



HAL
open science

Etude comparative de l'action des métalloprotéases de Penicillium caseicolum et Penicillium roqueforti sur les caséines alpha s1 et bêta

P. Trieu-Cuot, Marie-José Archieri-Haze, J. C. Gripon

► **To cite this version:**

P. Trieu-Cuot, Marie-José Archieri-Haze, J. C. Gripon. Etude comparative de l'action des métalloprotéases de Penicillium caseicolum et Penicillium roqueforti sur les caséines alpha s1 et bêta. Le Lait, 1982, 62 (615_616), pp.234-249. <hal-00928928>

HAL Id: hal-00928928

<https://hal.science/hal-00928928v1>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

Etude comparative de l'action des métalloprotéases de *Penicillium caseicolum* et *Penicillium roqueforti* sur les caséines alpha s₁ et bêta

par

P. TRIEU-CUOT, Marie-José ARCHIERI-HAZE
et J. C. GRIPON*

Résumé

L'hydrolyse des caséines α_{s_1} et β par les métalloprotéases de *Penicillium caseicolum* et *Penicillium roqueforti* a été étudiée et comparée par électrophorèse, focalisation isoélectrique et électrophorèse bidimensionnelle. Les diagrammes obtenus montrent que ces protéases coupent de nombreuses liaisons dans chacune des deux caséines. Qualitativement, ces métalloprotéases ont une action identique sur les caséines α_{s_1} et β , toutefois, l'efficacité catalytique avec laquelle certaines liaisons sont hydrolysées diffère d'une enzyme à l'autre. Trois liaisons peptidiques coupées par la métalloprotéase de *P. caseicolum* dans la caséine β ont été identifiées : Lys₂₈-Lys₂₉, Pro₉₀-Glu₉₁ et Glu₁₀₀-Ala₁₀₁.

Mots clés

Métalloprotéase - *Penicillium caseicolum* - *Penicillium roqueforti* - Hydrolyse des caséines - Focalisation isoélectrique - Electrophorèse bidimensionnelle.

Titre abrégé

Hydrolyse des caséines par les métalloprotéases de *Penicillium*.

Summary

COMPARATIVE STUDY OF THE ACTION OF METALLOPROTEINASES OF *PENICILLIUM CASEICOLUM* AND *PENICILLIUM ROQUEFORTI* ON α_{s_1} - AND β -CASEINS

We have studied and compared *in vitro* action of the metalloproteinases of *Penicillium caseicolum* and *Penicillium roqueforti* on purified

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

α_{s1} and β -caseins using electrophoresis, isoelectric focusing and 2-dimensional electrophoresis. The digestion patterns observed after migration showed that these proteinases cleaved numerous peptide bonds on both caseins. From a qualitative point of view these metalloproteinases acted in a similar way on α_{s1} and β -caseins, however, the catalytic efficiency with which some peptide bonds were hydrolyzed appeared to be different from an enzyme to the other. Three peptide bonds cleaved by the metalloproteinase of *P. caseicolum* in β -casein were identified: these were Lys₂₈-Lys₂₉, Pro₉₀-Glu₉₁ and Glu₁₀₀-Ala₁₀₁.

Key words

Metalloproteinase - *Penicillium caseicolum* - *Penicillium roqueforti* - Casein hydrolysis - Isoelectric focalisation - 2-dimensional electrophoresis.

INTRODUCTION

Les fromages à croûte fleurie et à pâte persillée subissent une protéolyse très importante dont les agents principaux sont *Penicillium caseicolum* et *Penicillium roqueforti* (Lenoir, 1963 ; Lenoir, 1970 ; Devoyod *et al.*, 1968 ; Desmazeaud *et al.*, 1976 ; Gripon *et al.*, 1977). Les conditions de production ainsi que la nature du système protéolytique exocellulaire de ces deux moisissures ont été préalablement définies et caractérisées (Lenoir *et al.*, 1973 ; Lenoir et Auberger, 1977 a ; Gripon et Bergère, 1972). Outre des exopeptidases ces *Penicillia* synthétisent et excrètent dans leur milieu de culture une aspartyle protéase, encore appelée protéase acide, et une métalloprotéase. Les propriétés générales de ces enzymes sont connues (Zevaco *et al.*, 1973 ; Gripon et Hermier, 1974 ; Lenoir et Auberger, 1977 b ; Lenoir *et al.*, 1979) mais paradoxalement leur action sur les caséines qui sont en quelque sorte leur substrat « technologique » n'a encore été que très peu étudiée (Le Bars et Gripon, 1981). Dans le but de répondre à cette question, nous avons préalablement rapporté la comparaison de l'action des deux aspartyles protéases sur les caséines α_{s1} et β (Trieu-Cuot *et al.*, 1982). Il s'est avéré que ces deux enzymes ont des actions identiques au plan qualitatif sur ces deux protéines, cependant, sur la caséine α_{s1} , l'aspartyle protéase de *P. roqueforti* hydrolyse une liaison peptidique avec une efficacité catalytique très supérieure à celle de l'aspartyle protéase de *P. caseicolum*. Dans cette présente communication, nous rapportons la comparaison de l'action des deux métalloprotéases sur ces mêmes substrats, ainsi qu'une étude succincte des produits de dégradation obtenus après hydrolyse de la caséine β par la métalloprotéase de *P. caseicolum*. Ces peptides, moins nombreux que ceux issus de la caséine α_{s1} , sont susceptibles de constituer des bons marqueurs de l'activité de la métalloprotéase au cours de l'affinage des fromages à croûte fleurie et de ce fait nécessitaient d'être mieux caractérisés au plan structural.

MATERIEL ET DISCUSSION

Préparation des enzymes et des caséines

La métalloprotéase de *P. roqueforti* était préparée selon la méthode décrite par Gripon et Hermier (1974). La métalloprotéase de *P. caseicolum*, aimablement fournie par M. J. Lenoir (Chaire de Technologie, INA-PG) était purifiée comme préalablement décrit (Lenoir et Auberger, 1977 b). Ces deux préparations enzymatiques étaient électrophorétiquement pures. Les caséines α_{s1} et β étaient préparées par chromatographie sur DEAE-Cellulose à partir de caséine isoélectrique bovine ($\alpha_{s1}B$, $\alpha_{s2}A$, βA^2 et KA) selon la technique de Mercier *et al.* (1968).

