

Etude biochimique d'une protéase coagulante produite par *Mucor miehei*

I. ACTIVITE COAGULANTE ET ACTIVITE PROTEOLYTIQUE

par

C. ALAIS et A. LAGRANGE

Laboratoire de Biochimie Appliquée, Université de Nancy-I F (54) Nancy

INTRODUCTION

Au cours des 10 dernières années, les recherches ont été activement poussées dans le but de trouver des enzymes coagulant le lait qui puissent être substituées à la présure animale traditionnelle, dont la production mondiale est insuffisante pour des raisons zootechniques et économiques variées que nous avons déjà exposées (Alais et Novak, 1968 ; Alais, 1970, 1971). Mais il y a d'autres moteurs pour la recherche d'enzymes coagulantes nouvelles : l'un d'eux est la proscription dont souffre la présure animale, dans certains pays, pour des raisons philosophiques ou religieuses ; l'usage d'enzymes d'origine microbienne ou végétale faciliterait le développement de l'industrie fromagère dans des régions où les ressources alimentaires sont limitées. L'autre est le désir de trouver des enzymes ayant des caractéristiques différentes, pouvant être favorablement exploitées dans la pratique.

De l'ensemble des travaux publiés ces dernières années, il ressort que ce sont des enzymes fongiques qui ont les propriétés les plus satisfaisantes pour l'utilisation en fromagerie. Le travail que nous avons entrepris concerne précisément une enzyme de ce type ; elle est produite par *Mucor miehei* et fabriquée par la firme « Novo Industrie A/S » Copenhague.

Le nombre de publications consacrées à cette protéase est encore limité et elles proviennent principalement du Danemark et d'Allemagne. Quelques auteurs se sont intéressés à ses aptitudes fromagères, comparées à celles de la présure animale et d'autres enzymes coagulantes (N. Hillerod, 1969 ; Behnke et Siewert, 1969 ; Prins et Nielsen, 1970 ; Hamdy et Edelstein, 1970 ; Mayr, 1971 ; Thomasow et al., 1971). Deux études biochimiques ont été récemment publiées, l'un sur la purification et la composition de l'enzyme par Ottesen et

Rickert (1970) et l'autre sur son action sur la chaîne B de l'insuline, par Rickert (1970). D'après ces auteurs, cette enzyme aurait un poids moléculaire voisin de 38 000, son point isoélectrique serait 4,2. Elle contient une forte proportion de proline, d'acides aminés hydroxylés et d'acides aminés acides, en comparaison avec la faible quantité d'acides aminés basiques présents. Elle est stable en solution de pH 3 à pH 6. Une autre préparation enzymatique, provenant d'une souche américaine de *Mucor miehei* (NRRL 3 420) a été dernièrement étudiée par Sternberg (1971) qui a indiqué des caractéristiques moléculaires voisines de celles mentionnées plus haut et qui a classé cette enzyme parmi les protéases acides.

Dans cette communication, nous présentons la première partie d'une étude qui a pour objet les activités de l'enzyme Novo et qui sera doublée d'une expérimentation pratique en vue d'apprécier ses aptitudes à la coagulation du lait de fromagerie.

MATERIEL ET METHODES

1) La protéase de *Mucor miehei*

Mucor miehei (Cooney, Emerson) est une moisissure banale du sol ; cette espèce est plutôt thermophile ; on la cultive habituellement à 34° C en immersion. La souche utilisée par « Novo Industri A/S » provient du « Centraalbureau voor Schimmelcultures », Baarn (Hollande) ; elle est répertoriée CBS 370-65 (fig. 1). D'autres souches ont été utilisées par d'autres laboratoires spécialisés dans les fermentations ; nous ne savons pas si elles sont différentes de la première.

Le *Mucor* est cultivé dans des conditions permettant d'obtenir beaucoup de mycélium et peu de spores : culture à 34° C en milieu aéré et agité, contenant de l'amidon hydrolysé, des protéines de soja, de l'orge broyé et des sels, à pH 6,5. L'enzyme est extrait du liquide, après élimination du mycélium, par des précipitations et filtrations diverses.

La préparation commerciale (dénomination « Rennilase ») se présente sous forme d'un liquide brun foncé, au goût et à l'odeur caramel salé. Il contient en effet environ 20 p. 100 de chlorure de sodium et 0,1 p. 100 de benzoate de sodium comme agents de conservation. Le liquide est transparent et ne présente aucun trouble, même après un long séjour à température ambiante. Il est conservé à 4° C. Son pH est 4,5. Son activité coagulante est contrôlée deux fois par mois. L'activité indiquée par le fabricant est de 14 000 unités internationales. Cette préparation ne contient ni antibiotiques, ni toxines. Nous avons utilisé le lot n° HR1-a 1970, à des dilutions convenables dans l'eau déminéralisée ou dans du tampon phosphate

0,15 M pH 6,5 pour les mesures d'activité coagulante. Nous employons une dilution au 20^e pour l'action protéolytique sur la caséine.

L'enzyme, qui sera désignée dans ce texte par l'abréviation « Mm », a été utilisé soit sous la forme brute, soit après une première purification par dialyse prolongée contre l'eau, jusqu'à réaction négative des chlorures, suivie de dessiccation par lyophilisation.

