

# **Influence de la nature et du taux d'inactivation sur le dosage de la chymosine et de la pepsine bovine par électro immuno-diffusion**

par

Pascaline GARNOT\* et D. MOLLE\*

## **Résumé**

1. Au cours de ces dernières années des méthodes immunologiques ont été proposées pour doser l'enzyme actif dans les extraits coagulants utilisés en fromagerie et dans le caillé ou le fromage. Cependant, les conséquences d'une perte d'activité sur les résultats obtenus par ces méthodes étaient mal précisées.

2. Quatre types d'inactivation (pH, urée, agitation, température) ont été utilisées. L'aptitude à se conjuguer aux anticorps était évaluée par électro immuno-diffusion. L'activité enzymatique était mesurée par détermination du temps de floculation d'une solution de caséine K. Les deux enzymes constitutifs de la présure de veau, chymosine et pepsine, ont été étudiés.

3. Les résultats montrent des différences très nettes selon la nature de l'enzyme et le type d'inactivation subie : l'agitation modifie pas ou peu la réaction antigène-anticorps. A l'opposé la température altère dans des proportions identiques, ou presque pour la pepsine, le site actif et les déterminants antigéniques. L'effet de l'urée et du pH est également identique ou presque sur les deux sites dans le cas de la chymosine. Dans le cas de la pepsine la réaction immunologique n'est pas ou très peu affectée même après une inactivation quasi-totale.

---

\* Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire de Recherches de Technologie Laitière, 65, rue de Saint-Brieuc - 35042 Rennes cedex (France).

4. Les modifications de structure entraînant une inactivation de l'enzyme n'ont pas forcément un effet identique sur l'aptitude à se conjuguer aux anticorps. La chymosine a une structure nettement plus sensible aux agents testés que ce soit d'un point de vue enzymatique ou immunologique. Il importe donc d'être très prudent dans l'utilisation d'une méthode immunologique pour doser une quantité d'enzyme actif. Les risques de surestimation sont importants, surtout avec la pepsine, s'il y a une inactivation même partielle.

*Titre abrégé*

Electro immuno-diffusion et inactivation enzymatique.

*Mots clés*

Immunologie - Electro immuno-diffusion - Inactivation - pH - Urée - Température - Agitation - Chymosine - Pepsine bovine.

## Summary

### INFLUENCE OF TYPE AND DEGREE OF INACTIVATION ON CHYMOSIN AND BOVINE PEPSIN QUANTIFICATION BY ROCKET IMMUNOELECTROPHORESIS

1. Last years, immunological methods have been proposed to titrate active enzyme in clotting extracts used for cheese-making, or in curd or cheese. However the consequences of loss of activity on results thus obtained were unknown.

2. Four types of inactivation were used : shaking, urea, temperature, pH. The experimental parameters were chosen in order to get samples having a range of residual activities between 0 and 100 % of the reference solution. For chymosin it was : a) shaking in a rotating tube (30 rpm) for 5,15 and 30 min at pH 5.5 at 20° C; b) urea 6 M, pH 5.5 at 35° C for 10 and 30 min and 1,2 and 3 h; c) 3, 7, 24 and 48 h at 50° C and 7 h at 55° C, at pH 5.5; d) 2, 4, 6, 8, 15 and 24 h at pH 7.0 at 35° C. For bovine pepsin: a) shaking in a rotating tube at pH 5.5 at 20° C for 6, 16, 24 h; b) urea 7.2 M, pH 5.5, at 35° C for 2, 5, 16 and 24 h; c) 6, 24 and 48 h at 50° C and 6, 24 h at 55° C; d) 6 and 24 h at pH 7.0 and 6, 24 and 48 h at pH 6.5 at 35° C.

The capacity for combining antibodies was estimated by rocket immunoelectrophoresis. Enzyme activity was measured by determining the flocculation time of a K casein solution.

3. Results show net differences according to the enzyme and the type of inactivation : shaking does not change or only slightly the extent of antigene-antibody combination. Contrariwise, temperature changes active site and combining sites in the same extent or almost the same for pepsin. Effect of pH and urea is also identical or almost on both types of sites for chymosin. For pepsin, immuno-

logical reaction is not or very slightly affected even after a complete inactivation.

4. Structural modifications producing inactivation of the enzyme do not have necessarily the same effect on the capacity for combining with antibodies. Chymosin has a more sensitive structure from an enzymatic point of view as well as from an immunological one. Therefore it is necessary to be very careful when using an immunological method to titrate active enzyme. Risks of over-estimate are important, especially with pepsin, in case of inactivation even if partial.

