

BBA 67257

PHOSPHATASE ALCALINE DU LAIT DE VACHE

I. PURIFICATION ET PROPRIETES MOLECULAIRES

G. LINDEN^a, P. MAZERON^b, J. B. MICHALOWSKI^a et C. ALAIS^a

^a Laboratoire de Biochimie et ^b Laboratoire de Biophysique Université de Nancy I, F. 54 037, Nancy Cedex (France)

(Received December 27th, 1973)

(Reçu le 27 decembre, 1973)

SUMMARY

Alkaline phosphatase from cow's milk; I. Purification and molecular properties

Alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) from cow's milk has been prepared (purification ratio: 7440 times) from buttermilk by means of the following techniques; *n*-butanol extraction, ammonium sulfate precipitation, Sephadex G-200 filtration and ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose columns.

Upon ultracentrifugation, electrophoresis and Sephadex G-200 filtration the above preparation appeared homogeneous. The molecular weight has been measured by means of analytical filtration on a Dextran column (190 000) and by means of ultracentrifugation (160 000-170 000). The sedimentation constant *s* and the diffusion coefficient *D* were 6.0 S and $3.4 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$. The amino acid composition of the purified enzyme has been determined. The stereospecific effect of L-phenylalanine on the enzyme was low and of the uncompetitive type.

--

INTRODUCTION

En 1933, Graham et Kay [1] observent dans le lait de vache la présence d'une phosphomonoestérase alcaline. Si de nombreux travaux ont été effectués sur cette enzyme, le plus grand nombre ne vise qu'un but essentiellement pratique: le contrôle de la pasteurisation industrielle du lait. Les autres publications ont trait aux problèmes de répartition, localisation, structure, isolement, réactivation [2-8]; mais certains résultats sont encore imprécis et parfois divergents.

Comme les phosphatases alcalines des mammifères, celle du lait de vache (EC 3.1.3.1) fait, *in situ*, partie intégrante d'une membrane. Ceci est confirmé par les travaux de Hayashi et Smith [3] et de Dowben et al. [4] sur la membrane des globules gras du lait. Leur solubilisation est généralement réalisée par le *n*-butanol qui détruit la structure lipoprotéique membranaire. La préparation la plus active a été obtenue par Morton [6] à partir du babeurre. On sait que ce milieu contient les constituants des membranes des globules gras qui ont été détruits au cours du traitement mécanique

de la butyfication. Au terme de la purification, l'activité phosphatasique augmente d'environ 5000 fois par rapport aux protéines totales du lait.

Dans le présent travail, nous décrivons une méthode de purification de la phosphatase alcaline du lait et nous examinons quelques propriétés moléculaires de l'enzyme purifiée. En outre, nous avons fait l'essai de l'inhibition caractéristique par la L-phénylalanine.

MATERIEL ET METHODES

Matériel

Le babeurre, récolté dès la fin du barattage de la crème, a été fourni gracieusement par la Laiterie de Ménil-la-Tour-54 et a été utilisé le plus rapidement possible après le barattage. Les réactifs suivants proviennent de Merck : *p*-nitrophénylphosphate, L-phénylalanine, 2 amino-2 méthyl propanol, α -naphthylphosphate et bleu de variamine. La α -lactalbumine, la trypsine, la carboxypeptidase A, la sérum albumine, la γ -globuline et l'acrylamide sont fournis par Serva; le Séphadex G-200 et le "blue dextran", par Pharmacia; la DEAE-cellulose, par Whatman.

Méthodes analytiques

L'activité enzymatique est déterminée avec le *p*-nitrophénylphosphate 5 mM, pH 10, en présence de Mg^{2+} 1 mM, et la mesure colorimétrique est faite à 410 nm. L'unité enzymatique a été définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer une μ mole de *p*-nitrophénol par minute.

Les concentrations en protéines des solutions aux différents stades de la purification sont déterminées par la microméthode de Kjeldahl ou par la méthode de Lowry et al. [9].

Les différentes fractions actives ont été concentrées par ultrafiltration sous une pression de trois bars dans une cellule Amicon avec des membranes Diaflo (PM-10).

