

UNE UTILISATION DES ENZYMES PROTÉOLYTIQUES EXTRAITES DES VISCÈRES DE POISSONS : LA COAGULATION DU LAIT

Fabienne GUÉRARD

Laboratoire de Biologie Marine du Collège de France,
29110 Concarneau, France.

Abstract

MILK-CLOTTING BY FISH PROTEOLYTIC ENZYMES : POTENTIAL OF UTILIZATION IN CHEESE-MAKING INDUSTRIES.

Chronic shortages in rennet have led to the use of enzyme preparations from various biological origins and capable of undergoing a milk-clotting process similar to that catalysed by calf rennet. A proteolytic enzyme extracted from the gastric mucosa of dogfish *Scyliorhinus canicula* exhibits a clotting activity and several physical properties which render it suitable for an utilization in cheese-making industry. The use of proteolytic enzymes from dogfish or other fish species could be extended to other biotechnological processes such as the production of specific peptides for animal or human feeding.

Résumé

En industrie laitière, le caractère fluctuant de l'approvisionnement en présure a conduit à l'emploi de préparations enzymatiques d'origines diverses, coagulant le lait de façon analogue à la présure. Une protéase extraite de la muqueuse gastrique de roussette possède une activité coagulante vis-à-vis du lait avec des propriétés compatibles avec une utilisation en industrie fromagère, en référence au modèle fourni par la présure. L'utilisation des enzymes protéolytiques de roussette ainsi que celle d'autres espèces de poissons peut ne pas se limiter à l'industrie fromagère : on peut ainsi envisager la production de peptides spécifiques destinée à l'alimentation du bétail ou à la consommation humaine.

Introduction.

La coagulation du lait est traditionnellement obtenue par action de la présure extraite industriellement des caillettes provenant de veaux non sevrés. La présure contient essentiellement une enzyme, la chymosine, dont la particularité est de posséder une activité coagulante associée à une faible activité protéolytique. Cette activité protéolytique n'intervient que lors de la phase d'affinage des fromages, sans induire de défauts de flaveur (RAMET, 1984). La production fromagère constitue un secteur industriel très dynamique puisque dans l'ensemble du monde, elle n'a cessé de croître depuis plus de vingt ans (LENOIR *et al.*, 1985). Le caractère irrégulier de l'approvisionnement en présure a conduit les industries concernées à utiliser, parallèlement à l'usage traditionnel de la présure de veau, qui assurait encore la coagulation de 90 % des fromages en 1980 (DESMAZEAUD, 1981), des préparations enzymatiques coagulant le lait dans lesquelles la chymosine est remplacée plus ou moins totalement par d'autres enzymes à mode d'action analogue.

Dans cette optique, un certain nombre d'enzymes ont été caractérisées. Il s'agit toujours de protéases susceptibles d'attaquer les caséines du lait et plus particulièrement la caséine K, dont la rupture d'une liaison peptidique particulièrement labile, la liaison Phe₁₀₅-Met₁₀₆ provoque la coagulation du lait (SWAISGOOD, 1982). Ces enzymes appartiennent au groupe des pepsines. La pepsine bovine, qui est assez proche de la chymosine au plan de la structure primaire (FOLTMANN, 1970), est déjà présente dans la présure avec la chymosine et la gastricsine bovine (MARTIN, 1984). On peut également faire appel à la pepsine porcine mais son emploi est limité par sa sensibilité aux variations de pH.

Un second groupe de protéases susceptibles de coaguler le lait est fourni par les microorganismes. Actuellement, trois préparations coagulantes ayant donné des résultats satisfaisants sur le plan organoleptique sont commercialisées sur le marché international et utilisées à plus ou moins grande échelle selon les pays. Il s'agit de *Mucor miehei*, de *Mucor pusillus* et d'*Endothia parasitica*. Les préparations enzymatiques obtenues à partir de ces microorganismes possèdent, par rapport aux autres succédanés d'origine animale, plusieurs avantages propres à leur fabrication. Tout d'abord, les protéases fongiques peuvent être produites en quantités pratiquement illimitées. Ceci évite d'être tributaire d'une source de matière première fluctuante comme c'est le cas pour la présure et les autres enzymes coagulantes d'origine animale. En outre, elles peuvent être utilisées dans les pays où des raisons philosophiques ou religieuses interdisent l'utilisation d'enzymes provenant de certains animaux. Enfin, les techniques de culture et les procédés d'extraction et de purification, qui sont relativement simples, entraînent un prix de revient satisfaisant.

