

ÉTUDE DE LA PROTÉOLYSE DES CASÉINES α_{s1} ET β BOVINES PAR LA PRÉSURE

SPÉCIFICITÉ D'ACTION. PEPTIDES AMERS LIBÉRÉS

J.-P. PELISSIER, J.-C. MERCIER et B. RIBADEAU DUMAS

*Laboratoire de Recherches sur les Protéines,
Centre national de Recherches zootechniques, I. N. R. A.,
78350 Jouy en Josas*

RÉSUMÉ

La spécificité d'action de la présure a été étudiée en prenant comme substrats les caséines β et α_{s1} bovines. L'action ménagée de l'enzyme sur la caséine β libre de manière reproductible 4 peptides correspondant à l'ensemble de la molécule. Ces peptides, qui ont été isolés et identifiés, résultent de l'hydrolyse spécifique de 3 liaisons peptidiques particulièrement labiles. Dans le cas de la caséine α_{s1} , une action intensive de la présure libère de nombreux peptides. Plus de vingt d'entre eux ont été isolés et analysés. Les résultats obtenus montrent que la présure hydrolyse préférentiellement la caséine α_{s1} au niveau des groupes carbonyles de résidus phénylalanyle et leucyle.

Le goût des peptides ainsi obtenus a été testé de façon à déceler une éventuelle amertume. Onze peptides ont été reconnus amers. D'après leurs caractéristiques chimiques et celles des peptides amers étudiés par différents auteurs, on peut conclure qu'un peptide hydrophobe constitué de moins de 20 résidus d'acides aminés et contenant de la leucine ou de la phénylalanine a de fortes chances d'être amer.

INTRODUCTION

Un goût amer apparaît assez fréquemment lorsque des protéines (protéines du lait, du soja, etc.) subissent des actions enzymatiques. Il semble que ce goût, dans tous les cas étudiés jusqu'à présent, soit dû à une protéolyse libérant des peptides ou des acides aminés présentant eux-mêmes une saveur amère. Il est bien connu que certains acides aminés présentent cette caractéristique (BERG, 1953 ; KIRIMURA *et al.*, 1969 ; MURRAY et BAKER, 1952 ; NEY, 1971 ; PETRISCHEK, LYNEN et BELITZ,

1972 ; SCHORMULLER, 1968 ; SOLMS, 1971 ; STONE et NAFF, 1967) et un certain nombre de peptides de goût amer ont été isolés de divers hydrolysats enzymatiques de protéines (ARAI *et al.*, 1970 ; BELITZ et SPARRER, 1971 ; FUJIMAKI *et al.*, 1968 ; GORDON et SPECK, 1965 ; HODGES, KENT et RICHARDSON, 1972 ; MATOBA, HAYASHI et HATA, 1970 ; MAZUR, SCHLATTER et GOLDKAMP, 1969 ; NEY, 1971 ; MINAMIURA *et al.*, 1972). Ney a étudié toute une série de peptides synthétiques, amers ou non, et trouvé qu'il existait une relation entre l'hydrophobicité des peptides et leur amertume (NEY, 1971).

Au cours de la fabrication du fromage, qui nous intéresse plus particulièrement, la présure ou les enzymes coagulantes de remplacement et les protéases des bactéries lactiques sont les principaux agents susceptibles de provoquer, en hydrolysant les caséines, la libération de peptides ou d'acides aminés ayant ou non une saveur amère. Désirant élucider la spécificité de la présure sur des protéines qui constituent ses substrats lors de la maturation du fromage, et caractériser les peptides amers libérés, nous avons, au cours de ce travail, analysé les hydrolysats obtenus en faisant agir la présure (EC 3.4.4.3) sur les caséines α_{s1} et β purifiées, dont la structure primaire est connue (MERCIER, GROSCLAUDE et RIBADEAU-DUMAS, 1971 ; RIBADEAU-DUMAS *et al.*, 1972).

Des conditions d'hydrolyse enzymatique différentes ont été utilisées pour les 2 caséines, α_{s1} et β : pour la caséine α_{s1} une protéolyse poussée, pendant un temps relativement court a permis de se placer dans des conditions grossièrement analogues à la maturation du fromage, qui est provoquée (en partie du moins) par une quantité faible de présure agissant pendant un temps relativement très long.

Pour la caséine β , des conditions identiques seront employées dans un travail ultérieur. Nous nous sommes bornés, dans cette étude, à vérifier les résultats de CREAMER, MILLS et RICHARDS (1971) concernant l'hydrolyse ménagée de la caséine β par la présure : dans les conditions employées par ces auteurs l'attaque initiale de la caséine β par la présure semble se confiner spécifiquement à quelques liaisons particulièrement labiles. Nous avons précisé les résultats de Creamer *et al.* en identifiant ces liaisons.

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

Les acides aminés provenaient de la firme NBC. La caséine totale a été préparée à partir du lait d'une vache homozygote pour le complexe génique $\alpha_{s1} \text{ Cn}^{\text{B}} \cdot \beta \text{ Cn}^{\text{B}} \cdot \alpha \text{ Cn}^{\text{B}}$ selon la méthode classique de précipitation au point isoélectrique (JENNESS *et al.*, 1956). Les caséines α_{s1} et β ont été préparées à partir de cette caséine totale par chromatographie sur DEAE cellulose (MERCIER *et al.*, 1968). La présure cristallisée a été préparée au laboratoire selon la méthode de BERRIDGE et WOODWARD (1953). La présure commerciale en poudre (Hansen, activité : 500 UP/g) a été dialysée contre l'eau pour éliminer le chlorure de sodium présent dans la préparation.

Conditions d'action de la présure cristallisée sur la caséine β B

A une solution de caséine β (0,87 g dissous dans 35 ml d'eau distillée) ont été ajoutés 750 μ l d'une solution de présure (2,45 mg/ml de tampon phosphate de sodium M/20, pH 6,2). Le pH initial du mélange était de 6,35. Au bout de 50 mn à la température ambiante, la réaction a été stoppée par acidification à pH 2,0 avec HClN.

*Conditions d'action de la présure cristallisée
sur la caséine α_{s1} B*

A une solution de caséine α_{s1} (2,5 g dissous dans 100 ml d'eau distillée) ont été ajoutés 10 ml d'une solution de présure (2,45 mg/ml de tampon phosphate de sodium M/20, pH 6,2). Le pH initial du mélange était de 6,2. La réaction a été conduite à température ambiante. Après 1 h 30 le pH, qui était de 5,0, a été ajusté à 5,8 par la soude N. La réaction a été stoppée au bout de 5 h par acidification à pH 2,0 avec HCl N.

*Conditions d'action de la présure commerciale
sur la caséine α_{s1} B*

A une solution de caséine α_{s1} (12,5 g dissous dans 500 ml d'eau distillée) ont été ajoutés 25 g de présure Hansen dialysée une nuit. Le pH a été ajusté à pH 4,6 par addition d'HCl N. Au bout de 7 h à 40°C, l'hydrolysate, très amer, a été lyophilisé après arrêt de la réaction par acidification à pH 2,0 avec HCl N.

Isolement spécifique des produits amers

Nous avons repris la technique d'extraction au chloroforme méthanol (2/1 ; V/V) de HARWALKER et ELLIOTT (1971).

Techniques de purification et d'analyse des peptides

Les techniques utilisées dans ce travail ont été décrites en détail ou référencées dans nos précédentes publications : chromatographie sur colonne et sur papier, électrophorèse sur papier, dosage des acides aminés (GROSCLAUDE, MERCIER et RIBADEAU-DUMAS, 1970), emploi des exopeptidases (MERCIER, GROSCLAUDE et RIBADEAU-DUMAS, 1970).

