

## INFLUENCE DU PH SUR LE JET DE PROTONS OBSERVÉ AU COURS DE L'HYDROLYSE DE LA CASÉINE K PAR LA PRÉSURE

J.-C. MERCIER, J. GARNIER

avec la collaboration technique de Ghislaine BRIGNON

*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

Le jet de protons observé au cours de l'hydrolyse de la caséine  $\kappa$  par la présure a été étudié à différents pH et comparé à la libération du caséino-macropéptide. Entre pH 5,2 et 6,2 et à pH inférieur à 4,2 la cinétique du jet de protons est complexe. De pH 4,9 à 7,5 le nombre total de protons libérés est constant et évalué à 1 proton pour trois chaînes polypeptidiques de caséine  $\kappa$  hydrolysées par l'enzyme. De pH 4,9 à 4,0 le nombre de protons libérés décroît très rapidement pour s'annuler. La vitesse initiale du jet de protons présente deux optimums en fonction du pH : l'un vers 5,1, l'autre vers 6,6. Une interprétation du jet de protons est proposée. La libération du caséino-macropéptide est plus simple et la vitesse initiale ne présente qu'un seul optimum vers pH 5,5. Ce n'est que dans certaines zones de pH qu'une relation linéaire est observée entre le jet de protons et l'apparition du caséino-macropéptide.

---

### INTRODUCTION

La caséine  $\kappa$  joue un rôle fondamental dans la formation et la structure des micelles de caséine du lait. Un modèle de disposition spatiale des différentes caséines dans la micelle vient d'être proposé où apparaît clairement le rôle de cette caséine (GARNIER et RIBADEAU-DUMAS, 1968). Aussi ne faut-il pas s'étonner que l'hydrolyse de la caséine  $\kappa$  par la présure soit à l'origine de la coagulation du lait. Il semble maintenant bien établi que le processus de coagulation dépende pour son initiation de la rupture par la présure de la liaison peptidique Phe-Met (DELFOUR *et al.*, 1965 ; JOLLES *et al.*, 1968) en position 120-121 de la chaîne polypeptidique de la caséine  $\kappa$

qui comprend  $166 \pm 1$  résidus d'acides aminés. Cette rupture conduit d'une part à la libération d'un peptide soluble ou caséino-macropéptide de 46 résidus d'acides aminés qui comporte toute la partie glucidique de la caséine  $\kappa$  (ALAIS *et al.*, 1964 ; MCKINLAY et WAKE, 1965) et d'autre part à la formation d'une partie insoluble ou paracaséine  $\kappa$  responsable de la coagulation des micelles de caséine du lait. Cette liaison est hydrolysée très rapidement par la présure ( $k^{cat} \sim 80 \text{ s}^{-1}$  à  $25^\circ\text{C}$  d'après GARNIER, 1963 *a*), ce qui est étonnant vu l'activité protéolytique réduite de cet enzyme dont la spécificité est très mal définie. Lorsque l'on suit l'hydrolyse par la présure de la caséine  $\kappa$ , on observe un jet de protons correspondant à la libération de 1 proton pour trois liaisons peptidiques rompues à pH 7 (GARNIER, 1963 *b*) tandis que la paracaséine  $\kappa$  produite forme un précipité fibrillaire rétractile insoluble dans une large zone de pH (4,6 à 9) mais soluble à pH très acide ou alcalin et en urée 6 M. Il est vraisemblable que ces faits ne sont pas sans rapport entre eux, ni sans intérêt pour aider à comprendre le processus de coagulation du lait lui-même. Aussi avons-nous entrepris de comparer la libération du caséino-macropéptide et le jet de protons dans une gamme étendue de pH alors que cette comparaison n'avait été faite qu'à pH 7 (GARNIER, 1963 *b*). Cette étude devait nous permettre d'évaluer le  $pK$  du groupe impliqué dans ce jet de protons et nous fournir ainsi un premier élément d'appréciation sur sa nature et éventuellement sur son rôle.

## MATÉRIEL, ET MÉTHODES

La caséine  $\kappa$  a été préparée à partir de lait de vache de mélange d'après la méthode de MCKENZIE et WAKE (1961). La présure était une préparation cristallisée HANSEN (1) conservée au congélateur en tampon phosphate M/20 pH 6,3 et décongelée extemporanément.

