

Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*

I. PRECARACTERISATION DE L'ACTIVITE EXOCELLULAIRE*

par

J. LENOIR et B. AUBERGER

avec la collaboration technique de Jacqueline BISSON
et Michèle SCHMIDT

Laboratoire de Recherche de la Chaire de Technologie (I.N.R.A.)

Institut National Agronomique Paris-Grignon
78850 Thiverval-Grignon

Penicillium caseicolum Bainier, moisissure superficielle de nombreux fromages à pâte molle, a une activité protéolytique qui a été depuis longtemps mise en évidence (Maze, 1905 ; Thom, 1906, 1909 ; Dox, 1908). L'importance et la nature de cette activité a déjà fait l'objet de plusieurs études (Dolezalek, 1956 ; Proks et Cingrosova, 1962 ; Tsugo et Matsuoka, 1963 ; Glenza, 1969 ; Kikuchi et Takafugi, 1971) et notre laboratoire s'est lui-même attaché à déterminer, sur une collection d'une centaine de souches de diverses origines, l'aptitude de l'espèce à la production d'enzymes protéolytiques (Lenoir et Choisy, 1971). Ce travail a révélé une assez grande homogénéité de la population. Placées dans les mêmes conditions de culture, les diverses souches produisent des quantités d'enzymes qui se situent dans un intervalle dont l'amplitude de variation ne dépasse guère 1 à 2. En revanche, des variations importantes dans les niveaux de production d'enzymes ont été observées en fonction de la composition du milieu de culture ou des conditions d'incubation (Lenoir et *al.*, 1973).

Dans le cadre de ces études sur l'aptitude à la protéolyse et les facteurs de production des enzymes protéolytiques de *P. caseicolum*

* Travail réalisé dans le cadre d'un contrat de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique sur l'emploi d'enzymes d'origine microbienne dans l'affinage des fromages.

il avait été procédé à une détermination de certains caractères des enzymes ; il était apparu qu'il s'agissait d'un système actif à pH neutre et doté d'une activité encore importante à pH 8,5. Il convenait cependant de vérifier si les différences dans les niveaux de production qui ont pu être observées entre les souches s'accompagnent ou non de différences dans la nature du système enzymatique produit ; aussi nous a-t-il paru utile de préciser les caractères de l'activité protéolytique sur des souches présentant des aptitudes à la protéolyse nettement différentes.

Par ailleurs, les micro-organismes, et notamment les moisissures, sécrètent généralement plusieurs enzymes protéolytiques. Ainsi, chez *Penicillium roqueforti*, le système enzymatique apparaît constitué de trois composants (Gripon et Bergère, 1972) ; une protéase acide (Zevaco et al., 1973 ; Modler et al., 1974) et une protéase inhibée par l'E.D.T.A. (Gripon et Hermier, 1974) ont été identifiées. Sur les cultures d'*Aspergillus oryzae* la présence de plusieurs enzymes protéolytiques a été également mise en évidence (Bergkvist, 1963 a, b) et trois protéases ont été purifiées et caractérisées (Nakadai et al., 1973).

Certaines études réalisées sur *P. caseicolum* permettent également de penser que cette espèce synthétise un système protéolytique complexe, la production de trois enzymes présentant des pH optimum d'action différents ayant été observée (Tsugo et Matsuoka, 1963 ; Glenza, 1969 ; Kikuchi et Takafugi, 1971). Un fractionnement et une purification des enzymes apparaissent cependant nécessaires pour préciser la nature du système protéolytique.

La présente étude a été réalisée sur des préparations enzymatiques exocellulaires. Dans une première étape, les essais ont comporté la détermination de la stabilité du système et de certaines caractéristiques d'action sur des préparations provenant de souches plus ou moins activement protéolytiques. Dans une seconde étape il a été procédé à un fractionnement des protéines enzymatiques sur des cultures provenant d'une souche.

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel d'étude. Choix des souches

Les souches de la collection du laboratoire ont été classées en trois groupes suivant leur niveau d'activité (tab. 1) ; cinq souches de chaque groupe ont été choisies pour la première étape de l'étude, ces souches se distinguant entre elles par leur plus ou moins grande sensibilité à la nature de la source d'azote (Lenoir et Choisy, 1971).

La souche retenue pour les essais de fractionnement, PL 21, appartient au groupe des souches les plus actives.

TABLEAU 1

Souches de *P. caseicolum* utilisées dans l'étude de précaractérisation de l'activité exocellulaire

| Groupes d'activité | Identité des souches | Activité exocellulaire* | Rapport d'activité CT/CD** |
|--------------------|----------------------|-------------------------|----------------------------|
| 1 | PL 4 | 260 | 1,6 |
| | PC 8 | 220 | 6,0 |
| | P 12 | 220 | 3,0 |
| | PL 11 | 230 | 5,4 |
| | PB 1 | 205 | 4,0 |
| 2 | PA 15 | 285 | 18 |
| | P 1 | 310 | 2,1 |
| | PN 14 | 320 | 2,3 |
| | PC 2 | 340 | 4,0 |
| | PL 3 | 300 | 1,3 |
| 3 | PE 1 | 350 | 1,9 |
| | PL 21 | 400 | 3,6 |
| | PN 19 | 425 | 11 |
| | PN 28 | 445 | 3,4 |
| | PC 12 | 455 | 1,5 |

* en unités d'activité protéolytique par ml de culture.

** rapport des activités produites sur milieu Czapek trypticase (CT) et sur milieu Czapek-Dox (CD).

2. Conditions de culture

Les conditions de culture adoptées sont celles qui ont été décrites antérieurement (Lenoir et Choisy, 1971). Les souches sont ensemencées au taux de 10 000 spores par ml sur milieu Czapek-trypticase, pH 6,5, réparti en fioles de Roux à raison de 250 ml par fiole. L'incubation se fait pendant 12 j à 20° C sans agitation.

3. Préparation de l'extrait enzymatique

3.1. Préparation de l'extrait brut

Après incubation, le milieu de culture est séparé du mycélium par filtration sur filtre Durieux n° 122 et le filtrat est centrifugé à

4° C pendant 10 mn à 3 000 g. Le surnageant constitue l'extrait enzymatique brut.

3.2. Précipitation par le tanin

Sur l'extrait brut, ajusté à pH 5,5 par addition d'acide sulfurique environ 2 N, les protéines sont précipitées par ajout d'une solution alcoolique de tanin à 3 p.100 jusqu'à la concentration finale de 3 p. 1000 (Bergkvist, 1963 a). Après repos, 2 h à température ambiante, le précipité est séparé par centrifugation à 3000 g pendant 10 mn. Le culot est repris par de l'acétone à 3-4° C, filtré, lavé à l'acétone refroidie puis séché sous vide à la température ambiante. La poudre ainsi obtenue peut être conservée plusieurs mois à 5° C sans perte notable d'activité.

