

MISE EN ÉVIDENCE
ET CARACTÉRISATION PARTIELLE
DE DIFFÉRENTES PEPTIDASES
CHEZ *SACCHAROMYCES LACTIS*

M.-J. DESMAZEAUD et J.-J. DEVOYOD*

avec la collaboration technique de C. AURIAULT

*Laboratoire de Biochimie microbienne,
Centre national de Recherches zootechniques, I. N. R. A.,
78350 Jouy en Josas*

* *Laboratoire de Recherches fromagères, I. N. R. A.,
15000 Aurillac*

RÉSUMÉ

Après broyage des cellules aux ultrasons une activité de type carboxypeptidase (EC 3.4.2) était mise en évidence à pH 7,0 sur les substrats synthétiques Z-Gly-Leu, Z-Gly-Phe et Z-Glu-Tyr. Après élimination des acides nucléiques et précipitation au sulfate d'ammonium trois activités de type aminopeptidase (EC 3.4.1) étaient mises en évidence sur le substrat Leucine-para-nitro-anilide (LNA) et isolées par chromatographies sur DEAE-cellulose et ECTEOLA-cellulose. Les aminopeptidases (AP 1, AP 2, AP 3) ont les caractères de métalloenzymes : l'EDTA et l'*o*-phénanthroline inhibent fortement les peptidases AP 1 et AP 2, totalement l'enzyme AP 3. Cette dernière est aussi inactivée par la cystéine et le β -mercaptoéthanol. Les peptidases AP 1, AP 2, AP 3, ont respectivement comme pH optimum : 5,0, 7,1 et 8,0 et présentent une stabilité maximum de pH 7,0 à 8,0. Leur température optimale d'hydrolyse de la LNA est de 40 à 45°C (l'énergie apparente d'activation de la peptidase AP 1 est de 10 000 cal/mole). L'enzyme AP 3 est stable à 50°C ; 50 p. 100 d'activité sont détruits après une incubation à 70°C pendant 15 mn. La peptidase AP 1 est stable jusqu'à 65°C ; 28 p. 100 d'activité sont détruits après incubation à 70°C pendant 10 mn. Ces peptidases présentent d'autre part une spécificité différente vis-à-vis de l'hydrolyse de nombreux peptides de synthèse.

ABRÉVIATIONS

Tris : Tris-(hydroxyméthyle)-aminométhane ;
DEAE : Diéthylaminoéthyle ;
ECTEOLA : Épichlorohydrine-triéthanolamine ;
LNA : Leucine-para-nitroanilide ;
Z : Benzylloxycarbonyle ;

- DO : Densité optique ;
 EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique (sel disodique) ;
 p-CMB : Para-chloromercuribenzoate de sodium ;
 DFP : Diisopropyle fluorophosphate.

INTRODUCTION

Parmi les microorganismes qui constituent la flore naturelle du fromage de Roquefort les streptocoques lactiques, les *Leuconostoc* et les lactobacilles mésophiles ont des besoins nutritifs en peptides et en acides aminés, qui peuvent être assurés par des microorganismes protéolytiques (DEVOYOD et DESMAZEAUD, 1970 et 1971). Or, dans les fromages bleus, les levures, peu nombreuses en général dans le lait de fabrication se multiplient rapidement au cours des 24 premières heures qui suivent l'emprésurage. A ce stade on rencontre des levures fermentant le lactose dont l'espèce *Saccharomyces lactis* (DEVOYOD et SPONEM, 1970). Puis au moment du salage ces levures se lysent. On peut se demander si la stimulation des bactéries lactiques constatée à ce stade de la fabrication n'est pas due aux peptides et acides aminés libérés lors de cette lyse cellulaire. C'est la raison qui nous a conduit à entreprendre l'étude du système peptidasique intracellulaire de *S. lactis*.

A notre connaissance aucune détermination précise des activités protéolytiques ou peptidasiques n'a été effectuée chez *S. lactis*. Par contre chez *Saccharomyces cerevisiae* plusieurs types de protéinases (FÉLIX et BROUILLET, 1966 ; HATA, HAYASHI et DOI, 1967 ; LENNEY et DALBEC, 1967) ou de carboxypeptidases (HAYASHI, AIBARA et HATA, 1970 ; FÉLIX et BROUILLET, 1966) ont été isolés et caractérisés. De même, chez *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* (CORDONNIER, 1966) l'activité amino-carboxypeptidasique (dipeptidase) a été étudiée de façon approfondie. De plus, quatre enzymes protéolytiques ont été caractérisées chez *Saccharomyces carlsbergensis* (MADDOX et HOUGH, 1970). Enfin, une protéase acide exocellulaire a été purifiée et ses propriétés déterminées chez *Rhodotorula glutinis* (KAMADA, ODA et MURAO, 1972).

TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

Organisme

Saccharomyces lactis souche SL 310. Les caractéristiques biochimiques de cette souche ont été décrites antérieurement (DEVOYOD et SPONEM, 1970).

Extrait cellulaire

Les 330 g de cellules provenaient de 160 litres d'une culture sur un milieu à l'extrait de malt (Malt Extract Broth Difco (n° 113) : 30 g ; yeast extract Difco : 1,6 g ; q. s. 1 000 ml d'eau distillée) ajusté à pH 4,50 avec de l'acide lactique concentré. Après une incubation de 40 heures à 22°C les cellules étaient récoltées par centrifugation à 17 000 g (centrifugeuse Sharples réfrigérée). La croissance étant contrôlée par mesure de la DO des cultures à 650 nm, ce temps permet d'atteindre la phase stationnaire pour laquelle la plus grande activité peptidasique était détectée (essais préliminaires non reportés dans ce mémoire). Les cellules étaient lavées deux fois par du tampon

Tris-maléate de sodium 0,005 M à pH 7,10 et remises en suspension dans ce même tampon, puis soumises à un traitement aux ultrasons dans un appareil Siduse US-77-7 à une fréquence de 23 Khz pendant 15 mn ; la température pendant le traitement était maintenue à 4°C. La suspension cellulaire était ensuite centrifugée à 27 000 g pendant 1 heure à 4°C et le surnageant conservé (surnageant S 1).

Procédé d'isolement et de purification partielle des aminopeptidases

1^{re} étape : Élimination des acides nucléiques.

Les acides nucléiques étaient hydrolysés en ajoutant à 1 150 ml du surnageant S 1, 38 mg de ribonucléase (Sigma), 0,8 mg de désoxyribonucléase (Sigma) et 2 g de chlorure de magnésium. Après incubation pendant 2 heures à 30°C avec agitation lente, 12,5 g de sulfate de manganèse étaient ajoutés. Après 1 heure à 4°C le précipité était éliminé par centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C et le surnageant (S 2) recueilli.

2^e étape : Précipitations au sulfate d'ammonium.

