1945

BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA

ÉTUDE CINÉTIQUE D'UNE PROTÉOLYSE LIMITÉE: ACTION DE LA PRÉSURE SUR LA CASÉINE κ

J. GARNIER

avec la collaboration technique de Mme. G. BRIGNON

Station Centrale de Microbiologie et Recherches Laitières, I.N.R.A., Jouy-en-Josas, S. et O. (France)

(Reçu le 2 janvier, 1963)

SUMMARY

Kinetic study of a limited proteolysis: action of rennin on κ-casein

The various thermodynamic constants of the ester-bond hydrolysis by rennin (EC 3.4.4.3) in κ-casein as it occurs during milk clotting have been determined.

The Michaelis constant of the reaction in 0.1 M NaCl at pH 6.9 does not vary between 25° and 40°. Its value is 1.8 ± 0.2 mg/ml or $(3.3 \pm 0.3) \cdot 10^{-5}$ M and is practically equal to the dissociation constant of the rennin–κ-casein complex.

The rate constant of decomposition of the rennin–κ-casein complex is 36 ± 4 sec^{-1} at 35°.

The variation of enthalpy of activation of the intermediary complex rennin–κ-casein is 6300 ± 400 cal/mole.

At 35° the variations of free energy and entropy of activation of the intermediary complex are, respectively, 15800 ± 100 cal/mole and -31 ± 1.5 cal/mole.

These results have been compared with various cases of enzymic hydrolysis, specially hydrolysis of ester bonds.

INTRODUCTION

Il existe peu de données quantitatives sur l'hydrolyse d'une seule liaison par molécule de substrat lorsqu'il s'agit d'un substrat protéique. Cela tient d'abord à la rareté du phénomène et ensuite aux difficultés qui surgissent lorsqu'on veut obtenir des données expérimentales suffisamment précises pour calculer les constantes thermodynamiques de la réaction. Cependant une telle étude présente beaucoup d'intérêt théorique à cause de l'absence de produits intermédiaires d'hydrolyse qui, dans une protéolyse ordinaire, constituent à leur tour de nouveaux substrats et empêchent de donner *a priori* une signification précise aux constantes mesurées puisque l'on a affaire à une série de plusieurs réactions successives. Celles-ci posent un problème qu'il n'est pas toujours facile de résoudre et pourtant il se pose chaque fois qu'on utilise pour des raisons de commodité technique la détermination des produits de la réaction enzymatique plutôt que la disparition progressive du substrat non hydrolysé.

Dans un travail antérieur[1] nous avons montré que l'activité de la présure

(EC 3.4.4.3) sur la caséine κ pouvait se ramener à l'hydrolyse d'une seule liaison ester par mole de substrat. Cette hydrolyse est en relation directe avec l'activité coagulante de cet enzyme[2] et l'on peut schématiser la réaction de coagulation du lait de la manière suivante:

$$\text{Micelles} \underset{}{\overset{Ca^{2+}}{\rightleftharpoons}} \text{complexes } (\alpha_s, \kappa, \beta, \ldots) \text{ solubles}^3 \qquad \text{(I)}$$

$$\text{Complexes } (\alpha_s, \kappa, \beta, \ldots) \text{ solubles} \xrightarrow{\text{présure}} \text{complexes } (\alpha_s, \text{para } \kappa, \beta, \ldots) \text{ solubles} + \text{caséino-glycopeptide} \qquad \text{(II)}$$

$$\text{Complexes } (\alpha_s, \text{para } \kappa, \beta, \ldots) \text{ solubles} \xrightarrow{Ca^{2+}} \text{coagulum} \qquad \text{(III)}$$

α_s, κ, β, représentent les principales caséines des complexes solubles, para κ représente la caséine κ après hydrolyse par la présure de la liaison ester et séparation concomitante du caséino-glycopeptide. On suppose que l'Equilibre I dans le lait est très rapide et ne perturbe pas la Réaction II. En l'absence d'ions divalents (Ca^{2+}, etc.) seule la Réaction II a lieu sans formation de coagulum. Enfin la Réaction III a un fort coefficient de température[4,5] ce qui permet de la dissocier de la Réaction II à basse température[5].

Nous avons étudié ici l'action de la présure sur la caséine κ seule en utilisant des concentrations en enzyme du même ordre de grandeur que celles utilisées pour obtenir la coagulation du lait. Une addition de caséine α_s destinée à reconstituer, au moins en partie, le complexe (α_s, κ, β, ...) ne modifie pas essentiellement le mode d'action de la présure, mais entraîne des caractéristiques nouvelles que nous exposons dans un autre travail[6].

MATÉRIEL ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

Substrat

La caséine κ a été préparée selon la méthode de McKenzie et Wake[7]. Nous avons observé que nous obtenions des résultats plus reproductibles en ce qui concerne le rendement, (environ 5 g de caséine κ pour 150 g de caséine entière) en effectuant la précipitation par le sulfate de sodium à raison de 25 g de Na_2SO_4 anhydre pour 100 ml de volume final protéine et sulfate de sodium. Les concentrations en caséine κ ont été déterminées en utilisant le coefficient d'extinction à 278 mμ, $E_{1\,cm}^{1\,mg/ml} = 1.05$ (réf. 2). Le poids moléculaire de la caséine κ a été pris égal à 26000 (réf. 8). Les solutions de caséine κ ont été additionnées de toluène à raison de 1 goutte pour 5 ml de solution.