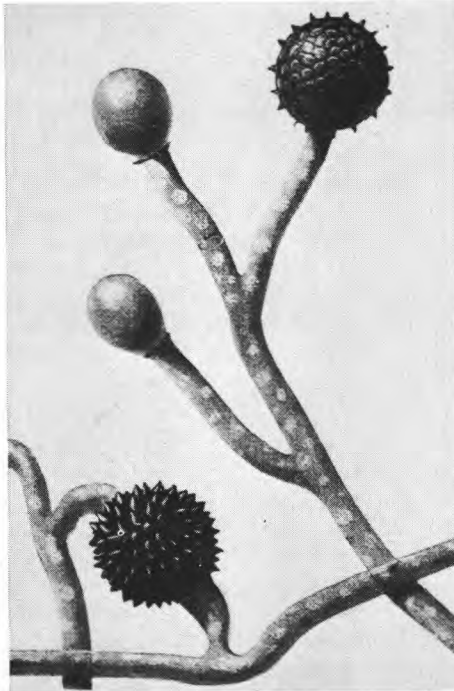


fig. 1

Mucor miehei (CBS 370-65) : mycélium blanc, puis gris, zygospores globulaires de 30 à 45 μ , de ton jaune, rouge ou brun (grossissement 500)

Les doses d'enzyme brute ou lyophilisée utilisées dans nos expériences sont toujours exprimées en unités (UP) pour mettre en évidence l'activité coagulante mise en œuvre. On utilise en général 0,04 UP/ml de substrat (lait ou solution de caséine) soit environ 0,05 mg d'enzyme lyophilisée. Comme élément de comparaison nous avons utilisé une présure animale en poudre exempte de pepsine, dont l'activité coagulante, selon la définition de Berridge (1945) est de 350 UP/g, ce qui correspond approximativement à une « force » de 77 000 selon les usages français.

2) Mesure de l'activité coagulante

Nous avons utilisé un lait sec préparé par le procédé « Spray » dans des conditions bien contrôlées. Par dissolution de 12 g dans 100 ml d'une solution de chlorure de calcium 0,003 M, on obtient un lait reconstitué de pH 6,5 dont l'aptitude à la coagulation est comparable à celle du lait frais*.

La mesure du temps de coagulation est faite soit à 32° C, soit à 35° C, avec des concentrations d'enzyme telles que la floculation visible sur la paroi du tube soit comprise entre 3 et 10 mn.

3) Méthode d'étude de l'activité protéolytique sur la caséine entière

Alais et *al.* (1953) ont montré que la méthode de choix pour l'étude de la réaction de la présure sur la caséine est la mesure de l'accroissement de l'azote non protéique (NPN), soluble dans l'acide trichloracétique (TCA). Avec 12 p. 100 d'acide trichloracétique dans le mélange final, seuls les produits de réaction « primaire » sont solubles ; on peut ainsi en suivre le cours. Avec 2 p. 100 d'acide trichloracétique, les produits de la protéolyse générale sont également solubles.

Nous avons adapté à l'étude de l'enzyme Mm les techniques décrites par Alais (1956). On ajoute 1 ml de solution enzymatique à 100 ml de solution de caséinate de sodium 2 p. 100, placée au bain marie à 30° C. La solution enzymatique a une concentration telle que le rapport enzyme/substrat soit identique à celui donnant un temps de coagulation de 4 mn avec le lait reconstitué standard. A des intervalles de temps choisis, 5 ml du mélange réactionnel sont ajoutés à 5 ml de TCA 24 p. 100 ou 4 p. 100. Le précipité protéique est séparé sur filtre « Millipore » et l'azote dosé par micro-kjeldahl dans le filtrat. L'azote non protéique initial (NPN-O) est déterminé de la même manière, mais la solution d'enzyme est remplacée par l'eau.

La protéolyse a été également suivie par la mesure de l'absorption à 280 nanomètres du filtrat trichloracétique, en utilisant une cuvette en quartz de 1 cm et un spectrophotomètre « Acta II ».

4) Méthodes d'électrophorèse

Pour étudier l'homogénéité de l'enzyme nous avons utilisé diverses méthodes d'électrophorèse à différentes valeurs du pH ; l'enzyme dialysée et lyophilisée était dissoute dans le tampon.

a) Electrophorèse sur papier, tampon acétate de sodium 0,025 M ; pH 5 ; 7 volts/cm.

* Nous remercions les Etablissements Lesaffre (50) Cérences, pour la fourniture gracieuse de ce lait.

b) Electrophorèse sur bande d'acétate de cellulose, tampon véronal 0,04 M ; pH 8,6 ou tampon tris-citrate 0,076 M ; pH 6,5.

c) Electrophorèse en gel de polyacrylamide dans une cellule verticale, selon Peterson (1963) avec le tampon tris-glycine 0,046 M ; pH 8,3 utilisé par Melachouris (1969).

d) Electrophorèse en gel d'amidon selon Wake et Baldwin (1961), avec le tampon tris-citrate 0,076 M ; pH 8,6.

RESULTATS

1) Stabilité de l'enzyme

La préparation commerciale liquide (enzyme brute) a une activité coagulante de 79 UP/ml (force de 17 000 environ). Elle possède une bonne stabilité ; nous n'avons observé qu'une chute de 4 p. 100 en 6 mois à 4° C.

La dialyse prolongée contre l'eau, durant 5 j à 4° C, ne provoque qu'une très faible perte d'activité coagulante, de 1 à 3 p. 100 au cours de six essais. La coloration brune persiste au cours de la dialyse, cependant, on observe que les premières eaux sont légèrement teintées. Il ne se forme pas de trouble ou de précipité dans le liquide dialysé.

La congélation et la dessiccation par lyophilisation ne provoquent qu'une perte d'activité relativement faible par rapport à ce que l'on observe avec d'autres types d'enzymes. Nous avons calculé une perte moyenne de 7 p. 100. L'enzyme sec se présente sous forme d'une poudre brun clair. Le rendement est de 7,7 g pour 100 ml de préparation commerciale, avec une activité coagulante en UP correspondant à 90 p. 100 de celle du départ, soit 920 UP/g.

2) Examen électrophorétique

Les résultats sur papier à pH 5,0, n'ont pas pu être exploités ; la migration était irrégulière et la coloration très faible par le noir amido. Sur bande d'acétate de cellulose, même en présence d'agents dissociants, urée et mercaptoéthanol, on ne distingue qu'une seule bande pour l'enzyme Mm et au moins trois pour la présure animale.

En gel de polyacrylamide, après simple fixation du gel à l'acide trichloracétique 15 p. 100 et en l'absence de toute coloration, on distingue deux bandes brunes distinctes : la plus mobile étant moins pigmentée que la deuxième. La coloration au noir amido ou au bleu comassie révèle généralement deux bandes ; l'une correspond au pigment et l'autre est plus large et moins mobile. Cet examen électrophorétique est schématisé dans la figure 2. La préparation enzymatique extraite de *Mucor miehei* semble donc composée d'un constituant protéique, qui est l'enzyme proprement dite, accompagnée de deux pigments.