L'opération était effectuée en deux étapes. Une première précipitation était obtenue après addition de 291 g de sulfate d'ammonium à 1 200 ml de surnageant S 2 (soit 40 p. 100 de saturation en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ; après 90 minutes à 4°C sans agitation, le précipité était éliminé par centrifugation à 10 000 g pendant 30 minutes à 4°C ; seul le surnageant S 3 contenait une activité peptidasique. Une deuxième précipitation était effectuée sur 1 360 ml de ce dernier surnageant par addition de 387 g de sulfate d'ammonium (soit 80 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium) après 15 heures à 4°C sans agitation, le précipité, qui contient l'activité peptidasique, était recueilli par centrifugation à 10 000 g pendant 30 minutes à 4°C et redissous (extrait E 1) dans environ 130 ml de tampon *Tris*-maléate de sodium 0,005 M à pH 7,10.

3^e étape : Chromatographie sur gel de Sepharose 6 B.

Le gel de Sepharose 6 B (Sephadex) était abondamment lavé sur un filtre en verre fritté G₃ par le tampon *Tris*-maléate de sodium 0,005 M à pH 7,10 puis versé dans une colonne de chromatographie. Soixante-cinq millilitres d'extrait peptidasique E₁ préalablement dialysés pendant 16 heures à 4°C contre le tampon *Tris*-maléate étaient ensuite déposés au sommet de cette colonne. Les fractions étaient recueillies au moyen d'un collecteur GME et l'on enregistrait en continu la densité optique à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre enregistreur Seive. On réunissait celles présentant l'activité peptidasique la plus forte (extrait F) et l'on concentrait les protéines dans une cellule Diaflo (Amicon) sur une membrane UM 10 Diaflo.

4^e étape : Chromatographie sur DEAE-cellulose.

Vingt millilitres d'extrait F étaient déposés au sommet d'une colonne de DEAE-cellulose DE-23 (Whatman) préalablement équilibrée en tampon *Tris*-maléate de sodium 0,005 M à pH 7,10. Après lavage de la colonne par 226 ml du tampon d'équilibrage l'élution était réalisée par application d'un gradient linéaire de concentration en chlorure de sodium en tampon *Tris*-maléate de sodium 0,005 M à pH 7,10. Les fractions étaient recueillies et dosées comme décrit ci-dessus puis réunies en quatre extraits : F 1, F 2, F 3 et F 4.

5^e étape :

a) Chromatographie sur ECTEOLA-cellulose.

La fraction F 3 après concentration sur membrane Diaflo UM 10 et dialyse pendant 16 heures à 4°C contre le tampon *Tris*-maléate était déposée au sommet d'une colonne d'ECTEOLA-cellulose E 9126 (Sigma) préparée en tampon *Tris*-maléate de sodium 0,005 M à pH 7,10. Après lavage de la colonne par 194 ml du tampon d'équilibrage, l'élution était réalisée par application d'un gradient linéaire de concentration en chlorure de sodium dans ce même tampon. Les fractions étaient recueillies et dosées comme précédemment puis réunies en trois extraits F 3a, F 3b et F 3c

b) Chromatographie sur Bio-Gel P-100.

La fraction F 4 était chromatographiée sur une colonne (75 × 3,5 cm) de Bio-Gel P-100 (Bio-Rad Laboratories) préalablement équilibrée dans le tampon *Tris*-maléate de sodium 0,005 M à pH 7,10. Les fractions étaient recueillies et dosées comme décrit ci-dessus et divisées en deux extraits peptidasiques actifs sur les peptides de caséine : F 4a et F 4b.

6^e étape : Chromatographie sur gel de Sephadex G-100.

Les différentes fractions actives ainsi isolées étaient finalement chromatographiées sur une colonne (98 cm × 2) de Sephadex G-100 équilibrée en tampon *Tris*-maléate de sodium 0,005 M à pH 7,10. La colonne était étalonnée avec le *Blue*-dextran 2000 (Sephadex), la sérum-albumine bovine (Sigma) et la ribonucléase (Calbiochem).

Dosage des activités peptidasiques

Origine des substrats.

Tous les produits utilisés sont de forme L.

- Amides d'acides aminés : Cyclo ; leucine-para-nitro-anilide (LNA) : Sigma ;
- Dipeptides non substitués : Gly-Gly : NBC ; Gly-Phe : Mann ; tous les autres : Cyclo ;
- Dipeptides monosubstitués : Z-Gly-Phe : Fluka ; Z-Gly-Ala ; Z-Gly-Leu et Z-Glu-Tyr : Cyclo.
- Dipeptides disubstitués : Z-Gly-Tyr-NH₂, Z-His-Phe-NH₂, Z-Thr-Phe-NH₂, Z-Ala-Phe-NH₂ : Cyclo ; Z-Gly-Leu-NH₂ : Mann.
- Tripeptides non substitués : Gly-Tyr-Gly, Gly-Trp-Gly : Cyclo et Gly-Gly-Gly-Gly : Mann.
- « Peptides de caséine à 0,02 p. 100 » : cette solution était obtenue par hydrolyse de la caséine entière par la protéase neutre de *Micrococcus caseolyticus* comme décrit précédemment (DESMAZEAUD et HERMIER, 1972).
- Glucagon : Calbiochem.

Dosage quantitatif des activités aminopeptidasiques

— Substrat leucine-para-nitroanilide (LNA) (RONCARI et ZUBER, 1969) : le mélange réactionnel avait la composition suivante : 0,1 ml d'une solution de LNA en méthanol (à 6,4 mg de LNA pour 1 ml de méthanol) ; 2,8 ml de tampon *Tris*-maléate de sodium 0,005 M à pH 7,10 ; 0,1 ml de solution enzymatique. Après incubation à 37°C pendant différents intervalles de temps la réaction était arrêtée par addition de 0,5 ml d'acide acétique à 30 p. 100 (poids/volume). La variation de densité optique était mesurée à 410 nm. Bien que plus précise la méthode spectrophotométrique continue n'a pu être employée, le spectrophotomètre utilisé n'étant pas équipé de cuves thermostatées.

— Substrats dipeptides monosubstitués et « peptides de caséine » : le mélange réactionnel avait la composition suivante : 0,9 ml de substrat à une concentration de 1 mM pour les dipeptides monosubstitués ou à 0,02 p. 100 pour les « peptides de caséine » en tampon *Tris*-maléate de sodium 0,005 M à pH 7,10 ; 0,1 ml de solution enzymatique. Après incubation à 37°C pendant différents intervalles de temps, la réaction était arrêtée en portant le mélange réactionnel au bain-marie bouillant pendant 15 mn après addition de 1 ml du réactif à la ninhydrine (MOORE et STEIN, 1954). La variation de densité optique était mesurée à 570 nm après dilution dans l'alcool à 50 p. 100.