Enzyme

Nous avons utilisé la présure cristallisée Hansen fournie par B. Foltmann*. Les cristaux de présure ont été conservés en NaCl 2 M à $-10°$. Pour préparer une solution stock les cristaux sont dissous dans un tampon phosphate 0.05 M (pH 6.3) et dialysés 36 h contre ce même tampon. La solution stock est divisée en parties aliquotes de 0.15 ml que l'on conserve au congélateur. Nous avons utilisé comme unité présure, l'unité définie par Berridge[9]. A 1 U.P. correspondait 12 μg de présure cristallisée ou $3 \cdot 10^{-10}$ moles de présure de poids moléculaire 40000 selon Schwander *et al.*[10]. Les solutions stocks de présure diluées dans l'eau distillée étant peu stables,

* Nous tenons ici à le remercier d'avoir si obligeamment mis à notre disposition cette présure.

elles sont préparées extemporanément et ajoutées à raison de 50 μl pour 5 ml de solution de caséine κ.

Méthode titrimétrique à pH constant

Pour suivre l'hydrolyse nous avons maintenu le pH constant à $5 \cdot 10^{-4}$ unité pH près par addition de soude 0.01 N à l'aide d'une microburette graduée en 0.2 μl comme cela a déjà été décrit[2]. Nous avons opéré sous atmosphère d'azote en milieu thermostaté à $\pm 0.01°$. Les mesures ont été faites en milieu de force ionique constante: NaCl 0.1 M. La solution de caséine κ (5 ml) était ajustée au préalable, pour chaque température, à pH 6.95 (après réglage du pH-mètre à la même température à l'aide d'un tampon phosphate (pH 6.9)). Ce pH est très supérieur au pK du groupe carboxylique de la liaison ester hydrolysée qui est compris entre 4 et 5 (réf. 1), par conséquent la quantité de soude ajoutée pour maintenir le pH constant est égale au nombre de liaisons hydrolysées. Quoique l'appareillage soit utilisé aux limites de ses possibilités et que les dérives de pH des solutions de protéines ne soient pas tout à fait négligeables, l'erreur maximum sur la mesure d'une vitesse initiale ne dépasse pas $\pm 10\%$ environ. La reproductibilité des essais en double est souvent meilleure et de l'ordre de $\pm 5\%$. Quand une dérive non négligeable a été observée, nous en avons tenu compte dans le calcul de la vitesse initiale.

RÉSULTATS

Nous avons utilisé le schéma simple des réactions enzymatiques de HENRI, MICHAELIS ET MENTEN, entre l'enzyme E et le substrat S:

$$E + S \underset{k_1'}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_s} E + P$$

où k_1, k_1' et k_s sont les constantes de vitesse respectives de formation, dissociation et décomposition du complexe intermédiaire ES. Nous avons mesuré les vitesses initiales (les mesures sont possibles environ 30 sec après l'addition de l'enzyme) et nous avons admis que l'état stationnaire était atteint.

La concentration en présure est suffisamment faible pour négliger la caséine κ combinée à l'enzyme. Par suite la vitesse initiale, v_0, exprimée en fonction de la concentration initiale, $[s_0]$, de caséine κ est de la forme

$$v_0 = \frac{k_s[e]\,[s_0]}{K_m + [s_0]} \qquad (1)$$

avec la constante de Michaelis

$$K_m = \frac{k_1' + k_s}{k_1}$$

et $[e]$ représentant la concentration en présure.

Variation des vitesses de protéolyse avec la concentration en présure

Nous avons vérifié la Relation 1 en maintenant constante la concentration en substrat. La Fig. 1 donne un exemple de l'évolution de la réaction à 25° pour différentes concentrations d'enzyme obtenues en diluant, dans l'eau distillée, la même

solution stock de présure cristallisée. Dans les Figs. 2 et 3 nous avons porté les vitesses initiales, v_0, en fonction de la concentration de la présure dans le mélange réactionnel enzyme et substrat à deux températures (25° et 35°). Les erreurs expérimentales ont été indiquées sur chacun des graphiques. On voit qu'il y a proportionnalité entre la vitesse initiale et la concentration en présure, sauf peut-être pour $70 \cdot 10^{-3}$ U.P./ml