#### Run title

Rocket immunoelectrophoresis and enzyme inactivation.

#### Key words

Immunology - Rocket immunoelectrophoresis - Inactivation - pH - Urea - Temperature - Shaking - Chymosin - Bovine pepsin.

## INTRODUCTION

Indispensable au développement de l'industrie fromagère, la maîtrise des différentes étapes de la transformation du lait, passe nécessairement par une bonne connaissance de la matière première (le lait) et des agents utilisés (les levains et l'enzyme coagulant). Il est donc essentiel tant pour des raisons technologiques que commerciales de pouvoir identifier et doser les enzymes contenus dans les préparations commerciales de présure. Par ailleurs, l'enzyme coagulant est également un agent d'affinage primordial (Gripon *et al.*, 1975 ; Visser, 1977) et il est nécessaire de pouvoir en déterminer la concentration résiduelle active dans le caillé et le fromage afin d'appréhender l'influence d'un certain nombre de paramètres technologiques. Parallèlement il se pose un problème de contrôle pour les fromages d'appellation d'origine ou de certains pays, qui ne peuvent être fabriqués qu'avec la présure traditionnelle.

Dans un cas comme dans l'autre, l'immunologie grâce à la spécificité de la réaction antigène-anticorps, apparaît être une solution extrêmement séduisante aux problèmes posés. Ainsi Rothe *et al.* (1976) ont utilisé la méthode d'électro-immuno-diffusion pour analyser quantitativement et qualitativement des présures commerciales. Matheson (1981) a adapté une technique de diffusion en gel avec et sans anticorps pour mesurer l'activité résiduelle dans le fromage. Quelques remarques faites par ces auteurs semblaient cependant suggérer que l'enzyme inactivé était décelable par ces techniques. Or, au cours de sa fabrication ou au cours de la fabrication du fromage, l'enzyme subit un certain nombre de traitements et éventuellement d'incidents qui peuvent l'inactiver. L'objectif des analyses étant le dosage ou la mise en évidence de l'enzyme actif, nous avons entrepris

de préciser les limites des méthodes immunologiques dans ce domaine, en étudiant systématiquement l'influence de la nature et du taux d'inactivation de la chymosine et de la pepsine bovine sur l'aptitude à se conjuguer avec leurs anticorps. Les différents types d'inactivation choisis ne modifient pas de la même manière la structure des protéines. En fonction de la nature et de l'intensité de ces modifications, les déterminants antigéniques qui peuvent être de nature séquentielle (structure primaire d'un segment protéique) ou conformationnelle (juxtaposition spatiale d'un ensemble d'acides aminés) pouvaient être plus ou moins affectés et donc plus ou moins aptes à s'associer avec l'anticorps complémentaire. C'est ce que nous avons effectivement observé. Les deux enzymes constitutifs de la présure, la chymosine et la pepsine bovine, malgré de fortes homologies de structure ne sont pas immunologiquement liées (Foltmann, 1981) et ont donné des réponses différentes bien qu'ayant subi un même type d'inactivation.

## MATERIEL ET METHODES

*Enzymes.* La chymosine et la pepsine bovine A ont été purifiées respectivement à partir de présure en poudre (Hansen - 94300 Vincennes, France) et d'extrait de pepsine bovine liquide (gracieusement fourni par les Ets Boll - 94300 Vincennes, France). Après dialyse, ces deux préparations étaient successivement chromatographiées sur colonne de DEAE-cellulose (DE 32 - Whatman) en tampon pipérazine 0,025 M-HCl, pH 5,3, avec un gradient d'éluion en chlorure de sodium de 0 à 0,6 M pour la chymosine et de 0,2 à 1 M pour la pepsine bovine ; sur Séphacryl S-200 (Pharmacia) en tampon citrate 0,05 M, NaCl 1 M, pH 5,6 ; et à nouveau sur DEAE-cellulose dans les mêmes conditions que la première fois. Les solutions étaient ensuite dialysées puis lyophilisées.

*Détermination de l'activité enzymatique.* L'activité enzymatique était déterminée selon la méthode décrite par Douillard et Ribadeau-Dumas (1970). Le substrat était une solution de caséine K à 0,2 % en tampon citrate - Na<sub>3</sub> 0,05 M - HCl, NaCl 0,075 M, pH 5,30. L'activité était évaluée par le temps de floculation de 1 ml de substrat auquel on avait ajouté 100 µl de solution enzymatique à 30° C. La caséine était préparée selon la méthode de Zittle et Custer (1963). L'inverse du temps de floculation permettait d'estimer l'activité des solutions.