Hydrolyse des caséines

L'hydrolyse des caséines était réalisée en tampon citrate (0,05 M pH 6,00) à 30° C ; la concentration en caséine était de 1 % (p/v), le rapport enzyme/substrat de 1/5 000 (mg/mg). Des fractions aliquotes étaient prélevées à différents temps (15, 30, 45, 60, 90 et 120 min) et la réaction enzymatique arrêtée par addition d'un volume égal d'une solution d'urée 9 M contenant 10^{-2} M d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA). Le pH du mélange réactionnel était alors amené à 3,00 avec de l'acide chlorhydrique 1 N de manière à éviter d'éventuelles carbamylations (Stark *et al.*, 1960).

Techniques électrophorétiques

L'électrophorèse était réalisée en gel d'acrylamide-bisacrylamide-agarose (5,00-0,16-0,80 %) en tampon Tris-glycine (0,075 M-0,060 M ; pH 8,60) contenant de l'urée (4,5 M) et du 2-mercaptoéthanol (0,2 %) (Gripon *et al.*, 1975 ; Uriel, 1966).

La focalisation isoélectrique était réalisée en gel d'acrylamide-bisacrylamide (5,00-0,15 %) contenant 2 % d'ampholytes Biolytes « Technical 4-9 » et de l'urée (7 M).

La seconde dimension de l'électrophorèse bidimensionnelle était réalisée dans un gel à gradient linéaire d'acrylamide-bisacrylamide (16-0,4 % à 28-0,7 %) en tampon Tris-HCl (0,675 M ; pH 8,8) contenant de l'urée (4,9 M) et du sodium dodecyl sulfate (SDS) (3,5 mM).

Les conditions d'électrophorèse, de focalisation isoélectrique et d'électrophorèse bidimensionnelle ont été préalablement décrites (Gripon *et al.*, 1975 ; Trieu-Cuot et Gripon, 1981).

La droite de régression linéaire représentant le logarithme du poids moléculaire de protéines étalons en fonction de leur distance de migration en électrophorèse-SDS a permis l'estimation du poids

moléculaire (PM apparent) des produits d'hydrolyse séparés sur le même gel.

Isolement et identification des produits de dégradation issus de la caséine β

La purification des produits de dégradation obtenus après hydrolyse de la caséine β par la métalloprotéase de *P. caseicolum* a été réalisée à partir du milieu réactionnel suivant : à 200 ml d'une solution de caséine β à 2 p. 100 (p/v) en tampon acétate de sodium (0,1 M ; pH 5,8) était ajoutée la quantité idoine de métalloprotéase de manière à obtenir un rapport enzyme/substrat de 1/5 000 (mg/mg). Après 45 min d'hydrolyse à 35° C, la réaction enzymatique était arrêtée par addition d'EDTA au milieu réactionnel à une concentration finale de 0,01 M et par un chauffage de 15 min à 100° C. La fraction azotée insoluble de l'hydrolysate était récupérée après acidification à pH 4,60 avec de l'acide chlorhydrique 1 N et centrifugation. Celle-ci était alors dialysée puis lyophilisée. Le lyophilisat était chromatographié sur une colonne de DEAE-Sephadex (3 \times 10 cm) équilibré en tampon Trisurée-EDTA (0,05 M-3,3/M-0,001 M ; pH 7,00) ; l'élution était réalisée avec le même tampon grâce à un gradient linéaire de molarité en NaCl de 0M à 0,25 M. La fraction non retenue sur DEAE-Sephadex était dialysée et lyophilisée puis dissoute dans une solution d'acide acétique (30 %, v/v) et chromatographiée dans ce même solvant sur une colonne de Sephadex G50 (2 \times 190 cm) ; deux subfractions étaient alors obtenues et chacune d'elles était rechromatographiée successivement trois fois sur Sephadex G 50 dans les conditions ci-dessus décrites. Les déterminations des séquences N- et C-terminales des fractions ainsi purifiées ont été réalisées selon les méthodes décrites précédemment (Mercier *et al.*, 1970 ; Mercier *et al.*, 1976).

RESULTATS ET DISCUSSION

Hydrolyse de la caséine α_{s1} par les métalloprotéases de *P. caseicolum* et de *P. roqueforti*

L'étude électrophorétique des hydrolysats obtenus après action des métalloprotéases de *P. caseicolum* et de *P. roqueforti* sur la caséine α_{s1} montre l'apparition de huit bandes majeures appelées α_{s1} mp1, α_{s1} mp2..., α_{s1} mp8 dans l'ordre de leur mobilité électrophorétique croissante à pH alcalin (fig. 1 a). Chaque bande observée dans l'électrophorégramme de l'un des deux hydrolysats possède une bande homologue dans l'électrophorégramme de l'autre hydrolysate ; toutefois, la cinétique d'hydrolyse de la caséine α_{s1} fait apparaître dès les premiers temps de réaction enzymatique des différences importantes au plan quantitatif dans les diagrammes obtenus avec les deux enzymes ; les bandes électrophorétiques α_{s1} mp2, α_{s1} mp3, α_{s1} mp6 et α_{s1} mp7 apparaissent plus

rapidement avec l'enzyme de *P. caseicum*, alors que la situation est inverse pour les bandes $\alpha_{s1}mp4$, $\alpha_{s1}mp5$ et $\alpha_{s1}mp8$. Ceci traduit le fait que ces deux protéases ont sur la caséine α_{s1} des spécificités d'action très proches, voir identiques, mais que, par contre, l'efficacité catalytique avec laquelle certaines liaisons peptidiques sont hydrolysées varie très sensiblement d'une enzyme à l'autre. Le diagramme de focalisation isoélectrique correspondant confirme ces résultats (fig. 1 b). Cependant, et malgré la bonne résolution obtenue, son interprétation est délicate à réaliser car le nombre et les positions