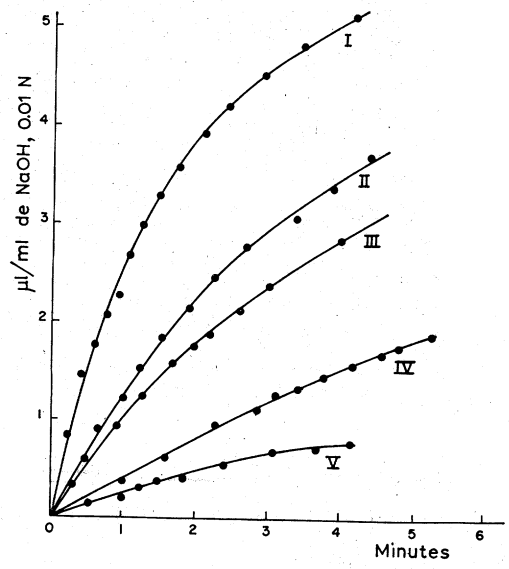

Fig. 1. Cinétique de protéolyse de la caséine κ suivie par titrimétrie à pH constant. Température 25°. Concentrations en présure: I, 73.6; II, 37.0; III, 18.4; IV, 11.0; V, $3.7 \cdot 10^{-3}$ U.P./ml. En ordonnées: nombre de μl de soude 0.01 N ajoutés à 1 ml d'hydrolysat pour maintenir le pH constant (1 μl de NaOH 0.01 N correspond à 10^{-8} mole de H^+ libéré). En abscisses: temps écoulé depuis l'addition de la présure. Concentration en caséine κ: 3.9 mg/ml; NaCl 0.1 M; pH 6.95.

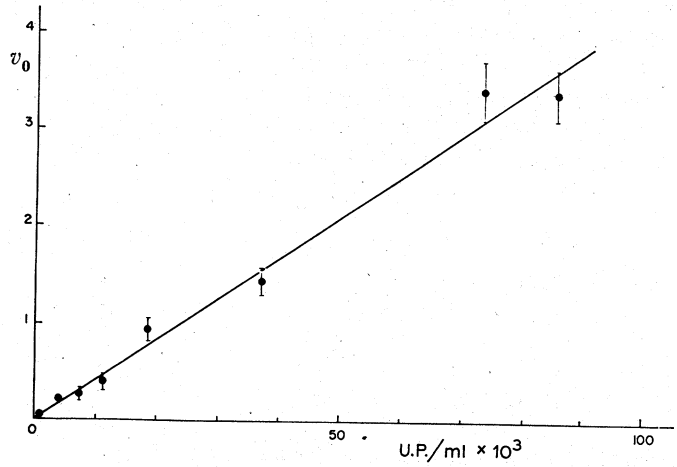

Fig. 2. Variation des vitesses initiales en fonction de la concentration en présure à 25°. En abscisses: concentration en présure (U.P./ml). En ordonnées: vittesse initiale, v_0, de protéolyse exprimée en mole de H^+ libérés/min/ml $\times$ 10^8. Concentration en caséine κ: 3.9 mg/ml; NaCl 0.1 M; pH 6.95.

à 35° où la vitesse observée est trop faible. Cependant, pour de telles concentrations en présure, les vitesses initiales sont grandes et leur mesure est imprécise car elle doit se faire pendant la première minute de la protéolyse, période au cours de laquelle l'addition de l'enzyme à la solution provoque une perturbation d'au moins 30 sec qui n'est pas très reproductible d'un essai à l'autre.

Nous pouvons donc, dans la zone des concentrations en enzyme étudiée, appliquer la relation de HENRI–MICHAELIS (Equation 1) et suivre les variations des vitesses initiales, v_0, en fonction de la concentration en substrat, $[s_0]$, à différentes températures.

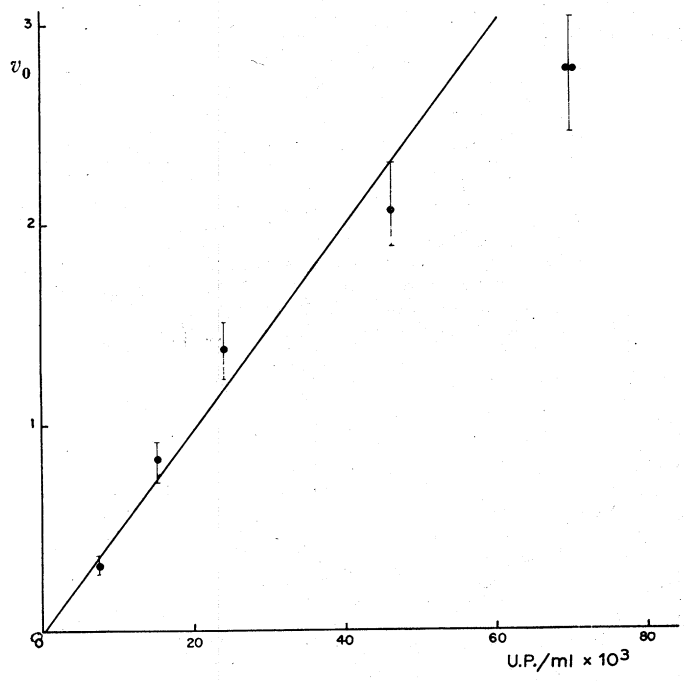

Fig. 3. Variation des vitesses initiales en fonction de la concentration en présure à 35°. En abscisses: concentration en présure (U.P./ml). En ordonnées: vitesse initiale, v_0, de protéolyse exprimée en mole de H^+ libérés/min/ml × 10^8. Concentration en caséine κ: 4.17 mg/ml; NaCl 0.1 M; pH 6.95.

