

Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*

II. CARACTERISATION D'UNE PROTEASE NEUTRE

par

J. LENOIR et B. AUBERGER

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

La nature complexe du système protéolytique de *Penicillium caseicolum* a été reconnue par divers auteurs. Tsugo et Matsuoka (1963) et Kikuchi et Takafugi (1971) ont relevé la présence de trois enzymes présentant des pH optimum d'action différents. Dans son travail sur les facteurs de production du système protéolytique de l'espèce, Glenza (1969) s'est livré à une étude préliminaire des enzymes libérées dans le surnageant de culture. Par filtration sur gel et chromatographie d'échange d'ions, au moins trois pics d'activité ont été séparés. L'enzyme correspondant au pic principal, partiellement purifiée, présente les caractères d'une protéase neutre.

Dans une précédente note, nous-mêmes avons relevé dans le système exo-cellulaire produit en milieu neutre, la présence d'au moins deux composants qui ont été séparés par filtration sur gel (Lenoir et Auberge, 1977). Ces enzymes se distinguent notamment par leur stabilité en fonction du pH ; l'une est stable en milieu acide ; l'autre, qui représente la fraction majeure de l'activité, est stable en milieu neutre et faiblement alcalin. La présente étude porte sur cette dernière fraction et elle l'identifie à une protéase neutre.

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel d'étude. Conditions de culture

La souche retenue, PL 21, est cultivée dans les conditions précédemment décrites (Lenoir et Choisy, 1971) : culture en boîtes de

Roux de 1 l contenant 250 ml de milieu Czapek-trypticase pH 6,5, incubation 12 j à 20° C sans agitation.

Le milieu de culture est séparé du mycélium par filtration sur papier et le filtrat est centrifugé pendant 10 mn à 3 000 g à la température de 4° C. Le surnageant constitue la préparation enzymatique brute.

2. Séparation et purification de la fraction majeure

Le schéma de purification adopté comporte une précipitation par le tanin, une filtration sur gel de Séphadex G 75 et une filtration sur gel de Séphadex G 100.

Les deux premières opérations ont été réalisées dans les conditions précisées antérieurement (Lenoir et Auberge, 1977). Après passage sur Séphadex G 75 la fraction correspondant à l'activité principale se retrouve dans un volume de solution d'environ 120 ml.

Les protéines de cette solution sont précipitées par addition de tanin à la concentration finale de 3 p. 1000 et le précipité est dissous dans 7 ml de tampon phosphate 0,01 M, pH 6. La solution obtenue est centrifugée 10 mn à 3 000 g.

Le surnageant est appliqué au sommet d'une colonne de Séphadex G 100 de 40 × 2,5 cm, équilibrée en tampon phosphate 0,01 M, pH 6. Le débit d'éluat est d'environ 10 ml par heure et l'éluat est collecté par fractions de 3 ml. Sur chaque fraction sont déterminées la densité optique à 280 nm et l'activité protéolytique.

Les fractions actives, rassemblées, représentent un volume proche de 35 ml. Cette solution, qui constitue la préparation enzymatique purifiée, contient 800 µg de protéine par ml. Elle est conservée à l'état congelé à -30° C.

3. Contrôle de pureté de la préparation purifiée

3.1. *Electrophorèse en gel de polyacrylamide*

Les essais d'électrophorèse ont été réalisés, avec des prises d'échantillon de 0,05 ml, sur gel de polyacrylamide en tube vertical, à pH 7,2 en tampon phosphate 0,01 M, et à pH 9,5 en tampon glycine-NaOH 0,01 M ; une tension de 80 volts est appliquée pendant 1 h 30 à 2 h 30. Les protéines sont révélées par coloration au noir amide suivie d'un rinçage par immersion dans un bain d'acide acétique à 2 p. 100 pendant 24 h. L'activité protéolytique est mise en évidence par application du gel sur gélose au lait.

3.2. *Chromatographie sur DEAE cellulose*

La chromatographie est réalisée sur une colonne de DEAE cellulose de 40 × 2,5 cm équilibrée à la température ambiante avec une solution de phosphate 0,01 M, pH 6. Un échantillon de préparation

enzymatique purifiée, représentant 15 mg de protéine, est appliqué sur la colonne. L'éluion a été réalisée selon deux méthodes, l'une avec un gradient de phosphate monosodique pH 5,6, de 0,01 à 0,25 M, l'autre avec un gradient de NaCl pH 5,6, de 0 à 0,5 M.

Dans les deux cas le débit est réglé à 25 ml par heure et l'éluat est collecté par fractions de 5 ml. La densité optique de l'éluat est mesurée en continu à 280 et à 260 nm à l'aide d'un densitomètre enregistreur Seive et sur chaque fraction il est procédé à une détermination de l'activité protéolytique.

4. Détermination de l'activité protéolytique

Aux diverses étapes de la purification et dans la plupart des essais de caractérisation de l'enzyme purifiée les activités protéolytiques ont été déterminées sur substrat caséine à 2,5 p.100 en solution citrate 0,02 M, pH 7 dans les conditions déjà décrites (Lenoir et Choisy, 1971). Le mélange de digestion a la composition suivante :

— Substrat	2,5 ml
— Préparation enzymatique	1 ml
— Tampon mixte acétate-borate-phosphate 0,25 M, pH 6	0,5 ml
— Eau distillée	1 ml

Après incubation 1 h à 40° C, le mélange est déféqué par addition d'acide trichloracétique à la concentration finale de 2 p.100 ou de 12 p.100 et les composés azotés solubles sont dosés sur les filtrats par colorimétrie avec le réactif de Folin et Ciocalteu, selon la méthode de Anson (1938).

Pour l'étude de la cinétique de l'action enzymatique, l'influence de la concentration en substrat a été recherchée en utilisant des volumes de solution de caséine oscillant de 0,5 à 4 ml ; l'influence de la quantité d'enzyme a été éprouvée avec des volumes de solution enzymatique compris entre 0,5 et 2 ml ; l'influence du temps de digestion a été déterminée dans l'intervalle 15 mn - 2 h.