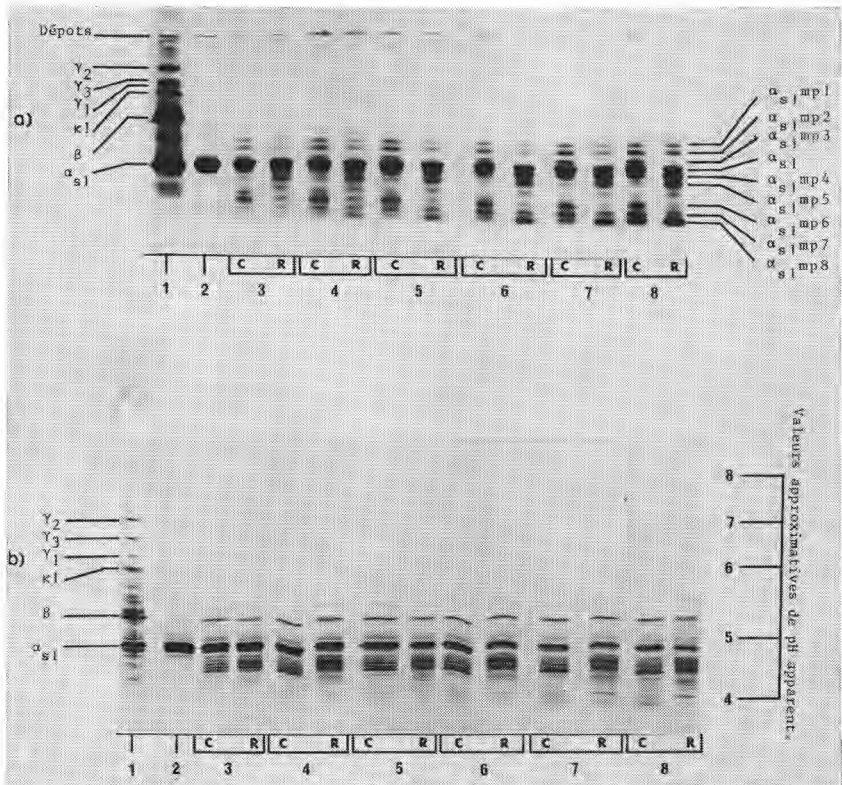


fig. 1

Comparaison par électrophorèse à pH alcalin (a) et par focalisation isoélectrique (b) d'hydrolysats de caséine α_{s1} obtenus par la métalloprotéase de *P. caseicum* (C) ou de *P. roqueforti* (R). 1 : caséine entière ; 2 : caséine α_{s1} ; 3-8 : hydrolysats aux temps 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min respectivement.

*Electrophoresis (a) and isoelectric focusing (b) of bovine α_{s1} -casein hydrolysed by *P. caseicum* metalloproteinase (C) or by *P. roqueforti* metalloproteinase (R). 1: whole casein; 2: α_{s1} -casein; 3-8: α_{s1} -casein hydrolysates after 15, 30, 45, 60, 90, 120 min of enzymic reaction respectively.*

relatives des principales bandes ne correspondent pas à ceux observés sur le diagramme électrophorétique.

Ce résultat diffère de ceux observés lors de travaux antérieurs avec d'autres enzymes où nous avons montré que les positions relatives de peptides issus soit de la caséine β , soit de la caséine α_{s1} , étaient fréquemment les mêmes sur les gels d'électrophorèse à pH alcalin et sur les gels de focalisation isoélectrique (Trieu-Cuot *et al.*, 1982 ; Trieu-Cuot et Gripon, 1981 ; Trieu-Cuot, 1981). Il faut toutefois retenir que les principes de séparation de ces deux techniques ne sont pas identiques. On peut schématiquement considérer que la mobilité électrophorétique d'une protéine dépend de sa charge, mais aussi de sa taille en raison des forces de friction qui s'exercent sur elle au cours de son déplacement dans le gel ; cet effet de tamisage moléculaire ne se manifeste pas au cours de la focalisation isoélectrique puisque en fin d'expérimentation, les protéines sont immobiles et concentrées à leur point isoélectrique. D'autre part, le nombre de bandes majeures observées sur le gel d'électrophorèse étant supérieur à celui dénombré par focalisation isoélectrique, il semble probable que sur ce dernier gel plusieurs produits de dégradation se superposent au sein d'une bande. Une telle situation qui ne permet pas de repérer les produits de dégradation homologues sur la base de leur intensité de coloration relative, pourrait contribuer à expliquer l'absence de correspondance entre les deux types de gel. Ces deux explications sont, du reste, en accord avec les diagrammes obtenus par électrophorèse bidimensionnelle (hydrolyse de 120 min) (fig. 2a et 2b). En effet, pour les deux hydrolysats, quinze spots majeurs peuvent être détectés et il apparaît nettement que certains étaient rassemblés en une bande au cours de la première dimension (focalisation isoélectrique). Par ailleurs, les poids moléculaires apparents de ces produits de dégradation s'échelonnent de 23 000 à 7 000 daltons ; si l'on considère que leurs points isoélectriques sont voisins, il devient probable que l'effet de tamisage moléculaire doit jouer un rôle important dans leurs séparations par électrophorèse. Sur les deux diagrammes bidimensionnels, nous avons indiqué les spots homologues (possédant le même point isoélectrique apparent et le même poids moléculaire apparent) dont les intensités de coloration sont très différentes, ainsi que les quelques spots caractéristiques de la métalloprotéase de *P. roqueforti* (fig. 2a et 2b).

