité était récupéré après une nuit à 4° C sur un filtre en fibre de verre (Whatman GF/A) de 7 cm de diamètre placé dans un appareil pour filtration stérilisante Seitz. Les protéines étaient remises en solution dans un petit volume de tampon phosphate 0,1 M pH 6,0 puis dialysées à 4° C pendant 6 h avec trois changements de tampon contre du tampon phosphate 0,01 M pH 6,0 afin d'éliminer le sulfate d'ammonium restant. Environ 10 ml de solution enzymatique étaient ainsi obtenus pour chaque souche et ont servi aux mesures d'activité et aux électrophorèses.

### 4. Dosages des activités protéolytiques

On a mesuré les activités de type endopeptidasique sur les protéines et les activités de types carboxypeptidasique et aminopeptidasique respectivement sur le Z-Glu-Tyr et la leucine-para-nitroanilide (LNA).

#### — *Dosage de l'activité endopeptidasique à pH acide*

2 ml d'une solution d'hémoglobine Worthington à 4 p.100 en tampon acétate 0,1 M pH 3,0 étaient ajoutés à 2 ml d'une solution enzymatique. Après différents temps d'incubation à 35° C la réaction était arrêtée par addition de 4 ml d'acide trichloracétique à 5 p.100. Le mélange était filtré sur filtre Whatman 42 après 20 mn de contact et la teneur en peptides de la fraction soluble était mesuré à 280 nm.

#### — *Dosage de l'activité endopeptidasique à pH neutre*

Elle était déterminée de la même manière qu'à pH 3,0 sauf que le substrat était constitué d'azocaséine en tampon phosphate 0,1 M pH 6,0 et que la teneur en produits solubles du filtrat trichloracétique était mesurée par l'absorption à 440 nm selon la méthode de Charney et Tomarelli [14].

— *Dosage de l'activité endopeptidasique à pH alcalin*

La même méthode qu'à pH 3,0 était utilisée mais le substrat était la caséine isoélectrique en tampon Tris-HCl 0,1 M pH 8,5.

— *Dosage de l'activité carboxypeptidasique à pH 4,0 et 8,5*

0,1 ml de solution enzymatique était ajouté à 0,9 ml de Z-Glu-Tyr  $0,8 \cdot 10^{-3}$  M en tampon acétate 0,1 M de pH 4,0 ou Tris-HCl 0,1 M pH 8,5. Après différents intervalles de temps à 35° C la réaction était arrêtée par addition de 1 ml de ninhydrine selon Moore et Stein [15] et le mélange immédiatement placé dans un bain-marie bouillant pendant exactement 15 mn. Le mélange réactionnel était ensuite porté dans un bain d'eau froide pendant 5 mn, puis additionné de 8 ml d'éthanol à 50 p. 100 et la teneur en tyrosine libérée était mesurée par la densité optique de la solution à 570 nm.

— *Dosage de l'activité aminopeptidasique à pH 4,0 et 8,5*

A 0,1 ml de solution de LNA (6,4 mg de LNA par ml de méthanol) on ajoutait 2,8 ml de tampon acétate 0,1 M pH 4,0 ou Tris HCl 0,1 M pH 8,5, puis 0,1 ml de solution enzymatique. Le mélange était incubé pendant différents temps à 35° C et la réaction était arrêtée par addition de 0,5 ml d'acide acétique à 30 p. 100. La variation de densité optique du mélange était mesurée à 410 nm.

— Pour l'ensemble de ces substrats, l'unité d'activité enzymatique est arbitrairement définie comme la variation de 0,01 unité de densité optique en 1 mn dans les conditions décrites ci-dessous.

## 5. Electrophorèses en gel de polyacrylamide

Les électrophorèses ont été effectuées en tubes dans des gels à 7 p. 100 à l'aide d'un appareil Acrylophor (Pleuger) selon la technique d'Ornstein [11] et Davis [12]. On a effectué des électrophorèses à pH alcalin en tampon Tris-Borate 0,1 M pH 9,2 (migration dans le sens — vers +) ou pH 8,5 (migration dans le sens + vers —). La migration était effectuée sous une tension de 250 V et une intensité de 4 mA par tube pendant environ 30 mn (l'électrophorèse était arrêtée lorsque le bleu de bromophénol, utilisé comme marqueur, se trouvait à l'extrémité des gels).