L'étude de l'influence du pH de digestion sur l'activité a été réalisée sur trois substrats, la caséine, l'hémoglobine et la sérum-albumine. Les substrats hémoglobine et sérum-albumine ont été préparés dans les mêmes conditions que le substrat caséine, mais sans stérilisation, et la détermination des composés solubles dans les filtrats trichloracétiques a été effectuée simultanément par dosage de la tyrosine avec le réactif de Folin et Ciocalteu et par dosage des groupements NH₂ libres par réaction à la ninhydrine.

5. Etude des caractères de l'activité enzymatique

L'influence du pH sur l'activité a été estimée en amenant le mélange de digestion à une valeur de pH comprise dans l'intervalle

3 - 11 par addition d'un tampon mixte acétate-borate-phosphate 0,25 M réglé au pH convenable.

L'influence de la température a été déterminée par digestion à pH 6 pendant 1 h dans l'intervalle 15-60° C, 7 h dans l'intervalle 5-20° C.

L'aptitude à la libération de composés de poids moléculaire plus ou moins élevé a été recherchée par dosage des composés solubles dans les filtrats trichloracétiques à 2 et à 12 p.100 avec le réactif de Folin et Ciocalteu et par réaction à la ninhydrine. L'aptitude à la libération des acides aminés a été estimée par digestion de la caséine aux pH 6 et 9 pendant 3 h à 40° C, défécation du mélange par l'acide trichloracétique à 12 p.100 puis chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'ions « Chromobeads » type C₂ dans les conditions précisées par Do Ngoc et *al.* (1971).

La stabilité en fonction du pH a été éprouvée en amenant la solution d'enzyme à la valeur de pH voulue dans l'intervalle 2,5 - 11 par addition, à 1 ml de solution, de 1 ml de tampon mixte 0,05 M réglé au pH convenable ; le mélange est conservé 1 h à 40° C ou 24 h à 20° C puis amené à pH 6 et l'activité enzymatique résiduelle est déterminée à pH 6 dans les conditions usuelles.

La stabilité à pH 4,5 et à pH 10 en fonction du temps a été estimée à 37° C sur une préparation diluée au 1/50 et ajustée au pH voulu par addition d'acide sulfurique ou de soude. L'activité résiduelle est déterminée à pH 6,0 et à pH 9,0.

Les essais de stabilité thermique ont été réalisés à la température de 55° C et pH 6,0. La préparation, placée en tube de verre de 5 mm de diamètre, est d'abord préchauffée pendant 2 mn à 40° C puis portée au bain-marie réglé à 55° C pendant un temps variant de 2 mn à 120 mn. Après chauffage, les tubes sont immédiatement refroidis par immersion dans l'eau glacée. L'activité résiduelle est mesurée à pH 6,0 et à pH 9,0.

La stabilité aux différentes températures a été déterminée dans l'intervalle 5-55° C par maintien des préparations à pH 6,0 pendant 1 h (de 15° C à 55° C) ou 7 h (de 5° C à 20° C), l'activité résiduelle étant mesurée à pH 6.

L'action des effecteurs a été recherchée sur la solution d'enzyme diluée au 1/50 en tampon tris-maléate 0,2 M, pH 7,0. Les effecteurs en solution aqueuse sont ajoutés aux concentrations finales de 10, 1 et 0,1 mM. Le mélange est conservé 2 h à 20° C et l'activité résiduelle mesurée à pH 6,0.

6. Etude des caractères physiques de la protéine

Le poids moléculaire de la protéase a été estimé selon la méthode de Whitaker (1963) par filtration sur une colonne de Séphadex G 100

de $89 \times 1,5$ cm équilibrée en tampon phosphate 0,05 M, pH 6,0, le débit de la colonne étant réglé à 5 ml par heure. L'enregistrement des chromatogrammes a été effectué à l'aide d'un ensemble densitomètre collecteur Seive. L'étalonnage de la colonne a été réalisé par passage de diverses protéines pures : sérum-albumine, ovalbumine, trypsine, trypsinogène, α chymotrypsinogène, myoglobine, cytochrome C.

Le spectre d'absorption U.V. a été établi à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DU dans l'intervalle 220-330 nm sur une solution phosphate 0,01 M, pH 6 de concentration en protéine égale à 0,2 mg/ml.

RESULTATS

1. Purification

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

La précipitation par le tanin permet de séparer les protéines des autres composants du milieu de culture avec un rendement en enzymes au moins égal à 90 p. 100 et il a été établi que les caractères de l'activité enzymatique récupérée s'identifient à ceux de l'activité originelle (Lenoir et Auberge, 1977).

La filtration sur Séphadex G 75 (fig. 1) permet d'éliminer près de 90 p. 100 des protéines non enzymatiques et elle sépare, avec un rendement en enzymes voisin de 65 p. 100, deux fractions actives : une fraction I, éluee avec un rapport V_e/V_0 de 1,70, une fraction II, éluee avec un rapport V_e/V_0 de 2,20, ces deux fractions représentant respectivement 20 p. 100 et 80 p. 100 de l'activité éluee mesurée à pH 6,0. Une très faible partie de l'activité (moins de 1 p. 100) se trouve dans la fraction protéique exclue.

La filtration sur Séphadex G 100 de la fraction principale isolée sur G 75 (fig. 2) élimine environ 40 p. 100 de protéines non enzymatiques et le composant actif unique présente des pics d'activité et de teneur en protéine symétriques et concordants. Ce composant représente près de 70 p. 100 de l'activité appliquée sur la colonne.

Le bilan de la purification du système protéolytique produit en milieu neutre se traduit finalement par la séparation de deux composants actifs et par l'obtention d'une préparation purifiée du composant majeur avec un rendement d'activité équivalent à 37 p. 100 de l'activité de la préparation tanin, soit environ 33 p. 100 de l'activité originelle du filtrat de culture et une activité spécifique de 12 200, multipliée par le facteur 7,5 par rapport à celle de la préparation tanin.

TABLEAU 1. — Bilan de la purification de la protéase neutre

Nature des préparations	Volume (en ml)	Activité protéolytique totale (UP)*	Protéines totales en mg	Activité spécifique**	Rendements (p. 100)	
					en protéines	en activité
Précipité tanin remis en solution	50 (2,5 l de milieu de culture)	1 187 500	730	1 630	100	100
Fraction active principale séparée sur G 75	120	618 000	81	7 615	11	52
Fraction active séparée sur G 100	35	440 000	36	12 200	4,5	37

* UP (Unité protéolytique) : nombre de μg de tyrosine libérée par ml de préparation en 1 h à 40° C et à pH 6,0.

