

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE



Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magister

Spécialité : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée aux Bioindustries

Thème

*Caractérisation chromatographique et
électrophorétique de l'extrait coagulant issu de
caillettes de dromadaires adultes*

Présenté par:

ISSELNANE Souad

Soutenu le : 18/09/2014

Devant le jury composé de :

Mme MATI-MOULTI Farida	Professeur	UMMTO	Président
Mr MATI Abderrahmane	Professeur	UMMTO	Rapporteur
Mr HOUALI Karim	Maître de Conférences (A)	UMMTO	Examineur
Mme BENABDESSLAM Rosa	Maître de Conférences (A)	UMMTO	Examinatrice
Mr OUELHADJ Akli	Maître de Conférences (B)	UMMTO	Examineur

Remerciements

Je tiens à remercier en premier Dieu le tout puissant de m'avoir aidé à réaliser ce travail en me donnant la force, le courage, et la volonté.

Je remercie chaleureusement mon promoteur, Monsieur MATI A., Professeur en Biochimie Appliquée à l'université M. MAMMERRI de Tizi-Ouzou (UMMTO) pour m'avoir accueillie dans son laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) en me proposant ce travail et de n'avoir jamais lésiné à me prodiguer conseils et assistance pour la bonne conception et l'achèvement de celui-ci. Je le remercie de m'avoir laissé prendre des initiatives, tout en étant toujours à l'écoute de mes questions. Merci pour son soutien, pour la confiance qu'il m'a accordé tout au long de ce travail et pour tous les enseignements prodigués.

Je suis très reconnaissante à Madame MATI-MOULTI F., Professeur à l'université M. MAMMERRI de Tizi-Ouzou (UMMTO) pour son précieux apport dans mon cursus et pour l'honneur qu'elle me fait de présider le jury.

J'adresse également ma reconnaissance à Monsieur HOUALI K., Maître de Conférences (A) à l'université M. MAMMERRI de Tizi-Ouzou (UMMTO) pour m'avoir accordée de son temps, pour sa précieuse contribution à ma formation et d'avoir aimablement accepté d'être membre du jury.

Je tiens à remercier Madame BENABDESSLAM R., Maître de Conférences (A) et Monsieur OUELHADJ A., Maître de Conférences (B) à l'université M. MAMMERRI de Tizi-Ouzou (UMMTO) d'avoir accepté de siéger dans ce jury et d'avoir consacré une partie de leur temps à examiner ce travail.

J'exprime mes vifs remerciements à Madame BOUDJNAH-HAROUN S., et Monsieur HAMDAD pour leur collaboration. Un grand merci à Sara SI AHMED-ZENNIA pour son aide en chromatographie.

Mes remerciements vont à Nassima KHAMMES, Malika NADOUR, Djouza SALMI, Samia DERMECHE pour leur amitié, leur soutien moral, leurs encouragements quotidiens et pour tous les moments agréables partagés au labo.

Merci à Ryma KEBBAB pour ta joie de vivre et tes petits délires. Merci aussi à Amel GHAZI, Achour CHERGUI et Hamida AKLI pour tous les moments agréables partagés durant cette PG.

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire, Nassima SENNANI, Dalila ALMI, Chahra SENOUSSE, Samia BEDOUHENE, et en particulier à Mme CHABI-BENYAHIA

Samia et Hassina TALBI, pour toute leur aide et leur soutien. Je n'oublie pas toute l'équipe du laboratoire de microbiologie, en particulier Mme IRATNI, Melle MEGUENNI et Mr TITTOUCHE. Bien que nous ayons eu peu de contacts, ils ont toujours été gentils, agréables et enrichissants.

C'est une grande opportunité qui m'a été offerte ici pour remercier ma famille pour avoir toujours été derrière moi. A papa et maman pour leur compréhension, leur amour inconditionnel et leur support moral et intellectuel. A mes frères Abderrahim et Mohamed, à mes beaux frères Hakim et Abdellah et mes sœurs Karima, Samira et particulièrement Selma qui m'ont toujours soutenu et encouragé. A mes nièces (Yasmine, Lina et Amélia) et neveux (Samir, Yanis et Nassim), ma source de bonheur. Je ne serai pas ce que je suis sans ce que vous m'avez offert. Je vous aime.

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer toute ma gratitude à ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à son élaboration.