Variation des vitesses de protéolyse avec la concentration en substrat à différentes températures

Lorsque la concentration en caséine κ varie de 0.6 à 19 mg/ml la vitesse initiale de la réaction augmente et nous n'avons pas observé d'inhibition par excès de substrat. Les résultats ont été représentés selon la relation d'EADIE:

$$v_0 = V - K_m\, v_0/[s_0]$$

où $V = k_s[e]$ et nous avons déterminé la constante de Michaelis, K_m, qui est la pente de la droite ainsi obtenue et la vitesse maximum, V, proportionnelle à la constante de vitesse de décomposition du complexe intermédiaire, qui est l'ordonnée à l'origine. Ces déterminations ont été faites à trois températures: 25°, 35° et 40°, avec différentes concentrations en enzyme.

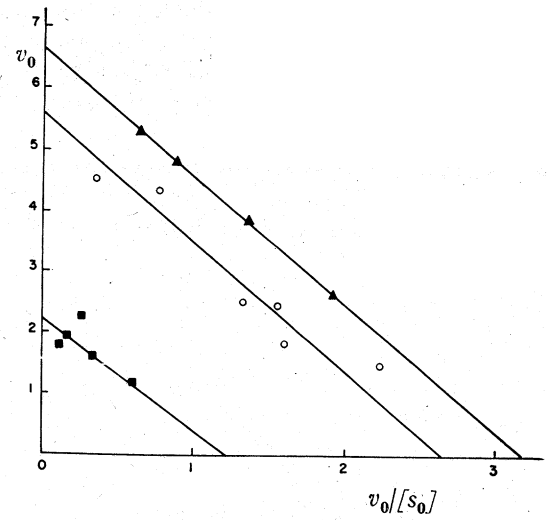

Fig. 4. Détermination de la constante de MICHAELIS à 25° à différentes concentrations de présure. En abscisses: rapport $v_0/[s_0]$ exprimé en H^+/min/mg × 10^9. En ordonnées: vitesse initiale, v_0, exprimée en H^+/min/ml × 10^9. Concentration en présure: ■, $4.6 \cdot 10^{-3}$ U.P./ml; ○, $10.7 \cdot 10^{-3}$ U.P./ml; ▲, $18 \cdot 10^{-3}$ U.P./ml. NaCl 0.1 M; pH 6.95.

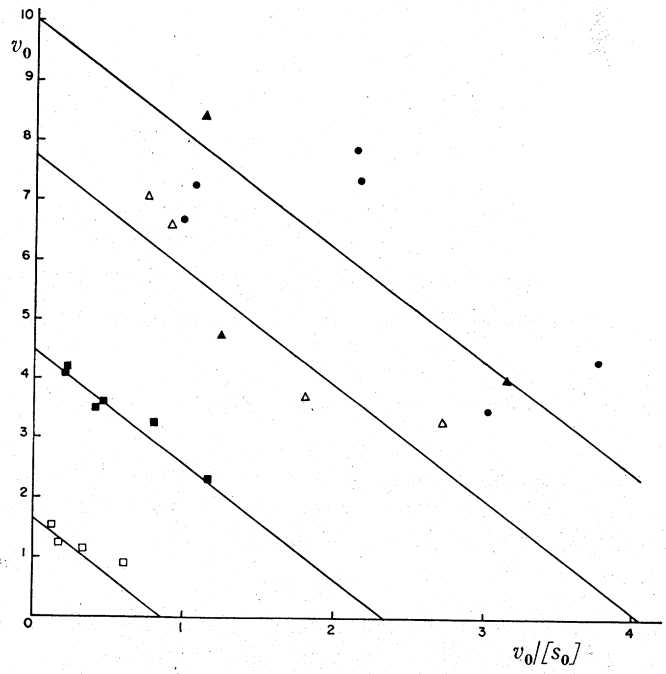

Fig. 5. Détermination de la constante de MICHAELIS à 35° à différentes concentrations de présure. En abscisses: rapport $v_0/[s_0]$ exprimé en H^+/min/mg × 10^9. En ordonnées: vitesses initiales, v_0, exprimées en H^+/min/ml × 10^9. Concentrations en présure: □, $2.6 \cdot 10^{-3}$U.P./ml; ■, $6.6 \cdot 10^{-3}$ U. P./ml; △, $11.8 \cdot 10^{-3}$U.P./ml; ▲, $13.5 \cdot 10^{-3}$U.P./ml; ●, $14.3 \cdot 10^{-3}$U.P./ml. NaCl 0.1 M; pH 6.95.

Les résultats expérimentaux ont été reportés sur les Figs. 4–6. Les résultats obtenus à 35° pour les concentrations en présure supérieures ou égales à $10 \cdot 10^{-3}$ U.P. par ml (Fig. 5), sont assez dispersés pour une raison semblable à celle déjà signalée, la réaction étant très rapide, la vitesse ne reste constante que pendant très peu de temps, la mesure de cette vitesse ne repose que sur quelques déterminations et elle demeure par suite assez imprécise. Les moyennes des valeurs expérimentales K_m pour chaque température ainsi que les écarts maximums observés ont été reportés dans le Tableau I. Dans la limite des erreurs expérimentales, la constante de Michaelis ne varie pas entre 25° et 40° et sa valeur moyenne est de 1.8 ± 0.2 mg/ml.