Hydrolyse de la caséine β par les métalloprotéases

de *P. caseicolum* et de *P. roqueforti*

La comparaison par électrophorèse à pH alcalin de l'action des métalloprotéases sur la caséine β est représentée sur la figure 3a. Avec l'enzyme de *P. caseicolum*, il apparaît en fin d'hydrolyse (120 min) douze bandes, dont sept majeures, qui, dans l'ordre de leur mobilité électrophorétique croissante, ont été appelées βmp_0 , βmp_1 ..., et βmp_{11} . Le diagramme électrophorétique obtenu avec l'enzyme de *P. roqueforti* est différent ; certaines bandes n'apparaissent pas ou

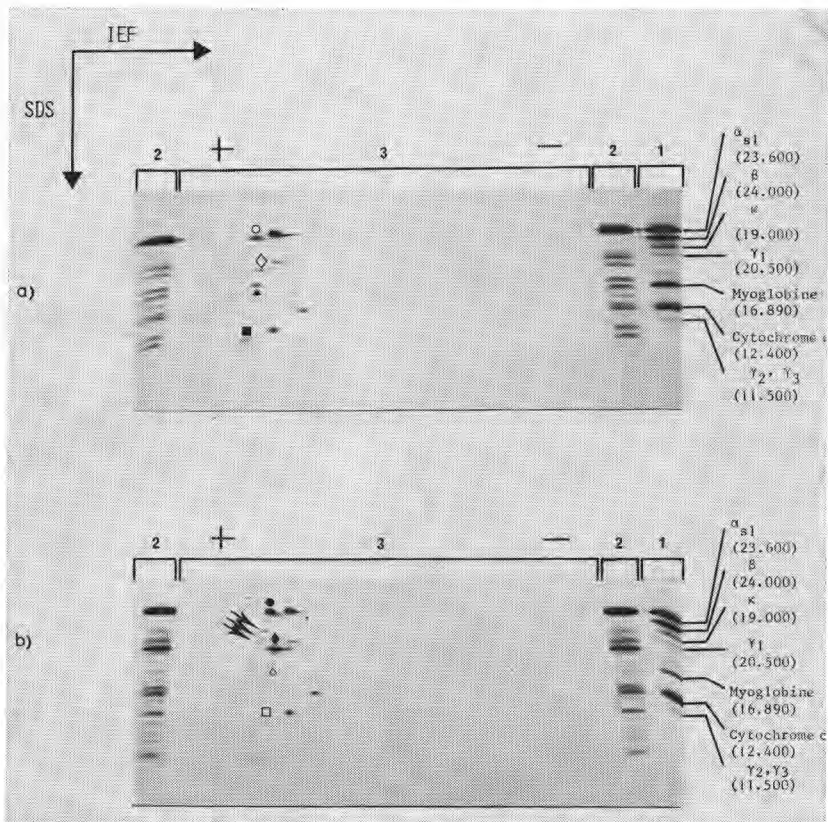


fig. 2

Electrophorèse-SDS (1) d'un mélange de caséine entière bovine, de myoglobine et de cytochrome C. Electrophorèse-SDS (2) et électrophorèse bidimensionnelle (3) de caséine α_{s1} incubée 120 min avec la métalloprotéase de *P. caseicolum* (a) ou de *P. roqueforti* (b). Les spots marqués d'un signe plein ($\blacktriangle \bullet \blacklozenge$) ont une intensité de coloration supérieure à celle des spots homologues marqués d'un signe blanc ($\square \triangle \diamond$). Les spots indiqués par une flèche semblent caractéristiques de l'enzyme de *P. roqueforti*.

SDS-pore gradient gel electrophoresis of standard molecular weight proteins (1). SDS-PAGE (2) and 2-dimensional electrophoresis (3) of α_{s1} -casein incubated 120 min with *P. caseicolum* metalloproteinase (a) or *P. roqueforti* metalloproteinase (b). Spots indicated with a black sign ($\blacktriangle \bullet \blacklozenge$) have a higher coloration intensity than the homologous spots indicated with a white sign ($\square \triangle \diamond$). The spots indicated with an arrow seem to be characteristic of the *P. roqueforti* enzyme.

n'apparaissent que très faiblement : c'est le cas de $\beta mp4$, $\beta mp5$ et $\beta mp10$. D'autres bandes, par contre, ont des intensités de coloration supérieure à celle obtenue avec l'enzyme de *P. caseicolum* ; c'est le

cas de β mp1 et de β mp8. La résolution et la sensibilité de la technique de focalisation isoélectrique permettent de préciser certaines différences existant entre ces deux hydrolysats (fig. 3 b). Deux bandes de point isoélectrique apparent proche de 8,5 sont obtenus avec la protéase de *P. roqueforti* alors qu'il n'en apparaît qu'une seule avec celle de *P. caseicolum* (β mp0) ; avec les deux hydrolysats les bandes électrophorétiques β mp1 et β mp2 résolvent en trois bandes. La comparaison des intensités de coloration relative des bandes β mp4, β mp5, β mp6 et β mp8 montre que, contrairement à la situation obtenue avec la caséine α_{s1} , les positions relatives de ces produits de dégradation sont les mêmes sur les deux gels (fig. 3 a et 3 b).

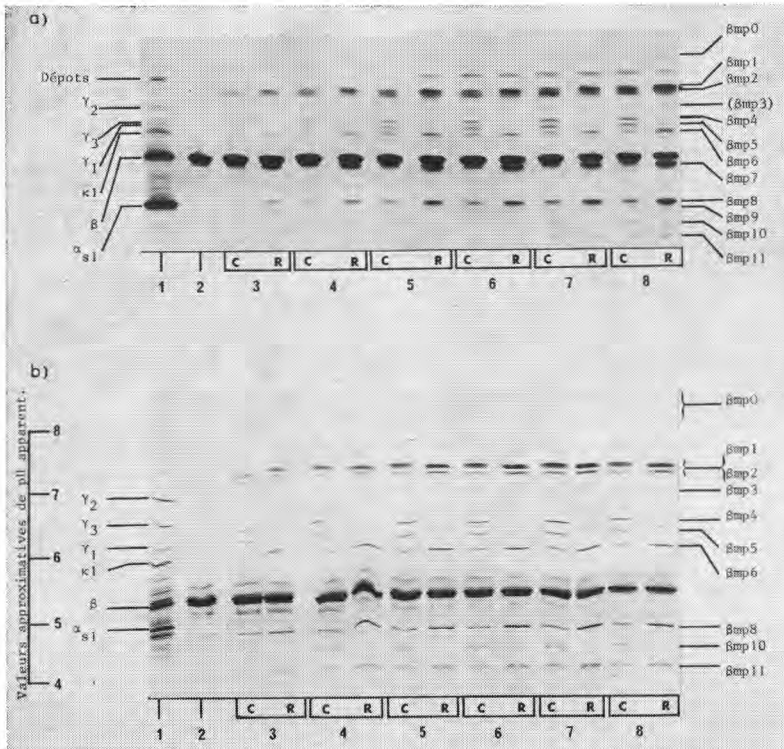


fig. 3

Comparaison par électrophorèse à pH alcalin (a) et par focalisation isoélectrique (b) d'hydrolysats de caséine β par la métalloprotéase de *P. caseicolum* (C) ou de *P. roqueforti* (R). 1 : caséine entière ; 2 : caséine β ; 3-8 : hydrolysats aux temps 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min respectivement.

