

Biochimie de la coagulation enzymatique du lait*

Par Charles Alais**

Service de Biochimie Appliqué, Université de Nancy-I, France

Summary

The primary enzymatic phase of chymosin (or rennin, EC. 3, 4, 4, 3) on cow casein is confined to the κ -casein fraction; the protective colloid is so destroyed. The digestion yields a very soluble "caseino-peptide" having special properties; it forms the C-terminal moiety of the κ -casein molecule containing all the sugars; the insoluble moiety "para- κ -casein" is linked to the caseino-peptide by a peptidic bond (Phe-Met); it is probably the unique linkage splitted off during this reaction. There is a relationship between the limited proteolysis of κ -casein and the clotting time of milk.

The limited proteolysis occurs also with pepsin. Some fungal proteases having a low proteolytic activity on casein can be used as chymosin substitutes for milk coagulation.

I Introduction

Cet article pourrait être regardé comme une contribution à la célébration d'un centenaire! L'étude biochimique de la coagulation du lait a été entreprise il y a environ cent ans par le suédois Hammarsten. Avant lui, il n'y avait que des hypothèses confuses; avec lui, est venu l'éclaircissement fondamental: la coagulation du lait par la chymosine est la conséquence d'une protéolyse limitée, en milieu neutre, indépendante du processus de coagulation proprement dit¹; et, pour accroître l'intérêt de cette découverte, à quelques années d'intervalle, il fit les mêmes observations sur la coagulation du sang par la thrombine². Le lait et le sang présentent des similitudes; ces deux liquides biologiques contiennent chacun une protéine de faible solubilité: la caséine et le fibrinogène, capables de former un coagulum par l'action d'un enzyme particulier. Après Hammarsten, on trouve d'autres hommes de science qui ont étudié parallèlement le lait et le sang; à l'époque actuelle, on peut citer D.F. Waugh en Amérique du Nord et Hs. Nitschmann en Suisse.

Il y a exactement cent ans, Hammarsten mettait en évidence un petit fragment détaché de la caséine par la chymosine, et qu'il avait dénommé «Molkenalbumose».³ Il est curieux de constater que pendant 50 ans cet état de nos connaissances a très peu évolué, si bien que dans un ouvrage classique, Oppenheimer pouvait écrire à cette époque: «Mit der Besprechung des Labfermentes

treten wir in eines der dunkelsten Gebiete der Fermentlehre ein».⁴ Heureusement, beaucoup de progrès ont été accomplis depuis dans les trois domaines que nous examinerons au cours de cet exposé:

- Connaissance du substrat
- Connaissance de l'enzyme
- Nature de la réaction

II Le substrat - la caséine entière - la caséine κ

L'action de la chymosine se porte sur la protéine précipitée par acidification du lait de vache à pH 4,6; c'est la caséine isoélectrique, que les catalogues dénomment souvent «Caséine de Hammarsten» (ce qui est historiquement inexact, la première description de cette substance a été donnée 40 ans auparavant par Braconnot⁵, savant nancéen peu connu malgré la découverte de substance importantes: le «caséum», le glyco-colle, etc.). Cette protéine a longtemps été considérée comme une substance homogène, mais à partir de 1925, Lindstrom-Lang et Kodama^{6,7} ont démontré son hétérogénéité par des études de solubilité: ils ont ainsi isolé 7 fractions K₁, K₂, K₃... se différenciant par leur teneur en phosphore et leur sensibilité aux ions Ca⁺⁺; données qui ont pris toute leur importance 30 ans plus tard! Au début de l'application de la méthode électrophorétique en veine liquide, Mellander⁸ a identifié 3 fractions, les caséines α , β et γ qui ont eu des destins variés. Seule, la caséine β est restée immuable; la caséine γ représente un curieux mélange de fragments de β et la caséine α a été dissociée en deux nouveaux constituants importants, les caséines α_s et κ .

La figure 1 représente l'évolution des connaissances sur la caséine bovine, récemment schématisée par Guérin⁹, et le tableau 1 résume les propriétés essentielles des principales caséines, avec leur proportion approximative. Un fait remarquable est la petitesse et la similitude des poids moléculaires, entre 20 et 25000; cependant, en solution à pH neutre, et encore plus à l'état natif dans le lait, on a affaire à d'énormes agrégats maintenus par des valences secondaires. Il faut savoir que d'autres caséines existent, mais en quantité minime; notamment, dans le groupe rapide ou α_{s1} est largement prédominant. La figure 2 présente des diagrammes d'électrophorèse montrant la complexité des caséines de différentes espè-

* Article dédié à l'Union Centrale des Producteurs Suisses de Lait (Berne), fondatrice du «Prix International de l'Alimentation Moderne», qui a été attribué à l'auteur en 1971. Manuscrit reçu par la rédaction le 15 septembre 1974.

** Adresse: Professeur Ch. Alais, Case Officielle N° 140, F-54037 Nancy.

Tableau 1. Principales caractéristiques des constituants de la caséine de vache

	Caséine α_{S-1} *	Caséine β^{**}	Caséine κ	Caséine γ
Proportion moyenne %	40	30	15	5
Poids moléculaire	23,600	24,200	20,000	21,000
Nombre de résidus d'acides aminés	199	209	169	181
Phosphore % (atomes/mole).	1,10 (8)	0,56 (5)	0,22 (2)	0,10 (1)
Glucides %	0	0	5	0
Cystéine %	0	0	1,4	0
Solubilité à 20° en présence de calcium	insoluble	insoluble	soluble	insoluble
Absorption: E 280/1cm/0,1%	1,0	0,46	1,2	
Variants génétiques connus:	A, B, C, D	A1, A2, A3, B, C	A, B	A1, A2, A3, B
Hydrophobicité (Kcal/résidu)	1,170	1,330	1,285	
Excès des groupements acides à pH 7,0	+ 15	+ 6	+ 14	- 2

* Données pour le variant α_{S1-B} .

** Données pour le variant β_{A2} .

ces. Ainsi, l'ancien substrat de la chymosine mis en évidence par Hammarsten, est un mélange d'une quinzaine d'espèces protéiques!