Les électrophorèses en gel de polyacrylamide ont été effectuées selon la technique de Spencer [10] avec un appareil Canalco en tampon Tris-HCl à pH 8.5 (3 mA par tube pendant 105 min). La protéine a été révélée par le noir amido et l'activité phosphatasique par imbibition du gel avec une solution de α -naphthylphosphate (1 mg/ml) tamponnée à pH 8.7 et coloration du α -naphtol libéré par le bleu de variamine.

La détermination des coefficients de sédimentation et de diffusion a été réalisé à l'aide de l'ultracentrifugeuse analytique Spinco Modèle E (Beckman) en optique schlieren.

L'analyse quantitative des acides aminés a été réalisée, après une hydrolyse totale des échantillons (18 et 48 h, 6 M HCl, 110 °C, dans des tubes scellés sous-vide), à l'aide d'un auto-analyseur Technicon.

Description de la méthode de purification

1er stade ; préparation de la phosphatase brute. La Fig. 1 résume les opérations d'extraction à partir de 240 l de babeurre récoltés au mois de juin. La méthode d'extraction décrite par Morton [6] a été appliquée, mais le traitement à l'acétone a été omis.

Un fractionnement à 30, 65 et 90 % de sulfate d'ammonium a été fait au début

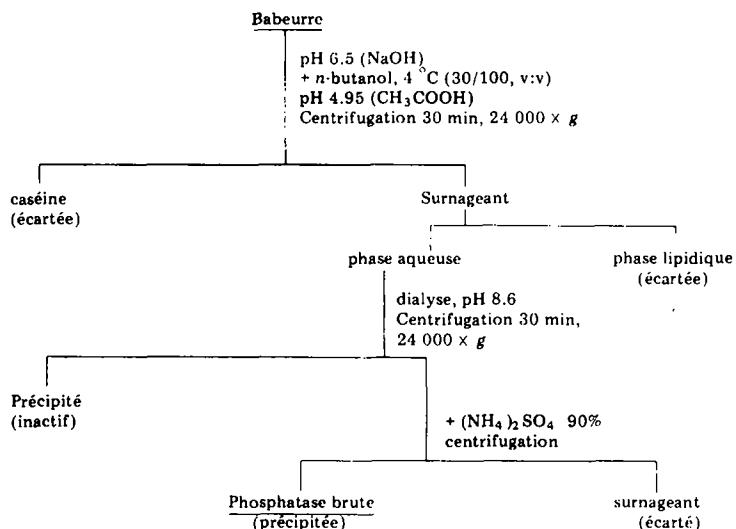


Fig. 1. Schéma de la préparation de la phosphatase brute.

du travail; la fraction active est la dernière précipitée. Les impuretés séparées à 30 et 65% n'étant pas gênantes au cours des étapes suivantes, cette opération n'a pas été répétée.

2ème stade : purification de la phosphatase par chromatographie. La phosphatase brute remise en solution est déposée sur une colonne de Séphadex G-200 (2.5 cm × 40 cm) préalablement équilibrée dans une solution tampon Tris-HCl, pH 8.6. La filtration est réalisée avec la même solution. On recueille des fractions de 5 ml sur lesquelles on détermine l'activité enzymatique (Fig. 2). La courbe de dosage de l'activité enzymatique fait apparaître un seul pic compris entre deux zones à fortes teneurs protéiniques et dépourvues d'activité.

Les fractions de la zone active sont rassemblées puis concentrées par ultrafiltration. La préparation enzymatique est ensuite chromatographiée sur une colonne

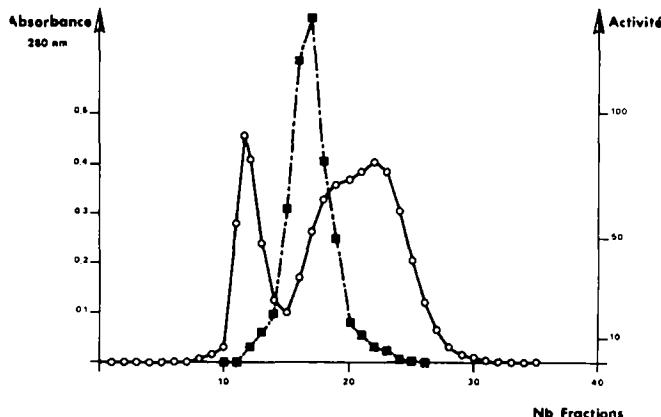


Fig. 2. Filtration moléculaire sur gel Séphadex G-200, en tampon Tris-HCl, pH 8.6, 350 mg de protéines, colonne 2.5 cm × 40 cm, débit 38 ml/h, fractions de 5 ml; absorbance à 280 nm ○—○ activité phosphatasique ■—■ ■