ISSELNANE Souad



Table des matières

Table des matières

Introduction générale

1. Synthèse des données bibliographiques

1.1. Aperçu sur le dromadaire.....	03
1.2. Anatomie et physiologie de l'estomac du dromadaire.....	03
1.3. Les enzymes coagulantes utilisées en technologie fromagère.....	05
1.3.1. Caractéristiques des enzymes coagulantes d'origine animale.....	05
1.3.1.1. Localisation tissulaire et expression.....	08
1.3.1.2. Les facteurs affectant la sécrétion des enzymes.....	09
1.3.1.3. Activation des zymogènes.....	09
1.3.1.4. La pepsine.....	10
1.3.1.5. La chymosine.....	12
1.3.2. Coagulants végétaux.....	13
1.3.3. Coagulants microbiens.....	14
1.3.4. Chymosine produite par génie génétique (FPC).....	15
1.4. Etude comparative des structures des enzymes coagulantes d'origine animale.....	17
1.4.1. Structure primaire.....	17
1.4.2. Structure secondaire et tertiaire.....	18
1.5. Site actif et mécanisme catalytique des enzymes coagulantes d'origine animale.....	18
1.6. Le site de liaison du substrat et spécificité.....	22
1.7. La coagulation.....	24
1.7.1. Mécanismes de la coagulation.....	24
1.7.1.1. Le substrat spécifique intervenant dans la coagulation.....	24
1.7.1.2. La coagulation acide.....	25
1.7.1.3. La coagulation enzymatique.....	25
1.8. L'aptitude du lait de chamelle à la coagulation enzymatique.....	26
1.9. Les facteurs affectant la coagulation enzymatique du lait.....	28
1.9.1. Effet de la température.....	28
1.9.2. Effet du pH.....	28
1.9.3. Effet de la teneur en ions calcium (CaCl ₂).....	28
1.9.4. Effet de la dose d'enzyme et de sa nature.....	28

2. Matériels et Méthodes

2.1. Matériels.....	29
2.1.1. La source enzymatique.....	29
2.1.2. Matériel biologique.....	29
2.1.3. Appareillage.....	29

2.1.4. Petit matériel.....	30
2.1.5. Produits et réactifs spécifiques.....	30
2.2. Méthodes.....	30
2.2.1. Extraction des enzymes coagulantes.....	30
2.2.2. Optimisation des conditions d'extraction des enzymes coagulantes.....	31
2.2.3. Caractérisation des extraits coagulants gastriques.....	31
2.2.3.1. Détermination de la teneur en protéines.....	31
2.2.3.2. Détermination de l'activité coagulante.....	33
2.2.3.3. Détermination de l'activité protéolytique.....	35
2.2.4. Méthode électrophorétique.....	36
2.2.4.1. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE).....	36
2.2.4.2. Conditions générales et conduite de l'électrophorèse.....	36
2.2.4.3. Conditions expérimentales.....	37
2.2.5. Purification de l'extrait enzymatique brut issu de caillettes de dromadaires adulte sur unité de chromatographie liquide basse pression (Biorad).....	40
2.2.5.1. Chromatographie d'échange d'anions sur DEAE-cellulose.....	40
2.2.5.2. Chromatographie de perméation sur Sephacryl S200.....	42
3. Résultats et Discussions	
3.1. Optimisation des conditions d'extraction des enzymes coagulantes	44
3.2. Analyse électrophorétique des extraits coagulants bruts.....	45
3.2.1. Analyse électrophorétique des extraits de caillettes de dromadaires non sevrés (NS), à alimentation mixte (M) et adultes (A).....	45
3.2.2. Caractérisation électrophorétique des extraits de caillettes de dromadaires adultes (A).....	52
3.3. Purification de l'enzyme coagulante issue de l'extrait de caillettes de dromadaires adultes par chromatographie.....	54
3.3.1. Isolement de l'enzyme coagulante par chromatographie échangeuse d'ions.....	54
3.3.2. Électrophorèse des fractions collectées durant l'élution en chromatographie échangeuse d'ions.....	59
3.3.3. Isolement de l'enzyme coagulante par chromatographie de perméation sur Sephacryl S200.....	60
Conclusion générale.....	63
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des abréviations