Dosage qualitatif des activités amino- ou carboxypeptidasiques

Le mélange réactionnel avait la composition suivante : 0,1 ml de substrat à une concentration de 1 mM en tampon *Tris*-maléate de sodium 0,005 M à pH 7,10 ; 0,1 ml de solution de peptidase. Après incubation pendant différents intervalles de temps à 37°C les mélanges réactionnels étaient déposés en spots sur une feuille de papier Whatman 3 MM et la détection des peptides ou (et) des acides aminés éventuellement libérés par l'hydrolyse était effectuée après chromatographie descendante ou électrophorèse à haut voltage selon des techniques décrites ailleurs (DESMAZEAUD, 1972).

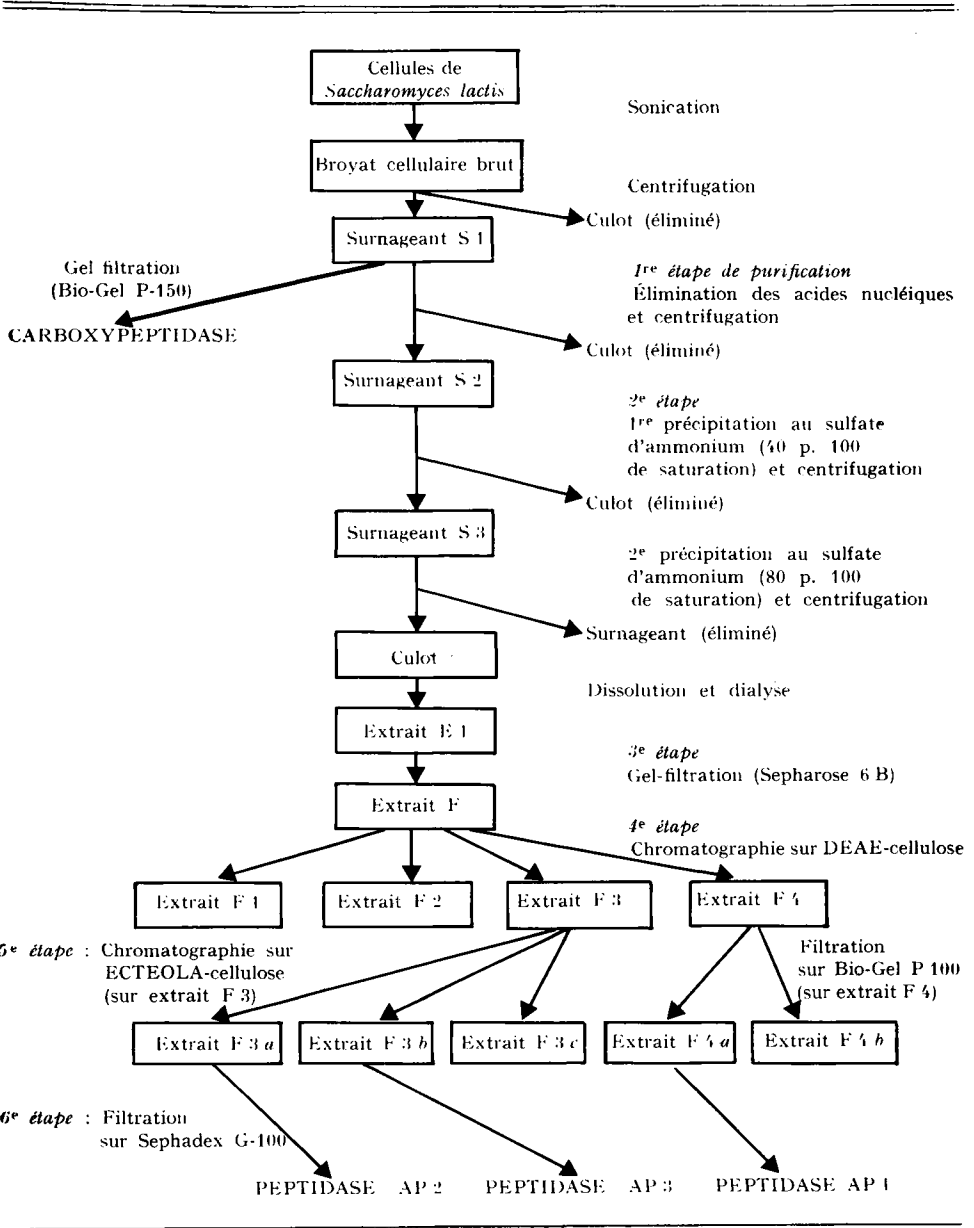
RÉSULTATS

1. — Séparation des différentes aminopeptidasases

Après élimination des acides nucléiques par traitement aux nucléases, précipitations au sulfate d'ammonium et chromatographie sur Sépharose 6 B, on ne détectait plus aucune activité carboxypeptidasique (tabl. 1). L'utilisation d'un substrat

TABLEAU I

Schéma d'isolement et de purification des différentes peptidases de *S. lactis*



complexe (« peptides de caséine ») pour détecter l'activité après chromatographie sur Sépharose 6 B, montre l'existence à ce stade de purification, de plusieurs peptidases (fig. 1). Un gradient linéaire de concentration en chlorure de sodium permet l'éluion distincte de quatre activités peptidasiques (F 1 à F 4) sur DEAE-cellulose (fig. 2 A et tabl. 1). Seules ont été retenues les fractions les plus actives F 3 et F 4. La fraction F 3 était décomposée en trois extraits actifs par chromatographie sur ECTEOLA-cellulose (fig. 2 B et tabl. 1) ; la plupart des protéines non actives étant

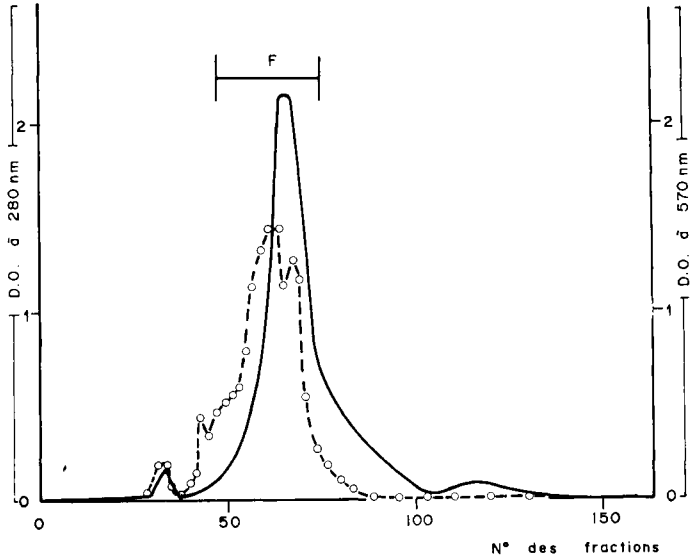


FIG. 1. — Chromatographie sur Sepharose 6 B de l'Extrait E 1 (après précipitation au sulfate d'ammonium)

Colonne $100 \times 4,5$ cm ; débit 55 ml/h ; volume des fractions 15 ml ; tampon Tris-maléate de sodium ; pH 7,10

— DO à 280 nm = éluion des protéines ;
 ○ — — — ○ DO à 570 nm = activité peptidasique (substrat : peptides de caséine).