Les électrophorèses à pH acide étaient effectuées en tampon glycine acide acétique 0,04 M pH 4,3 selon la méthode de Reisfeld [13]. Les migrations avaient lieu dans le sens + vers — sous une tension de 50 V et une intensité de 5 mA par tube pendant 1 h. Le bleu de méthylène servait de marqueur.

## 6. Détermination des mobilités électrophorétiques

La mobilité électrophorétique des enzymes a été mesurée en révélant leur activité après migration dans le gel d'électrophorèse.

### — *Activité endopeptidasique à pH alcalin*

Les enzymes correspondantes ont été recherchées après migration à pH 9,2 dans le sens — vers +.

Les tubes d'électrophorèse étaient découpés manuellement en disque de 1,5 mm d'épaisseur. Chacun de ces disques était incubé à 35° C pendant 16 h dans 2 ml de caséine à 2 p.100 en tampon Tris-HCl 0,1 M pH 8,5. La réaction était arrêtée par addition de 2 ml d'acide trichloracétique à 5 p.100 et après 20 mn de contact le mélange était filtré sur filtre Whatman 42. La quantité de produits solubilisés était mesurée par la densité optique à 280 nm. On obtenait ainsi une courbe représentant l'activité enzymatique en fonction de la distance de migration dont l'optimum permet de déterminer la mobilité électrophorétique de l'enzyme.

### — *Activité endopeptidasique à pH neutre*

Elle a été mise en évidence après migration en tampon Tris-borate à pH 9,2 (migration dans le sens — vers +) et pH 8,5 (migration dans le sens + vers —). La méthode de révélation de l'activité était identique à celle décrite précédemment sauf que les disques étaient incubés en présence de 2 ml d'azocaséine 2 p.100 et que les produits solubles dans l'acide trichloracétique étaient mesurés par la variation de densité optique à 440 nm.

### — *Activité aminopeptidasique à pH 8,5*

Elle a été recherchée après migration à pH 9,2 dans le sens — vers +. Chacun des disques obtenus après découpage des tubes d'acrylamide était incubé pendant 16 h à 35° C dans un mélange composé de 2,9 ml de tampon Tris-HCl 0,1 M pH 8,5 et 0,1 ml de solution de LNA (6,4 mg/ml de LNA en méthanol). La réaction était arrêtée par addition de 0,5 ml d'acide trichloracétique à 30 p.100 et l'activité était déterminée par la mesure des variations de densité optique à 410 nm après avoir éliminé le disque de polyacrylamide.

### — *Activité carboxypeptidasique à pH acide*

Pour une souche de *P. janthinellum* [16] et la souche 431 de *P. roqueforti* [6] il a été montré que l'activité sur le Z-Glu-Tyr à pH acide est due à une carboxypeptidase acide présentant également une activité estérasique sur certains substrats dont le N-acétyl-phénylalanine- $\beta$ -naphthyl-ester (APNE). L'activité sur ce dernier substrat a été mise à profit pour révéler l'activité carboxypeptidasique à pH

acide directement dans le gel sans découpage de celui-ci. Après électrophorèse à pH 4,3, le gel était incubé à 25° C pendant 16 h en présence de 0,1 ml d'une solution d'APNE (solution à 10 mg/ml en diméthylformamide) et 5 ml d'une solution à 2 mg/ml de Fast Garnet GBC (Serva) en tampon phosphate 0,1 M pH 6,0. La présence d'une activité estératique se traduit par l'apparition d'une bande de couleur rouge dans le gel d'électrophorèse.

### **7. Détermination de la nature des protéases hydrolysant la caséine à pH 8,5 et l'azocaséine à pH 6,0**

Les protéases à groupe sérine, inhibées par le DFP, ont un pH optimum d'hydrolyse dans la zone alcaline, par contre les métalloprotéases inhibées par les chélateurs ont leur optimum de pH au voisinage de pH 7,0. Toutefois ces deux types d'enzymes sont actifs dans une gamme de pH qui leur est en grande partie commune et l'activité sur la caséine à pH 8,5 ou l'azocaséine à pH 6,0 ne peut être attribuée avec certitude à une catégorie d'enzyme ou à l'autre. Aussi chacune des enzymes mise en évidence à l'aide de ces deux substrats a été révélée avec trois tubes d'électrophorèse : un tube était consacré à la révélation de l'activité en l'absence d'inhibiteur ainsi qu'il est décrit précédemment, pour les deux autres tubes le milieu d'incubation des disques d'acrylamide contenait en plus un inhibiteur, soit le DFP, soit l'EDTA, à la concentration de  $10^{-2}$  M. Pour toutes les enzymes détectées, l'un de ces deux inhibiteurs entraînait une diminution notable de l'activité alors que l'autre n'apportait pas de variation sensible. On a donc pu classer sans ambiguïté ces enzymes en protéases à sérine (inhibées par le DFP) et métalloprotéases (inhibées par l'EDTA).