Abréviation	Désignation
ATPS	Système à deux phases aqueuses
α-La	α -lactalbumine
αS-CN	Caséine α S
β-CN	Caséine β
β-Lg	β -Lactoglobuline
BSA	Sérum albumine bovine
CMP	Caséinomacropéptide
DEAE	Diéthylaminoéthyl
D.O	Densité optique
EBD	Electrophorèse bidimensionnelle
ECD	Extraits issus des caillettes de dromadaires
ECD NS	Extraits issus des caillettes de dromadaires non sevrés
ECD M	Extraits issus des caillettes de dromadaires à alimentation mixte
ECD A	Extraits issus des caillettes de dromadaires adultes
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
FPC	Chymosine produite par fermentation
GRAS	“Generally Recognized As Safe”
HPLC	Chromatographie liquide de haute performance
kDa	Kilo Dalton
k-CN	Caséine kappa
LABAB	Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies
MM	Masse moléculaire
2-ME	2-mercaptoéthanol
OV	Ovalbumine
PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
pHi	pH isoélectrique
PM	Poids moléculaire
R²	Coefficient de corrélation
TCA	Acide trichloracétique
TEMED	N, N, N', N'- tétraméthyl- éthylène diamine
Tris	Tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane
UP	Unité présure

Liste des figures

<i>Figures</i>	<i>Titre</i>	<i>Pages</i>
Figure 01	Anatomie de l'estomac d'un ruminant (a) et d'un camélidé (b).....	04
Figure 02	Coupe d'une crypte gastrique avec agrandissement de la partie de la glande sécrétrice d'enzymes et d'acide.....	08
Figure 03	Structure tridimensionnelle du pepsinogène A porcin.....	19
Figure 04	Structure tridimensionnelle de la chymosine bovine recombinante (a) et cameline recombinante (b).....	19
Figure 05	Structure tridimensionnelle du site actif et la région environnante de la pepsine porcine.....	21
Figure 06	Mécanisme d'action des protéases aspartiques.....	21
Figure 07	Les séquences de la caséine κ autour de la liaison peptidique sensibles à l'action de la chymosine.....	23
Figure 08	Modèle hypothétique de la structure tridimensionnelle de la caséine κ bovine.....	25
Figure 09	Protocole d'isolement des extraits enzymatiques gastriques préconisé par VALLES et FURET (1977).....	32
Figure 10	Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de LOWRY <i>et al</i> (1951).....	33
Figure 11	Préparation du substrat standard (poudre de lait reconstituée).....	34
Figure 12	Mesure du temps de floculation par la méthode de BERRIDGE (1945) modifiée par COLLIN <i>et al</i> (1977).....	34
Figure 13	Photographie de l'unité d'électrophorèse sur mini-cuve HOEFFER SE 280...	38
Figure 14	Courbe de calibration du gel de séparation en PAGE-SDS.....	39
Figure 15	Unité de chromatographie liquide basse pression BioLogic LP System (BioRad).....	41
Figure 16	Structure de la DEAE cellulose	41
Figure 17	Structure partielle du Sephacryl S200.....	42
Figure 18	Graphique du log de la masse moléculaire en fonction du volume élué.....	43
Figure 19	Variation de l'activité coagulante et protéolytique pour les trois ECD dans les conditions de macération de 42°C et 0,2 M.....	45
Figure 20	Profil électrophorétique en PAGE-SDS avec β -ME des extraits de caillettes de dromadaires. (T=17%, C= 2,7%).....	47
Figure 21	Profil électrophorétique en PAGE-Native des extraits de caillettes de dromadaires. (T=12%, C= 2,7%).....	50
Figure 22	Profil électrophorétique des extraits de caillettes de dromadaires non sevrés en électrophorèse bidimensionnelle.....	50

Figure 23	Profil électrophorétique en PAGE-SDS des extraits de caillettes de dromadaires adultes (T=17%, C= 2,7%).....	53
Figure 24	Profil électrophorétique des extraits de caillettes de dromadaires adultes en électrophorèse bidimensionnelle.....	53
Figure 25a	Profil d'élution sur DEAE-Cellulose DE52 de l'extrait enzymatique brut issu de caillettes de dromadaires adultes.....	56
Figure 25b	PAGE-SDS des fractions collectées durant l'élution (F1 à F5).....	56
Figure 26	Profil d'élution sur DEAE-Cellulose DE52 de la chymosine recombinante (ChyMax).....	57
Figure 27	Profil d'élution sur DEAE-Cellulose DE52 de la pepsine porcine.....	57
Figure 28a	Profil d'élution sur Sephacryl S200 de la fraction coagulante issue de l'échange ionique.....	61
Figure 28b	PAGE-SDS des fractions collectées durant l'élution (F1 et F2).....	61

