



UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE

Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du Diplôme de Master
Spécialité : Sciences Biologiques
Option : Biochimie Appliquée

Thème :

Synthèse bibliographique sur
Les enzymes coagulantes

Présenté par :

- ARAB Sarah
- IDRES Lisa

Promotrice : Mme ISSELNANE. S

Maitre assistante A (UMMTO)

Membres du jury :

Présidente : Mme SENANI. N

Maitre de conférences B (UMMTO)

Examinatrice : Mme BEDOUHENE.S

Maitre de conférences B (UMMTO)

Année Universitaire : 2020 – 2021

Remerciements

Avant tout, louange à Dieu le tout puissant qui nous a éclairé le chemin de la réussite et nous a donné le courage, la volonté, la santé et la force pour réaliser ce présent travail.

Nous remercions particulièrement Mme ISSELNANE-TAMACHE Souad, notre merveilleuse promotrice, pour avoir proposé et dirigé ce travail, pour ses conseils avisés, son aide précieuse, sa disponibilité et surtout sa patience avec nous.

Nous tenons à remercier également le personnel du laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) de l'université M. Mammeri de Tizi-Ouzou pour leurs aides, leurs conseils ainsi qu'à tous nos professeurs qui nous ont accompagnés durant tout notre cursus universitaire.

Nos grands remerciements sont adressés à nos familles et nos amis, qui sans leurs encouragements et soutien inconditionnel, ce travail n'aurait pas progressé. Que tous ceux et celles qui ont aidé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail, soient assurés de notre sincère reconnaissance et profonde gratitude,

MERCI

Dédicaces

*Du fond du cœur, je dédie ce modeste travail en signe de
reconnaissance et de respect :*

*A mes chers parents qui ont toujours été les étoiles de mon ciel et ont
illuminés mon chemin depuis ma naissance, je ne les remercierai jamais assez,
que Dieu tout puissant les bénisses et me les garde en bonne et parfaite santé ;*

A mes chers grands parents que dieu leur procure bonne santé et longue vie

A mon cher et unique frère

A mes chères sœurs ;

A tout(es) mes oncles, mes tantes, et mes cousin(es)

A toutes la famille ARAB

A la mémoire de mon cher Oncle bien aimé Rachid

Paix et tranquillité à son âme

A toutes mes amis (es)

A ma binôme et meilleure amie adorée Lisa ainsi qu'à toute sa famille.

A tous ceux qui mon aidé de près ou de loin.

Sarah

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail, comme preuve de respect,

de gratitude et de reconnaissance à :

*Mes chers parents, aucun hommage ne pourrait être à la hauteur
de l'amour dont ils ne cessent de me combler, que Dieu leur procure
bonne santé et longue vie.*

A mon cher et unique frère adoré

A ma sœur bien aimée

A tout la famille IDRES

A tous mes amis (es)

A mes deux meilleures amies Katia et Sarah (ma binôme)

bien adorées ainsi qu'à leurs familles

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin

Lisa

SOMMAIRE

Résumé	
Introduction générale.....	01
I. Généralités sur la présure	
1.1.Histoire de la présure.....	02
1.2.Définition d'une enzyme coagulante.....	03
1.3.Le marché et la production mondiale des coagulants	04
II .Enzymes coagulantes	
2.1. Différents types de coagulants enzymatiques	06
2.1.1. Coagulant d'origine animale.....	06
2.1.2. Coagulant d'origine végétale	12
2.1.3. Coagulant d'origine microbienne.....	15
2.1.4. Coagulant d'origine recombinant (FPC)	18
2. 2.Paramètres physicochimiques de la présure animale.....	22
2.3. L'extraction et purification des enzymes coagulantes	25
2.4. Structure des enzymes coagulantes	26
2.4.1. Structure primaire.....	26
2.4. 2. Structure secondaire et tertiaire.....	26
2.5. Site actif et mécanisme catalytique	29
2.5.1. Site actif.....	29
2.5.2. Mécanisme catalytique	30
III. L'application industrielle des enzymes coagulantes	
3.1. Vue d'ensemble sur les enzymes utilisées en industrie	35
3.2. L'application dans la filière laitière	36
Conclusion générale.....	37
Références	
Bibliographique.....	

Liste des tableaux

Tableau 01 : Exemples de protéases aspartiques de plantes qui coagulent le lait.....	14
Tableau 02 : Expression de chymosine dans différentes hôtes microbiennes.....	22
Tableau 03 : Paramètres physicochimiques de la présure animale.....	23
Tableau 04 : Paramètres cinétique de la catalyse de la K-caséine par la chymosine.....	24
Tableau 05 : Techniques d'extraction et purification des différents coagulants.....	25

Liste des figures

Figure 01 : Production mondiale de production mondiale des enzymes coagulantes (FAOSTAT)	5
Figure 02 : La chymosine bovine recombinante disponible sur le marché.....	19
Figure 03 : Représentation schématique des structures secondaires et tertiaires de la chymosine	27
Figure 04 : La "poignée du pompier" du côté actif de la chymosine	28
Figure 05 : Structure tridimensionnelle de la chymosine bovine.....	28
Figure 06 : Structure par rayon X de la pepsine porcine. Vue agrandie des résidus ASP du site actif avec la molécule d'eau qui est liée	29
Figure 07 : Exemples de quatre aspartyl-protéinases montrant la profondeur de la fente du site actif	30
Figure 08 : Représentation schématique du mécanisme catalytique des protéases aspartiques.....	31
Figure 09 : Structure tridimensionnelle de la zone du site actif de la pepsine porcine	33

Résumé

Depuis l'Antiquité, on utilise des extraits de caillètes de jeunes veaux, de chevreaux ou d'agneaux dans la fabrication du fromage. Parmi les coagulants les plus utilisés on trouve la présure de veau, qui contient principalement de la chymosine, qui est la principale enzyme de coagulation du lait à faible activité protéolytique appartenant au groupe de protéases aspartiques et des quantités faibles et variables de pepsine. Après une pénurie mondiale de caillète de jeunes veaux au milieu du 20^e siècle, différents substituts de présure ont été développés. Parmi celles-ci figuraient la présure de bovin adulte, un extrait dominé par la pepsine de la caillète de bovins adultes, différentes protéases d'origine fongique telles que celles de *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus*, *Cryphonectria parasitica*, et microbiens telles que *Bacillus licheniformis* Bl 312, *Bacillus amyloliquefaciens* GSBa-1, des coagulants végétaux tels que *C. cardunculus*, *Calotropis procera* et plus récemment, la chymosine produite par fermentation dans des micro-organismes modifiés via la technologie de l'ADN recombinant. En raison des coûts élevés de la présure bovine, les succédanés sont actuellement beaucoup utilisés au niveau des filières laitières pour la fabrication des dérivés de lait tels que les fromages et les yaourts.

Mots clés : présure, Chymosine, pepsine, Activité coagulante, Succédanés de présure, fromage.

Sammury

Since ancient times, extracts from the rennet of young calves, kids or lambs have been used in cheese making. Among the most commonly used coagulants is calf rennet, which contains mainly chymosin, the main milk coagulating enzyme with low proteolytic activity belonging to the aspartic protease group, and small and variable amounts of pepsin. After a worldwide shortage of rennet from young calves in the middle of the 20th century, various rennet substitutes were developed. These included adult bovine rennet, a pepsin-dominated extract from adult bovine abomasum, various proteases of fungal origin such as *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus*, *Cryphonectria parasitica*, and microbial such as *Bacillus licheniformis* Bl 312, *Bacillus amyloliquefaciens* GSBa-1, vegetable coagulants such as *C. cardunculus*, *Calotropis procera* and more recently, chymosin produced by fermentation in modified microorganisms via recombinant DNA technology. Due to the high cost of bovine rennet, substitutes are currently widely used in the dairy industry for the manufacture of milk derivatives such as cheese and yoghurt.

Key words: rennet, chymosine, pepsin, coagulant activity, rennet substitutes, cheese.

Introduction générale

La coagulation du lait est la principale étape de la fabrication du fromage et peut être réalisée par un certain nombre d'enzymes protéolytiques provenant de diverses sources, telles que différentes espèces animales, des protéinases microbiennes et des protéinases extraites de fruits et de plantes. La présure de veau reste l'enzyme la plus utilisée dans la fabrication du fromage. Cependant, l'augmentation de la consommation de fromage et la pénurie mondiale de présure de veau ont encouragé la recherche d'autres coagulants du lait.

La coagulation du lait par une enzyme caséinolytique est une étape cruciale dans la fabrication de la plupart des types de produits laitiers notamment le fromage. L'enzyme traditionnelle et la plus couramment utilisée dans l'industrie laitière à cette fin est la présure de veau, dérivée du quatrième estomac d'un jeune veau.

Cependant, en raison de l'augmentation continue de la consommation mondiale de produits dérivés de lait, la présure de veau n'est pas en mesure de répondre aux demandes croissantes de la production de produits laitiers.

Cette pénurie mondiale a fait que différents succédanés de présure ont été développés parmi ceux les coagulants d'origine végétale, microbienne ou encore la plus récente la chymosine produite par fermentation (FPC).

L'étape initiale de la fabrication de la plupart des variétés de fromage implique l'hydrolyse enzymatique de l'une des protéines du lait, la κ -caséine sous l'action de la présure. Au cours de la phase primaire, la κ -caséine est clivée par la présure au niveau de la liaison Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶,

Dans notre étude, nous allons développer les différentes présures qui se trouvent actuellement sur le marché issues de divers origines et leur utilisation au niveau des filaires laitières.

I. Généralités sur la présure

1.1. Historique sur la présure

En Mésopotamie, 7000 ans av .J.-C (peut être 12000 ans selon les récentes découvertes), le premier homme devenu fromager transportait du lait dans une vessie de ruminant pour office de sac, qui sous l'effet du temps et de la chaleur gélifia. L'abomasum, véritable estomac, contient naturellement deux types d'enzymes, la chymosine (du grec *khumós*, qui signifie jus ou humeur) et la pepsine (du grec *pepsis* qui signifie digérer), responsables de la gélification du lait (ROSET, 2019).

Les civilisations grecques et romaines mentionnent à travers différents écrits la notion de fromages. Ces écrits rapportent le procédé de fabrication de fromages avec l'utilisation d'une présure d'origine animale, de veau ou de chèvre, mais aussi d'origine végétale comme le chardon.

C'est vers 1 000 ans apr. J.-C. que l'on peut situer les débuts de la production fromagère et de sa commercialisation (Kindstedt, 2012). En Europe, l'art artisanal fromager et le transfert de la connaissance se développent probablement au XIe siècle dans des monastères, où des noms de fromages, aujourd'hui mondialement connus, furent créés comme l'Emmental, le Gouda, l'Edam ou encore des fromages dits « bleus » comme le Roquefort.

Face à l'empirisme, la science participe de plus en plus, à partir de 1800, à la connaissance des mécanismes microbiologiques, chimiques et immunologiques par le traitement de sujets pharmacologiques et agricoles (Pasteur, Metchnikov, Liebig...).

En 1840, en France, le pharmacien Deschamps décrit les propriétés enzymatiques de la présure et participe ainsi à la renaissance du terme chymosine, principe actif provenant de la caillette de veau.

Face à l'instabilité de l'utilisation de caillettes de veau destinées à la préparation de présures, c'est en 1874 que Christian Ditlev Ammentorp Hansen initie les débuts de la standardisation des présures animales et le début de son industrialisation.

La présure (EC 3.4.23.4), une protéase aspartique, est l'enzyme clé utilisée dans le processus de production du fromage. La présure joue un rôle important pendant la maturation

du fromage, qui est un processus vital et complexe pour le développement équilibré de la saveur et de la texture (Law *et al*, 2010).

La présure de veau a été la première qui contient de la chymosine comme principal composant enzymatique. Elle a été la préparation enzymatique de coagulation du lait la plus largement utilisée. (Law *et al*, 2010).

1.2. Enzymes coagulantes

Une enzyme est une substance organique produite par des cellules vivantes. Elle agit comme catalyseur dans une réaction chimique et est constituée de polypeptides ((PALASHOFF et MELISSA, 2008).

Les coagulants identifiés appartiennent à une famille appelée protéase aspartique (EC 3.4.23), et endopeptidases à cystéines (EC 3.4.22). Celles qui nous concernent le plus sont : la pepsine A (EC 3.4.23.1) et B (EC 3.4.23.3), la chymosine (EC 3.4.23.4), la mucorpepsine (EC 3.4.23.23) ou encore endothiapepsine (EC 3.4.23.22) (PALASHOFF et MELISSA, 2008).