Une des propriétés les plus importantes est le comportement en présence de calcium; elle a été exploitée par Waugh et v. Hippel¹¹ pour séparer deux groupes bien distincts:

1. Caséines sensibles au calcium, c'est-à-dire insolubles en présence d'ions Ca^{++} ; c'est le groupe dominant, avec les caséines α_s et β ; mais, du point de vue qui nous occupe, c'est un groupe passif.

2. Caséines insensibles au calcium; en fait, une seule est bien connue, la caséine κ : c'est le constituant le plus important dans le cadre de cette étude, bien qu'elle ne représente que 15% environ de l'ensemble; elle occupe une position exceptionnelle pour les raisons suivantes:

a) La caséine κ est soluble en présence de calcium à toutes températures. Lorsqu'on ajoute à une solution de caséine entière à pH 7 et à 20° du chlorure de calcium à la concentration de 0,4 M, le complexe se dissocie, les caséines α_s et β précipitent, la caséine κ reste dans le surnageant.

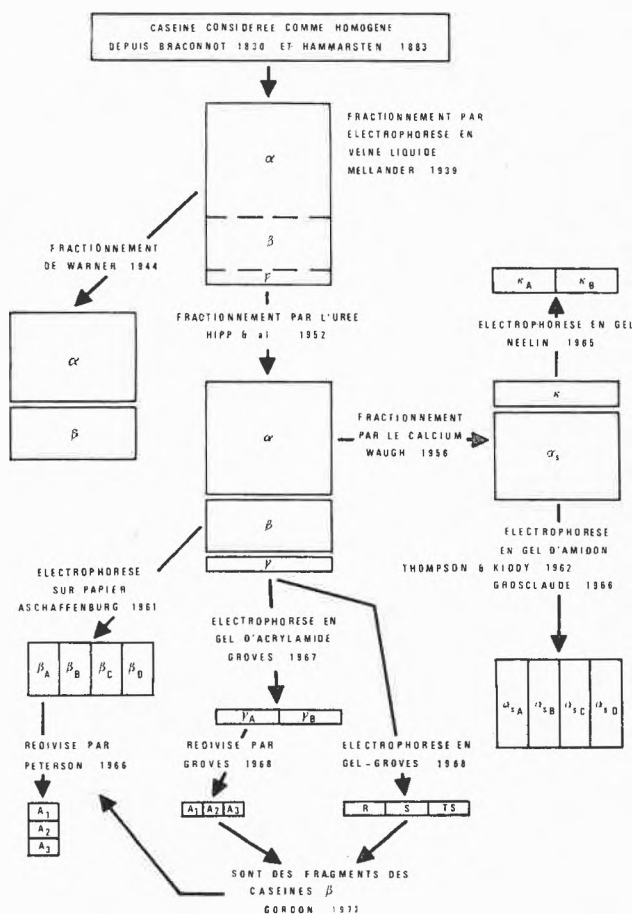


Fig. 1. Evolution des connaissances sur la caséine bovine

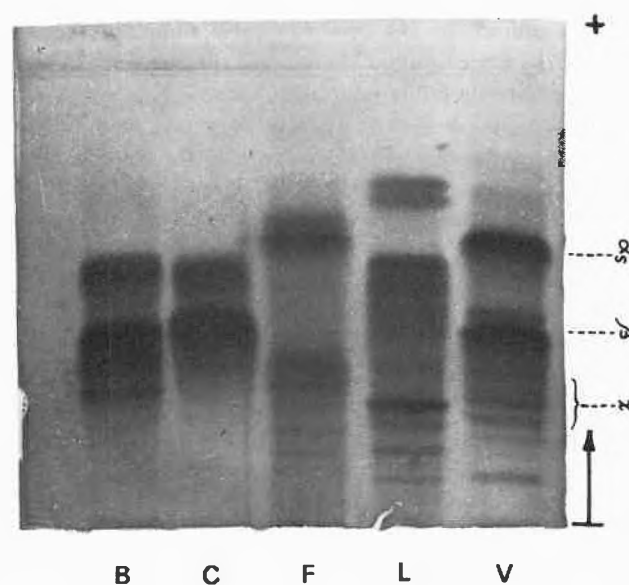


Fig. 2. Electrophorèse en gel d'amidon à pH 8,6, en présence d'urée 7 M et de 2-mercaptoéthanol, de caséines de diverses espèces; de droite à gauche: vache (V), lapine (L), femme (F), chèvre (C), brebis (B); 15 heures, 15 volts/cm (Alais et Jollès¹⁰)

- b) La caséine κ possède un pouvoir stabilisant vis-à-vis du calcium, pour les autres caséines. Elle joue le rôle de «colloïde protecteur»; elle permet la formation de micelles stables en présence de calcium.
- c) La molécule de caséine κ contient une liaison Phe-Met très labile; elle constitue le substrat spécifique de la chymosine (présure), au cours de la phase primaire qui précède la coagulation du lait.
- d) La caséine κ contient deux résidus de cystéine par molécule à l'état natif. Au cours de la préparation, des ponts disulfures se forment au hasard et l'on observe une zone diffuse sur les diagrammes d'électrophorèse. En présence de réactifs réducteurs, cette zone se résout en bandes nettes.
- e) La caséine κ contient des glucides; les proportions moyennes dans la substance préparée par les méthodes de précipitations sont :
 - Galactose 1,3 %
 - Galactosamine 1,4 %
 - Acide N-acétylneuraminique (ou sialique) 2,0 %

Un type spécial d'hétérogénéité est dû à cette composition particulière, car le nombre de résidus de glucides fixés sur la chaîne peptidique peut varier, ce qui explique la présence de plusieurs bandes électrophorétiques, la plus lente correspondant à la protéine dépourvue de glucides et les plus rapides, à la protéine portant de 1 à 5 groupements prosthétiques glucidiques (Mackinlay et Wake¹² et Pujolle et al.¹³).