Liste des tableaux

<i>Tableaux</i>	<i>Titre</i>	<i>Pages</i>
Tableau I	Principales caractéristiques physico-chimiques des enzymes coagulantes utilisées en fromagerie.....	06
Tableau II	Comparaison des différentes caractéristiques de la pepsine A, B et C...	10
Tableau III	Principales différences entre la chymosine A, B et C.....	13
Tableau IV	Exemples de chymosine pure produite par fermentation à l'aide d'un micro-organisme hôte.....	15
Tableau V	Méthodes de correction de l'aptitude fromagère du lait de chamelle.....	27
Tableau VI	Caillettes de dromadaires utilisées.....	29
Tableau VII	Résumé de la purification de l'extrait coagulant du dromadaire adulte.....	54

Liste des annexes

<i>Annexes</i>	<i>Titre</i>
Annexe 01	Systématique des camélidés.
Annexe 02	Nombre de dromadaire dans les pays ayant plus de 0,1 million de tête camelines (FAO 2010).
Annexe 03	Les principaux fournisseurs de coagulants microbiens (GERMONVILLE, 2003)
Annexe 04	Alignement de la séquence primaire de la chymosine bovine (variant B) (FOLTMANN <i>et al</i> , 1977) et cameline (KAPPELER <i>et al</i> , 2006).
Annexe 05	Alignement de la séquence primaire de la pepsine porcine (Pepsine A) (MORAVEK et KOSTKA, 1974) et cameline (KAPPELER <i>et al</i> , 2006).
Annexe 06	Alignement de la séquence primaire de la CN- κ bovine (variant A) (JOLLÈS <i>et al</i> , 1972) et cameline (KAPPELER <i>et al</i> , 1998).
Annexe 07	Les acides aminés qui délimitent le site de liaison de la chymosine cameline et bovine au substrat (JENSEN <i>et al</i> , 2013).
Annexe 08	Caractères comparés des gels lactiques et présures.
Annexe 09	Détermination de la teneur en protéines par la méthode de LOWRY <i>et al</i> (1951).
Annexe 10	Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-native).
Annexe 11	Electrophorèse en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-SDS).
Annexe 12	Préparation des solutions pour chromatographie.

Résumé :

Le lait de dromadaire est un produit noble qui présente une grande valeur nutritionnelle. Sa production dans le monde et dans notre pays ne cesse de s'accroître, ce qui nécessite le recours à la transformation d'une bonne proportion en produits dérivés. Pour peu que la phase de coagulation limitante soit bien cernée et améliorée.

Aussi, dans le cadre de la recherche de voies de substitution ou d'amélioration de cette étape, les travaux menés au sein de notre laboratoire ont montré que l'extrait issu de caillettes de dromadaires adultes permet d'avoir une bonne activité coagulante et une activité protéolytique limitée.

Dans le présent travail, nous avons isolé et caractérisé les extraits enzymatiques issus de trois types de caillettes de dromadaires : non sevrés, à alimentation mixte et adultes. Les paramètres étudiés (température de macération des caillettes et concentration en HCl) ont tous des effets sur les caractéristiques des extraits, notamment sur leur activité coagulante et protéolytique.

L'extrait enzymatique issu de caillettes de dromadaires adultes a montré une plus grande thermostabilité que l'extrait issu de caillettes de dromadaires non sevrés et à alimentation mixte avec une température optimale de catalyse de 42, 40 et 40°C respectivement.

L'extrait issu de caillettes de dromadaires adultes a été ensuite séparé et purifié par chromatographie liquide sur DEAE 52 suivi d'une chromatographie de perméation sur Sephacryl S200 en utilisant une unité de chromatographie liquide basse pression (Biorad).

La caractérisation des différentes fractions recueillies a montré deux fractions (F3 et F5) présentant une activité coagulante sont éluées respectivement à 0,1M et 0,45M en NaCl. La fraction F5 présente une activité enzymatique supérieure à la fraction F3. La masse moléculaire de la fraction la plus active est estimée à environ 42 kDa sur PAGE-SDS. Cette MM est similaire avec ou sans ajout de β -mercapto-éthanol. En PAGE native, l'enzyme migre en une seule bande de forte intensité ayant un niveau de migration similaire avec celui de la pepsine porcine. En électrophorèse bidimensionnelle (PAGE native x PAGE SDS), cette bande se focalise en un spot unique, assez intense.