éluées au début du gradient, ce fait explique la non-correspondance entre les pics principaux de protéines et ceux obtenus après dosage sur la LNA ; la fraction F 4 était purifiée par passage sur Bio-Gel P-100 et une seule activité peptidasique notable était détectée (F 4a) (tabl. 1). Après chromatographie sur Séphadex G-100 seules les fractions F 4a, F 3a et F 3b présentant une stabilité satisfaisante pendant la conservation à -30°C ont été étudiées ; les peptidases ainsi obtenues seront respectivement désignées AP 1, AP 2 et AP 3 (tabl. 1). Cette dernière étape de purification permet d'estimer leur poids moléculaire respectivement à environ 100 000, 71 000 et 69 000 daltons.

2. — Caractérisation partielle des aminopeptidases

Activités en fonction du pH.

La peptidase AP 1 présente un optimum d'activité envers la LNA de pH 5,0 à 6,0 (fig. 3). Elle est active dans une large zone de pH puisque les activités mesurées à pH 4,10 ou pH 8,2 représentent encore respectivement 33, ou 42 p. 100 de cette

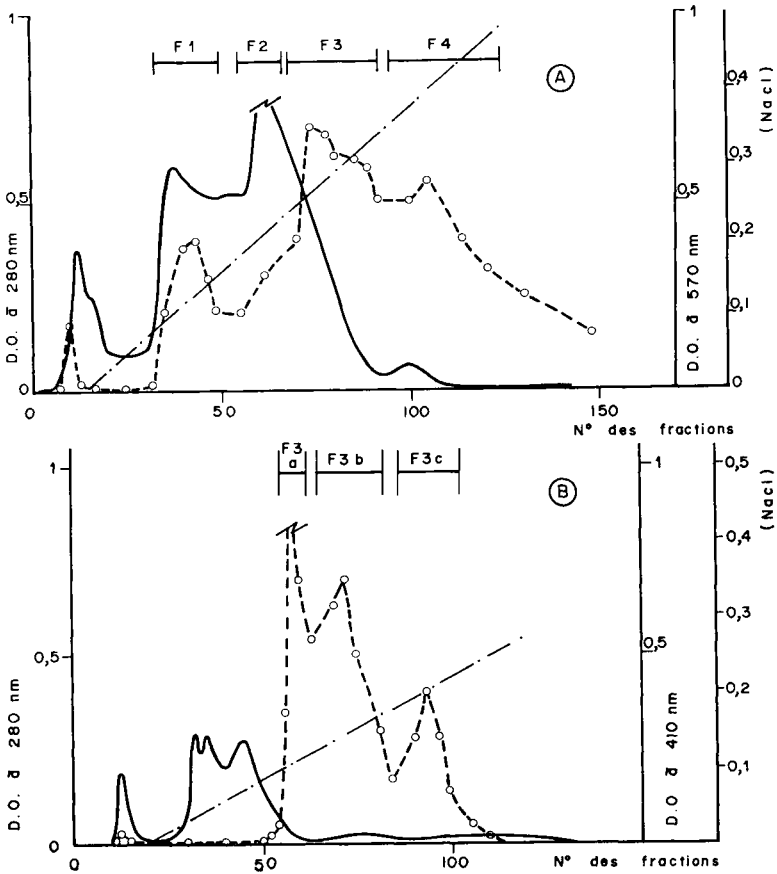


FIG. 2.

A : Chromatographie sur DEAE-cellulose DE-23 de l'extrait peptidasique après Sepharose 6 B. Colonne 50 × 2 cm ; volume des fractions 15 ml ; débit 45 ml/h ; tampon Tris-maléate de sodium 0,005 M ; pH 7,10.

B : Chromatographie sur ECTEOLA-cellulose de l'extrait F 3 précédent. Colonne 35 × 2 cm ; volume des fractions : 9,7 ml ; débit 38 ml/h ; tampon Tris-maléate de sodium 0,005 M ; pH 7,10.

- DO à 280 nm = élution des protéines ;
- — — — ○ DO à 570 nm (substrat : peptides de caséine) = activité peptidasique ;
- ····· ○ DO à 410 nm (substrat : LNA) = activité peptidasique ;
- — ····· · NaCl = pente du gradient de concentration en NaCl.

activité maximum mesurée à pH 5,0. La vitesse d'hydrolyse de la LNA par la peptidase AP 2 est maximum à pH 7,0 (fig. 3). La vitesse de la réaction mesurée à pH 6,0 ou pH 8,6 représente encore respectivement 54 ou 56 p. 100 de celle obtenue à pH 7,0. Enfin, la peptidase AP 3 a un pH optimum d'activité de 8,0. La vitesse d'hydrolyse

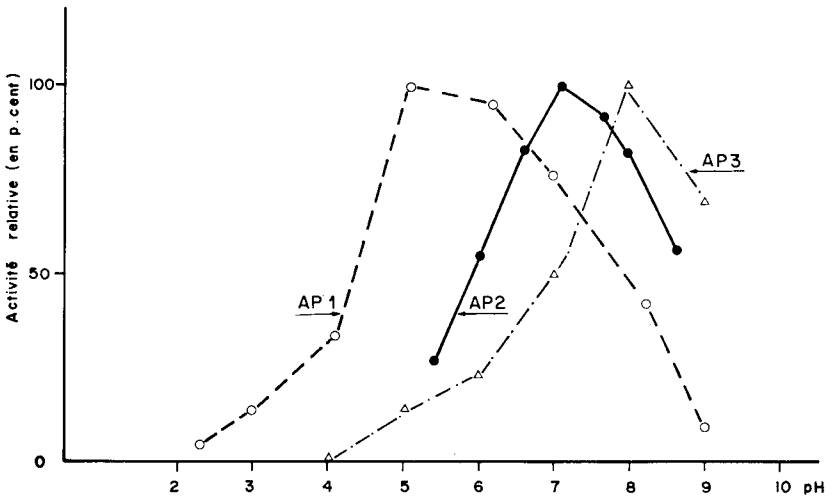


FIG. 3. — Influence du pH sur les différentes activités peptidasiques de *S. lactis* Activité mesurée sur la LNA. Les différents pH étaient obtenus dans les tampons 0,05 M KCl-HCl (pH 2,0 à 3,5), acétate de sodium (pH 4,0 à 5,4), Tris-maléate (pH 5,4 à 8,5), borate de sodium-KCl (pH 8,5 à 9,0).

de la LNA à pH 9,0 représente encore 69 p. 100 de cette vitesse maximum. Ces comparaisons ne rendent compte, évidemment, que d'un phénomène global puisque d'une part, il n'a pas été effectué d'études portant ni sur k_{cat} ni sur k_m et que, d'autre part, il faudrait tenir compte aussi de la stabilité de l'enzyme.

