Étude des caillettes des bovins à l'état ruminant pour l'obtention d'extraits coagulants à base de pepsine bovine

I. METHODES D'EXTRACTION

par

E. VALLES et J. P. FURET

*Laboratoire de Recherches sur les Protéines, C.N.R.Z., I.N.R.A.
78350 Jouy-en-Josas (France)*

INTRODUCTION

L'emploi de préparations de pepsine bovine en fromagerie a permis l'obtention de fromages tout à fait comparables à ceux fabriqués avec de la présure [1]. L'utilisation d'extraits coagulants à base de pepsine bovine pourrait alors devenir courante dans un proche avenir.

La connaissance de différents facteurs qui conditionnent la richesse enzymatique des caillettes des bovins à l'état ruminant au moment de l'abattage est, parmi d'autres, un élément important pour la production commerciale de pepsine bovine.

Ce premier article, consacré à l'extraction et à l'activation des pepsinogènes bovins à partir de caillettes fraîches, rend compte des premiers résultats des recherches que nous poursuivons sur ce sujet.

La préparation d'extraits coagulants à partir de caillettes de veaux — à l'état pré-ruminant — comporte fondamentalement l'*extraction* des pro-enzymes des caillettes, leur *activation*, la clarification des extraits et, éventuellement, leur concentration.

Depuis très longtemps le procédé utilisé pour la préparation de la présure a été la macération des caillettes dans des solutions de NaCl. L'extraction dans ces conditions est plus ou moins lente, et elle a lieu à un pH voisin de 6,0. L'activation des pro-enzymes est obtenue par acidification des extraits aux environs de pH 5,0 [2].

Mais d'autres procédés ont été décrits qui ne comportent pas de macération dans des solutions de NaCl. Ce sont des procédés basés sur une macération des caillottes, séchées ou fraîches, en milieu acide, généralement dans des solutions d'acide chlorhydrique [3-7]. Dans ces procédés l'extraction et l'activation des pro-enzymes se font simultanément, de sorte que l'obtention des enzymes actives est plus rapide en général que dans le procédé traditionnel.

En ce qui concerne les caillottes des bovins à l'état ruminant (caillottes de vaches ou de bœufs), Chow et Kassel [8] ont extrait les pepsinogènes à partir de caillottes fraîches par macération dans une solution de NaHCO_3 à pH 7,3. Green [9] a extrait les pepsinogènes à partir de la muqueuse de caillottes, macérée dans une solution de phosphate de sodium à pH 7,3 et l'activation a été faite en acidifiant les extraits avec l'acide chlorhydrique à pH 5,0. Fox [10] macérait des caillottes fraîches dans une solution de NaCl à 10 p. 100 pendant 3 j à 3° C, et l'activation était faite par acidification à pH 4,0. O'Leary et Fox [11] ont réalisé l'extraction des pepsinogènes en macérant des caillottes dans de l'eau et l'activation était réalisée par acidification des extraits à pH 2,0 avec l'acide chlorhydrique.

Dans notre travail, nous avons utilisé la macération des caillottes fraîches dans des solutions d'acide chlorhydrique à 42° C.

I. MATERIEL ET METHODES

I.1. Caillottes

Les caillottes, reçues de l'abattoir du C.N.R.Z. le jour même de leur prélèvement, étaient conservées en chambre froide à 3° C - 5° C pendant une nuit. Elles étaient pesées, dégraissées et, dans la plupart des essais, la partie pylorique de la caillotte était rejetée. On broyait alors les caillottes dégraissées, et on conditionnait des poids déterminés de broyat dans des boîtes en aluminium. Les boîtes étaient conservées en congélateur entre - 28° C et - 30° C.

On a également opéré à partir de la muqueuse des caillottes. Dans ce cas, on séparait le tissu musculaire de la muqueuse. Celle-ci était broyée, homogénéisée et conditionnée comme précédemment. Des essais ont été faits également à partir de caillottes ou de muqueuses coupées en lanières qui ont été macérées sans avoir été congelées.

I.2. Macérations

On décongelait les boîtes contenant les muqueuses ou les caillottes broyées dans un bain-marie à 42° C ou en les laissant une nuit à température ambiante.

Dans un bocal en verre ou un bécher en acier inoxydable, on mettait un poids de caillette — ou de muqueuse — et un volume donné d'une solution d'acide chlorhydrique. Le récipient était placé dans un bain-marie et son contenu était porté, sous agitation et aussi rapidement que possible, à la température des essais. On plaçait alors le récipient dans un bain-marie réglé à la température des essais et on agitait le mélange manuellement de temps en temps pendant l'incubation.