** Activité en UP rapportée à 1 mg de protéine.

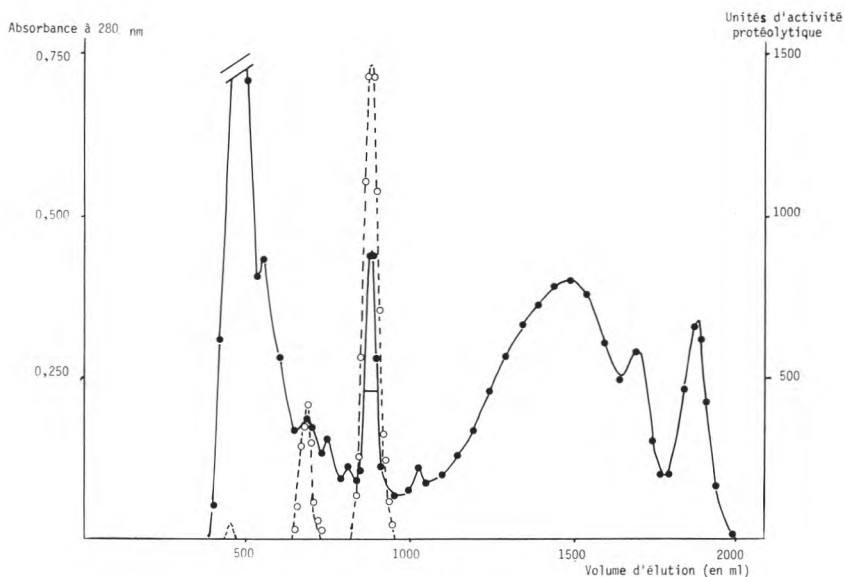


fig. 1

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

Préparation tainin en solution phosphate 0,1 M, pH 6,0.

Colonne de 85×5 cm.

Charge 50 ml.

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

Vitesse d'élution 40 ml/h, fractions de 10 ml.

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

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

2. Homogénéité et caractères de la protéine

Les diagrammes d'électrophorèse en gel de polyacrylamide révèlent la présence d'une bande principale, seule active, et de deux bandes protéiques mineures à peine marquées.

La chromatographie sur DEAE cellulose (fig. 3) confirme la présence d'une seule enzyme associée à une faible proportion de protéine non active.

Le poids moléculaire de l'enzyme peut être estimé à 20 000 daltons (fig. 4). Le spectre d'absorption en ultra-violet présente un maximum à 278 nm et un minimum à 250 nm. Le comportement électrophorétique de la protéine révèle un pHi inférieur à 5,5.

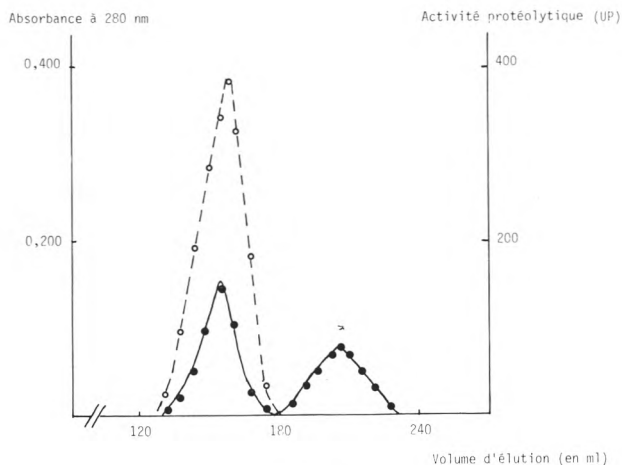


fig. 2

Diagramme de filtration sur gel de Séphadex G 100 de la fraction II séparée sur Séphadex G 75

Préparation tannin de la fraction en solution phosphate 0,01 M, pH 6,0.

Colonne de $40 \times 2,5$ cm.

Charge 7 ml.

Elution par tampon phosphate 0,01 M, pH 6,0.

Vitesse élution 10 ml/h, fractions de 3 ml.

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

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

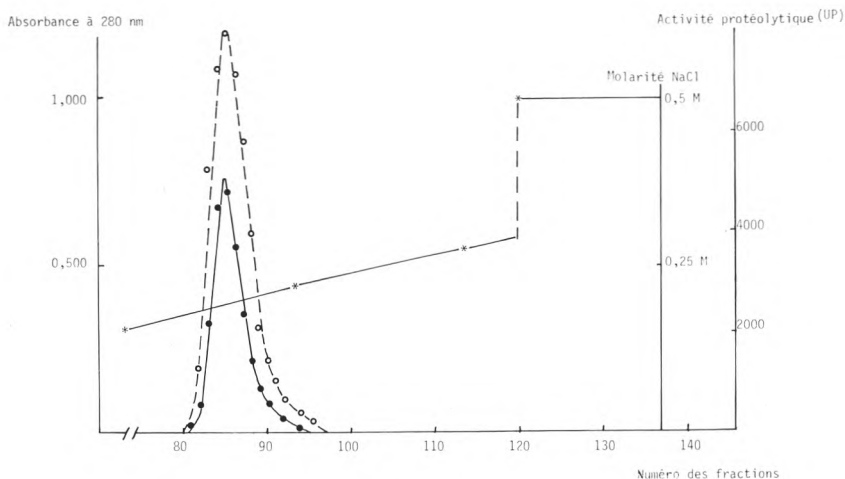


fig. 3

Diagramme de chromatographie sur DEAE cellulose de la préparation enzymatique purifiée

Colonne de $40 \times 2,5$ cm.

Tampon de départ : phosphate 0,01 M, pH 6,0.

Elution avec un gradient de NaCl de 0 à 0,5 M.

Débit 25 ml/h, fractions de 5 ml.

Echantillon : 15 mg de protéines en solution dans 25 ml de tampon.

●—● Absorbance à 280 nm.

○—○ Activité protéolytique mesurée à pH 6,0.