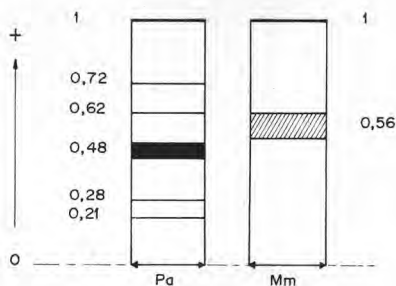


fig. 2

Electrophorèse de l'enzyme de *Mucor miehei* (Mm) et de la présure animale (Pa) en gel d'acrylamide ; pH 8,3 (tampon tris-gly 0,046 M) 200 V, 3 h. La distance de migration prise comme unité est celle de la bande frontale.

Par la même méthode on distingue six constituants dans la présure animale. Le petit nombre de bandes observées pour l'enzyme de *Mucor miehei* ne provient donc pas d'une méthode déficiente. La pureté de la substance est satisfaisante pour un produit commercial. Cette observation est confirmée par une expérience de filtration moléculaire que nous avons faite sur Séphadex G-75, avec le tampon phosphate à pH 6,0. Dans ces conditions, la substance protéique sort en un seul pic légèrement disymétrique.

La technique d'électrophorèse en gel d'amidon en présence d'urée permet de distinguer une dizaine de constituants dans la présure animale, mais elle donne de mauvais résultats avec toutes les enzymes coagulantes fongiques étudiées au laboratoire. Cela est dû à l'impossibilité d'obtenir des échantillons à la fois suffisamment concentrés en enzyme et restant solubles dans le tampon, ainsi qu'à une fixation difficile après migration.

3) Variation du temps de coagulation en fonction de la concentration de l'enzyme

L'expérience a été faite à 32° C, avec du lait reconstitué à pH 6,5. On a mesuré le temps de coagulation obtenu avec différentes dilutions d'une solution mère ainsi préparée : enzyme Mm au 1/50^e ; présure animal 0,4 p. 100. Les temps de coagulation sont présentés dans le tableau 1. La règle dite de Storch et Segelke est vérifiée pour l'enzyme Mm comme pour la présure animale, car si l'on traçait les courbes correspondant à ces valeurs, on obtiendrait deux droites.

4) Influence du pH du lait sur le temps de coagulation

Les essais sont faits sur du lait reconstitué de pH 5,55 à 6,85. A des pH inférieurs à 5,55, on se rapprocherait trop du point isoélec-

TABLEAU 1

Influence de la concentration en enzyme sur le temps de coagulation

Dilution	Temps de coagulation (mn)	
	Enzyme Mm	Présure animale
1	1,75	2,01
1/2	3,32	3,97
1/3	4,88	5,67
1/4	6,33	7,51
1/5	7,89	9,28
1/6	9,38	10,65
1/8	11,95	14,53

trique de la caséine, qui devient insoluble, et la coagulation est très lente à des pH supérieurs à 7,0 à cause de l'inactivation progressive de l'enzyme, de sorte que la mesure devient imprécise. Nous préparons des laits de pH différents, mais de même concentration en extrait sec, par addition d'acide chlorhydrique ou de soude 0,1 N.

Les temps de coagulation, à 32° C, de 10 ml de lait additionné de 0,5 ml de présure animale (0,4 p. 100) ou d'enzyme Mm (au 1/100°), pour les différents pH choisis sont indiqués dans le tableau 2 (moyenne de 3 expériences).

Les doses d'enzymes avaient été choisies de manière à obtenir approximativement le même temps de coagulation vers pH 6,5 ; or l'on constate qu'aux autres valeurs du pH, les temps sont également voisins avec les deux enzymes. Si l'on traçait les courbes de variation du temps, elles seraient confondues. L'enzyme Mm réagit comme la présure animale aux variations du pH.

5) Influence du calcium soluble ajouté sur le temps de coagulation

Le fait d'ajouter du chlorure de calcium au lait provoque une baisse de son pH. Il s'agit probablement d'un échange d'ions H^+ par Ca^{++} sur la protéine. Pour étudier l'action du calcium ionique seul, nous avons ramené le lait à un pH fixe choisi, ici pH 6,7. Les enzymes coagulantes sont mises en solution dans du tampon phosphate de pH 6,7 : l'enzyme Mm est diluée au centième et la présure animale utilisée à 0,2 p. 100 de concentration.

Les résultats sont résumés dans le tableau 3, où les temps de coagulation sont exprimés en nombres proportionnels, la valeur 100 étant attribuée au lait de pH 6,7 enrichi de 10 mM de calcium par

TABLEAU 2. — Temps de coagulation du lait en fonction du pH (mn)

pH	5,55	5,83	6,0	6,22	6,32	6,44	6,53	6,62	6,70	6,85
Présure animale	0,82	1,13	1,38	1,95	2,56	3,71	5,50	8,88	11,51	29,45
Enzyme Mm	0,85	1,22	1,47	2,10	2,71	3,81	5,86	8,92	11,89	31,75

TABLEAU 3

Influence de la concentration en calcium sur l'activité coagulante

Calcium ajouté mM/l de lait de pH 6,7	Temps de coagulation Nombres proportionnels à 32° C	
	Présure animale	Enzyme Mm
Première série		
0	279	369
2	217,8	277,5
4	164,5	187,2
6	128,2	138,2
10	100	100
15	70	68,2
Deuxième série		
5	164,9	180
10	100	100
15	71,7	67,3
20	67,3	61,4
30	64	54,7
40	63,5	52,4

litre (substrat standard). On constate que l'enzyme Mm est plus sensible aux variations de la teneur en calcium que la présure animale, à pH constant. Les résultats de la 2^{me} série montrent que l'activité relative de l'enzyme Mm est d'autant plus grande que la concentration en calcium ajoutée est plus élevée.