3.3. Mise en solution de la poudre-tanin

Au moment de l'emploi la poudre est mise en solution dans un volume de tampon phosphate M/15, pH 6, égal au volume initial de l'extrait brut. Après une nuit d'agitation à 5° C la solution est centrifugée 10 mn à 3 000 g ; le surnageant constitue la préparation enzymatique utilisée dans la première étape de l'étude.

4. Fractionnement des enzymes de l'extrait par filtration sur gel de Séphadex G 75

La poudre obtenue par précipitation tannique est mise en solution, comme il est dit précédemment, dans un volume de tampon égal à 1/50 du volume initial de l'extrait enzymatique brut.

Un échantillon de 50 ml de solution est appliqué au sommet d'une colonne de Séphadex G 75 superfine de 85 × 5 cm, équilibrée en tampon phosphate 0,1 M, pH 6. Le débit d'élution est d'environ 40 ml par heure. L'éluat est collecté par fractions de 10 ml. La densité optique à 280 nm est mesurée à l'aide d'un densitomètre enregistreur Seive et sur chaque fraction collectée il est procédé à une détermination de l'activité protéolytique.

Les fractions correspondant à chaque pic d'activité sont rassemblées et les solutions obtenues constituent les préparations enzymatiques partiellement purifiées.

5. Détermination de l'activité protéolytique

L'activité des préparations est déterminée dans les conditions qui ont été décrites antérieurement (Lenoir et Choisy, 1971). Le mélange réactionnel a la composition suivante : caséinate de sodium à 2,5 p. 100 en solution citrate 0,02 M : 2,5 ml ; tampon mixte acétate-borate-phosphate 0,25 M ajusté à pH convenable : 0,5 ml ; eau distillée : 1 ml ; préparation enzymatique : 1 ml.

Sauf indication contraire, la digestion est conduite à pH 6,0 pendant 2 h à 40° C et le mélange est déféqué par l'acide trichloro-

cétique à la concentration finale de 12 p.100. Les composés azotés non protéiques libérés au cours de l'incubation sont dosés sur le filtrat par colorimétrie à l'aide du réactif de Folin et Ciocalteu (1927) selon la méthode de Anson (1938). Les résultats sont exprimés en unités d'activité protéolytique (UP) ; par convention 1 UP correspond à 1 μ g de tyrosine libérée par heure de digestion.

6. Etude des caractères de l'activité protéolytique

L'influence du pH sur l'activité enzymatique a été déterminée en amenant le mélange réactionnel à un pH compris entre 3 et 11 à l'aide du tampon mixte ajusté à pH convenable. L'influence de la température a été recherchée par digestion à pH 6,0 pendant 2 h dans l'intervalle 25-60° C, 24 h dans la plage 5-30° C. L'aptitude à la libération de composés de poids moléculaire plus ou moins élevé a été estimée par détermination de l'activité enzymatique à quatre valeurs de pH comprises dans l'intervalle 5,5-8 et dosage des composés azotés solubles sur les filtrats trichloracétiques à 12 p.100 et à 2 p. 100.

Les essais de stabilité en fonction du pH ont été réalisés en portant les préparations enzymatiques, en solution tampon mixte 0,025 M, à différentes valeurs de pH dans l'intervalle 2,5-11. Les préparations sont conservées 1 h à 37° C, ou 15 h à 20° C, puis amenées à pH 6 et diluées au 1/2 par addition d'eau. L'activité enzymatique résiduelle est déterminée sur une prise d'essai de 2 ml dans les conditions usuelles de la digestion.

La stabilité à 37° C aux valeurs de pH 4,2 et 10,0 a été déterminée sur les préparations enzymatiques en solution phosphate M/15 ajustées au pH voulu par addition d'acide sulfurique ou de soude environ N/2. Les préparations sont conservées pendant des temps compris entre 2 et 120 mn et l'activité résiduelle à pH 6,0 est estimée dans les conditions déjà décrites.

Pour les essais de stabilité thermique, les préparations enzymatiques, ajustées à pH 6,0, ont été placées en tube de verre de 5 mm de diamètre à raison de 3 ml par tube. Après un préchauffage de 3 mn à 45° C, les tubes sont plongés dans un bain-marie réglé à 60° C pendant des temps variant de 10 s à 1 h ; l'action du chauffage est arrêtée par immersion des tubes dans un bain d'eau glacée. L'activité résiduelle à pH 6,0 est déterminée dans les conditions usuelles.

RESULTATS

1. Mise au point des conditions de préparation des enzymes

L'obtention des enzymes sous la forme d'une poudre présente l'intérêt de disposer de préparations concentrées et stables. Encore

convient-il de s'assurer que ces préparations ont une activité sensiblement égale à celle du milieu originel et que les caractères de celle-ci ne sont pas modifiés.

Les conditions de précipitation adoptées sont celles proposées par Bergkvist (1963 a). Certains facteurs ont été contrôlés ; le pH, la concentration en tanin, le temps et la température. Le pH doit être compris entre 5 et 6 ; à pH inférieur à 5,0 il y a inactivation des enzymes, à pH supérieur à 6 la précipitation est incomplète ou la séparation du précipité est plus difficile. La concentration en tanin peut être comprise entre 2 et 4 p.1000 et le temps de précipitation peut être 2 h à 20° C ou 2 à 20 h à 5° C.

La mise en solution de la poudre peut être réalisée par contact avec le tampon phosphate M/15 pH 6 pendant 1 h à 20° C ou 15-20 h à 5° C. La séparation de la partie insoluble, effectuée par centrifugation, n'a pas d'incidence sur le résultat de la détermination de l'activité de la préparation.

Un contrôle de la récupération des enzymes par précipitation tannique a été réalisé, dans les conditions opératoires adoptées, sur des cultures de quatre souches différentes : PL 21, PN 14, PL 8, PL 1 ; les activités enzymatiques retrouvées représentaient respectivement 90-93-95 et 100 p. 100 des activités des extraits bruts.

L'étude comparée des caractères de l'activité des filtrats de culture et des solutions obtenues à partir des précipités tanniques montre que les comportements de l'une et l'autre des préparations sont sensiblement analogues, aussi bien en ce qui concerne l'influence du pH sur l'activité des enzymes et sur leur stabilité qu'au niveau de l'inactivation thermique (fig. 1).

La précipitation des enzymes par le tanin constitue donc une technique de concentration et de conservation satisfaisante comme phase de préparation dans une étude de précaractérisation et comme première étape de purification.

2. Caractéristiques d'action du système protéolytique

2.1. Influence du pH

Les variations d'activité en fonction du pH du mélange de digestion sont représentées par les courbes de la figure 2. D'une souche à l'autre, au sein d'un même groupe d'activité, ou d'un groupe à l'autre, il n'y a pas de différences marquantes ; l'allure des courbes est pratiquement identique, toutes les souches présentent un pH optimal à 5,8-6,2 et un optimum secondaire en milieu alcalin vers pH 8,5-9. A pH 5, l'activité est sensiblement égale à 50 p. 100 de l'activité maximale ; aux pH inférieurs à 5, elle est très faible et elle devient presque nulle à pH 4.