Détection de l'amertume

A cet effet un « jury » de 8 à 15 personnes, sélectionnées pour leur aptitude à détecter l'amertume, a été constitué. La sélection a été faite en se basant sur les résultats de tests de classement de solutions de caféine de concentrations croissantes.

Les acides aminés ont été goûtés par un « jury » de 9 personnes, sous forme de solutions aqueuses à 1 p. 100, dont le pH avait été ajusté à 7,0. Les peptides ont également été goûtés après dissolution ou mise en suspension dans l'eau distillée.

Électrophorèses en gel d'amidon

Elles ont été faites à pH 8,6 en présence d'urée et de β -mercaptoéthanol suivant la technique d'ASCHAFFENBURG et MICHALAK (1968).

RÉSULTATS

I. — Goût des acides aminés de la série L

Plusieurs auteurs avaient déjà étudié le goût des acides aminés de la série L. Cependant, au vu des résultats contradictoires qui avaient été publiés, il nous a semblé utile de tester à nouveau le goût de ces acides aminés.

Nous avons noté que le goût indiqué variait souvent d'une personne à l'autre. Cependant les résultats ont été parfaitement concordants pour les acides aminés suivants :

- la glycine, l'alanine, la sérine et la proline sont sucrées ;
- la cystéine a un goût soufré ;
- la phénylalanine, le tryptophane et l'isoleucine sont amers ;
- l'acide aspartique et l'histidine sont acides.

Par ailleurs, au moins les 2/3 des dégustateurs ont donné les indications suivantes :

- Goût acide : Glu
- Goût « fade » : Met
- Goût sucré : Thr, Val, Lys
- Goût amer : Val, Leu, Arg
- Sans goût : Tyr, Cys-Cys

2. — Action de la présure cristallisée sur la caséine β B

Comme l'ont montré CREAMER, MILLS et RICHARDS (1971), après action ménagée de la présure sur la caséine β l'électrophorèse sur gel d'amidon à pH alcalin permet de mettre en évidence une nouvelle bande migrant entre les bandes caractéristiques des caséines α_{s1} et β . Le peptide correspondant aurait une masse moléculaire inférieure d'environ 2 000 daltons à celle de la caséine β (CREAMER, MILLS et RICHARDS, 1971). Nous avons repris le travail de ces auteurs afin de mieux caractériser les produits d'hydrolyse de la caséine qui résultent d'une action ménagée de la présure.

L'hydrolysats que nous avons obtenu dans les conditions mentionnées précédemment donnait, par électrophorèse en gel d'amidon à pH alcalin (fig. 1), un dia-

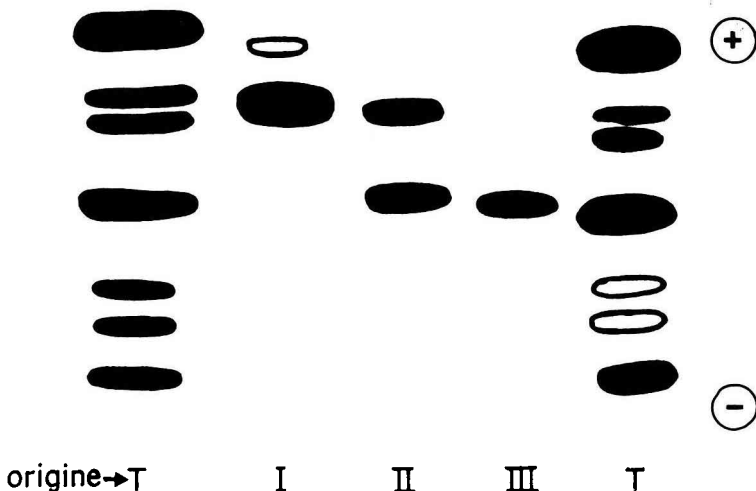


FIG. 1. — Électrophorèse sur gel d'amidon de l'hydrolysats obtenu par action ménagée de la présure sur la caséine β

Tampon Tris/acide citrique pH 8,6, urée 8 M, 2-mercaptoéthanol 0,2 M ;
tension 18 V/cm ; durée 5 h

T : témoin caséine totale de vache ; I, II, III, fractions obtenues par chromatographie de la fraction 1 (fig. 2) en présence d'urée (fig. 3).

TABLEAU I

Composition en acides aminés (hydrolyse acide de 24h)
des peptides libérés par action de la présure sur la caséine β

Peptide	A	B	C	D
Fragment	1-164	165-189	190-192	193-209
Composition	Moles d'acides aminés/Mole de peptide			
Asx	7,46 (8)	1,20 (1)	—	—
Thr	7,61 (9)	—	—	—
Ser	8,80 (13)	1,67 (2)	—	—
Glx	32,22 (33)	4,40 (4)	—	2,0 (2)
Pro	25,80 (25)	5,20 (5)	—	3,5 (4)
Gly	3,01 (3)	—	—	2,0 (2)
Ala	3,01 (3)	1,80 (2)	—	2,9 (3)
Val	11,58 (13)	3,10 (3)	—	—
Met	2,06 (5)	0,80 (1)	—	—
Ile	6,42 (7)	1,00 (1)	—	1,4 (2)
Leu	13,60 (17)	1,46 (2)	2,10 (2)	1,0 (1)
Tyr	1,66 (2)	0,70 (1)	—	0,7 (1)
Phe	6,34 (7)	—	0,98 (1)	1,0 (1)
Lys	9,12 (9)	1,96 (2)	—	—
His	4,84 (5)	—	—	—
Arg	2,86 (3)	+ (1)	—	+ (1)
Trp	+ (1)	—	—	—
Action de la Carboxypeptidase A	Ser 0,67 Leu 0,55	Gln 0,3 Ala 0,5		Ile 0,7 Val 0,8
Amertume	—	—	+	—

Les chiffres donnés pour Ser et Thr n'ont pas été corrigés et il n'a donc pas été tenu compte de la destruction partielle de ces acides aminés lors de l'hydrolyse.

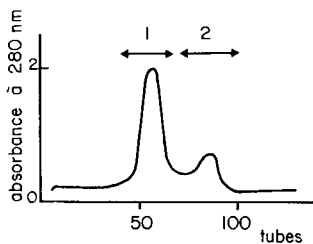


FIG. 2

FIG. 2. — Diagramme d'élution de l'hydrolysât obtenu par action de la présure sur la caséine β

Chromatographie sur une colonne (2 × 180 cm) de Sephadex G-50, en acide acétique 30 p. 100; fractions de 5 ml; vitesse d'élution de 30 ml/h. Détection par mesure directe de la densité optique à 280 nm.

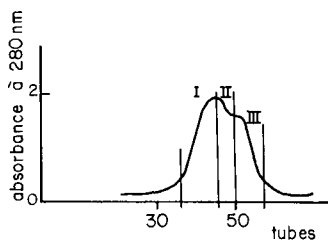


FIG. 3

FIG. 3. — Séparation des constituants de la fraction I de l'hydrolysât de la caséine β par la présure

Chromatographie sur une colonne (2 × 180 cm) de Sephadex G-50; agent éluant : solution aqueuse d'urée 6,6 M; fractions de 5 ml; vitesse d'élution de 10 ml/h. Détection par mesure directe de la densité optique à 280 nm.

gramme similaire à celui obtenu par CREAMER *et al.* Par chromatographie sur Sephadex G-50 en milieu acide acétique 30 p. 100 nous en avons isolé 2 fractions (fig. 2). La fraction 1 contenait la caséine β résiduelle et le peptide de grande taille (A) correspondant à la bande supplémentaire. Par chromatographie sur Sephadex G-50 en milieu urée 6,6 M (fig. 3) nous avons pu séparer ces composants. La fraction 2 contenait 3 peptides (B, C, D) qui ont été purifiés par électrophorèse préparative à pH 1,9. L'analyse de ces peptides a permis de les localiser dans la séquence de la caséine β (tabl. I).