Nous avons fait quelques essais comparatifs pour rechercher d'éventuelles différences de comportement des enzymes actuellement proposées pour la coagulation du lait, avec des valeurs de pH et de calcium ajouté, utilisées en pratique. Ils sont résumés dans le tableau 4, où le temps du lait reconstitué standard (10 mM CaCl₂) est pris égal à 100.

On peut classer dans l'ordre des sensibilités croissantes au calcium, l'enzyme d'*Endothia parasitica* (la moins sensible), la présure animale, l'enzyme de *Mucor miehei*, et celle de *Mucor pusillus* (la plus sensible).

De cette expérience, on peut également déduire la sensibilité au pH par l'allongement du temps de coagulation, de pH 6,33 à pH 6,51, pour chaque teneur en calcium. La figure 3 rapporte ces résultats et montre que la présure animale et l'enzyme *Mucor miehei* ont une sensibilité comparable vis-à-vis du pH (ce qui confirme nos résultats

TABLEAU 4

Temps de coagulation du lait à pH 6,33 et 6,51 par la présure animale et trois enzymes fongiques avec du calcium ajouté

Calcium ajouté en mM	Temps de coagulation (nombre proportionnel)			
	Présure animale	Enzyme <i>M. miehei</i>	Enzyme <i>M. pusillus</i>	Enzyme <i>E. parasitica</i>
Lait de pH 6,33				
10	100	100	100	100
3	143	157	166	129
0	187	210	274	166
Lait de pH 6,51				
10	100	100	100	100
3	152	160	174	138
0	236	263	294	195

précédents) alors que les autres enzymes sont plus (*M. pusillus*), ou moins (*E. parasitica*) sensibles aux variations du pH dans cette étroite zone.

6) Influence de la température du lait sur le temps de coagulation

Nous avons mesuré les temps de coagulation avec l'enzyme Mm et la présure animale sur du lait reconstitué de pH 6,3 contenant 0,01 M de chlorure de calcium, à des températures choisies entre 20° C et 40° C, zone habituelle de la coagulation du lait.

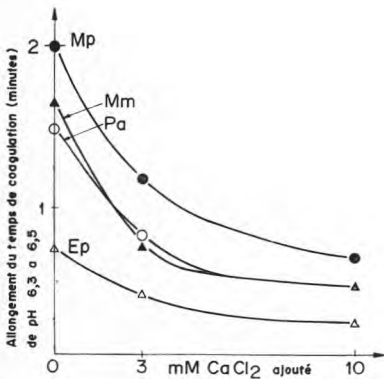


fig. 3

Influence du calcium et du pH sur le temps de coagulation par différentes enzymes : Mm : *Mucor miehei*, Mp : *Mucor pusillus*, Ep : *Endothia parasitica*, Pa : présure animale.

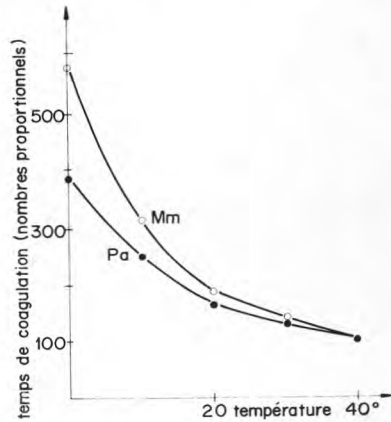


fig. 4

Influence de la température sur le temps de coagulation.

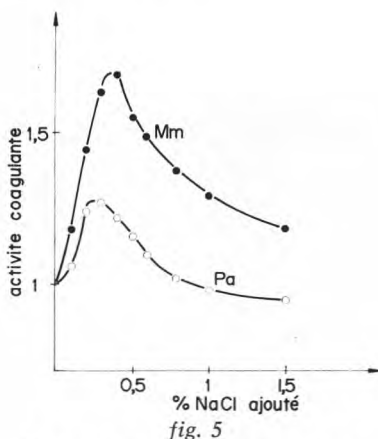
Dans la figure 4, les temps de coagulation proportionnels sont reportés en fonction de la température du lait. On a pris égal à 100 le temps de coagulation à la température de 40° C (température optimale avec la présure). Les courbes montrent que l'enzyme Mm est un peu plus sensible que la présure animale aux variations de la température. Le temps de coagulation augmente plus rapidement, (donc l'activité coagulante décroît plus vite) lorsque la température diminue, dans le cas de l'enzyme Mm.

7) Influence de la concentration en chlorure de sodium sur le temps de coagulation

Le chlorure de sodium est utilisé à la concentration d'environ 20 p. 100 comme agent conservateur de la présure et d'enzymes coagulantes. Habituellement, on le considère comme sans effet sur

la coagulation, vu les faibles doses de présures employées, mais dernièrement, Hamdy et Edelsten (1970) ont trouvé que du chlorure de sodium ajouté au lait en quantité inférieure à 1 p. 100 provoquait l'accroissement de l'activité coagulante des enzymes coagulantes.

Nous avons voulu vérifier cet effet curieux. Pour cela, nous avons utilisé du lait reconstitué de pH 6,6 sans addition de chlorure de calcium. A ce lait, nous ajoutons de 0 à 1,5 p. 100 de chlorure de sodium, puis nous mesurons à 35° C le temps de coagulation pour différentes teneurs en chlorure de sodium.



Variation de l'activité coagulante
sous l'influence de NaCl

Dans la figure 5, on a présenté les variations de l'activité coagulante (proportionnelle à l'inverse du temps de coagulation). Elle montre que l'activité coagulante de l'enzyme Mm et celle de la présure animale sont effectivement accrues par l'addition de chlorure de sodium en faibles quantités, et que l'enzyme Mm est plus sensible que la présure animale. De plus, le maximum d'activité coagulante ne paraît pas coïncider ; il se situe vers 0,4 p. 100 NaCl pour l'enzyme Mm et vers 0,3 p. 100 pour la présure animale.