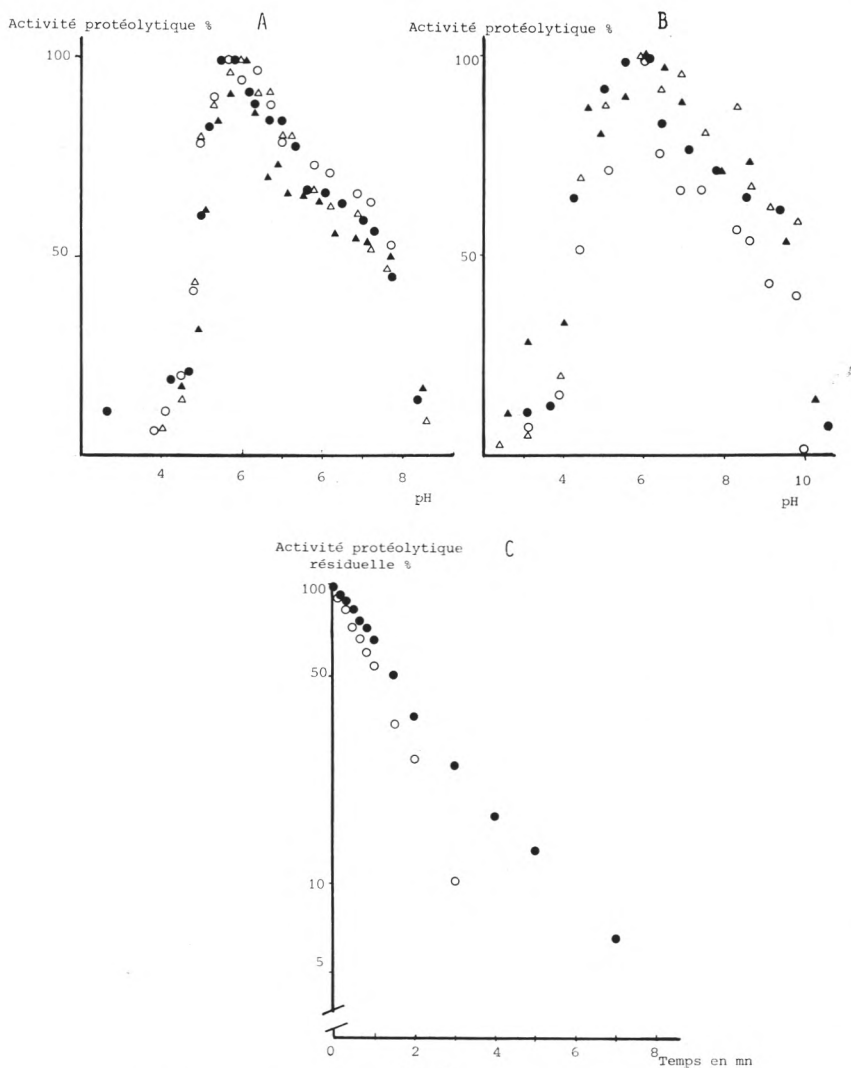


fig. 1

Caractères des préparations enzymatiques exocellulaires
de *Penicillium caseicolum*

Filtrats de culture ● ▲ - Préparations tanin ○ △

- A. Influence du pH sur l'activité protéolytique.
Souches PL 21 ○ ● et PN 14 △ ▲.
- B. Stabilité de l'activité protéolytique en fonction du pH.
Souches PL 21 ○ ● et PN 14 △ ▲.
Conservation 1 h - 37° C ; activité protéolytique résiduelle déterminée à pH 6.
- C. Stabilité thermique de l'activité protéolytique.
Souche PL 8.
Chauffage 65° C - pH 6,0 ; activité protéolytique résiduelle déterminée à pH 6.

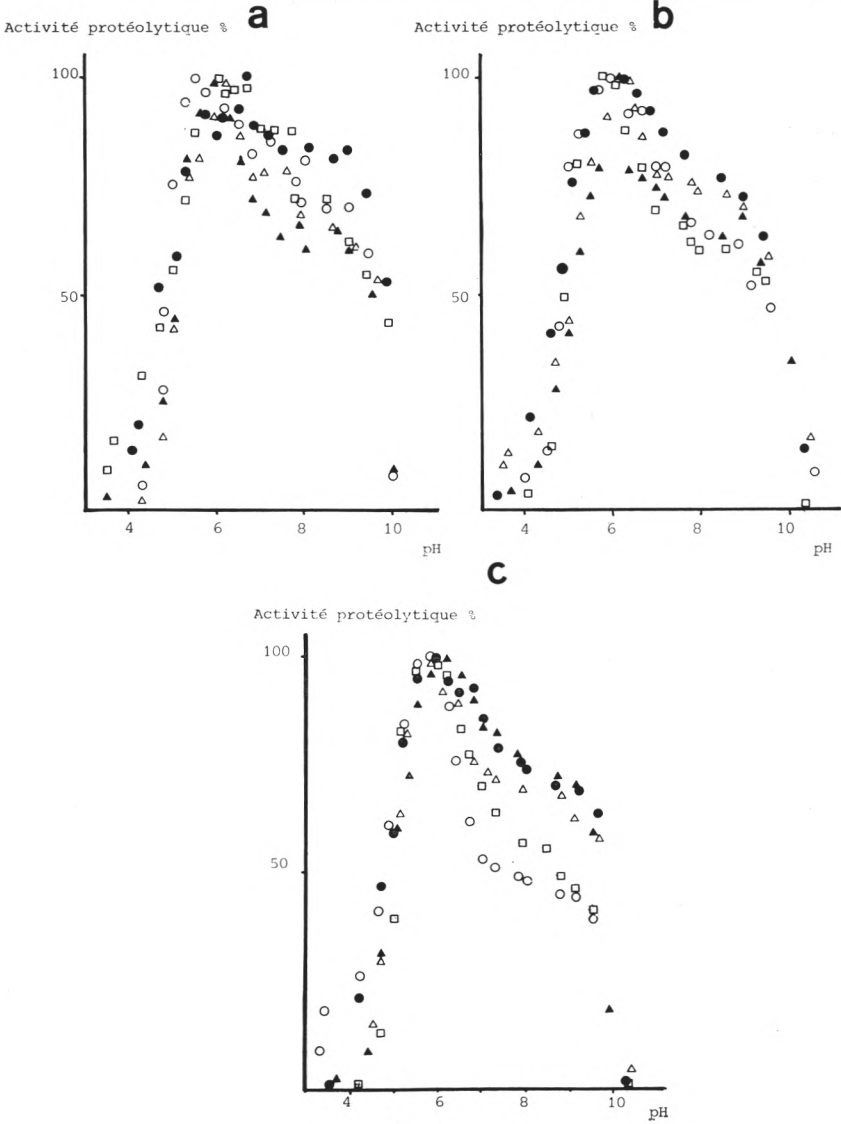


fig. 2

Influence du pH sur l'activité protéolytique de *Penicillium caseicola*

- | | | |
|------------------------|-------|-------|
| a. Souches du groupe 1 | ○ ○ ○ | PC 8 |
| | ● ● ● | PL 4 |
| | △ △ △ | PL 11 |
| | ▲ ▲ ▲ | P 12 |
| | □ □ □ | PB 1 |
| b. Souches du groupe 2 | ○ ○ ○ | PN 14 |
| | ● ● ● | PA 15 |
| | △ △ △ | PL 3 |
| | ▲ ▲ ▲ | PC 2 |
| | □ □ □ | P 1 |
| c. Souches du groupe 3 | ○ ○ ○ | PN 28 |
| | ● ● ● | PE 1 |
| | △ △ △ | PL 21 |
| | ▲ ▲ ▲ | PN 19 |
| | □ □ □ | PC 12 |

