

ISOLEMENT, PURIFICATION ET PROPRIÉTÉS D'UNE PROTÉASE EXOCELLULAIRE DE *MICROCOCCUS CASEOLYTICUS*

M. DESMAZEAUD et J. HERMIER

Station centrale de Recherches laitières et de Technologie des Produits animaux,
Centre national de Recherches zootechniques, 78 - Jouy-en-Josas
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

L'activité protéolytique exocellulaire de *M. caseolyticus* est attribuée à une protéase unique qui a été purifiée 40 fois par précipitation au sulfate d'ammonium à 85 p. 100 de saturation, puis par absorption négative sur D.E.A.E.-cellulose en tampon *Tris*-maléate 0,05 M, suivie d'une chromatographie sur D.E.A.E.-cellulose en tampon *Tris*-maléate 0,005 M et d'une chromatographie sur Sephadex G 100. La préparation purifiée de protéase est homogène à l'ultracentrifugation.

La protéase a les caractères d'un métallo-enzyme : les ions citrate et l'EDTA l'inhibent à 100 p. 100 mais les ions Ca^{++} et Sr^{++} assurent une réactivation partielle (60 p. 100 pour les ions Ca^{++}). Les composés réducteurs l'inhibent partiellement ; le DFP et l'acide iodoacétique n'exercent aucune inhibition. Le poids moléculaire déterminé par filtration sur Séphadex G 100 est de $38\ 000 \pm 3\ 000$. Le coefficient d'extinction E à 20°C en tampon *Tris*-maléate 0,005 M à pH 7 est $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 8,95$ à 280 m μ .

Cette protéase présente une grande affinité vis-à-vis de la caséine ($K_m = 0,128$ p. 100) ; l'hémoglobine dénaturée ($K_m = 2,2$ p. 100) et la β -lactoglobuline ($K_m = 9$ p. 100) sont aussi des substrats. La température optimum est de 50°C (chaleur d'activation $\Delta H = 8\ 640$ calories par mole à 50°C). Le pH optimum est de 7,40.

Même en présence des ions Ca^{++} cette protéase neutre est rapidement inactivée par la chaleur (chaleur d'activation $\Delta H = 27,360$ kilocalories par mole à 50°C). En l'absence d'ions Ca^{++} l'activité n'est conservée que dans une zone de pH très étroite (optimum 7,00) ; en présence d'ions Ca^{++} l'enzyme est stable en milieu alcalin jusqu'à pH 8,50. L'instabilité de la protéase est due à une auto-lyse de la protéine qui est inhibée par les ions Ca^{++} .

INTRODUCTION

Nous avons montré dans la première partie de ce travail (DESMAZEAUD et HERMIER, 1968) qu'une souche de *M. caseolyticus* stimulatrice de la croissance de certaines

Abréviations : *Tris* : tris(hydroxyméthyle) aminométhane ;
EDTA : éthylène diamine tétracétique.
D.E.A.E. : diéthylaminoéthyle.

bactéries lactiques, produit dans certaines conditions de culture un système protéolytique exocellulaire.

Les protéases exocellulaires n'ont été complètement purifiées que chez un nombre limité de genres bactériens (HAGIHARA et *al.*, 1958 ; MORIHARA, 1963 ; MIZUSAWA, 1964 ; McCONN et *al.*, 1964). En ce qui concerne le genre *Micrococcus*, quelques caractéristiques de l'activité protéolytique produite dans le milieu de culture ont été déterminées chez *M. freudenreichii* (HUSAIN et McDONALD, 1958) et *M. caseolyticus* (POZNANSKI, LENOIR et MOCQUOT, 1965).

Dans le présent travail nous avons complètement purifié par chromatographie sur colonne, le système protéolytique produit par *M. caseolyticus*. Nous en avons, d'autre part, caractérisé certaines propriétés et montré en particulier que son instabilité a pour origine une forte activité autoprotéolytique qui est inhibée par les ions calcium.

I. — MATÉRIEL, ET MÉTHODES

1. Souche bactérienne

Les caractères de la souche n° 96 de *M. caseolyticus* utilisée dans ce travail sont décrits dans la première partie (DESMAZEAUD et HERMIER, 1968).

2. Production du système protéolytique

Les conditions de culture sont celles décrites précédemment (DESMAZEAUD et HERMIER, 1968) pour la croissance dans le milieu TGCa maintenu à pH constant. Après 80 heures de culture à 30°C, les cellules sont séparées du milieu par centrifugation à 4°C pendant 30 minutes à 8 000 g dans une centrifugeuse réfrigérée Sorvall.

3. Purification du système protéolytique

Des essais préliminaires ayant montré que les ions calcium sont nécessaires à la stabilité de l'enzyme en solution, le tampon *Tris*-maléate (au pH utilisé pour mettre la protéase en solution au cours de la purification) contient toujours du chlorure de calcium à la concentration de $1,5 \cdot 10^{-3}$ M. Toutes les opérations de purification sont effectuées à la température ambiante à l'exception des dialyses et des centrifugations qui sont faites à 4°C.