8) Activité protéolytique sur la caséine entière à pH 6,7

Le substrat est constitué par la solution à 2 p. 100 de caséine entière à pH 6,7. Nous avons utilisé l'enzyme Mm soit sous la forme de la préparation brute, soit sous la forme purifiée. Chaque essai comporte une épreuve de comparaison avec la présure animale. Les doses d'enzymes employées sont très voisines : 0,035 UP/ml de substrat pour la présure animale et 0,039 UP/ml de substrat pour l'enzyme Mm ; c'est-à-dire, dans les mêmes conditions que pour l'étude de

l'activité coagulante ; le temps de coagulation d'un lait avec ces doses serait de 5 à 10 mn.

Le tableau 5 montre que pour des activités coagulantes égales l'activité protéolytique de l'enzyme Mm est inférieure à celle de la présure dans les temps d'action relativement courts, c'est-à-dire dans ceux de la coagulation du lait en pratique. Pour de longues durées d'action, l'activité protéolytique de l'enzyme Mm devient plus grande que celle de la présure.

TABLEAU 5. — Activité protéolytique relative de l'enzyme Mm*

Temps d'action (mn)	2 p. 100 de TCA	12 p. 100 de TCA
5	0,6	—
10	0,8	0,7
20	0,9	0,7
30	1,04	0,7
90	1,3	0,9
120	1,5	1,15
180	1,6	1,4

* Rapport des augmentations de NPN : enzyme Mm/présure animale.

Les courbes de libération du NPN - 12 p. 100 TCA de la figure 6 révèlent une différence entre l'enzyme Mm et la présure. Avec cette dernière, on observe la fin rapide de la « réaction primaire » après environ 20 mn d'action ; la courbe se termine par un palier. Avec l'enzyme Mm, l'inflexion prononcée de la courbe montre que la réaction primaire a bien lieu, mais ensuite la libération de NPN soluble dans 12 p. 100 de TCA continue.

Les courbes de libération de NPN - 2 p. 100 TCA (qui ne sont pas montrées ici) confirment que la protéolyse est plus progressive avec l'enzyme Mm qu'avec la présure. La pente de la 2^{me} partie de la courbe est sensiblement plus grande avec le premier enzyme qu'avec le second ; ce qui signifie que la protéolyse non spécifique est plus poussée (réaction tertiaire).

Les courbes sont identiques avec l'enzyme Mm brut et l'enzyme purifié par dialyse ; il en est de même avec la présure en poudre et la présure cristallisée. Les substances éliminées au cours de la dialyse n'ont aucun effet sur la protéolyse.

L'évolution de la densité optique à 280 nm du filtrat trichloracétique confirme l'existence de différences entre l'enzyme Mm et la présure. Les courbes de la figure 6 montrent que la première libère des peptides contenant de la tyrosine ou du tryptophane solubles

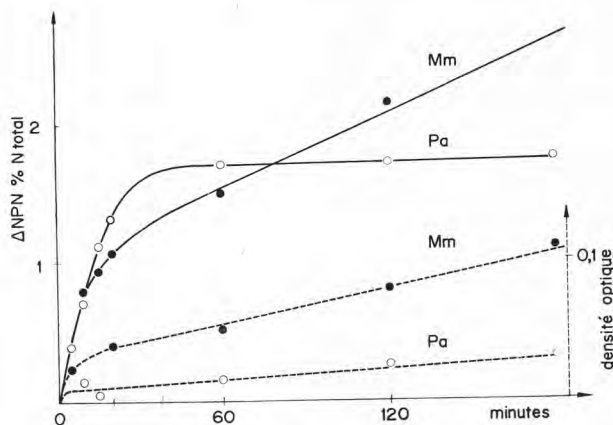


fig. 6

Courbe de protéolyse de l'enzyme de *Mucor miehei* (Mm) et de la présure animale (Pa) ; $e = 0,04$ UP/ml ; S = caséinate Na 2 p. 100, pH 6,7, 30° C. En ordonnée, accroissement de la densité optique à 280 nm et de l'azote non protéique (NPN) soluble dans 12 p. 100 d'acide trichloracétique.

dans 12 p. 100 de TCA, alors que les « caséinopeptides » libérés au cours de la réaction primaire de la présure n'en contiennent pas (Alais, 1956).

9) Etude de la protéolyse de la caséine entière en fonction du pH

Cette étude est rendue difficile par l'insolubilité de la caséine autour du point isoélectrique, pH 4,6, et par le fait que les variations du pH au cours des manipulations sont lentes. Nous avons fait deux séries de mesures dans des conditions un peu différentes, pour tenter d'obtenir des résultats plus sûrs.

a) Nous avons préparé des solutions à 2 p. 100 de caséine, en dessous de pH 4,0 et au-dessus de pH 5,2 ; en ajoutant plus ou moins de NaOH ou HCl 0,1 M soit à une solution de caséine à pH 2,0, soit à une solution à pH 7,0. La concentration du substrat en solution est connue avec précision vers pH 2 et au-dessus de pH 5,5, lorsque les solutions sont limpides, donc complètes ; mais la force ionique n'est pas constante. La quantité d'enzyme Mm employée est de 0,04 UP/ml. Dans la figure 7 on a tracé en trait plein la partie de la courbe dans la zone de solubilité complète et en pointillés dans la zones où les solutions sont laiteuses, mais sans dépôt. Il se peut qu'il existe un maximum d'activité vers pH 5,5 dans ces conditions, mais on ne peut l'affirmer ; au-delà de pH 7,0 l'activité décroît rapidement.

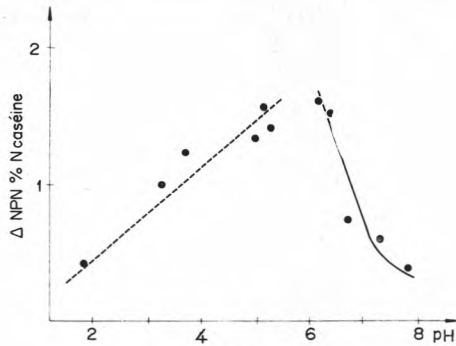


fig. 7

Activité protéolytique de l'enzyme Mm en fonction du pH ; $e = 0,04$ UP/ml ; S = caséinate Na 2 p. 100 ; température 30° C. En ordonnée : NPN libéré p. 100 d'azote total de la solution de caséine, en 60 mn.