### **8. Coloration des protéines après électrophorèse**

Les protéines étaient colorées au bleu de Coomassie selon une méthode analogue à celle de Chrambach [17]. Après fixation pendant 18 h dans l'acide trichloracétique à 12,5 p. 100, les gels étaient colorés pendant 4 h par le bleu de Coomassie à 0,05 p. 100 dans le même solvant, puis décolorés dans le mélange méthanol-acide acétique eau (v/v/v:50-75-875) pendant 24 h.

## **RESULTATS**

### **1. Production des différentes activités protéolytiques**

Les activités protéolytiques ont été mesurées sur les préparations obtenues après mise en solution du précipité en sulfate d'ammonium. L'ensemble des résultats est donné dans le tableau 1. Aucune des souches n'est active à pH acide sur la LNA sauf peut-être la souche

TABLEAU 1. — Production des différentes activités protéolytiques

Souche	Activité endopeptidasique			Activité aminopeptidasique		Activité carboxypeptidasique	
	pH 3,5	pH 6,0	pH 8,5	pH 4,0	pH 8,5	pH 4,0	pH 8,5
<i>P. roqueforti</i> n° 1173	0,5	0,16	0,18	0,00	0,02	0,06	0,00
n° 431	0,66	0,07	0,02	0,00	0,02	0,06	0,06
n° m973	0,96	0,21	0,03	0,03	0,19	0,10	0,08
n° 273	1,00	0,40	0,02	0,00	0,10	0,10	0,08
L	2,1	0,25	0,06	0,00	0,07	0,42	—
E	1,66	0,14	0,00	0,00	0,09	0,18	0,11
G <sub>2</sub>	1,1	0,21	0,03	0,00	0,14	0,49	—
K <sub>2</sub>	0,23	0,05	0,00	0,00	0,08	0,00	0,08
<i>P. caseicolum</i>	0,03	0,13	0,13	0,00	0,09	0,02	0,02
<i>P. cyclopium</i>	1,70	0,30	0,24	0,00	0,10	0,20	0,05
<i>P. frequentans</i>	19,90	2,70	4,32	0,00	0,54	3,24	0,08

Les activités sont toutes mesurées et exprimées en unités arbitraires par ml de milieu de culture ainsi qu'il est indiqué dans Matériel et Méthodes. Les valeurs obtenues ne sont donc comparables entre elles que pour des substrats identiques.

m973 pour laquelle une faible activité a été détectée. Par contre et à de rares exceptions près, la LNA à pH alcalin et tous les autres substrats testés sont hydrolysés par chacune des souches. Seul le Z-Glu-Tyr n'est pas attaqué à pH acide par la souche K<sub>2</sub> et à pH alcalin par la souche 1173, ainsi que la caséine à pH 8,5 qui n'est pas hydrolysée par les souches E et K<sub>2</sub>.

Il apparaît donc que le système protéolytique exocellulaire des souches testées est très complet puisqu'elles sont presque toutes douées d'activités endopeptidasiques à pH acide, neutre et alcalin, ainsi que d'activités carboxypeptidasiques à pH acide et alcalin et d'activités aminopeptidasiques à pH alcalin.

En ce qui concerne les souches de *P. roqueforti* la souche K<sub>2</sub> se distingue par sa faible activité sur l'ensemble des substrats. Pour les autres souches une assez grande hétérogénéité des quantités d'activités produites est observée. En effet les activités endopeptidasiques à pH acide et neutre, aminopeptidasiques à pH alcalin et carboxypeptidasiques à pH acide varient respectivement de 1 à 4, 1 à 6, 1 à 10 et 1 à 8 selon les souches. Pour *P. caseicolum*, les activités mesurées sont comparables à celles de *P. roqueforti* sauf l'activité sur l'hémoglobine à pH acide qui est nettement plus faible et les activités carboxypeptidasiques qui sont légèrement plus faibles. Les quantités d'activité produites par *P. cyclopium* sont du même ordre de grandeur que celles observées avec *P. roqueforti*, par contre *P. frequentans* présente un pouvoir protéolytique nettement supérieur. Pour tous les substrats sauf le Z-Glu-Tyr à pH alcalin, les filtrats de culture de cette souche sont cinq à cent fois plus actifs que ceux de *P. roqueforti*.