Mots clés : enzyme coagulante / caillettes / dromadaires / isolement / chromatographie/ électrophorèse

Abstract :

Camel milk is a noble product that has a high nutritional value. Production in the world and in our country continues to increase, necessitating the use of the transformation of a good proportion of derivative products. As long as the phase of coagulation is well identified and improved.

In addition, as part of the search for ways of replacing or improving the coagulation step, the work in our laboratory have demonstrated that the extract from the weaned dromedary abomasums provides a good coagulant activity and limited proteolytic activity.

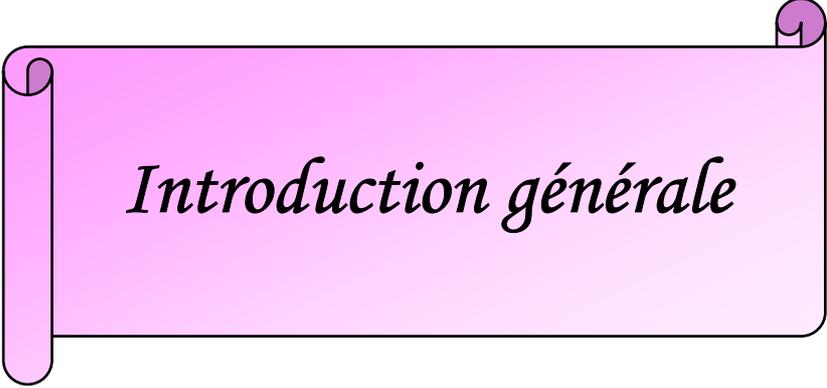
In the present research, we have isolated and characterized the enzymatic extracts from three types of dromedary abomasums: unweaned, mixed diet and weaned. The studied parameters (temperature maceration and HCl concentration) all have effects on the characteristics of the extracts including their clotting and proteolytic activity.

The enzyme extracted from the weaned dromedary abomasum have shown greater thermal stability than the extract from the unweaned and mixed diet dromedary abomasum with an optimum temperature of catalysis 42, 40 and 40 °C respectively.

Then, the extract from the weaned dromedary abomasum have been separated and purified, using the low pressure liquid chromatography (Biorad), on DEAE 52 followed by Sephacryl S200 gel.

The characterization of the various collected fractions have shown that two fractions (F3 and F5) presenting a clotting activity are eluted at 0,1 M and 0,45 M in NaCl respectively. Fraction F5 has an enzymatic activity more than the Fraction F3. The molecular weight of the most active fraction is estimated at about 42 kDa on SDS-PAGE. This MW is similar with or without the addition of β -mercaptoethanol. In native PAGE the enzyme migrates as a single band having a high intensity with a similar level of migration to that of porcine pepsin. In two dimensional electrophoresis (PAGE native x PAGE SDS), the band concentrates on a single spot, quite intense.

Key words: clotting enzyme / abomasum / dromedary / isolation / chromatography/ electrophoresis



Introduction générale

Introduction générale

Par ses caractéristiques morphologiques, physiologiques et comportementales, lui permettant de produire et de se nourrir dans les conditions écologiques les plus difficiles, le dromadaire demeure l'animal d'élevage le plus adapté aux régions désertiques. Cet animal a toujours joué, et joue encore, un rôle considérable dans le développement de l'économie régionale des zones arides de par le monde, par ses productions et services variés.

Parmi ces productions, le lait camelin est un aliment de grande valeur nutritionnelle, car bien équilibré en nutriments de base (glucides, lipides et protides). Il se singularise en outre par sa richesse en vitamine C en oligoéléments et en certaines protéines et enzymes (lysozyme, lactoperoxydase, lactoferrine) qui forment un système protecteur puissant avec une activité antimicrobienne intense. Les vertus thérapeutiques qui lui sont attribuées et sa valeur alimentaire plaident naturellement en faveur du développement et de l'extension de l'élevage camelin laitier.

Néanmoins, et comparativement au lait d'autres espèces, le lait de chamelle, du fait de sa composition et de la structure particulière de certains de ses nutriments, présente des particularités qui limitent sa transformation technologique en produits dérivés (fromage, beurre...etc) .

La faible aptitude à la coagulation enzymatique de ce lait aboutit à une affinité limitée pour la présure, principal coagulant dans l'industrie fromagère, et à une structuration limitée des gels formés. La coagulation acide n'est pas meilleure. Riche en produits antibactériens, le lait de chamelle a tendance à inhiber naturellement l'acidification lactique par voie fermentaire.