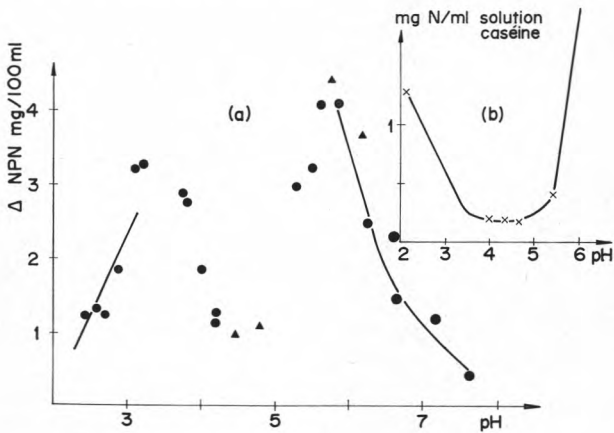


fig. 8

- a) Activité protéolytique de l'enzyme Mm en fonction du pH ; $e = 0,10$ UP/ml ; température 30° C ; S = caséine 2 p. 100. En ordonnée NPN libéré pour 100 ml de substrat, en 60 mn.
- b) N soluble par ml de solution de caséine à 2 p. 100.

b) Pour chaque valeur de pH choisie on suspend 0,5 g de caséine dans 20 ml d'eau, on ajoute x ml de NaOH ou HCl 0,1 plus 5-x ml de NaCl 0,1 M. La force ionique est constante, mais les solutions sont imparfaites au-dessous de pH 5,6 ; il reste un dépôt de caséine non dissoute même après une agitation mécanique prolongée (48 h). La quantité d'enzyme employée est de 0,1 UP/ml, soit

2,5 fois plus que dans l'expérience précédente, afin d'obtenir des quantités de NPN libéré plus importantes et de rendre plus visible un éventuel maximum d'activité.

Dans la figure 8 a, nous avons pris comme ordonnée la quantité de NPN en valeur absolue (mg NPN/100 ml solution protéique), car on ne connaît pas exactement la quantité d'azote de la caséine pouvant réagir avec l'enzyme de pH 3,5 à 5,6. La courbe en trait plein correspond aux déterminations sur la solution apparemment complète ; il est difficile de joindre les autres points car ils se trouvent dans une zone de solubilité incomplète du substrat. Il n'est pas possible de préciser le maximum d'activité ; sinon qu'il doit se trouver entre pH 3,5 et 5,5. L'apparence d'un minimum en valeur absolue, vers pH 4 à 5 coïncide avec le minimum de solubilité de la caséine (fig. 8 b) et l'on ignore la concentration exacte du substrat ; on ne peut donc pas interpréter ces résultats en terme de minimum ou de maximum d'activité enzymatique.

Nous avons mesuré la quantité d'azote soluble de la caséine (Ns) après séparation de la partie insoluble par centrifugation et nous avons exprimé le NPN libéré par l'enzyme en p.100 de Ns. Les points entre pH 4,0 et 5,5 sont dispersés ; il est probable que Ns ne représente pas la concentration réelle du substrat et que l'enzyme agisse sur une partie de la caséine centrifugeable.

DISCUSSION

La moisissure *Mucor miehei* sécrète une endopeptidase (Mm) qui, par deux propriétés essentielles : activité coagulante élevée dans le lait et activité protéolytique relativement faible dans des solutions de caséine, présente des analogies avec la présure (rennin) ; elle a cependant des caractères distinctifs.

L'enzyme extrait du milieu de culture par précipitation, puis purifié par dialyse est presque homogène. L'électrophorèse en gel ne révèle que des contaminants pigmentés mineurs. Ottesen et Rickert (1970) ont d'ailleurs signalé la difficulté de séparer ces pigments de la protéine. La préparation liquide « Rennilase » que nous avons étudiée possède une bonne stabilité à pH 4,5 ; l'enzyme supporte bien la dialyse prolongée à basse température, la congélation et la dessiccation par lyophilisation. Les auteurs précédents avaient observé une qualité de conservation excellente, supérieure à celle de la présure animale dans les mêmes conditions.

L'activité coagulante de l'enzyme Mm répond comme celle de la présure animale aux variations de pH du lait ; une baisse du pH accroît l'activité ; au-dessus de pH 6,7 l'activité diminue rapidement. Par contre il est un peu plus affecté que la présure animale par une baisse de la teneur en calcium ionisé du lait, ou par une baisse de

la température. Il est clair que l'enzyme Mm conserve mieux son activité coagulante lorsque la température s'élève. Prins et Nielsen (1970), Thomasow et *al.* (1971) indiquent un optimum de température vers 65° C.

En ce qui concerne l'influence du calcium soluble, les résultats de Hamdy et Edelsten montrent une égale sensibilité de l'enzyme Mm et de la présure animale. Nos résultats concordent avec ceux de N. Hillerod (1969) qui révèlent une sensibilité au calcium un peu plus grande pour l'enzyme Mm.

Nous avons retrouvé l'effet activateur du chlorure de sodium à faible concentration sur la coagulation, précédemment mis en évidence par Hamdy et Edelsten (1970). L'accroissement d'activité coagulante de l'enzyme Mm et de la présure animale passe par un maximum, respectivement à 0,4 et 0,3 p. 100 en NaCl, soit 0,07 M et 0,05 M en ions sodium.

Cet effet du chlorure n'est pas exceptionnel ; il a été démontré que ce sel, à de basses concentrations, influe sur les propriétés des micelles de caséine, le maximum d'instabilité se situant vers 0,17 M (Zittle et Jasewicz, 1962). On sait également que l'activité protéolytique de la présure sur la caséine est influencée par le chlorure de sodium, mais à des concentrations plus élevées (Stadhouders, 1962).