La structure primaire de la caséine κ bovine est maintenant connue; elle résulte d'une longue série de travaux, dont les plus nombreux ont été effectués par Jollès et al. Les premiers éléments de structures (acides aminés C-terminaux) datent de 1959¹⁴; ensuite, la structure des peptides constitutifs, dont deux sont en relation directe avec l'action de la chymosine, a été établie, puis ils furent reliés entre-eux^{15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22}; dans plusieurs de ces études, des comparaisons ont été faites entre les

caséines K ovine et bovine. Plus récemment, d'autres chercheurs ont apporté leur contribution à l'élucidation des derniers points obscurs de la structure de cette protéine: Mercier et al.^{23, 24}, Brignon et al.²⁵ ont montré que l'acide aminé N-terminal était l'acide pyro-glutamique. La présence des glucides dans la partie C-terminale de la caséine κ a été démontrée en premier lieu par Nitschmann et al.^{26, 27}, puis par Alais et Jollès²⁸; la structure de la partie glycanique et son rattachement à la chaîne peptidique ont été étudiées par Jollès et al.²⁹ et par Fiat et al.^{30, 31}; il s'agit d'une liaison O-glycosidique entre la galactosamine et la thréonine.

La figure 3 présente un raccourci de la structure primaire de la caséine κ , qui ne peut être bien comprise qu'après avoir étudié le mode d'action de la chymosine.

III La chymosine

Cette peptide-peptidohydrolase a eu des ennuis dans son existence d'enzyme! Tout d'abord, on a voulu la confondre avec la pepsine, ce qui était une erreur; ensuite, il y a eu des problèmes de dénomination. La Commission Internationale qui a établi la classification des enzymes a retenu le nom d'origine anglaise: *Rennin* (E. C. 3.4.4.3.); mais ce terme a été beaucoup critiqué à cause du risque de confusion avec une autre protéase du même groupe: *Renin* (E. C. 3.4.4.15). C'est pourquoi, sur la recommandation du meilleur spécialiste actuel de la question, Foltmann³², on revient au terme qui a la priorité chronologique: *chymosine*.

Chacun connaît la fonction naturelle de la chymosine, qui est la digestion du lait dans l'estomac du jeune ruminant avant le sevrage; elle paraît être absente des sécrétions stomacales chez les mammifères monogastriques. Son milieu naturel est acide; son pH optimum d'activité protéolytique est un peu moins bas que celui de la pepsine; pour Nitschmann et Bohren³³, il doit être compris entre 3,5 et 5,5 et pour Foltmann³⁴ il est

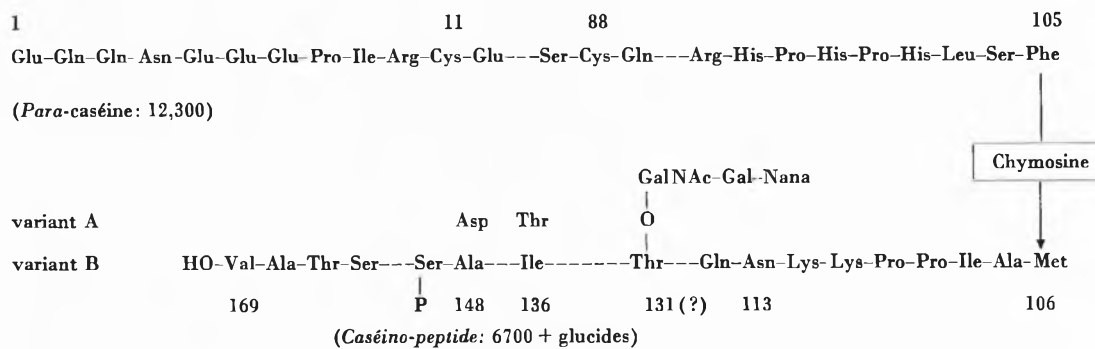
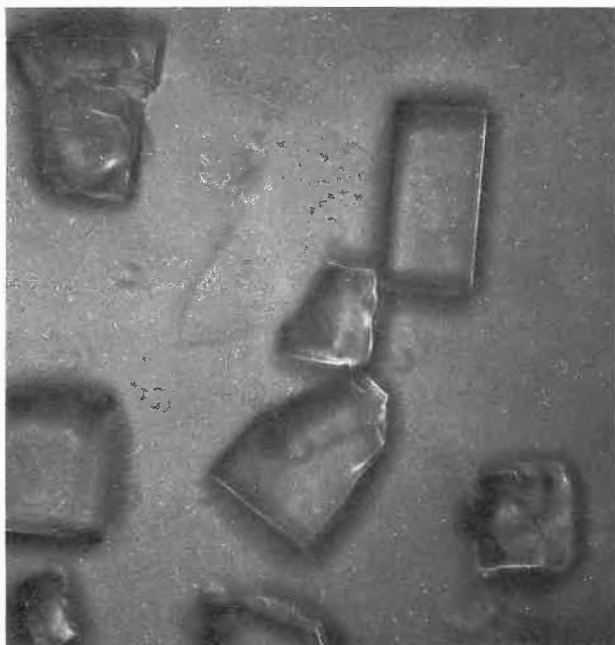
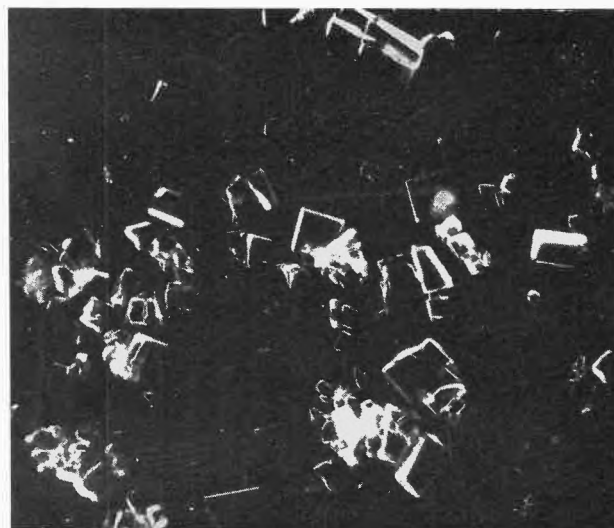