Les précipitations par le sulfate d'ammonium sont réalisées par dialyse : la solution enzymatique est dialysée pendant 24 heures à 4°C contre une solution sursaturée de sulfate d'ammonium dont la quantité est calculée de façon à obtenir une concentration égale à 85 p. 100 de la saturation quand l'équilibre des concentrations est réalisé. Au cours de la dialyse quand tout le sulfate d'ammonium est passé en solution, le pH est ajusté à 7,0 par addition d'ammoniaque 6 N.

Cette méthode de précipitation a été préférée à la méthode d'addition directe du sulfate d'ammonium dans la solution à précipiter, car elle permet l'obtention d'un précipité plus gros et par suite plus facilement recueilli par centrifugation à 30 000 g pendant une heure. Le précipité est ensuite dissous dans le tampon *Tris*-maléate et dialysé pendant 24 heures contre ce même tampon.

4. Méthodes et techniques de mesure

L'activité protéolytique est mesurée conformément à la technique décrite dans la première partie de ce travail (DESMAZEAUD et HERMIER, 1968). L'activité spécifique est définie comme le nombre d'unités d'activité protéolytique par mg de protéines ; celles-ci sont dosées par la méthode spectrophotométrique de WARBURG et CHRISTIAN (1941).

La coloration à la ninhydrine est effectuée d'après la méthode de MOORE et STEIN (1948). La courbe standard des densités optiques en fonction de la concentration est obtenue avec de la leucine pure en tampon citrate 0,1 M à pH 5.

Le test d'homogénéité est réalisé dans une ultracentrifugeuse Beckman, modèle E, opérant à 59 780 tours par minute à 20°C. La solution enzymatique (en tampon *Tris*-maléate de sodium 0,005 M, à pH 7,0) est à une concentration de 1 p. 100 ; le volume de la cellule étant de 0,8 ml.

Le poids moléculaire est déterminé par filtration sur gel (ANDREWS, 1964 ; WHITAKER, 1963). La colonne de Sephadex G 100 (25 cm × 2 cm) est préparée en tampon *Tris*-maléate de sodium 0,005 M à pH 7,0. 4 ml d'une solution de protéine à 0,1 p. 100 dans le même tampon sont déposés au sommet de la colonne puis élués. Le volume d'éluat est déterminé à partir de la courbe d'enregistrement de l'absorption de l'éluat à 280 m μ .

II. — RÉSULTATS

A. — Isolement et purification de la protéase

1^{re} étape : Précipitation par le sulfate d'ammonium à 85 p. 100 de saturation.

Les 1 500 ml du surnageant de culture après élimination des cellules bactériennes sont précipités par le sulfate d'ammonium selon la méthode décrite dans le chapitre « Matériel et Méthodes ». Le précipité est redissous dans 40 ml de tampon *Tris*-maléate 0,05 M à pH 7,0, puis dialysé pendant 40 heures contre ce même tampon.

2^e étape : Première chromatographie sur colonne de D.E.A.E.-cellulose.

Cette étape de la purification, ainsi que la suivante, exploitent le fait que le système protéolytique étudié n'est pas retenu sur une colonne de D.E.A.E.-cellulose équilibrée avec du tampon *Tris*-maléate 0,05 M alors qu'il est retenu quand la colonne est équilibrée avec le même tampon 0,005 M.

Les 40 ml de la solution enzymatique contenant 25 mg par ml de protéines sont déposés au sommet de la colonne de D.E.A.E.-cellulose (30 cm × 2 cm) équilibrée avec du tampon *Tris*-maléate 0,05 M. La colonne est éluee par passage du même tampon et les fractions de l'éluat montrant une activité protéolytique sont rassemblées et précipitées par le sulfate d'ammonium. Le précipité obtenu est ensuite redissous dans 17 ml de tampon *Tris*-maléate 0,005 M de pH 7,0 et dialysé 24 heures contre ce même tampon.

3^e étape : Deuxième chromatographie sur colonne de D.E.A.E.-cellulose.

Les 17 ml de solution enzymatique contenant 140 mg de protéines sont déposés sur une colonne de D.E.A.E.-cellulose (26 cm × 1 cm) équilibrée avec du tampon *Tris*-maléate 0,005 M à pH 8,0. La colonne est éluee par passages successifs de solutions de chlorure de sodium à concentration croissante en tampon *Tris*-maléate 0,005 M à pH 7,0. Comme on peut le voir sur la figure 1, la presque totalité du système protéolytique est éluee par la solution de NaCl à 0,1 M. La fraction éluee par la solution de NaCl 0,2 M montre une faible activité protéolytique.

Les fractions correspondant à la partie symétrique du pic d'activité protéolytique sont rassemblées et précipitées par le sulfate d'ammonium à 85 p. 100 de satu-

ration. Le précipité recueilli est redissous dans 6 ml de tampon *Tris*-maléate 0,005 M à pH 7,0 et dialysé 24 heures contre ce même tampon.

4^e étape : Filtration sur colonne de *Sephadex G 100*.