Plusieurs études de l'enzyme Mm ont été faites comparativement à la présure animale (Pa) et aux enzymes fongiques semblant les plus intéressantes actuellement ; ceux d'*Endothia parasitica* (Ep) de *Mucor pusillus* (Mp) (N. Hillerod, 1969, Hamdy et Edelsten, 1970, Ottesen et Rickert, 1970). Certaines caractéristiques ressortent de ces travaux ; nous les avons rassemblées dans le tableau 6, en tenant compte de nos propres résultats. L'activité coagulante de l'enzyme Ep (Alais et Novak, 1968) est caractérisée par une certaine indifférence aux variations de température, de pH ou de teneur en calcium du lait. Notre étude comparative limitée de l'effet du pH et des ions calcium confirme la moindre sensibilité de l'enzyme Ep et montre que ceux provenant des *Mucor* sont plus sensibles que la présure animale, tout en conservant des caractères spécifiques, puisque l'enzyme Mp est plus affecté par le pH et la teneur en calcium que l'enzyme Mm ; alors que c'est le contraire pour la température (N. Hillerod, 1969).

L'étude de l'activité protéolytique sur la caséine de l'enzyme Mm comparée à celle de la présure animale, à des doses correspondant à une activité coagulante équivalente, montre que le début de la réaction primaire se produit approximativement à la même vitesse, mais la proportion de produits de cette réaction est un peu moins importante pour le premier dans le temps nécessaire à la coagulation. Ceci concorde avec les résultats de Behnke et Siewert (1969). On peut penser que l'enzyme Mm ne coupe donc pas toutes les liaisons sensibles à la présure animale au bout de ce temps ; mais

TABLEAU 6

Sensibilité des enzymes vis-à-vis de différents facteurs de coagulation*

Ordre de sensibilité décroissant	Température	pH	Ca (II)
1	Mm	Mp	Mp
2	Mp	Pa et Mm	Mm
3	Pa		Pa
4	Ep	Ep	Ep

* Enzymes : Mm *Mucor miehei* Ep *Endothia parasitica*
 Mp *Mucor pusillus* Pa Présure animale

il n'est pas nécessaire que toutes soient rompues pour que la coagulation se produise. Foltmann (1959) a montré que la phase de coagulation peut être observée, dans certaines conditions, avant que la courbe de protéolyse spécifique de la présure n'atteigne le palier correspondant à la fin de la réaction primaire.

Les enzymes coagulantes fongiques, à ce point de vue encore présentent des différences entre elles, lorsque l'on compare l'activité protéolytique spécifique de la réaction primaire pour des doses équivalentes, en ce qui concerne le temps de coagulation. Les enzymes Mp (N. Hillerød, 1969) et Ep (Alais et Novak, 1968) ont, dans les conditions expérimentales choisies une activité protéolytique plus élevée que celle de la présure animale. Du point de vue de la technologie fromagère, rappelons que le temps de tranchage est plus significatif que le temps de coagulation (Alais et Novak, 1968).

L'étude de l'évolution de la densité optique à 280 nm, au cours de la protéolyse révèle également des différences dans le mode d'action des enzymes. On peut se demander s'ils coupent d'autres liaisons dans la caséine K, en avant de la liaison Phe-Met, que la présure coupe sélectivement au cours de la réaction primaire (Delfour et al., 1965), ou s'ils détachent des peptides également à partir des caséines α_s et β contenues dans la caséine entière, ce que la présure ne peut pas faire dans les conditions de nos expériences. C'est un point que nous cherchons actuellement à élucider avec l'enzyme Mm. Les différences existant entre les diverses enzymes coagulant le lait, au niveau de la protéolyse limitée précédant et provoquant la coagulation, doivent être en relation avec les particularités observées dans la formation et l'évolution du coagulum,

comme le souligne Alais (1971). La coupure de différentes liaisons peptidiques dans la caséine K peut modifier le mode d'agrégation des micelles au cours de la formation du gel.

Les résultats de notre étude de l'action du pH sur la protéolyse de la caséine entière par l'enzyme Mm, permettent seulement de dire que le pH optimum d'activité de l'enzyme Mm sur la caséine se situe entre pH 3,5 et pH 5,5, c'est-à-dire dans une zone où se trouve le minimum de solubilité de la caséine. Nous ne savons pas si l'enzyme agit uniquement sur le caséinate de sodium dissout ou également sur la caséine insoluble ; il se peut même qu'une dissolution intervienne au fur et à mesure de la digestion du caséinate de sodium soluble. A titre indicatif le pH optimum de la présure animale sur le même substrat est compris entre ces mêmes valeurs d'après Nitschmann et Bohren (1955), il est proche de pH 4,0 d'après Foltmann (1959). Pour Ottesen et Rickert (1970), l'optimum de protéolyse de l'enzyme Mm sur l'hémoglobine dénaturée est à pH 4,0 ; mais ils ne donnent pas de valeur pour la caséine entière. Sternberg (1971) qui a étudié l'activité protéolytique de l'enzyme extrait d'une souche américaine de *Mucor miehei*, en utilisant différents substrats, donne avec l'hémoglobine dénaturée un optimum situé vers 3,4-4,0 ; avec la serumalbumine bovine l'optimum est moins nettement marqué, vers pH 4,6. Ses résultats avec la caséine entière sont difficiles à interpréter parce qu'ils ne présentent que la zone de pH 5,5 à 7,5 ; ce morceau de courbe n'est pas en désaccord avec nos propres résultats.

L'aptitude de l'enzyme Mm à la coagulation du lait de fromagerie est l'objectif d'autres recherches que nous poursuivons et qui seront publiées plus tard. Les résultats déjà acquis sur le plan rhéologique et sur celui des fabrications montrent que cette enzyme a un comportement très voisin de celui de la présure.

Remerciements

Nous remercions Mme Novak et M. Tarodo de la Fuente, assistants à l'Ecole de Laiterie de Nancy, pour leurs conseils, et nous remercions Novo-Industrie A/S pour les échantillons de « Rennilase ».