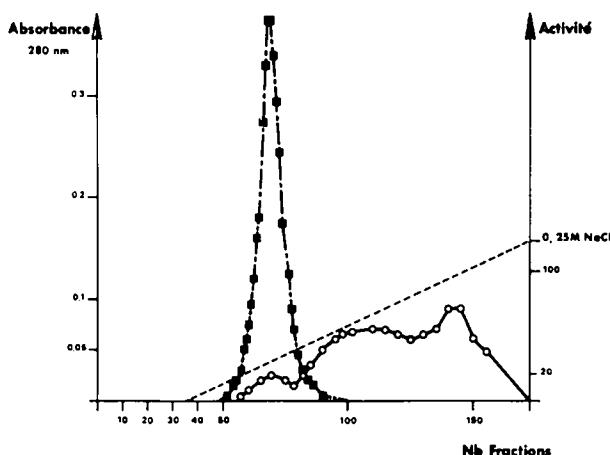


Fig. 3. Chromatographie sur DEAE-cellulose, 70 mg de protéines, colonne 3 cm × 50 cm, débit 80 ml/h, fractions de 5 ml; absorbance à 280 nm ○—○, activité phosphatasique ■—·—■

(3 cm × 50 cm) de DEAE-cellulose équilibrée dans du tampon Tris-HCl, pH 8.6. L'élution est réalisée par un gradient linéaire en NaCl (0.25 M).

L'enzyme est élue sous forme d'un pic apparemment symétrique, qui présente un maximum d'activité phosphatasique pour une concentration en NaCl de 0.06 M (Fig. 3). Nous avons voulu vérifier son homogénéité.

Sur une colonne de Séphadex G-200 (48 cm × 1.2 cm) équilibrée avec du tampon Tris-HCl, pH 8.6, la fraction protéique est élueée en un pic symétrique, mais le maximum d'activité phosphatasique se trouve décalé par rapport au maximum d'absorbance à 280 nm.

La fraction contenant l'enzyme purifiée a été reprise, concentrée et rechromatographiée à travers une colonne de Séphadex G-200 (152 cm × 1 cm) équilibrée avec du tampon Tris-HCl, pH 7.2.

Sur le diagramme de la Fig. 4, il apparaît un pic de protéine dépourvu d'activité

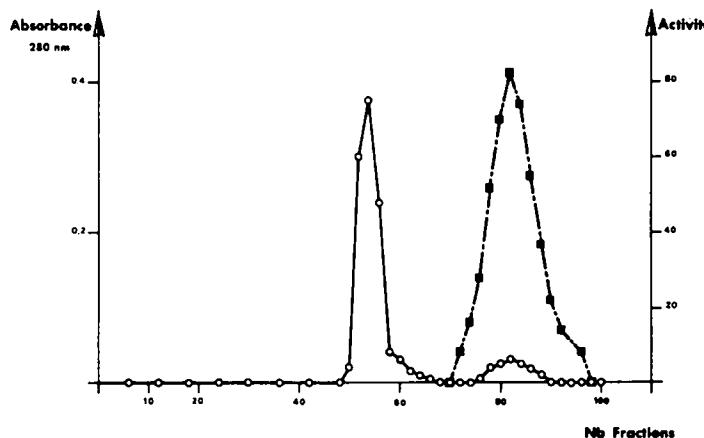


Fig. 4. Filtration finale sur Séphadex G-200 en tampon Tris-HCl, pH 7.2, colonne 152 cm × 1 cm, débit 10 ml/h, fractions de 1 ml; absorbance à 280 nm ○—○, activité phosphatasique ■—·—■

phosphatasique; le pic représentant l'activité se superpose à un pic de protéine dont le tracé montre qu'il est apparemment homogène.

RESULTATS

(A) Bilan des différentes étapes de purification

Le Tableau I donne un résumé de la méthode de purification. L'extrait final a été concentré et son activité spécifique est de 96 unités/mg de protéines. Le rendement de l'opération est voisin de 28 %. Ces chiffres sont satisfaisants, si on les compare à ceux obtenus pour d'autres phosphatases alcalines. Le facteur de purification, exprimé par rapport aux protéines contenues dans le babeurre, est de 7440.