Six ml de la solution enzymatique contenant 23 mg de protéines sont déposés au sommet d'une colonne (25 cm × 2 cm) de *Sephadex G 100* préparée en tampon

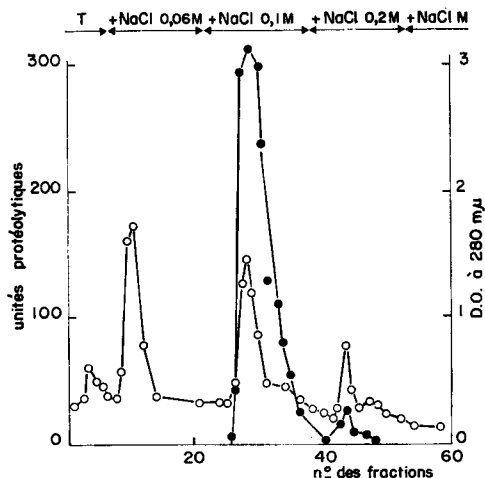


FIG. 1. — Chromatographie sur DEAE-cellulose équilibrée en tampon *Tris*-maléate 0,005 M à pH

T = Tampon de départ : *Tris*-maléate 0,005 M + CaCl_2 $1,5 \cdot 10^{-3}$ M
 ○—○ : courbe d'élution des protéines (densité optique à 280 mμ)
 ●—● : activité protéolytique (unités par ml)

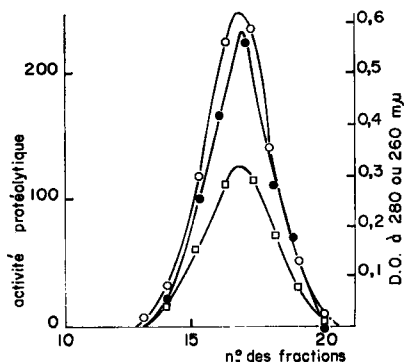


FIG. 2. — Chromatographie sur *Sephadex G 100* de la protéase purifiée

Éluant : tampon *Tris*-maléate 0,005 M + CaCl_2 $1,5 \cdot 10^{-3}$ M
 □—□ : densité optique à 260 mμ
 ○—○ : densité optique à 280 mμ
 ●—● : activité protéolytique (unités par ml)

Tris-maléate 0,005 M. Toutes les protéines sont éluées par ce même tampon en un pic unique qui est symétrique. Le pic d'activité protéolytique coïncide rigoureusement

avec le pic des protéines comme il est montré dans la figure 2. La préparation est donc homogène vis-à-vis de la filtration sur gel.

Les rendements des différentes étapes de la purification sont présentés dans le tableau I.

TABLEAU I

*Processus d'isolement et bilan de la purification
de la protéase exocellulaire de M. caseolyticus*

	Volume (ml)	Activité protéolytique unités/ml	Unités totales	Protéines en grammes	Activité spécifique unités/mg	Rendement (%)	Purifi- cation
Surnageant de culture	1 590	305	485 000	7,79	62,2	100	1
Précipitation par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 85 % saturation	41	7 810	320 000	1,02	312	66	5
Absorption négative sur DEAE-cellulose	320	699	223 000	0,138	1 620	49	26
Précipitation par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 85 % saturation	11,2	13 610	152 900	0,091	1 680	31,5	27
Chromatographie sur DEAE-cellulose	30	2 425	72 800	0,033	2 960	15	38
Précipitation par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 85 % saturation	6,10	9 090	55 200	0,023	2 390	11,4	38,4
Chromatographie sur Sephadex G 100	35	970	33 990	0,013	2 490	7	40

B. — Propriétés physico-chimiques de la protéase

La préparation purifiée de la protéase de *M. caseolyticus* est homogène à l'ultra-centrifugation car l'image obtenue ne présente qu'un pic symétrique.

Le spectre d'absorption en ultraviolet de la protéase en tampon *Tris*-maléate 0,005 M à pH 7,0 et à 20°C, présente un maximum d'absorption à 276 m μ et un minimum d'absorption à 258 m μ (fig. 3). Le coefficient d'extinction $E_{1\text{ cm}}^1\%$ à 280 m μ .

Le poids moléculaire de la protéase neutre est estimé à 38 000 \pm 3 000 par comparaison de son volume d'éluion d'une colonne de Sephadex G 100, avec ceux de la trypsine (poids moléculaire : 24 000), pepsine (poids moléculaire : 36 000) et sérumalbumine (poids moléculaire 69 000) (fig. 4). La trypsine, la pepsine et la sérumalbumine sont des produits *Nutritional Biochemicals Corporation*.

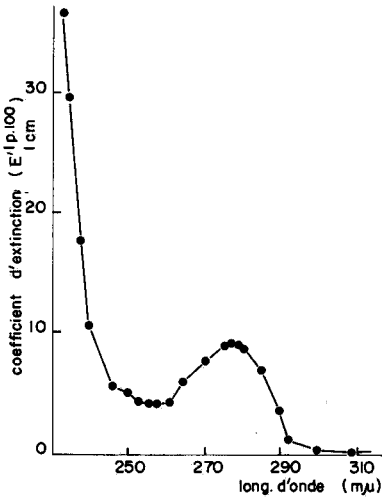


FIG. 3. — Spectre d'absorption ultraviolet de la protéase.