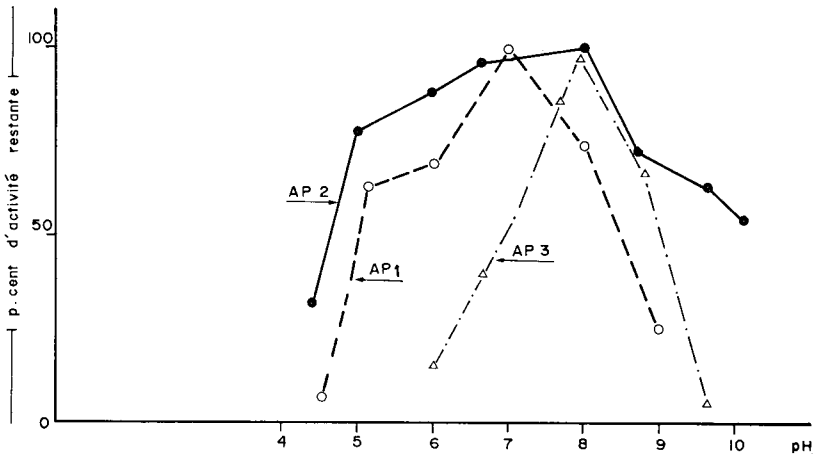


FIG. 4. — Stabilité des aminopeptidasases de *S. lactis* à différents pH.

L'activité restante était mesurée après incubation des différentes peptidasases pendant 30 mn à 37°C dans des tampons 0,05 M : acétate de sodium (pH 4,0 à 5,4), Tris-maléate (pH 5,4 à 8,5), borate de sodium-KCl (pH 8,5 à 10,1). L'activité restante était mesurée au pH optimum des différentes enzymes, sur la LNA comme substrat.

Stabilité aux différents pH.

La peptidase AP 1 est complètement stable à pH 7,0. Entre pH 5,0 et pH 8,0 il subsiste plus de 50 p. 100 de l'activité initiale (fig. 4). La peptidase AP 2 est la plus stable des enzymes étudiées puisqu'entre pH 5,50 et 8,20 l'activité restant après incubation est au moins égale à 80 p. 100 de l'activité initiale (fig. 4) et qu'après traitement à pH 10,10 il reste encore 53 p. 100 de celle-ci. Enfin, la peptidase AP 3 est peu stable avec un optimum de stabilité à pH 8,0.

Influence de la température.

L'hydrolyse maximum de la LNA, par la peptidase AP 1, était obtenue à 45°C (fig. 5). Les activités mesurées à 50°C ou 30°C ne représentaient plus respectivement que 87 ou 48 p. 100 de cette activité maximum. La pente de la droite obtenue dans la représentation graphique de la loi d'Arrhenius (MOELWYN-HUGHES, 1950) (fig. 5 A)

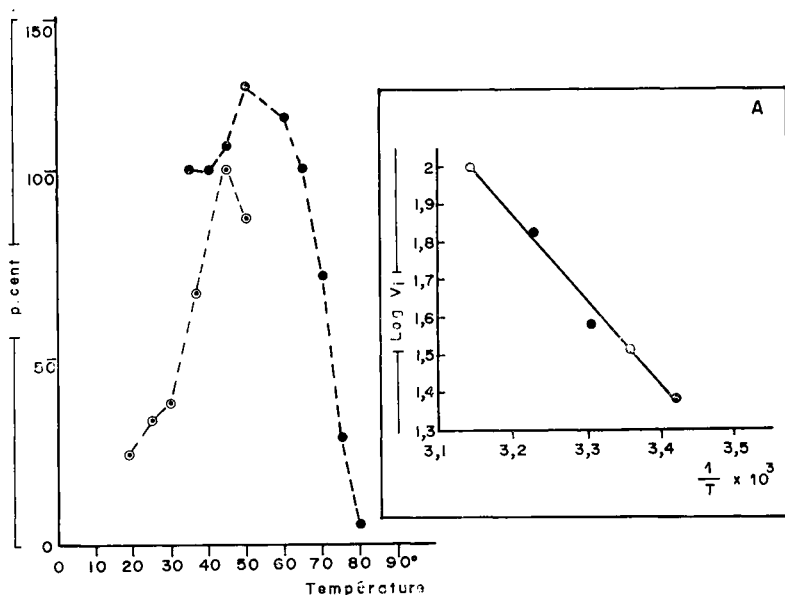


FIG. 5. — *Activité et stabilité de l'aminopeptidase AP 1 en fonction de la température*

○ — — — ○ activité relative en p. 100 (substrat LNA) ;
● — — — ● activité restante après incubation 10 mn à pH 7,0, mesurée sur la LNA.

Partie A = représentation graphique de la loi d'Arrhénius
(à partir des données de la figure principale)

permet de calculer l'énergie apparente d'activation E_A qui est égale à 10 000 calories/mole. D'autre part, nous avons déterminé les optima de température des peptidases AP 2 et AP 3 qui sont respectivement, sur la LNA, 45°C et 40°C.

Les expériences d'inactivation thermique ont été réalisées à pH 7,0 pour l'enzyme AP 1 et à pH 8,0 pour les peptidases AP 2 et AP 3, en tampon *Tris*-maléate de sodium 0,05 M. L'activité restante était dosée à 37°C comme décrit précédemment au pH optimum d'activité des différentes peptidases, en tampon *Tris*-maléate de sodium 0,05 M.

L'enzyme AP 1 semble stable jusqu'à 65°C après incubation à pH 7,0 pendant

10 mn. Il faut noter que cette « thermostabilité » peut être due à une réaction d'activation d'une forme zymogène puisqu'un chauffage à 45°, 50° ou 60°C permet de retrouver des activités supérieures à l'activité initiale (fig. 5). D'autre part, la peptidase AP 3 semble être, elle aussi relativement thermostable puisque après incubation à 50°C aucune activité n'était perdue et qu'après chauffage à 70°C pendant 15 mn on retrouvait 50 p. 100 de l'activité initiale.

Influence de certains inhibiteurs.