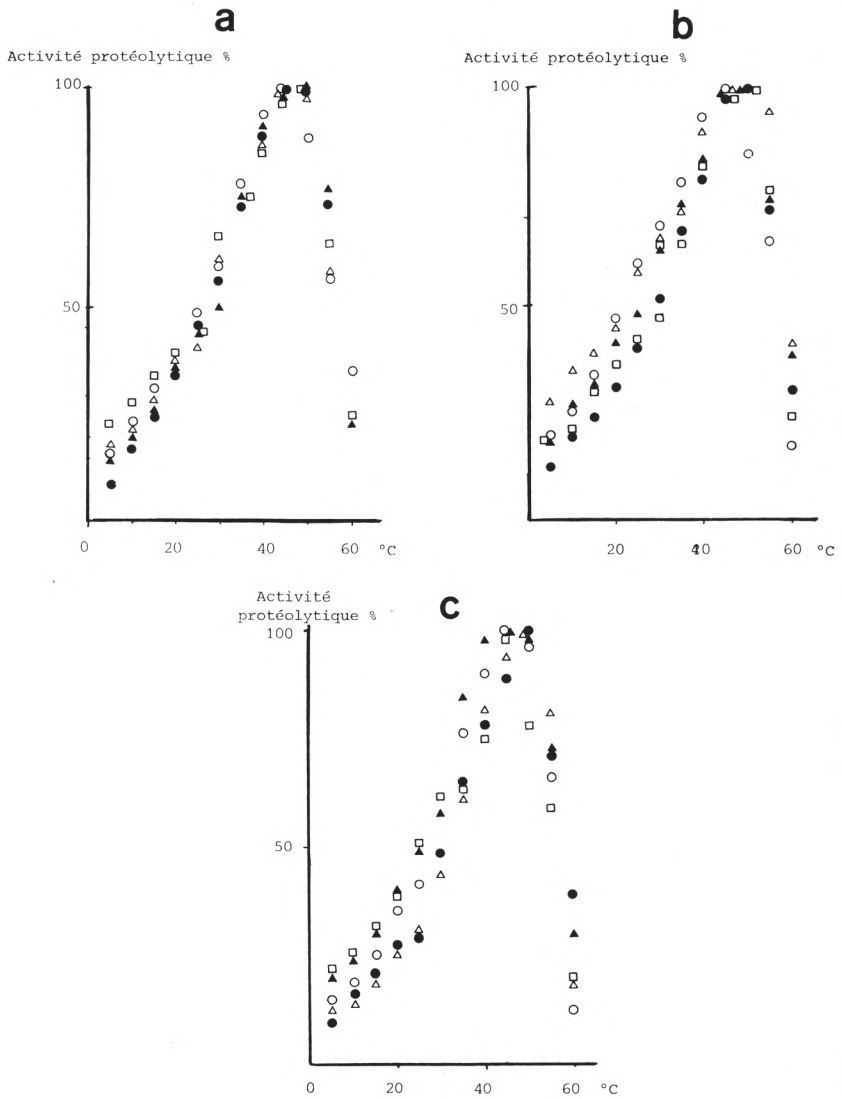


fig. 3

Influence de la température sur l'activité protéolytique
de *Penicillium caseicolum*

Activité protéolytique déterminée à pH 6,0.

Identité des souches : voir légende figure 2.

2.2. Influence de la température

Les préparations des différentes souches ont vis-à-vis de la température le même comportement ; leur température optimale d'action est proche de 45-50° C et dans l'intervalle de température 5-40° C il y a un accroissement régulier de l'activité protéolytique (fig. 3), le coefficient de température (Q 10) étant proche de 1,5.

2.3. Aptitude à la libération de peptides de poids moléculaire plus ou moins élevé

Les rapports teneur en composés solubles dans l'acide trichloracétique à 2 p.100 / teneur en composés solubles dans l'acide trichloracétique à 12 p.100 (Tyr 2 / Tyr 12) présentent pour les différentes souches, au pH optimal d'activité, des valeurs se situant dans l'intervalle 1,2-1,6. Une souche (PB 1) se distingue cependant par un rapport nettement plus faible, proche de 1. Dans l'ensemble, il n'y a pas de variations importantes du rapport Tyr 2 / Tyr 12 en fonction du pH, on observe seulement à pH proche de 5,5 des valeurs un peu inférieures à celles trouvées à pH voisin de 8 (1,25 contre 1,4).

3. Stabilité du système protéolytique

3.1. Stabilité en fonction du pH

Les courbes présentant les activités résiduelles à pH 6,0 des différentes préparations enzymatiques maintenues 1 h à 37° C à des valeurs de pH comprises entre 2,5 et 11 sont en assez bonne concordance (fig. 4). La stabilité est maximale dans la zone de pH 5-7. Dans cet intervalle l'activité résiduelle atteint 90 à 100 p.100 de l'activité initiale. Dans la zone de pH 7-9 les préparations présentent encore une assez grande stabilité, le taux d'inactivation ne dépassant généralement pas 20-25 p.100. En revanche, aux pH inférieurs à 4,5 ou supérieurs à 9,5, l'inactivation devient très importante. Les essais de conservation 15 h à 20° C confirment les résultats obtenus en 1 h à 37° C.

L'inactivation en fonction du temps de conservation à 37° C aux pH de 4,2 et 10,0 se concrétise pour les différentes souches par des courbes qui, tracées en coordonnées semi-logarithmiques, présentent deux pentes (fig. 5). D'une souche à l'autre une assez grande dispersion des résultats est observée ; elle s'explique par la grande sensibilité du système protéolytique aux valeurs de pH adoptées car des variations du même ordre se retrouvent dans les essais réalisés à partir de préparations provenant d'une même souche.