Tampon : Tris-maléate 0,005 M + CaCl₂ 1,5 · 10⁻³ M pH 7,0 à 20°C

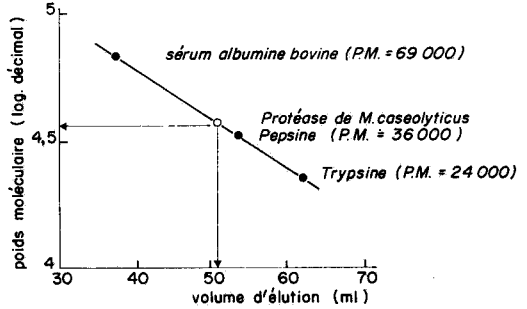


FIG. 4. — Estimation du poids moléculaire de la protéase neutre exocellulaire de M. caseolyticus

C. — Stabilité de la protéase

Influence du pH et des ions calcium.

La solution enzymatique sans calcium est obtenue en dialysant contre du tampon Tris-maléate 0,005 M le volume de solution désiré. En absence d'ions calcium, la protéase n'est stable qu'au voisinage de pH 7. Après 30 mn à 30°C l'enzyme est déjà partiellement inactivé à pH 8,0 ou à pH 6,0. Par contre, en présence d'ions calcium 1,5 · 10⁻³ M, l'enzyme est stable dans les mêmes conditions entre pH 7,0 et 8,5 mais reste instable quand le pH est inférieur à 7,0 (fig. 5).

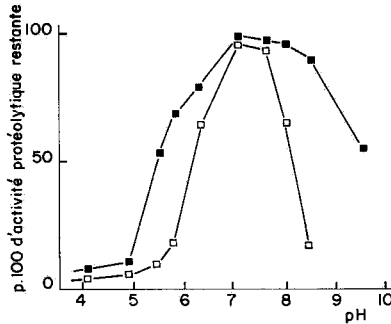


FIG. 5. — Influence du pH et des ions calcium sur la stabilité de la protéase neutre de M. caseolyticus

- pH 10 : Tampon glycine-NaOH 0,05 M
- pH 9 : Tampon Tris-HCl 0,05 M
- pH 5 à 8,60 : Tampon Tris-maléate 0,05 M
- pH 4 : Tampon acétate 0,05 M

L'enzyme est incubé 30 minutes à 30°C aux différents pH. Les ions calcium sont éliminés de la solution de protéase par dialyse à pH 7 à 4°C.

- : enzyme avec calcium (CaCl₂ 1,5 · 10⁻³ M)
- : enzyme sans calcium

L'influence de la concentration des ions calcium sur la stabilité de l'enzyme incubé à 30°C en tampon *Tris*-maléate à pH 7,0 pendant 20 heures et 44 heures est montrée dans la figure 6. La perte d'activité devient notable quand la concentration en ions calcium est inférieure à $1,5 \cdot 10^{-3}$ M.

Cette instabilité de la protéase peut être attribuée à une forte activité auto-protéolytique de l'enzyme, comme cela a été montré chez d'autres protéases (WU et LASKOWSKI, 1956 ; MCCONN *et al.*, 1964). En effet, à la fin de la période d'incubation de 48 heures, on constate une augmentation dans la solution enzymatique du matériel colorable par la ninhydrine, cette augmentation étant d'autant plus forte que l'inactivation de l'enzyme est plus importante, donc que la concentration des ions calcium est plus faible (fig. 6). Cette corrélation entre la perte d'activité et l'apparition de matériel colorable à la ninhydrine peut être montrée au cours de l'incubation à 30°C dans des conditions où l'enzyme perd rapidement son activité (pH 8,4, concentration en ions calcium $5 \cdot 10^{-5}$ M).

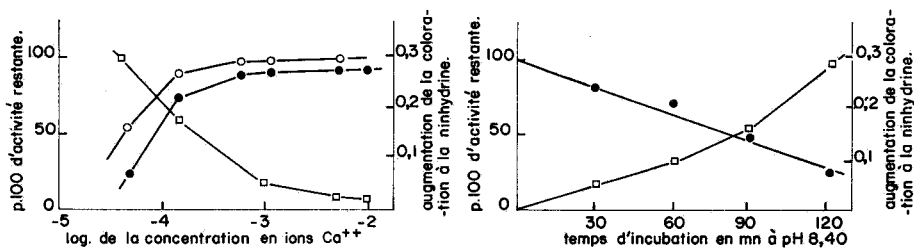


FIG. 6. — Étude de l'autolyse de la protéase neutre

- Partie A □—□ : augmentation de la coloration après colorimétrie à la ninhydrine après 44 heures d'incubation ;
 ○—○ : % d'activité protéolytique restante après incubation à 30°C à pH 7 pendant 20 heures ;
 ●—● : % d'activité protéolytique restante après 44 heures.
 Concentration en protéase : 390 µg dans 1,5 ml de tampon *Tris*-maléate
- Partie B □—□ : augmentation de la coloration après colorimétrie à la ninhydrine ;
 ●—● : % d'activité protéolytique restante.