La technique adoptée après les essais préliminaires est la suivante : à un poids de caillette ou de muqueuse PU (g) on ajoutait un volume égal à 1,25 PU (ml) d'une solution de HCl 0,2 M. Le mélange était porté à 42° C et maintenu à cette température pendant 45 mn à 60 mn en agitant de temps en temps.

I.3. Clarification des extraits

A la fin de la période d'incubation les résidus de caillette étaient séparés sur une passoire. Dans le cas des macérations faites à partir de muqueuses, ce tamisage n'était pas nécessaire. A la macération brute ainsi obtenue, on ajoutait 1 p.100 en volume d'une solution de sulfate d'aluminium 1 M et 5 p.100 d'une solution de sulfate disodique 1 M chauffée à environ 42° C. Après agitation et quelques minutes de repos à 42° C on filtrait sur des filtres à sirop Durieux n° 127. La filtration était rapide et on obtenait un filtrat jaune plus ou moins limpide de poids Pm (g) et d'activité coagulante AC (UP/g). Le rendement d'extraction Rt est défini comme le nombre d'unités coagulantes contenues dans l'extrait clarifié provenant de 1 g de caillette (ou de muqueuse) mis en œuvre.

I.4. Concentration des extraits clarifiés

Dans les 3 h qui suivaient la filtration, on prenait un poids donné de macération clarifiée auquel on ajoutait deux fois son poids d'une solution saturée de NaCl qui contenait 1 p.100 (p/p) d'acide chlorhydrique concentré $d = 1,19$. Le mélange était agité et laissé en repos pendant 1 h. On centrifugeait alors à 2 100 g pendant 20 mn. Le surnageant était rejeté et on notait le poids du précipité humide. On ajoutait à ce dernier une quantité déterminée d'eau distillée (selon l'activité enzymatique désirée de l'extrait concentré), pour le dissoudre sous agitation. On ajustait alors le pH à 5,30 avec une solution de phosphate disodique 1 M (chauffée vers 42° C).

I.5. Détermination de l'activité coagulante

Elle était faite par la méthode de Berridge modifiée que nous avons décrite [6]. Avec le substrat utilisé, une activité coagulante de 78 UP/g correspondait environ à la force 10 000 d'une présure liquide.

II. RESULTATS

II.1. Essais préliminaires

Influence de PU

AC est fonction de la richesse en enzyme des caillettes ainsi que de PU, pour un même volume de liquide ajouté pour la macération. Les résultats du tableau 1 montrent que AC augmente en fonction de PU jusqu'à une certaine limite. Parallèlement Rt varie peu en deçà de cette limite, au delà de laquelle il diminue fortement, alors que AC varie peu. On remarque également qu'il existe une zone dans laquelle il y a proportionnalité entre PU et AC, zone en dehors de laquelle on ne peut pas trop augmenter AC même en doublant PU (tab. 1, 2).

TABLEAU 1

Variation de l'activité coagulante et du rendement d'extraction en fonction du poids de caillettes mis en œuvre

PU (g)	AC (UP/g de macération)	Rt (UP/g de caillette)
50	3,6	74
100	6,0	63
200	12,0	63
400	14,0	39

Conditions de macération : PU + 1 l HCl 0,05 M, 42° C, 2 h.

Influence de la concentration en HCl

Pour obtenir des extraits plus concentrés on peut augmenter la concentration en HCl des solutions de macération (tab. 2). On remarque dans ce tableau (lots de caillettes A et C) qu'il faut augmenter la concentration des solutions de HCl quand on augmente PU si l'on veut augmenter AC et Rt (lot C).

Comme nous l'avons montré dans le tableau 1 on remarque qu'une augmentation linéaire de PU entraîne une augmentation pratiquement parallèle de AC tandis que Rt reste sensiblement constant

TABLEAU 2

Variation de l'activité coagulante et des rendements d'extraction
en fonction du poids des caillottes mis en œuvre
et de la concentration des solutions de HCl utilisées dans la macération

Sol. HCl (molarité)	PU (g)	AC (UP/g de macération)	Rt (UP/g de caillotte)	Lot de caillottes
0,05	100 a	5,5	57	A
0,05	200 a	11,3	63	
0,2	800 b	36,3	61	
0,05	200 b	9,9	44	B
0,2	800 b	31,0	45	
0,1	800 b	26,0	49	C
0,2	800 b	36,0	72	
0,2	200 b	12,5	75	D
0,2	400 b	21,5	72	
0,2	800 b	42,5	72	
0,2	800 b	57,0	109	E
0,2	1 600 b	73,0	70	
0,2	3 200 b	105,0	35	

Conditions de macération :

a : 2 h à 42° C PU + 1 l sol. HCl.

b : 1 h à 42° C PU + 1 l sol. HCl.