3. — Action de la présure cristallisée sur la caséine α_{s1} B

Par chromatographie sur Dowex AG-50 W \times 2 nous avons isolé 18 fractions (fig. 4) que nous avons rechromatographiées sur Sephadex G-25. Quelques peptides ont été repurifiés par électrophorèse préparative sur papier à pH 1,9. La composition en acides aminés des peptides obtenus, les résultats de leur hydrolyse par les exopeptidases et leur saveur, sont indiqués dans le tableau 2.

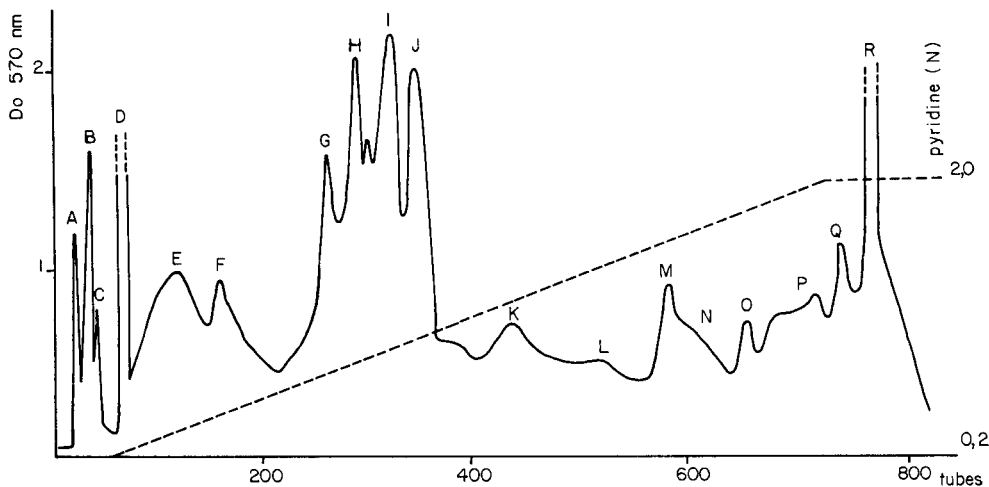


FIG. 4. — Diagramme d'éluion d'un hydrolysât de la caséine α_{s1} B par la présure cristallisée

Chromatographie sur une colonne (4 \times 120 cm) de résine Dowex AG-50 W \times 2, 200-400 « mesh », en tampon pyridine-acide acétique, à 43°C. Le gradient de pH 3,1 à pH 5,0, linéaire en normalité de pyridine, est indiqué par une ligne discontinue. Fractions de 20 ml; vitesse d'éluion de 80 ml/h; réaction à la ninhydrine effectuée après hydrolyse alcaline sur des aliquotes de 250 μ l.

4. — Action de la présure commerciale sur la caséine α_{s1} B Essai d'isolement des peptides amers par un solvant non aqueux

L'extraction de l'hydrolysât par un mélange de chloroforme méthanol nous a donné un premier fractionnement. Par purification sur Dowex AG-50 W \times 2 (fig. 5), Sephadex G-25 et éventuellement électrophorèse préparative sur papier à pH 1,9, nous avons obtenu les peptides dont l'analyse chimique et la saveur sont indiquées dans le tableau 3.

TABLEAU 2. — Composition en acides aminés des peptides libérés par action de la présure cristallisée sur la caséine α_{s1}

Peptide	A 1	A 2	A 3	B 1	C 1	E 1
Sephadex	+	+	+	+	+	+
Électroph.	—	—	—	—	—	+
Asx	3,67 (4)	1,18 (1)	—	1,26 (1)	3,95 (4)	1,00 (1)
Thr	4,35 (4)	—	—	—	3,57 (4)	1,57 (2)
Ser	3,91 (4)	3,94 (5)	—	—	3,65 (4)	0,88 (1)
Glx	3,05 (3)	4,54 (6)	—	4,70 (5)	2,93 (3)	1,25 (1)
Pro	4,50 (4)	1,03 (1)	—	1,35 (1)	3,44 (5)	1,63 (2)
Gly	1,56 (2)	—	—	1,07 (1)	2,16 (2)	1,02 (1)
Ala.....	1,20 (1)	0,91 (1)	—	—	1,10 (1)	0,83 (1)
Val.....	—	1,29 (2)	—	0,94 (1)	1,02 (1)	1,04 (1)
Met.....	+ (1)	—	—	+ (1)	+ (1)	—
Ile	2,00 (2)	2,06 (2)	—	1,10 (1)	2,01 (2)	—
Leu	1,10 (1)	—	1,0 (1)	1,02 (1)	2,05 (2)	1,08 (1)
Tyr	0,80 (1)	—	—	—	2,18 (3)	0,98 (1)
Phe	0,70 (1)	—	1,1 (1)	—	1,00 (1)	+ (1)
Lys	1,00 (1)	0,95 (1)	—	0,95 (1)	0,99 (1)	—
His.....	—	—	—	—	—	—
Arg	—	—	1,1 (1)	—	—	—
Trp	+ (1)	—	—	—	+ (1)	—
CPB	—	—	rien	—	—	—
CPA.....	—	Gln 0,3	Phe 0,5	Leu 0,4	Trp	Phe 0,4
LAP	—	—	—	—	—	—
Amertume	—	—	+	—	—	+
Fragment	170-199	58-77	21-23	130-142	165-199	167-179

TABLEAU 2. — Composition en acides aminés des peptides libérés par action de la présure cristallisée sur la caséine α_{s1}

Peptide	F 1	F 2	F 3	F 4	G 1	H 1
Sephadex	+	+	+	+	+	+
Électroph.	+	+	+	+	—	+
Asx	1,00 (1)	—	0,80 (1)	—	1,00 (1)	1,16 (1)
Thr	1,75 (2)	—	—	—	—	—
Ser	0,94 (1)	—	1,13 (1)	—	0,95 (1)	—
Glx	1,05 (1)	0,81 (1)	—	1,98 (2)	—	3,85 (5)
Pro	1,88 (2)	1,13 (1)	1,30 (1)	—	1,20 (1)	1,35 (1)
Gly	0,99 (1)	—	0,73 (1)	—	0,98 (1)	1,14 (1)
Ala.....	0,99 (1)	—	2,18 (2)	—	2,00 (2)	0,84 (1)
Val.....	1,03 (1)	0,93 (1)	—	—	—	0,73 (1)
Met.....	—	—	—	—	—	+ (1)
Ile	—	—	—	—	—	1,05 (1)
Leu	1,03 (1)	—	—	2,00 (2)	—	0,94 (1)
Tyr	2,44 (3)	—	0,81 (1)	—	0,92 (1)	—
Phe	0,99 (1)	1,13 (1)	—	—	—	—
Lys	—	—	—	—	—	0,94 (1)
His.....	—	—	—	—	—	—
Arg	—	—	—	—	—	—
Trp	—	—	+ (1)	—	+ (1)	—
CPB	—	—	—	—	—	—
CPA.....	—	Phe 0,4	—	{ Gln 1,0 Leu 1,0 Leu 2,0	—	{ Leu 1,00 Glu 0,30 Glu 0,05
LAP	—	—	—	{ Glu 1,0 Gln 1,0	—	{ Ala Gln
Amertume	?	+	—	—	—	—
Fragment	165-179	29-32	157-164	95-98	157-164	129-142