Une enzyme coagulante destinée à la production fromagère possède la propriété d'hydrolyser les caséines laitières. La coagulation repose sur le clivage spécifique de la caséine Kappa, la liaison Phe (105) et Met (106). Dans une autre mesure, une enzyme coagulante participe plus ou moins au clivage des caséines β et α S1 (CREAMER, 1971 ; KAMINOGAWA *et al*, 1975).

Le terme de présure est réservé en France à la présure animale. C'est l'agent coagulant traditionnel par excellence, utilisé depuis la nuit des temps pour la fabrication de fromages. La présure est extraite de la caillette, quatrième poche de l'estomac de jeunes bovidés préruminants. Elle est constituée de deux enzymes principales, la chymosine et la pepsine, dont la proportion varie selon l'âge de l'animal. Pour être plus précis, trois iso-enzymes A, B et C ont été identifiées pour la chymosine, et six pour la pepsine. Leur rôle spécifique n'est pas encore bien déterminé. Il en est de même des systèmes enzymatiques mineurs (gastricines) trouvés dans l'estomac de bovins adultes, et dont l'effet sur les protéines du lait n'a pas encore été totalement défini (RAMPILI *et al*, 1992).

La pepsine présente la spécificité de cliver des liaisons peptidiques de résidus d'acides aminés hydrophobes, de préférence aromatiques (AGUDELO *et al*, 2004 ; Gregory ROSET,

2019). Les enzymes dites d'origine microbienne (mucorpepsine et endothiapepsine) sont similaires, dans leur qualité d'hydrolyse, à la pepsine animale.

Pour l'homme, le choix ainsi que la qualité de production de l'enzyme coagulante employée seront déterminants sur l'ensemble des qualités fonctionnelles fromagères. Pour cela Les enzymes coagulantes doivent répondre à un certain nombre de conditions (AGUDELO *et al*, 2004) :

- Toxicité nulle ;
- Pureté chimique et qualité microbiologique élevées ;
- Activité protéolytique faible comparativement à l'activité coagulante ;
- Comportement voisin de celui de la présure vis-à-vis de la température, du pH, des ions calcium.

D'un point de vue technologique, ces enzymes doivent :

- Avoir une bonne activité coagulante dans les conditions habituelles de la fromagerie
- Donner au caillé des propriétés rhéologiques permettant de les travailler normalement, dans les délais habituels
- Donner un rendement fromager identique à celui de la présure

1.3. Le marché et la production mondiale d'enzymes coagulantes

Le marché mondial des coagulants est couvert par quatre principaux fabricants industriels : Chr. Hansen (Danemark), D.S.M. (Pays-Bas), Dupont (États-Unis) avec sa filiale française Danisco, et C.S.K. (Pays-Bas) (à noter en France, la fabrication de présures animales par les Laboratoires Abia).

La production mondiale de coagulants, toutes familles confondues, suit logiquement l'augmentation de la production mondiale de fromages. Selon (FAOSTAT, 2018) La production des coagulants atteint aujourd'hui 22 millions de tonnes avec une progression annuelle de 2 %.

S'il est difficile de trouver des données précises et officielles, en regroupant différentes sources économiques et autres publications, il est estimé que les coagulants FPC (Fermented Produced Chymosin), obtenus à partir de chymosine recombinée sont les

plus utilisés actuellement mondialement (FAOSTAT, 2018) et représentent un niveau d'utilisation de 60 % (figure 1). Ce type de coagulant répond actuellement aux demandes industrielles (continent américain, Europe et Europe centrale). Le reste du marché se partage de manière équivalente entre les coagulants d'origine animale et microbienne. La part de coagulant d'origine végétale, quant à elle, est extrêmement limitée (Amérique du sud, Espagne, Grèce...).

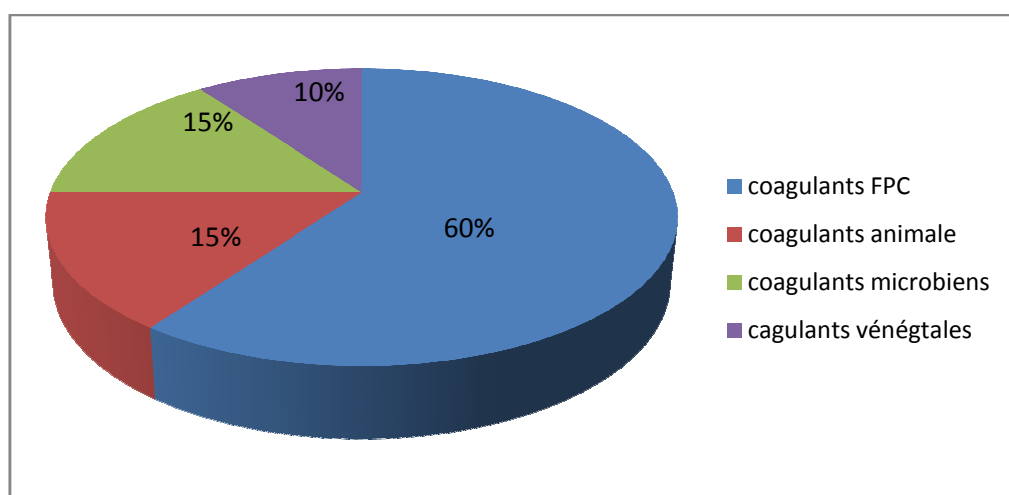


Figure 1 : production mondiale des enzymes coagulantes (FAOSTAT, 2018).

La part de l'utilisation des coagulants d'origine animale est en lente et constante diminution. Ils sont cependant toujours liés à la production des fromages AOC/AOP artisanaux, pour des raisons historiques et culturelles. Ces coagulants sont utilisés principalement en Europe (France, Italie et Suisse) et en Russie. À l'inverse, les coagulants d'origine microbienne (indépendamment de leurs qualités fromagères comparativement aux FPC et coagulants d'origine animale) répondent à de plus amples législations et à des marchés spécifiques comme ceux de la Corée du sud (ROSET, 2019).

I. Les enzymes coagulantes

2.1. Les différents types de coagulants enzymatiques

A nos jours, l'évolution de la consommation mondiale de fromage a nécessité le développement de coagulants de plus en plus spécifiques, afin de répondre à des demandes industrielles adaptées aux différents marchés, aux réglementations, à l'amélioration des qualités de tranchage, ainsi qu'au rendement fromager et à la qualité des lactosérums. Il existe sur le marché quatre origines différentes de coagulants : animale, végétale, microbienne et la plus récente issue de fermentation à partir de micro-organismes intégrant de l'ADN d'origine animale, nommée FPC (Fermented Produced Chymosin) (ROSET, 2019).

2.1.1. Coagulant d'origine animale

Les coagulants d'origine animale résultent d'une macération de l'estomac de ruminants ou encore de monogastriques. La principale production est issue plus précisément de la caillette de ruminants, principalement de veaux, de chevreaux, d'agneaux ou encore de bovins (Abreuve Da Silva, 2004).

2.1.1.1. La présure

La présure est largement utilisée dans le processus de fabrication du fromage depuis l'Antiquité, et la principale source connue de présure était la caillette de l'estomac des ruminants ou le quatrième estomac des veaux allaités. Les deux sources contiennent de la pepsine (EC 3.4.23.1) et de la chymosine (EC 3.4.23.4) comme principal composant enzymatique (Devilee et cornelisse, 1996).

La qualité intrinsèque d'un coagulant animal, ainsi que sa teneur en chymosine et ses variantes (A, B et C), sont liés à son mode d'extraction (macération rapide ou lente), ainsi qu'à l'âge de l'animal et à son alimentation. Le variant A de la chymosine possède une plus grande activité enzymatique. Le variant B, ayant un poids moléculaire similaire à celui du variant A (respectivement 35,65 kDa et 35,71 kDa), diffère seulement par sa composition. Quant au variant C, celui-ci est présent en très faible quantité dans les présures commerciales, il résulte de la dégradation du variant de la chymosine A (Uniacke-Lowe *et al*, 2017).

Ces protéases sont synthétisées par les cellules principales de la glande fundique de la caillette (BANGA-MBOKOH, 2000 ; SIDIKOU *et al*, 2005) sous forme de précurseurs

inactifs ou zymogènes : pepsinogène, progastricsine et prochymosine (KHAN et JAMES, 1998).

Comparé à l'enzyme actif, le zymogène possède un segment peptidique supplémentaire lié à la partie N-terminal de l'enzyme actif nommé « pro-segment » qui sert à bloquer le site actif et empêcher l'entrée du substrat dans ce site et stabiliser ainsi la forme inactive (JENSEN *et al*, 2013). En plus de son rôle inhibiteur, le pro-segment est souvent important pour le repliement et la stabilité du zymogène (KHAN et JAMES, 1998).

Ces zymogènes sont stables à pH neutre mais sont convertis en enzymes actives à des pH acides (RICHTER *et al*, 1998). Lors de l'ingestion de nourriture, chacun d'eux est libéré dans la lumière gastrique et subit une conversion en enzyme active, dans le suc gastrique acide, par un mécanisme auto-catalytique qui est déclenché suite à la perturbation des interactions électrostatiques entre la fraction d'enzyme active et le pro-segment conduisant à la dissociation de celui-ci et le dévoilement du site actif (KHAN et JAMES, 1998).

Cette réaction d'activation est un processus complexe, impliquant une série de changements conformationnels et un clivage protéolytique du pro-segment qui peut se produire en une ou plusieurs étapes par une réaction intra- ou inter moléculaire (RICHTER *et al*, 1998).

2.1.1.1.1. La chymosine

La chymosine anciennement connue sous le nom de "rennine" et à ne pas confondre avec la rénine, EC 3.4.23.4, (une enzyme du rein) est commercialement importante pour la fabrication du fromage, un processus qui remonte à ~6000-7000 avant JC lorsque la domestication généralisée des moutons et des chèvres étaient présentes dans tout le Croissant fertile, bien qu'au départ, les animaux aient probablement été élevés pour la production de viande et non de lait, car l'intolérance au lactose des adultes était presque universelle (Kindstedt, 2012).

La chymosine est produite *in utero* dans la muqueuse de la caillette des fœtus de mammifères (Foltmann, 1970). Les chymosines (EC 3.4.23.4) peuvent être caractérisées comme gastriques fœtale ou néonatale de mammifères protéinases appartenant au groupe des protéases aspartique (EC 3.4.23.) (Szecsi *et al*, 2013).

La chymosine est sécrétée sous forme de son zymogène, la prochymosine, qui est activée de manière autocatalytique lors de l'acidification à pH 2-4 par élimination d'un peptide de 44 résidus de l'extrémité N-terminale du zymogène.

La chymosine a une activité élevée de coagulation du lait mais une faible activité protéolytique générale et a ainsi évolué pour éviter la protéolyse et l'inactivation des immunoglobulines dans le colostrum (Foltmann et Axelsen, 1981).

La chymosine de veau est exprimée sous trois variantes génétiques A, B, C. La chymosine A (masse moléculaire 35,71 kDa) et la chymosine B (masse moléculaire 35,65 kDa) ne diffèrent que par l'acide aminé en position 254, qui est respectivement l'asparagine ou la glycine (Kumar *et al*, 2010). La chymosine A a une activité enzymatique plus élevée mais subit une dégradation autocatalytique. La troisième forme allélique, la chymosine C, a été distinguée d'un produit de dégradation de la chymosine A par (Rampilli *et al*, 2005) et il a été démontré qu'il présente une activité de coagulation du lait plus élevée. La rareté du gène est cependant responsable de la faible teneur en chymosilane C de la présure commerciale (Uniacke-Lowe *et al*, 2017).

La chymosine de veau est bien caractérisée aux niveaux moléculaire et enzymatique ; la littérature abondante a fait l'objet de plusieurs revues, dont (Chitpintyol et Crabbe, 1998; Crabbe, 2004 ; Jacob *et al*, 2011 ; Szecsi et Harboe, 2013 et Yegin et Dekker, 2013). L'enzyme a été cristallisée par Bunn *et al* (1971).

L'électrophorèse aux limites libres a montré que certaines préparations cristallines précoces n'étaient pas homogènes (Ernstrom, 1958). L'hétérogénéité n'a pas été expliquée mais peut être due à des isoenzymes ou à une enzyme inactivée ou à d'autres protéines. La chymosine de veau est un polypeptide à chaîne unique contenant 323 résidus d'acides aminés avec une masse moléculaire de 35 600 Da (Uniacke-Lowe *et al*, 2017).