Les viscères d'organismes marins constituent une source abondante de molécules à partir desquelles il serait facile d'extraire des enzymes dont les propriétés et les utilisations potentielles en industrie restent à déterminer. Les propriétés d'une pepsine coagulante extraite de la muqueuse gastrique d'un Sélacien, la roussette (*Scyliorhinus canicula*), ont été décrites (GUÉRARD et LE GAL, 1986). On a pu montrer que d'une part cette enzyme possédait un rapport activité coagulante (AC)/activité protéolytique (AP) satisfaisant et que, d'autre part, ses propriétés biochimiques étaient compatibles avec une utilisation en industrie fromagère. On a pu montrer également que cette enzyme coagulante obtenue sous une forme purifiée, la pepsine II, pouvait s'attaquer, dans des conditions assez comparables à celles de la chymosine, à un substrat artificiel. Ce substrat reproduit partiellement la séquence de la caséine K au voisinage de la liaison peptidique labile dont la rupture provoque la coagulation du lait (GUÉRARD et LE GAL, 1987). Cet article illustre quelques propriétés des enzymes coagulantes de poisson et discute des possibilités de leur utilisation en industrie fromagère.

Matériel et méthodes.

Les poissons sont capturés au chalut de fond en mer Celtique ou dans la baie de Concarneau. Les estomacs sont prélevés soit sur des poissons sacrifiés juste avant l'expérience, soit sur des poissons morts depuis 24 heures au plus. Les extraits bruts sont obtenus par broyage de la muqueuse gastrique à l'ultra-turrax pendant 3 minutes dans du tampon phosphate de sodium (0,2 M, pH 7,3) à raison de 2 ml pour 1 g de tissu. Les homogénats obtenus sont centrifugés (35 000 g, 20 min). Le surnageant constitue l'extrait brut. Dans le cas des enzymes extraites de la muqueuse gastrique de roussette, l'extrait brut subit une activation par HCl et une purification selon la méthode décrite par GUÉRARD et LE GAL (1986). Les activités enzymatiques, activité coagulante vis-à-vis du lait et activité protéolytique vis-à-vis de l'hémoglobine, sont mesurées selon la méthode décrite par GUÉRARD et LE GAL (1987). L'étude de l'hydrolyse de la caséine entière et de ses fractions purifiées est suivie par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-agarose (12 %) selon GRIPON *et al.* (1975). Les fractions de caséine sont colorées par le bleu de Coomassie.

Résultats.

Recherche des activités coagulantes chez plusieurs espèces de poissons. L'aptitude à coaguler le lait des protéases extraites de la muqueuse gastrique de plusieurs espèces de poissons présentant un intérêt commercial a été évaluée en relation avec leur activité protéolytique mesurée sur l'hémoglobine (fig. 1). Chez un grand nombre d'espèces étudiées, une activité coagulante est identifiée. Cette activité est

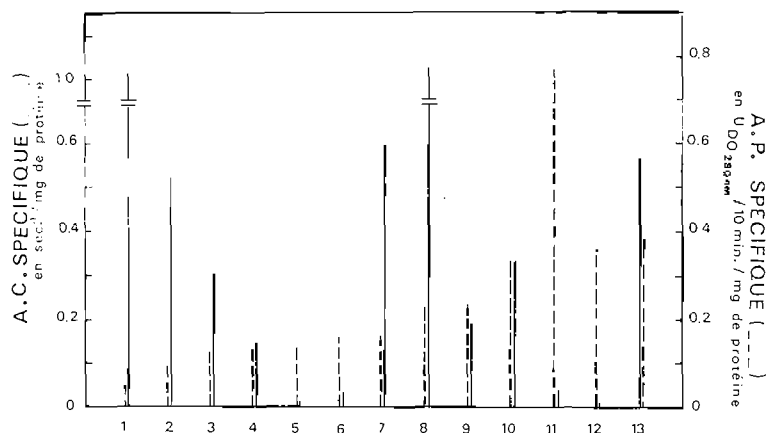


FIG. 1. — Recherche des activités coagulantes et protéolytiques de préparations enzymatiques extraites de la muqueuse gastrique de plusieurs espèces de poissons. 1 : Merlan (*Merlangius merlangus*), 2 : Raie noire (*Raja batis*), 3 : Tacaud (*Trisopterus luscus*), 4 : Sole (*Solea vulgaris*), 5 : Raie fleurie (*Raja naevus*), 6 : Chinchard (*Trachurus trachurus*), 7 : Raie piquante (*Raja clavata*), 8 : Limande (*Limanda limanda*), 9 : Lieu jaune (*Pollachius pollachius*), 10 : Limande-sole (*Microstomus kitt*), 11 : Sprat (*Sprattus sprattus*), 12 : Carrelet (*Pleuronectes platessa*), 13 : Roussette (*Scyliorhinus canicula*).