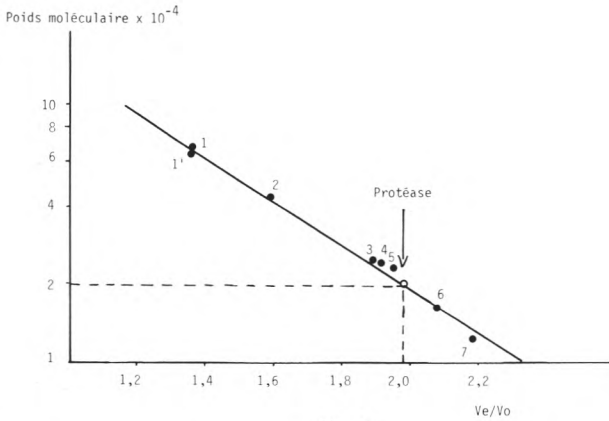


fig. 4

Détermination du poids moléculaire par filtration sur gel de Séphadex G 100

Colonne 90 × 1,5 cm : débit 15 ml/h, fractions de 2,5 ml.
Elution en phosphate 0,05 M, pH 6,0.

- | | |
|----------------------------------|---------------------------------------------|
| 1. Sérum albumine (N.B.C.). | 4. α chymotrypsinogène (Boehringer). |
| 1'. Sérum albumine (Boehringer). | 5. Trypsine (N.B.C.). |
| 2. Albumine d'œuf (Boehringer). | 6. Myoglobine de cheval (N.B.C.). |
| 3. Trypsinogène (Merck). | 7. Cytochrome C (Boehringer). |

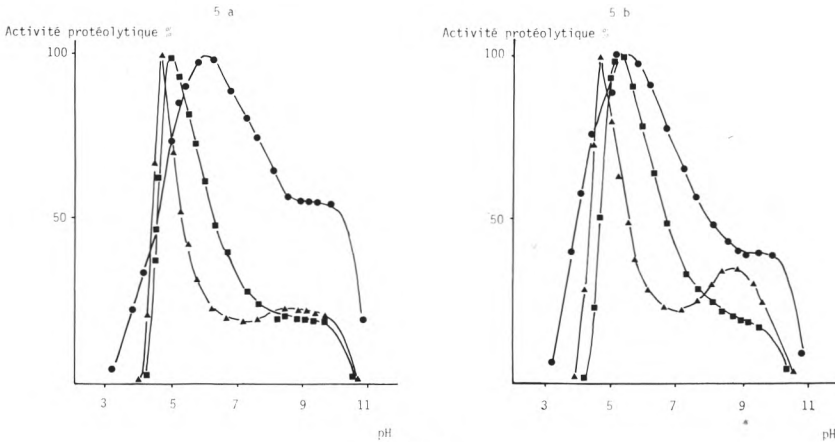


fig. 5

Influence du pH sur l'activité de la protéase neutre

— 5 a : activité estimée par dosage de la tyrosine avec le réactif de Folin et Ciocalteu.

— 5 b : activité estimée par dosage des groupements NH_2 libres par réaction à la ninhydrine.

- ▲ —▲ Substrat sérum albumine.
- —■ Substrat hémoglobine.
- —● Substrat caséine.

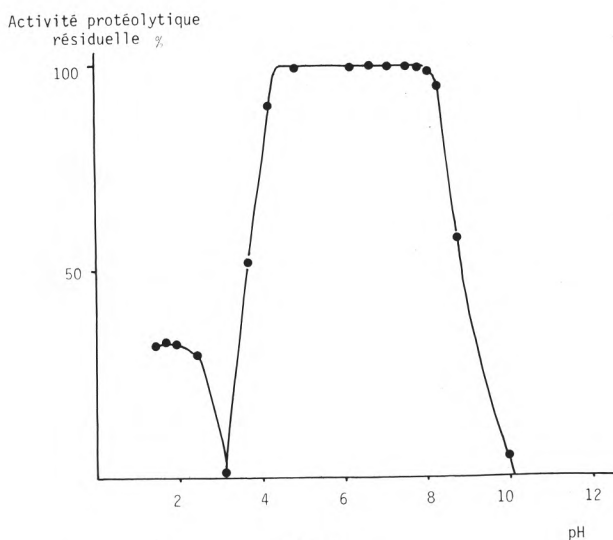


fig. 6

Influence du pH sur la stabilité de la protéase neutre

- Incubation à 40° C pendant 1 h en tampon mixte acétate-phosphate-borate 0,05 M.
- Activité résiduelle mesurée à pH 6,0, exprimée en p. 100 de l'activité d'un témoin conservé à 4° C et pH 6,0.

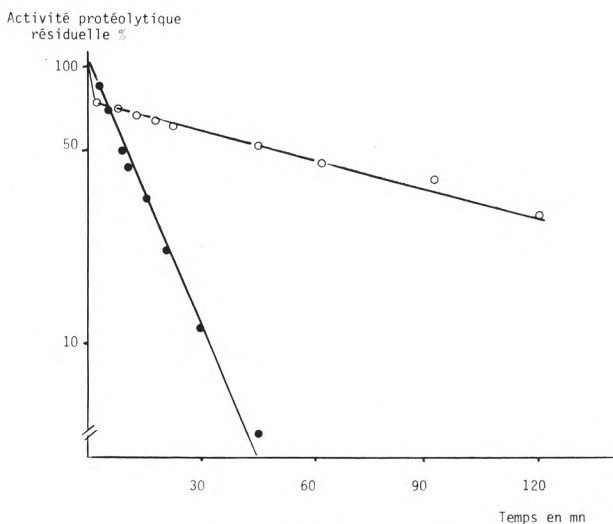


fig. 7

Stabilité de la protéase neutre aux pH 4,5 et 10

- Incubation aux pH 4,5 et 10, à 37° C pendant des temps variant de 0 mn à 120 mn.
 - Activité résiduelle mesurée à pH 6,0, exprimée en p. 100 de l'activité d'un témoin conservé à 4° C et pH 6,0.
- — ● pH 4,5.
○ — ○ pH 10.