La chymosine, dans son action initiale, clive protéolytiquement et inactive la *k*-caséine en la transformant en para-*k*-caséine insoluble et en peptides plus petits solubles dans le TCA, appelés macro peptides. Ensuite, dans l'action suivante, la para-*k*-caséine entraîne la formation du caillé en raison de la formation d'un précipité de caséines insolubles dans le calcium à une température supérieure à 20°C (Fox, 1988). En l'absence de calcium, la fraction insoluble de para-*k*-caséine interagit avec les caséines sensibles au calcium pour empêcher la

précipitation. Par contre, en présence de calcium, la caséine sensible au calcium ainsi que la para-*k*-caséine insoluble forment un caillot (Fox, 1988).

Plusieurs chercheurs ont démontré que la *k*-caséine est le substrat primaire pour l'action de la chymosine (Vega-Hernandez *et al*, 2004). Cependant, les fractions α_1 et β -caséine sont également dégradées (Gustchina *et al*, 1996).

Visser *et al* (1980) ont suggéré que la réaction hydrolytique est soutenue par d'autres résidus proches de la liaison clivée. Des études cinétiques sur des peptides synthétiques ont suggéré que les deux résidus supplémentaires de part et d'autre de la liaison hydrolysable sont essentiels pour une réaction significative (Raymond *et al*, 1972). Les résidus modifiés dans la liaison sensible de la chymosine entre les espèces suggèrent que la séquence d'acides aminés, contenant les déterminants importants de l'hydrolyse, entoure cette liaison plutôt que les résidus dans la liaison elle-même (Fox et McSweeney, 1997).

Les différents facteurs tels que le pH, la température, la force ionique, la concentration enzymatique et les sels influencent le processus de coagulation du lait (Bringe et Kinsella, 1986 ; Kumar, 2010). Un pH élevé (6,6-6,7) réduit le temps de coagulation et la fermeté du caillé, tandis qu'un pH faible (3-4) diminue le rendement du caillé en raison d'une activité hydrolytique élevée (Okigbo *et al*, 1985).

La source de la chymosine et du lait, ainsi que les différences entre les constituants du lait et le processus de prétraitement peuvent affecter la vitesse du stade initial de la coagulation (Foltmann, 1992). La coagulation du lait est également influencée positivement par la concentration en ions calcium (Berridge, 1954) ; cependant, les ions strontium, magnésium et baryum peuvent également contribuer positivement au processus de coagulation du lait (kumar *et al*, 2010)

2.1.1.1.2. Pepsine

La pepsine comprend le groupe principal de protéases acides de l'estomac des animaux à sang chaud. La pepsine hydrolyse les liaisons N- et C-terminales, mais clive également les dipeptides synthétiques tels que Glu-Tyr ou Phe-Phe avec moins d'efficacité (Júnior *et al*, 2015 ; RC *et al*, 2021).

La pepsine clive les liaisons peptidiques du côté amino-terminal des résidus d'acides aminés cycliques (tyrosine, phénylalanine et tryptophane), brisant les chaînes polypeptidiques en peptides plus petits (Fange et Grove, 1979).

Cette enzyme est responsable de l'hydrolyse initiale et partielle des protéines dans l'estomac à l'aide de l'acide chlorhydrique sécrété ; le processus est complété par une action combinée de la trypsine et de la chymotrypsine dans l'intestin (Sabapathy et Teo, 1993). La pepsine est active à pH acide comme celui de la partie gastrique et peut hydrolyser plusieurs protéines, à l'exception des mucines, des spongines, de la conchioline, de la kératine ou des peptides de bas poids moléculaire (Sumner et Somers, 1947 ; Fange et Grove, 1979).

La forme inactive de la pepsine, le pepsinogène, est activée au contact du suc gastrique (Guillaume et Choubert, 2001 cité par Gilberto Moraes *et al*, 2020). Cette enzyme présente une activité de coagulation du lait en ayant une spécificité sur la liaison Phe105-Met106 de la κ -caséine. Cependant, une activité non spécifique élevée provoque des changements indésirables dans le goût et l'arôme des fromages frais pendant le stockage (Andrén *et al*, 2011 ; TangPepsin *et al*, 2013 ; Júnior *et al*, 2015 cité par RC *et al*, 2021).

Foltmann et Pedersen (1977) ont proposé une classification des pepsines et des enzymes de type pepsine basée sur leur pH optimal sur des substrats spécifiques. Martin *et al* (1980) ont rapporté un système de classification amélioré pour ces enzymes basé sur le rapport k_{cat} / K_m obtenu lorsqu'un hexapeptide synthétique, Leu-Ser-Phe(NO₂)-Nle-Ala-Leu-OMe, était utilisé comme substrat. Les enzymes de classe I étaient celles avec un $k_{cat} / K_m > 100 \text{ mM/s}$ et comprenaient les pepsines porcines et bovines et la gastricine bovine, tandis que les enzymes de classe II avaient un $k_{cat} / K_m < 100 \text{ mM/s}$ et comprenaient la chymosine et les protéinases de *Rhizomucor miehei* et *Rhizomucor pusillus* (Uniacke-Lowe *et al*, 2017).

Des études sur la recherche de succédanées de présure bovine intéressent plusieurs chercheurs partout dans le monde. C'est le cas des enzymes coagulantes extraites des ovins.

Mezina *et al* (2001) ont réalisé une étude comparative entre la chymosine ovine transgénique et celle de la chymosine de veau. Les résultats obtenus ont montré que l'activité de coagulation de la chymosine de mouton transgénique et de la chymosine de veau sont du même ordre de plus la stabilité maximale de la chymosine de mouton transgénique et de la chymosine de veau est observée dans l'intervalle de pH de 2,0 à 6,0. L'incubation des enzymes

à 37°C pendant 24 et 48 heures entraîne une perte substantielle de l'activité enzymatique à pH 3,6 et 7,0. Ces résultats coïncident avec les données de la littérature pour la chymosine de veau (FOLTMANN, 1966) cité par (Mezina *et al*, 2001).L'inactivation de la chymosine à pH 3,5 est probablement due à l'autolyse, puisque ce pH est le plus favorable à la digestion des substrats protéiques par la chymosine.

Selon les données de l'électrophorèse obtenues par (Mezina *et al*, 2001) dans des conditions non dénaturantes et dénaturantes, des résultats de la détermination de la masse moléculaire, de la composition en acides aminés et de la séquence N-terminale, et de l'étude de la stabilité à différentes valeurs de pH et des caractéristiques de l'hydrolyse des substrats protéiques, il est conclu que l'enzyme coagulante l isolée du lait de moutons transgéniques est identique à la chymosine de veau(Foltmann, 1966).

Pour ce qui est des enzymes coagulantes issues des camelins, des études ont été réalisées,selon Kappeler *et al* (2006) et Bornaz *et al* (2009), Contrairement au lait d'autres animaux laitiers, l'obtention d'une gélification satisfaisante du lait de chamelle induite par la présure serait difficile lors de l'utilisation de la chymosine bovine, ceci s'explique par des différences dans la composition de la caséine (CN), la teneur totale en solides (Kappeler *et al*, 2006 ; Bornaz *et al*, 2009),la concentration de calcium et de phosphore ainsi que la taille des micelles de caséine (Bornaz *et al*, 2009).La proportion relative d'espèces de caséine individuelles (c'est-à-dire le rapport inférieur de lower-CN à β -CN) dans le lait de chamelle est supposée être une raison majeure des différences observées dans la coagulation (Wangoh *et al*, 1993;Kappeler, Farah et Puhan, 1998; Ramet, 2001; Boudjenah *et al*, 2012)

Des performances améliorées de la chymosine de chamelle par rapport à la chymosine bovine dans la fabrication de fromage à partir de lait de vache ont été trouvées (Bansal *et al*, 2009 ; Langholm Jensen *et al*, 2013). La coagulation, la fermeté du caillé et la synérèse sont affectées par un certain nombre de facteurs tels que la quantité de κ -CN, le pH, la température et l'équilibre minéral (Nejera *et al*, 2003 ; Philippe *et al*, 2005;Bornaz *et al*, 2009).L'agrégation de caséine est également déterminée par les charges sur la caséine (Walstra, Wouters, & Geurts, 2005) et cela peut être manipulé par l'acidification du lait (Ramet, 2001 ; Nejera *et al*, 2003 ; Boudjenah-Haroun *et al*, 2012).

La dépendance de la gélification du lait de chamelle sur la température de gélification et le pH a déjà été rapportée par (Saliha *et al*, 2011 ; Boudjenah-Haroun *et al*, 2012). La dépendance de l'activité de coagulation du lait à l'origine de l'enzyme a également été

démontrée (Wangoh *et al*, 1993 ; Ramet, 2001 ;Boudjenah-Haroun *et al*, 2012).La chymosine de chamelle présente une activité de coagulation plus élevée (Kappeler *et al*, 2006) et un temps de coagulation amélioré avec l'augmentation de la température de gélification lorsqu'elle est utilisée dans le lait de chamelle. Par conséquent, il est impératif de tester différents niveaux de chymosine de chamelle sur le lait de chamelle (Konuspayeva, Camier, Gaucheron et Faye, 2013).

Selon Hailu *et al* (2016) Les effets de la température, du pH, de la concentration de chymosine de chamelle et de l'ajout de CaCl_2 sur l'hydrolyse de la κ -caséine (κ -CN) et la cinétique de coagulation du lait de chamelle ont été étudiés. Le taux d'hydrolyse du κ -CN était plus élevé à 40 °C qu'à 30 °C et avec l'augmentation de l'ajout de chymosine et la diminution du pH. La gélification du lait a été initiée à des niveaux d'hydrolyse du κ -CN cameline avec un taux > 95 %.

Le temps de gélification du lait de chamelle était significativement réduit de 717 à 526 s) à 30 °C lorsque la concentration de chymosine était augmentée, mais était indépendant de la concentration de chymosine à 40 °C. La réduction du pH a également réduit le temps de formation de caillé. La fermeté du gel a augmenté à 40 °C (58 Pa) par rapport à 30 °C (44 Pa) et l'effet d'addition du CaCl_2 sur les propriétés de gélification du lait camelin s'est avérée dépendante du pH; une amélioration significative n'a été trouvée qu'à pH 6,3. Cela explique que cette chymosine cameline donne de bon résultats concernant son utilisation a la place de la chymosine bovine dans la fabrication de dérivés du lait camelin (Hailu *et al*, 2016).

2.1.2 Coagulant d'origine végétale

Les protéases aspartiques (PA) sont présentes dans de nombreuses variétés d'espèces végétales (tableau I). Elles sont impliquées dans la dégradation des protéines au cours du processus de développement de la plante, dans les mécanismes de stockage des protéines, dans les réponses au stress et aux pathogènes, et dans la sénescence des plantes (González *et al*, 2011). Ces enzymes possèdent deux résidus aspartiques responsables de l'activité catalytique, dont la spécificité d'action est préférée pour le clivage des liaisons peptidiques entre les résidus d'acides aminés hydrophobes (Domingos *et al*, 2000).

La plupart de ces enzymes sont des protéines hétérodimériques avec une grande sous-unité de 28-35 kDa et une petite sous-unité de 11-16 kDa, et seulement un très petit nombre

de protéines monomères avec une masse moléculaire de 36-65 kDa (Amal Ben Amira *et al*, 2017).

Plusieurs extraits et jus de plantes peuvent être utilisés comme alternative potentielle à la présure animale utilisée dans l'industrie laitière. Les extraits de plantes peuvent être utilisés comme source peu coûteuse et végétale de peptidase pour la coagulation du lait, car presque toutes les sortes de cellules végétales contiennent des peptidases impliquées dans le processus de développement de dégradation des toxiques, la signalisation, le stockage des protéines, la réponse au stress, la différenciation des plantes, contre le pathogène. invasion, etc. Kumar *et al* (2020) et Liburdi *et al* (2019) ont conclu que la forte activité protéolytique de certains extraits de plantes peut affecter négativement la forte activité protéolytique.

Chaque échantillon de lait doit être optimisé pour chaque extrait végétal quelle que soit l'espèce animale (Liburdi *et al*, 2019). La spécificité, la tendance à la coagulation, l'efficacité, la qualité, le rendement du produit, l'évaluation sensorielle/organoleptique et d'autres paramètres de qualité des peptidases végétales sont largement étudiés et prouvés pour la production de fromage de qualité à faible coût (Valdés *Et al*, 2015 ; Godifey, 2015 ; Benkahoul *et al*, 2016 ; Bueno-Gavilá *et al*, 2019 ; Wang, 2020).

Freitas *et al* (2016) ont étudié le schéma d'hydrolyse de la peptidase obtenue à partir de *Calotropis procera* et *Calotropis grandiflora* et ont signalé sa similitude avec la chymosine commerciale avec un rendement significativement bon.