variable d'une espèce à l'autre. Une valeur intéressante pour le rapport AC/AP est obtenue avec les poissons cartilagineux ainsi qu'avec certains poissons osseux tels que le merlan (*Merlangius merlangus*) et la limande-sole (*Microstomus kitt*). Il importe, en effet, que l'activité protéolytique de l'enzyme soit faible afin d'éviter une hydrolyse trop importante des différentes fractions caséiniques qui entraînerait des chutes de rendement et pourrait être responsable, au sein d'un caillé en cours de maturation, de l'apparition de défauts de texture et de flaveur (RAMET, 1984).

Adaptation des enzymes aux basses températures.

Le tableau 1 regroupe les énergies d'activation d'Arrhénius (EAA) calculées à partir des vitesses maximales de réaction et mesurées lors de l'hydrolyse de l'hémoglobine par plusieurs sources d'enzymes. L'extrait brut de Sélacien *Lepidorhinus squamosus* possède une EAA de 7,28 kcal/mole dans la zone des 8-20 °C. De 20 à 50 °C, des modifications de la structure de l'enzyme conduisent à un abaissement significatif de

Morue polaire (1) <i>Boreogadus saida</i>	Morue de l'arctique (2) <i>Arctogadus glacialis</i>	Morue de l'Atlantique (3) <i>Gadus morhua</i>	Squale-chagrin <i>Lepidorhinus squamosus</i>	Pepsine porcine (2)	Chymosine de veau (4)
pepsinogène A : 3,2 pepsinogène B : 2,9	4,4,2	7,3	8-20 °C : 7,28 20-50 °C : 3,13	11,2-11,8	13,6

(1) Arunchalam et Haard (1985) ; (2) Haard *et al.* (1985) ; (3) Brewer *et al.* (1984) ; (4) Shamsuzzaman and Haard (1985).

TABL. 1. — Energies d'activation d'Arrhénius (EAA) mesurées lors de l'hydrolyse de l'hémoglobine par les pepsines extraites de divers organismes (valeurs exprimées en kcal/mole).

l'EAA (3,13 kcal/mole). Ces valeurs sont intermédiaires entre celles de la morue de polaire qui occupe un habitat dont les températures varient entre - 2 °C et + 4 °C et celles des pepsines d'un organisme homéotherme comme le porc. HAARD *et al.* (1982) ont suggéré que les protéases provenant d'organismes poikilothermes adaptés au froid pourraient être exploités comme substituts de présure en raison de leur capacité à coaguler le lait à basse température.

Un exemple : la pepsine de roussette.

Les espèces dont les viscères pourraient faire l'objet d'une utilisation en industrie sont les poissons de la pêche côtière et plus particulièrement les Sélaciens, en raison de l'anatomie de leur tractus digestif qui facilite les prélèvements. La pepsine de roussette a été particulièrement étudiée à cet égard.

Activité protéolytique résiduelle (%)	Température (°C)							
	10	20	30	40	45	50	55	70
Pepsine de roussette	50	65	80	90	98	100	95	0
Chymosine de veau	20	38	50	70	80	97	100	10

TABL. 2. — Optimum thermique d'un extrait enzymatique de pepsine de roussette et de chymosine de veau.

Optimum thermique. — On remarque (tabl. 2) que même aux basses températures (10-20 °C), l'activité de la pepsine de roussette conserve un niveau élevé (plus de 50 % de l'activité maximale). En ce qui concerne la chymosine, aux mêmes températures, on n'atteint pas 40 % de cette activité maximale.

Niveaux d'activité. — Les niveaux d'activité enzymatique sont plus élevés dans les tissus provenant de poissons morts depuis plusieurs heures (tissus partiellement altérés) que dans les tissus provenant de poissons sacrifiés juste avant l'expérience (tissus frais) (tabl. 3 a et b). Les résultats d'une activation des extraits bruts par l'acide chlorhydrique diffèrent également pour les deux qualités de tissus étudiés. On observe dans les deux cas une augmentation importante de l'activité coagulante. Dans le cas de tissus partiellement

A	Act./ml		Prot. mg/ml	Act. spéc.		AC/AP
	A.C.	A.P.		A.C.	A.P.	
Extrait brut	9,8	39,7	30,50	0,3	1,3	0,25
Acidification	83,3	41,9	23,50	3,5	1,8	1,99

B	Act./ml		Prot. mg/ml	Act. spéc.		AC/AP
	A.C.	A.P.		A.C.	A.P.	
Extrait brut	125	90,36	23	5,43	3,9	1,38
Acidification	182	72,74	10,50	17,33	6,9	2,5

Act. : Activité ; Act. spéc. : Activité spécifique.