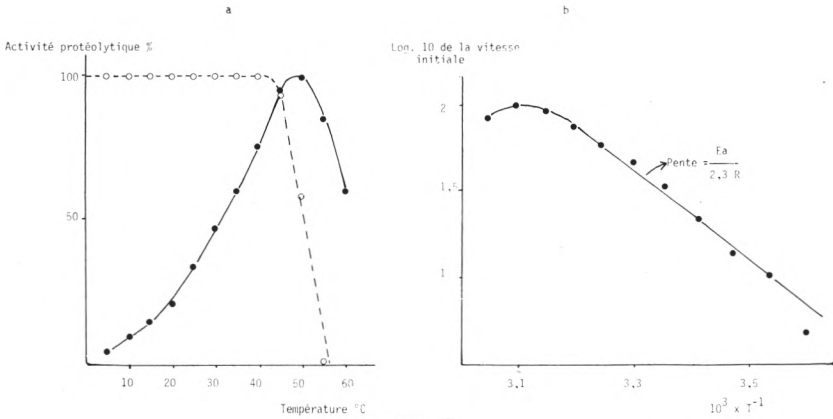


fig. 8

Influence de la température sur l'activité et la stabilité de la protéase neutre

- a) Influence sur l'activité ●——●
- Influence sur la stabilité ○——○
- b) Représentation selon Arrhenius de l'influence de la température sur la vitesse initiale d'hydrolyse de la caséine.
 R = constante des gaz parfaits.
 Ea = énergie apparente d'activation.
 Activités protéolytiques mesurées à pH 6,0.

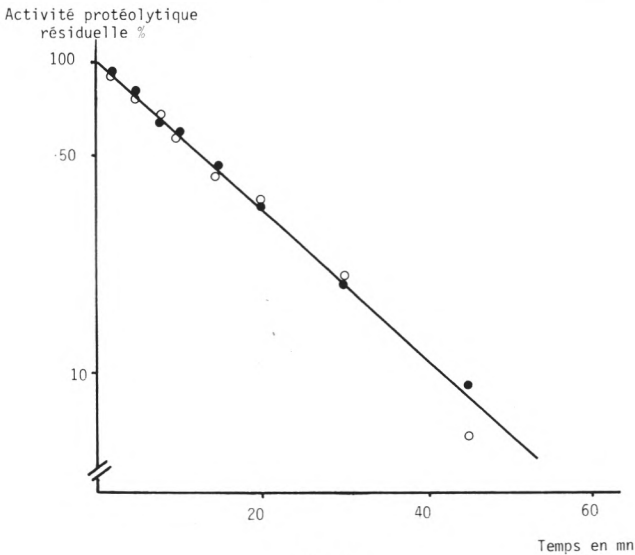


fig. 9

Inactivation thermique de la protéase neutre

- Incubation à 55° C et pH 6,0 en tampon phosphate 0,01 M.
- Activité résiduelle mesurée à pH 6,0 (●——●) et pH 9,0 (○——○).

3. Caractères de l'activité enzymatique

3.1. Cinétique de l'action enzymatique

La vitesse maximale de la réaction enzymatique est obtenue avec une concentration en caséine de 12,5 g/l pour une quantité d'enzyme correspondant à 2 μg d'azote/ml de mélange réactionnel et la valeur de K_m peut être estimée à 1,25 g/l. L'activité protéolytique est proportionnelle à la concentration en enzyme, dans l'intervalle correspondant à 1-4 μg d'azote/ml de mélange réactionnel, et au temps de digestion, dans l'intervalle 15-75 mn.

3.2. Influence du pH

L'influence du pH sur l'activité de l'enzyme est représentée sur la figure 5. L'allure des courbes varie avec la nature du substrat (fig. 5 a). Le pH optimal d'action, voisin de 6,0 avec la caséine, est proche de 5 avec l'hémoglobine, de 4,6 avec la sérum-albumine. En outre, l'optimum secondaire, observé à pH 8,5-9,5, est plus ou moins marqué ; il est particulièrement net avec la sérum-albumine. La méthode d'estimation de la quantité de composés azotés solubles, dosage de la tyrosine ou réaction à la ninhydrine, a également une certaine incidence. Ainsi, sur substrat caséine (fig. 5 b) le pH optimal d'action apparaît proche de 5,5 lorsque le dosage des composés solubles est réalisé par réaction à la ninhydrine, en outre la valeur relative de l'optimum secondaire est dans ces conditions également différente.

L'enzyme est stable à 40° C pendant 1 h dans l'intervalle de pH 6-9 (fig. 6). Aux pH 4,5 et 10 l'activité résiduelle est égale à 50 p. 100 de l'activité initiale. A pH 4,0, l'inactivation est totale ; en revanche, au-dessous de pH 4, dans l'intervalle 2,3-3,5, une activité résiduelle notable est encore observée. Les courbes des activités résiduelles mesurées à pH 6,0 et à pH 9,0 présentent la même allure.

L'inactivation de l'enzyme en fonction du temps aux valeurs de pH 4,5 et 10, à 37° C, est concrétisée par les courbes de la figure 7. A pH 4,5 on obtient une droite ; à pH 10, la courbe présente deux pentes, la première très forte est l'indice d'une dénaturation quasi-immédiate, l'autre très faible, la marque d'une grande stabilité.

3.3 Influence de la température

La température optimale d'action est proche de 50° C. Dans l'intervalle 25-45° C le Q_{10} est voisin de 1,6. Dans l'intervalle 5-20° C sa valeur est proche de 2,5. A 5° C, l'activité devient très faible, elle représente seulement 5 p. 100 de l'activité maximale. L'inactivation thermique en 1 h à pH 6,0 est observée aux températures supérieures à 40° C, elle est importante à 50° C et totale à 55° C (fig. 8 a). La courbe traduisant l'influence de la température sur l'activité enzymatique selon la représentation d'Arrhenius (fig. 8 b) permet d'estimer la valeur de l'énergie apparente d'activation à 12 Kcal-mole⁻¹.

A la température de 55° C, l'inactivation en fonction du temps se traduit, en coordonnées semi-logarithmiques, par une courbe à une seule pente, le temps d'inactivation à 90 p. 100 est voisin de 40 mn. Les courbes représentant les activités résiduelles à pH 6,0 et à pH 9,0 se superposent (fig. 9).