L'influence stabilisante des ions calcium est aussi observée dans le cas de l'inactivation de l'enzyme par chauffage puisqu'elle est plus rapide en tampon phosphate 0,067 M qu'en tampon *Tris*-maléate 0,005 M contenant des ions calcium $1,5 \cdot 10^{-3}$ M.

L'énergie apparente d'activation E et la chaleur d'activation ΔH pour la réaction d'inactivation de la protéase par la chaleur ont été calculées d'après la méthode proposée par AKIBA et FUKIMBARA (1967). Les valeurs obtenues sont les suivantes :

$$E = 28\,000 \text{ calories par mole et } \Delta H = 27,36 \text{ Kcal par mole à } 50^\circ\text{C.}$$

D. — Facteurs commandant la vitesse de protéolyse de la caséine

1. Influence du pH.

La protéase de *M. caseolyticus* rentre dans la catégorie des protéases neutres puisque la vitesse de protéolyse est maximale à pH 7,40 (fig. 7). Cette valeur est sensiblement la même que celle du pH de stabilité maximale de la protéase. La vitesse de protéolyse décroît rapidement quand le pH est inférieur à 6,50 ou supérieur à 8,50.

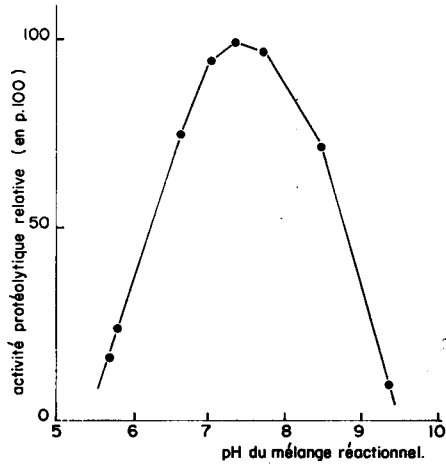


FIG. 7. — Influence du pH réactionnel sur la vitesse de la protéolyse de la caséine

Température d'incubation : 30°C
 Tampon *Tris*-maléate 0,05 M : pH 5,0 à pH 8,60
 Tampon *Tris*-HCl 0,05 M : pH 9,40

2. Influence de la température.

La figure 8 montre la variation de la vitesse de la protéolyse en fonction de la température. Dans les conditions employées (durée de réaction : 10 mn), la température optimale apparente est de 50°C. En fait, elle est probablement un peu supérieure puisque dans les conditions employées 25 p. 100 de l'activité sont déjà perdus à cette température (voir fig. 9). La vitesse de la réaction en fonction de la température suit la loi d'ARRHENIUS (fig. 8 a). L'énergie apparente d'activation E est de 9 100 calories par mole et la chaleur d'activation de 8 460 calories par mole à 50°C.

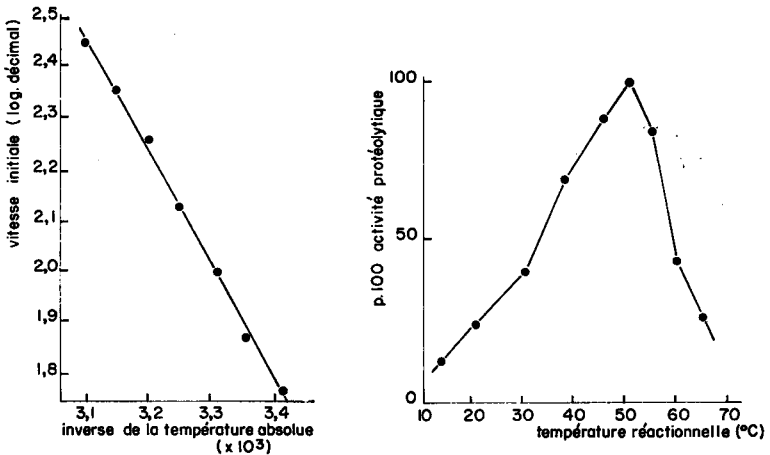


FIG. 8. — Influence de la température sur la vitesse de la protéolyse de la caséine par la protéase neutre

a) Représentation graphique de la loi d'Arrhenius dans le cas de l'hydrolyse de la caséine par la protéase neutre

3. Influence de la concentration en substrat.

La vitesse d'hydrolyse en fonction de la concentration en substrat suit la loi de HENRI (1903) et MICHAELIS-MENTEN (1913). La constante de MICHAELIS (K_m) a été déterminée graphiquement suivant le système de coordonnées de LINEWEAVER-BURK (1934) (fig. 10). Elle a pour valeur 0,128 p. 100 à pH 7,0 dans le cas de la caséine isoélectrique.