Le jet de protons a été suivi par potentiométrie à pH constant en utilisant un pHmètre Vibron E. I. L. 33 B et le produit d'hydrolyse ou caséino-macropéptide par détermination de l'azote soluble dans 5 p. 100 d'acide trichloracétique dans les conditions déjà décrites (GARNIER, 1963 *b*). Le pH des solutions de caséine  $\kappa$  dans NaCl 0,1 M était ajusté à la valeur voulue en ajoutant soit NaOH N, soit HCl N. Pour les pH inférieurs à 3, la solution de caséine  $\kappa$  était faite directement à pH 2 dans HCl 0,01 M et NaCl 0,1 M.

Toutes les mesures ont été effectuées à  $25^\circ\text{C}$ .

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Bien que le jet de protons soit faible (1 proton pour trois chaînes de caséine  $\kappa$ , c'est-à-dire 1 eq./gramme pour 55 000-60 000 g de caséine  $\kappa$ ), la méthode est suffisamment sensible pour permettre une étude précise en fonction du temps. La figure 1 montre quelques courbes typiques de libération de protons à différents pH. Le phénomène qui apparaissait simple à pH neutre, se révèle complexe à d'autres pH, entre pH 5,2 et 6,2 notamment, ainsi que pour les pH inférieurs à 4,2 ; dans cette dernière zone, on observe une fixation de protons. Il semble, dans ces conditions, assez difficile d'utiliser cette méthode pour une étude cinétique de la présure dans une gamme

(1) Cette préparation nous a été fournie par B. FOLTMANN que nous remercions encore une fois vivement.

étendue de pH. Cependant, on peut noter qu'entre pH 5,2 et 6,2 il existe toujours une relation linéaire entre la vitesse observée et la concentration d'enzyme (voir fig. 2 a), à condition de prendre pour la vitesse la valeur maximum de cette vitesse qui, dans cette zone de pH, n'est obtenue qu'après quelques minutes : voir courbe pH 5,95 de la figure 1.

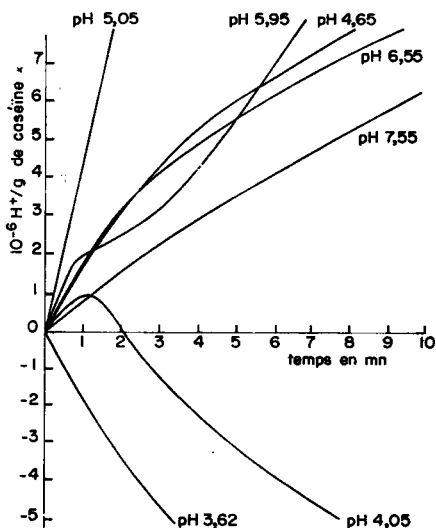


FIG. 1. — Jet de protons pendant l'hydrolyse de la caséine  $\alpha$  à différents pH  
Caséine  $\alpha$  : 4 mg/ml ; NaCl 0,1 M  
Présure :  $26 \cdot 10^{-8}$  UF/ml ou 0,3  $\gamma$ /ml

Nous avons reporté dans la figure 2 b les valeurs de ces vitesses en fonction du pH où deux optimums sont visibles, l'un vers pH 5, l'autre vers pH 6,6. Étant donné la complexité du phénomène observé, nous n'avons pas procédé à une étude cinétique plus complète.

Dans un premier essai d'identification du groupe à l'origine du jet de protons, nous avons étudié la variation du nombre total de protons libérés en fin de réaction à divers pH. Ce nombre est proportionnel à la concentration de caséine  $\alpha$  (fig. 2 c), et il ne varie pas dans les limites des erreurs expérimentales entre pH 5-7,5, mais il décroît très rapidement aux pH inférieurs à 5 (fig. 2 d). Les nombres de protons libérés, respectivement de 1,80 (fig. 2 c) et de  $2,0 \cdot 10^{-5}$  H<sup>+</sup>/g de caséine  $\alpha$  (fig. 2 d) sont obtenus à partir de deux préparations différentes de caséine  $\alpha$ , et se situent dans les limites de variation du nombre total de protons libérés observé par GARNIER (1963 b) à pH 7 soit  $1,85 \pm 0,3 \cdot 10^{-5}$  H<sup>+</sup>/g de caséine  $\alpha$ .

Par contre, la libération du produit d'hydrolyse ne semble pas donner lieu à des phénomènes aussi complexes. En fonction du temps, la cinétique de libération du caséino-macropéptide ne présente pas l'anomalie observée avec le jet de protons de pH 5,2 à 6,2. La variation de la vitesse initiale en fonction du pH ne présente qu'un seul maximum centré vers pH 5,5 (fig. 2 b).