TABLEAU 3

Influence de la température et de la durée d'incubation sur l'activité coagulante
et le rendement (AC et Rt)

Sol. HCl (molarité)	PU g	Tempé- rature °C	Durée d'incubation h	AC (UP/g de ma- cération)	Rt (UP/g de caillotte)	Lot de caillotte
0,05	200	20	1	3,9	15,3	A
0,05	200	42	1	9,9	44,0	
0,2	800	42	1	31,4	45,0	
0,05	200	20	18	9,2	38,0	B
0,05	200	42	2	8,5	51,0	

Conditions de macération : PU + 1 l sol. HCl.

(lot D). On note également qu'au delà d'une certaine limite une augmentation de PU ne produit plus d'augmentation parallèle de AC et que Rt diminue alors sensiblement (lot E).

Influence de la température et de la durée de macération

Les chiffres présentés dans le tableau 3 indiquent que les résultats sont meilleurs à 42° C qu'à 20° C, et qu'à 20° C il faut des durées d'incubation de l'ordre de 18 h pour obtenir des résultats légèrement inférieurs à ceux obtenus en 2 h à 42° C.

Nous indiquons ci-dessous les variations de AC en fonction du temps de macération à 42° C en partant de 800 g de caillottes plus 1 l de solution de HCl 0,2 M.

Temps (mn)	15	20	30	45	60	75	90
AC (UP/g de macération)	39	43	42	42	42	42	42

On remarque qu'à partir de 20 mn à 30 mn on atteint pour AC un maximum et que l'activité reste ensuite constante jusqu'à 90 mn.

Comparaison de macérations effectuées dans l'eau et dans HCl 0,2 M

Le tableau 4 montre les conditions expérimentales suivies et les résultats obtenus. Deux macérations successives ont été effectuées dans l'un et l'autre cas. Avec la solution de HCl, 97 p. 100 de l'activité enzymatique totale recueillie par les deux extractions proviennent de la première extraction, contre seulement 56 p. 100 dans l'eau à 20° C. Deux extractions consécutives à l'eau ne récupèrent que 77 p. 100 de l'activité obtenue par la macération acide en une seule opération. Ceci nous a conduits à comparer les rendements d'extraction des deux méthodes, en pratiquant une seule macération acide et trois macérations par l'eau, à partir d'un même poids de muqueuse. Les résultats suivants ont été obtenus :

Rendements d'extraction (UP/g de muqueuse)

Macération par l'eau à 20° C		Macération HCl 0,2 M
Première extraction	35,4	70,4
Deuxième extraction	23,3	—
Troisième extraction	11,7	—
Total	70,4	70,4

TABLEAU 4

Comparaison de macérations effectuées dans l'eau et dans HCl 0,2 M

A. Conditions de macération

	Première extraction	
	Macération dans l'eau	Macération acide
PU	200 g	200 g
Milieu de macération	250 ml H ₂ O	250 ml HCl 0,2 M
Température	20° C	42° C
Durée d'incubation	1 h	1 h
Séparation des résidus	Centrifugation (a)	Centrifugation (a)
Poids de l'insoluble après macération	170 g	28 g
Activation	Ajustement du pH à 2,0 : 30 mn d'incubation et centrifugation (b)	—

Deuxième extraction

Les résidus des deux macérations étaient repris par un volume égal à deux fois leur poids des liquides de macération respectifs et traités comme pour la première extraction.

(a) : 2 200 g, 20 mn.

(b) : 2 200 g, 10 mn.

B. Activité coagulante et rendements

	Première extraction		Deuxième extraction		Total	
	Activité totale extraite (UP)	Rt (UP/g de muqueuse)	Activité totale extraite (UP)	Rt (UP/g de muqueuse)	Activité totale extraite (UP)	Rt (UP/g de muqueuse)
Macération par l'eau	8 728 (56 p. 100)	44	6 834 (44 p. 100)	34	15 562	78
Macération acide	19 798 (97 p. 100)	99	521 (3 p. 100)	3	20 319	102

Entre parenthèses : p. 100 par rapport à l'activité totale récupérée par les deux extractions.

Ces résultats montrent que la méthode de macération que nous avons décrite permet par une seule extraction de récupérer autant

de pepsine bovine qu'une macération par l'eau nécessitant trois extractions consécutives.

L'ensemble des résultats préliminaires que nous venons de présenter nous a conduits à choisir la méthode de macération décrite dans le paragraphe I.2., qui nous permettait d'obtenir les activités coagulantes des extraits clarifiés les plus élevées et, en même temps, d'obtenir les meilleurs rendements d'extraction.