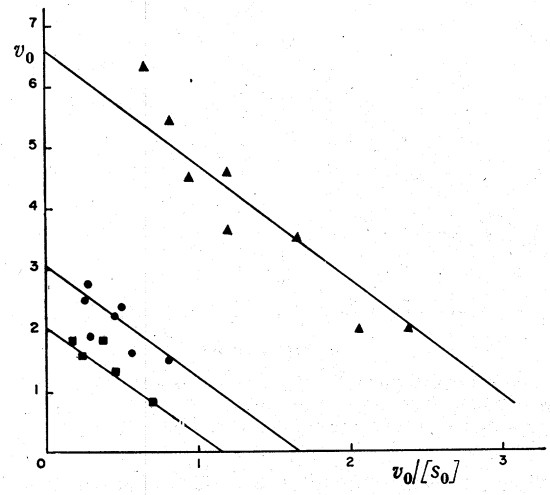

Fig. 6. Détermination de la constante de MICHAELIS à 40° à différentes concentrations de présure. En abscisses: rapport $v_0/[s_0]$ exprimé en H^+/min/mg $\times 10^9$. En ordonnées: vitesses initiales, v_0, exprimées en H^+/min/ml $\times 10^9$. Concentrations en présure: ■, $2.7 \cdot 10^{-3}$ U.P./ml; ●, $4.1 \cdot 10^{-3}$ U.P./ml; ▲, $8.2 \cdot 10^{-3}$ U.P./ml. NaCl 0.1 M; pH 6.95.

Dans la Fig. 7, nous avons représenté la vitesse maximum en fonction de la concentration en présure aux trois températures étudiées. C'est une droite dont la pente correspond à la constante de vitesse de décomposition du complexe enzyme–substrat. La valeur de la pente à différentes températures a été reportée dans le Tableau I et exprimée sous deux formes: l'une en unités arbitraires, l'autre en sec^{-1}. Sous cette dernière forme elle représente le nombre de liaisons esters rompues par

TABLEAU I

VALEURS DE K_m ET DE k_s A DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES

Température	$V[e]^{-1}$ ($10^{-7} \cdot H^+$/min/ml/U.P./ml)	k_s* (sec^{-1})	K_m (mg/ml)	$K_m \times 10^{-5}$ M
25°	4.6 ± 0.6	25 ± 3	1.98 ± 0.3	3.6 ± 0.5
35°	6.6 ± 0.7	36 ± 4	1.55 ± 0.4	2.8 ± 0.7
40°	8.4 ± 0.3	46 ± 2	1.84 ± 0.03	3.3 ± 0.05

* Valeur calculée sur la base d'un H^+ libéré par unité cinétique et de $3 \cdot 10^{-10}$ mole de présure par unité présure.

sec par 1 molécule d'enzyme, nombre calculé sur la base de $3 \cdot 10^{-10}$ mole de présure par unité présure et d'un proton libéré par liaison rompue.

Nous avons indiqué que la constante de Michaelis, K_m, est égale à $(k_1' + k_s)/k_1$ et nos résultats montrent qu'elle ne varie pas entre 25° et 40°. Dans ce même intervalle de température, k_s varie d'un facteur 2 (Tableau I). Il est peu probable que les variations de k_1'/k_1 compensent exactement celle de k_s/k_1 mais il est beaucoup plus probable que k_s peut être considéré comme négligeable devant k_1' et que, pratiquement, la

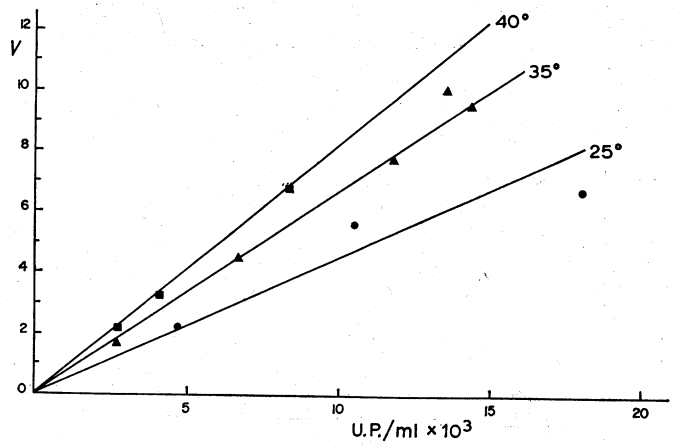

Fig. 7. Variations de la vitesse maximum en fonction de la concentration en présure à 25° (●—●), 35° (▲—▲) et 40° (■—■). En abscisses: concentration dee la présure exprimée en U.P./ml. En ordonnées: vitesse maximum exprimée en H^+/min/ml. 109

constante de Michaelis, K_m, est peu différente de la constante de dissociation du complexe présure–caséine κ c'est-à-dire k_1'/k_1. Par conséquent, la concentration du complexe intermédiaire (ES) est celle qui résulte de l'équilibre $E + S \rightleftharpoons ES$ et l'hypothèse d'HENRI[11] se trouve vérifiée comme c'est le cas dans presque toutes les hydrolyses enzymatiques.