TABL. 3. — Influence du vieillissement des estomacs sur les niveaux d'activité enzymatique ; A) tissu provenant de poissons sacrifiés juste avant l'expérience ; B) tissu provenant de poissons morts depuis 24 heures.

altérés, l'activation des zymogènes de pepsine est réalisée par une catalyse enzymatique associée à l'action des sécrétions acides de la muqueuse stomacale. Ce processus prend tout son intérêt dans le contexte d'une utilisation industrielle des protéases extraites des viscères des poissons provenant des activités des pêches côtières ou hauturières.

Etude électrophorétique de l'hydrolyse de la caséine entière et de ses constituants.

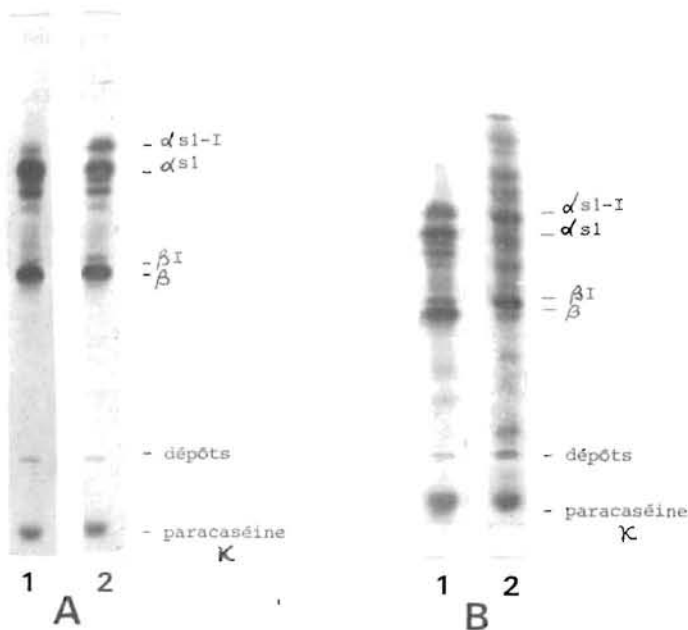


FIG. 2. — Electrophorèse en gel de polyacrylamide-agarose des produits de la réaction de protéolyse de la caséine entière par la présure (1) et par la pepsine de roussette (2). Les concentrations enzymatiques ont été ajustées sur le lait de manière à obtenir des temps de coagulation moyens (A) de 15 minutes (hydrolyse ménagée) et (B) de 50 secondes (hydrolyse drastique).

Les diagrammes d'hydrolyse des constituants de la caséine entière par la pepsine de roussette d'une part et par la chymosine d'autre part ont été étudiés (fig. 2). Deux concentrations enzymatiques ont été utilisées. La première correspond à des conditions d'hydrolyse ménagée des caséines (elle conduit à un temps moyen de coagulation du lait de 15 minutes) tandis que la seconde concentration enzymatique est supérieure, la coagulation du lait intervenant cette fois au bout de 50 secondes d'incubation.

Dans le premier cas, on observe que la caséine K est entièrement convertie en paracaséine K qui migre vers la cathode. L'action protéolytique de la pepsine de roussette vis-à-vis des caséines α s1 est plus marquée que celle de la présure puisqu'une fraction notable de cette dernière est dégradée en caséine α s1-I. La caséine β subit également une hydrolyse importante avec la production du composé β I bien différencié.

Dans le second cas, c'est-à-dire dans des conditions drastiques d'hydrolyse des

caséines, le diagramme électrophorétique obtenu avec la pepsine de roussette est très différent. La caséine α s1 est totalement dégradée et l'on observe l'apparition de composés de forte migration électrophorétique qui se rejoignent au niveau du front de migration. L'absence de coloration résiduelle de la fraction α s1 peut s'expliquer par sa dégradation totale en peptides de faible masse moléculaire non colorables par électrophorèse. La caséine β est également totalement dégradée en trois composés principaux qui migrent vers l'anode. Les produits de dégradation des caséines obtenus avec la présure sont comparables à ceux que l'on observe dans le premier cas lorsque la pepsine de roussette est utilisée.

L'action protéolytique de la pepsine de roussette à l'égard des divers constituants de la caséine est donc plus marquée que celle de la présure. La pepsine de roussette coupe la caséine K au niveau de la liaison Phe₁₀₅-Met₁₀₆, ce qui aboutit à la formation du macropeptide de paracaséine K mais elle agit également sur d'autres sites secondaires de fractions α s1 et β .