II.2. Résultats obtenus avec la méthode mise au point (macérations clarifiées)

En utilisant la méthode que nous avons mise au point, nous avons préparé des extraits clarifiés de pepsine bovine, soit à partir de caillettes dégraissées, soit à partir uniquement de muqueuses. Le tableau 5 montre l'ensemble des résultats obtenus.

Quantité obtenue de macération clarifiée

Les données utilisées pour le calcul des moyennes mentionnées dans le tableau 5 ont montré qu'il y avait une corrélation hautement significative entre PU (caillette ou muqueuse) et Pm (lot A, $r = 0,98$; lot B, $r = 0,80$).

Nous avons établi les équations de régression qui relient ces deux paramètres dans le cas des macérations faites à partir de caillettes et de muqueuses. A l'aide de ces équations nous pouvons prédire (dans certaines limites) quelles sont les quantités de macération clarifiée que l'on peut obtenir à partir d'un poids de caillette ou de muqueuse utilisé :

Caillettes dégraissées : $Pm = 1,95 PU - 9,60$

Muqueuses : $Pm = 1,89 PU + 3,58$

A partir de 100 g de caillette dégraissée ou de muqueuse on obtiendrait respectivement 185 g et 192 g de macération clarifiée.

Dans la mesure où l'extrapolation serait valable, les quantités de macération clarifiée que l'on obtiendrait à partir d'une caillette seraient les suivantes, selon les données du tableau 5 :

Caillettes dégraissées : $Pm = (1,95 \times 1\ 160) - 9,6 = 2\ 252\ g$

Muqueuses : $Pm = (1,89 \times 630) + 3,58 = 1\ 194\ g$

et les activités coagulantes seraient respectivement de 28,5 et 38,6 UP/g.

Activité coagulante totale correspondant à une caillette

Ce paramètre (ACT) peut être calculé directement à partir du poids moyen d'une caillette dégraissée ou d'une muqueuse et des rendements d'extraction respectifs montrés dans le tableau 5 :

Caillettes dégraissées : $ACT = PCD \times Rt = 1\ 160 \times 49,7 = 57\ 710\ UP$

Muqueuses : $ACT = PM \times Rt = 630 \times 71,7 = 45\ 171\ UP$

TABLEAU 5

Résultats obtenus par la méthode acide choisie (caillettes ou muqueuses)

Caillettes				Macération				
Lot		PC (g)	PCD (g)	PM (g)	PU (g)	Pm (g)	AC (UP/g de macération)	Rt (UP/g de caillette)
A	$\bar{x}$	1 820	1 160	—	250	478	28,5	49,7
	s	—	—	—	—	—	3,2	7,1
	n	7	7	—	8	8	8	8
B	$\bar{x}$	1 800	—	630	191	365	38,6	71,7
	s	—	—	—	—	—	4,8	3,9
	n	31	—	24	12	12	12	12

Conditions de macération : PU + 1,25 PU ; HCl 0,2 M ; 1 h ; 42° C ; PC, poids de la caillette entière ; PCD, poids de la caillette dégraissée ; PM poids de la muqueuse correspondant à une caillette ; $\bar{x}$, moyenne ; s, écart type ; n, nombre de données ; PU, Pm, AC, Rt, indiqué dans le texte.

Ces valeurs peuvent être également calculées à partir des poids de macération clarifiée Pm prédits par l'équation de régression et de l'activité des macérations clarifiées :

Caillettes dégraissées : $ACT = Pm \times AC = 2252 \times 28,5 = 64\,193 \text{ UP}$

Muqueuses : $ACT = Pm \times AC = 1\,194 \times 38,6 = 46\,088 \text{ UP}$

Toutefois ce mode de calcul est plus approximatif car les valeurs de PCD et de PM (1 160 et 630 dans notre cas) introduits pour le calcul de Pm s'écartent de celles qui ont servi à déterminer l'équation de régression que nous avons établie.

Il faut noter que toutes les comparaisons effectuées entre les résultats obtenus avec les caillettes dégraissées d'une part et les muqueuses d'autre part se réfèrent à deux lots de caillettes différents (tab. 5). Les différences observées peuvent donc provenir soit du matériel de départ (muqueuse ou caillette dégraissée), soit des lots eux-mêmes.

II.3. Concentration des macérations clarifiées

Les macérations clarifiées obtenues par la méthode mise au point présentaient une activité coagulante d'environ la moitié de celle d'une préparation de présure de force 10 000. Il était donc intéressant de voir si, par une technique simple et rapide, on pouvait obtenir des extraits plus concentrés en pepsine bovine.