3.2. Stabilité à 60° C en fonction du temps

La stabilité thermique des préparations a été éprouvée à une valeur de pH se situant dans la zone de stabilité maximale (pH 6,0). D'une souche à l'autre, on observe quelques différences (fig. 6) mais celles-ci restent faibles. D'une façon générale, l'activité résiduelle

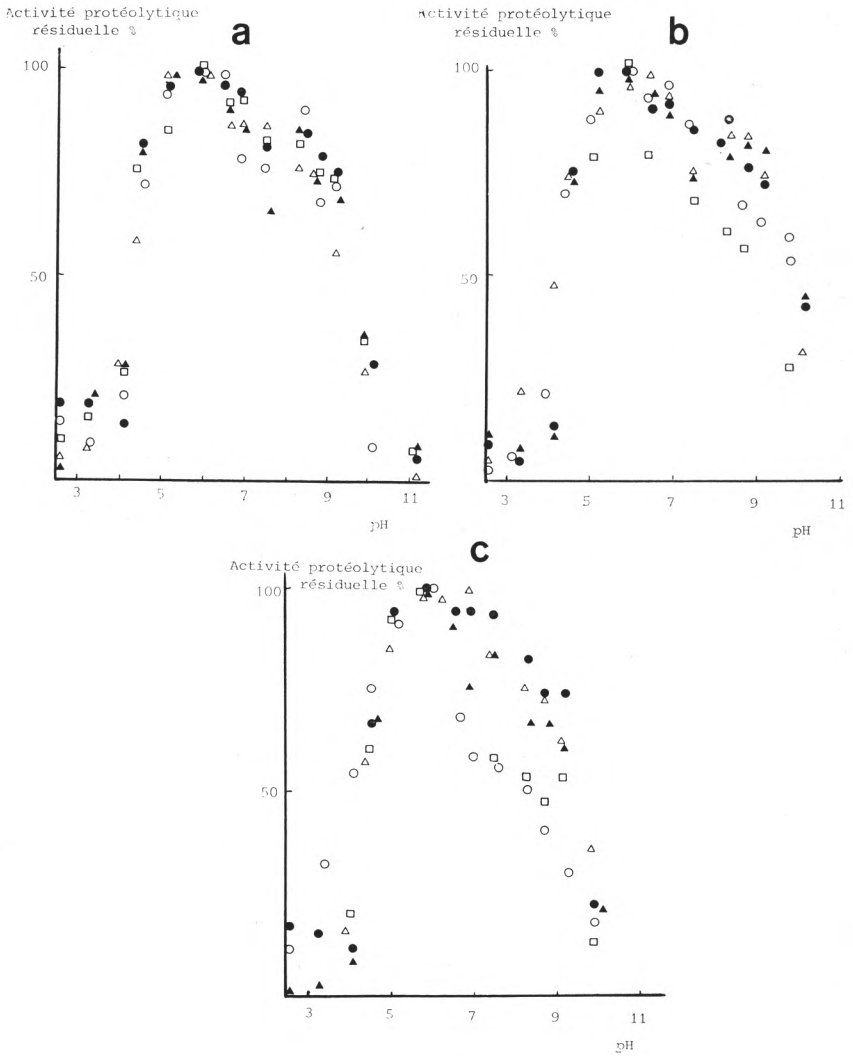


fig. 4

Stabilité de l'activité protéolytique de *Penicillium caseicolum*
en fonction du pH

Conservation 1 h - 37° C en tampon mixte acétate-borate-phosphate 0,025 M.

Activité protéolytique résiduelle déterminée à pH 6.

Identité des souches : voir légende figure 2.

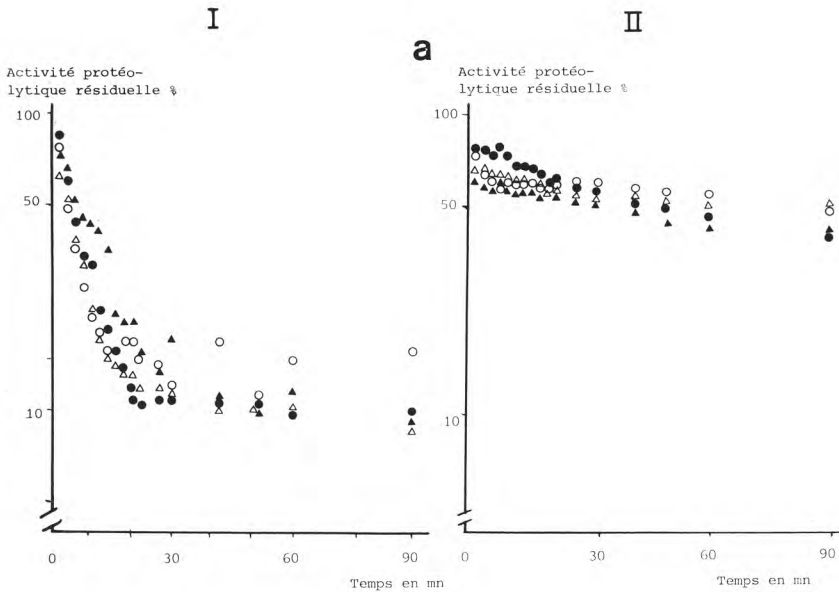


fig. 5

Stabilité de l'activité protéolytique de *Penicillium caseicolum* en milieu acide, pH 4,2 (I) et en milieu alcalin, pH 10 (II)

Conservation à 37° C en solution phosphate M/15.

Activité protéolytique résiduelle déterminée à pH 6,0.

Identité des souches : voir légende figure 2.

des préparations est, après 10 mn, proche de 20 p.100 de l'activité initiale et le taux d'inactivation de 90 p.100 est atteint en un temps voisin de 15 mn.

4. Fractionnement du système protéolytique

La filtration sur Séphadex G 75 (fig. 7) élimine une part très importante des protéines non enzymatiques et elle sépare deux fractions actives. Une première fraction, éluée avec un rapport V/V₀ de 1,7, correspond à environ 20 p.100 de l'activité mesurée à pH 6. La deuxième fraction, éluée avec un rapport V/V₀ de 2,2, représente près de 80 p.100 de l'activité. On remarque sur le diagramme qu'une très faible partie de l'activité protéolytique (moins de 1 p.100) se trouve dans la fraction protéique exclue.