Les peptidases isolées de *S. lactis* ont les caractères de métallo-enzymes puisqu'une forte inhibition est obtenue avec l'*o*-phénanthroline ou l'EDTA (tabl. 2). Cependant ce caractère n'est vraiment absolu que pour l'enzyme AP 3, la peptidase AP 2 n'étant que peu sensible à l'EDTA même à une concentration de 10⁻² M. De plus, la peptidase AP 3 présente une grande sensibilité aux composés réducteurs puisque la cystéine et le β-mercaptoéthanol l'inhibent complètement (tabl. 2). Les

TABLEAU 2

Effet des inhibiteurs sur les aminopeptidases de S. lactis

	AP 1	AP 2	AP 3
DFP	100	100	100
Acide iodoacétique	84		
<i>p</i> -CMB	51,5	45,5	100
β-mercaptoéthanol	100	60	0
Cystéine		65,5	3,2
EDTA	13	45,5	0
<i>O</i> -phénanthroline	13	25	0

Les enzymes étaient incubées en présence de l'inhibiteur 10⁻² M, à pH 7,10 dans du tampon *Tris*-maléate de sodium 0,05 M à pH 7,10, à 37°C pendant 180 mn. L'activité restante était dosée sur la LNA en tampon *Tris*-maléate.

Les résultats sont exprimés en p. 100 de l'activité initiale.

résidus séryles ne doivent pas intervenir dans le site actif des trois peptidases puisqu'il n'y a pas d'inhibition par le DFP. Nous n'avons obtenu aucune réactivation par les ions Ca⁺⁺, Co⁺⁺, Mn⁺⁺, Mg⁺⁺, Zn⁺⁺ ou Fe⁺⁺, des peptidases inhibées par l'EDTA. D'autre part, les ions Zn⁺⁺, Mn⁺⁺ ou Mg⁺⁺ à une concentration de 10⁻³ M entraînent respectivement une inhibition de 100, 88,5 ou 42,5 p. 100 de l'activité de la peptidase AP 2. Par contre le *p*-CMB inhibe partiellement les enzymes AP 1 et AP 2, cette dernière étant sensible de plus au β-mercaptoéthanol et à la cystéine (tabl. 2), ce qui peut être en faveur de résidus sulfhydryles dans le site actif ou de leur présence nécessaire à la conformation active de la protéine enzymatique.

Spécificité du substrat.

Les trois peptidases de *S. lactis* étudiées dans ce travail sont de type aminopeptidasique (EC 3.4.1). En effet, elles hydrolysent soit des peptides de poids molécu-

lares variés, soit des dérivés d'acides aminés — tels que la leucine-para-nitro-anilide et la phénylalanine amide — à l'extrémité — NH_2 libre ; d'autre part, elles sont incapables d'hydrolyser des substrats dont le résidu NH_2 -terminal est bloqué, tels que les dipeptides de type Z-X-Y ou Z-X'-Y'- NH_2 (tabl. 3).

TABLEAU 3

Étude comparative de l'activité des peptidases de S. lactis sur différents substrats

Nature du substrat	Peptidase		
	AP 1	AP 2	AP 3
Leucine para-nitroanilide	++	++	++
Phénylalanine-amide	+	—	+
Tyrosine-amide	+	—	—
Leucine-, Isoleucine-, Glycine-, Ala- mine-, Tyrosine- ou Valine-amide ...	—	—	—
Dipeptides de type Z-X-Y	—	—	—
Dipeptides de type Z-X'-Y'- NH_2 ...	—	—	—
Gly-Tyr	++	—	—
Gly-Ala	++	+	—
Gly-Trp, Gly-Phe ou Gly-Leu	+	—	—
Gly-Pro	—	—	—
Ala-Gly ou Ala-Ala	++	—	—
Leu-Gly	++	+	—
Leu-Ala	++	—	—
Leu-Leu	+	—	—
Phe-Gly, Tyr-Leu ou Met-Leu	++	—	—
Lys-Tyr ou His-Leu	+	—	—
Pro-Gly	—	—	—
Gly-Trp-Gly, Gly-Tyr-Gly ou $(\text{Gly})_4$.	+	—	—
« Peptides de caséine »	+	++	++
Glucagon	—	—	+

++ : substrat très fortement hydrolysé.

+ : substrat faiblement hydrolysé.

— : substrat non hydrolysé.

L'aminopeptidase AP 1 se distingue très nettement des deux autres puisqu'elle hydrolyse tous les dipeptides testés, à l'exclusion cependant de la Pro-Gly ou de la Gly-Pro, alors que la peptidase AP 3 n'en hydrolyse aucun. Par contre, pour ces trois enzymes, les amides des acides aminés ne représentent pas de bons substrats (tabl. 3).

3. — Mise en évidence d'une activité carboxypeptidasique

L'extrait cellulaire non purifié S 1 (tabl. 1) présente une activité carboxypeptidasique mise en évidence par l'hydrolyse des dipeptides monosubstitués Z-Gly-Leu, Z-Gly-Phe, Z-Gly-Ala et Z-Glu-Tyr. Après chromatographie d'une partie aliquote d'extrait S 1 sur Bio-gel P-150 (fig. 6 et tabl. 1) une seule activité carboxypeptida-

sique est éluee, dont le poids moléculaire peut être estimé à 64 400 daltons environ. D'autre part, il a été établi qu'à pH 7,10 la vitesse d'hydrolyse du substrat Z-Gly-Leu, par cette carboxypeptidase, est 4 fois supérieure à celle mesurée à pH 5,50.

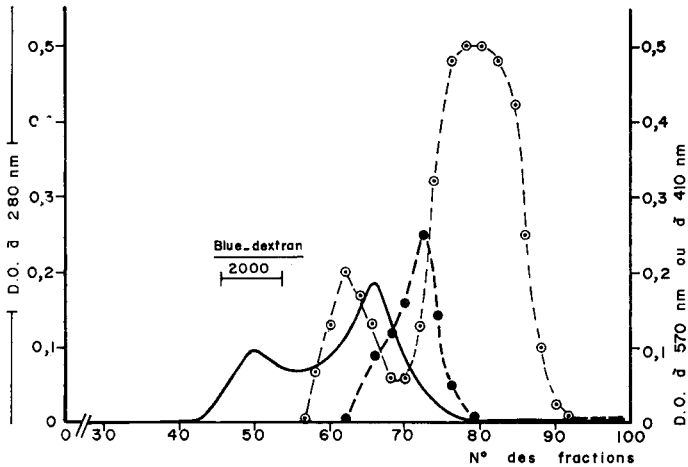


FIG. 6. — Chromatographie sur Bio-Gel P-150 de l'extrait S 1 (cellules traitées aux ultra-sons)

Colonne 88 × 4 cm ; volume des fractions 5,2 ml ; débit 27 ml/h ;
tampon *Tris*-maléate de sodium 0,005 M ; pH 7,10

- DO à 280 nm = élution des protéines ;
 ○ — — ○ DO à 410 nm = activité aminopeptidasique (substrat LNA) ;
 ● — — ● DO à 570 nm = activité carboxypeptidasique (substrat Z-Gly-Leu).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Comme les levures de brasserie (FÉLIX et BROUILLET, 1966) ou les levures de boulangerie (HAYASHI, AIBARA et HATA, 1970), *Saccharomyces lactis* possède une activité carboxypeptidasique liée aux cellules, capable d'hydrolyser des substrats tels que le Z-Gly-Leu, le Z-Gly-Phe ou le Z-Glu-Tyr dans la zone des pH voisins de la neutralité. Cette carboxypeptidase a un poids moléculaire apparent (64 400 daltons) plus élevé que celui des enzymes du même type isolées des organes animaux qui est par exemple de 34 472 daltons pour la carboxypeptidase A (HARTSUCK et LIPSCOMB, 1971) ou de 34 300 daltons pour la carboxypeptidase B (FOLK, 1971). Par contre, cette propriété la rapproche d'une carboxypeptidase acide isolée d'*Aspergillus oryzae* qui a un poids moléculaire de 61 000 daltons (NAKADAI, NASUNO et IGUCHI, 1972).