## 2. Mobilité électrophorétique des enzymes testées

La mobilité électrophorétique des enzymes a été déterminée : après électrophorèse à pH 9,2 (sens — vers +) à l'aide de la caséine tamponnée à pH 8,5, l'azocaséine tamponnée à pH 6,0 et la LNA tamponnée à pH 8,5 ; après électrophorèse à pH 8,5 (sens + vers —) à l'aide de l'azocaséine à pH 6,0 ; après électrophorèse à pH 4,3 (sens + vers —) sur le N-acétyl-DL-phénylalanine- $\beta$ -naphthyl ester tamponné à pH 6,0. L'ensemble des résultats est donné dans le tableau 2. La distinction entre les protéases à sérine et les métalloprotéases a été effectuée en révélant l'activité en présence ou non des inhibiteurs de ces types d'enzyme (DFP ou EDTA) ainsi qu'il est indiqué dans Matériel et Méthodes.

Toutes les souches de *P. roqueforti* sauf la souche K<sub>2</sub> synthétise une protéase inhibée par l'EDTA qui migre vers la cathode à pH 8,5 et par conséquent dont le pHi est nettement alcalin. La coloration des protéines dans le gel d'électrophorèse révèle pour ces souches la présence d'une seule bande de protéines qui coïncide avec l'activité protéolytique. Il a été vérifié que ces enzymes migrent également

TABLEAU 2. — Mobilité électrophorétique des enzymes (exprimée en cm)

Souches	Electrophorèse à pH 8,5 Sens + vers —	Electrophorèse à pH 9,2 Migration sens — vers +			Electrophorèse à pH 4,3 Sens + vers —
	Métalloprotéase inhibée par l'EDTA	Métalloprotéase inhibée par l'EDTA	Protéase à sérine inhibée par le DFP	Aminopectidase basique	Carboxypeptidase acide
<i>P. roqueforti</i> n° 1173	0,9	—	1,0	2,8	0,6 et 1,2
n° 431	0,6	—	1,15	—	0,6
n° m973	1,0	—	—	2,8	0,6
n° 273	0,6	—	—	—	0,6 et 1,1
L	0,9	—	—	2,0	0,6
E	0,7	—	—	—	0,6
G <sub>2</sub>	1,0	—	—	2,4	0,6
K <sub>2</sub>	—	—	—	—	0,6
<i>P. caseicolum</i>	—	2,15	—	2,4	0,9
<i>P. cyclopium</i>	—	—	0,4	1,3	non testé
<i>P. frequentans</i>	—	—	1,0	—	0,5

vers la cathode à 9,2. Toutefois, leur pHi doit être proche de cette valeur car elles migrent très peu dans le gel dans ces conditions. Il est probable que leur mobilité électrophorétique très voisine (due à leur pHi particulièrement élevé) qui les distingue nettement des autres protéines de l'extrait indique que ces protéases ont des propriétés très similaires et représentent le même type d'enzyme.

Pour deux souches de *P. roqueforti* (431 et 1173) une protéase inhibée par le DFP et migrant vers l'anode à pH 9,2 est mise en évidence. La mobilité électrophorétique de ces deux enzymes est sensiblement la même. Pour les autres souches (L, E, 101, m973, G<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>) les activités relativement faibles mesurées sur la caséine à pH 8,5 seraient dues à la métalloprotéase migrant vers la cathode et non à l'action d'une protéase alcaline. En effet pour la métalloprotéase de la souche 431 l'activité sur la caséine à pH 8,5 représente encore 50 p. 100 de son activité maximale [5]. Il faut toutefois noter que les conditions de production utilisées (pH final du milieu de culture voisin de 6,5) et de préparation de l'extrait enzymatique (en tampon phosphate 0,1 M pH 6,0) sont peu favorables à la production et la stabilité d'une protéase alcaline. L'absence de protéase alcaline dans les souches L, E, 101, m973, G<sub>2</sub>, K<sub>2</sub> reflèterait alors non pas l'absence de synthèse d'une telle enzyme mais son instabilité à des pH voisins de 6,0.