Dans l'hypothèse d'une réaction entre la présure et un dimère de la caséine κ (ref. 2) nous obtenons les valeurs thermodynamiques suivantes pour la formation du complexe intermédiaire d'après les relations:

$$\Delta F = -RT \log. K_m^{-1} \text{ et } \Delta F = \Delta H - T\Delta S$$

à 35°:

$$\Delta F = -6300 \pm 100 \text{ cal/mole}$$

$$\Delta H = 0$$

$$\Delta S = +20 \text{ cal/degré/mole.}$$

Variation des vitesses de protéolyse avec la température: énergie d'activation

Les mesures ont été faites sur des solutions de caséine κ à 3.9 mg/ml pour deux concentrations d'enzyme, dans l'intervalle de température 20°–40°. La Fig. 8 montre une cinétique de protéolyse à 20°, 25°, 30° et 35° et nous avons représenté, dans la Fig. 9, Courbe 1, pour plusieurs séries d'essais, la droite $\log_{10} v_0[e]^{-1}$ en fonction de T^{-1} où v_0 représente la vitesse initiale et $[e]$ la concentration en présure. Comme la constante de Michaelis ne varie pas avec la température, la pente de cette droite

est proportionnelle à l'incrément critique, μ, ou énergie d'activation expérimentale de la réaction de décomposition du complexe intermédiaire en enzyme et produits de la réaction. Nous avons trouvé $\mu = 6900 \pm 400$ cal/mole. La Courbe 2 de la Fig. 9 représente la droite obtenue en remplaçant la valeur de la vitesse initiale par celle de la vitesse maximum, V, dans l'expression $\log_{10} v_0[e]^{-1}$ et où $V[e]^{-1} = k_s$. Dans les deux cas nous trouvons bien la même valeur d'incrément critique: $\mu = 6900 \pm 400$ cal/mole.

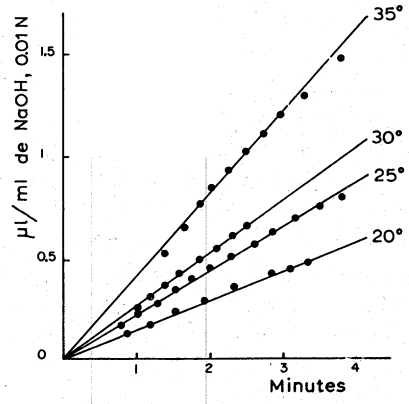

Fig. 8. Cinétique de protéolyse de la caséine κ à différentes températures en NaCl 0.1 M, pH 6.95. En abscisses: temps en minutes écoulé depuis l'addition de la présure. En ordonnées: nombre de μl de NaOH 0.01 N versés par ml d'hydrolysat pour maintenir le pH constant. Concentration en caséine κ: 3.9 mg/ml. Concentration en présure: $7.1 \cdot 10^{-3}$ U.P./ml.

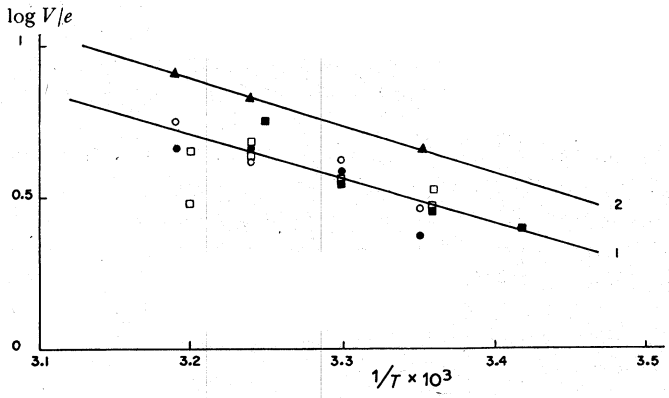

Fig. 9. Variation de la vitesse en fonction de la température. Courbe 1: Variation de la vitesse initiale. 3.9 mg caséine κ/ml. Concentration en présure: ○, $3.6 \cdot 10^{-3}$ U.P./ml; □, $3.8 \cdot 10^{-3}$ U.P./ml; ■, $7.1 \cdot 10^{-3}$ U.P./ml; ●, $7.2 \cdot 10^{-3}$ U.P./ml. Courbe 2: variation de la constante de vitesse, k_s. En abscisses: inverse de la température absolue exprimée en degrés Kelvin. En ordonnées: logarithme décimal du rapport $v_0/[e]$ exprimé en H^+/min/U.P. $\times 10^7$. Dans la Courbe 2 on a suivi la variation du logarithme décimal de la vitesse maximum par unité présure exprimée en H^+/min/U.P. $\times 10^7$. NaCl 0.1 M; pH 6.95.