*Electrophoresis (a) and isoelectric focalisation (b) of bovine β -casein hydrolysates by *P. caseicolum* metalloproteinase (C) or *P. roqueforti* metalloproteinase (R). 1: whole casein; 2: β -casein; 3-8: β -casein hydrolysate after 15, 30, 45, 60, 90, 120 min of enzymic reaction respectively.*

Les électrophorèses bidimensionnelles réalisées sur ces deux hydrolysats ont permis de mettre en évidence que les bandes électrophorétiques $\beta mp1$ et $\beta mp2$, déjà séparées en trois bandes par focalisation isoélectrique, sont en réalité composées de quatre spots majeurs ($\beta mp1a$, $\beta mp1b$, $\beta mp2a$, $\beta mp2b$) dans le cas de l'enzyme de *P. caseicolum* (fig. 4a et 4b) et de trois seulement ($\beta mp1a$, $\beta mp1b$, $\beta mp2a$) dans le cas de celle de *P. roqueforti*. Ceux-ci, dans le cas de l'hydrolysat obtenu avec la métalloprotéase de *P. caseicolum*, ont des points isoélectriques très voisins et peuvent être séparés en deux groupes

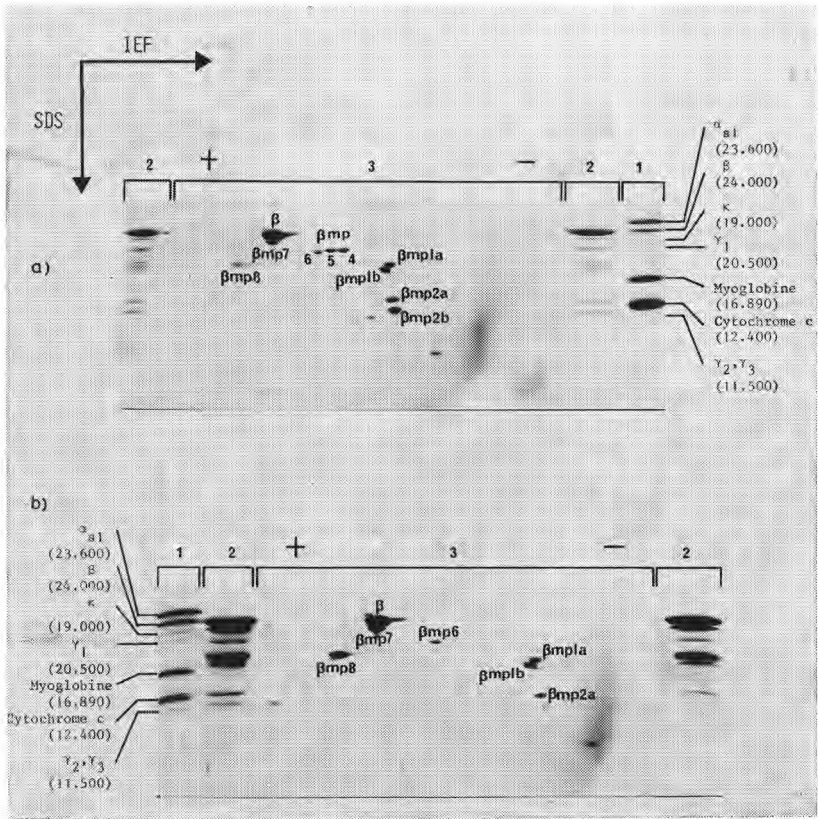


fig. 4

Electrophorèse-SDS (1) d'un mélange de caséine entière bovine, de myoglobine et de cytochrome c. Electrophorèse-SDS (2) et électrophorèse bidimensionnelle (3) de caséine β incubée 120 min avec la métalloprotéase de *P. caseicolum* (a) ou de *P. roqueforti* (b).

SDS-Pore Gradient Gel Electrophoresis of standard molecular weight proteins (1). SDS-PGGE (2) and 2-dimensional electrophoresis (3) of β -casein incubated 120 min with *P. caseicolum* metalloproteinase (a) or *P. roqueforti* metalloproteinase (b).

TABLEAU 1

Estimation des poids moléculaires des produits de dégradation obtenus après action des métalloprotéases de *P. caseicolum* et de *P. roqueforti* sur la caséine β

	<i>P. caseicolum</i>	<i>P. roqueforti</i>
	Poids moléculaire apparent	Poids moléculaire apparent
β mp2b	12 500 (11 800)a	—
β mp2a	13 400 (12 600)a	13 100
β mp1b	16 900	16 400
β mp1a	17 700	17 000
β mp4	19 900	—
β mp5	19 900 (20 500)a	—
β mp6	19 900	19 400
β mp7	20 800	21 100
β mp8	17 100	17 400

a : Poids moléculaire calculé d'après la séquence d'acides aminés du peptide correspondant.

de poids moléculaire apparent (fig. 4 a ; tab. 1) ; leur séparation en deux bandes électrophorétiques (β mp1 et β mp2) est donc sans aucun doute due plus à un effet de tamisage moléculaire qu'à une différence de charge effective entre ces différents produits de dégradation. La bande β mp1, la moins mobile par électrophorèse, doit donc être composée des 2 spots de plus grande taille (β mp1a, β mp1b) cette hypothèse s'est révélée être exacte par la suite lorsque nous avons purifié β mp1 et β mp2. Il apparaît également que la bande électrophorétique β mp7 qui n'était pas mise en évidence par focalisation isoélectrique possède le même point isoélectrique apparent que celui de la caséine β mais s'en distingue par son poids moléculaire apparent qui est légèrement plus faible (fig. 4 a et 4 b). La comparaison des deux gels montre que la métalloprotéase de *P. roqueforti*, en plus de l'absence des spots β mp4 et β mp5, ne produit pas le peptide correspondant au spot β mp2b. Nous avons calculé les poids moléculaires apparents des spots homologues majeurs des deux hydrolysats. Comparés deux à deux, ceux-ci ont des poids moléculaires apparents ne présentant pas de différence significative ; leurs points isoélectriques apparents

étant identiques (fig. 3 b), ils correspondent probablement aux mêmes fragments peptidiques.