L'escalade rapide de l'intérêt envers ces peptidases végétales se manifeste par leur efficacité, leur polyvalence, leur spécificité (Oliveira, 2019). Stabilité sur de larges températures, pH et temps de réaction. En outre, ces peptides sont écologiques, rentables, facilement disponibles et ne présentent aucun obstacle aux croyances religieuses. Ces peptidases végétales brutes et purifiées ont présenté un schéma de gélification similaire à celui de la chymosine commerciale ou de la présure de veau. La gélification du lait forme un réseau de gel tridimensionnel en raison de l'agrégation des micelles de la paracaséine (Kumar *et al*, 2010).

La gélification ou le caillage se produit en deux phases; dans la phase initiale, l'hydrolyse de la caséine κ (caséine kappa) C-terminale se produit en raison de l'hydrolyse enzymatique due à la rupture de la liaison Phe105-Met106 (Swaigood, 1974) qui conduit à la formation de parties hydrophobes et hydrophiles au sein des protéines ; la paracaséine forme

un noyau hydrophobe tandis que le caséinomacropeptide (CMP) devient hydrophile et est ensuite libéré dans le lactosérum ou le sérum de lait.

Après la séparation des macropeptides de caséine (CPM), en raison de la diminution de la charge des particules, la déstabilisation stérique se produit. Cette dernière initie la deuxième phase de gélification du lait. Des interactions électrostatiques entre ces micelles déstabilisées se produisent, ce qui provoque l'agrégation des micelles de caséine dans un réseau de gel de lait tridimensionnel stable (Kumar *et al*, 2010).

Tableau 1 : Exemples de protéases aspartiques de plantes qui coagulent le lait (Ben Amira *et al*, 2017).

plantes	Organe		Enzyme	
		Type	Dénomination	Variante
Cynara cardunculus	fleurs	Protéases aspartiques	Cardosin	Cardosin A Q9XFX3/
				AJ132884Cardosin B Q9XFX4/AJ237674 Cardosin C/Cardosin D Cardosin E/P85 136 Cardosin F/P85137 Cardosin G/P85138 Cardosin H/P85139
Cynara scolymus	Fleurs	Protéases aspartiques	Cynarase	Cynarase (A, B, C)
Cynarahumilis	Fleurs	Protéases aspartiques	Cardosin A like	–
Silybum marianum	Fleurs	Protéases aspartiques	Extrait enzymatique	–
Oryza sativa	Graines	Protéases aspartiques	Oryzasin	1
Moringa oleifera	Fleurs	Protéases aspartiques	Extrait enzymatique	–
Onopordum acanthium	Fleurs	Protéases aspartiques	Onopordosin	

Les coagulants végétaux en général, ne sont pas considérés comme étant très adéquats pour la production fromagère en raison du faible rendement et de la qualité inférieure du produit obtenu. Columelle (2004), mentionne l'utilisation de fleurs de chardons sauvages (probablement *Cynara cardunculus*), de graines de *Carthamus tinctorius* (une autre fleur ressemblant à des chardons), ou de sève de figuiers pour coaguler le lait de petits ruminants (Fox et McSweeney, 2004). Remarquablement, au Portugal et dans certaines régions d'Espagne, l'utilisation d'extraits de fleurs séchées de *C. cardunculus L.* a été maintenu avec

succès depuis ces temps anciens pour la production de nombreuses variétés traditionnelles de fromages de brebis et de chèvre, renforçant encore l'aptitude de cette présure pour la production de fromages de haute qualité (Reis et Malcata, 2011; Roseiro *et al*, 2003 ;Sousa et Malcata, 2002).Par conséquent, au cours des dernières décennies, de nombreux efforts ont été déployés pour comprendre les propriétés de ce coagulant végétal unique.

Plusieurs auteurs ont consacré leurs efforts de recherche à caractériser les enzymes de coagulation du lait présentes dans les fleurs de chardon, leur rôle dans l'hydrolyse des caséines *in vitro* et leur effet dans le processus de protéolyse au cours de la maturation (Esteves *et al*, 2001 ; Esteves *et al*, 2003 ; Roseiro *et al*, 2003a, 2003b ; Silva *et al*, 2003, 2005).Le succès des coagulants de *Cynara sp.* Est probablement dû aux caractéristiques uniques et spécifiques de ces enzymes. Les enzymes de *Cynara cardunculus L.* et *Cynara humilis L.* ressemblent à la chymosine par plusieurs aspects. *C. cardunculus L.* hydrolyse spécifiquement la liaison Phe105-Met106 de la caséine κ . Le K_m de la réaction est plus faible que pour la chymosine mais une activité catalytique similaire (k_{cat}/K_m) est obtenue pour les deux enzymes (MACEDO *et al*, 1993).Le coagulant de *C. cardunculus L.* contient deux protéases à acide aspartique dénommées cardosine A et cardosine B, cette dernière ayant une action protéolytique plus marquée, utilisant un peptide synthétique comme substrat (Almeida et Simões, 2018).

VERISSIMO *et al* (1995) ont montré que les valeurs des paramètres cinétiques obtenues pour la cardosine A étaient similaires à celles obtenues avec la chymosine et que celles de la cardosine B étaient similaires à celles obtenues avec la pepsine. Chez *C. humilis*, l'unique enzyme qui a été découverte est une « cardosine A like ».

L'utilisation de coagulants de plantes reste toutefois restreinte si nous la comparons avec celle des coagulants d'origines microbienne et animale. Elle se limite à certaines régions géographiques où les coagulants issus de plantes sont utilisés pour la fabrication de fromages traditionnels. (Almeida & Simões, 2018).

2.1.3. Coagulant d'origine microbienne

Les enzymes microbiennes sont des protéases aspartiques qui catalysent la coagulation du lait. Bien qu'il existe certaines lacunes par rapport à la présure traditionnelle de veau, la présure microbienne a été acceptée sur les marchés de plusieurs pays. Aux États-Unis seulement, environ 60 % du fromage est fabriqué à partir d'enzymes fongiques (Hashem,

2000). De nombreux micro-organismes qui produisent des enzymes coagulantes, à savoir *Rhizomucor miehei*, *Aspergillus oryzae*, *Enthothia parasitica* et *Aspergillus flavo furcatis*, sont largement utilisés (He *et al*, 2011 ; Li *et al*, 2012 ; Alecrim *et al*, 2015).

2.1.3.1. Coagulant bactérien

Dans le cas de *Mucor sp* aucun des rapports disponibles n'indique que l'utilisation de l'enzyme dans la fabrication du fromage est dangereuse (Tubesha et Delaimy, 2003).

Bacillus sp. Est l'un des groupes microbiens les plus étudiés, car ils peuvent produire des variétés de substances biotechnologiques intéressantes. La capacité des souches de *Bacillus* à produire et à sécréter de grandes quantités d'enzymes extracellulaires, notamment l'amylase, la protéase et les cellulases, les a amenées à figurer parmi les plus importants producteurs industriels d'enzymes.

Il est bien connu que la production d'enzymes microbiennes est fortement influencée par de nombreux facteurs, en particulier la composition du milieu et les conditions de culture. Par conséquent, les travaux sur l'optimisation des paramètres de l'enzyme coagulante sont menés en utilisant la technique «un facteur à la fois» pour avoir une activité coagulante élevée avec une activité protéolytique limitée (Tubesha et Delaimy, 2003).

Les coagulants d'origine microbienne sont des enzymes protéolytiques produites par des micro-organismes capables d'induire la coagulation du lait de manière similaire aux coagulants d'origine animale. Un grand nombre de champignons secrètent des protéases à acide aspartique dans le milieu de culture. La fonction physiologique de ces enzymes est l'hydrolyse de protéines pour répondre aux besoins nutritionnels.

Selon une étude réalisée par (Zhao *et al*, 2019) une espèce de *B. amylolique faciens GSba-1* a été isolé à partir du levain traditionnel appelé jiuqu, qui contenait un mélange de levures, de moisissures et de bactéries.

Le vin de riz fabriqué par fermentation de riz gluant avec du jiuqu était utilisé comme agent coagulant pour fabriquer le fromage royal traditionnel, un type de fromage frais fabriqué à l'origine pour les familles royales depuis le début de la dynastie Qing en Chine. Il a été confirmé que *B. amylolique faciens GSba-1* isolé de jiuqu produisait des enzymes coagulantes (Teng *et al*, 2018).

Selon Zhao *et al* (2019) l'enzyme coagulante issue de *B. amylolique faciens* GSBa-1 a été purifiée, identifiée et caractérisée enzymatiquement. L'activité protéolytique de l'enzyme coagulante, son profil hydrolytique sur les protéines du lait et le site de clivage spécifique de la κ -caséine ont été étudiés et les résultats obtenus par (Zhao *et al*, 2019) montre qu'elle appartient à la famille des peptidases M4, et le peptide mature avec une activité coagulante était une métalloprotéinase neutre avec une masse moléculaire d'environ 38 kDa.

Le pH et la température optimaux ont été déterminés à 5,5 et 57 °C pour l'enzyme coagulante, et à 7,0 et 57 °C pour l'activité protéolytique, respectivement. L'enzyme coagulante présentait une légère autolyse qui pourrait être inhibée par Ca^{2+} et Na^{+} . L'hydrolyse des caséines a révélé que la case-caséine présentait une sensibilité plus élevée à l'action de l'enzyme coagulante que la α - et la κ -caséine (Zhao *et al*, 2019).

Par digestion tryptique in-gel et analyse LC-MS/MS du peptide majeur (environ 13 kDa) généré à partir de l'hydrolyse de la case-caséine par l'enzyme coagulante, le site de clivage a été identifié comme étant à Lys 111-Lys 112.

L'enzyme coagulante issue de *B. amylolique faciens* GSBa-1 pourrait servir de nouveau coagulant du lait pour une application potentielle dans la fabrication de fromage avec la protéolyse souhaitée. (Zhao *et al*, 2019).

2..1.3.2. Coagulant fongiques

Les principaux champignons, sources de protéases à acide aspartique, sont *Endothia parasitica* (SARDINAS, 1968), *Rhizopus chinensis* (FUKUMOTO *et al*, 1967), *Penicillium janthinellum* (HOFMANN et SHAW, 1964), *Mucor pusillus* (ARIMA *et al*, 1968) et *Mucor miehei* (STERNBERG, 1971).

Rhizopus chinensis, *Mucor pusillus* et *Mucor miehei* appartiennent à la sous-division « zygomycotina », classe des « zygomycètes », ordre des « Mucorales ». *Endothia parasitica* et *Penicillium janthinellum* appartiennent à une autre sous-division « ascomycotina ». ARIMA *et al* (1967) ont montré que *Mucor miehei* var. *Lindt*, moisissure thermophile isolée de sols chauds et humides, était l'espèce la plus productrice de protéases à acide aspartique parmi 800 autres espèces de divers micro-organismes testés. Les enzymes produites par ces champignons sont caractérisées par une grande activité coagulante due au clivage de la caséine κ avec une activité protéolytique relativement limitée ce qui en fait des substituts de la chymosine bovine dans l'industrie fromagère (Abreu da Silva, 2004).

Selon STERNBERG (1976), déjà en 1974, 60% des fromages produits aux Etats-Uni étaient fabriqués avec les protéases provenant d'*Endothia parasitica*, de *Mucor pusillus* et de *Mucor miehei*. Ce rapide succès est dû en partie à leurs prix compétitifs, ne représentant que 45% du prix d'acquisition de la présure traditionnelle.

Selon Abreu da Silva (2004), les coagulants d'origine microbienne, comparée à la chymosine, montrent certains désavantages dont un ratio plus petit entre l'activité coagulante et l'activité protéolytique non spécifique. De plus, ils présentent une thermo stabilité plus grande qui entraîne la survie de l'activité de l'enzyme après la cuisson du caillé, conduisant alors à l'apparition de goûts indésirés pendant les périodes de maturation des fromages. En ce qui concerne ce dernier point, plusieurs groupes travaillent pour tenter de diminuer la thermostabilité de la protéase à acide aspartique de *Mucor*. YAMASHITA *et al* (1994) ont réalisé une mutagenèse sur le champignon *Mucor pusillus* et ont pu isoler une souche de champignon mutée qui produisait une enzyme avec une thermo stabilité réduite.

L'utilisation d'enzyme coagulantes dans la fabrication du fromage tel que la Mozzarella s'est avérée favoriser la formation d'acides aminés libres et de composés volatils en raison de son activité protéolytique modérée par rapport à une présure commerciale (Teng *et al*, 2017, 2018).