DISCUSSION

Constante de Michaelis

Nous savons d'après WAUGH[12] que la caséine κ est fortement polymérisée à pH 7 alors que la protéolyse ne semble pas être sensible au degré de polymérisation,

soit que la polymérisation ne modifie pas le nombre de liaisons esters accessibles, soit que l'équilibre polymère $\rightleftharpoons$ dimère s'établisse avec une rapidité suffisante pour ne pas influencer la cinétique de la protéolyse. Cette dernière hypothèse paraît la plus vraisemblable si l'on admet, avec WAUGH[3,12] que les hauts polymères de la caséine entière, représentés par les micelles sont eux-mêmes en équilibre réversible avec de petits polymères dont la taille exacte n'est pas précisée par cet auteur. Sur cette base nous pouvons alors exprimer la constante de Michaelis par rapport à l'unité cinétique que constitue le dimère[2] et $K_m = (3.3 \pm 0.3) \cdot 10^{-5}$ M. Ceci présente également l'avantage de donner pour K_m la même valeur au cas où la caséine κ ne serait pas homogène et ne contiendrait que 50 % du véritable substrat de la présure. En effet dans cette hypothèse la vraie valeur de K_m serait la moitié de celle mesurée mais il y aurait 1 liaison rompue par monomère et non plus par dimère si bien que la valeur de K_m exprimée en mole/l ne changerait pas. Une telle hétérogénéité des préparations de caséine κ est encore à craindre[13].

Des valeurs de K_m du même ordre de grandeur ont déjà été trouvées pour différentes hydrolyses: nous citerons par exemple l'hydrolyse à pH 7 de la β-lactoglobuline par la trypsine ($K_m = 1.7 \cdot 10^{-4}$ M (réf. 14)) (ou par la chymotrypsine ($K_m = 3.7 \cdot 10^{-5}$ M (ref. 15)) et également d'autres hydrolyses telles que celle de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase ($K_m = 4.2 \cdot 10^{-4}$ M (réf. 16)). Dans certains cas, la valeur de K_m pour l'hydrolyse d'une liaison ester est plus faible que pour l'hydrolyse d'une liaison amide. Par exemple l'hydrolyse par la trypsine du benzoyl-L-arginine méthylester donne $K_m = 8 \cdot 10^{-5}$ M (réf. 17) et du benzoyl-L-arginine amide $K_m = 21 \cdot 10^{-4}$ M (ref. 18).

L'assimilation possible de la constante de Michaelis à la constante de dissociation du complexe enzyme–substrat est un fait d'observation pour de nombreuses protéolyses en particulier pour l'hydrolyse de la β-lactoglobuline par la trypsine et la chymotrypsine[14,15]. L'inverse de cette constante représente alors l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

La chaleur de formation (ΔH) du complexe présure–caséine κ étant nulle, toute la variation d'énergie libre est lié à une variation positive d'entropie $\Delta S = +20$ U.E. La formation du complexe présure–caséine κ est donc accompagnée d'un remaniement intramoléculaire important et la liaison est faible ($\Delta H = 0$, $\Delta F = -6300$ cal/mole). Ce remaniement intramoléculaire peut se faire soit par départ d'un grand nombre de molécules d'eau, soit par désorganisation partielle du substrat ou de l'enzyme: la valeur négative de la variation de l'entropie d'activation indique le retour à un état plus organisé du substrat ou de l'enzyme.

Constante de vitesse de décomposition du complexe présure–caséine κ

Nous avons trouvé pour k_s à 35° la valeur de 36 sec^{-1}. Cette valeur est relativement élevée, environ 200 fois plus grande que celle déterminée pour l'hydrolyse de la β-lactoglobuline par la trypsine où $k_s = 0.15$ sec^{-1} (ref. 14). Cette valeur correspond au fait, bien connu expérimentalement, que la réaction de coagulation peut être très rapide ou encore que de très petites quantités d'enzyme sont suffisantes pour obtenir la coagulation contrairement aux quantités importantes nécessaires à une protéolyse plus étendue mais non spécifique telle que celle signalée par NITSCHMANN[19]. Des valeurs élevées de k_s sont également observées lors de l'hydrolyse des liaisons esters. Par exemple l'hydrolyse par la chymotrypsine du benzoyl-

L-phénylalanine méthylester conduit à une valeur de $k_s = 51$ sec^{-1} et l'acétyl-L-tyrosine éthylester à une valeur de $k_s = 193$ sec^{-1} (réf. 20).

Variation d'énergie libre, d'entropie et d'enthalpie d'activation

A partir de la valeur de l'incrément critique, μ, et de la constante de vitesse, k_s, nous avons calculé, d'après la théorie des vitesses absolues, les variations d'énergie libre (ΔF^*), d'enthalpie (ΔH^*) et d'entropie (ΔS^*) d'activation. Ces valeurs ont été réunies dans le Tableau II. La variation d'enthalpie est faible, c'est la diminution d'entropie qui apporte la part la plus importante à l'augmentation d'énergie libre.

De faibles valeurs de ΔH^* sont souvent observées pour l'hydrolyse des liaisons esters, nous citerons les valeurs de 11 900 et 10 900 cal/mole trouvées respectivement pour l'hydrolyse par la chymotrypsine du benzoyl-L-phénylalanine méthylester et de l'acétyl-L-tyrosine éthylester[20].