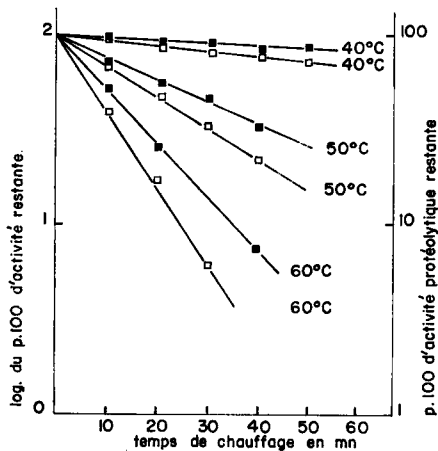


FIG. 9. — Étude de la stabilité thermique de la protéase

—■—■— : Chauffage en tampon Tris-maléate 0,05 M + CaCl_2 $1,5 \cdot 10^{-3}$ M à pH 7,0
 —□—□— : Chauffage en tampon phosphate 0,066 M à pH 7,0

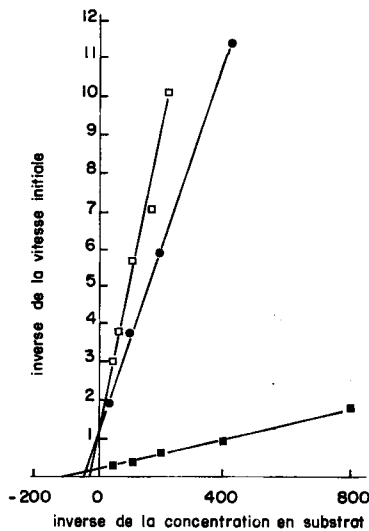


FIG. 10. — Détermination graphique de la constante de MICHAELIS dans le cas de l'hydrolyse de trois protéines substrats

■—■— : caséine isoélectrique
 ●—●— : hémoglobine dénaturée
 □—□— : β -lactoglobuline

L'hémoglobine dénaturée et la β -lactoglobuline (Produits Nutritional Biochemicals Corporation) sont aussi des substrats de la protéase de *M. caseolyticus* ; les constantes de MICHAELIS correspondantes ont pour valeur 2,2 p. 100 et 9 p. 100 à pH 7,0.

Dans le cas de la sérum-albumine de bœuf, la réaction est trop faible pour pouvoir être mesurée avec suffisamment de précision.

E. — Inhibiteurs de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique a été mesurée après 60 mn d'incubation à 30°C dans une solution à pH 7,0 de tampon Tris-maléate 0,005 M du composé essayé.

L'activité protéolytique est complètement inhibée par les ions Fe^{++} , Hg^{++} , Cu^{++} , Ag^{++} , fortement inhibée par les cations Cd^{++} , Zn^{++} et Pb^{++} à la concentration $2 \cdot 10^{-3}$ M et les ions Co^{++} et Mn^{++} à la concentration $2 \cdot 10^{-2}$ M (tabl. 2). Les ions Ca^{++} , Sr^{++} , Mg^{++} , Na^{++} et K^+ ne provoquent pas d'inhibition même à une concentration $2 \cdot 10^{-2}$ M.

La protéase est inhibée par des agents chélateurs (tels que l'éthylènediamine-tétracétate, le 8-quinolinol et les ions citrates) mais pas par les ions oxalates (tabl. 3).

TABLEAU 2

Action inhibitrice des cations sur l'activité protéolytique de la protéase neutre de Micrococcus caseolyticus

	% de l'activité initiale	
	$2 \times 10^{-3} \text{ M}$	$2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$
Fe ⁺⁺	0	
Hg ⁺⁺	0	
Cu ⁺⁺	0	
Ag ⁺⁺	0	
Cd ⁺⁺	4	
Zn ⁺⁺	12	
Pb ⁺⁺	13	
Mn ⁺⁺	75	50
Co ⁺⁺	95	10
Sr ⁺⁺	100	100
Mg ⁺⁺	100	100
Ca ⁺⁺	100	100
Na ⁺	100	100
K ⁺	100	100

TABLEAU 3

Action des inhibiteurs enzymatiques sur l'activité protéolytique de la protéase neutre de Micrococcus caseolyticus

	Concentration employée	% de l'activité initiale
Sulfite de sodium	10^{-1} M	100
Thiosulfite de sodium	10^{-2} M	90
Thioglycollate de sodium	10^{-2} M	97
—	10^{-1} M	32
2-mercapto-éthanol	10^{-1} M	9
L-cystéine	10^{-2} M	2
—	10^{-3} M	46
<i>p</i> -chloromercuribenzoate	$1,5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	44
Acide iodoacétique	10^{-1} M	100
Oxalate d'ammonium	$3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	100
Citrate de sodium	$3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	0
Éthylène-diamine-tétracétique (EDTA)	10^{-5} M	82
8-quinolinol	$3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	0
Diisopropylfluorophosphate (DFP)	10^{-2} M	12
	10^{-3} M	0

Après traitement par une solution d'EDTA 10^{-4} M, la protéase est partiellement réactivée par incubation à 30°C pendant 60 mn dans une solution de chlorure de calcium ou de chlorure de strontium $2 \cdot 10^{-2}$ M. On retrouve ainsi respectivement 60 p. 100 et 40 p. 100 de l'activité initiale après traitement par les cations Ca^{++} et Sr^{++} .

Le diisopropylfluorophosphate, composé qui réagit avec la sérine, n'inhibe pas l'activité de la protéase (tabl. 3).

Parmi les réactifs du groupe sulfhydryle l'acide iodoacétique ne montre aucune action sur l'enzyme alors que celui-ci est partiellement inactivé par le *p*-chloromercuibenzoate à $1,5 \cdot 10^{-2}$ M (tabl. 3).