TABLEAU 2 (suite I)

Composition en acides aminés des peptides libérés
par action de la présure cristallisée sur la caséine α_{s1}

Peptide	I 1	J 1	L 1-M 1	M 2-N 2	N 1	O 1
Sephadex	+	—	+	+	+	+
Électroph.	—	—	—	+	+	—
Asx	3,46 (4)	—	1,30 (1)	—	0,83 (1)	1,33 (1)
Thr	1,06 (1)	—	1,10 (1)	—	—	—
Ser	2,80 (3)	—	1,70 (2)	—	—	0,85 (1)
Glx	6,83 (7)	0,89 (1)	5,1 (5)	—	—	4,23 (4)
Pro	2,01 (2)	1,04 (1)	1,9 (2)	—	—	2,05 (2)
Gly	1,83 (2)	—	1,0 (1)	—	—	—
Ala.....	1,56 (2)	0,94 (1)	1,4 (1)	—	—	1,00 (1)
Val.....	3,31 (3)	—	2,0 (2)	—	—	1,17 (2)
Met.....	0,63 (1)	—	0,9 (1)	—	—	—
Ile.....	2,21 (2)	—	1,9 (2)	—	—	0,97 (1)
Leu.....	1,28 (1)	1,09 (1)	2,3 (2)	1,95 (2)	2,17 (2)	1,18 (1)
Tyr.....	—	2,02 (2)	1,0 (1)	—	—	0,47 (1)
Phe.....	1,55 (2)	1,02 (1)	—	—	1,04 (1)	—
Lys.....	2,98 (3)	—	2,8 (4)	—	—	1,78 (3)
His.....	—	—	0,4 (1)	—	—	—
Arg.....	—	—	1,0 (1)	1,09 (1)	0,95 (1)	—
Trp.....	—	—	—	—	—	—
CPB.....	—	—	—	—	—	—
CPA.....	—	Leu 0,3	{ Gly Ile Glu	Leu	—	—
LAP.....	—	—	—	rien	—	—
Amertume.....	—	+	—	+	?	?
Fragment.....	25-57	143-149	102-127	99-101	19-23	102-118

5. — Étude d'autres peptides provenant des caséines

Un certain nombre de peptides, isolés au laboratoire lors de l'étude des séquences des caséines α_{s1} (MERCIER, GROSCLAUDE et RIBADEAU-DUMAS, 1971) et β (RIBADEAU-DUMAS *et al.*, 1972) ont été goûtés pour détecter une éventuelle amertume. Les peptides suivants ont été reconnus amers :

— Provenant de la caséine α_{s1}

H-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-OH séquence 92-99
H-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu-Phe-Arg-OH séquence 145-151
H-Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Gln-Val-Phe-Gly-Lys-OH
séquence 23-34

— Provenant de la caséine β

H-Ala-Pro-Lys-OH séquence 103-105
H-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val-OH séquence 203-209

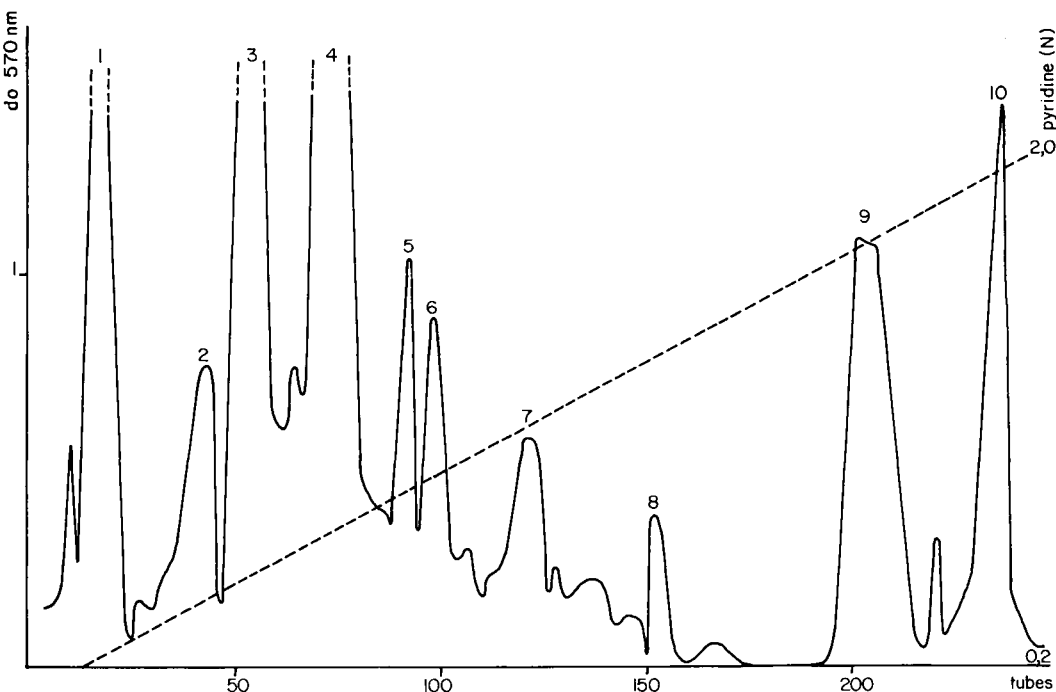


FIG. 5. — Diagramme d'élution de la phase aqueuse obtenue après extraction par le mélange chloroforme-méthanol de la caséine α_{s1} hydrolysée par la présure Hansen

Chromatographie sur une colonne (1 x 150 cm) de résine Dowex AG-50 W x 2, 200-400 « mesh », en tampon pyridine-acide acétique, à 43°C. Le gradient de pH 3,1 à pH 5,0, linéaire en normalité de pyridine, est indiqué par une ligne discontinue. Fractions de 5 ml, vitesse d'élution de 30 ml/h; réaction à la ninhydrine effectuée après hydrolyse alcaline sur des aliquotes de 250 μ l.

TABLEAU 3

Composition en acides aminés (hydrolyse acide de 24 h)
des peptides libérés par action de la présure commerciale
sur la caséine α_{s1}

Peptide	3 A	3 B	4 A	4 B	4 C
Dowex Sephadex	+	+	+	+	+
Électroph.	—	—	—	+	+
Asx	1,01 (1)	—	1,11 (1)	—	—
Thr	1,62 (1)	—	—	0,91 (1)	—
Ser	0,89 (1)	—	0,93 (1)	—	—
Glx	1,39 (1)	1,09 (1)	—	1,05 (1)	—
Pro	2,58 (2)	2,25 (2)	1,24 (1)	1,28 (1)	—
Gly	1,02 (1)	—	0,81 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)
Ala	1,00 (1)	0,92 (1)	1,92 (2)	—	—
Val	1,11 (1)	1,90 (2)	—	1,05 (1)	—
Met	—	—	—	—	—
Ile	—	—	—	—	—
Leu	1,07 (1)	—	—	1,11 (1)	—
Tyr	1,44 (3)	—	1,10 (1)	1,67 (2)	—
Phe	0,94 (1)	1,78 (2)	—	—	—
Lys	—	—	—	—	—
His	—	—	—	—	—
Arg	—	—	—	—	—
Trp	—	—	+	—	—
CPA	—	Phe 0,3	—	Gln	—
Amertume	non goûté	« suave »	—	—	—
Fragment	165-179	25-32	157-164	165-172	—