Résumé

L'étude biochimique de l'enzyme coagulante produite par *Mucor miehei* (Rennilase) a montré que l'aptitude à la coagulation du lait est proche de celle de la présure animale, en ce qui concerne les variations du pH ; par contre cette enzyme est plus sensible aux ions calcium et aux variations de la température. L'activité protéolytique,

sur la caséine entière de vache, est plus progressive que celle de la présure ; dans les conditions habituelles de la coagulation du lait de fromagerie, la proportion d'azote non protéique libéré par l'enzyme de *M. miehei* est faible. Le maximum d'activité protéolytique sur la caséine se situe entre pH 3,5 et 5,5. L'enzyme résiste bien à la congélation et à la dessiccation.

Des essais rhéologiques et des fabrications expérimentales de fromages sont en cours.

Summary

The biochemical study of the milk clotting enzyme from *Mucor miehei* (Rennilase) has shown that its aptitude on the coagulation of milk is close to that of rennin as for the effect of pH ; but this enzyme is more sensible to calcium ions and the variations of temperature. The proteolytic activity on whole cow casein is more progressive than that of rennin ; in the usual conditions of cheese-milk clotting, the porportion of non-protéic nitrogen liberated by *M. miehei* enzyme is low. The maximum proteolytic activity locates between pH 3,5 and 5,5. This enzyme prossesses well resistance to congelation an desiccation.

Several rheologic essays and experimental cheese fabrications have being done.

Bibliographie

- ALAIS (C.), MOCQUOT (G.), NITSCHMANN (Hs.) und ZAHLER (P.) (1953). — Das Lab und sein Wirkung auf das Casein der Milch. VII. Über die Abspaltung von Nicht-Protein - Stickstoff (NPN) aus Casein durch Lab und ihre Beziehung zur Primärreaktion der Labgerrinnung der Milch. *Helv. Chim. Acta*, 36, 1955.
- ALAIS (C.) (1956). — Etude des substances azotées non protéiques (NPN) séparées de la caséine du lait de vache sous l'action de la présure. *C. R. XIV^e Congrès Intern. Laiterie, Rome*, vol. II, 823.
- ALAIS (C.) et NOVAK (G.) (1968). — Etude d'un enzyme coagulant microbien dérivé de *Endothia parasitica*. *Le Lait*, 48, 393.
- ALAIS (C.) (1970). — Recherches sur les enzymes coagulant le lait : biochimie de la coagulation, l'enzyme de « *Endothia parasitica* », activité de la présure et de la pepsine. *Ind. del Latte, Lodi*, 6, 207.
- ALAIS (C.) (1971). — Les enzymes coagulant le lait. *Techn. Laitière*, 719, 79.
- BEHNKE (U.) und SIEWERT (R.) (1969). — Untersuchungen über die Verwendbarkeit von *Mucor miehei* - Lab bei der Herstellung von Camembert Limburger, Edamer und Tollenser. *FBM Milch. Stand.*, II, 2, 66.
- BERRIDGE (N. J.) (1945). — The purification and crystallization of rennin. *Biochem. J.*, 39, 179.
- DELFOUR (A.), JOLLES (J.), ALAIS (C.) and JOLLES (P.). — Caseino-glycopeptides : characterization of a methionine residue and of the N-Terminal sequence. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 19, 452.

- FOLTMANN (B.) (1959). — On the enzymatic and the coagulation stages of the renneting process. *C. R. XV^e Int. Dairy congress*, 2, 655.
- HAMDY (A.) and EDELSTEN (D.) (1970). — Some Factors affecting the coagulation strength of 3 different microbial rennets. *Milchwissenschaft*, 25, 8, 450.
- MAYR (A.) (1971). — Versuche zur Herstellung von Emmentalerkäse unter Verwendung von mikrobiellem Lab « Rennilase ». *Deut. Molkerei Zeit.*, 92, 544.
- MELACHOURIS (N.) (1969). — Discontinuous gel electrophoresis of whey proteins, casein and clotting enzymes. *J. Dairy Sci.*, 52, 450.
- N. STATENS FORSOGSMEJERI. HILLERØD (1969). — Comparative examinations of animal and microbial Rennets. *179 beretning*.
- NITSCHMANN (H. S.) und BOHREN (H. U.) (1955). — Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch. X-Eine Method zur direkten Bestimmung der Geschwindigkeit der Primärreaktion der Labgerinnung der Milch. *Helv. Chim. Acta*, 38, 1953.
- OTTESEN (M.) and RICKERT (W.) (1970). — The Isolation and Partial caractérisation of an Acid Protéase produced by *Mucor miehei*. *C.R. Lab. Carlsberg*, 37, 301.
- PETERSON (R. F.) (1963). — High resolution of milk clotting-Protéase from *Mucor miehei* and some of its Properties. *J. Dairy Sci.*, 54, 159.
- PRINS (J.) and NIELSEN (T. K.) (1970). — Microbial Rennet from *Mucor miehei*. *Process. Biochem.*, 5, 34.
- RICKERT (W.) (1970). — The Degradation on the B-Chain of oxidized insulin by *Mucor miehei* protease. *C. R. Lab. Carlsberg*, 38, 1.
- STERNBERG (M. Z.) (1970). — Crystalline Milk-Clotting Protease from *Mucor miehei* and some of its propeties. *J. Dairy Sci.*, 54, 159.
- THOMASOW (J.), MROWETZ (G.) und SCHMANKE (E.) (1971). — Untersuchungen zur verwendung von Lab aus *Mucor miehei* zur Käseherstellung. *Kieler Milchwirtschaft. Forschungsber.*, 23, 57.
- WAKE (R. G.) and BALDWIN (R. L.) (1961). — Analysis of Casein fractions by zone electrophoresis in concentrated urea. *Biochim. Biophys. Acta*, 47, 225.
- ZITTLE (C. A.) and JASEWICZ (L. B.) (1962). — Influence of Sodium chloride on the stability of the calcium caseinate micelle. *J. Dairy Sci.*, 45, 703.
-