Conclusion.

Cet ensemble de résultats montre que des enzymes protéolytiques extraites des viscères de poissons et en particulier les pepsines de roussette possèdent des activités intéressantes au plan de l'hydrolyse des caséines, notamment de la fraction K. Cette hydrolyse constitue la phase primaire du processus de coagulation du lait. Cependant le caractère protéolytique plus marqué de la pepsine de roussette, comparé à celui de la chymosine conduit également à une apparition renforcée de produits de dégradation des autres fractions de caséine α s1 et β . Ce phénomène est susceptible d'engendrer au cours des phases ultérieures de maturation du caillé l'apparition de défauts de texture (par perte de matière protéique) et de flaveur ainsi qu'une diminution de rendement. Toutefois, la faible résistance thermique de la pepsine coagulante, comparativement à la chymosine d'une part et à certaines protéases fongiques d'autre part, peut permettre d'envisager une inactivation thermique des enzymes après formation du coagulum et prévenir ainsi les défauts précédemment signalés. Ces propriétés permettent donc d'envisager, sous certaines conditions, une utilisation de cette enzyme en industrie fromagère.

L'utilisation des enzymes protéolytiques de roussette pourrait ne pas se limiter au domaine fromager. Compte tenu de la valeur élevée de l'activité protéolytique, il serait envisageable de les utiliser dans la production de peptides spécifiques ou d'acides aminés destinés à l'alimentation du bétail ou à la consommation humaine. Les viscères des organismes marins représentent une source abondante de protéases, actuellement sous-exploitée. Elles pourraient intervenir, à faible coût, en remplacement de certaines protéases d'origine végétale, animale ou fongique.

Il reste à déterminer l'intérêt de promouvoir les méthodes d'extraction/purification parallèlement à l'introduction de systèmes issus du clonage des gènes. Les coûts de production du génie génétique sont très élevés et ne se justifient que par la production de molécules biologiques à très forte valeur ajoutée (hormones, enzymes...). De plus, les opérations de purification restent indispensables. Au cours des dix prochaines années, la voie extractive constituera, sans doute, la meilleure approche pour une production industrielle de ces substances. Les tentatives de valorisation des protéases extraites d'organismes marins s'inscrivent bien dans une telle perspective.

BIBLIOGRAPHIE

- DESMAZEAUD (J.M.), 1981. — Principales utilisations des enzymes en industrie laitière, aspects scientifiques et techniques. — *Industr. aliment. agric.*, **98** : 195-204.
- FOLTMANN (B.), 1970. — Prochymosin and chymosin (Prorennin and rennin). — *Methods in Enzymology*, **19** : 421-436.
- GRIPON (J.C.), DESMAZEAUD (J.M.), LE BARS (D.) et BERGÈRE (J.L.), 1975. — Etude du rôle des microorganismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II. Influence de la présure commerciale. — *Le Lait*, **548** : 502-516.
- GUÉRARD (F.) et LE GAL (Y.), 1986. — Sur l'activité coagulante d'une pepsine de la Roussette *Scyliorhinus canicula*. *C.R. Soc. Biol.*, **180** : 651-655.
- 1987. — Characterization of a chymosin-like pepsin from the dogfish *Scyliorhinus canicula*. — *Comp. Biochem. and Physiol.* **88** : 823-827.
- HAARD (N.E.), FELTHAM (L.A.W.), HELBIG (N.) et SQUIRES (E.J.), 1982. — Modification of proteins with proteolytic enzymes from the marine environment. — *Adv. Chem. Ser.*, **198** : 223-244.
- LE NOIR (J.), LAMBERET (G.), SCHMIDT (J.L.) et TOURNEUR (C.), 1985. — La maîtrise des bioréacteurs fromage. — *Biofutur*, **41** : 23-50.
- MARTIN (P.), 1984. — Influence du degré de phosphorylation de la pepsine A sur son activité enzymatique. — *Biochimie*, **66** : 371-384.
- RAMET (J.P.), 1984. — La présure et les enzymes coagulantes. — In, *Le Fromage*, A. Eck, ed. — Tec. et Doc. Lavoisier, Paris : 101-108.
- SWAISGOOD H.E., 1982. — Chemistry of milk protein. In *Developments in Dairy Chemistry. 1 - Proteins* : 1-60. — Ed. P.F. Fox. London : Appl. Sci. Publish.

Manuscrit soumis le 5-10-1987, accepté le 10-11-1987.