La quantité totale de caséino-macropéptide libéré reste constante dans la zone de pH explorée, de pH 3 à pH 8, ce qui est sans rapport avec la diminution du jet de

protons entre pH 4,9 et 4,0. Cette quantité se situe aux environs de 26 p. 100, exprimés en pour cent de l'azote total, ce qui est assez proche du rapport des longueurs de chaînes des produits de la réaction.

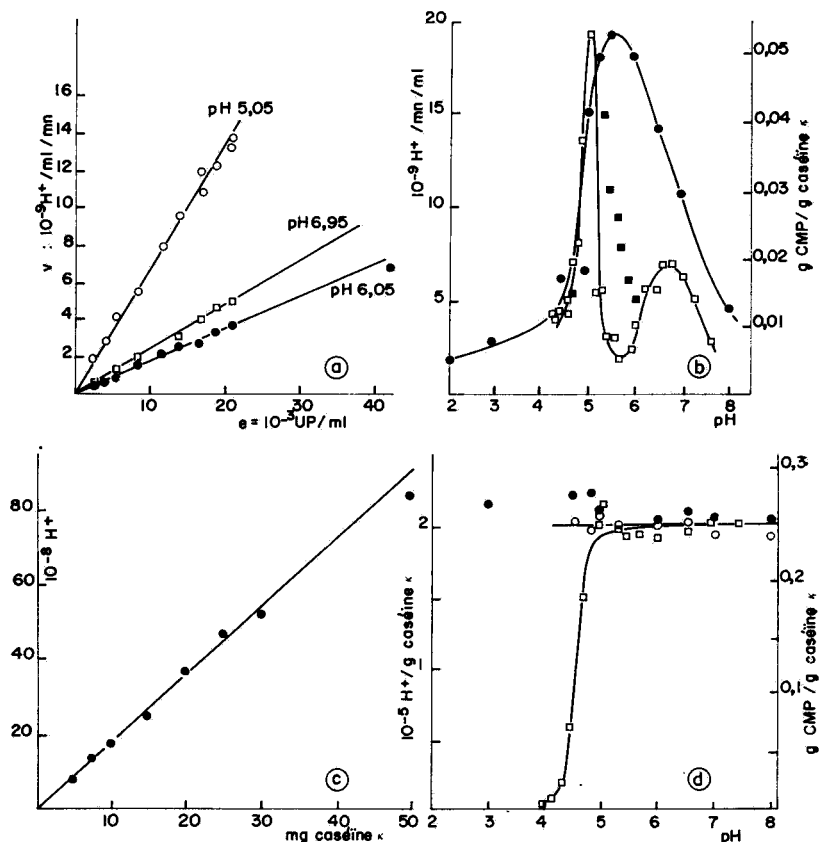


FIG. 2. — Vitesses initiales et nombre de protons libérés en fonction du pH. Comparaison avec la libération du caséino-macropeptide

2 a. — Vitesses initiales du jet de protons à différentes concentrations d'enzyme et à différents pH.  
Caséine  $\times$  : 1,5 mg/ml ; NaCl 0,1 M

2 b. — Vitesses initiales du jet de protons (■, □) et de la libération du caséino-macropeptide (●) à différents pH.

Caséine  $\times$  : 4 mg/ml ; NaCl 0,1 M

Présure :  $26 \cdot 10^{-3}$  UP/ml ou 0,3  $\gamma$ /ml

Les points ■ représentent la vitesse maximum qui n'est pas la vitesse initiale entre pH 5,2 et 6,2.

2 c. — Nombre total de protons libérés en fonction de la concentration  $s$  en caséine  $\times$ .

Caséine  $\times$  :  $V = 5$  ml ;  $s =$  variable

Présure :  $e = 12 \cdot 10^{-3}$  UP/ml ou 0,14  $\gamma$ /ml

2 d. — Nombre total de protons libérés (□) et de caséino-macropeptide libéré (● ; ○) en fonction du pH

Caséine  $\times$  : 4 mg/ml ; NaCl 0,1 M

Présure :  $26 \cdot 10^{-3}$  UP/ml soit 0,3  $\gamma$ /ml

Les points ○ et ● représentent respectivement le caséino-macropeptide libéré après 60 et 120 mn d'hydrolyse.

Il semble donc possible de séparer nettement dans certaines zones de pH, la libération des produits d'hydrolyse et celle des protons, alors qu'à pH 7 une relation linéaire entre les deux phénomènes avait été montrée (GARNIER, 1963 b). En fait,

à pH plus acide, vers pH 5 par exemple, il existe à nouveau une relation linéaire entre les deux phénomènes (fig. 3) alors qu'à pH 5,5 par ex. une partie des résultats se place sur la droite de pH 6,95 et l'autre partie sur une droite parallèle à celle obtenue à pH 5 comme s'il n'y avait que deux types de relations linéaires possibles.