Pour remédier au retard à la coagulation de ce lait, plusieurs travaux, de par le monde, ont porté sur les voies d'amélioration de la phase de coagulation de ce lait. Ainsi, certains auteurs mentionnent la possibilité de fabriquer du fromage uniquement après avoir opéré des mélanges avec des laits possédant de bonnes aptitudes fromagères (vache, bufflonne, chèvre, brebis...). Par ailleurs, d'autres auteurs signalent la nécessité d'employer la présure à une concentration élevée pour obtenir un bon coagulum, qui malgré tout reste mou, friable et d'aspect floconneux.

Par ailleurs et afin de remédier à cet état de fait et proposer des voies de substitutions avantageuses, des essais ont montré que la pepsine présente une bonne affinité pour coaguler le lait camelin. Récemment, les travaux menés au Laboratoire LABAB de l'UMMTO par SIBOUKEUR *et al* (2005) et BOUDJNAH-HAROUN *et al* (2011), ont montré que l'extrait coagulant issu de caillettes de dromadaires adultes a montré une bonne activité coagulante (pour le lait camelin et bovin) et une faible activité protéolytique.

En effet, le choix des enzymes coagulantes à employer et une connaissance plus approfondie de leurs propriétés demeure un des facteurs déterminants de la réussite de la coagulation de ce lait. C'est dans ce cadre de préoccupation que nous nous sommes intéressées aux extraits de caillettes de dromadaires et plus particulièrement à ceux issus d'animaux adultes.

Ainsi, afin de connaître davantage cet extrait qui a présenté une bonne aptitude à la coagulation de ce lait, nous nous sommes proposé de le caractériser au niveau moléculaire en utilisant les techniques appropriées d'analyses biochimiques, particulièrement les techniques chromatographiques (échange d'ions, perméation sur gel) et électrophorétiques sur gels de polyacrylamide dans plusieurs conditions.

*Synthèse des données
bibliographiques*



1. Synthèse des données bibliographiques

1.1. Aperçu sur le dromadaire

Les Camélidés sont des mammifères Artiodactyles appartenant au sous-ordre des Tylopodes dont ils constituent l'unique famille. Cette dernière ne comporte que trois genres (*Camelus*, *Lama* et *Vicugna*). Le genre *Camelus* comporte deux espèces : *Camelus dromedarius* (dromadaire à une seule bosse) et *Camelus bactrianus* (chameau de Bactriane à deux bosses) vivants en Afrique et en Asie. Le genre *Lama* comporte trois espèces : *Lama glama* (lama), *Lama guanicoe* (guanaco) et *Lama pacos* (alpaga ou alpaca). Enfin, le genre *Vicugna* comporte une espèce : *Vicugna vicuna* (vigogne) vivants en Amérique du sud (Annexe 01).

Le dromadaire (*Camelus dromedarius*) est propre au Sahara et aux régions limitrophes ainsi qu'à la péninsule arabe. Il est utilisé pour le transport dans ces régions, il est également élevé pour son cuir, sa fourrure, sa viande et son lait.

Actuellement, le cheptel camelin total recensé dans le monde est d'environ 25 millions de têtes selon les estimations de la FAO (2010). Ce chiffre semble bien en dessous de la réalité car le caractère nomade de l'élevage camelin ne facilite pas le recensement des effectifs. L'Afrique héberge à elle-seule 80% du cheptel mondial, dont 60% se concentre au niveau de la Somalie et le Soudan (Annexe 02). Le nombre de têtes du cheptel camelin algérien a été estimé par la FAO à 345 000 en 2013, alors qu'il n'était que de 150 870 en 1997.

FAYE (2003), a rapporté que la production mondiale en lait de chamelle est estimée à 1,3 millions de tonnes en 2002. Ce chiffre a pratiquement quadruplé dix années plus tard (soit 5,4 millions de tonnes). Dans notre pays, la production de lait varie de 0,5 à 10 kg par jour suivant les différentes populations camélines. Le lait produit est généralement utilisé pour l'allaitement des chameaux et pour l'autoconsommation (CHEHMA, 2003).

1.2. Anatomie et physiologie de l'estomac du dromadaire

De nombreuses études et revues bibliographiques décrivent l'anatomie du tube digestif (VALLENAS *et al*, 1971 ; LECHNER-DOLL *et al*, 1995), l'histologie des muqueuses (SALIMI NAGHANI *et al*, 2010 ; SALIMI NAGHANI, 2011 ; RAJI, 2011), la physiologie du tube digestif (WILSON, 1989 ; SOUILEM et BARHOUMI, 2009) ainsi que la digestion microbienne chez le dromadaire (JOUANY et KAYOULI, 1989).