*Electro immuno-diffusion (EID).* La méthode utilisée était celle décrite par Laurell (1966) et reprise par Rothe *et al.* (1976). Les anticorps provenaient des laboratoires Chr. Hansen - Copenhague, Danemark. Les concentrations des sérums antichymosine et anti-pepsine A dans les gels étaient respectivement de 0,33 % et 1,5 %.

Pour quelques essais, une concentration légèrement inférieure (0,30 %) en antichymosine a été utilisée.

Les échantillons (5  $\mu$ l) étaient déposés dans les puits, le gel étant sous tension (1 V-cm<sup>-1</sup>). Une tension de 2,5 V-cm<sup>-1</sup> était ensuite appliquée pendant 20 h à + 4° C. Tous les échantillons correspondant à un même type d'inactivation étaient testés trois ou quatre fois sur une même plaque en même temps qu'une gamme étalon de l'enzyme. Les hauteurs des pics étaient mesurées après agrandissement d'un facteur 5 environ. Les résultats présentés sont les moyennes des trois ou quatre mesures.

*Traitement d'inactivation de la chymosine.* Une solution-mère de chymosine (0,8 mg.ml<sup>-1</sup>) était préparée dans un tampon acétate Na 0,05 M, pH 5,5. Les conditions ont été choisies pour les deux enzymes de façon à obtenir des échantillons ayant des activités enzymatiques résiduelles réparties de façon à peu près régulière entre 0 et 100 % d'inactivation, à l'exception de l'inactivation par agitation.

- *Agitation* : des aliquotes de 10 ml de la solution-mère diluée 10 fois étaient réparties dans des tubes de 30 ml (18  $\times$  10) qui étaient ensuite fixés sur une roue animée d'un mouvement rotatif de 30 tours par min. Cette agitation était maintenue pendant 5, 15 et 30 min.

- *Urée* : la solution-mère était diluée vingt fois dans un tampon acétate 0,05 M, pH 5,5, urée 6,6 M, ce qui donnait une concentration finale en urée de 6 M. Ces échantillons étaient inactivés pendant 10 et 30 min, 1, 2 et 3 h, à 35° C.

- *Température* : la solution-mère, diluée dix fois dans le tampon acétate Na 0,05 M, pH 5,5 et répartie en aliquote de 2 ml dans des tubes à hémolyse, était maintenue à 50° C pendant 3, 7, 24 et 48 h et pour un des aliquotes à 55° C pendant 7 h.

- *pH* : la solution-mère était amenée à pH 7,0 en la diluant dix fois dans un tampon tris-acide maléique 0,1 M, pH 7,15. Les échantillons étaient maintenus à ce pH, à 35° C pendant 2, 4, 6, 8, 15 et 24 h.

*Traitement d'inactivation de la pepsine bovine A.* Une solution-mère de pepsine bovine (1,3 mg/ml<sup>-1</sup>) était préparée dans le tampon acétate Na 0,05 M, pH 5,5.

- *Agitation* : après dilution au dixième, la solution enzymatique était agitée de la même manière que la chymosine pendant 6, 16 et 24 h.

- *Urée* : la solution-mère diluée dix fois dans un tampon acétate Na 0,05 M, pH 5,5, urée 8 M, était inactivée en urée 7,2 M pendant 2, 5, 16 et 24 h à 35° C.

• *Température* : la solution-mère diluée au dixième dans le tampon acétate Na 0,05 M pH 5,5, était inactivée pendant 6 h, 24 h et 48 h à 50° C, et pendant 6 h et 24 h à 55° C.

• *pH* : la solution-mère était amenée à pH 7,0 par dilution (10 x) dans un tampon tris-acide maléique 0,1 M, pH 7,15 ou à pH 6,5 par dilution dans un tampon tris-acide maléique 0,1 M, pH 6,6. Les échantillons étaient maintenus à pH 7,0 pendant 6 h et 24 h et à pH 6,5 pendant 6 h, 24 h, 48 h à 35° C.

Les échantillons ayant subi un traitement d'inactivation étaient immédiatement testés par EID. Leur activité était mesurée après dilution (10 x) dans un tampon citrate 0,05 M pH 5,3. L'absence d'effet de l'urée présente dans certains échantillons sur le résultat de la EID a été vérifiée.