2.1.4 Coagulant d'origine recombinant (FPC)

Dans les années 1980, trois entreprises différentes ont développé la chymosine produite par fermentation FPC, en utilisant des techniques d'ADN recombinant. Une séquence d'ADN pour la chymosine provenant d'une cellule principale de caillette de veau a été introduite dans le génome d'un organisme hôte. Une bactérie (*E.coli* var K-12 non pathogène), un mucor (*Aspergillus niger* var *awamori*) et une levure (*Kluyveromyces lactis*) ont été utilisés comme organismes hôtes (Teuber, 1990 ; Harboe, 1992 ; Praaning-van Dalen, 1992).

Microorganisme hôte	Nom du produit commercial	Entreprise
<i>Aspergillus niger</i> var <i>awamori</i>	CHYMOGEN®	Chr-Hansen (Danemark)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	MAXIREN®	Gist-Brocades (France)
<i>Escherichia coli</i> K12	CHY-MAX®	Pfizer (Etats-Unis)

Figure 2: La chymosine bovine recombinante disponible sur le marché.

Aujourd'hui, seuls les deux derniers FPCs (figure 2) le mucor (*Aspergillus niger* var *awamori*) et une levure (*Kluyveromyces lactis*) sont sur le marché produisant de la chymosine bovine, puisque le brevet de celui produit via *E. coli* a été acheté par un concurrent qui a fermé la production (Alan et Larsen, 2021). En plus de la chymosine bovine produite par fermentation, il y a également de la chymosine cameline produite par fermentation connue sous le nom de Chymax M (KAPPELER *et al*, 2006) sur le marché depuis 2009, et ce dernier permet d'améliorer les performances en termes de rendements fromagers et de qualité des lactosérums, ce qui correspond à de nombreuses attentes industrielles (ROSET, 2019).

L'isolement de l'ARNm de la prochymosine a été rapporté pour la première fois en 1980 (UCHIYAMA *et al*, 1980). De ce laboratoire proviennent les premières publications sur la production de la chymosine bovine recombinante chez *Escherichia coli* (NISHIMORI *et al*, 1982, 1984) qui a été par la suite adoptée par d'autres groupes utilisant *E. coli* (EMTAGE *et al*, 1983 ; MARSTON *et al*, 1984) mais aussi divers micro-organismes dont *Saccharomyces cerevisiae* (MELLOR *et al*, 1983 ; GOFF *et al*, 1984), *Aspergillus* spp (CULLEN *et al*, 1987 ; WARD *et al*, 1990 ; DUNN- COLEMAN *et al*, 1991 ; TSUCHIYA *et al*, 1993), *Yarrowia lipolytica* (FRANKE *et al*, 1988), *Proteus mirabilis* (KLESSEN *et al*, 1989), *Kluyveromyces lactis* (VAN DEN BERG *et al*, 1990), *Trichoderma reesei* (HARKKI *et al*, 1989 ; UUSITALO *et al*, 1991), *Bacillus subtilis* (PARENTE *et al*, 1991) et chez des cellules de mammifères (KOLMER *et al*, 1991).

La vente de ses chymosines recombinantes est permise dans de nombreux pays comme l'Australie, la Suisse, les Etats-Unis et certains pays de l'Union Européenne (la Belgique, la Grande-Bretagne, la Grèce, le Portugal). En France, la situation est différente puisque l'utilisation de la chymosine recombinante n'a pas encore été autorisée. Il faut en effet savoir que le dossier de demande d'autorisation d'emploi de la chymosine recombinante a été déposé à la Direction générale de la consommation, de la concurrence et de la répression des fraudes (DGCCRF) en 1988(Abreu da Silva, 2004) Les raisons de ce blocage seraient liées à la situation particulière des fromages d'Appellation d'Origine Contrôlée (AOC) dans lesquels seule l'utilisation de la présure traditionnelle est permise. Or, comme il n'existe pas de techniques capables de distinguer dans les fromages, la chymosine native de la chymosine recombinante issue de fermentation, il est alors impossible de vérifier l'origine de la chymosine utilisée dans la fabrication de ces fromages qui bénéficient d'une appellation (LEROY, 1997).

La chymosine produite par les micro-organismes est identique en poids moléculaire, séquence d'acides aminés, propriétés immunologiques et profil chromatographique à la chymosine naturelle (TEUBER, 1990). De nombreuses études ont montré que dans la production fromagère, le rendement et la qualité du produit fini est le même quelle que soit la chymosine utilisée (BINES *et al*, 1989 ; BROOME et HICKEY, 1990. BARBANO et RASMUSSEN, 1992). En termes d'analyse, les chymosine recombinante issue de fermentation(CPF) doivent être traitées comme une présure de veau contenant 100% de chymosine (Alan et Larsen, 2021).

Selon Macedo *et al* (1993) ; Roseiro *et al* (2003) ; Fusté-Forné (2020) ; Natrella et al (2020) et Murtaza(2021) les différents types de fromages tel que la Feta, le Gouda, Mozzarella et le Cheddar ont été fabriqués avec succès par l'utilisation de la chymosine recombinante (bovine) sans la détection d'aucune différence significative des propriétés du fromage (texture, gout, la couleur, odeur et la maturation) comparé à la chymosine naturelle (Koch *et al*, 1986 ; Prokopek *et al*, 1988).

Les caractéristiques du processus de fabrication du fromage, la récupération des solides du lait, la composition du fromage et la protéolyse pendant la maturation du fromage fabriqué avec de la présure et de la chymosine recombinante (tableau3) ont été décrites en détail par Green *et al* (1985) ;Starovoitova *et al* (2006) ont rapporté l'action de la chymosine de veau obtenue à partir de lait de brebis transgénique et de la protéine recombinante

exprimée dans la levure *Kluyveromyces lactis* (Maxiren) sur des substrats peptidiques fluorogènes. Ils ont constaté que la chymosine transgénique et la chymosine recombinante différaient de l'enzyme native dans leur action sur les substrats de faible poids moléculaire, alors qu'aucune différence n'a été constatée dans l'action enzymatique sur les substrats protéiques (Kumar *et al*, 2010).

La chymosine recombinante est pratiquement impossible à distinguer de la chymosine authentique. D'un point de vue scientifique et technologique, il n'existe pas de raisons pour que les préparations de chymosine recombinante ne soient pas utilisées pour la fabrication fromagère à partir du moment où leur disponibilité sur le marché se traduit par une offre illimitée et à des prix compétitifs (TEUBER, 1990).

Ces produits restent cependant commercialisés à un prix élevé, à la fois en raison de la pénurie de caillotte de veau mais aussi en raison des inquiétudes suscitées par des problèmes tels que la maladie de la vache folle (ESB, encéphalopathie spongiforme bovine) (Alan Larsen, 2021) ce qui rend par conséquent leurs utilisation parfois difficile par des petites et moyennes entreprises surtout dans les pays en voie de développement, tel le Brésil (Abreu da Silva, 2004).

Tableau II : Expression de la chymosine dans différents hôtes microbiens (Kumar *et al*, 2010).

Espèce d'origine	Forme de chymosine	plasmide	Promoteur	hôte
Calf	Pro	pCR301	LacUV5	<i>Escherichia coli</i>
Calf	Pro	pCT66,67,70	Tryptophan	<i>E. coli</i>
Calf	Pro	p501	Tryptophan	<i>E. coli</i>
Calf	Chymosin	pGK2231	Trp- β ,glyA gene tryptophan & serine hydroxymethyl transferase	<i>E. coli</i>
Calf	Pro	pTaAc	Tac	<i>E. coli</i>
Lamb	Met-pro	pKP1500	—	<i>E. coli</i>
Goat	Pro	pET43.1a(+)	T7	<i>E. coli</i>
Bovine	Pro	pKM636, pKM1361 pKM6361	SpeA	<i>Proteus mirabilis</i>
Bovine	Pro	pSM316	Neutral protease	<i>Bacillus subtilis</i>
Goat	Pro	pQSec1	pGK	<i>Kluyveromyces fragilis</i>
Goat Buffalo	Pro Prepro, Pro, chymosin	pQFlag1 pGAPZ α A	ADH ₂ pGAP	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia pastoris</i>
Bovine	Pro	pPICZaA	—	<i>Pichia pastoris</i>
Calf	Chymosin	—	glaA	<i>Aspergillus oryzae</i>
Bovine	Chymosin	—	pdA & pepB	<i>Aspergillus awamori</i>
Camel	Pro	pGAMpR	glaA	<i>Aspergillus niger</i>

2.2. Paramètres physicochimiques et cinétiques de la présure animale

L'une des caractéristiques les plus importantes des enzymes en général (tableau 3), et des enzymes coagulantes en particulier, est qu'elles se commercialisent et s'utilisent en prenant en compte bien sûr leur poids ou leur volume, mais aussi et surtout leur activité, ou concentration. Le processus de la coagulation est provoqué par l'action d'un coagulant, ajouté à un taux bien défini au lait de fabrication, lui-même à une température et un pH précis. Le coagulant traditionnel, la présure, est extrait de l'estomac du jeune veau nourri au lait.

Tableau III : Paramètres physicochimiques de la présure animale

Types	Espèce	Ph d'activation	Ph d'inactivation	Activité	Température D'inactivation	Site d e clivage	Références
Chymosine	bovine	5,5-5,6	> à 7	activité coagulante élevée et protéolytique faible	50-61°C	Phe105-Phe106	UniackeLowe et al, 2017
	buffle	>5,6	>à7	activité coagulante plus élevée que celle de la bovine	45°C	Phe105-Phe106...	Malak et al, 1996
	chamelle	5,8-6	> à 7	activité coagulante élevé	50°C	Phe105-Phe106	Elagamy, 2000
	Ovine	5,5-5,6	> à 7	activité coagulante élevée et protéolytique faible	50-58°C	Phe105-Phe106	Mezina et al , 2001.
Pepsine	Bovine	1 ,6-2,5	> à 7	Activité coagulante faible et protéolytique élevée	>à55°C	Phe-Try Phe-tyr Phe-Phe	McSweeney, 2021

Tableau VI : paramètres cinétique de la catalyse de la K-caséine par la chymosine (Visser *et al*, 1976).

Peptide	Séquence	Kcat (sec-1)	Km (MM)	Kcat /Km (sec-1/MM)
S.F.M.A.I	104-108	0.33	8.5	0.038
S.F.M.A.I.P	104-109	1.05	9.20	0.114
S.F.M.A.I.P.P	104-110	1.57	6.80	0.231
S.F.M.A.I.P.K	104-111	0.75	3.20	21.3
Caseine bovine	...	2-20	0.001-0.0051	12.7

2.3. L'extraction et purification des enzymes coagulantes

Le processus de la coagulation est provoqué par l'action d'un coagulant, ajouté à un taux bien défini au lait de fabrication, lui-même à une température et un pH précis. Le coagulant traditionnel, la présure, est extrait de l'estomac du jeune veau nourri au lait.

Tableau V: techniques d'extraction et purification des différents coagulants

Origine de l'espèce	Extraction	Purification	Références
Végétale C.cardunculus	Précipitation au sulfate d'ammonium	Chromatographie de permeation	Alavi et Momen,2020.
Végétale Calotropis procera	Mise en suspension 10 g de fleurs, préalablement broyées, dans 90 ml d'eau pendant 30 minutes.	Filtration sur membrane (cheese cloth) + centrugation à 6934 000 tours/minute pendant 10 minutes.	Bethelhem <i>et al</i> , 2020. Rovira <i>et al</i> , 2012)
Microbienne Bacillus licheniformis Bl 312	Précipitation au sulfate d'ammonium	Chromatographie sur colonne de DEAE sepharose dans du tampon tris HCl 20Mm PH 7.	Yao_Zhang <i>et al</i> , 2019
Microbienne Bacillus amyloliquefaciens GSBa-1	Extraction acide dans du Tris-HCl 50 mM (pH 6,8)	Chromatographie sur Colonne (DEAE Fast Flow (50 cm × 2 cm)	Zhao <i>et al</i> ,2019)
Animale Pepsine de poulet	Précipitation au sulfate d'ammonium	Chromatographie d'exclusion (sephadexe)	BOHAK, 1970.
Animale Présure Porcine	Extraction acide dans du Tris-HCl	Chromatographie d'exclusion.	Rosanna <i>et al</i> , 2015
Recombinante Rhisopus oryzae	Extraction acide dans du tris	chromatographie d'exclusion.	Kumar <i>et al</i> , 2005.
Recombinante Kluyveromyces lactis.	Extraction acide dans du Tris-HCL	Chromatographie sur colonne (sepharose) centrifugé à 6000xg A 4°C pendant 20min.	Malaquias <i>et al</i> , 2017).