TABLEAU 3 (suite 1)

Composition en acides aminés des peptides libérés
par action de la présure commerciale sur la caséine α_{s1}

Peptide	5 A	6 A	7 A	8 A	9 A
Dowex Sephadex	+	+	+	+	+
Electroph.	—	—	—	—	+
Asx	—	—	—	1,00 (1)	—
Thr.....	—	—	—	—	—
Ser.....	—	—	—	—	—
Glx.....	—	1,00 (1)	1,35 (1)	2,00 (2)	—
Pro.....	—	—	1,05 (1)	—	—
Gly.....	1,00 (1)	—	—	0,85 (1)	—
Ala.....	—	—	0,90 (1)	—	—
Val.....	—	—	—	0,86 (1)	—
Met.....	—	—	—	—	—
Ile.....	—	—	—	—	—
Leu.....	1,00 (1)	1,00 (1)	1,12 (1)	1,11 (1)	2,00 (2)
Tyr.....	0,78 (1)	1,00 (1)	1,62 (2)	—	—
Phe.....	—	—	0,94 (1)	—	—
Lys.....	—	—	—	1,96 (2)	—
His.....	—	—	—	—	—
Arg.....	—	—	—	—	1,04 (1)
Trp.....	—	—	—	—	—
CPA.....	Tyr 0,2	2 h : Leu 24 h : Leu + Gln	—	—	Leu 0,5
Amertume.....	non goûté	non goûté	+	non goûté	+
Fragment.....	91-94	154-156	143-149	33-40	99-101

DISCUSSION

I. — Spécificité d'action de la présure

a) Action sur la caséine β .

Les résultats de CREAMER *et al.* (CREAMER, MILLS et RICHARDS, 1971) indiquaient que la masse moléculaire du peptide libéré lors de l'action ménagée de la présure sur la caséine β était inférieure de 2 000 à celle de la caséine β . En se basant sur la mobilité électrophorétique de la bande obtenue, ces auteurs concluaient que la liaison hydrolysée se trouvait près de l'extrémité COOH de la protéine.

Les résultats que nous avons obtenus montrent une coupure rapide des liaisons 189-190 et 192-193 de la caséine β (fig. 6). Le calcul des masses moléculaires des peptides 190-209 et 193-209 donne respectivement 2 233 et 1 860 daltons, qui sont proches de 2 000. La troisième liaison hydrolysée, 164-165, libère le peptide 1-164 dont la masse moléculaire est de 18 978 daltons.

Les trois liaisons hydrolysées sont les suivantes :

164-165 : Ser-Leu
 189-190 : Ala-Phe
 192-193 : Leu-Tyr

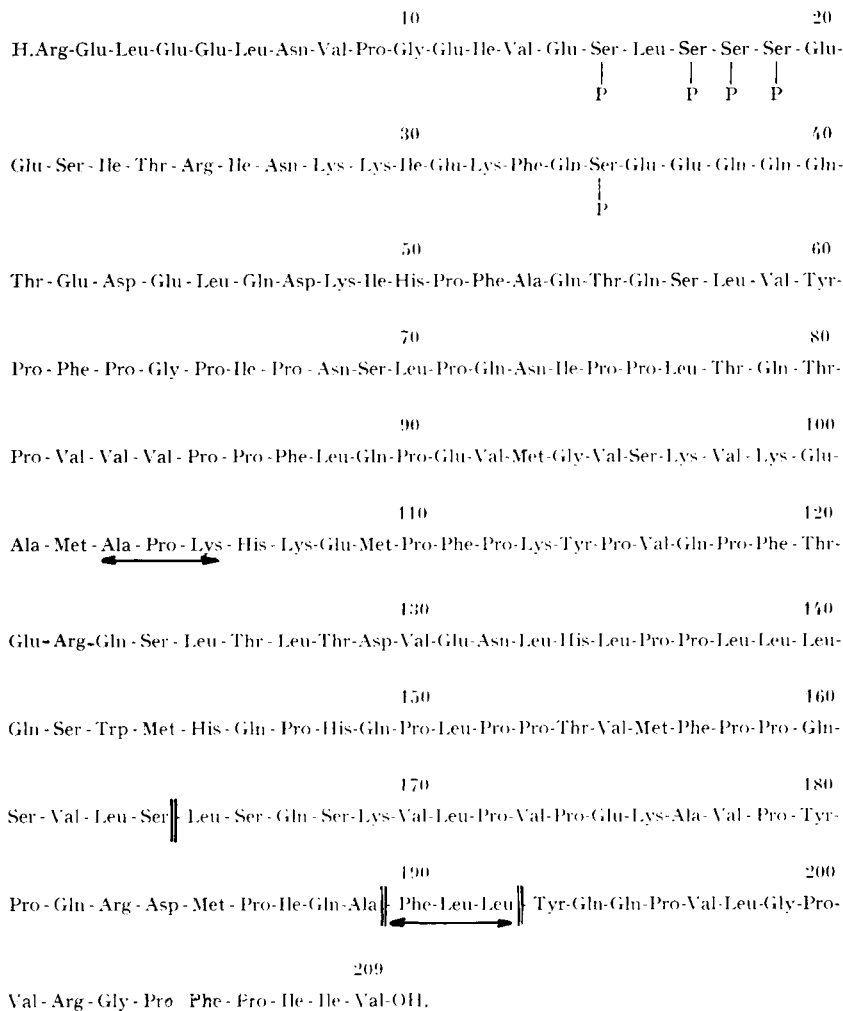


FIG. 6. — Séquence de la caséine βB-bovine

←————→ peptides amers isolés dans ce travail
 ←-----→ peptides amers cités par d'autres auteurs
 || liaisons rapidement hydrolysées par la présure.

Il est à noter que les résidus impliqués par leur groupe amide dans les trois liaisons peptidiques hydrolysées préférentiellement par la présure sont tous trois des résidus hydrophobes. Cependant, il est vraisemblable que la labilité de ces liai-

sons peptidiques résulte en partie de la nature des résidus situés dans leur voisinage immédiat. La caséine β contient par exemple trois autres liaisons Ser-Leu qui, dans les conditions utilisées, n'ont pas été hydrolysées par l'enzyme.

Ces trois liaisons peptidiques étant particulièrement sensibles à l'action de la présure, il est possible que la caséine β subisse une hydrolyse limitée dès le premier stade de la fabrication du fromage.

b) Action sur la caséine α_{s1} .

La localisation, dans la chaîne peptidique de la caséine α_{s1} , des peptides libérés par la présure a permis d'identifier les liaisons peptidiques hydrolysées par cette enzyme (fig. 7). La liaison impliquant le carbonyle du seul résidu tryptophanyle interne (position 164) a été hydrolysée. Six des 8 liaisons impliquant le carbonyle des résidus phénylalanyle (positions 23, 24, 28, 32, 153, 179) ont été également hydrolysées. Une coupure a également eu lieu au niveau de la fonction amide du résidu phénylalanyle en position 150. En ce qui concerne les 17 résidus leucyle de la caséine α_{s1} , nous avons observé 8 coupures du côté de la fonction carbonyle et 4 du côté de la fonction amide. Quelques autres coupures ont été obtenues entre des acides aminés divers : Glu-Asn ; Ile-Lys ; Gln-Glu ; Tyr-Leu ; Glu-Arg ; Ile-His ; His-Ala ; Ala-Gln.