TABLEAU II

VALEURS THERMODYNAMIQUES CORRESPONDANT A L'ACTIVATION DU COMPLEXE INTERMÉDIARE PRÉSURE–CASÉINE κ À 35°

k_s (sec^{-1})	36 ± 4
ΔF^* (cal/mole)	$+15.800 \pm 100$
μ (cal/mole)	$+6900 \pm 400$
ΔH^* (cal/mole)	$+6300 \pm 400$
ΔS^* (cal/degré/mole)	-31 ± 1.5

Grâce à un appareillage très sensible mais facile à monter, il a donc été possible d'établir avec une précision satisfaisante des données quantitatives relatives à l'hydrolyse enzymatique d'une seule liaison par molécule de substrat. Les valeurs thermodynamiques trouvées sont du même ordre de grandeur que celles concernant les protéolyses enzymatiques ordinaires et plus particulièrement lorsqu'il s'agit d'une activité estérasique. C'est un nouvel argument en faveur de l'hypothèse que nous avions faite sur la rupture par la présure d'une liaison ester dans la caséine κ (réf. 1), argument auquel vient s'ajouter l'action particulière du $LiBH_4$ sur la caséine κ récemment signalée par JOLLÈS *et al.*[21].

L'établissement de ces données quantitatives ont tout leur intérêt quand on sait qu'elles se rapportent à l'action primaire et spécifique de la présure, action qui amorce ensuite le processus proprement dit de coagulation du lait.

REMERCIEMENTS

Nous sommes heureux de remercier M. MOCQUOT pour ses conseils et les encouragements qu'il nous a apportés au cours de cette étude ainsi que M. TONNELAT et Mlle. YON pour les fructeuses discussions qu'ils ont bien voulu nous accorder.

Ce travail a bénéficié d'une subvention du Ministère de l'Agriculture des Etats-Unis (FG-Fr-103-61) et représente une partie d'une thèse de Doctorat soutenue en juin 1962 à la Faculté des Sciences de Paris.

RÉSUMÉ

Nous avons déterminé les différentes constantes thermodynamiques de l'hydrolyse de la liaison ester par la présure dans la caséine κ qui intervient dans le phénomène de coagulation du lait.

La constante de Michaelis de la réaction en milieu NaCl 0.1 M à pH 6.9 ne varie pas avec la température entre 25° et 40°. Sa valeur est 1.8 ± 0.2 mg/ml ou $(3.3 \pm 0.3) \cdot 10^{-5}$ M et se confond avec la constante de dissociation du complexe enzyme–substrat.

La constante de vitesse de décomposition du complexe présure–caséine κ a été trouvée égale à 36 ± 4 sec^{-1} à 35°.

La variation d'enthalpie correspondant à l'activation du complexe intermédiaire enzyme–substrat est 6300 ± 400 cal/mole.

A 35° les variations d'énergie libre et d'entropie d'activation du complexe intermédiaire sont respectivement 15800 ± 100 cal/mole et -31 ± 1.5 cal/degré pour mole.

Ces résultats ont été comparés avec diverses hydrolyses enzymatiques en particulier les hydrolyses de liasons esters.

BIBLIOGRAPHIE

1 J. Garnier, G. Mocquot et G. Brignon, *Compt. Rend.*, 254 (1962) 372.
2 J. Garnier, *Ann. Biol. Animale Biochim. Biophys.*, sous presse.
3 D. F. Waugh, *J. Phys. Chem.*, 65 (1961) 1793.
4 N. J. Berridge, *Nature*, 149 (1942) 194.
5 J. Garnier et R. Chevalier, *Compt. Rend.*, 252 (1961) 350.
6 J. Garnier, *Biochim. Biophys. Acta*, sous presse.
7 H. A. McKenzie et R. G. Wake, *Biochim. Biophys. Acta*, 47 (1961) 240.
8 H. A. McKenzie et R. G. Wake, *Australian J. Chem.*, 12 (1959) 712.
9 N. J. Berridge, *Biochem. J.*, 39 (1945) 179.
10 H. Schwander, P. Zahler et Hs. Nitschmann, *Helv. Chim. Acta*, 35 (1952) 553.
11 V. Henri, *Thèse*, Paris, 1903.
12 D. F. Waugh, *Discussions Faraday Soc.*, 25 (1958) 186.
13 J. Garnier, B. Vibadeau Dumas et J. Gautreau, *Congr. Intern. Laiterie, 16e, Copenhague*, 1962, Vol. B, p. 655.
14 F. Labeyrie et J. Yon, *J. Chim. Phys.*, 50 (1953) 186.
15 J. Yon, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 40 (1958) 45.
16 K. J. Laidler, *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, Clarendon Press, Oxford, 1958, p. 7.
17 G. W. Schwert et M. A. Eisenberg, *J. Biol. Chem.*, 179 (1949) 665.
18 K. M. Harmon et C. Nieman, *J. Biol. Chem.*, 178 (1949) 743.
19 Hs. Nitschmann et R. Varin, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 1421.
20 J. E. Snoke et H. Neurath, *J. Biol. Chem.*, 182 (1950) 577.
21 P. Jollès, C. Alais et J. Jollès, *Biochem. J.*, 84 (1962) 71P.