2.4. Structure des enzymes coagulantes

2.4.1. Structure primaire

La plupart des aspartyl-protéinases sont des molécules à chaîne unique, dont la masse moléculaire est comprise entre 32 000 et 39 000 Da et qui sont constituées de ~330 acides aminés. Les protéinases aspartyles possèdent deux résidus réactifs d'acide aspartique dans leur site catalytique qui sont essentiels à leur fonction. Les deux résidus d'acide aspartique se trouvent dans deux séquences caractéristiques, Asp32-Thr-Gly-Ser dans le domaine N-terminal et un Asp215-Thr-Gly-Ser/ Thr correspondant dans le domaine C-terminal. Les résidus Asp sont responsables de l'activation d'une molécule d'eau, qui sert de médiateur à la réaction nucléophile. Liaison peptidique scissile (Yegin et Dekker, 2013).

2.4.2. Structure secondaire et tertiaire

La structure secondaire est à 13 % hélicoïdale (9 hélices, 44 résidus) et à 48 % de feuillet (29 brins, 158 résidus) (Palmer *et al*, 2010) cité par (Uniacke-lowie *et al*, 2017). La protéine contient trois disulfures (Cys 47 -Cys 52, Cys 207 -Cys 211 et Cys 250 -Cys 283) et une cis -proline (Pro 25), qui est conservée dans la mucorpepsine, l'endothiapepsine et la pepsine porcine (Palmer *et al*, 2010).

Une illustration de la structure tridimensionnelle de la chymosine est présentée sur (figure). la molécule existe sous forme de deux domaines séparés par la fente du site actif dans laquelle les deux résidus aspartyl catalytiquement actifs (Asp 34 et Asp 216 Fig.3) sont situés avec leurs chaînes latérales orientées vers la fente. La fente actif peut accueillir ~ 7 résidus de la κ -caséine séquence (Uniacke-lowie *et al*, 2017).

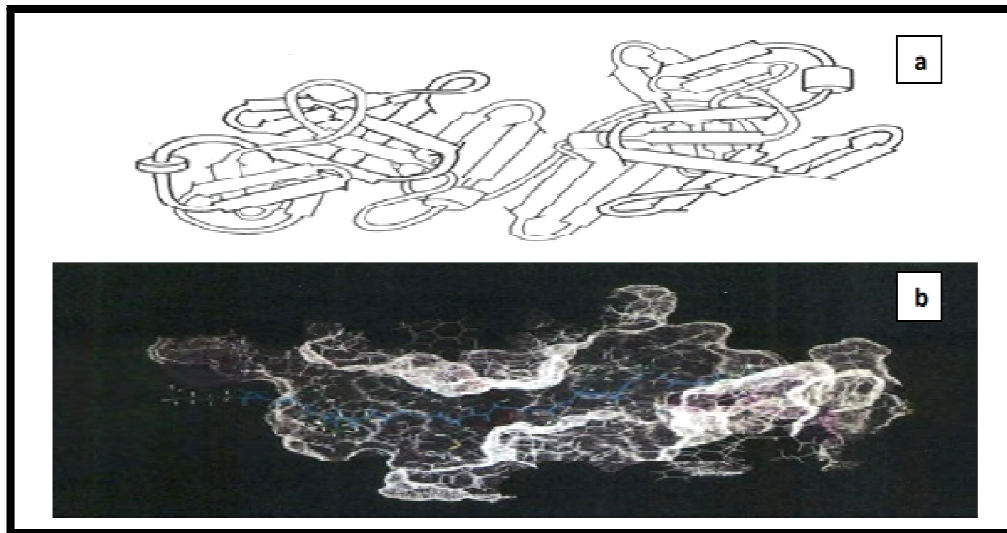


Fig. 3: Représentation schématique des structures secondaires et tertiaires de la chymosine (Uniacke-Lowe *et al*, 2017).

En Bleu montrant la fente du site actif dans laquelle s'insère la séquence comprenant les résidus d'acides aminés 102-108 de la caséine κ ((a) de Foltmann, 1987); (b) de (Plowman et Creamer, 1995) cité par (Uniacke-Lowe *et al*, 2017).

La distance entre l'oxygène carboxyle des deux résidus Asp est de 3,1. Le groupe carboxyle des résidus Asp est connecté via un réseau complexe de liaisons hydrogène et un certain nombre de molécules d'eau dans l'environnement immédiat de la fente du site actif (Gilliland *et al*, 1990 ; Mantafounis et Pitts, 1990) cité par (Uniacke-Lowe *et al*, 2017)

Dans la structure tertiaire (figure5), deux résidus thréonine adjacents, Thr 35 et Thr 217, sont liés l'un à l'autre par l'oxygène de la chaîne latérale et l'azote de la chaîne principale, tandis que leurs chaînes latérales sont dirigées dans la poche hydrophobe vers la « poignée du pompier » (Uniacke-Lowe *et al*, 2017) figure 4.

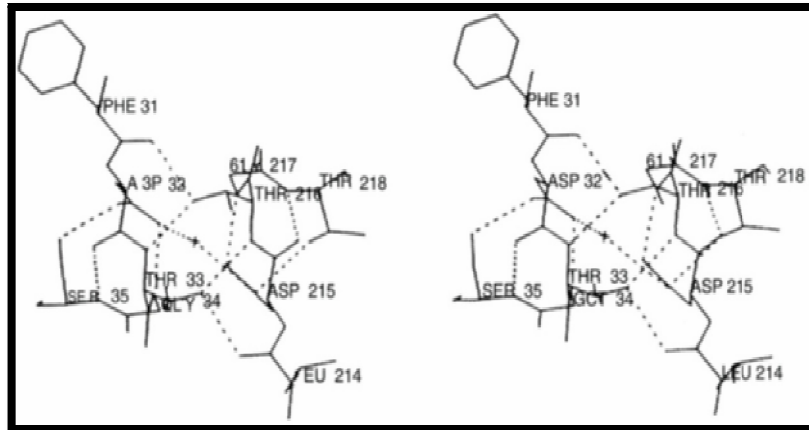


Fig.4 : La "poignée du pompier" du côté actif de la chymosine (Newman *et al*, 1991).

Les liaisons hydrogène (lignes brisées) impliquées sont Thr216 N...Thr33 (2.8Å), Thr33 ...Lys214 O (2.7 Å), Thr33 N...Thr216 (2.9 Å) et Thr216..Phe31 O (2.8 Å). D'autres liaisons hydrogène contribuant à la stabilité de Asp32 et Asp215 sont également représentées (Newman *et al*, 1991).

C'est-à-dire que l'oxygène de la chaîne latérale d'un Thr est lié à l'azote de la chaîne principale du Thr correspondant, ce qui confère une stabilité structurale supplémentaire au site catalytique (Chitpinitiyol et Crabbe, 1998 ; Wong, 1995) cité par (Uniacke-Lowe *et al*, 2017).

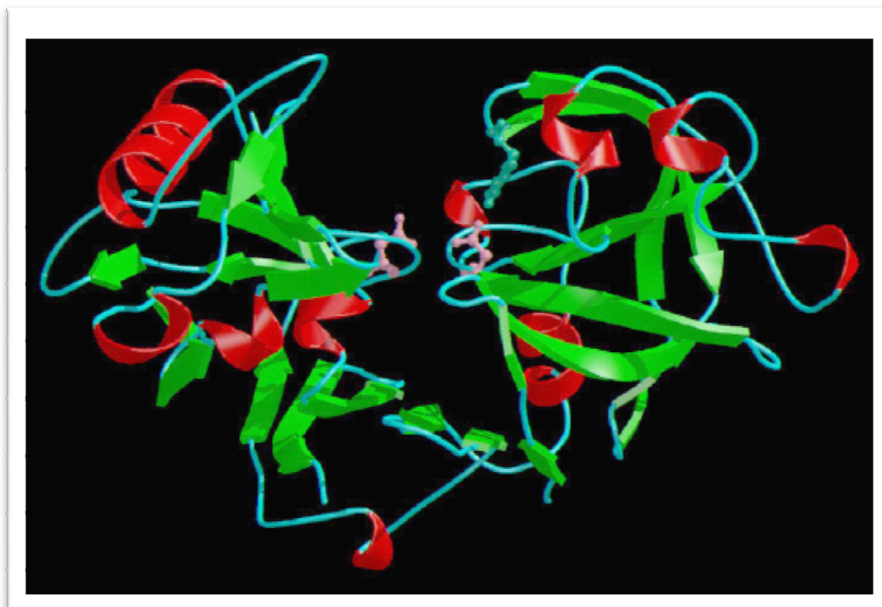


Fig. 5 : structure tridimensionnelle de la chymosine bovine (Abreu Da Silva, 2004).

2.5. Site actif et mécanisme catalytique

2.5.1. Site actif

Le site actif est composé de la triade hautement conservée des résidus acide aspartique, thréonine et glycine pour chacun des lobes de l'enzyme. Les deux résidus d'acide aspartique du site actif Asp32 et Asp215 se trouvent à la base du sillon (figure6). Les chaînes latérales de ces deux résidus sont impliquées dans de nombreuses liaisons hydrogène. La spécificité de la chymosine est également une conséquence de la structure des sites d'interaction avec le substrat. Nous pouvons citer l'importance du résidu Tyr75 situé sur une anse externe mobile qui recouvre le sillon du site actif, faisant partie des sites S1 à S'1 (NEWMAN *et al*, 1991).

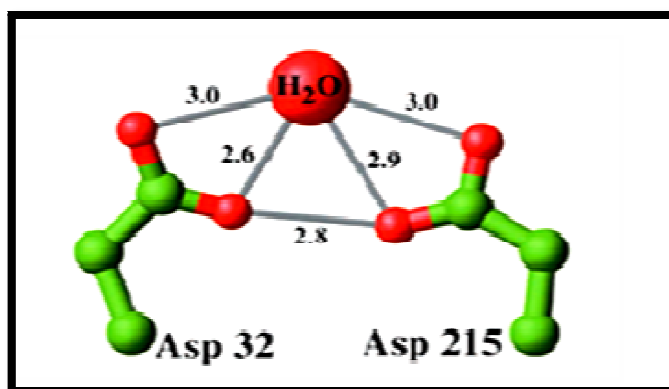


Fig. 6 : Structure par rayon X de la pepsine porcine. Vue agrandie des résidus Asp du site actif avec la molécule d'eau qui leur est liée (VOET D et VOET J.G, 2016).

Le site actif est tapissés de résidus chargés négativement et positivement ainsi que de résidus hydrophobes (BOGGETTO et REBOUD-RAVAUX, 2001) formant ainsi des sous sites S1- S4 et S'1-S'4 (nomenclature de SCHECHTER et BERGER, 1967).

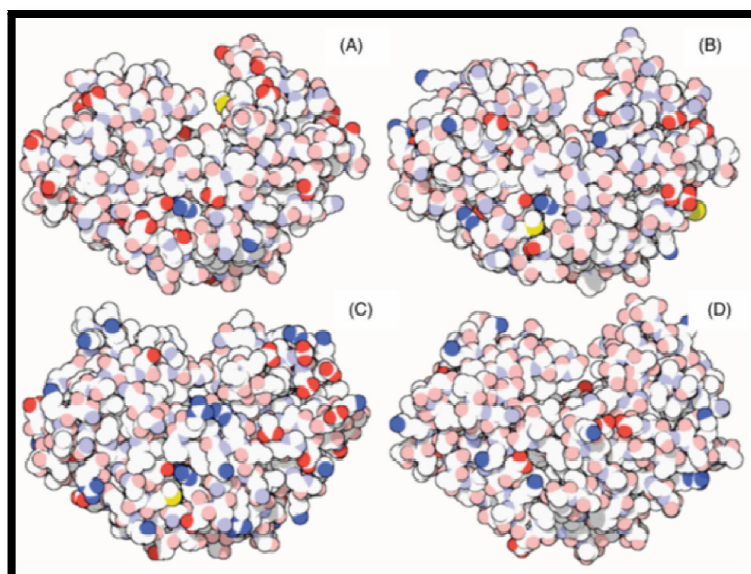


Fig.7 : Exemples de quatre aspartyl-protéinases montrant la profondeur de la fente du site actif. (A) Pepsine porcine (entrée PDB 5PEP) ; (B) chymosine (entrée PDB 4CMS) ; (C) cathepsine D (entrée PDB 1LYB) ; et (D) endothiapepsine (entrée PDB 4APE) (Goodsell *et al*, 2015)

Une molécule d'eau se trouve entre les résidus catalytiques Asp et est impliquée dans le mécanisme catalytique. Les molécules d'eau conservées (attachées aux résidus 502 et 513 ; numérotation de la pepsine) crée des liaisons hydrogène supplémentaires et offrent une stabilité supplémentaire pour la prise du pompier (Prasad et Suguna, 2002).