L'activité aminopeptidasique à pH alcalin mise en évidence dans l'extrait brut après précipitation au sulfate d'ammonium n'a pu être détectée que dans quatre des huit souches de *P. roqueforti* testées. Il est probable que la ou les enzymes des autres souches sont instables dans les conditions de l'électrophorèse.

Pour toutes les souches de *P. roqueforti* on a pu révéler les carboxypeptidases acides grâce à leur activité estérasique sur le N-acétyl-DL-phénylalanine- $\beta$ -naphthyl ester. Une enzyme de mobilité 0,6 cm est détectée dans toutes les souches, en outre deux souches (1173 et 273) présentent une seconde activité de mobilité 1,1-1,2 cm. Ce résultat est en accord avec la mise en évidence chez une autre espèce de *Penicillium* [18] de deux carboxypeptidases acides l'une de poids moléculaire élevé (supérieur à 100 000 daltons) et l'autre de poids moléculaire plus faible (de l'ordre de 50 000 daltons).

Chez *P. caseicolum*, une protéase inhibée par l'EDTA, migrant vers l'anode à pH 9,2 est mise en évidence. Par contre, aucune enzyme inhibée par le DFP et hydrolysant la caséine n'a été détectée. La souche étudiée synthétise également une aminopeptidase alcaline de mobilité électrophorétique comparable (2,4 cm) à celles de *P. roqueforti* ainsi qu'une carboxypeptidase acide de mobilité intermédiaire (0,9 cm) à celles de *P. roqueforti*.

Pour *P. cyclospium* seulement une protéase inhibée par le DFP et une aminopeptidase sont détectées. Ces enzymes ont toutes deux

des mobilités électrophorétiques (respectivement 0,4 et 1,3 cm) sensiblement inférieures à celles des enzymes correspondantes de *P. roqueforti*.

Chez *P. frequentans* les fortes activités hydrolysant la caséine à pH 6,0 et l'azocaséine à pH 6,0 sont dues à une seule protéase qui est inhibée par le DFP. Aucune enzyme inhibée par l'EDTA n'est détectée. Après électrophorèse à pH 4,3, une carboxypeptidase de mobilité comparable à celle de *P. roqueforti* est mise en évidence.

### CONCLUSION

Les bilans des activités produites sur les différents substrats démontrent, à de rares exceptions près, que l'ensemble des souches de *P. roqueforti* hydrolyse tous les substrats testés sauf la LNA tamponnée à pH acide. L'équipement protéolytique de cette espèce est par conséquent assez complet et lui permet d'hydrolyser les protéines aux stades peptides et acides aminés.

L'activité sur l'hémoglobine à pH acide est due à une protéase acide dont la synthèse a été mise en évidence pour un grand nombre de moisissures [19, 20, 21, 22, 23, 24] et qui est produite par la plupart des espèces de *Penicillium* [25]. Pour cette raison nous n'avons pas cherché à la mettre en évidence par électrophorèse. Il est maintenant démontré que ces enzymes ressemblent à la pepsine de par leurs propriétés générales, leur spécificité et leur site actif. Pour *P. roqueforti* une telle enzyme a été purifiée et étudiée chez deux souches [3, 4] et il est clairement montré qu'elle possède bien les propriétés générales des protéases acides. En ce qui concerne la protéase acide synthétisée par la souche 431, les inhibiteurs spécifiques [6] ont permis d'établir sans ambiguïté la similitude du site actif avec celui de la pepsine et l'étude de la séquence N-terminale a montré une analogie avec la séquence d'autres protéases acides [6]. Cette enzyme possède encore une activité notable à pH 5,5 sur la caséine [3], de plus elle semble synthétisée en quantités appréciables par l'ensemble des souches de *P. roqueforti*, il paraît donc raisonnable de lui attribuer un rôle dans la forte protéolyse observée dans les pâtes persillées.