Des essais préliminaires ont été faits en additionnant du NaCl jusqu'à saturation à la macération clarifiée ajustée à pH 1,0 par HCl concentré à la température de 20° C. Dans ces conditions, la pepsine précipitait. Le précipité était séparé du surnageant (après 3 h à 16 h d'incubation à 20° C) par centrifugation et dissous dans l'eau distillée. Des pertes d'activité de l'ordre de 12 p.100 ont été constatées. Le même procédé utilisé à une température de 15° C nous a donné des pertes d'activité de l'ordre de 7 p.100. Finalement, avec la technique plus souple et plus rapide que nous avons décrite dans le paragraphe I.4., nous avons constaté des pertes d'activité de l'ordre de 7 p. 100 également.

Quand nous avons travaillé avec des caillettes dégraissées en appliquant la technique adoptée, nous avons observé que le poids de précipité variait selon « l'âge » des macérations clarifiées. Des augmentations du poids du précipité de trois à cinq fois ont été constatées selon qu'on partait de macérations clarifiées préparées depuis 2 h, ou de macérations clarifiées ayant été préparées depuis 8 h. Cette augmentation entraînait une diminution de l'activité enzymatique des extraits concentrés obtenus par dissolution des précipités. Un phénomène analogue a été constaté lorsqu'on a utilisé la partie pylorique des caillettes : des augmentations du poids du précipité (pour des macérations prises au même moment après leur préparation) de

l'ordre de dix fois par rapport aux macérations faites sans cette partie de la caillette ont été observées.

Lorsqu'on travaillait uniquement avec la muqueuse ces phénomènes n'étaient pas observés.

Voici les résultats obtenus dans la préparation d'extraits concentrés de pepsine bovine avec la technique de précipitation adoptée :

Poids de macération clarifiée à concentrer	Pm	95 g (moyenne)
Poids d'extrait concentré obtenu	PPC	34,6 g (moyenne)
Activité coagulante des extraits concentrés	UP/g	92,5 (moyenne)
Pertes d'activité au cours de la concentration		7 p. 100
Nombre d'essais		9

Il y a une corrélation significative ($r = 0,75$) entre les poids Pm et PPC, et l'équation de régression entre ces deux paramètres est la suivante : $PPC = 0,239 Pm + 13,09$. On peut donc prédire qu'à partir de 100 g de macération clarifiée on obtiendrait 37 g de pepsine concentrée titrant 92 UP/g. Avec la réserve qu'impose l'utilisation de valeurs de Pm très éloignées de celles à partir desquelles l'équation de régression a été calculée, on peut estimer *très approximativement* les valeurs suivantes, que nous avons calculées à *titre purement indicatif*. Le poids de pepsine concentrée (PPC) titrant 92 UP/g et l'activité coagulante totale (ACT) obtenus à partir d'une caillette seraient :

$PPC = (0,239 \times 1\,194) + 13,09 = 298$ g. $ACT = PPC \times AC = 298 \times 92 = 24\,416$ UP (1 194 g étant le poids Pm obtenu à partir de la muqueuse d'une caillette, par. II.2.).

La quantité d'extrait concentré correspondant à une activité coagulante totale égale à celle de 1 l de présure de force 10 000, c'est-à-dire 78 000 UP environ, serait de :

$$\frac{78\,000 \times 298}{24\,416} = 952 \text{ g}$$

Le nombre de caillettes nécessaires pour obtenir 1 kg d'extrait concentré de pepsine bovine titrant 92 UP/g correspondrait à :

$$\frac{92\,000}{24\,416} = 3,7$$

II.4. Conservation des extraits concentrés de pepsine bovine

II.4.1. Gélification des extraits

Quand on utilisait des caillettes dégraissées, c'est-à-dire la muqueuse avec le tissu musculaire, pour effectuer les macérations, on constatait maintes fois que les extraits concentrés formaient un

gel à des températures de 5° C à 10° C. Les gels se liquéfiaient dès que la température atteignait 16° C à 17° C.

Dans certains cas, nous avons observé le même phénomène avec les macérations clarifiées non concentrées, ainsi que la formation de gels à température ambiante lors de la concentration sous vide de macérations clarifiées.