TABLEAU I

PURIFICATION DE LA PHOSPHATASE ALCALINE DU LAIT DE VACHE

	Protéines totales (mg)	Unités totales	Activité spécif. (unités/mg)	Rendement	Purification
Babeurre	59 900	503	$1.2 \cdot 10^{-2}$	100	1
Extrait butanolique	3 850	346	$9 \cdot 10^{-2}$	71	7
Précipité $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (90 %)	2 480	293	$11.7 \cdot 10^{-2}$	58	9
Séphadex G-200	330	273	$81 \cdot 10^{-2}$	54	64
DEAE-cellulose	47	195	4.2	50	550
Produit final	1.48	143	96	28	7440

(B) Propriétés moléculaires

(1) *Coefficient de sédimentation.* Les mesures ont été effectuées à 20 °C dans une cellule normale de 12 mm à secteur de 4°, à la vitesse maximale de 59 780 tours/min (Fig. 5). La valeur de $s_{20,w}$ a été corrigée à l'aide de la relation de Svedberg et Pedersen [11] et est égale à 6.0 S.

(2) *Coefficient de diffusion.* Une cellule à frontière synthétique du type valve a été utilisée pour la détermination de D à la vitesse de 7447 tours/min. Les résultats ont été dépouillés selon la méthode des surfaces [12]. Les calculs montrent que le coef-

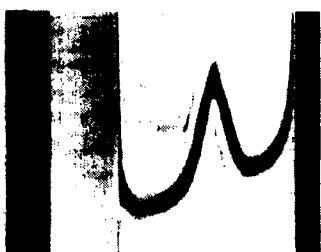


Fig. 5. Diagramme de séédimentation de la phosphatase alcaline purifiée (2 mg/ml) en tampon Tris-HCl 0.1 M, pH 7.2 à la vitesse maximale de 59 780 tours/min pour un angle d'observation en système Schlieren $\theta = 20^\circ$ (la cellule utilisée est du type cellule à frontière préformée à valve).

ficient de diffusion apparent diminue légèrement avec le temps t . L'extrapolation au temps $t = 0$ mène au résultat suivant:

$$D = 3.4 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}.$$

(3) *Masse moléculaire.* La relation classique de Svedberg permet de calculer la masse moléculaire, en admettant que le volume spécifique partiel de la phosphatase est égal à 0.75:

$$M_{s,D} = 170\,000 \text{ daltons}$$

Une mesure directe a également été effectuée au moyen de la cellule à multicanaux d'Yphantis [13]. La valeur de la concentration initiale de la solution, exprimée en unités de surface, a été déduite des expériences de diffusion. La vitesse de rotation choisie pour cet équilibre de sédimentation—diffusion a été de 7447 tours/min. La masse obtenue est $M_{eq} = 160\,000$ daltons.

La masse moléculaire de l'enzyme a également été estimée par la technique de filtration sur gel. L'étalonnage de la courbe V_e/V_0 est réalisé avec la α -lactalbumine (poids moléculaire 14 200), la trypsine (poids moléculaire 23 300), la carboxypeptidase A (poids moléculaire 34 600), la sérum albumine bovine (poids moléculaire 67 000), la γ -globuline ovine (poids moléculaire 160 000) et le blue dextran (poids moléculaire $2 \cdot 10^6$). La relation $V_e/V_0 = f(\log. \text{masse moléculaire})$ est linéaire.

Dans nos conditions opératoires, on obtient un volume d'élution de la phosphatase qui, d'après la courbe d'étalonnage, conduit à une masse moléculaire de $190\,000 \pm 10\,000$ daltons.

(4) *Composition en acides aminés.* La composition en acides aminés de la phos-

TABLEAU II

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE LA PHOSPHATASE ALCALINE DU LAIT DE VACHE

Acides aminés	g/100g protéines*	Nombre de résidus**
Asp	7.0	93
Thr	6.2	90
Ser	12.2	198
Glu	12.4	148
Pro	3.4	54
Gly	4.2	97
Ala	6.6	130
Val	5.6	82
$^{1/2}$ Cys	0.9	14
Met	1.9	19
Ile	3.9	53
Leu	6.0	82
Tyr	2.5	24
Phe	3.7	39
Lys	9.4	113
His	3.3	38
Arg	6.3	63

* Valeurs obtenues par extrapolation linéaire au temps zéro à l'exception de Ala, Val, Tyr, Phe.