4. Mode d'action

4.1. Nature des produits formés

Une traduction approchée du poids moléculaire des produits d'hydrolyse peut être obtenue par une comparaison des résultats des dosages des composés solubles en acide trichloracétique à 2 p. 100 et en acide trichloracétique à 12 p. 100 (rapport Tyr 2 / Tyr 12). Une valeur du rapport proche de 1 est l'indice de la présence dominante de peptides de faible poids moléculaire, solubles en acide trichloracétique à 12 p. 100 ; une valeur élevée est la marque de la présence d'une proportion importante de composés de poids moléculaire élevé, insolubles en acide trichloracétique à 12 p. 100. Avec le substrat caséine le rapport tyr 2 / tyr 12 est voisin de 2 dans l'intervalle de pH 4,5-9,0 ; proche de 2,5 entre pH 3 et 4 et 9-10. Il y aurait donc formation d'une proportion notable de composés de poids moléculaire élevé, proportion qui tend à croître aux pH extrêmes.

Avec l'hémoglobine comme substrat les valeurs du rapport tyr 2 / tyr 12 sont assez sensiblement différentes. Voisines de 2 dans la zone du pH optimal, elles sont proches de 1 dans l'intervalle de pH 6-9. Les produits formés en milieu neutre à partir de l'hémoglobine seraient donc uniquement des composés de faible poids moléculaire.

A partir de la caséine comme substrat, même après des temps de digestion longs se traduisant par une formation importante de composés solubles en acide trichloracétique à 12 p. 100, il n'y a aucune libération d'acides aminés.

4.2. Influence du substrat

Il a déjà été noté que la nature du substrat influe sur le pH optimal d'action et le poids moléculaire des produits formés. En outre, la vitesse d'hydrolyse des substrats protéiques est aussi très différente. Ainsi, au pH optimal d'action, les vitesses relatives de dégradation sont les suivantes :

— sérum-albumine 1, hémoglobine 1,8, caséine 5,8 sur la base des teneurs en tyrosine libérée ;

— sérum-albumine 1, hémoglobine 2, caséine 3,6 sur la base des teneurs en groupements NH_2 libérés.

Par ailleurs, l'enzyme n'a qu'une très faible action coagulante sur la caséine et elle est inactive sur le trypsinogène de bœuf.

5. Influence des effecteurs

5.1. Influence des ions métalliques et des agents chélateurs

Les résultats obtenus après action de divers cations sont regroupés dans le tableau 2. La plupart des métaux sont sans action sur l'activité de l'enzyme. Seuls le cobalt, à la concentration de 0,1 mM, et le cuivre, à la concentration de 10 mM, sont faiblement activateurs. Le mercure au taux de 1 mM et le cadmium à la concentration de 0,1 mM sont inhibiteurs.

Parmi les agents chélateurs étudiés, seuls l'EDTA et l'O-phénantroline exercent un effet inhibiteur à la concentration de 1 mM (tab. 3).

TABLEAU 2

Influence des métaux sur l'activité de la protéase neutre de *P. caseicolum*
(activité protéolytique résiduelle p. 100)

	Concentrations		
	0,1 mM	1 mM	10 mM
Ca ⁺⁺	104	100	99
Fe ⁺⁺	103	95	87
Fe ⁺⁺⁺	103	99	100
Cu ⁺⁺	102	100	130
Mn ⁺⁺	100	95	100
Zn ⁺⁺	107	103	99
Co ⁺⁺	115	122	152
Sn ⁺⁺	100	100	—
Pb ⁺⁺	102	100	100
Mg ⁺⁺	108	100	100
Ag ⁺⁺	100	86	84
Cd ⁺⁺	73	51	40
Hg ⁺⁺	100	65	—
K ⁺	103	102	100
Na ⁺	102	100	95
Al ⁺⁺⁺	103	100	100

— Incubation 2 h à 20° C du mélange enzyme-métal en tampon tris-maléate 0,2 M, pH 7,0.

— Activité résiduelle mesurée à pH 6,0 ; exprimée en p. 100 d'un témoin conservé dans les mêmes conditions.

TABLEAU 3

Influence des agents chélateurs sur l'activité de la protéase neutre
de *P. caseicum*

(Activité protéolytique résiduelle exprimée en p. 100)

	Concentrations		
	0,1 mM	1 mM	10 mM
EDTA	29	26	4
8 Quinolinol	97	91	—
Diéthylthiocarbamate	100	97	—
Ferrocyanure de potassium	93	81	43
Oxalate de sodium	96	98	98
1,10-phénantroline	92	12	—
Citrate de sodium	100	100	100

— Incubation 2 h à 20° C du mélange enzyme-chélateur en tampon tris-maléate 0,2 M, pH 7,0.

— Activité résiduelle mesurée à pH 6,0 ; exprimée en p. 100 d'un témoin conservé dans les mêmes conditions.

Après inhibition par l'EDTA, à la concentration de 2 mM, le cobalt, le cuivre, le zinc, le fer ferreux, le manganèse sont aptes à réactiver l'enzyme, les deux premiers totalement, les autres partiellement (tab. 4).

5.2. Influence des réactifs spécifiques

Les réactifs du groupe SH, qui sont des inhibiteurs des protéases de type papaine, et les agents réducteurs, n'exercent aucune action ou n'ont pas un effet notable sur l'activité de l'enzyme. Le DFP, réactif des résidus sérine, et le 1-fluoro-2-4-dinitrobenzène sont inactifs (tab. 5).

DISCUSSION

La protéase principale, produite par *P. caseicum* cultivé en milieu neutre, a été isolée et purifiée par filtration sur gel de Séphadex. La préparation obtenue apparaît à l'électrophorèse et par chromatographie sur DEAE cellulose légèrement contaminée par une

TABLEAU 4

Réactivation de la protéase neutre de *P. caseicolum* en présence de cations, après inhibition par l'EDTA

		Activité relative	p. 100 de réactivation*
Témoin		100	
Inhibition par EDTA (2 mM)		15	
Cations réactivateurs à 1 mM	Ca ⁺⁺	22	8
	Fe ⁺⁺	15	0
	Fe ⁺⁺⁺	12	0
	Cu ⁺⁺	79	75
	Mn ⁺⁺	53	48
	Zn ⁺⁺	100	100
	Co ⁺⁺	125	129
	Mg ⁺⁺	18	4
Cations réactivateurs à 10 mM	Ca ⁺⁺	50	41
	Fe ⁺⁺	82	79
	Fe ⁺⁺⁺	37	26
	Cu ⁺⁺	127	132
	Mn ⁺⁺	71	66
	Zn ⁺⁺	88	86
	Co ⁺⁺	122	126
	Mg ⁺⁺	25	12

— Incubation enzyme-EDTA, 1 h à 20° C, suivie d'une réactivation en présence des cations pendant 1 h à la même température.