Identification des produits de dégradation obtenus après hydrolyse de la caséine β par la métalloprotéase de *P. caseicolum*

La fraction insoluble de l'hydrolysate étudié était principalement constituée des bandes électrophorétiques β mp1, β mp2, β mp4, β mp5, β mp6 et de la caséine β résiduelle (fig. 5 b). Les peptides non retenus sur DEAE-Sephadex étaient élués en deux fractions (fig. 5 a). La première fraction majeure était composée de β mp1 et β mp2 (fig. 5) ; ces deux composants ne pouvant être séparés sur CM-Sephadex, ont été purifiés par chromatographie successive sur Sephadex G-50. Toutefois, ceux-ci apparaissaient encore hétérogènes par électrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS et composées respectivement des spots β mp1a/ β mp1b, et β mp2a/ β mp2b (fig. 4 a et 6). La seconde fraction, mineure, était essentiellement composée de β mp4 (fig. 5 a et 5 b). Les protéines retenues sur DEAE-Sephadex étaient séparées en quatre fractions qui correspondaient, dans l'ordre d'éluion, à β mp5 et β mp6, à la caséine β résiduelle et à un mélange de cette dernière et de peptides de plus grande mobilité électrophorétique.

Les séquences N- et C- terminales ont été déterminées sur les fractions β mp1 β mp1a/ β mp1b), β mp2 (β mp2a/ β mp2b), β mp4, β mp5 et β mp6 ; les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau 2. Tous ces produits de dégradation ont la même séquence C-terminale qui correspond à celle de la caséine β (Ribadeau-Dumas *et al.*, 1972) ; malheureusement, seules les séquences N-terminales de β mp5 et β mp2 ont pu être déterminées avec certitude.

β mp5 apparaît après hydrolyse de la liaison peptidique Lys₂₈-Lys₂₉ et correspond au fragment 29-209 de la caséine β ; sa structure primaire est donc la même que celle de la caséine γ_1 naturellement présente dans le lait et due à l'action de la plasmine sur cette même liaison de la caséine β (Eigel, 1977). Deux autres liaisons doivent être hydrolysées à proximité de la liaison Lys₂₈-Lys₂₉ puisque β mp4 et β mp6 ayant la même séquence C-terminale que β mp5 ont également le même poids moléculaire apparent (β mp6 et β mp4 migrent au même niveau que β mp5 en électrophorèse-SDS) (fig. 4 a ; tab. 1). La fraction β mp2 est composée de deux peptides correspondant aux fragments 91-209 (β mp2a) et 101-209 (β mp2b) de la caséine β et dus respectivement à l'hydrolyse des liaisons Pro₉₀-Glu₉₁ et Glu₁₀₀-Ala₁₀₁.

Trop peu de liaisons peptidiques hydrolysées dans la caséine β ont été identifiées afin de nous permettre de définir une spécificité propre à la métalloprotéase de *P. caseicolum*. Certains résultats méritent cependant d'être soulignés :

a) La métalloprotéase de *P. caseicolum*, et très probablement celle de *P. roqueforti*, hydrolyse la liaison Pro₉₀-Glu₉₁ de la caséine β . Peu d'endopeptidases sont susceptibles d'hydrolyser de telles liaisons

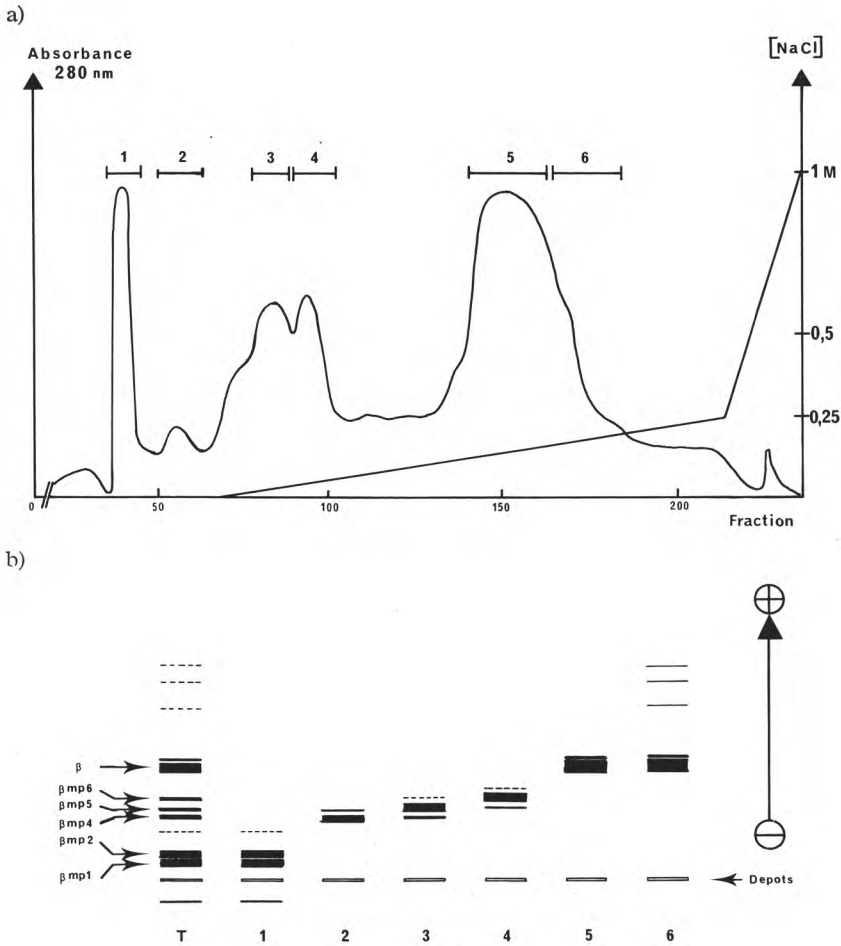


fig. 5

a) : Diagramme d'élution de la fraction azotée insoluble à pH 4,6 de l'hydrolysate de caséine β par la métalloprotéase de *P. caseicolum*. b) : Electrophorégramme (électrophorèse à pH alcalin) de l'hydrolysate témoin (T) et de différentes fractions recueillies après la chromatographie sur DEAE-Sépharose.