Enfin, parmi les composés réducteurs le sulfite de sodium ou le thiosulfate de sodium n'affectent pas l'activité enzymatique, alors que le 2-mercaptoéthanol, le thioglycollate de sodium et la L-cystéine à une concentration de 10^{-1} M inhibent l'activité protéolytique. L'effet inhibiteur de la cystéine est encore observable quand celle-ci est à la concentration de 10^{-3} M.

DISCUSSION

Le système protéolytique exocellulaire de *M. caseolyticus* est décomposable en deux constituants par chromatographie sur D.E.A.E.-cellulose. Le constituant élué en premier représente la presque totalité de l'activité protéolytique ; il se comporte comme une protéine homogène à l'ultracentrifugation et à la filtration sur gel. Le constituant élué en second n'a pas été étudié ; il est très possible qu'il représente non pas une autre protéase, mais un ou plusieurs produits de dégradation du premier constituant formé par auto-protéolyse au cours des premières étapes de la préparation de l'enzyme.

Le processus de purification employé ne permet qu'un faible rendement (7 p. 100, purification : 40 fois) qui a en partie pour origine une perte non réversible de l'activité enzymatique au cours des précipitations par le sulfate d'ammonium ; une autolyse partielle au cours des opérations de purification peut aussi contribuer à diminuer le rendement.

La protéase de *M. caseolyticus* est remarquable par son instabilité en absence d'ions calcium. Elle nécessite les ions calcium pour sa stabilité à une concentration minimum de $1,5 \times 10^{-3}$ M. Cette action protectrice des ions calcium est fréquente chez les protéases bactériennes ; elle a été observée en particulier chez les genres proches des microcoques (VALLIER, 1966 ; COLOBERT, 1957 ; GORINI, 1950). Comme pour la protéase neutre de *B. subtilis* (McCONN, 1954) l'action protectrice des ions calcium chez *M. caseolyticus* est due à l'inhibition par ces ions de l'auto-protéolyse de l'enzyme. Il est remarquable que cette inhibition soit obtenue avec des concentrations de chlorure de calcium qui n'ont aucun effet sur l'activité de l'enzyme vis-à-vis d'autres substrats tels que la caséine. Cet effet différentiel des ions calcium pourrait suggérer que le ou les sites actifs de l'enzyme intervenant dans la formation du complexe enzyme-substrat ne sont pas les mêmes quand le substrat est la caséine ou la protéine enzymatique.

La protéase de *Micrococcus caseolyticus* présente la même spécificité de substrat que celle du système protéolytique non purifié de *M. freudenreichii* (HUSAIN et

MCDONALD, 1958), la même température optimale (50°C), mais un pH optimal différent (7,4 chez *M. caseolyticus* ; 6,4 chez *M. freudenreichii*).

L'action des cations et des inhibiteurs de l'activité enzymatique révèle que la protéase de *Micrococcus* présente les caractères d'un métalloenzyme : inactivation par les agents chélateurs et réactivation par certains ions divalents. Ces caractères rapprochent cet enzyme du système protéolytique de *M. lysodeikticus* (GORINI, 1950) et de la protéinase de *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* (BLEIWEIS et ZIMMERMAN, 1964) mais ce dernier enzyme est réactivé par les ions Zn^{++} et non par les ions Ca^{++} après traitement par les agents chélateurs. Les protéases de *M. caseolyticus* et de *Str. faecalis* possèdent d'autres propriétés en commun. En dehors des agents chélateurs leur activité est inhibée par les composés réducteurs alors qu'elle ne l'est pas par des agents se combinant avec les groupes sulfhydryles ou la fonction hydroxyle de la sérine (JANSEN et BALLS, 1952). Les valeurs de l'énergie d'activation sont comparables ainsi que celles de la constante de MICHAELIS pour la caséine (SHUGART et BECK, 1964).

Le poids moléculaire de la protéase de *Micrococcus caseolyticus* est de $38\ 000 \pm 3\ 000$. Il ne peut être comparé à celui du système protéolytique de *M. freudenreichii* ni à celui de la protéase de *Str. faecalis* var. *liquefaciens*. Il est du même ordre de grandeur que celui de la protéase neutre de *B. subtilis* (TSURU, MCCONN et YASUNOBU, 1965) mentionnée plus haut pour son activité auto-protéolytique.

Reçu pour publication en avril 1968.

REMERCIEMENTS

Nous exprimons notre reconnaissance à M. MOCQUOT pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et pour son aide dans l'établissement du manuscrit.

SUMMARY

ISOLATION, PURIFICATION AND PROPERTIES OF AN EXTRACELLULAR PROTEINASE FROM « MICROCOCCUS CASEOLYTICUS »

The extracellular proteolytic activity of *Micrococcus caseolyticus* is due to one proteinase isolated from the culture supernatant. This proteinase was 40 times purified by precipitation with 0,85-saturated ammonium sulfate, then by negative absorption on DEAE-cellulose (0,05 M *Tris*-maleate buffer), chromatography on DEAE-cellulose (0,005 M *Tris*-maleate buffer), and re-chromatography on Sephadex G-100. The ultracentrifugation pattern of the purified enzyme was homogeneous.