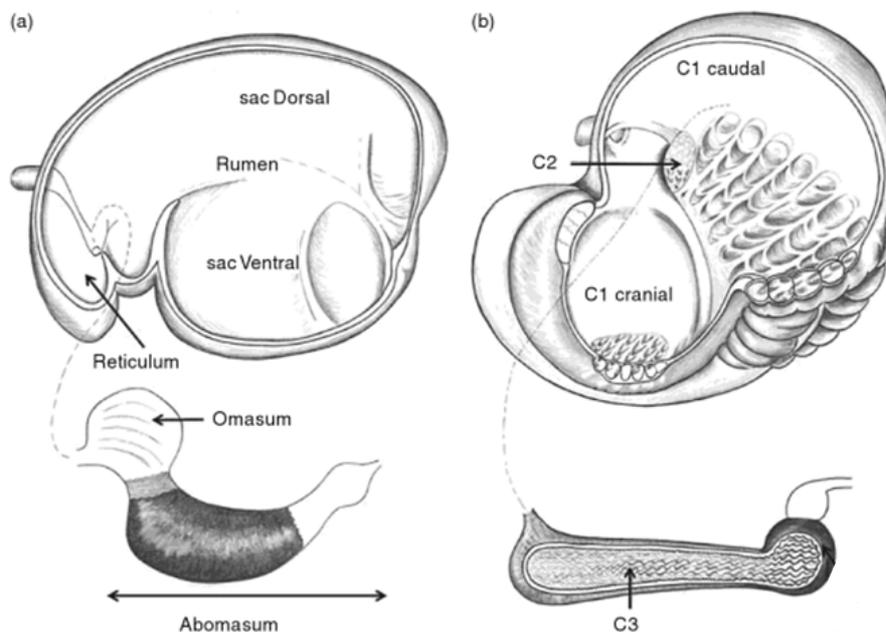
L'anatomie de l'estomac du dromadaire diffère de celle des ruminants (KAY et MALOY, 1989). Les ruminants présentent un estomac divisé en quatre sacs de grandeur inégale : le rumen, le réticulum, l'omasum et l'abomasum (la caillette). Les trois premiers compartiments sont non glandulaires et assurent une digestion microbienne. La digestion enzymatique est réalisée dans la caillette qui est l'analogue de l'estomac d'un monogastrique comme l'homme (GALLOUIN et FOCANT, 1980).

Le dromadaire n'a que trois compartiments (VALLENAS *et al*, 1971 ; LECHNER-DOLL *et al*, 1995) (Figure 01) :

- un grand compartiment dit C1 (70% du volume total de l'estomac), correspondant au rumen ;

- un compartiment relativement petit (7% du volume total de l'estomac) en forme de rein dit C2 (correspondant au réticulum), (LECHNER-DOLL *et al*, 1995 ; ABDEL-MAGIED et TAHA, 2003) ;
- enfin, un compartiment tubulaire C3 (comme l'omasum) ; long tube dont la partie interne est tapissée d'une muqueuse glandulaire et qui se termine par une partie constituée de glandes gastriques sécrétrices d'enzymes et d'acide chlorhydrique (DOUGBAG et BERG, 1981 ; JOUANY et KAYOULI, 1989 ; LECHNER-DOLL *et al*, 1995).

L'intérieur des compartiments C1 et C2 présente des sacs glandulaires ou aquifères auxquels on attribue un rôle important dans l'absorption des produits de la fermentation (acides gras volatils, ammoniacque,..) et dans la formation de substances tampons (DELLMANN *et al*, 1968 ; EERDUNCHAOLU *et al*, 1999).



**Figure 01 : Anatomie de l'estomac d'un ruminant (a) et d'un camélidé (b)
(AL JASSIM et HOGAN, 2013).**

Concernant la physiologie digestive, le dromadaire présente une meilleure capacité à digérer les fourrages pauvres que les ruminants domestiques grâce à la combinaison d'une importante activité cellulolytique microbienne dans les pré-estomacs (WILIAMS, 1963 ; SELIM *et al*, 1999) et d'un temps de séjour plus long de particules alimentaires permettant aux micro-organismes fixés d'être plus efficaces (KAYOULI *et al*, 1995).