La rigidité de la géométrie du site actif est essentielles pour l'activité des protéases aspartiques (Bernstein *et al*, 1999 ; Prasad et Suguna, 2002) cité par (Uniacke-lowie *et al*, 2017).

Les protéases aspartiques sont inhibées par la pepstatine (FITZGERALD *et al*, 1990 ; RAO *et al*, 1998 ; CAMPOS et SANCHO, 2003). Elles sont également sensibles aux composés diazocétones tels que l'ester méthylique de diazoacétyl-dl-norleucine (DAN) et le 1,2-époxy-3- (p-nitrophénoxy) propane (EPNP) en présence d'ions cuivre (RAO *et al*, 1998).

2.5.2. Mécanisme catalytique

Le mécanisme catalytique des aspartyl-protéinases a été décrit par de nombreux auteurs, notamment Chitpinitiyol et Crabbe (1998) ; Davies (1990) ; Dunn (2002) ; Iliadis *et al.* (1996) ; James *et al.* (1977, 1982) ; James et Sielecki (1985) ; Palmer *et al.*, 2010 ; Pearl (1987) ; Polgár (1987) ; Tang (2010) ; Veerapandian *et al.* (1992) ; et Yegin et Dekker (2013) cité par (Uniacke-Lowe *et al.*, 2017).

Dans ce mécanisme Une molécule d'eau liée à l'hydrogène, située entre les deux résidus aspartyl du site actif, joue un rôle clé dans l'hydrolyse des liaisons peptidiques qui se produit par un mécanisme acide-base général (Tang, 2010). Le mécanisme exact de l'hydrolyse reste controversé (Dunn, 2002; James *et al.*, 1992 ; Palmer *et al.*, 2010) mais (Szecsi, 1992 ; Dunn, 2002) Pensent généralement qu'il se produit par une attaque nucléophile sur le carbone carbonyle du peptide via la molécule d'eau catalytique (Szecsi, 1992 ;Dunn, 2002).

À partir d'études structurales aux rayons X d'un complexe endothiapepsine-difluorostérone inhibiteur. (Veerapandian *et al.*, 1992) ont proposé un mécanisme de réaction, illustré à la figure 8.

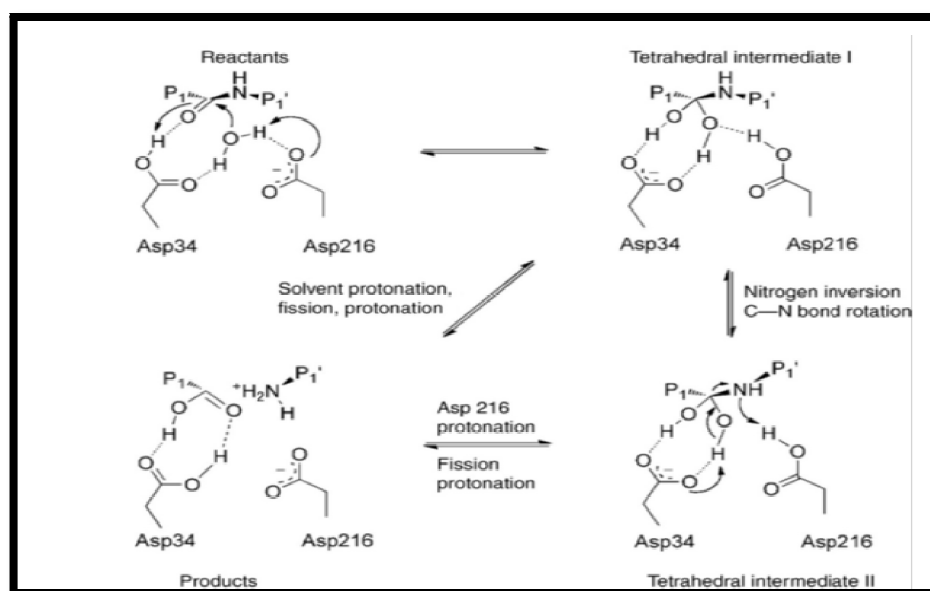


Fig.8: Représentation schématique du mécanisme catalytique des protéases aspartiques proposée par (Veerapandian *et al.*, 1992 cité par Uniacke-Lowe *et al.*, 2017).

Le carbonyle de la liaison scissile est protoné par Asp34 et subit simultanément une attaque nucléophile par une molécule d'eau, qui est activée par Asp216 déprotoné (Palmer, 2010).

La première étape de la réaction est un transfert de proton de la molécule d'eau à la dyade Asp216 avec un transfert simultané d'un proton de la dyade à l'oxygène carbonyle de la liaison peptidique ; ces transferts de protons représentent la force motrice de la formation de la liaison entre le substrat et l'eau et conduisent à la formation d'un intermédiaire oxyanionique tétraédrique qui est hydrolysé par une catalyse acide-base impliquant un transfert simultané de protons de l'intermédiaire à la dyade et de la dyade à l'atome d'azote du substrat (Polgár, 1987).

James *et al* (1992) ; Coates *et al* (2001) ont proposé un mécanisme similaire. Northrop (2001) compte à lui a suggéré un mécanisme catalytique qui implique la formation d'une liaison hydrogène à faible barrière entre les deux résidus Asp du site actif et le réarrangement des protons autour d'un intermédiaire cyclique à 10 chaînons.

Andreeva et Rumsh (2001) ont examiné la structure cristalline du site catalytique des enzymes de type pepsine (fig.9), ont signalé qu'en plus de la molécule d'eau (W 1), qui assume le rôle de nucléophile pendant la catalyse, une autre molécule d'eau (W2), à proximité des groupes actifs, est entièrement conservée dans les protéinases aspartyl. Cette molécule d'eau joue un rôle essentiel dans la formation d'une chaîne de résidus liés à l'hydrogène entre le rabat du site actif et les carboxyles actifs lors de la fixation du ligand.

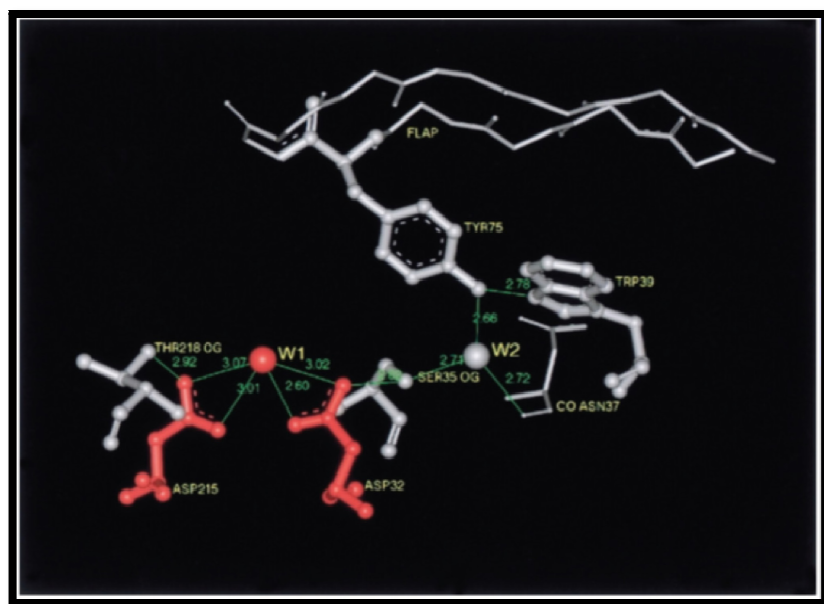


Fig. 9: Structure tridimensionnelle de la zone du site actif de la pepsine porcine (PDB ID : 4PEP ; Sielecki *et al*, 1990).

La molécule d'eau (W1) est active. L'hydroxyle de Tyr75 forme des liaisons hydrogène à l'intérieur de la molécule, ce qui entraîne la formation d'une chaîne continue de résidus liés à l'hydrogène à savoir la Trp39-Tyr75-W2-Ser35-Asp32 qui s'étend du rabat au site actif. Pour le groupe hydroxyle de Thr218, il est situé à une distance de liaison hydrogène du carboxyle Asp215 et protège ce carboxyle de la protonation en milieu acide. (Andreeva *et al*, 2001).

Les résidus présentés dans (la fig.11) sont conservés dans les enzymes de type pepsine à quelques exceptions près (Andreeva et Rumsh, 2001). Ces données suggèrent une nouvelle approche pour comprendre le rôle des résidus qui entourent le site catalytique, ce qui peut aider au développement de la réaction catalytique.

II. L'application industrielle des enzymes coagulantes

3.1. Vue d'ensemble sur les enzymes utiliser en industrie

Les enzymes coagulantes sont une nécessité absolue pour la production de fromages affinés. Ces coagulants sont des préparations d'enzymes protéolytiques (Jacob *et al*, 2011; Shah *et al*, 2014) et sont de différentes sources : animale, microbienne, végétale et, depuis peu, issues de modifications génétiques.

Plusieurs protéases animales sont utilisées pour la fabrication de fromages. Toutefois, la présure (mélange de chymosine et de pepsine) est de très loin la plus employée et est considérée comme étant la meilleure enzyme de coagulation du lait (Abi-Azar, 2007). Le principal coagulant de la présure est la chymosine qui représente 80 % de l'enzyme contre 20 % pour la pepsine (Abakar, 2012).

De nombreuses protéases microbiennes agissent de la même manière que la chymosine. Toutefois, ces enzymes montrent une activité protéolytique plus élevée pendant la fabrication du fromage. L'enzyme de *Rhizomucor miehei* est le coagulant microbien le plus couramment utilisé pour la production fromagère (Jacob *et al*, 2011).

De nombreuses préparations coagulantes végétales sont connues. Elles sont obtenues par macération de divers organes de plantes supérieures (Adoui, 2007). Malgré le nombre élevé de coagulants végétaux, leur application en industrie est très limitée. Toutefois, des études ont révélé que certaines enzymes végétales sont prometteuses.

Les présures recombinantes représentent actuellement 70 à 80% du marché mondial de la présure (Johnson, 2006 ; Jacob, 2011). Différentes études ont prouvé que la chymosine recombinante et la chymosine de veau standard se comportent de la même façon dans toutes les conditions étudiées. Aucune différence entre les fromages n'a été observée du point de vue sensoriel et chimique (Yegin et Dekker, 2013).

3.2. L'application dans la filière laitière

La première étape de la transformation du lait en fromage est la coagulation. Quand elle s'effectue par la voie enzymatique, elle résulte d'une déstabilisation de la fraction caséinique par hydrolyse spécifique de la caséine (liaison Phe105Met 106) sous l'action de chymosine (E.C.3.4.23.4). Dans la présure extraite de la caillotte de veau nourri au lait, cette enzyme se trouve en compagnie d'une autre protéase coagulante : la pepsine (E.C.3.4.23.1-2) (LINDEN, 2012).

Pour pallier aux déséquilibres de l'offre et de la demande en matière de présure de veau, différentes solutions ont été proposées : à savoir, la mise en œuvre de protéases d'origine animale (pepsine bovine, pepsine porcine), d'origine végétale (*Cynara cardunculus*), d'origine microbienne (*Endothia parasitica*, *Mucor pusillus*, *Mucor miehei*) ou l'utilisation de chymosine recombinante (DESMAZEAUD et SPINLER, 1997) Cette protéase produite chez *Kluyveromyces lactis*, *Escherichia coli* ou *Aspergillus niger* est autorisée en remplacement de la présure de veau dans certains pays (Collin et coord, 2015).

La mise en œuvre de substituts de chymosine a des répercussions à la fois sur la texture, le rendement fromager et l'affinage. Leurs spécificités enzymatiques sont, en effet, différentes de celles de la chymosine ; de plus, leur rétention dans le caillé lors de l'égouttage est inférieure à celle de la chymosine. Par contre, la chymosine recombinante a des caractéristiques physico-chimiques et des propriétés coagulantes identiques à celle du veau (TEUBER, 1990).

Le choix de l'enzyme coagulante est une décision importante qui appartient au fromager. La sélectivité de la coupure de la caséine K assure en effet l'intégrité des protéines pendant cette transition délicate du lait liquide au coagulum. Une enzyme trop peu sélective risque de continuer à hydrolyser les caséines pendant la phase de coagulation. On risque alors Ce risque est majeur : il détermine le rendement fromager, c'est-à-dire le nombre de kilogrammes de fromages que l'on obtient pour 100 kilogrammes de lait mis en œuvre. C'est un critère principal de la réussite économique de la transformation fromagère. (Collin et coord, 2015).

En perdant un pour cent de rendement, on remet en cause la rentabilité globale du processus de transformation du lait en fromage. Cela justifie le fait que l'on juge d'abord les enzymes coagulantes sur leur aptitude à préserver les rendements (KERJEAN, 1995).