** La masse moléculaire utilisée est 170 000 daltons.

phatase alcaline du lait de vache a été déterminée après une hydrolyse acide de 18 h ou 48 h de deux échantillons. Les résultats sont consignés dans le Tableau II. Le nombre de résidus par molécule de protéine a été calculé en prenant une masse moléculaire de 170 000 daltons.

(5) *Inhibition par la L-phénylalanine.* En tampon borate 25 mM, avec le *p*-nitrophénylphosphate 5 mM comme substrat, la L-phénylalanine inhibe la phosphatase alcaline du lait par formation d'un complexe intermédiaire. L'inhibition produite par l'isomère L de la phénylalanine par rapport à un témoin contenant la D-phénylalanine à la même concentration (20 mM) est maximale à pH 9.6. Elle atteint 57% et seulement 39% lorsque le milieu réactionnel contient Mg²⁺ 1 mM.

(6) *Stabilité de l'enzyme au stockage.* Les préparations enzymatiques en tampon Tris-HCl, pH 7.2 à 8.6 conservent la totalité de leur activité à 4 °C pendant plus d'un mois. Pour une conservation plus longue les fractions de chromatographie ont été congelées à -20 °C. Leur activité est inchangée après une période de stockage supérieure à 6 mois.

DISCUSSION

Nous nous sommes inspirés des travaux de Ghosh et Fishman [14] sur la purification de la phosphatase alcaline du placenta humain et de ceux de Morton [6] sur le lait et nous y avons apporté quelques modifications. La concentration des différentes fractions douées d'activité a été réalisée à l'aide de cellules Diaflo en évitant toute perte d'activité.

La méthode de purification qui vient d'être exposée, permet d'obtenir en cinq étapes une enzyme dont le taux d'enrichissement par rapport aux protéines totales du babeurre atteint 7440. Morton [6] avait purifié 5660 fois l'enzyme par rapport aux protéines totales du lait. Si l'on admet qu'il existe un facteur de purification de près de 9 [2] lors du passage du lait entier au babeurre, on constate que l'accroissement est appréciable. Signalons, cependant, que tous les dosages d'activité enzymatique ont été effectués en présence de Mg²⁺ (1 mM). Or, comme pour d'autres phosphatases alcalines [15], nous avons constaté que Mg²⁺ a un effet activateur significatif sur l'hydrolyse du *p*-nitrophénylphosphate à pH 10.0. L'effet activateur est d'autant plus marqué que la préparation est plus pure.

La préparation enzymatique obtenue après filtration sur Séphadex G-200 paraît électrophorétiquement homogène. Il en est de même d'après son comportement en ultracentrifugation analytique. Sa constante de sédimentation est égale à 6.0 S. L'accord entre les valeurs des masses moléculaires 160 000-170 000 déterminées par ultracentrifugation est satisfaisant. La concentration maximale des solutions était égale à deux pour mille; dans ces conditions d'utilisation limite de l'optique schlieren, la précision obtenue est de l'ordre de 10% pour les mesures de masse moléculaire et de diffusion, de 3% pour la mesure de la vitesse de sédimentation; les résultats n'ont pas été extrapolés à concentration nulle.

Par filtration sur Séphadex G-200, Andrews [16] attribuait à la phosphatase alcaline du lait une masse moléculaire de 180 000 ($\pm 10\%$), Barman et Gutfreund [5], une masse de 190 000 ($\pm 10\ 000$), alors que plus récemment Lefranc et Han [8] trouvaient une masse nettement inférieure: 140 000. Par cette méthode, nous avons trouvé une bonne concordance avec celles déterminées par ultracentrifugation.

Si cette valeur est comparable à celles proposées par d'autres auteurs pour des phosphatases d'origines diverses, notamment celles du cerveau de boeuf [15], du foie de boeuf [17], il n'en reste pas moins que les phosphomonoestérases alcalines forment un groupe très hétérogène de ce point de vue.

Des travaux récents ont montré la présence dans le lait de deux [8] et même de quatre isoenzymes [18, 19] de la phosphatase alcaline. L'enzyme que nous avons purifiée correspond probablement à la fraction A [8]. Peereboom [18] a étudié le comportement électrophorétique des différents isoenzymes contenus dans la crème du lait de vache; la fraction que nous avons purifiée présente les mêmes caractéristiques que l'isoenzyme α , équivalent à la fraction A.