Il apparaît donc que la présure hydrolyse préférentiellement la caséine α_{s1} au niveau des groupes carbonyles des résidus phénylalanine et leucine, et ces résultats corroborent ceux obtenus en étudiant l'action de la présure sur la chaîne B de l'insuline oxydée (BANG-JENSEN, FOLTMANN et ROMBAUTS, 1964 ; FISH, 1971).

2. — Étude des peptides amers

L'élucidation de la structure primaire des caséines α_{s1} et β bovines a permis de déterminer l'origine de la plupart des peptides amers isolés par divers auteurs à partir du fromage ou d'hydrolysats enzymatiques de caséine entière (fig. 6 et 7). Cinq de ces peptides sont des fragments de la caséine α_{s1} correspondant aux segments 23-34, 145-150, 14-17, 17-21 et 26-33 de la chaîne peptidique. Les deux premiers fragments ont été isolés respectivement par MATOBA, HATASHI et HATA (1970) et par BELITZ et SPARRER (1971), à partir d'hydrolysats enzymatiques de la caséine entière. Les trois derniers fragments ont été identifiés par spectrométrie de masse (HODGES, KENT et RICHARDSON, 1972) dans une fraction amère de fromage. Dans ce dernier cas il est important de noter que l'amertume a été déterminée sur le mélange de ces trois peptides. Il est donc possible qu'un seul de ces peptides soit amer. Deux autres peptides amers cités dans la littérature sont des fragments de la caséine β correspondant vraisemblablement aux segments 203-209 et 202-209 de la chaîne peptidique. Ils ont été isolés d'hydrolysats enzymatiques de caséine entière, respectivement par MATOBA, HAYASHI et HATA (1970) et par MINAMIURA *et al.* (1972).

Dans le présent travail, nous avons étudié 11 peptides amers, dont 8 proviennent de la caséine α_{s1} . Deux d'entre eux avaient déjà été obtenus par des auteurs précédemment cités (fragments 23-34 de la caséine α_{s1} et 203-209 de la caséine β). Sur les

9 nouveaux peptides amers identifiés, trois sont des peptides obtenus lors de la détermination de la séquence des caséines α_{s1} et β (fragments 92-99 et 145-151 de la caséine α_{s1} et 103-105 de la caséine β). Les 6 autres peptides (fragments 21-23, 29-32, 99-101, 143-149 et 167-179 de la caséine α_{s1} et fragment 190-192 de la caséine β ont été isolés d'hydrolysats des caséines α_{s1} et β par la présure.

La saveur des peptides dépend manifestement de leur structure puisque seuls certains d'entre eux sont amers. En se reportant à la composition en acides aminés ou à la séquence des peptides amers actuellement connus, il est possible de dégager certaines caractéristiques chimiques communes à ces derniers.

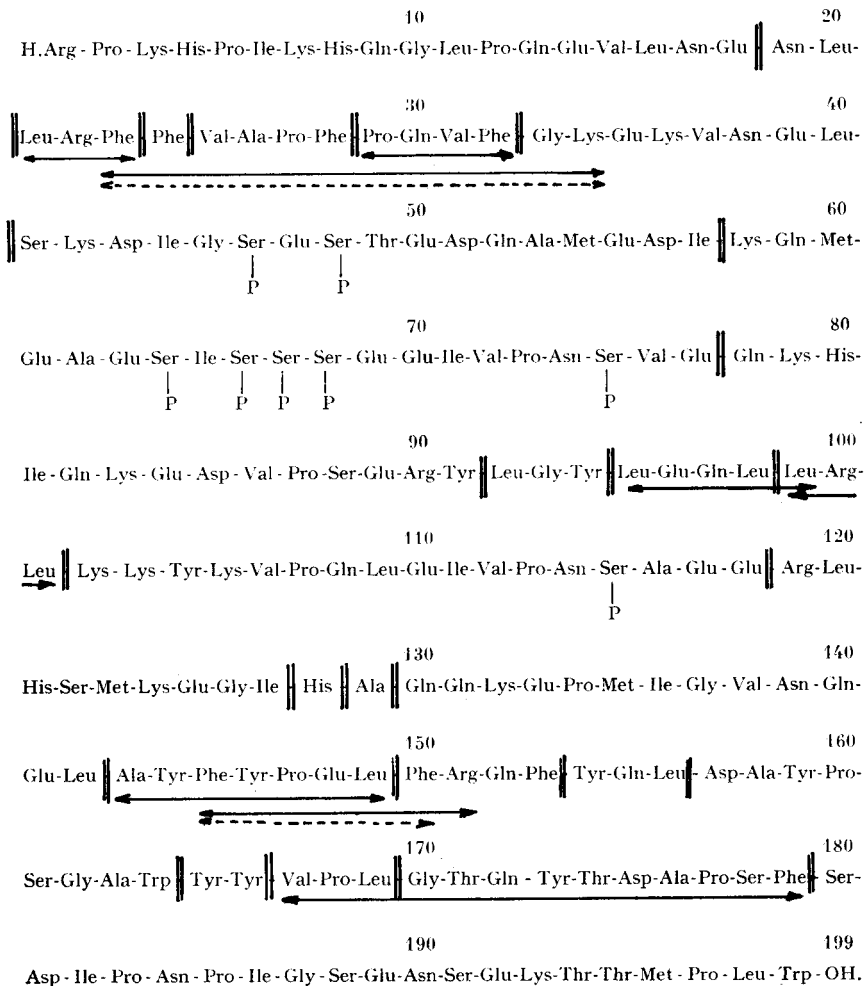


FIG. 7. — Séquence de la caséine α_{s1} B-bovine

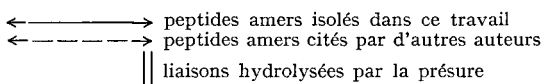


TABLEAU 4
Composition en acides aminés des peptides amers
obtenus à partir de la caséine

Moles d'acides aminés/Moles de peptides													Références		
Ile	Tyr	Phe	Pro	Leu	Val	Lys	Ala	Arg	Glx	Asx	Thr	Ser		Gly	H \bar{O}
2		1	5	2	4			1	2				2	1840	GORDON et SPECK, 1965
1		1	2	1	1	1	1		1				1	2085	MATOBA <i>et al.</i> , 1970
		4	2	2	2	1	1		1				1	1830	MATOBA <i>et al.</i> , 1970
	1	1	1	2	1	1	1		1					1967	MATOBA <i>et al.</i> , 1970
1	1	2	1	1	1			1	1				1	2250	BELITZ et SPARRER, 1971
	1	1	2	4	1			1	2				1	1656	MINAMIURA <i>et al.</i> , 1972
	1	2	1	1				1	1				1	1706	Ce travail
		1	1	1			1							2067	—
2		1	2		1		1						1	1610	—
		1	1	2										2211	—
		1	1	1										2496	—
		1	1	1				1					1	1933	—
	1	1	2	1	1		1	1	1	1	2	1	1	1351	—
		1	1	1	1				1					1872	—
		2	1	1	1		1		1					2098	—
			1	2	2			1						1856	—

H \bar{O} : hydrophobicité moyenne exprimée en cal./résidu d'acides aminés. Les acides aminés sont placés par ordre hydrophobicité décroissante.