En ce qui concerne l'activité à pH neutre l'ensemble des souches de *P. roqueforti* produit une protéase inhibée par l'EDTA et migrant vers la cathode à pH 8,5. Etant donnée leur mobilité électrophorétique caractéristique, il est probable que ces enzymes sont très proches et représentent un seul et même type de protéase. Notons cependant qu'une telle enzyme n'a pu être mise en évidence pour la souche K<sub>2</sub>, mais ceci est peut-être dû à la faible quantité d'enzyme produite, cette souche étant moins protéolytique que les sept autres

souches de *P. roqueforti*. La protéase mise en évidence avec la souche 431 a été purifiée et étudiée par Gripon et Hermier [5]. Il s'agit d'une métalloprotéase qui se distingue par certaines propriétés des métalloprotéases de micro-organismes déjà mises en évidence telle la thermolysine. En particulier son poids moléculaire est deux fois plus faible et sa spécificité sur les peptides de synthèse et la chaîne B de l'insuline est différente de cette dernière. Son pH optimum d'action sur la caséine est de 5,5, et il est donc probable que cette enzyme intervient conjointement avec la protéase acide dans la dégradation des protéines des pâtes persillées.

Une protéase à sérine ne semble pas être synthétisée par toutes les souches de *P. roqueforti* testées mais peut-être est-ce dû aux conditions de production défavorables.

Une carboxypeptidase acide (parfois deux) est produite par toutes les souches de *P. roqueforti*. Cette enzyme a été étudiée pour la souche 431 et l'on a observé qu'il s'agit d'une carboxypeptidase à sérine selon la dénomination proposée par Hayashi [26] analogue à celle synthétisée par *P. Janthinellum* [27] ou *Saccharomyces cerevisiae* [28]. Cette enzyme est très peu spécifique et hydrolyse tous les acides aminés en position C-terminale sauf si une proline est en position pénultième. On peut penser qu'une telle enzyme contribue notablement à la forte production d'acides aminés que l'on observe dans les pâtes persillées [1].

L'aminopeptidase n'a pu être mise en évidence après électrophorèse pour toutes les souches. Avec la souche 431 des études ultérieures sur l'enzyme purifiée ont montré que cette enzyme était instable au cours de l'électrophorèse mais que l'introduction de 10 p. 100 de glycérol dans le gel d'électrophorèse permettait de la stabiliser. Cette enzyme hydrolyse bien certains tripeptides mais n'a pas d'action sur le glucagon ou la chaîne B de l'insuline.

Une seule souche de *P. caseicolum* a été étudiée. Cependant il a été montré [29] que cette espèce est assez homogène en ce qui concerne la production et les propriétés dans l'extrait brut de l'activité endopeptidasique et la souche étudiée peut être considérée comme représentative de l'espèce.

L'activité obtenue sur l'hémoglobine à pH 3,5 est beaucoup plus faible que pour *P. roqueforti* toutefois *P. caseicolum* synthétise une protéase acide mais cette dernière est instable à des pH égaux ou supérieurs à 6,0 [30] c'est-à-dire dans les conditions de culture que nous avons utilisées.

L'activité sur la caséine est due à une protéase inhibée par l'EDTA mais de mobilité électrophorétique nettement différente de celle de *P. roqueforti*. L'aminopeptidase et la carboxypeptidase acide

ont des mobilités comparables aux enzymes de *P. roqueforti* ce qui pourrait traduire une similitude quant à leurs propriétés générales.

En ce qui concerne les deux autres espèces étudiées *P. cyclopium* et *P. frequentans* elles sont comme *P. roqueforti* actives sur tous les substrats testés sauf la LNA tamponnée à pH acide. Il faut noter la très forte activité sur l'ensemble des substrats de *P. frequentans* qui est nettement supérieure à celle de *P. roqueforti* et *P. caseicolum*. Ceci démontre clairement que ces deux moisissures tout en disposant d'un système protéolytique très complet ne sont pas des organismes très protéolytiques. L'activité détectée à pH acide pour *P. cyclopium* et *P. frequentans* est probablement due à une protéase acide identique à celles des autres moisissures. L'activité sur les caséines à pH neutre ou alcalin est due à une seule protéase du type protéase à sérine puisque aucune enzyme inhibée par l'EDTA n'a pu être détectée. L'aminopeptidase de *P. cyclopium* est douée d'une mobilité électrophorétique sensiblement différente de celle de *P. roqueforti*.

Nasuno [7] a observé que l'étude des mobilités électrophorétiques des protéases alcalines chez des souches du groupe *Aspergillus flavus* pouvait être utilisée comme critère taxonomique. Notre étude démontre qu'une voie d'approche identique pourrait être utilisée pour *P. roqueforti*. En effet les souches que nous avons testées synthétisent une métalloprotéase migrant vers la cathode à pH 8,5 ou 9,2. Une enzyme possédant les mêmes propriétés n'a, à notre connaissance, pas été mise en évidence pour d'autres espèces de *Penicillium*. Une étude sur un plus grand nombre de souches permettrait de dire si l'enzyme est caractéristique de l'espèce et si par conséquent la méthode employée est utilisable comme critère taxonomique.