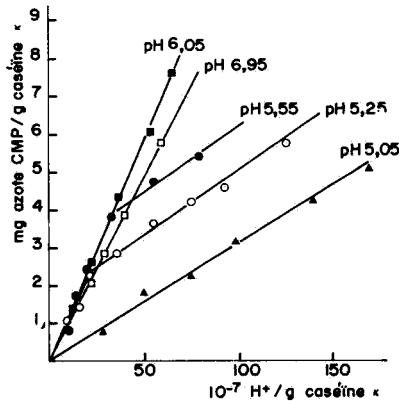


FIG. 3. — Relation entre le jet de protons et le caséino-macropéptide libéré à différents pH

Par ailleurs, la modification d'autres conditions expérimentales comme la force ionique révèle également que le jet de protons et la libération du caséino-macropéptide semble être deux phénomènes que l'on peut dissocier ; pour une force ionique de 0,5 à pH 7, aucun jet de protons n'est observé alors que la vitesse de libération du caséino-macropéptide n'est réduite que d'un facteur trois (GARNIER et MERCIER, 1966).

Il est donc vraisemblable que le jet de protons ne provient pas de la méthionine N-terminale du caséino-macropéptide qui apparaît au cours de l'hydrolyse. Parmi plusieurs hypothèses possibles on peut penser par exemple qu'il a pour origine un changement de conformation consécutif à la rupture de la liaison peptidique Phe-Met. Aux pH inférieurs à 5, ou à force ionique élevée, un tel changement de conformation n'aurait pas lieu ou se serait déjà produit.

La libération d'un proton pour trois chaînes de caséine  $\alpha$  hydrolysées par la présure de pH 5 à 7,5 confirme les résultats antérieurs de GARNIER (1963 b). Or, aucune hétérogénéité n'a pu encore être démontrée entre les chaînes de caséine  $\alpha$ , si ce n'est leur teneur en glucides. Nous avons vérifié que les chaînes dépourvues de glucides donnaient lieu au même jet de protons que les chaînes riches en glucides avec le même rapport de 1 proton pour trois chaînes. Ce résultat curieux est à rapprocher semble-t-il de l'association stœchiométrique des autres caséines avec un trimère de caséine  $\alpha$  observée par GARNIER (1967). Une explication possible est la formation d'un trimère non symétrique par suite d'une contrainte conformationnelle, le jet de proton ne provenant que d'une seule des sous-unités du trimère.

L'absence d'une augmentation significative du jet de protons aux pH supérieurs à 7 suggère par ailleurs un pK anormal pour la méthionine N-terminale du caséino-macropéptide ; ce pK devrait être au moins de l'ordre de 8,5.

La disparition du jet de protons à pH inférieur à 5 dans une gamme de pH infé-

rieur à 1 unité laisse prévoir un effet coopératif impliquant vraisemblablement la protonation de plusieurs groupes carboxyles. En ce qui concerne la nature du groupe à l'origine du jet de protons, nous en sommes réduits aux hypothèses : ce pourrait être par exemple un carboxyle masqué qui par suite du départ du caséino-macropéptide deviendrait titrable et s'ioniserait sauf à pH inférieur à 5. D'autres expériences sont nécessaires pour déterminer la nature de ce groupe, et savoir par exemple s'il intervient dans la stabilité d'une conformation active de la caséine  $\kappa$ , ou s'il joue un rôle dans la précipitation fibrillaire de la paracaséine  $\kappa$ .

La fixation de protons à pH acide pourrait s'expliquer à la fois par l'absence de dissociation du groupe masqué à pH neutre, et par la protonation du groupe  $\alpha$  aminé de la méthionine N-terminale, le carboxyle de la phénylalanine C-terminale de la paracaséine  $\kappa$  ne s'ionisant pas.

Le pH optimum d'action de la présure observé en suivant l'apparition de l'un des produits de la réaction n'est pas très différent de celui observé par FOLTMANN (1959) avec d'autres substrats protéiques. Il semble donc que l'on puisse rapporter les variations de l'activité à une modification de l'état d'ionisation de deux ou plusieurs groupes de l'enzyme, plutôt qu'à des groupes du substrat protéique, groupes dont les pK seraient situés entre pH 4 et 5 d'une part, et entre pH 5,5 et 6,5 d'autre part ; l'absence de substrats simples ne permet pas d'émettre actuellement des conclusions plus précises.