Fig. 3. Parties de la structure primaire de la caséine κ , montrant la coupure de la molécule par la chymosine, la position des cystéines et des variations génétiques. Le résidu N-terminal se présente sous forme pyro-glutaminy! dans l'analyse. Il existe des différences minimales dans la partie N-terminale de cette structure (Jollès et al.²¹) et celle établie par Mercier et al.²⁴

- P: acide phosphorique
- GalNAc: N-acétylgalactosamine
- Nana: acide N-acétylneuraminique
- Gal: galactose



(a)



(b)

Fig. 4. Cristaux de chymosine, $\times 500$; (a) en contraste de phase, (b) en éclairage superficiel (Alais⁴⁰)

près de 4,0, en prenant la caséine entière comme substrat. Cependant la coagulation du lait par la chymosine se produit rapidement à des valeurs de pH proches de la neutralité, donc dans des conditions où la protéolyse est lente.

Dans la caillette (abomasum), c'est une forme inactive qui est sécrétée; en milieu acide, la prochymosine est rapidement transformée en chymosine par un processus autocatalytique activé par les ions H^+ , comme dans le cas de la pepsine. Il y a libération de peptides basiques dans la partie N-terminale et une légère baisse du point isoélectrique de 5,0 à 4,7. La chymosine est une holo-protéine de poids moléculaire 31 000; elle a été bien décrite par Foltmann^{32, 35}. Il existe trois isoenzymes se distinguant par leur activité spécifique. Sa structure primaire est en partie connue³⁶. Un fait remarquable est la similitude entre des segments connus de la chymosine et des pepsines^{37, 38}.

La chymosine a été obtenue à l'état cristallisé pour la première fois par Berridge³⁹. La figure 4 montre des cristaux obtenus par Alais⁴⁰ à partir d'un extrait de caillette de veau.

La chymosine n'appartient pas au grand groupe des protéases à sérine dans le centre actif; par contre, il est probable que des résidus d'acides dicarboxyliques (Asp, Glu) et un résidu de lysine et de tyrosine jouent un rôle dans l'activité protéolytique.

Il faut souligner le fait que la chymosine est un enzyme de médiocre stabilité; elle n'est vraiment stable que de pH 5,3 à pH 6,3; vers pH 3,5 et au-dessus de pH 8 elle est rapidement inactivée.

Après le sevrage, l'estomac des bovins sécrète en réalité deux enzymes de type pepsine; l'un (pepsine II) est abondant et se rapproche de la pepsine de porc, l'autre (pepsine I) est un constituant mineur dont les propriétés le placent entre la chymosine et la pepsine⁴¹. Le tableau 2 présente quelques caractéristiques des protéases gastriques, qui peuvent toutes être utilisées pour la coagulation du lait.

La chymosine est extraite habituellement des caillettes séchées par macération dans l'eau salée. Mais on peut aussi l'extraire par fistulation des veaux vivants, pratique encore peu répandue.

Tableau 2. Propriétés des enzymes gastriques *

	Chymosine	Pepsines bovines		Pepsine porcine
		I	II	
pH optimum d'activité protéolytique sur l'hémoglobine	3,4	2,8	≤ 2	≤ 2
Rapport des activités protéolytiques: pH 2,0/pH 5,6	1,4	7,0	18,5	48
pH pour lequel il y a 50% d'inactivation	8,15	7,45	7,85	7
Poids moléculaire	31,400	?	33,400	34,500

* D'après les données de Antonini et Ribadeau-Dumas (41) sauf les P.M.

IV Le mode d'action de la chymosine sur la caséine

Linderstrom-Lang⁷ puis Holter⁴² ont précisé le mécanisme de la coagulation du lait d'une manière qui est encore acceptable aujourd'hui; la caséine entière renferme un constituant (K_3) qui doit jouer le rôle de colloïde protecteur, en maintenant à l'état dispersé l'ensemble des constituants de la caséine originelle en milieu calcique; la chymosine, dans un premier stade, dégrade spécifiquement ce constituant qui perd ses propriétés; dans un deuxième stade, la suspension est détruite et le caséinate de calcium modifié floccule.

Cette théorie a reçu par la suite des appuis sérieux, en particulier par les travaux de Nitschmann et Lehmann⁴³. Berridge a précisé les deux phases du phénomène de la coagulation³⁹:

1. Réaction «primaire», stade enzymatique indépendant des ions Ca^{++} , au cours duquel la chymosine solubilise une petite partie de la caséine; le coefficient de température (Q_{10}) est voisin de 3; la réaction se produit à une vitesse appréciable à 0°C.

2. Réaction «secondaire» qui est le stade de coagulation proprement-dite, le calcium est nécessaire à son accomplissement; le coefficient de température est élevé: 1,3 à 1,6 par degré; la coagulation ne se produit pratiquement plus vers 0°C.

La réaction primaire est trop limitée pour pouvoir être suivie par les méthodes titrimétriques habituelles; on n'observe pas d'augmentation notable des groupes basiques et acides comme l'ont montré Holter⁴² et Nitschmann et Varin⁴⁴. L'étude séparée de la réaction primaire a été rendue possible par la détermination de l'azote non protéique (soluble dans l'acide trichloracétique) en fonction de la durée l'action de la chymosine sur une solution de caséinate de sodium. Ainsi, Alais et al.⁴⁵ ont mis deux réactions enzymatiques en évidence, comme le montre la figure 5:

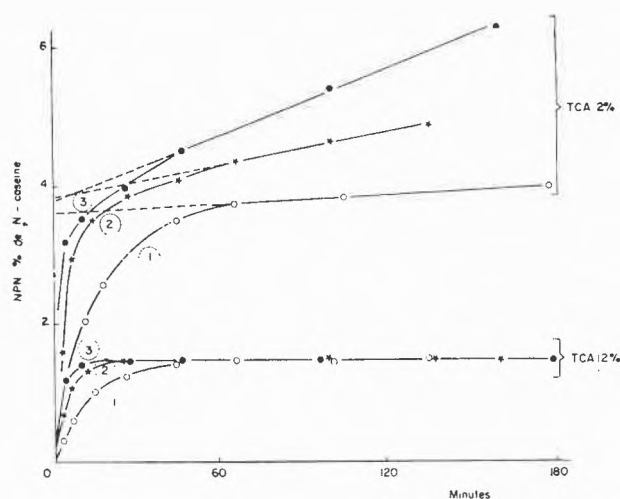


Fig. 5. Protéolyse de la caséine entière de vache (3%), à 25°C et à pH 6,7, par la chymosine cristallisée (1 : 0,4 µg/ml; 2 : 1,6 µg/ml; 3 : 4 µg/ml), mesurée par l'augmentation de l'azote soluble dans 2 et dans 12% d'acide trichloracétique (Alais et al.⁴⁵)

- Réaction primaire spécifique, se produisant à vitesse initiale élevée et se terminant au bout d'une durée correspondant au temps de coagulation, avec libération de 1,5 à 2% de l'azote de la caséine soluble dans 12% d'acide trichloracétique.
- Réaction de protéolyse générale, se produisant à faible vitesse, dans les conditions habituellement suivies pour la coagulation du lait; elle a été plus tard dénommée «réaction tertiaire». Elle apparaît par la libération d'azote non protéique soluble dans 2% d'acide trichloracétique.

Il faut tenir compte d'un fait important, lorsque l'on coagule le lait par la chymosine, on en emploie des doses anormalement faibles; le rapport enzyme/substrat (caséine entière) étant de l'ordre de 1/100 000 à 1/200 000, c'est-à-dire beaucoup moins (environ 300 à 500 fois) que dans les études de protéases, comme la trypsine. Si l'on emploie des doses de chymosine plus élevées, la réaction non spécifique devient plus rapide, mais la coagulation du lait à 30–35°C est presque instantanée. De toute évidence, il existe dans le substrat une ou des liaisons très facilement coupées d'une manière spécifique, et des liaisons moins labiles. Avec la chaîne B de l'insuline comme substrat, et des doses d'enzyme élevées, Fish⁴⁶ a montré que la chymosine a une spécificité voisine de celle de la pepsine.

La cinétique de la réaction primaire a été étudiée au moyen de la méthode à l'acide trichloracétique par Nitschmann et ses collaborateurs^{33, 47, 48} et ainsi une première approche du substrat a été accomplie en montrant que la chymosine agit sur la caséine α et non sur la caséine β . Un peu plus tard, la caséine α a été scindée en α_s et κ , et Waugh et v. Hippel¹¹ ont émis l'hypothèse que la chymosine agirait spécifiquement sur la caséine κ , après avoir démontré son pouvoir stabilisateur vis-à-vis des autres caséines en présence de calcium. Cette hypothèse a été confirmée par Garnier⁴⁹ et Wake⁵⁰. Donc, un seul constituant de la caséine entière est attaqué au cours de la réaction primaire; les caséines α_s et β ne jouent aucun rôle. La méthode titrimétrique à pH constant n'a révélé l'apparition que d'un groupe ionisable pour 55 000 g de caséine κ , après action de la présure⁵¹; c'est-à-dire pour une quantité représentant environ 3 fois le poids moléculaire, ce qui est difficile à expliquer. A la suite de ces travaux et de l'étude de la réaction de l'hydroborure de lithium⁵², l'hypothèse de la coupure d'une liaison non-peptidique avait été émise.

Après action de la chymosine sur la caséine il se forme essentiellement deux substances, l'une insoluble, la *para*-caséine κ , l'autre soluble, un peptide acide qui a été dénommé «caséinoglycopeptide» ou «glycomacropéptide», étudié par Alais⁵³ puis par Nitschmann et al.^{26, 27}. Le peptide a la même séquence C-terminale que la caséine κ ; mais, pendant plusieurs années, on n'a pu mettre en évidence de groupe N-terminal, ce qui avait incliné à penser à une liaison ester entre les deux moi-

Table 3. Amino acid and sugar composition of caseino-glycopeptides *

	Cow %	r	Sheep %	r	Goat %	r
<i>Amino acids</i>						
Aspartic acid	8.15	4	12.0	8	11.5	7
Threonine	16.1	9	11.5	9	14.75	10
Serine	9.8	6	10.6	7	8.2	6
Glutamic acid	19.8	9	18.0	10	17.55	9
Proline	11.15	7	10.7	7	10.6	7
Glycine	1.2	1	0	0	0	0
Alanine	6.5	5	12.0	10	11.5	10
Valine	8.35	3	7.2	5	8.1	5
Isoleucine	9.7	5	8.7	5	8.7	5
Leucine	2.1	1	0.8	0.5	0	0
Lysine	6.4	3	4.95	3	6.05	3
Histidine	0	0	1.3	1	2.05	1
Total	99.25		97.75		99.0	
<i>Non peptidic moiety</i>						
Galactose	6.0	3.0	2.1	1.0	3.6	1.6
Galactosamine	6.5	3.0	2.4	1.0	3.4	1.5
Sialic acid **	10.2	3.0	1.0	0.3	2.8	0.7
Phosphorus	0.37		0.65		0.72	

* % of dry matter. r: molecular ratio. ** in N-acetylneuraminic acid.

(Jollès and Alais, ⁵⁴; Jollès et al. ²⁹).

tiés. Cependant, la séquence N-terminale du peptide a pu être mise en évidence^{15, 16} et le résidu N-terminal est une méthionine très labile. La *para*-caséine étant terminée par la phénylalanine (-COOH)⁵² la liaison est donc bien de nature peptidique: -Phe-Met-. Il ne semble pas qu'il ait d'autre coupure dans les conditions propres à la coagulation (faible dose, courte durée). La figure 3 met en évidence le point d'impact de la chymosine.