The proteinase has the properties of a metal-enzyme. It is 100 per cent inhibited by EDTA, citrates and heavy metal ions. Ca^{++} and Sr^{++} ions induce partial reactivation (60 and 40 per cent respectively). Reducing agents induce partial inhibition ; diisopropylfluorophosphate and iodoacetic acid induce no inhibition.

Molecular weight estimated on Sephadex G-100 was $38,000 \pm 3,000$. The $E_{1\text{an}}^{1\%}$ at 280 m μ was 8,95 at 20°C in 0,005 M *Tris*-maleate buffer at pH 7,0.

The proteolytic activity was much greater with casein ($K_m = 0,128$ p. 100) than with dena-

turated hemoglobin ($K_m = 2.2$ p. 100) and β -lactoglobulin ($K_m = 9$ p. 100). The pH optimum of the enzyme was approximately 7.4. The temperature optimum was 50°C. The energy of activation was 9,100 cal/mole.

The proteinase was easily heat-inactivated even with calcium (heat of activation $\Delta H = 27.36$ kcal/mole at 50°C). Without calcium the enzyme was stable only in a narrow range of pH values about 7.0. In 1.5×10^{-3} M calcium chloride, the enzyme was stable from pH 6.5 to pH 8.5.

The lack of stability of the proteinase is due to protein autolysis which is inhibited by calcium.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AKIBA T., FUKIMBARA T., 1967. Studies on the production of acid-protease by submerged culture of *Rhizopus*. I. Cultural conditions and some properties of the acid-protease. *J. Ferment. Technol.*, **45**, 66-71.
- ANDREWS P., 1964. Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. *Biochem. J.*, **91**, 222-233.
- BLEIWEIS A. S., ZIMMERMANN L., N., 1964. Properties of proteinase from *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*. *J. Bacteriol.*, **88**, 653-659.
- COLOBERT L., 1957. Étude de la protéinase de *Coccus P* (*Sarcina flava*). I. Purification. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **39**, 919-926.
- DESMAZEAUD M., HERMIER J., 1968. Facteurs intervenant dans la production du système protéolytique chez *Micrococcus caseolyticus*. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* (sous presse).
- GORINI L., 1950. Le rôle du calcium dans l'activité et la stabilité de quelques protéinases bactériennes. *Biochim. Biophys. Acta*, **6**, 237-255.
- HAGIHARA B., NAKAI M., MATSUBARA H., OKUNIKI K., 1958. I. Preparation of a crystallized protease. *J. Biochem.*, **45**, 185-194.
- HENRI V., 1903. *Lois générales de l'action des diastases*. Thèse, Paris.
- HUSAIN I., McDONALD I. J., 1958. Characteristics of an extracellular proteinase from *Micrococcus freudenreichii*. *Can. J. Microbiol.*, **4**, 237-242.
- JANSEN E. F., BALLS A. K., 1952. The inhibition of β - and γ -chymotrypsin and trypsin by diisopropyl-fluorophosphate.
- LINWEAVER H., BURK D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658-666.
- MCCONN J. D., TSURU D., YASUNOBU K. T., 1964. *Bacillus subtilis* neutral proteinase. I. A zinc enzyme of high specific activity. *J. Biol. Chem.*, **239**, 3706-3715.
- MICHAELIS L., MENTEN M. L., 1913. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.*, **59**, 333-369.
- MIZUSAWA K., ICHISHIMA E., YOSHIDA F., 1964. Studies on the proteolytic enzymes of thermophilic *Streptomyces*. Part. I. Purification and some properties. *Agr. Biol. Chem.*, **28**, 884-895.
- MOORE S., STEIN W. H., 1948. Photometric ninhydrine method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.*, **176**, 367-388.
- MORIHARA K., 1963. *Pseudomonas aeruginosa* proteinase. I. Purification and general properties. *Biochim. Biophys. Acta*, **73**, 113-124.
- POZNANSKI S., LENOIR J., MOCQUOT G., 1965. La protéolyse de la caséine par les enzymes intracellulaires de certaines bactéries. *Le Lait*, **441-442**, 3-26.
- SHUGART L. R., BECK R. W., 1964. Purification and activity of proteinase of *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*. *J. Bacteriol.*, **88**, 586-590.
- TSURU D., MCCONN J.-D., YASUNOBU K. T., 1965. *Bacillus subtilis* neutral proteinase. II. Some physico-chemical properties. *J. Biol. Chem.*, **240**, 2415-2420.
- VALLIER P., 1966. Sécrétion d'une protéinase par *Micrococcus lysodeikticus* (*Sarcina flava*). Thèse de Doctorat de 3^e cycle. Grenoble.
- WARBURG O., CHRISTIAN W., 1941. Isolierung und Kristallisation des Gärungsferment Enolase. *Biochem. Z.*, **310**, 384-421.
- WHITAKER J. R., 1963. Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on Sephadex. *Anal. Chem.*, **35**, 1950-1953.
- WU F. Ch., LASKOWSKI M., 1956. The effect of calcium on chymotrypsins α and β . *Biochim. Biophys. Acta*, **19**, 110-115.