Il reste également à comprendre pourquoi cette liaison Phe-Met est hydrolysée aussi rapidement par la présure, alors que celle-ci n'hydrolyse pas le NCbz-L-phényl-alanyl-L-méthionine amide. La spécificité de l'enzyme dépend vraisemblablement d'un ou plusieurs résidus d'acides aminés assez éloignés dans la séquence de la liaison Phe-Met, comme semble l'indiquer les travaux de HILL (1968).

En conclusion, si le jet de protons observé doit être rapporté vraisemblablement au remaniement de structure de la caséine  $\kappa$  causé par le départ du caséino-macropéptide, sa complexité en rend l'interprétation encore très difficile.

*Reçu pour publication en mars 1969.*

## SUMMARY

### EFFECT OF PH ON THE PROTON BURST OCCURRING DURING K-CASEIN HYDROLYSIS BY RENNIN

The proton burst occurring during K-casein hydrolysis by rennin was studied at various pH values, and its pattern was compared to that of the caseino-macropéptide release.

At pH values from 5.2 to 6.2 and below 4.2, the kinetics of the proton burst is very complex. At pH values ranging from 4.9 to 7.5, the total number of protons released is constant, viz. 1 proton per 3 hydrolysed polypeptide chains of K-casein or a trimer. At pH values between 4.9 and 4.0, the rate of proton burst sharply decreases to 0. The rate of burst shows two peaks at pHs 5 and 6.6.

It is suggested that the proton burst originates from a masked carboxyl group unmasked by the caseino-macropéptide release, and from a change in the conformation of para-K-casein.

The lack of significant increase in the proton burst at pH values higher than 7 suggests that the apparent pK of the N-terminal methionine is anomalous (8.5 or more). The initial rate of the caseino-macropéptide release shows only one peak at pH 5.5. A linear relationship between the proton burst and the caseino-macropéptide release exists only within certain ranges of pH, higher than 6.2 and from 4.2 to 5.3.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALAIS C., BLONDEL-QUEROIX J., JOLLES P., 1964. Étude des substances solubles formées au cours de la réaction de la présure sur la caséine  $\kappa$ . II. Composition chimique ; fractionnement par l'acide trichloracétique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **46**, 973-980.
- DELFOUR A., JOLLES J., ALAIS C., JOLLES P., 1965. Caseino-glycopeptides : Characterization of a methionine residue and of the N-terminal sequence. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **19**, 452-455.
- GARNIER J., 1963 a. Étude cinétique d'une protéolyse limitée : action de la présure sur la caséine  $\kappa$ . *Biochim. Biophys. Acta*, **66**, 366-377.
- GARNIER J., 1963 b. Étude de l'action de la présure sur la caséine  $\kappa$  par la méthode titrimétrique à pH constant. Comparaison avec d'autres méthodes. *Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.*, **3**, 71-90.
- GARNIER J., MERCIER J.-C., 1966. Investigation of the proteolytic activity of crystalline rennin on the individual components of casein, to obtain information on the coagulation of milk which can be applied to improving cheese manufacturing processes and the quality of cheese. *Final Technical Report of Project Number UR-E9-(60)-47, Grant Number FG-Fr-103-61*.
- GARNIER J., 1967. Extension of the continuous variation method to protein interactions :  $\alpha_1^-$  and  $\beta^-$  caseins associations with  $\kappa^-$  casein. *Biopolymers*, **5**, 473-475.
- GARNIER J., RIBADEAU-DUMAS B., 1968. Casein micelle structure. II. A plausible model (envoyé pour publication).
- HILL R. D., 1968. The nature of the rennin-sensitive bond in casein and its possible relation to sensitive bonds in other proteins. *Biochim. Biophys. Res. Com.*, **33**, 659-663.
- FOLTMANN B., 1959. Studies on rennin. II. On the crystallisation, stability, proteolytic activity of rennin. *Acta Chem. Scand.*, **13**, 1927-1935.
- JOLLES J., ALAIS C., JOLLES P., 1968. The tryptic peptide with the rennin-sensitive linkage of cow's  $\kappa$ -casein. *Biochim. Biophys. Acta*, **168**, 591-593.
- MCKENZIE H. A., WAKE R. G., 1961. An improved method for the isolation of  $\kappa^-$  casein. *Biochim. Biophys. Acta*, **47**, 240-242.
- MCKINLAY A. G., WAKE R. G., 1965. Fractionation of S-carboxymethyl- $\kappa$ -casein and characterization of the components. *Biochim. Biophys. Acta*, **104**, 167-180.