La molécule de caséine κ est monocaténaire, mais elle est plutôt déséquilibrée; la partie C-terminale, libérée par la chymosine, représente environ le tiers de la molécule; elle ne contient aucun acide aminé aromatique, ni histidine, ni arginine, ni cytéine; par contre, elle renferme tous les résidus glycidiques comme l'ont montré Jollès et Alais^{54, 29} et Nitschmann et al.^{26, 27}. Le tableau 3 présente la composition des caséino-glycopeptides de 3 espèces de ruminants; les similitudes sont grandes, mais on note l'absence de glycine et la présence d'histidine dans ceux de chèvre et de brebis. Il s'agit de caséino-glycopeptides provenant de l'action de la chymosine sur des caséines de mélange; les teneurs en glucide représentent une valeur moyenne puisque l'on a établi que la caséine κ se présentait sous la forme de variants glycidiques ayant la même chaîne peptidique mais portant 0, 1, 2, 3... chaînes glycidiques latérales.

La moitié insoluble (*para*-caséine) renferme de larges parties hydrophobes et l'on observe de fréquentes duplications d'un même acide aminé; par exemple Glu-Gln-Glu-Asn-Glu-Glu-Glu dans le début N-terminal. Les deux résidus de cystéine se trouvent de ce côté; ils sont probablement libres à l'état natif.

L'étude électrophorétique, en gel d'amidon riche en urée, de la caséine κ traitée par la chymosine a montré

l'apparence de deux *para*-caséines migrant vers la cathode à pH 9,0⁵⁵. C'était un résultat plutôt ennuyeux; mais il semble que l'un d'eux est un artefact; il renferme un résidu de citrulline formé aux dépens d'une lysine.

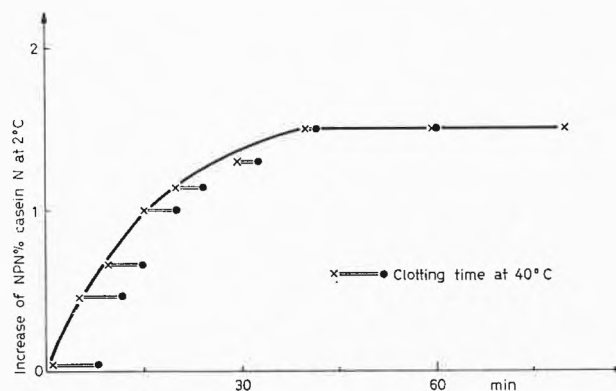


Fig. 6. Libération de l'azote non-protéique (NPN soluble dans 12% d'acide trichloracétique) et raccourcissement du temps de coagulation à 40°C (Alais⁵⁶)

La figure 6 montre la corrélation entre la protéolyse primaire et la coagulation proprement-dite⁵⁶. D'autres expériences ont montré que la première, non seulement précède, mais est nécessaire à la coagulation.

V Les autres enzymes coagulants

La pénurie de chymosine dans le monde a activé la recherche d'enzymes de remplacement, de même que des raisons religieuses dans certains pays (Israël, Inde). On

peut penser que beaucoup d'endopeptidases peuvent couper la liaison Phe-Met et provoquer la coagulation. La pepsine de porc est un produit moins coûteux, mais sa sensibilité aux variations du pH limite son emploi dans l'industrie fromagère; elle est très peu active aux valeurs du pH que l'on trouve habituellement dans le lait, vers 6,7; on l'emploie en mélange avec la chymosine. Ces deux enzymes ont le même mode d'action sur la caséine⁴⁸.

Les autres enzymes digestifs, trypsine, chymotrypsine, sont trop fortement protéolytiques pour cet usage.

Les enzymes végétaux, du groupe de la papaine (ficine, broméline...) ont été essayés; leur activité protéolytique est également trop grande par rapport à leur activité coagulante.

C'est parmi les enzymes fongiques que l'on trouve les agents coagulants les plus intéressants, car leur rapport d'activité protéolytique/activité coagulante est assez faible, égal ou un peu supérieur à celui de la chymosine dans les conditions pratiques de la coagulation du lait. Nous donnons ci-dessous le nom des espèces actuellement exploitées et quelques références concernant leurs activités enzymatiques:

1. *Endothia parasitica*, moisissure du châtaignier, produit une protéase qui est extraite par Pfizer (Suparen); étudiée notamment par Alais et Novak⁵⁷, Mickelsen et Fisch⁵⁸ et Larson et Whitaker⁵⁹.

2. *Mucor pusillus*, moisissure mésophile banale du sol dont la protéase est extraite par Meito-Sangyo (Noury-Rennet); étudiée notamment par Iwasaki et al.⁶⁰ et par Richardson et al.⁶¹; elle a été obtenue dans un état semi-cristallin et un poids moléculaire de 30 000 a été donné par Yu et al.⁶².

3. *Mucor miehei*, moisissure thermophile banale du sol, utilisé par plusieurs firmes de fermentation. La protéase la mieux étudiée est celle de Novo (Rennilase). Ottesen et Rickert⁶³ ont étudié ses caractéristiques moléculaires (P.M. 38 000); Rickert⁶⁴ a étudié son mode d'action sur la chaîne B de l'insuline, qui se rapproche de celui de la pepsine et de la chymosine, et Alais et Lagrange⁶⁵ ont étudié son activité sur la caséine. Sternberg⁶⁶ a obtenu cette protéase à l'état cristallisé.

Un fait important est que ces différents enzymes sont difficiles à comparer entre eux, à la pepsine et à la chymosine, parce que leur sensibilité aux variations du pH, de la température et de la concentration en certains ions, comme Na⁺ et Ca⁺⁺, est très différente. Ceci explique en partie des résultats discordants de plusieurs auteurs. En outre, pour certains enzymes, on ne dispose pas d'une substance complètement purifiée et les études de protéolyse sont souvent faites sur la base de l'activité coagulante et non sur la base du poids, ce qui conduit à des erreurs d'interprétation.

On ne connaît encore que peu de chose sur la spécificité de ces nouvelles protéases vis-à-vis des liaisons peptidi-

ques. Une récente étude de Oka et Morihara⁶⁷ sur l'action des protéinases microbiennes acides sur des peptides synthétiques est un début dans cette voie.