La texture, la saveur et l'arôme du fromage sont la résultante de modifications physico-chimiques des fractions protéiques et lipidiques consécutives à l'action des enzymes et des micro-organismes. Les protéases et les lipases impliquées dans le déroulement de l'affinage sont :

- présentes dans le lait : plasmine (E.C.3.4.21.7) ;
- apportées par les agents coagulants : chymosine, lipases ;
- secrétées ou libérées par les micro-organismes : levain, flore secondaire.

En ce qui concerne la chymosine, dans les fromages à pâte cuite, de type emmental, comté, beaufort, grana, parmesan..., l'enzyme coagulante n'intervient pas ou de façon marginale dans la protéolyse pendant l'affinage. Le chauffage du caillé en cuve autour de 53 °C inactive, en effet, en très grande partie cette enzyme. Pour les autres fromages (par exemple, type pâte pressée : gouda, cheddar...), la chymosine coupe la caséine α_1 dans la première phase de la protéolyse pendant l'affinage. Cette activité protéolytique jouera un rôle majeur sur la formation de la texture et du goût du fromage prêt à la consommation (Roset, 2019).

L'ensemble des enzymes susceptibles de jouer un rôle dans le déroulement de l'affinage est de mieux en mieux connu. De nombreuses études ont été réalisées pour tenter d'accélérer le déroulement de l'affinage, pour en réduire les coûts, notamment dans le cas de pâtes pressées (FOX *et al*, 1991). Plusieurs voies sont envisagées :

- addition directe d'enzymes (protéases et lipases) dans le lait ou le caillé sous forme libre ou encapsulée (liposomes) ;
- lyse des micro-organismes du fromage (lysozyme-lysine phagique) pour libérer leur contenu enzymatique ;
- surexpression des activités protéolytiques-peptidasiques des micro-organismes (levains).

En résumé, l'importance des acides gras libres dans la flaveur caractéristique de différents produits laitiers n'a cessé de croître. Certains acides gras, comme les acides caproïque caprylique et caprique donnent un goût piquant, poivré au fromage. Les lipases actives dans les fromages « italiens » (provolone, romano...) sont traditionnellement dérivées de caillettes des jeunes veaux ou d'agneaux (Collin *et al*, 2015).

Conclusion générale

La présure de veau est le coagulant traditionnel le plus utilisé pour la coagulation du lait depuis de nombreuses années et connue comme étant l'ingrédient clé dans la fabrication des dérivés du lait tels que : le fromage, yaourts, etc.

Avec l'évolution du temps, le marché mondial de la production de la présure de veau a cessé d'augmenter pour des raisons diverses notamment la maladie de la vache folle qui a eu un impacte cruciale sur l'élevage et la reproduction des troupeaux ainsi que l'augmentation de la consommation des produits laitiers dans le monde.

Ces dernières décennies plusieurs recherches ont été menées afin de palier à ce manque, en développant d'autres sources pour produire cette présure, cependant, les coagulants d'origine végétales, microbiennes et plus récemment recombinants ont vu jour au niveau des industries agroalimentaires notamment la filière laitière.

Les coagulants de différentes origines ont été étudiés par de nombreux chercheurs qui ont démontré qu'il y avait des similitudes entre ces différentes préparations enzymatiques et la présure sur le plan nutritionnel, organoleptique et technologique.

L'application de ces succédanés de présure de veau, voient chaque jours leur taux d'utilisation dans les industries laitières augmenter plus précisément les présures produites par génie génétique (FPC) qui occupe 60% ; à la demande du consommateur et préserver l'évolution de la production journalière de ces industries agro-alimentaire.

Références bibliographiques

Abreu da Silva A. (2004).Clonnage et expression des prochymosines bovine A, B et B S79N chez Escherichia Coli et Pishia Pastoris. Etude de la mutation S79N.(AgroParisTech),France .

Agudelo *et al* (2004).Kinetics of peptide fraction release during in vitro digestion of casein. J. Sci. Food. Agric., 84, p. 325-333 .

Almeida C.M., Simões I. (2018).Cardoon-based rennets for cheese production.Applied Microbiology and biotechnology,102,4675-4686.

Andreeva N.S., Rumsh L.D. (2001).Analysis of crystal structures of aspartic proteinases: on the role of amino acid residues adjacent to the catalytic site of pepsin-like enzymes. Protein Sci,10,2439-2450.

Arima K., Iwasaki S., Tamura G. (1967).Milk clotting from microorganisms.

Part I.Screening test and the identification of the potent fungus. Agric Biol Chem, 31,540-545.

Berridge N.J. (1954).Rennin and the clotting of milk. Adv Enzymol Relat Subj Biochem, 15,423-448.

Ben Amira A., besbes S., Hamadi A., Blecker C. (2017).Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making. International Journal of Food Properties, 20, 76-93.

Bring N.A., Kinsella J.E. (1986).Use of platelet aggrerometer to monitor the chymosin initiated coagulation o casein miceppes.J.Dairy.Res, 53 ,359-370.

Brutti C.B., Pedro M.F., Cafini N.O., Natalucci C.I. (2012).*Onopordum acanthium* L.(Aseteraceae) Flowers as Coagulating Agent for Chessemaking.LWT-Food Science and Technology,45,172-179.

Bunn C.W., Moews P.C., Baumber M.E. (1971).The crystallography of calf rennin (chymosin).Proc.Roy.Lond.B,178,245-258

Brutti C.B., Pedro M.F., Cafini N.O., Natalucci C.I. (2012). *Onopordum acanthium* L.(*Asteraceae*) Flowers as Coagulating Agent for Chessemaking .*LWT-Food Science and Technology*,45,172-179.

Carla Malaquias A.J., Manso A.C., Antunes L.F., Cruz R., Manadas B., Bur D., Barbosa P.J. (2017). Functional and structural characterization of synthetic cardosin B-derived rennet.

Domingos A., Cardoso P.C., Xue Z.T., Clemente A., Brodelius P.E., Pais M.S. (2000). Purification, cloning and Autoproteolytic Processing of an Aspartic Proteinase from *Centaurea calcitrapa*. *Uropean Journal o Biochemistry*,267,6824-6831.

Dunn-Coleman N.S., Bloebaum P., Berka R.M., Bodie E., Robinson N., Armstrong G., Ward M., Garter G.L., Lacost R., Wilson L.J., Kodaa K.H., Baliu E., Bower B., Lamsa M., Heinsohn H. (1991). Commercial levels of chymosin production by *Aspergillus*.*Bio-Technol*,9,976-981.

David G., Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat, T.N., Weissig I.N. (2000). The protein data bank. *Nuc Acid Res*, 28, 235-242.

Foltmaan B. (1993). General and molecular aspects of rennets .In Fox PF.cheese: Chemistry,physics and Microbiology,37-88.

Fusté-Frné F. (2020). Dite gouda,dites fromage: récits de voyage d'une identité alimentaire,22.

Freitas A.C., Macedo A.C., Malcata F.X. (2000). Technological and organoleptic issues pertaining to cheeses with denomination of origin manufactured in the liberian Peninsula from ovine and caprine milks. *Food Sci.Technol.Int*,6,351-3370.

Gonzalez-Rabade N., Badillo-Corona J.A., Aranda-Barradas J.S., Del Carmen-Salvador M. (2011). Production of Plant Proteases in Vivo and in Vitro-A Review.*Biotechnology Advances*,29,983-996.

Garcia V., Rovira S., Teruel R., Boutoial K., Rodriguez J., Roa I., Lopez M.B. (2012). Effect of vegetable coagulant, microbial coagulant and calf rennet on physicochemical, proteolysis, sensory and texture profiles of fresh goats cheese. *Dairy Science and Technology*, 92(6), 691-707.

Hailu Y., Hansen E.B., Sifu E., Eschetu M., Ipsen R. (2016a). Factors influencing the gelation and rennetability of camel milk using camel chymosin. *International Dairy Journal*, 60, 62-69.

Hashem M.A. (2000). Purification and properties of a milk clotting enzyme produced by *Penicillium oxalicum*. *Bioresour Technol*, 75, 219-222.

Jensen J.L., Molgaard A., Poulsen J-C.N., Harboe M.K., Simonsen A.M., Hjerno K., Van den Brink J.M., Qvist K.B., Larsen S. (2013). Camel and bovine chymosine: the relationship between their structures and cheese-making properties. *Acta Crystallogr*, 69, 901-913.

Kappeler S.R., Van den Brink H.J., Rahbek-Nielsen H., Farah Z., Puhan Z., Hansen E.B., Jonhansen E. (2006). Characterization of recombinant camel chymosine reveals superior properties for the coagulant on bovine and camel milk. *Biochem Biophys Res Commun*, 342, 647-654.

Leroy C. (1997). Les nouvelles onctions des enzymes et des ferments . *RIA*, 567, 32, 36.

Malak C.A., Abou EL Adab I.F., Vukashinovic V., Zalunin I.A., Timokhina E.A., Lavrenova G.I., Stepanov V.M. (1996). Buffalo (*Bos buffali* L) chymosine purification and properties. *Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol*, 113, 57-62.

Murtaza M.A. (2021). Fromages de type cheddar.

Newman M., Safro M., Frazao C., Khan G., Zdanov A., Tickle I.J., Blundell T.L., Andreeva N. (1991). X-ray analyses of aspartic proteinases IV-Structure and refinement at 2.2Å resolution of bovine chymosin. *J. MOL. BIOL*, 221, 1295-1309.

Okigbo L.M., Richardson G.H., Brown R.J., Emstrom C.A. (1985). Effects of pH, calcium chloride and chymosine concentration on coagulation properties of abnormal and normal milk. *J. Dairy Sci*, 68, 2527-2533.

Rampili M., Barzaghi S., Molinari P., Tenaglia L. (1992).HPLC analysis of rennets enzymes and fermentation-produced chymosin . *Scienza et Tecnica lattiero-casearia* ,43(6),387-401.

Raymond M.N., Garnier J., Bricas E. (1972). Studies of the specificity of chymosine (rennin). I. Kinetic parameters of the hydrolysis of synthetic oligopeptide substrates. *Biochimie*, 54,145-154.

Roset G. (2019).Coagulation et coagulation enzymatique en transformation fromagère.*Technique de l'ingénieure*, 2, F4700.

Sardinas JL. (1968).Rennin enzym p *Endothia parasitica*.*Appl microbiol*,16,248-255.

Sternberg M. (1971). Crystalline milk-clotting protease from *Mucor miehei* and some of its properties .*J.Dairy Sci*,54,159-167.

Sternberg M. (1976).Microbial rennets. *Adv.Appl.Microbiol*,20,135-137.

Schechter I., Berger A. (1967). On the size of the active site in proteases.I.Papain. *Biochem. Bioph. Res. CO*,27,157-162.

Tang J., James M.N.G., HSU I.N., Jenkins J.A., Blundell T.L. (1978). Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acide proteasese.*Nature*,271,618-621.

Tang J., Koelsch G. (1995). A possible function o the flaps of aspartic proteases: the Capture of substrate side chains determines the specificity of cleavage positions. *Protein Peptide Lett*,2,257-266.

Teuber M. (1990).Production of chymosin by microorganisms and its use for cheesemaking.*Bull.IDF*,251,3-15.

Uchiyama H., Uozumi T., Beppu T., Arima K. (1980).Purification of prorennin mRNA and its translation *in vitro*.*Agric.Biol.Chem*,44,1373-1381.

Uniacke-Lowe T., Chevalier F., Hem S., Fox P.F., Mulvihill D.M. (2013). Proteomic comparison of equine and bovine milks on renneting. *J.Agric Food Chem.*, 61, 2839-2850.

Uchiyama H., Uozumi T., Beppu T., Arima K. (1980). Purification of prorennin mRNA and its translation in vitro. Agric. Biol. Chem., 44, 1373-1381.

Vega-Hernandez M.C., Gormez-Coello A., Villar J., Claverie-Martin F. (2004). Molecular cloning and expression in vivo of caprine prochymosin. J. Biotechnol, 114, 69-79.

Visser S., Van Rooijen P.J., Slangen C.L. (1980). Peptide substrates for chymosin (rennin) Isolation and substrate behaviour of two tryptic fragments of bovine k-casein. Eur J. Biochem, 108,415-421.

Walstra P., Wouters J.M.T., Geurts T.J. (2005). Dairy Science and Technology second ed CRC Publishers, Boca Rato, USA.

Wangoh J., Farah Z., Puhon Z. (1993). Extraction of camel rennet and its comparison with calf rennet extract Milchwissenschaft, 48,322-325.