La formation du gel dépend du pH : à pH 1,0 la gélification était fortement atténuée et, au fur et à mesure que le pH augmentait, la consistance des gels augmentait également. A des pH voisins de 6,0 la gélification avait lieu très rapidement et les gels étaient très fermes. L'addition de certaines substances telles que l'acide lactique,

TABLEAU 6

Conservation d'extraits de pepsine bovine

Macération				
Période et température	par l'eau à 20° C		par HCl 0,2 M à 42° C	
	Activité initiale en UP/g			
	85	65	112	102
	Différences d'activité en p. 100 par rapport à l'activité initiale			
15 j :				
29° C - 30° C	6,4	6,0	— 4,4	2,0
20° C - 22° C	11,8	3,5	— 0,9	3,4
3° C - 5° C	2,5	6,2	4,3	— 2,9
30 j :				
29° C - 30° C	5,3	3,5	5,2	0,8
20° C - 22° C	1,2	1,8	5,8	0,7
3° C - 5° C	3,3	5,3	— 0,6	0,0
90 j :				
29° C - 30° C	9,8	17,0	9,8	10,8
22° C - 20° C	13,0	15,5	5,4	10,4
3° C - 5° C	6,2	27,0	— 2,7	2,6

le lactose, le saccharose diminuait le point de fusion des gels, sans pour autant empêcher la gélification aux alentours de 5° C.

La gélification n'avait pas lieu quand on utilisait seulement la *muqueuse pour les macérations chlorhydriques* ou bien quand on utilisait les *caillettes dégraissées pour les macérations aqueuses*.

II.4.2. Essais de conservation

Une première série d'essais a été faite avec des extraits concentrés de pepsine bovine ajustés à pH 1,0 et additionnés de 5 p. 100 (p/p) de glycérine, conservés entre 3° C et 5° C pendant 1 mois. Des pertes de l'ordre de 4 p. 100 en moyenne ont été constatées.

TABLEAU 7

Variation de l'activité de certains extraits clarifiés au cours du temps à différents pH et à différentes températures

Lots de caillettes	pH	Température (°C)	Temps (h)	Variation de l'activité p. 100 (a)
A	1,0	15	4	+ 34,0
	1,0	15	21	+ 37,0
	1,0	4	4	+ 41,0
	1,0	4	21	+ 38,0
B	1,0	15	4	+ 2,5
	0,1	15	4	+ 3,5
C	1,0	15	4	+ 8,5
	1,0	15	21	+ 6
	1,0	23	4	+ 3,0
	1,0	23	21	+ 13,0
	2,5	15	4	+ 11,0
	2,5	15	21	+ 6,5
D	1,0	4	48	0,0
	3,0	4	48	— 5,0

(a) : Par rapport à l'activité initiale.

Une deuxième série d'essais a été effectuée avec des extraits concentrés obtenus à partir de caillettes dégraissées macérées dans l'eau à 20° C, ou dans HCl 0,2 M à 42° C selon la méthode décrite, et ajustés à pH 5,3. Le but de ces essais était de voir si les substances gélifiables (présentes dans les extraits obtenus par macération acide) avaient une influence sur la conservation.

Les résultats présentés dans le tableau 6 montrent, pour les deux essais réalisés pour chaque type de macération, qu'au bout de 30 j de conservation aux trois températures essayées, il n'y avait pas de pertes d'activité.

Durant les 90 j de conservation, on a constaté une activation des extraits très accusée dans le cas des macérations à l'eau aux trois températures et plus faible pour les macérations acides aux températures de 20° C et 30° C.

II.5. Variation de l'activité des extraits clarifiés avec certains lots de caillettes

Au cours de nos essais, nous avons constaté plusieurs fois des gains considérables d'activité des extraits. Toutes vérifications faites, nous avons observé qu'avec certaines caillettes l'activité variait au cours du temps lorsque les extraits étaient ajustés à pH 1,0 avec l'acide chlorhydrique 12 M.

Les résultats présentés dans le tableau 7 montrent d'abord un comportement différent des lots de caillettes. L'activité des macérations obtenues à partir des lots A, B et C augmentait tandis que celle du lot D restait constante. Dans le cas du lot A un gain considérable d'activité a été observé dans les 4 premières heures d'incubation et cette activation était indépendante de la température (4° C et 15° C). Le lot B subissait une faible activation à pH 1,0 ou 0,1 au bout de 4 h à 15° C.

Pour le lot C les résultats sont plus difficiles à interpréter. Il semble qu'à pH 1,0 l'activation était terminée après 4 h à 15° C, mais, au même pH et à 23° C, l'activation était beaucoup plus lente. A pH 2,5 et 15° C l'activation semblait terminée au bout de 4 h et était suivie d'une perte d'activité entre 4 h et 21 h. Enfin, pour le lot D, on ne constatait pas d'activation à pH 1,0 au bout de 48 h à 4° C et une légère perte d'activité à pH 3,0.