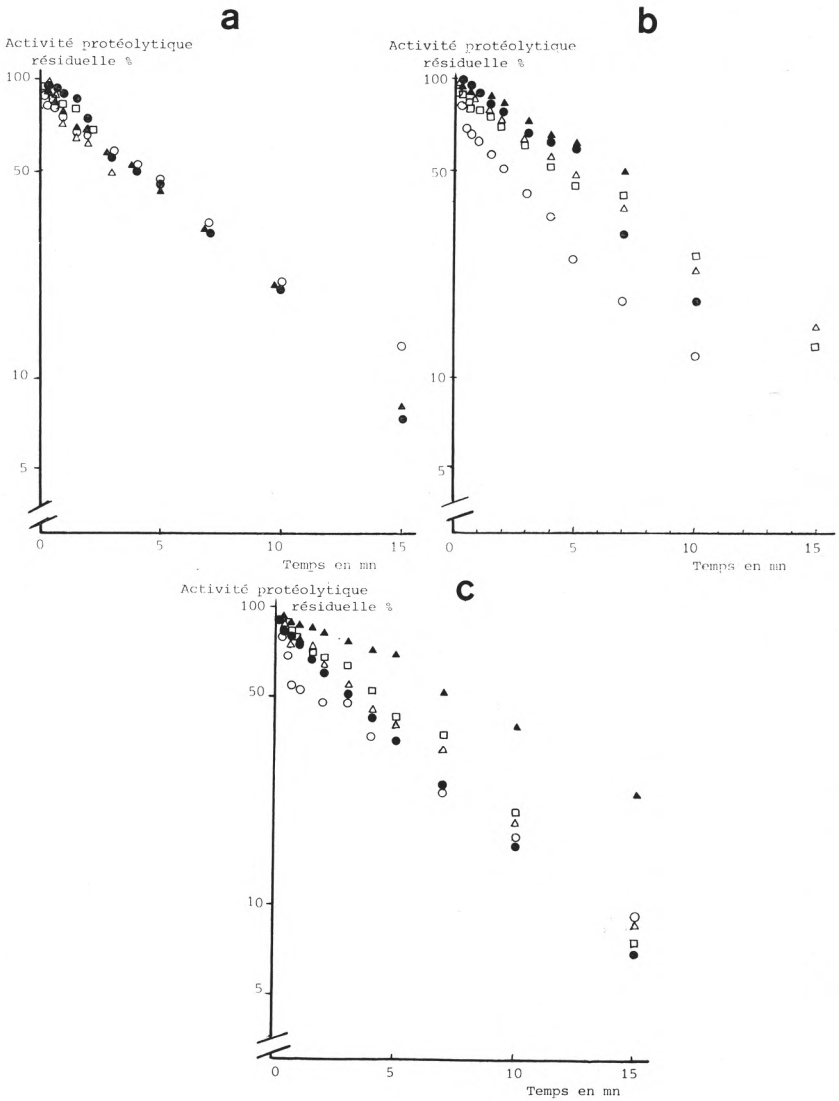


fig. 6

Stabilité thermique de l'activité protéolytique
de *Penicillium caseicola*

Chauffage à 60° C à pH 6,0 en tampon phosphate M/15.

Activité protéolytique résiduelle déterminée à pH 6,0.

Identité des souches : voir légende figure 2.

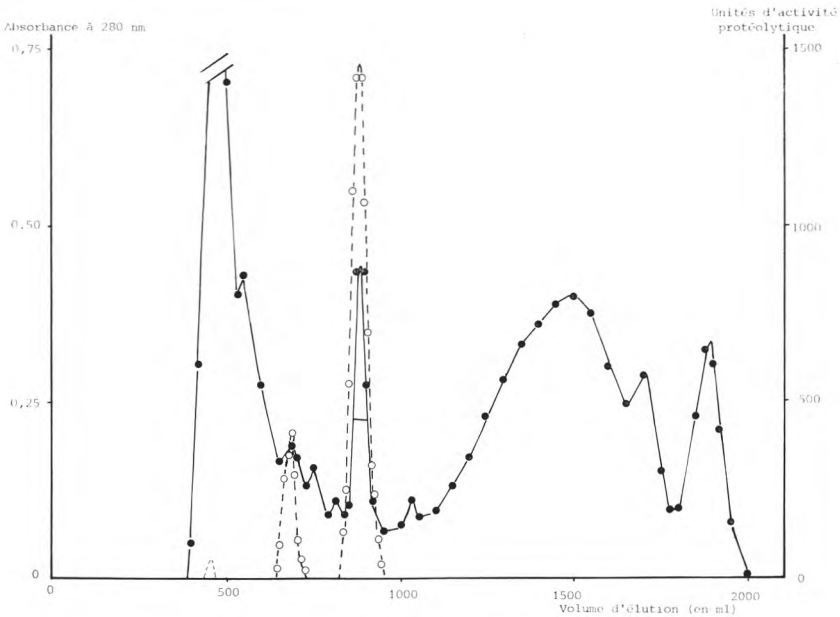


fig. 7

Diagramme de filtration sur gel de Séphadex G 75 du système protéolytique exocellulaire de *Penicillium caseicolum*

Souche PL 21, préparation tannin en solution phosphate 0,1 M, pH 6,0.

Colonne de 85 × 5 cm.

Elution par tampon phosphate 0,1 M, pH 6,0.

Vitesse d'élution 40 ml/h.

Charge 50 ml ; volume des fractions : 10 ml.

●—● Courbe d'élution des protéines (absorbance à 280 nm).

○—○ Courbe d'activité protéolytique mesurée à pH 6,0.

La chromatographie sur Séphadex G 75 se traduit ainsi par la séparation de deux enzymes représentant respectivement 20 et 80 p.100 de l'activité mesurée à pH 6.

5. Caractères des fractions actives

Les caractéristiques d'action et de stabilité des deux fractions séparées sur Séphadex G 75 montrent clairement qu'elles correspondent à des enzymes différentes (fig. 8). Les allures des courbes illustrant les influences du pH et de la température sur l'activité mettent cette dualité en évidence mais celle-ci apparaît encore mieux