## RESULTATS

La figure 1 présente les concentrations en enzyme estimées par EID en fonction de l'activité enzymatique résiduelle des échantillons ayant subi un des quatre traitements d'inactivation. Après EID, la concentration en chymosine ou en pepsine était estimée par référence à une gamme étalon dont la concentration la plus élevée correspondait à celle de la solution d'enzyme avant tout traitement d'inactivation. Pour faciliter la lecture, cette concentration maximale a été considérée égale à une unité arbitraire. L'activité enzymatique des échantillons ayant subi un traitement d'inactivation a été exprimée en pour cent de l'activité initiale.

Dans deux cas (chymosine traitée par l'urée et la température) la relation entre la concentration estimée par EID et l'activité enzymatique est linéaire et passe par l'origine. Seul l'enzyme actif a donc été dosé par EID. Par contre, dans deux autres cas (pepsine traitée à pH 7,0 ou 6,5 et chymosine traitée par agitation) la droite est parallèle à l'ordonnée, ce qui signifie que tout l'enzyme actif ou pas, est estimé par EID. Entre ces deux extrêmes, nous avons obtenu des réponses intermédiaires. Nous n'avons jamais observé même partiellement une perte de réactivité antigénique sans perte d'activité enzymatique.

On observe donc une extrême diversité des réponses en fonction du type d'inactivation et de la nature de l'enzyme.

De façon plus précise, l'agitation ne modifie pas l'estimation de la chymosine par EID, même lorsque 50 % de l'activité est perdue. Elle a un léger effet sur celle de la pepsine qui, bien que moins active est partiellement estimée par EID.

La chymosine inactivée après traitement par l'urée n'est pas dosée par EID. Par contre, la concentration estimée d'une solution de pepsine bovine complètement inactivée après traitement par l'urée

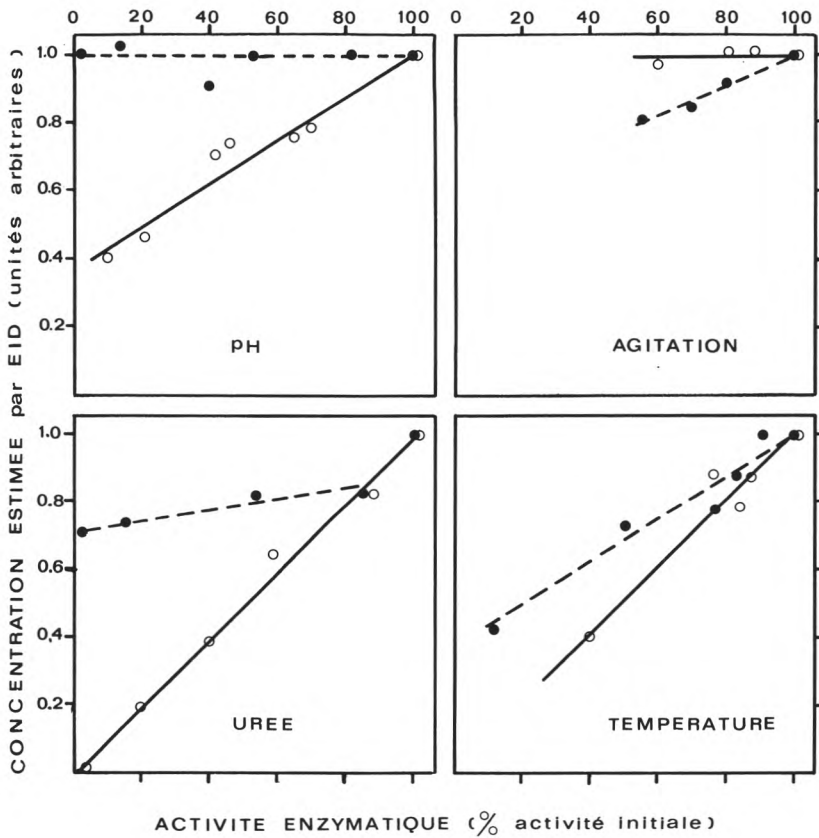


Fig. 1

Relation entre la convention en enzyme déterminée par EID et l'activité enzymatique résiduelle après inactivation :

- (a) à pH 7,0 (chymosine) ou 6,5 (pepsine) ;
- (b) par agitation ;
- (c) par urée 6,6 M (chymosine) ou 8 M (pepsine) ;
- (d) à 50 et 55° C ;

de solution de chymosine (○——○) et de pepsine bovine (●——●).