a): Elution pattern of DEAE-Sépharose chromatography of pH 4.6 insoluble products obtained after hydrolysis of β -casein by *P. caseicolum* metalloproteinase. b): Electrophograms of the whole pH 4.6 insoluble fraction (T) and of purified fractions obtained after DEAE-Sépharose chromatography.

en raison de la présence d'un résidu prolyl et de sa structure α -iminée ; signalons, cependant, que la thermolysine, métalloprotéase différent de celles de *P. caseicolum* et de *P. roqueforti* par ses propriétés et sa spécificité (Gripon *et al.*, 1980) hydrolyse avec un bon rendement les

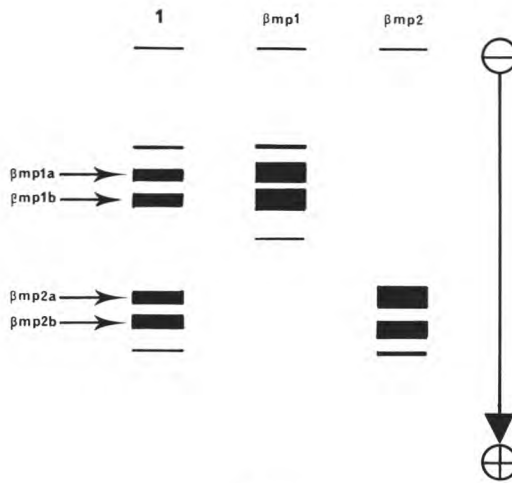


fig. 6

Electrophorogramme (électrophorèse-SDS) de la fraction 1 non retenue sur DEAE-Sépharose et des fractions $\beta mp1$ et $\beta mp2$ après purification successive sur Séphadex G-50.

Electrophoregram (SDS-pore gradient gel electrophoresis) of the unabsorbed protein on DEAE-Sepharose and of fraction $\beta mp1$ and $\beta mp2$ after purification on Sephadex G-50.

liaisons Pro₁₂-Leu₁₃ et Pro₂₇-Val₂₈ de la myoglobine de chien (Dumur et Dautrevaux, 1976) et que, au cours de la détermination de la structure primaire de la caséine β , Ribadeau-Dumas *et al.* (1972) ont montré qu'elle hydrolysait les liaisons Pro₅₁-Phe₅₂, Pro₇₆-Leu₇₇ et Pro₈₁-Val₈₂. D'autre part, la collagénase d'*Achromobacter iophagus* hydrolyse, à un taux faible, certes, les liaisons Pro₆₃-Gly₆₄ de la caséine β (Gilles et Keil) (1976).

b) Les liaisons Lys₂₈-Lys₂₉ et Lys₂₉-Ile₃₀ de la caséine β sont respectivement hydrolysées par la plasmine (Gordon *et al.*, 1972) et les aspartyles protéases de *P. caseicolum* et de *P. roqueforti* (Le Bars et Gripon, 1981 ; Trieu-Cuot *et al.*, 1982) ; il est remarquable de constater que la métalloprotéase de *P. caseicolum* hydrolyse trois liaisons peptidiques, dont la liaison Lys₂₈-Lys₂₉ dans cette région de la caséine β . La structure tridimensionnelle de cette protéine n'est pas connue, mais il ne fait aucun doute que cette partie de la chaîne peptidique doit être particulièrement bien exposée et accessible à ces différentes enzymes.

Nous pouvons conclure que les endopeptidases homologues, excrétées par ces deux moisissures, sont très proches tant par leurs propriétés générales que par leur action sur les caséines. Cependant, les résultats présentés dans cette communication montrent clairement

TABLEAU 2

Identification des produits de dégradation obtenus après hydrolyse de la caséine β par la métalloprotéase de *P. caseicum*

	β mp6	β mp5	β mp4	β mp2	β mp1
Fréquence N-terminale	non déterminée	NH ₂ -Lys-Ile-Glu-Lys-	non déterminée	NH ₂ -Glu-Val-Met- NH ₂ -Ala-Met-Ala-	non déterminée
Fréquence C-terminale	(Ile,Ile,Val)OH	(Ile,Ile,Val)OH	(Ile,Ile,Val)OH	(Ile,Ile,Val)OH	(Ile,Ile,Val)OH
Fragments proposés	—	29-209	—	91-209 101-209	—

que les deux métalloprotéases ont sur ce substrat une action présentant moins de similitude entre elles que celles des aspartyls protéases. La complexité des diagrammes bidimensionnels représentant les hydrolysats de caséine α_{s1} par les métalloprotéases de *P. caseicolum* et de *P. roqueforti* traduit l'hydrolyse d'un grand nombre de liaisons peptidiques dans cette caséine et l'on peut penser que ces deux enzymes ne possèdent pas une spécificité d'action bien définie sur cette protéine. Cette observation est en accord avec la spécificité large observée pour ces deux protéases sur la chaîne B de l'insuline (Gripou et al., 1980).

Remerciements

Nous remercions M. J. Lenoir de nous avoir procuré une préparation purifiée de métalloprotéase de *P. caseicolum*.

Reçu pour publication en février 1982.