DISCUSSION

Nous avons observé, dans le cas de macération réalisées à 20° C, qu'à partir du moment où l'on mélangeait la muqueuse broyée à la solution d'acide chlorhydrique 0,2 M, le caractère collant et glaireux

de la muqueuse diminuait fortement. Ceci serait dû à une modification physico-chimique des mucoprotéines. Quand la macération était réalisée à 42° C un autre phénomène était observé : la désintégration de la muqueuse et du tissu musculaire durant la macération. Lorsqu'on mélangeait des poids égaux de muqueuse et de HCl 0,2 M à 20° C, au bout de quelques instants le mélange s'épaississait en absorbant presque tout le liquide. Par chauffage aux alentours de 40° C un changement très net survenait : la pâte se liquéfiait rapidement, exsudant le liquide. Après 30 mn à 45 mn d'incubation à 42° C, les morceaux de muqueuse se désintégraient finement au sein du liquide. Dans ces conditions une très faible quantité de liquide était retenue par les résidus insolubles. Quand on macérait la muqueuse (ou la caillette) dans l'eau à 20° C le caractère glaireux et collant propre à la muqueuse persistait encore en fin de macération. La muqueuse et le tissu musculaire n'étaient presque pas altérés. En fin de macération subsistait une grande quantité de résidus qui, par leur nature gluante, retenaient une quantité importante de liquide. Ces faits expliquent pourquoi les macérations chlorhydriques effectuées à 42° C permettaient d'obtenir en une seule opération des rendements d'extraction nettement supérieurs à ceux obtenus par une seule extraction aqueuse.

La désintégration du tissu musculaire et de la muqueuse des caillettes, ainsi que la gélification des extraits concentrés obtenus par macération chlorhydrique à 42° C, doivent être vraisemblablement attribués au collagène. En effet, cette protéine, abondante dans le tissu musculaire, les tendons et le tissu conjonctif, est solubilisée en milieu acide et dans cet état sa transformation par chauffage en gélatine est bien connue. La présence du collagène soluble dans les macérations clarifiées expliquerait les variations du poids des précipités obtenus à pH 1,0 par addition de NaCl. Le collagène soluble précipite dans ces conditions et il peut absorber des quantités importantes d'eau [12].

Nous avons montré que l'activité des macérations ne variait plus à partir de 30 mn d'incubation et qu'elle restait constante dans les 60 mn suivantes. Si l'on considère que depuis le début de la macération jusqu'à la fin de la clarification 2 h environ se sont écoulées et que les pepsinogènes sont restés pendant ce temps à des pH compris entre 1,5 et 3,0, on pourrait conclure que leur activation est achevée. Or le phénomène d'activation ultérieure a été constaté après ajustement du pH à 1,0, ce qui n'implique cependant pas que l'activation n'ait pas lieu avant l'abaissement du pH. Une hypothèse peut être avancée : certaines caillettes, en fonction de la race ou de l'individu par exemple, pourraient contenir des pepsinogènes dont l'activation complète ne se produirait qu'à pH 1,0.

Quant aux différents paramètres étudiés concernant les *caillettes elles-mêmes*, ils constituent seulement une première indication. En

effet, les caillettes que nous avons utilisées provenaient de vaches de différents âges qui avaient été soumises à des traitements divers en vue d'étudier leur lactation. Dans ces conditions ces caillettes ne forment pas un échantillon représentatif des caillettes pouvant être normalement utilisées pour la préparation d'extraits coagulants. Il est vraisemblable que des caillettes de bœufs provenant de races à viande, de vaches laitières de réforme, constitueront la matière première essentielle pour la fabrication d'extraits de pepsine bovine. Dans ces deux groupes d'animaux, la race, l'âge, l'alimentation sont, parmi d'autres, des facteurs susceptibles d'influencer le contenu enzymatique des caillettes au moment de l'abattage.

Des recherches en cours dans notre laboratoire nous permettront d'étudier l'influence de ces facteurs et de caractériser les caillettes les plus aptes à la préparation d'extraits coagulants avec un bon rendement.

Enfin, la méthode que nous avons mise au point pour l'étude des caillettes pourrait se prêter à la préparation industrielle d'extraits concentrés de pepsine bovine. Les rendements d'extractions élevés, la rapidité des opérations et l'exclusion des fermentations bactériennes pendant la préparation des extraits sont des éléments intéressants.

Cependant quelques problèmes restent à considérer tels que la corrosion et la pollution, liés à l'emploi de la technique de concentration des extraits à l'aide de solutions de NaCl très acides, ou celui de la gélification des macérations qui semble exclure l'emploi d'autres techniques de concentration. Le problème de la gélification des extraits concentrés pourrait être résolu par leur conservation à température ambiante étant donné leur remarquable stabilité à 20° C et à 30° C. La préparation de pepsine bovine en poudre pourrait également être une solution à ce problème.

Résumé

Dans l'optique d'une étude détaillée de caillettes individuelles de bovins adultes, une méthode d'extraction et de concentration de la pepsine bovine a été mise au point.