La composition en acides aminés que nous avons établie est à notre connaissance la première concernant la phosphatase alcaline du lait de vache. Elle présente un certain nombre de similitudes avec celles du placenta humain rapportées par Fernley [20]: dix acides aminés (Asp, Pro, Ala, Val, Cys, Met, Leu, Phe, His, Arg) sont en proportion très voisine; par contre, les teneurs en thréonine, sérine, acide glutamique et lysine sont plus élevées. Il est à noter que les rapports moléculaires présentés dans le Tableau II ont été calculés sur la base d'une masse moléculaire de 170 000, sans tenir compte de la présence probable d'une partie glucidique.

Enfin, nous avons constaté que la phosphatase alcaline du lait de vache est également inhibée, comme les autres phosphomonoestérases alcalines (14-15), par l'isomère L de la phénylalanine. L'inhibition est également de type incompétitif et résulte de la combinaison stéréospécifique de l'acide aminé avec le complexe enzyme-substrat. L'étude des propriétés catalytiques de la phosphatase alcaline est en cours.

RESUME

La phosphatase alcaline du lait de vache (E.C. 3.1.3.1) a été purifiée 7440 fois à partir du babeurre par les traitements suivants: extraction au *n*-butanol, précipitation par le sulfate d'ammonium, filtration sur Séphadex G-200 et chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-cellulose.

La préparation s'est révélée homogène par les techniques d'ultracentrifugation, d'électrophorèse et de filtration sur Séphadex G-200. La masse moléculaire a été déterminée par ultracentrifugation: 160 000-170 000, et par filtration analytique sur gel de dextrane: 190 000. Le coefficient de sédimentation $s_{20,w}$ est égal à 6.0 S. La valeur du coefficient de diffusion D est de $3.4 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$. La composition en acides aminés de l'enzyme purifiée a été déterminée. L'effet stéréospécifique produit par la L-phénylalanine sur l'enzyme est modéré; l'inhibition est de type incompétitif.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement le Professeur P. Jollès, pour les analyses d'acides aminés et le Professeur M. Lazdunski d'avoir bien voulu faire l'analyse critique du manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Graham, W. R. et Kay, H. D. (1933) *J. Dairy Res.* 5, 54-63
- 2 Kitchen, B. J., Taylor, G. C. et White, I. C. (1970) *J. Dairy Res.* 37, 279-288
- 3 Hayashi, S. et Smith, L. M. (1965) *Biochemistry* 4, 2550-2556
- 4 Dowben, R. M., Brunner, J. R. et Philpott, D. E. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 135, 1-10
- 5 Barman, T. E. et Gutfreund, H. (1966) *Biochem. J.* 101, 460-466
- 6 Morton, R. K. (1953) *Biochem. J.* 55, 795-800
- 7 Peereboom, J. W. C. (1970) *Fette Seifen Anstrichmittel*, 72, 299-308
- 8 Lefranc, G. et Han, K. (1967) *Ann. Inst. Pasteur Lille* 18, 185-196
- 9 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. et Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- 10 Spencer, T. (1970) *Biochem. J.* 116, 927-928
- 11 Schachman, H. K. (1959) in *Ultracentrifugation in Biochemistry*, pp. 75-103, Academic Press, New York
- 12 Elias, H. G. (1961) *Méthodes de l'Ultracentrifugation analytique* 3ème edn, pp. 121-128, Beckman, Zurich
- 13 Yphantis, D. A. (1960) *Ann. New York Acad. Sci.* 88, 586
- 14 Ghosh, N. K. et Fishman, W. H. (1968) *Biochem. J.* 108, 779-792
- 15 Brunel, C. (1972) Thèse doctorat ès-sciences, Montpellier.
- 16 Andrews, P. (1965) *Biochem. J.* 96, 595-606
- 17 Engström, L. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 92, 71-78
- 18 Peereboom, J. W. C. (1968) *Neth. Milk Dairy J.* 22, 137-152
- 19 Buruiana, L. M. et Dema, A. (1969) *Rev. Roum. Biochim.* 6, 275-282
- 20 Fernley, H. N. (1971) in *The enzymes*, 3ème edn, Vol. IV, p. 425, Academic Press, New York