### Remerciements

Nous remercions vivement Mme J. Nicot pour son aide dans la détermination de certaines des souches de *Penicillium*.

### Résumé

La composition du système protéolytique exocellulaire de huit souches de *Penicillium roqueforti* a été étudiée par électrophorèse en gel d'acrylamide et révélation des activités dans le gel.

Les souches étudiées hydrolysent les protéines à pH acide, neutre et alcalin. En outre, elles sont douées d'activités carboxypeptidasiques à pH acide et alcalin et d'activité aminopeptidasique à pH alcalin.

L'hydrolyse des protéines à pH neutre et alcalin est due à une protéase inhibée par l'EDTA dont la mobilité électrophorétique traduit un pHi alcalin. Deux souches synthétisent également une protéase alcaline inhibée par le DFP.

Chez toutes les souches, une carboxypeptidase acide de même mobilité électrophorétique a été détectée. Deux souches produisent une seconde activité de mobilité supérieure.

Les aminopeptidases alcalines, quand elles ont pu être révélées ont des mobilités électrophorétiques comparables.

Trois souches appartenant respectivement aux espèces *P. caseicolum*, *P. cyclopium* et *P. frequentans*, étudiées à titre de comparaison, synthétisent les mêmes activités que *P. roqueforti*. Elles en diffèrent cependant par la mobilité électrophorétique et le comportement vis-à-vis des inhibiteurs des protéases actives à pH neutre et alcalin.

## Summary

### ELECTROPHORETIC STUDIES OF THE EXOCYLLULAR PROTEOLYTIC SYSTEM OF *PENICILLIUM ROQUEFORTI*

The composition of the proteolytic system of 8 strains of *Penicillium roqueforti* have been studied by acrylamide electrophoresis and by revelation of the activity in the gel.

The analysed strains hydrolyse proteins at acid, neutral and alkaline pH. Furthermore they synthetise acid and alkaline carboxypeptidase activities and alkaline aminopeptidase activity.

Proteolysis at neutral and alkaline pH is the result of the action of an EDTA inhibited protease of alkaline pHi. Two strains produced also a DFP inhibited protease.

Each strain produce an acid carboxypeptidase of identical mobility and two strains synthetise a second acid carboxypeptidase activity of higher mobility.

The alkaline aminopeptidases that have been revealed have similar electrophoretic mobility.

Three strains belonging respectively to *P. caseicolum*, *P. cyclopium* and *P. frequentans* species have been compared. They synthetise the same activities that *P. roqueforti* but are different in enzyme electrophoretic mobility and behaviour with inhibitors.