A PU (g) de caillettes broyées, 1,25 PU (ml) de HCl 0,2 M sont ajoutés. Le mélange est incubé à 42° C pendant 45 mn à 60 mn. Les macérations sont clarifiées par addition de sulfate d'aluminium 1 M et de phosphate disodique 1 M. Des rendements d'extraction élevés permettent d'obtenir à l'aide d'une seule macération autant de pepsine que trois macérations consécutives effectuées dans l'eau à 20° C.

La concentration des macérations clarifiées est obtenue par précipitation à pH 1,0 par NaCl. Le précipité est dissous dans l'eau après

séparation par centrifugation. Moins de 2 h sont nécessaires pour réaliser cette opération qui n'entraîne que de faibles pertes d'activité coagulante (de l'ordre de 7 p. 100).

Les extraits concentrés de pepsine bovine ajustés à pH 5,3 et additionnés de thymol ont été conservés pendant 90 j à 5° C, 20° C et 30° C sans perte de leur activité coagulante.

Les rendements d'extraction, les activités coagulantes des macérations et des extraits concentrés ont été étudiés.

Summary

A procedure of extraction and concentration of bovine pepsin has been devised for a further study of individual adult bovine vells as a function of different factors (age, breed, feeding). To PU (g) of minced vells 1.25 PU (ml) of 0.2 M HCl is added. The mixture is incubated at 42° C for 45-60 mn and subsequently clarified by adding 1 M aluminum sulfate and 1 M disodium phosphate. From one single extraction this technique produces the same yield of active pepsin as 3 consecutive extractions with water at 20° C. Clarified extracts are concentrated by precipitating pepsin with NaCl at pH 1.0. The precipitate is separated by centrifugation and dissolved in water. This concentration procedure requires less than 2 hrs and produces only small losses of activity (ca. 7 p. 100). The concentrated extracts were adjusted at pH 5.3. They were kept in the presence of thymol for 90 days at 5° C, 20° C and 30° C without any loss of clotting activity. The different steps of the technique have been studied in details.

Remerciements

Nous remercions M. Hazé pour la collaboration qu'il nous a apportée dans la réalisation de ce travail. Nous remercions également M. Ribadeau-Dumas pour les suggestions et les conseils qu'il nous a apportés au cours de ce travail et pour la rédaction du manuscrit.

Reçu pour publication en juin 1977.

Références bibliographiques

- [1] VALLES (E.), VASSAL (L.) et RIBADEAU-DUMAS (B.) (1977). — Utilisation d'une préparation de pepsine bovine dans la fabrication de fromages à pâte molle, à pâte pressée et à pâte cuite. *Revue Lait. Française*, 350, 87.
- [2] LEITCH (R. H.) (1937). — Manufacture of rennet. V^e Congrès Int. des Industries Agricoles.
- [3] PORCHER (Ch.) (1930). — Le lait du point de vue colloïdal. Recherches sur le mécanisme de l'action de la présure. *Le Lait*, 10, 55.

- [4] TAUBER (H.) and KLEINER (I.) (1932). — Studies on rennin. *J. Biol. Chem.*, 96, 745.
 - [5] KEIL (H. L.) (1942). — *U.S. Pat.*, 2, 339, 931.
 - [6] VALLES (E.) et MOCQUOT (G.) (1972). — Etude sur la technique de préparation de la présure utilisée dans les fabrications traditionnelles des fromages de Gruyère de Comté et d'Emmental. *Le Lait*, 515-516, 259.
 - [7] GARNOT (P.), VALLES (E.), THAPON (J. L.), TOULLEC (R.), TOMASSONE (R.) and RIBADEAU-DUMAS (B.) (1974). — Influence of dietary proteins on rennin and pepsin content of preruminant calf vell. *J. Dairy Res.*, 41, 19.
 - [8] CHOW (R. B.) and KASSEL (B.) (1968). — Bovine pepsinogen and pepsin. *J. Biol. Chem.* 243, 1718.
 - [9] GREEN (M. L.) (1972). — Assessment of swine, bovine and chicken pepsins as substitutes for Cheddar cheese-making. *J. Dairy Res.*, 39, 261.
 - [10] FOX (P. F.) (1969). — Milk clotting and proteolytic activities of rennet and of bovine pepsin and porcine pepsin. *J. Dairy Res.*, 36, 427.
 - [11] O'LEARY (P. A.) and FOX (P. F.) (1973). — Ovine pepsin: suitability as a rennet substitute. *Ir. J. Agric. Res.*, 12, 267.
 - [12] KENDREW (J. C.) (1954). — Structure proteins. I. The proteins, Vol. II, Part B. Academic Press Inc. Publishers, New York, 990.
-