Bibliographie

- DESMAZEAUD (M. J.), GRIPON (J. C.), LE BARS (D.) et BERGÈRE (J. L.) (1976). — Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. III. Influence des micro-organismes (*Streptococcus lactis*, *Penicillium caseicolum*, *Penicillium roqueforti*). *Le lait*, 56, 379-396.
- DEVOYOD (J. J.), BRET (G.) et AUCLAIR (J. E.) (1968). — La flore microbienne du fromage de Roquefort. I. Son évolution au cours de la fabrication et de l'affinage du fromage. *Le Lait*, 48, 613-629.
- DUMUR (V.) et DAUTREVAUX (M.) (1976). — Spécificité d'action de la thermolysine sur la myoglobine de chien. *Biochimie*, 58, 525-532.
- EIGEL (W. N.) (1977). — Formation of γ_1 -A², γ_2 -A² and γ_3 -A² caseins by *in vitro* proteolysis of β -casein A² with bovine plasmin. *Int. J. Biochem.*, 8, 187-92.
- GILLES (A. M.) and KEIL (B.) (1976). — Cleavage of β -casein by collagenases from *Acromabacter iophagus* and *Clostridium histolyticum*. *FEBS Lett.*, 65, 369-372.
- GORDON (W. G.), GROVES (M. L.), GREENBERG (R.), JONES (S. B.), KALAN (E. B.), PETERSON (R. F.) and TOWNED (R. E.) (1972). — Probable identification of γ -, TS-, R and S-caseins as fragments of β -casein. *J. Dairy Sci.*, 55, 261-263.
- GRIPON (J. C.), AUBERGER (B.) and LENOIR (J.) (1980). — Metalloproteases from *Penicillium caseicolum* and *Penicillium roqueforti*: Comparison of specificity and chemical characterization. *Int. J. Biochem.*, 12, 451-455.
- 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, 497-514.
- 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. I. Influence de la présure commerciale. *Le Lait*, 55, 502-516.
- GRIPON (J. C.), DESMAZEAUD (M. J.), LE BARS (D.) et BERGÈRE (J. L.) (1977). — Role of proteolytic enzymes of *Streptococcus lactis*, *Penicillium roqueforti* and *Penicillium caseicolum* during cheese ripening. *J. Dairy Sci.*, 60, 1532-1538.
- GRIPON (J. C.) et HERMIER (J.) (1974). — Le système protéolytique de *Penicillium roqueforti*. III. Purification, propriétés et spécificités d'une protéase inhibée par l'E.D.T.A. *Biochimie*, 56, 1323-1332.

- LE BARS (D.) and GRIPON (J. C.) (1981). — Role of *Penicillium roqueforti* proteinases during blue cheese ripening. *J. Dairy Res.*, 48, 479-487.
- LENOIR (J.) (1963). — Notes sur la dégradation des protides au cours de la maturation du Camembert. *Le Lait*, 43, 154-165.
- LENOIR (J.) (1970). — L'activité protéasique dans les fromages à pâte molle. *Rev. Lait. Frse.*, 275, 231-243.
- LENOIR (J.) et AUBERGER (B.) (1977 a). — Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. I. Précaractérisation de l'activité exocellulaire. *Le Lait*, 57, 164-183.
- LENOIR (J.) et AUBERGER (B.) (1977 b). — Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. II. Caractérisation d'une protéase neutre, *Le Lait*, 57, 471-491.
- LENOIR (J.), AUBERGER (B.) et GRIPON (J. C.) (1979). — Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. III. Caractérisation d'une protéase acide. *Le Lait*, 59, 244-268.
- LENOIR (J.), GLENZA (A.), BERGÈRE (J. L.), CERF (O.), CHOISY (C.), DESMAZEAUD (M. J.) et HERMIER (J.) (1973). — Les facteurs de production du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. *Le Lait*, 53, 246-279.
- MERCIER (J. C.), ADDÉO (F.) et PÉLISSIER (J. P.) (1976). — Structure primaire du caséinomacropéptide de la caséine K caprine. *Biochimie*, 58, 1303-1310.
- MERCIER (J. C.), GROSCLAUDE (F.) et RIBADEAU-DUMAS (B.) (1970). — Structure primaire de la caséine α_{S1} bovine. Séquence de 48 résidus d'acides aminés de l'extrémité COOH-terminale. *Eur. J. Biochem.*, 14, 108-119.
- MERCIER (J. C.), MAUBOIS (J. L.), POZNANSKI (S.) et RIBADEAU-DUMAS (B.) (1968). — Fractionnement préparatif des caséines de vache et de brebis par chromatographie sur DEAE cellulose en milieu urée et 2-mercaptoéthanol. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 50, 521-530.
- PETERSON (R. F.) and TOWNED (R. E.) (1972). — Probable identification of γ -, TS-, R- and S-caseins as fragments of β -casein. *J. Dairy Sci.*, 55, 261-263.
- RIBADEAU-DUMAS (B.), BRIGNON (G.), GROSCLAUDE (F.) et MERCIER (J. C.) (1972). — Structure primaire de la caséine β bovine. Séquence complète. *Eur. J. Biochem.*, 25, 505-514.
- STARK (G. R.), STEIN (W. H.) and MOORE (S.) (1960). — Reaction of the cyanates present in aqueous urea with amino acids and proteins. *J. Biol. Chem.*, 335, 3177-3181.
- TRIEU-CUOT (P.) (1981). — Etude des caséines et de leurs produits de dégradation par méthodes électrophorétiques. Application à l'étude de l'affinage du Camembert. Thèse Université Paris XI.
- TRIEU-CUOT (P.), ARCHIERI-HAZE (M. J.) and GRIPON (J. C.) (1982). — Effect of aspartyl proteinases of *Penicillium caseicolum* and *Penicillium roqueforti* on caseins. *J. Dairy Res.* (sous presse).
- TRIEU-CUOT (P.) and GRIPON (J. C.) (1981). — Electrofocusing and two-dimensional electrophoresis of bovine caseins. *J. Dairy Res.*, 48, 303-310.
- URIEL (J.) (1966). — Méthode d'électrophorèse dans des gels d'acrylamide-agarose. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 48, 969-982.
- ZEVACO (C.), HERMIER (J.) et GRIPON (J. C.) (1973). — Le système protéolytique de *Penicillium roqueforti*. II. Purification et propriétés de la protéase acide. *Biochimie*, 55, 1353-1360.