Il n'a pas encore été démontré que ces protéases coagulantes coupent préférentiellement la liaison Phe-Met de la caséine α , comme la chymosine. Il est possible qu'une coupure à un autre endroit, à proximité du précédent, conduite également à la coagulation. Une telle différence dans le mode de protéolyse pourrait expliquer les différences observées sur le plan de l'activité coagulante.

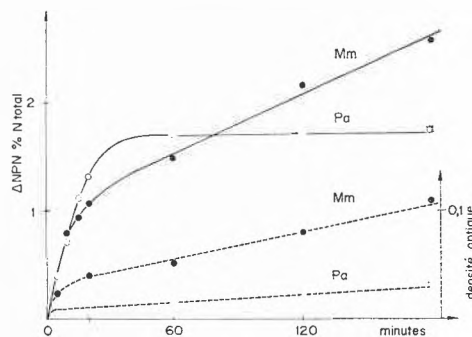


Fig. 7. Courbes de protéolyse de la caséine entière de vache (2%, pH 6,7, 30°C) par l'enzyme de *Mucor miehei* Novo (Mm) et la chymosine (Pa), précipitation avec 12% d'acide trichloracétique (Alais et Lagrange⁶⁵)

La figure 7 donne un exemple de différences dans le déroulement de la protéolyse par la chymosine et par une protéase, celle de *Mucor miehei* (Novo). On remarque que cette protéase libère des substances non-protéiques ayant une absorption notable dans l'ultra-violet, contrairement à la chymosine. L'inflexion de la courbe du «NPN» avec la protéase correspond à un achèvement plus précoce de la réaction primaire; ensuite il n'y a pas de palier; la réaction se manifeste ici, alors qu'avec la présure, elle est inapparente.

VI Conclusions

Le schéma de la figure 8 résume d'une manière un peu simpliste, mais claire, les phases de la coagulation du lait par la chymosine⁶⁸:

1. La «réaction primaire» de la chymosine est une protéolyse très limitée et spécifique; la caséine α est seule touchée et une liaison très labile (Phe-Met) paraît être l'unique point de rupture.
2. La coagulation proprement-dite, ou phase secondaire, consiste en une sorte de polymérisation des micelles de caséine, dont les propriétés physico-chimiques sont modifiées après le départ d'un peptide hydrophile et chargé négativement (présence d'acide sialique).
3. La «réaction tertiaire» est une protéolyse non spécifique, lente dans les conditions de la coagulation.

La réaction primaire de la chymosine sur la caséine α est un des meilleurs exemples de protéolyse très limitée.

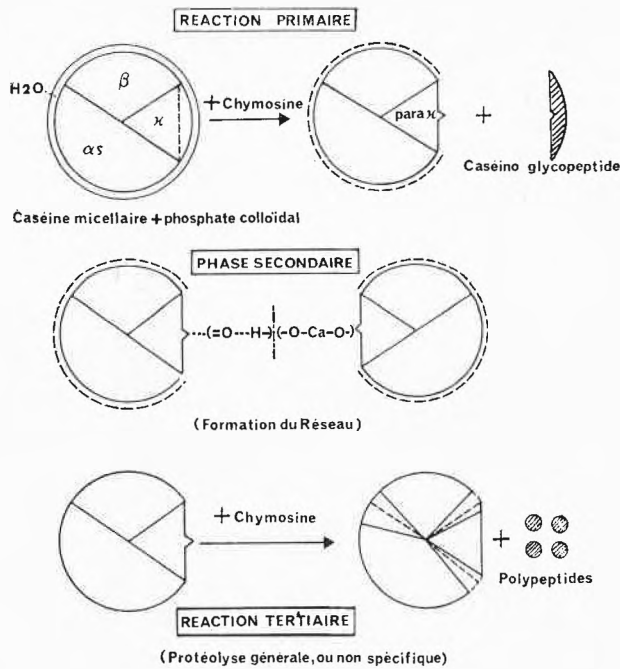


Fig. 8. Représentation schématique des trois phases de la coagulation enzymatique du lait (H₂O: eau liée aux protéines)

Une longue série de travaux a été nécessaire pour en connaître le mécanisme, et il faut souligner le fait qu'une bonne partie a été effectuée ou publiée en Suisse.

Dans cet article, l'étude de la coagulation proprement dite n'a pas été envisagée; c'est une autre partie du phénomène dont la nature est plus biophysique que biochimique. Son mécanisme a été expliqué grâce aux travaux de plusieurs chercheurs, parmi lesquels le professeur H. Hostettler, de Berne, a joué un rôle éminent.