*Reçu pour publication en mars 1976.*

## Références

- [1] ISMAIL (A. A.) and HANSEN (K.) (1972). — Accumulation of free amino-acids during cheese ripening of some types of Danish cheese. *Milchwissenschaft*, 27, 556-559.
- [2] DESMAZEAUD (M. J.), GRIPON (J. C.), LE BARS (D.) et BERGÈRE (J. L.) (1976). — Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. III. Influence des micro-organismes (*Streptococcus lactis*, *Penicillium caseicola* et *P. roqueforti*). *Le Lait*, 555-556, 379-396.
- [3] ZEVACO (C.), HERMIER (J.) et GRIPON (J. C.) (1973). — Le système protéolytique de *Penicillium roqueforti*. II. Purification et propriétés de la protéase acide. *Biochimie*, 55, 1353-1360.
- [4] MODLER (H.), BRUNNER (J. R.) and STINE (C. M.) (1973). — Extracellular protease of *Penicillium roqueforti*. II. Characterisation of a purified enzyme preparation. *J. Dairy Sci.*, 57, 523-534.
- [5] GRIPON (J. C.) et HERMIER (J.) (1974). — Le système protéolytique de *Penicillium roqueforti*. III. Purification, propriétés et spécificité d'une protéase inhibée par l'EDTA. *Biochimie*, 56, 1323-1332.
- [6] GRIPON (J. C.) et HOFMANN (T.) (1975). — Résultats non publiés.
- [7] NASUNO (S.) (1972). — Electrophoretic studies of alkaline proteinases from strains of *Aspergillus flavus* group. *Agr. Biol. Chem.*, 36, 684-689.
- [8] RAPER (K. B.) and THOM (C.) (1968). — A manual of the Penicillia, Hafner publishing Company, New-York et Londres.
- [9] MEYERS (E.) and KNIGHT (S. G.) (1958). — Studies on the nutrition of *Penicillium roqueforti*. *Appl. Microbiol.*, 6, 174-178.
- [10] GRIPON (J. C.) et BERGÈRE (J. L.) (1972). — Le système protéolytique de *Penicillium roqueforti*. I. Conditions de production et nature du système protéolytique. *Le Lait*, 518, 497-514.
- [11] ORNSTEIN (L.) (1964). — Disc electrophoresis : I. Background and theory. *Ann. New-York Acad. Sci.*, 121, 321-349.
- [12] DAVIS (B. J.) (1964). — Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. New-York Acad. Sci.*, 121, 404-427.
- [13] REISFELD (R. A.), LEWIS (U. J.) and WILLIAMS (D. E.) (1964). — *Nature*, 195, 281-283.
- [14] CHARNEY (J.) and TOMARELLI (R. M.) (1947). — Colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J. Biol. Chem.*, 171, 501-505.
- [15] MOORE (S.) and STEIN (W. H.) (1948). — Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino-acids. *J. Biol. Chem.*, 176, 367-388.
- [16] WOLF (D. H.) and FINK (G. R.) (1975). — Proteinase C (Carboxypeptidase Y) mutant of yeast. *J. Bact.*, 123, 1150-1156.
- [17] 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.
- [18] YOKOYAMA (S.), OOBAYASHI (A.), TANABE (O.), SUGAWARA (S.), ARAKI (E.) and ISCHISHIMA (E.) (1974). — Production and some properties of a new type of acid carboxypeptidase of *Penicillium* molds. *Appl. Microbiol.*, 27, 953-960.
- [19] SOMKUTI (G. A.) and BABEL (F. J.) (1968). — Purification and properties of *Mucor pusillus* acid protease. *J. Bact.*, 95, 1407-1414.

- [20] STERNBERG (M. Z.) (1971). — Cristalline milk clotting protease from *Mucor miehei* and some of its properties. *J. Dairy Sci.*, 54, 159-161.
- [21] GRAHAM (J. E. S.), SODEK (J.) and HOFMANN (T.) (1973). — *Rhizopus* acid proteinases (*Rhizopus*-pepsins) properties and homology with other acid proteinases. *Can. J. Biochem.*, 51, 789-796.
- [22] WHITHAKER (J. R.) (1972). — Activity assay for *Endothia parasitica* protease using trypsinogen as substrate. *J. Dairy Sci.*, 55, 719.
- [23] HOFMANN (T.) and SHAW (R.) (1964). — Proteolytic enzymes of *Penicillium janthenillum*. I. Purification and properties of a trypsinogen activating enzyme (peptidase A). *Biochim. Biophys. Acta*, 92, 543-557.
- [24] LOBAREVA (L. S.), KOVALEVA (G. G.), SHIMANSKAYA (M. P.) and STEDANOV (V. M.) (1972). — Pepsin like proteinase from *Aspergillus awamori*. *Biokhimia*, 37, 198-205.
- [25] HOFMANN (T.) (1963). — Trypsinogen aktivierende enzyme in schimmelpilzen der gatturen *Aspergillus* und *Penicillium*. *Pharm. Acta Helv.*, 38, 634-639.
- [26] HAYASHI (R.), BAI (Y.) and HATA (T.) (1975). — Evidence for an essential histidine in carboxypeptidase Y. *J. Biol. Chem.*, 250, 5221-5226.
- [27] JONES (S. R.) and HOFMANN (T.) (1972). — Penicillocarboxypeptidase-S, a non-specific SH dependent exopeptidase. *Can J. Biochem.*, 50, 1297-1310.
- [28] KUHN (R. W.), WALSH (K. A.) and NEURATH (H.) (1974). — Isolation and partial characterization of an acid carboxypeptidase from yeast. *Biochemistry*, 19, 3871-3877.
- [29] LENOIR (J.) et CHOISY (C.) (1971). — Aptitude de l'espèce *P. caseicolum* à la production d'enzymes protéolytiques. *Le Lait*, 503, 138-157.
- [30] LENOIR (J.). — Communication personnelle.
-