TABEAU 5

Composition en acides aminés des peptides amers obtenus à partir du soja

Moles d'acides aminés/Moles de peptides														Références			
Trp	Ile	Tyr	Phe	Pro	Leu	Val	Lys	Ala	Arg	Glx	Asx	Thr	Ser		Gly	HØ	
			1		1									1	1 240	FUJIMAKI <i>et al.</i> , 1968	
					1								1	1	2 355		
					1								1	1	990		
			1		1									1	1 960		
					2	1				1				1	1 814		
					2									1	1 856		
					1				1					1	1 575		
1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	3	3	1	1	2	1 342		ARAI <i>et al.</i> , 1970
		1	1		1	1		1	1	1	1			1	1 357		
		1	1		1	1		1	1	1	1			1	2 646		
			1		1										2 535		

HØ : hydrophobicité (cf. tabl. 4).

TABEAU 6
Composition en acides aminés de peptides amers synthétiques (NEY, 1971)

Moles d'acides aminés/Moles de peptides															
Trp	Ile	Tyr	Phe	Pro	Leu	Val	Lys	Met	Ala	Arg	Glx	Asx	Ser	Gly	H \bar{O}
		1	1									1			1 595
		1			1			1				1			1 705
		1			1										1 860
					2										2 645
				1						1					2 420
1														1	1 665
									1						1 500
														1	1 690
					1	2									1 690
					1	1									2 055
	1													1	1 481
														1	1 325
														1	1 600
		1									1				1 710
					1						1				1 575
	1						1	1	1		1		1		1 410
				3										1	2 028
						3									1 690

H \bar{O} : hydrophobicité (cf tabl. 4).

La composition en acides aminés et l'hydrophobicité moyenne des peptides amers provenant de la caséine et des protéines du soja ou de certains peptides amers d'origine synthétique, sont indiquées dans les tableaux 4, 5 et 6 respectivement. Comme l'avait déjà observé Ney, les peptides amers sont hydrophobes et cette remarque avait conduit cet auteur à proposer une règle permettant de prévoir l'amertume d'un peptide en se basant sur son hydrophobicité : un peptide serait amer lorsque son hydrophobicité moyenne est supérieure à 1 400 calories par résidu d'acide aminé.

Toutefois, bien qu'une hydrophobicité élevée soit une caractéristique assez générale des peptides amers, il est vraisemblable que d'autres facteurs sont impliqués dans le goût amer, entre autre la nature des acides aminés. On remarquera en effet que deux des peptides amers isolés du soja font exception à la règle de Ney : HGly-LeuOH et HSer-Lys-Gly-LeuOH ont une hydrophobicité moyenne respectivement égale à 1 210 et 990 cal./res.

L'étude des tableaux 4 et 5 donnant respectivement les compositions en acides aminés des peptides amers isolés de la caséine et du soja, permet de faire quelques constatations :

- aucun peptide ne contient de l'histidine ou de la méthionine ;
- certains acides aminés sont faiblement représentés : thréonine, sérine, acide aspartique, tryptophane ;
- certains acides aminés sont par contre très fréquents : leucine, phénylalanine, proline, acide glutamique.

Il faut cependant remarquer que cette distribution des acides aminés peut résulter en partie des caractéristiques des protéines d'où ces peptides amers sont originaires. Par exemple la caséine α_{s1} ne contient que 2 tryptophanes, et le nombre de peptides pouvant contenir cet acide aminé est de ce fait limité.

Les 26 peptides amers isolés de la caséine et du soja représentent au total 170 acides aminés et nous avons calculé les pourcentages respectifs des différents acides aminés constitutifs (tabl. 7).

Dans le tableau 8, nous avons indiqué le pourcentage de peptides amers de la caséine et du soja contenant un acide aminé déterminé, sans tenir compte du nombre de résidus de cet acide aminé présents dans chacun des peptides considérés.

L'examen de ces deux tableaux semble indiquer que la nature des résidus constitutifs d'un peptide joue un rôle dans sa saveur ; on remarquera en particulier la fréquence de la leucine, de la phénylalanine et de la proline dans la chaîne des peptides amers.

Afin de vérifier si l'on observe bien un plus grand pourcentage de certains acides aminés dans les peptides amers, nous avons fait le même travail de comparaison avec les peptides amers et non amers obtenus à partir de la caséine α_{s1} B (tabl. 9). Ces calculs montrent des différences notables pour certains acides aminés :

- forte teneur des peptides amers en phénylalanine et leucine par rapport aux peptides non amers ;
- diminution de Asx, Ser, Glx, Ile et Lys, lorsqu'on passe des peptides non amers aux peptides amers ;
- les autres acides aminés se trouvent à un niveau comparable dans les deux séries de peptides.

TABLEAU 7

Pourcentage des divers acides aminés dans les peptides amers du soja et de la caséine

Leu	18,2
Phe	14,1
Pro	11,8
Glx	9,4
Val, Gly	7,6
Tyr, Arg	5,9
Ile, Lys, Ala	4,1
Asx	2,9
Thr, Ser	1,8
Trp	0,6
Met, His	0,0

TABLEAU 8

Pourcentage de peptides amers du soja et de la caséine contenant les divers acides aminés

Leu	80,7
Phe	69,2
Pro, Glx	46,1
Gly	42,3
Tyr, Val, Arg	34,6
Ala	26,9
Lys	23,0
Ile	15,3
Asx, Ser	11,5
Thr	7,6
Trp	3,8
Met, His	0,0

TABLEAU 9

Pourcentage des acides aminés dans les peptides isolés de la caséine α_{s1}

Acides aminés	Peptides non amers (205 AA) (11 peptides)	Peptides amers (57 AA) (8 peptides)	Différence
Asx	9,2	1,7	— 7,5
Thr	4,3	3,5	— 0,8
Ser	9,7	1,7	— 8,0
Glx	19,5	12,2	— 7,3
Pro	9,2	12,2	+ 3,0
Gly	4,8	5,2	+ 0,4
Ala	4,8	5,2	+ 0,4
Val	5,8	7,0	+ 1,2
Met	3,4	0,0	— 3,4
Ile	6,3	0,0	— 6,3
Leu	6,3	17,5	+ 11,2
Tyr	3,4	8,7	+ 5,3
Phe	2,4	17,5	+ 15,1
Lys	7,3	1,7	— 5,6
His	0,4	0,0	— 0,4
Arg	0,9	5,2	+ 4,1
Trp	1,4	0,0	— 1,4

A partir de ces différents résultats, il est possible de faire un certain nombre d'hypothèses concernant la structure des peptides amers :

— leur taille ne doit pas être trop élevée : jusqu'à présent aucun peptide amer de longueur supérieure à 25 résidus n'a été décrit. Pour expliquer cette observation, MATOBA *et al.* ont proposé (MATOBA, HAYASHI et HATA, 1970) le schéma suivant : dans un peptide de grande taille, la structure tertiaire du peptide est telle que les groupements hydrophobes sont enfouis à l'intérieur de la molécule et de ce fait non accessibles. Par contre, dans un petit peptide, les chaînes latérales hydrophobes sont « démasquées » et peuvent donc entrer en contact avec les récepteurs du goût.

— leur composition en acides aminés, en raison de la présence de certains résidus hydrophobes, leucine et phénylalanine principalement, doit être telle que le peptide ait une hydrophobicité assez élevée, supérieure à 1 300 suivant l'échelle de Ney. Quelques exceptions à cette règle peuvent cependant être trouvées. Par exemple, le peptide H-Ser-Lys-Gly-Leu-OH décrit par FUJIMAKI est amer avec une hydrophobicité de 990 ; le peptide de la caséine β H-Ile-Asn-Lys-OH n'est pas amer malgré une hydrophobicité de 1 670.