Très peu d'études ont été consacrées aux aminopeptidasases des levures, alors que de nombreuses enzymes de ce type ont été déjà purifiées et caractérisées aussi bien à partir de tissus animaux (SMITH et HILL, 1960) qu'à partir de cellules de différentes espèces bactériennes en particulier *Escherichia coli* (DICK, MATHESON et WANG, 1970 ; VOGT, 1970 ; YARON et MLYNAR, 1968), *Pseudomonas* (FREUND, 1969, *Aeromonas proteolytica* (PRESCOTT *et al.*, 1971), *Bacillus stearothermophilus* (RONCARI et ZUBER, 1969), *B. subtilis* var. *amylosacchariticus* (MATSUMURA *et al.*, 1971) ou *Streptococcus thermophilus* (RABIER et DESMAZEAUD, 1973). Cependant des activités aminopeptidasiques ont été déterminées ou isolées chez *S. cerevisiae* (BERGER et JOHNSON, 1939 ;

SMITH, 1951 ; SICHU et KAS, 1970) ou *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* (CORDONNIER, 1966).

Comme *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* (CORDONNIER, 1966), *S. lactis* possède des aminopeptidases dont le pH optimum est situé près de la neutralité ou légèrement alcalin. Par cette propriété ces enzymes se rapprochent de l'aminopeptidase de *B. stearothermophilus* (RONCARI et ZUBER, 1969) qui possède vis-à-vis du substrat LNA un pH optimum de 7,50.

Comme de nombreuses aminopeptidases que ce soit la leucine-aminopeptidase du rein de porc (EC 3.4.1.1) (SMITH et HILL, 1960), ou celles d'origine bactérienne (RABIER et DESMAZEAUD, 1973 ; FREUND, 1969 ; MOSER, RONCARI et ZUBER, 1970) ou celle mise en évidence chez *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* (CORDONNIER, 1966) les peptidases de *S. lactis* sont inhibées par les complexants tels que l'EDTA ou l'*o*-phé-nanthroline et par certains cations tels que Zn^{++} . Ce sont donc vraisemblablement des métal-enzymes (cependant la présence de métal n'a pas été recherchée, comme il serait possible de l'effectuer par adsorption atomique par exemple). De façon semblable à l'aminopeptidase de *S. cerevisiae*, étudiée par GRASSMAN et DYCKERHOFF (1928) (cités par CORDONNIER, 1966), qui était inhibée par le SH_2 , deux aminopeptidases de *S. lactis* sont inhibées par des composés sulfhydriques tels que le β -mercapto-éthanol ou la L-cystéine.

L'énergie apparente d'activation E_A (de la réaction d'activation) de l'aminopeptidase AP 1 de *S. lactis* qui est égale à 10 000 cal./mole sur le substrat LNA est plus élevée que celle obtenue pour l'aminopeptidase de *S. thermophilus* (RABIER et DESMAZEAUD, 1973) sur le même substrat. Par contre elle est à rapprocher de celle trouvée chez certaines protéases bactériennes telles que celle de *Micrococcus caseolyticus* (DESMAZEAUD et HERMIER, 1968) ($E_A = 9\ 100$ cal./mole avec la caséine comme substrat) ou de *S. faecalis* var. *liquefaciens* (SHUGART et BECK, 1964) ($E_A = 9\ 060$ cal/mole) avec l'hémoglobine comme substrat. Ces deux dernières valeurs ne sont d'ailleurs citées qu'à titre d'illustration, la comparaison n'étant pas possible puisque les études n'ont pas mis en œuvre les mêmes substrats.

Les aminopeptidases de *S. lactis* possèdent des poids moléculaires relativement faibles pour cette catégorie d'enzymes. Cette propriété les rapproche des aminopeptidases de *S. thermophilus* (RABIER et DESMAZEAUD, 1973) ou *Pseudomonas* (FREUND, 1969). Il est en effet très inférieur à celui généralement observé pour ce type d'hydrolases. En effet, les autres aminopeptidases ont un poids moléculaire égal ou supérieur à 300 000 (SMITH et HILL, 1960 ; VOGT, 1970 ; MOSER, RONCARI et ZUBER, 1970). Il faut remarquer que ces poids moléculaires élevés traduisent pour les aminopeptidases des formes polymères dont les monomères ont, par contre, un poids moléculaire comparable à celui des aminopeptidases de *S. lactis*.

Enfin, peu de données existant dans le domaine de la spécificité des aminopeptidases des levures, seule la peptidase AP 2 pourrait être comparée à l'activité déterminée chez *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* (CORDONNIER, 1966) par le fait qu'elles hydrolysent la Leu-Gly mais non l'Ala-Gly ou la Gly-Leu. En conclusion, les aminopeptidases de *S. lactis* présentent le caractère original de ne pas hydrolyser la plupart des amides d'acides aminés tout en attaquant la leucine-para-nitro-anilide ; d'autre part, à l'exception de l'aminopeptidase AP 1, les dipeptides ne leur sont pas substrats.

REMERCIEMENTS

Nous remercions M. J. HERMIER pour ses suggestions et ses critiques au cours de la rédaction du manuscrit, ainsi que M. C. BOUILLANNE qui a eu l'obligeance de réaliser la culture en fermenteur et M^{lle} Jeanne FOURNAUD qui a mis à notre disposition l'appareil de traitement aux ultrasons.