Bibliographie

- 1 O. Hammarsten, *Jber. Fortschr. Thierchem.* 2 (1872) 118.
- 2 O. Hammarsten, *Upsala Läkarförhandl.* 11 (1876) 538.
- 3 O. Hammarsten, *Jber. Fortschr. Thierchem.* 4 (1874) 135.
- 4 C. Oppenheimer, *Die Fermente und ihre Wirkungen*, Leipzig 1926.
- 5 H. Braconnot, *Ann. Chim. Physique* 43 (1830) 337.
- 6 L. Linderstrom-Lang et S. Kodama, *C.R. Trav. Lab. Carlsberg* 16 (1925) n° 1.
- 7 L. Linderstrom-Lang, *C.R. Trav. Lab. Carlsberg* 17 (1929) n° 9.
- 8 O. Mellander, *Biochem. Z.* 300 (1939) 240.
- 9 J. Guérin, *Thesis Sci.*, Nancy 1974.
- 10 C. Alais et P. Jollès, *Internat. J. Biochem.* 1 (1970) 546.
- 11 D. F. Waugh et P. H. v. Hippel, *J. Amer. Chem. Soc.* 78 (1956) 4.576.
- 12 A. G. Mackinlay et R. G. Wake, *Biochem. Biophys. Acta* 104 (1965) 167.
- 13 J. Pujolle, B. Ribadeau-Dumas, J. Garnier et R. Pion, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 25 (1966) 285.
- 14 P. Jollès et C. Alais, *Biochim. Biophys. Acta* 34 (1959) 565.
- 15 A. Delfour, J. Jollès, C. Alais et P. Jollès, *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 19 (1965) 452.
- 16 A. Delfour, C. Alais et P. Jollès, *Chimia* 20 (1966) 148.
- 17 J. Jollès, C. Alais et P. Jollès, *Biochem. Biophys. Acta* 168 (1968) 591.
- 18 J. Jollès, P. Jollès et C. Alais, *Nature* 222 (1969) 668.
- 19 J. Jollès, C. Alais et P. Jollès, *Helv. Chim. Acta* 53 (1970) 1918.
- 20 J. Jollès, F. Schoentgen, C. Alais, A. M. Fiat et P. Jollès, *Helv. Chim. Acta* 55 (1972) 2872.
- 21 J. Jollès, F. Schoentgen, C. Alais et P. Jollès, *Chimia* 26 (1972) 645.
- 22 J. Jollès, A. M. Fiat, C. Alais et P. Jollès, *FEBS Letters* 30 (1973) 173.
- 23 J. C. Mercier, J. Uro, B. Ribadeau-Dumas et F. Grosclaude, *Eur. J. Biochem.* 27 (1972) 535.
- 24 J. C. Mercier, G. Brignon et B. Ribadeau-Dumas, *Eur. J. Biochem.* 35 (1973) 222.
- 25 G. Brignon, J. C. Mercier, B. Ribadeau-Dumas et D. C. Das, *FEBS Letters* 27 (1972) 301.
- 26 Hs. Nitschmann, H. Wißmann et R. Henzi, *Chimia* 11 (1957) 76.
- 27 Hs. Nitschmann et R. Henzi, *Helv. Chim. Acta* 42 (1959) 1985.
- 28 C. Alais et P. Jollès, *Biochim. Biophys. Acta* 51 (1961) 315.
- 29 P. Jollès, C. Alais, A. Adam, A. Delfour et J. Jollès, *Chimia* 18 (1964) 357.
- 30 A. M. Fiat, C. Alais et P. Jollès, *Chimia* 22 (1968) 137.
- 31 A. M. Fiat, C. Alais et P. Jollès, *Eur. J. Biochem.* 27 (1972) 408.
- 32 B. Foltmann, in *Methods in Enzymology*, Academic Press, 1970.
- 33 Hs. Nitschmann et H. U. Bohren, *Helv. Chim. Acta* 38 (1955) 1953.
- 34 B. Foltmann, *Acta Chem. Scand.* 13 (1959) 1927.
- 35 B. Foltmann, *C.R. Trav. Lab. Carlsberg* 35 (1966) 143.
- 36 B. Foltmann et B. S. Hartley, *Biochem. J.* 104 (1967) 1064.
- 37 B. Foltmann et B. Andersen, *FEBS Letters* 17 (1971) 87.
- 38 K. T. Rasmussen et B. Foltmann, *Acta Chem. Scand.* 25 (1971) 3873.
- 39 N. J. Berridge, *Biochem. J.* 39 (1945) 179.
- 40 C. Alais, *Ann. Technol. Agric.* 4 (1955) 113.
- 41 J. Antonini et B. Ribadeau-Dumas, *Biochimie* 53 (1971) 321.
- 42 H. Holter, *Biochem. Z.* 255 (1932) 160.
- 43 Hs. Nitschmann et W. Lehmann, *Helv. Chim. Acta* 30 (1947) 804.
- 44 Hs. Nitschmann et R. Varin, *Helv. Chim. Acta* 34 (1951) 1421.
- 45 C. Alais, G. Mocquot, Hs. Nitschmann et P. Zahler, *Helv. Chim. Acta* 36 (1953) 1955.
- 46 J. C. Fisch, *Nature* 180 (1957) 345.
- 47 Hs. Nitschmann et W. Keller, *Helv. Chim. Acta* 38 (1955) 942.
- 48 H. Mattenheimer et Hs. Nitschmann, *Helv. Chim. Acta* 38 (1955) 687.
- 49 J. Garnier, *Proceedings of the International Symposium on Enzyme Chemistry, Tokyo 1957*, p. 525.
- 50 R. G. Wake, *Austral. J. Sci.* 20 (1957) 167.
- 51 J. Garnier, G. Mocquot et G. Brignon, *C.R. Acad. Sci.* 254 (1962) 372.
- 52 P. Jollès, C. Alais et J. Jollès, *Biochim. Biophys. Acta* 69 (1963) 511.
- 53 C. Alais, *XIVth International Dairy Congress* 2 (1956) 823.
- 54 P. Jollès, C. Alais et J. Jollès, *Biochim. Biophys. Acta* 51 (1961) 309.
- 55 A. G. Mackinlay, R. Hill et R. G. Wake, *Biochim. Biophys. Acta* 115 (1966) 103.
- 56 C. Alais, *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 3 (1963) 391.
- 57 C. Alais et G. Novak, *Le Lait* 48 (1968) 393.
- 58 R. Mickelsen et N. L. Fisch, *J. Dairy Sci.* 53 (1970) 704.
- 59 M. L. Larson et J. R. Whitaker, *J. Dairy Sci.* 53 (1970) 253.
- 60 S. Iwasaki, G. Tamura et K. Arima, *Agric. Biol. Chem.* 31 (1967) 546.
- 61 G. H. Richardson, J. H. Nelson, R. E. Lubnow et R. L. Schwarberg, *J. Dairy Sci.* 50 (1967) 1066.
- 62 J. Yu, G. Tamura et K. Arima, *Biochim. Biophys. Acta* 171 (1969) 138.
- 63 M. Ottesen et W. Rickert, *C.R. Trav. Lab. Carlsberg* 37 (1970) 301.
- 64 W. Rickert, *C.R. Trav. Lab. Carlsberg* 38 (1970) 1.
- 65 C. Alais et A. Lagrange, *Le Lait* 52 (1972) 407.
- 66 M. Z. Sternberg, *J. Dairy Sci.* 54 (1971) 159.
- 67 T. Oka et K. Morihara, *Arch. Biochem. Biophys.* 156 (1973) 543 et 552.
- 68 C. Alais, *La Science du lait*, 3^e édition, SEPAIC, Paris 1974.