Relation between enzyme concentration determined by Rocket Immuno Electrophoresis and residual activity after inactivation:

- (a) at pH 7.0 (chymosin) or 6.5 (pepsin);
- (b) by shaking;
- (c) by 6.6 M (chymosin) or 8 M (pepsin) urea;
- (d) at 50 or 55° C;

of chymosin (○——○) and bovine pepsin (●——●) solutions.

est encore égale à 80 % de celle du témoin. La presque totalité de l'enzyme, actif ou pas est donc mesurée par EID.

La chymosine inactive après chauffage n'est pas dosée par EID. Pour la pepsine bovine A, on observe un léger décalage entre les deux types d'estimation de la concentration. Cependant, l'écart entre le résultat théorique et le résultat réel est d'autant plus accentué que l'enzyme est plus inactif : si 10 % de l'enzyme est inactif, la quantité de pepsine active déterminée par EID sera surestimée de 5 % ; pour un taux d'inactivation de 90 %, la surestimation sera de 35 %.

On retrouve une différence extrêmement nette entre chymosine et pepsine bovine A après le traitement d'inactivation par le pH. La EID ne permet pas d'estimer rigoureusement la quantité de chymosine active réellement présente. Les résultats sont légèrement surestimés et, comme précédemment, d'autant plus que le taux d'inactivation est élevé. Pour la pepsine, la totalité de l'enzyme présent, actif ou pas, est dosée par EID.

## DISCUSSION

Selon le type d'inactivation et la nature de l'enzyme, l'aptitude à s'associer aux anticorps est différente. Dans la plupart des cas la structure du site actif est apparue plus sensible aux traitements d'inactivation testés que la structure des déterminants antigéniques.

L'inactivation des enzymes par agitation est due aux forces de cisaillement qui provoquent une déformation de la molécule voire la rupture de liaisons de faible énergie (Charm et Wong, 1981). Nous avons vérifié que dans les conditions expérimentales utilisées, l'inactivation était irréversible. Les modifications de structure semblent demeurer relativement restreintes puisque pour les deux enzymes, pas ou peu d'effet est observé sur l'aptitude à se complexer avec les anticorps.

Dans les conditions d'inactivation par le pH retenues (7,0 et 6,5), la chymosine apparaît pour ce seul cas légèrement moins sensible que la pepsine comme l'avaient déjà observé Antonini et Ribadeau-Dumas (1971). Mais même totalement inactivée, la pepsine bovine présente la même affinité vis-à-vis des anticorps. Par contre, la réactivité antigénique de la chymosine est fortement amoindrie. Les changements de conformation induits à ce pH ne semblent donc avoir de conséquences que sur les déterminants antigéniques de la chymosine. Ce résultat confirme celui obtenu dans des conditions légèrement différentes au cours d'un travail mené parallèlement par Andren et de Koning (1982).

Nos essais mettent en évidence une différence de sensibilité à l'urée entre la chymosine et la pepsine bovine en accord avec Douil-

lard (1971) et Mulvihill et Fox (1977). La structure des déterminants antigéniques de la pepsine bovine semble peu modifiée par l'urée contrairement à ceux de la chymosine qui se trouvent pourtant à une concentration en urée plus faible. Ceci confirme ce que nous avons observé avec l'effet du PH, c'est-à-dire une nette différence de sensibilité des déterminants antigéniques de la chymosine et de la pepsine bovine aux agents testés.

Le chauffage, dans les conditions utilisées, est l'agent le plus dénaturant puisque pour les deux enzymes, les pertes d'activité et d'aptitude à former des complexes antigène-anticorps sont concomitantes ou presque, ce qui reflète une perte de structure plus importante, avec encore une légère différence en faveur de la pepsine.