En conclusion il semble donc qu'un peptide de taille relativement faible (nombre de résidus inférieur à 20), hydrophobe et qui contient de la leucine ou de la phénylalanine a de fortes chances d'être amer.

Reçu pour publication en octobre 1973.

NOTE AJOUTÉE EN COURS D'IMPRESSION

Des travaux récents de R. JAYLE dans ce laboratoire ont montré qu'au cours de l'action primaire de la présure sur la caséine β A², les liaisons Leu 165 Ser 166 et Ser 166 Gln 167 sont coupées sensiblement à la même vitesse. Il ne semble pas que la liaison Ser 164 Leu 165 soit attaquée.

REMERCIEMENTS

Nous remercions J.-L. THAPON de nous avoir fourni la présure cristallisée.
Nous remercions J. URO pour l'aide apportée à ce travail.

SUMMARY

PROTEOLYSIS OF BOVINE α_{s1} - AND β - CASEINS BY RENNIN. A STUDY OF THE PROTEOLYTIC SPECIFICITY OF THE ENZYME AND OF BITTER PEPTIDES RELEASED

The proteolytic specificity of rennin was studied using purified bovine α_{s1} - and β -caseins. A mild action of the enzyme on β -casein releases four peptides. These four fragments, corresponding to the whole molecule, arise from the selective cleavage of three labile peptide bonds which were identified. More vigorous hydrolysis conditions were used in the case of α_{s1} -casein. More than 20 peptides released by rennin were isolated and analysed. The results show a preferential breakdown at the level of carbonyl groups of phenylalanyl and leucyl residues.

The peptides thus obtained were tested for bitterness. Eleven peptides were found to be bitter. On the basis of their chemical characteristics and those of bitter peptides already known, bitterness may be predicted for small-sized and hydrophobic peptides, containing either phenylalanine or leucine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ARAI S., YAMASHITA M., KATO H., FUJIMAKI M., 1970. Applying proteolytic enzymes on soybean. Part. V. A non dialyzable bitter peptide in peptic hydrolyzate of soybean and its bitterness in relation to the chemical structure. *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 729-738.
- ASCHAFFENBURG R., MICHALAK W., 1968. Simultaneous phenotyping procedure for milk proteins. Improved resolution of the β -lactoglobulins. *J. Dairy Sci.*, **15**, 1849.
- BANG-JENSEN V., FOLTMANN B., ROMBAUTS W., 1964. On the proteolytic specificity of rennin. *C. R. Trav. Carlsberg*, **34**, 326-345.
- BELITZ H. D., SPARRER D., 1971. Isolierung eines bitteren peptids aus einem chymotryptischen caseinhydrolysat. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, **4**, 131-132.
- BERG C. P., 1953. Physiology of the amino-acids. *Physiol. rev.*, **33**, 145-189.
- BERRIDGE N. J., WOODWARD C., 1953. A simple method for preparing crystalline rennin. *J. Dairy Res.*, **20**, 255-257.
- CREAMER L. K., MILLS O. E., RICHARDS E. L., 1971. The action of rennets on the caseins. I. Rennin action on β -casein in solution. *J. Dairy Res.*, **38**, 269-280.
- FISH J. C., 1957. Activity and specificity of rennin. *Nature*, **180**, 345.
- FUJIMAKI M., YAMASHITA M., OKAZAWA Y., ARAI S., 1968. Diffusible bitter peptides in peptic hydrolyzate of soybean protein. *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 794-795.
- GORDON D. F., SPECK M. L., 1965. Bitter peptides isolated from milk cultures of *Streptococcus cremoris*. *Appl. Microbiol.*, **13**, 537-542.
- GROSCLAUDE F., MERCIER J. C., RIBADEAU DUMAS B., 1970. Structure primaire de la caséine α_{s1} -bovine. *Eur. J. Biochem.*, **14**, 98-107.
- HARWALKAR V. R., ELLIOT J. A., 1971. Isolation of bitter and astringent fractions from Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, **54**, 8-11.
- HODGES R., KENT S. B. H., RICHARDSON B. C., 1972. The mass spectra of some permethylated acetylpeptides. *Biochim. Biophys. acta*, **257**, 54-60.
- JENNESS R., LARSON B. L., Mc MEEKIN T. L., SWANSON A. M., WHITNAH C. H., Mc L. WHITNEY, 1956. Nomenclature of the protein of bovine milk. *J. Dairy Sci.*, **39**, 536-541.
- KIRIMURA J., SHIMIZU A., KIMIZUKA A., NINOMIYA T., KATSUYA N. J., 1969. The contribution of peptides and amino-acides to the taste of foodstuffs. *J. Agr. Food Chem.*, **17**, 689-695.
- MATOBA T., HAYASHI R., HATA T., 1970. Isolation of bitter peptides from tryptic hydrolyzate of casein and their chemical structure. *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 1235-1243.
- MAZUR R. H., SCHLATTER J. M., GOLDKAMP A. F., 1969. Structure-taste relationship of some dipeptides. *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 2684-2691.
- MERCIER J. C., MAUBOIS J. L., POZNANSKI S., 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.
- MERCIER J. C., GROSCLAUDE F., RIBADEAU DUMAS B., 1970. Structure primaire de la caséine α_{s1} -bovine. *Eur. J. Biochem.*, **14**, 108-119.
- MERCIER J. C., GROSCLAUDE F., RIBADEAU DUMAS B., 1971. Structure primaire de la caséine α_{s1} -bovine. *Eur. J. Biochem.*, **23**, 41-51.
- MERCIER J. C., URO J., RIBADEAU DUMAS B., GROSCLAUDE F., 1972. Structure primaire du caséinomaclopeptide de la caséine α_{B1} -bovine. *Eur. J. Biochem.*, **27**, 535-547.
- MINAMIURA N., MATSUMURA Y., FUKUMOTO J., YAMAMOTO T., 1972. Bitter peptides in cow milk casein digests with bacterial proteinase. Part I. Isolation and determination of amino-acid sequence of a bitter peptide. *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 588-595.
- MURRAY T. K., BAKER B. E., 1952. Studies on protein hydrolysis. I. Preliminary observations on the taste of enzymic protein hydrolyzates. *J. Sci. Food Agric.*, **3**, 470-475.
- NEY K. H., 1971. Voraussage der Bitterkeit von Peptiden aus deren Aminosäurezusammensetzung. *Z. Lebensmittelunter u. Forsch.*, **147**, 64-68.
- PETRISCHEK A., LYNEN F., BELITZ H. D., 1972. Untersuchungen über Bitterpeptide. II. Auftreten von Bittergeschmack in enzymatischen Hydrolysaten verschiedener Proteine. *Lebensm.-Wiss. u. Technol.*, **5**, 77-81.
- RIBADEAU DUMAS B., BRIGNON G., GROSCLAUDE F., MERCIER J. C., 1972. Structure primaire de la caséine β -bovine. *Eur. J. Biochem.*, **25**, 505-514.
- SCHORMULLER J., 1968. The chemistry and biochemistry of cheese ripening. *Adv. Food Res.*, **16**, 231-234.
- SOLMS J., 1971. In OHLOFF, THOMAS A. F. *Gustation and olfaction*, **92**, Academic Press, New York.
- STONE W. K., NAFF D. M., 1967. Increases in soluble nitrogen and bitter flavor development in cottage cheese. *J. Dairy Sci.*, **50**, 1497-1500.