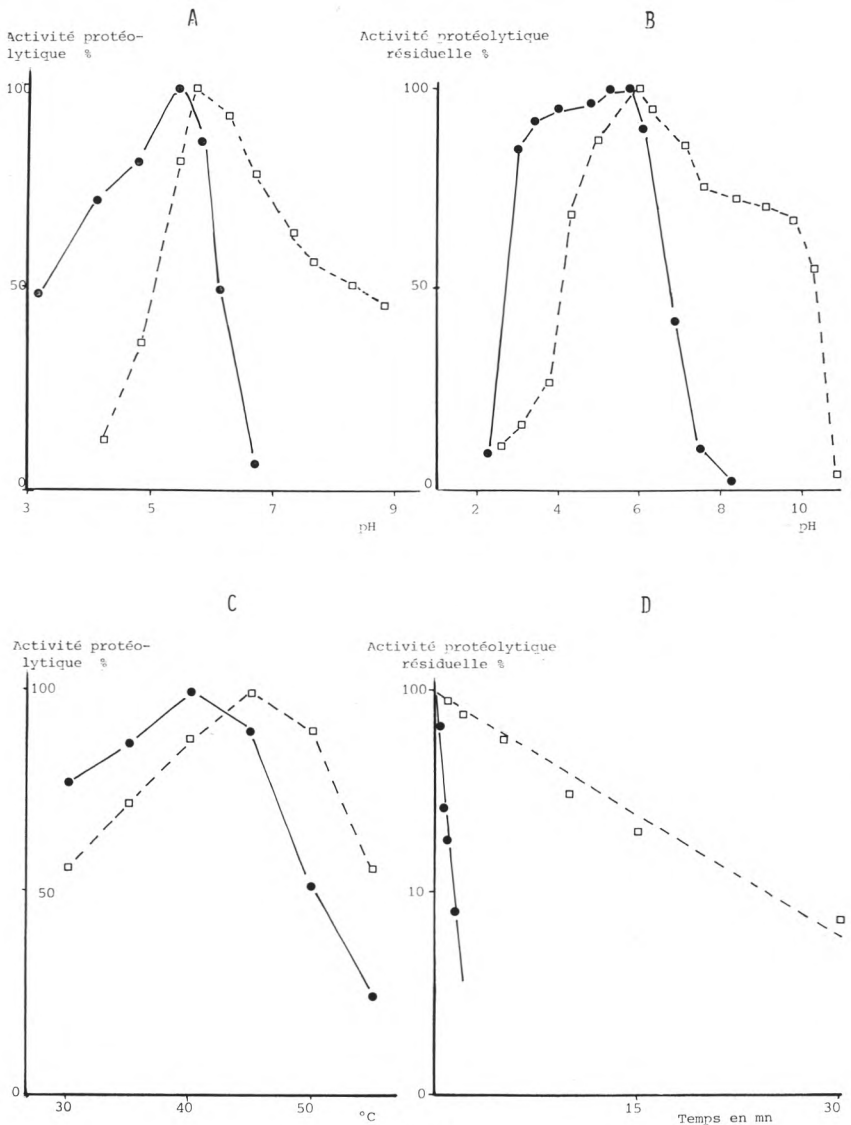


fig. 8

Caractères des deux fractions enzymatiques séparées par filtration sur gel de Séphadex G 75

- Influence du pH sur l'activité protéolytique.
 - Stabilité de l'activité protéolytique en fonction du pH.
(Conservation 15 h - 20° C en solution phosphate M/15 - Activité protéolytique résiduelle déterminée à pH 6).
 - Influence de la température sur l'activité protéolytique.
(Activité protéolytique déterminée à pH 6,0).
 - Stabilité thermique de l'activité protéolytique.
Chauffage à 60° C - pH 6,0 en tampon phosphate M/15.
Activité protéolytique résiduelle déterminée à pH 6,0.
- — ● Fraction I.
□ — □ Fraction II.

marquée par les courbes de stabilité, stabilité en fonction du pH et stabilité thermique.

La fraction I, fraction mineure, a une activité maximale sur caséine vers pH 5-5,5 ; à pH 4,0 elle possède encore 70 p.100 de l'activité maximale ; à pH 6,0 elle n'a plus que 50 p.100 de cette activité et au-dessus de pH 6,5 son action devient presque nulle. La fraction II, fraction principale, a un pH optimal voisin de 6,0 ; à pH 4 elle perd presque toute activité ; en revanche, à pH 6,7, elle conserve près de 80 p.100 de l'activité maximale. Ces différences de comportement vis-à-vis du pH se retrouvent dans les essais de stabilité. La fraction I présente un maximum de stabilité à 20° C dans l'intervalle de pH 3-6 et à pH 8 elle est totalement inactivée en 15 h ; par chauffage à 60° C, à pH 6,0, le taux d'inactivation de 90 p.100 est atteint en moins de 2 mn. La fraction II est stable dans la zone de pH 5-7 et à pH 8, après 15 h, elle conserve près de 75 p.100 de l'activité initiale. Par chauffage à 60° C, à pH 6,0, le temps nécessaire pour atteindre le taux d'inactivation de 90 p.100 est proche de 20 mn.

DISCUSSION

Les souches étudiées présentent des niveaux de production d'enzymes protéolytiques assez différents puisqu'ils se situent dans un intervalle présentant une amplitude de variation de 210 à 460 UP par ml de milieu de culture ; par ailleurs, leur aptitude à la production d'enzymes est plus ou moins sensible à la nature de la source d'azote, azote peptidique ou azote nitrique, les rapports des niveaux de production sur milieu Czapek-trypticase et Czapek-Dox pouvant être très différents (Lenoir et Choisy, 1971). Les préparations enzymatiques exocellulaires obtenues à partir de ces souches présentent cependant des caractéristiques très voisines tant au plan des conditions d'action que de la stabilité.

Les courbes d'activité en fonction du pH mettent en évidence un pH optimal d'action voisin de 6,0 et un optimum secondaire vers pH 8,5-9,0. Ce pourrait être l'indice de la présence de deux enzymes protéolytiques, l'une active à pH neutre, l'autre présentant une activité maximale en milieu alcalin comme l'ont observé Tsugo et Matsuoka (1963). S'il en est ainsi, les différentes souches doivent produire les deux enzymes en proportions relatives à peu près égales, les rapports activité à pH 6,0 / activité à pH 8,5 étant, d'une souche à l'autre, peu différents (1,3 à 1,6) ; deux exceptions peuvent cependant être notées : les souches PL 4 et PN 28, pour lesquelles les valeurs de ces rapports sont respectivement 1,1 et 2,1. Aux pH acides, inférieurs à 5, l'activité devient très faible et il n'est pas relevé sur la plupart des courbes l'existence d'une inflexion susceptible de marquer la présence d'une enzyme ayant une activité maximale

à ces valeurs de pH. On remarque cependant sur les courbes correspondant aux souches PB 1, PL 3, PC 2 et PN 28 une légère inflexion vers pH 4.

L'allure des courbes de stabilité en fonction du pH confirme ces observations et elle met en évidence l'existence de deux zones de stabilité maximale, l'une de pH 5 à 7, l'autre de pH 7 à 9 ; on relève ainsi une assez grande analogie entre les courbes de stabilité et d'activité. Par ailleurs, le comportement des préparations à 37° C, aux pH extrêmes de 4,2 et 10, peut également suggérer la présence de deux enzymes se distinguant par leur stabilité aux pH acides et alcalins ; une enzyme, très rapidement inactivée à pH 10, serait stable à pH 4,2 ; une autre serait stable en milieu alcalin mais non à pH faible.

Le chauffage à 60° C se traduit par une inactivation rapide des préparations. La thermorésistance des enzymes est donc faible et on peut penser que la vitesse initiale de la réaction est maximale à une température supérieure à 45-50° C car, en 2 h, à cette température, il peut y avoir déjà une inactivation importante. Les courbes de stabilité thermique semblent présenter une seule pente et cette allure ne confirme pas l'hypothèse de l'existence de deux enzymes différentes. Observons cependant que les courbes n'ont pas pour origine l'activité relative 100 et il est possible qu'une enzyme représentant une faible fraction de l'activité à pH 6,0 soit très rapidement dénaturée.

Les activités protéolytiques estimées sur la base des teneurs en composés azotés solubles dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100 sont, pour les différentes souches, assez proches de celles estimées par mesure des teneurs en composés solubles dans l'acide trichloracétique à 2 p. 100 ; il apparaît ainsi que *P. caseicum* possède un système protéolytique apte à la libération de composés de faible poids moléculaire.

Finalement, on peut admettre que l'espèce *P. caseicum* cultivée en milieu neutre, produit un système protéolytique exocellulaire actif à pH neutre et doté d'une activité encore importante à pH 8,5. Entre les souches, possédant des aptitudes à la protéolyse plus ou moins grandes, il n'est pas observé de différences marquantes dans les caractères de l'activité enzymatique ; il semble donc qu'elles produisent le même système protéolytique.