SUMMARY

REVELATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF VARIOUS PEPTIDASES
IN *SACCHAROMYCES LACTIS*

After cells were ground supersonically, carboxypeptidase-type activity (EC 3.4.2) was revealed at 7.0 pH on synthetic substrates Z-Gly-Leu, Z-Gly-Phe and Z-Glu-Tyr. After elimination of nucleic acids and precipitation of ammonium sulphate, three aminopeptidase-type activities (EC 3.4.1) were revealed on the Leucine-para-nitro-anilide substrate (LNA) and isolated by DEAE-cellulose and ECTEOLA-cellulose chromatography. Aminopeptidases (AP 1, AP 2, AP 3) have the characters of metalloenzymes: EDTA and O-phenanthroline strongly inhibit AP 1 and AP 2 peptidases, and completely inhibit AP 3 enzyme. The latter is also inactivated by cysteine and β -mercaptoethanol. AP 1, AP 2 and AP 3 peptidases have an optimum pH, respectively, of: 5.0, 7.1 and 8.0 and present a maximum stability of 7.0 to 8.0 pH. Their optimal temperature of LNA hydrolysis is 40 to 45°C (apparent activation energy of AP 1 peptidase is 10 000 cal/mole). AP 3 enzyme is stable at 50°C; 50 p. 100 of the activity is destroyed after incubation at 70°C for 15 min. AP 1 peptidase is stable up to 65°C; 28 p. 100 of the activity is destroyed after incubation at 70°C for 10 min. These peptidases also have different specificity in regard to the hydrolysis of many synthetic peptides.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BERGER J., JOHNSON M.-J., 1939. Metal activation of peptidases. *J. Biol. Chem.*, **130**, 641-654.
- CORDONNIER R., 1966. Recherches sur l'amino-carboxypeptidase (dipeptidase) de *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Ann. Technol. agr.*, **15**, H. S. 1, 1-114.
- DESMAZEAUD M.-J., 1972. Contribution à l'étude de la spécificité de la papaine: hydrolyse du glucagon. *Biochimie*, **54**, 1109-1114.
- DESMAZEAUD M., HERMIER J., 1968. Isolement, purification et propriétés d'une protéase exocellulaire de *Micrococcus caseolyticus*. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **8**, 565-577.
- DESMAZEAUD M.-J., HERMIER J.-H., 1972. Isolement et détermination de la composition qualitative de peptides issus de la caséine, stimulant la croissance de *Streptococcus thermophilus*. *Eur. J. Biochem.*, **28**, 190-198.
- DEVOYOD J.-J., DESMAZEAUD M., 1970. Les associations microbiennes dans le fromage de Roquefort. I. Action des entérocoques vis-à-vis des streptocoques lactiques et des *Leuconostoc*. Nature des substances stimulantes produites par *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*. *Le lait*, **50**, 374-390.
- DEVOYOD J.-J., DESMAZEAUD M., 1971. Les associations microbiennes dans le fromage de Roquefort. III. Action des entérocoques et des levures fermentant la lactose vis-à-vis des lactobacilles. *Le Lait*, **51**, 399-415.
- DEVOYOD J.-J., SPONEM D., 1970. La flore microbienne du fromage de Roquefort. VI. Les levures. *Le Lait*, **50**, 524-543.
- DICK A. J., MATHESON A. T., WANG J. H., 1970. A ribosomal-bound aminopeptidase in *Escherichia coli* B: purification and properties. *Can. J. Biochem.*, **48**, 1181-1188.
- FELIX F., BROUILLET N., 1955. Purification et propriétés de deux peptidases de levure de brasserie. *Biochim. Biophys. Acta*, **122**, 127-144.
- FOLK J.-E., 1971. *The Enzymes*, vol. III, 61-62, 3^e éd., BOYER P. D., éd., Academic Press New York and London.

- FREUND T. S., 1969. The proteolytic enzymes of a new marine *Pseudomonas*. In a dissertation (for the degree of Doctor of Philosophy in Chemistry), Lehigh University, U. S. A.
- HARTSUCK J. A., LIPSCOMB W. N., 1971. *The Enzymes*, vol. III, 1-6, 3^e éd., Boyer P. D., éd., Academic Press New York and London.
- HATA T., HAYASHI R., DOI E., 1967. Purification of yeast proteinases. Part. I. Fractionation and some properties of the proteinases. *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 150-159.
- HAYASHI R., AIBARA S., HATA T., 1970. A unique carboxypeptidase activity of yeast proteinase C. *Biochim. Biophys. Acta*, **212**, 359-361.
- KAMADA M., ODA K., MURAO S., 1972. The purification of the extracellular acid protease of *Rhodotorula glutinis* K-24 and its general properties. *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1095-1102.
- LENNEY J. F., DALBEC J. M., 1967. Purification and properties of two proteinases from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **120**, 42-48.
- MADDOX I. S., HOUGH J. S., 1970. Proteolytic enzymes of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biochem. J.*, **117**, 843-852.
- MATSUMURA Y., MINAMIURA N., FUKUMOTO J., YAMAMOTO T., 1971. Intracellular peptidase of *Bacillus subtilis*. III. Effects of metal ions on activity and specificity of aminopeptidase of *Bacillus subtilis*. *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 975-982.
- MOELWYN-HUGHES E. A., 1950. *The Enzymes*, vol. I, 28-78, 1^{re} éd., Sumner J. B. et Myrbach K., éd., Academic Press, New York.
- MOORE S., STEIN W. H., 1954. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino-acids and related compounds. *J. Biol. Chem.*, **211**, 907-913.
- MOSER P., RONCARI G., ZUBER H., 1970. Thermophilic aminopeptidases from *B. stearothermophilus*. II. Aminopeptidase-I (API) = physicochemical properties; thermostability and activation; formation of the apoenzyme and subunits. *Int. J. Protein Res.*, **2**, 191-207.
- NAKADAI T., NASUNO S., IGUCHI N., 1972. Purification and properties of acid carboxypeptidase III from *Aspergillus oryzae*. *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1481-1488.
- PRESCOTT J. M., WILKES S. H., WAGNER F. W., WILSON K. J., 1971. *Aeromonas* aminopeptidase. Improved isolation and some physical properties. *J. Biol. Chem.*, **246**, 1756-1764.
- RABIER D., DESMAZEAUD M. J., 1973. Inventaire des différentes activités peptidasiques intracellulaires de *Streptococcus thermophilus*. Purification et propriétés d'une dipeptide-hydrolase et d'une aminopeptidase. *Biochimie*, **55**, 389-404.
- RONCARI G., ZUBER H., 1969. Thermophilic aminopeptidases from *Bacillus stearothermophilus*. I. Isolation, specificity and general properties of the thermostable aminopeptidase. I. *Int. J. Protein Res.*, **1**, 45-61.
- SHUGART L. R., BECK R. W. Purification and activity of proteinase of *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*. *J. Bacteriol.*, **88**, 586-590.
- SICHO V., KAS J., 1970. Leucine aminopeptidase activity in dying animal and plant tissue, and in yeast cells. *Vys. Skol. Chem. technol. Praxe*, **E 29**, 8-22.
- SMITH E. L., 1951. *The Enzymes*, vol. I, 793-872, 1^{re} éd., Sumner J. B. et Myrbach K., éd., Academic Press, New York.
- SMITH E. L., HILL R. L., 1960. *The Enzymes*, vol. 4 A, 37-62, Boyer P. D., Lardy H. et Myrbach K., éd., Academic Press, New York and London.
- VOGT V. M., 1970. Purification and properties of an aminopeptidase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **245**, 4760-4769.
- YARON A., MLYNAR D., 1968. Aminopeptidase-P. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **32**, 658-663.