— Activités déterminées à pH 6,0 exprimées en p. 100 du témoin.

$$* \text{ Réactivation en p. 100} = \frac{(\text{Essai Métal} - \text{Essai EDTA})}{\text{Essai Témoin} - \text{Essai EDTA}} \times 100.$$

petite quantité de protéine étrangère. Cependant cette partie contaminante n'a aucune action protéolytique et l'allure des courbes d'inactivation thermique confirme que la préparation étudiée est formée d'une seule enzyme.

Par ses propriétés, notamment son inhibition par l'EDTA, cette enzyme s'identifie à une protéase neutre du groupe des métallo-

TABLEAU 5

Influence des effecteurs spécifiques sur l'activité de la protéase neutre de *P. caseicolum*

(Activité protéolytique résiduelle exprimée en p. 100)

	Concentrations		
	0,1 mM	1 mM	10 mM
P-CMB	100	100	—
Acide iodo-acétique	100	100	100
NEM	100	100	100
Anhydride arsénieux	100	100	—
Mercaptoéthanol	99	100	100
Thiosulfate de sodium	99	98	99
Cystéine HCl	96	93	29
Acide ascorbique	96	80	82
Thioglycolate de sodium	96	86	25
DFP	100	100	100
1-fluoro-2,4 dinitrobenzène	100	100	—

— Incubation 2 h à 20° C du mélange enzyme-effecteur en tampon tris-maléate 0,2 M, pH 7,0.

— Activité résiduelle mesurée à pH 6,0 exprimée en p. 100 d'un témoin conservé dans les mêmes conditions.

protéases. Elle peut être comparée aux enzymes de ce type qui ont déjà été caractérisées chez d'autres moisissures du genre *Penicillium*, exemple la protéase II de *Penicillium roqueforti* identifiée par Gripon et Hermier (1974), ou du genre *Aspergillus*, exemples les protéases neutres I et II de *A. sojae* étudiées par Sekine (1972-1973) et de *A. oryzae* purifiées par Nakadai et *al.* (1973).

Le poids moléculaire de l'enzyme, proche de 20 000, est le même que celui de la protéase II de *P. roqueforti* et de la protéase II de *A. oryzae*. Il est nettement plus faible que celui des protéases I de *A. sojae* et de *A. oryzae* qui est voisin de 41 000.

La protéase neutre de *P. caseicolum* a un pH optimal d'action sur la caséine plus faible que celui de la plupart des enzymes de ce type, lequel est généralement voisin de 7 (Nakadai et *al.*, 1972 ; Sekine, 1972 ; Desmazeud et Hermier, 1968). De ce point de vue elle s'apparente à la protéase II de *P. roqueforti* et à la protéase II de *A. oryzae*.

Ces deux enzymes ont elles aussi un pH optimal voisin de 5,5-6,0, une activité encore importante à pH 8,5-9,0 et une zone de stabilité en fonction du pH relativement large. L'allure de la courbe concrétisant l'influence du pH sur l'activité de la protéase de *P. caseicolum* met en évidence un optimum secondaire au voisinage de pH 9. La présence d'un tel optimum observée sur les préparations brutes (Lenoir et Auberger, 1977) ne peut donc être interprétée comme un indice de production d'une protéase ayant un pH optimal d'action en milieu alcalin.

La stabilité thermique de la protéase neutre est faible, comme celle de la protéase I de *A. oryzae* et de nombreuses métallo-protéases. Son inactivation thermique devient sensible au-dessus de 40° C et le taux d'inactivation de 90 p.100 à 55° C est atteint en un temps proche de 40 mn. Cette enzyme est donc beaucoup plus sensible à la chaleur que ne le sont la protéase II de *A. oryzae*, stable jusqu'à 90° C, ou la protéase II de *P. roqueforti* qui, d'après les données publiées par Gripon et Hermier (1974), présente à 55° C un taux d'inactivation de 90 p.100 après un temps voisin de 80 mn. Par ailleurs, sur la courbe d'inactivation de l'enzyme de *P. caseicolum* en fonction de la température, il n'est pas observé, comme pour la protéase II de *P. roqueforti*, un minimum puis une augmentation de stabilité lorsque la température s'élève.

L'étude de la spécificité d'action de l'enzyme, comportant notamment l'hydrolyse des peptides de synthèse spécifiques des métallo-protéases et la recherche des liaisons rompues sur la chaîne B de l'insuline, est actuellement en cours. Le mode d'action sur la caséine met cependant en évidence le caractère endopeptidasique de l'enzyme et l'absence d'activité carboxy ou amino-peptidasique ; elle paraît ainsi proche des deux protéases neutres d'*Aspergillus oryzae* (Nakadai et al., 1973 b et c).

La vitesse d'hydrolyse de la caséine est beaucoup plus grande que celle de l'hémoglobine. On retrouve un caractère de la protéase II de *P. roqueforti* et on observe pour les deux enzymes des rapports d'activité spécifique sur ces deux substrats qui sont du même ordre de grandeur.

L'inhibition par l'EDTA, caractéristique des métallo-protéases, est très nette et il n'est pas nécessaire de faire agir l'agent chélatant à pH faible pour obtenir une inhibition totale, comme il est observé avec les protéases II de *P. roqueforti* et de *A. oryzae*. Certains cations divalents réactivent l'enzyme inhibée par action de l'EDTA. Les plus efficaces sont le cobalt et le cuivre. Il y a là encore un caractère qui est commun avec la protéase II de *P. roqueforti* et qui la distingue de nombreuses métallo-protéases pour lesquelles le zinc est l'ion métallique assurant la réactivation la plus forte. Le cobalt et, dans une moindre mesure, le cuivre sont des activateurs de l'enzyme. Le degré d'activation dû au cobalt est toutefois sensiblement plus faible

que celui observé par Gripon et Hermier (1974) sur la protéase II de *P. roqueforti*.