Le fractionnement, réalisé sur une culture d'une souche, révèle dans ce système la présence de deux enzymes distinctes. L'enzyme principale, correspondant à près de 80 p. 100 de l'activité mesurée à pH 6, a des caractéristiques d'action et de stabilité qui l'apparentent aux protéases neutres. La fraction mineure a un comportement qui présente une certaine analogie avec celui d'une protéase acide. La production d'une enzyme de type protéase alcaline n'est pas observée dans les conditions de culture et de préparation mises en œuvre.

Une purification des fractions et une caractérisation plus complète des enzymes purifiées restent cependant nécessaires pour une identification de celles-ci. En outre, des essais de production et de fractionnement dans des conditions plus favorables à la stabilité des protéases acides et alcalines doivent être adoptées pour établir le bilan des activités protéolytiques de *P. caseicolum*.

Remerciements

Nous remercions vivement M. Lamberet pour ses suggestions qui nous ont été précieuses dans la présentation de ce travail.

Résumé

Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum* ont été déterminés sur des préparations exocellulaires obtenues à partir de cultures de quinze souches présentant des aptitudes à la protéolyse différentes.

Entre les souches, il n'est pas observé de différences marquantes dans les caractères de l'activité enzymatique et il apparaît qu'elles produisent le même système protéolytique.

Le système, produit en milieu neutre, présente un pH optimal d'action sur la caséine voisin de 6 et un optimum secondaire vers pH 8,5-9,0. Il a deux zones de stabilité maximale, l'une de pH 5 à 7, l'autre de pH 7 à 9. L'allure des courbes d'inactivation en milieu acide et alcalin suggère que le système est complexe.

Un fractionnement, par filtration sur gel de Séphadex G 75, des préparations provenant d'une souche a mis en évidence la présence de deux enzymes. La fraction majeure a un pH optimal d'action voisin de 6 sur la caséine et des caractères de stabilité qui l'apparentent au groupe des protéases neutres. La fraction mineure, de pH optimal 5-5,5 pourrait être une protéase acide.

Summary

The characteristics of the *Penicillium caseicolum* proteolytic system were determined on exocellular fractions obtained from cultures of 15 strains which show different abilities to proteolysis.

No significant differences in the characteristics of the enzymatic activity of the 15 strains were observed and it occurred that they produced the same proteolytic system.

This system, produced in a neutral medium, showed with casein an optimum activity at pH ca. 6 and a secondary optimum pH between pH 8.5 and 9.0. There were two ranges of maximum stability, one for pH 5-7, the other for pH 7-9. The shape of the inactivation curves in acid and alkaline medium suggested that this system was complex.

Partition of the enzymes issued from one strain, by gel filtration using Sephadex G 75, showed the existence of two components. The major fraction had an optimum pH of activity about pH 6 on casein and its stability properties make it belong to the neutral proteases group. The minor fraction, which had an optimum pH of 5-5.5, might be an acid protease.

Reçu pour publication en janvier 1977.

Références Bibliographiques

- ANSON (M. L.) (1938). — The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 22, 79.
- BERGKVIST (R.) (1963 a). — The proteolytic enzymes of *Aspergillus oryzae*. I. Methods for the estimation and isolation of the proteolytic enzymes. *Acta Chem. Scand.*, 17, 1521-1540.
- BERGKVIST (R.) (1963 b). — The proteolytic enzymes of *Aspergillus oryzae*. II. Properties of the proteolytic enzymes. *Acta Chem. Scand.*, 17, 1541-1551.
- DOLEZALEK (J.) (1956). — Etude biochimique de *Penicillium caseicolum*. *Industr. Alim. Agric.*, 73, (7-8), 535-539.
- DOX (A. W.) (1908). — Proteolytic changes in the ripening of Camembert cheese. *U.S. Dept. Agr. Bur. Anim. Ind. Bull.*, 109, 1-24.
- FOLIN (O.) and CIOCALTEU (V.) (1927). — On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *J. Biol. Chem.*, 73, 627-650.
- 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 BERGÈRE (J. L.) (1972). — Le système protéolytique de *Penicillium roqueforti*. I. Conditions de production et nature du système protéolytique. *Le Lait*, 52, (518), 497-514.
- 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, (10), 1323-1332.
- KIKUCHI (T.) and TAKAFUJI (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.
- LENOIR (J.), et CHOISY (C.) (1971). — Aptitude de l'espèce *Penicillium caseicolum* à la production d'enzymes protéolytiques. *Le Lait*, 51, (503-504), 138-157.
- LENOIR (J.), GLENZA (A.), BERGÈRE (J. L.), CERF (O.), CHOISY (C.), DESMAZEAUD (M.) et HERMIER (J.) (1973). — Les facteurs de production du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. *Le Lait*, 53, (525-526), 246-279.

- MAZE (P.) (1905). — Les microbes dans l'industrie fromagère. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 19, 378-403, 481-493.
- MODLER (H.), BRUNNER (J. R.) and STINE (C. M.) (1974). — Extracellular protease of *Penicillium roqueforti*. II. Characterization of a purified enzyme preparation. *J. Dairy Sci.*, 57, (5), 528-534.
- NAKADAI (T.), NASUNO (S.) and IGUCHI (N.) (1973 a). — Purification and properties of alkaline proteinase from *Aspergillus oryzae*. *Agr. Biol. Chem.*, 37, (12), 2685-2694.
- NAKADAI (T.), NASUNO (S.) and IGUCHI (N.) (1973 b). — Purification and properties of neutral proteinase I from *Aspergillus oryzae*. *Agr. Biol. Chem.*, 37, (12), 2695-2701.
- NAKADAI (T.), NASUNO (S.), IGUCHI (N.) (1973 c). — Purification and properties of neutral proteinase II from *Aspergillus oryzae*. *Agr. Biol. Chem.*, 37, (12), 2703-2708.
- PROKS (J.) and CINGROSOVA (K.) (1962). — The influence of *Penicillium camemberti* and *Penicillium caseicolum* on proteolytic and lipolytic changes in the ripening of Camembert cheese type. *C.R. Cong. Int. Lait*, vol. B, 442-448.
- THOM (C.) (1906). — Fungi in cheese ripening : Camembert and Roquefort. *U.S. Dept. Agr. Bur. Anim. Ind. Bull.*, 82, 1-39.
- THOM (C.) (1909). — Camembert cheese problems in the United States. *U.S. Dept. Agr. Bur. Anim. Ind. Bull.*, 115, 1-54.
- TSUGO (T.) and MATSUOKA (H.) (1963). — Studies on the manufacture of semi soft white mould cheese ripened by *Penicillium caseicolum*. II. Qualities of proteases produced by *Penicillium caseicolum*. *Jap. J. Zootechn. Sci.*, 33, (6), 480-483.
- 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, (11-12), 1353-1360.
-