L'ensemble de ces résultats montre d'une part que la chymosine possède une structure enzymatique active généralement plus sensible aux agents d'inactivation que la pepsine. La structure responsable de la réactivité immunologique est également plus facilement perdue par la chymosine. Globalement, la chymosine semble donc avoir une structure tertiaire plus fragile que la pepsine dans les conditions d'inactivation utilisées. D'autre part, pour les deux enzymes, la structure des déterminants antigéniques apparaît plus stable que celle du site actif. Ce dernier est constitué par l'agencement d'acides aminés appartenant à différentes parties de la chaîne polypeptidique, qui forment une large crevasse (Foltmann, 1981). Il est donc facilement affecté par de légères modifications de la structure tertiaire. Les déterminants antigéniques correspondent à des zones plus limitées et localisées à la surface de la molécule. Leur structure est, par conséquent, plus facilement conservée voire totalement résistante à certaines modifications qui par ailleurs rendent la molécule totalement inactive. Nos résultats amènent également à supposer que le site actif est distinct des déterminants antigéniques non seulement par la taille mais également par la localisation. Ceci a été vérifié dans le cas de la chymosine par Andren et de Koning (1982) en bloquant le site actif par la pepstatine. Dans ces conditions, on observe toujours la formation de complexe avec les anticorps. Enfin, lorsque les enzymes sont injectés dans la circulation sanguine pour préparer les anticorps, ils sont plus ou moins inactivés en particulier du fait du pH. Les anticorps pourraient donc se conjuguer avec certaines formes inactivées de ces enzymes.

D'un point de vue analytique, ces résultats précisent les limites d'une méthode immunologique utilisées pour mettre en évidence et/ou doser un enzyme actif. Selon le type d'inactivation subi par l'enzyme et selon l'enzyme considéré, la fraction inactive sera dosée en totalité, en partie ou pas du tout. Les risques de résultats erronés sont loin d'être négligeables particulièrement avec la pepsine. De telles méthodes demeurent cependant séduisantes de par leur extrême spécificité. Il importe donc d'en garder présent à l'esprit les limites liées à une éventuelle inactivation. Dans ce cas, comme le suggère

Harboe (1981), il convient d'utiliser une méthode d'analyse complémentaire permettant d'évaluer l'activité enzymatique.

*Reçu pour publication en juillet 1982.*

### Bibliographie

- ANDREN (A.) and DE KONING (P.J.) (1982). — Changes in immunologically active centres of some milk-clotting enzymes. Poster présenté au Symposium International sur l'Utilisation des enzymes en Technologie Alimentaire à Versailles (France). Accepté pour publication dans *Neth. Milk Dairy J.*
- ANTONINI (J.) and RIBADEAU-DUMAS (B.) (1971). — Isolement, purification et propriétés de deux zymogènes gastriques bovins. Propriétés des protéases correspondantes. *Biochimie*, 53, 321-329.
- CHARM (S.E.) and WONG (B.L.) (1981). — Shear effects on enzymes. *Enzyme Microb. Technol.*, 3, 111-118.
- DOUILLARD (R.) et RIBADEAU-DUMAS (B.) (1970). — Détermination avec caséine K de l'activité protéolytique de la présure, de pepsine de porc et des pepsines bovines. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 52, 1429-1445.
- DOUILLARD (R.) (1971). — Inactivation par l'urée de la présure et des pepsines bovines. Application possible à leur dosage en mélange. *Biochimie*, 53, 447-455.
- FOLTMANN (B.) (1981). — Mammalian milk clotting proteases: structure, function, evolution and development. *Neth. Milk Dairy J.*, 35, 223-231.
- GRIPON (J.C.), DESMAZEAUD (M.J.), LE BARS (D.) et BERGÈRE (J.L.) (1975). — Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II. Influence de la présure commerciale. *Le Lait*, 55, 502-516.
- HARBOE (M.K.) (1981). — Analysis of milk clotting enzymes in commercial rennets. *Neth. Milk Dairy J.*, 35, 367-369.
- LAURELL (C.B.) (1966). — Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.*, 15, 45-52.
- MATHESON (1981). — The immunochemical determination of chymosin activity in cheese. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 33-41.
- MULVIHILL (D.M.) and FOX (P.F.) (1977). — Selective denaturation of milk coagulants in 5 M. Urea. *J. Dairy Res.*, 44, 319-324.
- ROTHER (G.A.L.), AXELSEN (N.H.), JOHNK (P.) and FOLTMANN (B.) (1976). — Immunochemical, chromatographic, and milk-clotting activity measurements for quantification of milk-clotting enzymes in bovine rennets. *J. Dairy Res.*, 43, 85-95.
- VISSER (F.M.W.) (1977). — Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 3. Protein breakdown: analysis of the soluble nitrogen and amino acid nitrogen fractions. *Neth. Milk Dairy J.*, 31, 210-239.
- ZITTLE (C.A.) and CUSTER (J.H.) (1963). — Purification and some of the properties of  $\alpha_s$ -casein and K-casein. *J. Dairy Sci.*, 46, 1183-1188.
-