Il apparaît finalement que la protéase principale de *P. caseicolum* produite en milieu neutre est une endopeptidase appartenant au groupe des métallo-protéases. Par divers caractères elle se rapproche de la protéase II de *P. roqueforti* et de la protéase II de *A. oryzae* mais elle s'en distingue cependant par une moindre stabilité thermique. La connaissance de la spécificité d'action doit permettre une identification complète de l'enzyme et ainsi une meilleure comparaison entre les métallo-protéases produites par les deux espèces de *Penicillium* utilisées en fromagerie.

Remerciements

Nous remercions vivement M. Do Ngoc pour sa collaboration dans la recherche de l'aptitude à la libération des acides aminés.

Résumé

Le composant majeur du système protéolytique exocellulaire produit par *Penicillium caseicolum* en milieu neutre a été purifié par précipitation au tanin et filtration sur gels de Séphadex G 75 et G 100 ; le rendement en activité est de 33 p. 100.

Le poids moléculaire de l'enzyme est d'environ 20 000 daltons. Son pH optimal d'action est voisin de 6,0 sur la caséine, de 5,0 sur l'hémoglobine. La température optimale d'action est proche de 50° C et l'énergie apparente d'activation est de 12 Kcal mole⁻¹. La stabilité thermique de l'enzyme est faible : au pH de 6,0, après 40 mn à 55° C, l'activité est réduite à 10 p. 100 de sa valeur initiale. L'hydrolyse du substrat caséine est beaucoup plus rapide que celle de l'hémoglobine ou de la sérum albumine et il y a seulement libération de peptides.

L'EDTA et l'O-phénanthroline exercent un effet inhibiteur à la concentration de 1 mM. Le cobalt et le cuivre réactivent l'enzyme inhibée par l'EDTA. Le DFP, les réactifs des groupes SH et le 1-fluoro 2, 4-dinitrobenzène sont inactifs.

Par ses propriétés, l'enzyme s'identifie à une endopeptidase appartenant au groupe des métallo-protéases. Elle est proche de la protéase II de *Penicillium roqueforti* et de la protéase II de *Aspergillus oryzae*.

Summary

The main component of the exocellular proteolytic system, which was produced by *Penicillium caseicolum* on a neutral medium, has

been purified by means of tannin precipitations, plus Sephadex G 75 and G 100 gel-filtration. 33 p. 100 of the initial activity were recovered.

The enzyme molecular weight was about 20 000 daltons. The optimum pH of activity on casein was next to pH 6,0 and to 5,0 on hemoglobin. The optimum temperature of activity was near 50° C. Its activation energy reached 12 Kcal mole⁻¹. The enzyme heat stability was weak: at pH 6,0, after 40 mn at the temperature of 55° C, the activity was reduced to 10 p. 100 of its initial value. The hydrolysis of a casein substrate was much faster than those of hemoglobin or serum-albumin and only peptides were released.

EDTA and O-phenantroline had an inhibitor effect at 1 mM of concentration. The enzyme inhibition by EDTA was removed by cobalt and copper. DFP, reagents of the SH - groups, and 1-fluoro-2,4 dinitrobenzene were not active.

Through these properties, the enzyme could be identified to an endopeptidase which belongs to the metalloprotease group. Its properties were about ones of the protease II of *Penicillium roqueforti* and of protease II of *Aspergillus oryzae*.

Reçu pour publication en avril 1977.

Références bibliographiques

- ANSON (M. L.) (1938). — The estimation of pepsin, trypsin, papaïn and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 22, 79.
- DESMAZEAUD (M.), HERMIER (J.) (1968). — Isolement, purification et propriétés d'une protéase exocellulaire de *Micrococcus caseolyticus*. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, 8, 565-577.
- DO NGOC (M.), LENOIR (J.), CHOISY (C.) (1971). — Les acides aminés libres des fromages affinés de Camembert, Saint-Paulin et Gruyère de Comté. *Rev. Lait. Frse.*, 288, 447-462.
- FOLIN (O.), CIOCALTEU (V.) (1927). — On tyrosine and tryptophane determination in protein. *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, Univ. Caen.
- GRIPON (J. C.), 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.), TAKAFUJI (S.) (1971). — Studies on the microorganisms of Camembert cheese. II. Experiments on protease of Camembert cheese mould. *Jap. J. Zootechn. Sci.*, 42 (5), 205-209.
- LENOIR (J.), CHOISY (C.) (1971). — Aptitude de l'espèce *Penicillium caseicolum* à la production d'enzymes protéolytiques. *Le Lait*, 51 (503-504), 138-157.
- LENOIR (J.), AUBERGER (B.) (1977). — Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. I. Pré-caractérisation de l'activité exocellulaire. *Le Lait*, 57 (563-564), 164-183.

- NAKADAI (T.), NASUNO (S.), IGUCHI (N.) (1973 a). — Purification and properties of alkaline proteinase from *Aspergillus oryzae*. *Agr. Biol. Chem.*, 37 (12), 2685-2694.
- NAKADAI (T.), NASUNO (S.), 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.
- SEKINE (H.) (1972 a). — Neutral proteinases I and II of *Aspergillus sojae* in homogeneous form. *Agr. Biol. Chem.*, 36, 198-206.
- SEKINE (H.), (1972 b). — Neutral proteinases I and II of *Aspergillus sojae*. Some enzymatic properties. *Agr. Biol. Chem.*, 36, 207-216.
- SEKINE (H.) (1972 c). — Some properties of neutral proteinases I and II of *Aspergillus sojae* as zinc-containing metalloenzyme. *Agr. Biol. Chem.*, 36, 2143-2150.
- SEKINE (H.) (1973). — Neutral proteinases I and II of *Aspergillus sojae*. Preparation of water - insoluble enzyme. *Agr. Biol. Chem.*, 37, 437-440.
- TSUGO (T.), MATSUOKA (H.) (1963). — Studies on the manufacture of semi soft white mould cheese ripened by *Penicillium caseicolum*. II-Qualities of proteases product by *Penicillium caseicolum*. *Jap. J. Zootechn. Sci.*, 33 (6), 480-483.
- WITAKER (J. R.) (1963). — Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on Sephadex. *Anal. Chem.*, 35 (12), 1950-1953.
-