Selon EMMANUEL *et al* (1976), les camélidés ont une meilleure aptitude au recyclage de l'azote uréique sanguin, comparé aux ruminants. Ce phénomène augmente dans le cas d'un régime alimentaire pauvre en protéines et/ou de déshydratation (GIHAD *et al*, 1989 ; SOUILEM et DJEGHAM, 1994). Dans ce processus, l'urée est réintroduite dans le compartiment digestif où il peut être utilisé par les bactéries symbiotiques pour la synthèse des protéines (SOUILEM et BARHOUMI, 2009).

1.3. Les enzymes coagulantes utilisées en technologie fromagère

Les enzymes coagulantes sont des enzymes protéolytiques retrouvées chez tous les organismes vivants. Ce sont des endopeptidases appartenant à la famille des protéinases aspartiques car elles possèdent deux résidus aspartyls dans le site actif impliqués de manière décisive dans la catalyse (RAWLINGS *et al*, 2004). Elles ont un pH optimal dans la gamme des acides et sont inhibées par la pepstatine (FRUTON, 1976).

Elles sont utilisées depuis très longtemps dans la fabrication de fromage. En 1874, Hansen, un pharmacien danois, commercialise la première présure qui est une préparation coagulante extraite de l'abomasum de veau non sevré et renfermant deux enzymes actives : la chymosine (80%) et la pepsine (20%). Cet extrait est depuis standardisé et utilisé directement par l'industrie laitière.

Actuellement, la présure de veau est la plus largement utilisée en fromagerie (MAHAUT *et al*, 2000 ; RAMET, 2006). Toutefois, elle couvre seulement 20 à 30% de la demande mondiale en coagulants (JACOB *et al*, 2011). De nombreux substituts d'origines animale, végétale, microbienne ou par voie génétique (chymosine) ont été proposés, mais seuls quelques-uns se sont révélés aptes à une production fromagère de haute qualité.

En effet, Les enzymes coagulantes de remplacement doivent répondre à un certain nombre de conditions :

- l'activité protéolytique doit être faible comparativement à l'activité coagulante ;
- la spécificité protéolytique sur la β -caséine doit être faible, sinon l'amertume se produit dans le fromage (DALGLEISH, 1992 ; FOX et KELLY, 2004) ;
- la pureté chimique et la qualité microbiologique doivent être élevées ;
- le rendement fromager devrait être identique à celui de la présure (GERMONVILLE, 2003 ; MISTRY, 2012).

Dans ce cadre, la chymosine fermentaire représente 70-80% du marché mondial des coagulants (JOHNSON et LUCEY, 2006).

En France, les protéases d'origine animale et microbienne sont les plus utilisées en fromagerie (33% pour la présure ; 53% pour les enzymes microbiennes (35% pour *Mucor miehei* et 18% pour *Cryphonectria parasitica*), la chymosine fermentaire représente seulement 14% (ANONYME 1, 2010). Aux Etats Unis d'Amérique et en Grande Bretagne, 80 à 90% des fromages sont produits par la chymosine fermentaire (ANONYME 2, 2010).

Le tableau I résume les principales caractéristiques physico-chimiques des enzymes coagulantes utilisées au niveau industriel.

1.3.1. Caractéristiques des enzymes coagulantes d'origine animale

L'extrait de caillette des mammifères contient des protéases gastriques responsables de la digestion des aliments. Elles sont classées en 4 groupes selon leurs propriétés enzymatiques et immunochimiques : la pepsine A (EC 3.4.23.1), la pepsine B (EC 3.4.23.2), la pepsine C ou gastricine (EC 3.4.23.3) et la chymosine (EC 3.4.23.4) (TANG *et al*, 1973 ; FOLTMANN *et al*, 1981 ; KAGEYAMA, 2002 ; NARITA *et al*, 2002).

La pepsine A et la pepsine B sont dominantes et caractérisent la sécrétion stomacale du mammifère adulte, tandis que la chymosine est dominante chez les animaux non sevrés (TANG *et al*, 1973 ; FOLTMANN *et al*, 1978 ; KAGEYAMA, 2002).

Tableau I : Principales caractéristiques physico-chimiques des enzymes coagulantes utilisées en fromagerie.

Origine	coagulant	espèces	MM (kDa)	pHi	Nombre d'isoformes	pH optimum	Température optimale °C	Glycosylation	Phosphorylation	Références
animale	chymosine	bovine	36 ± 1	4,5-5,0	A, B et C	5,5-6,0	--	Non glycosylée	--	BAUDYŠ <i>et al</i> , 1988 ; FOLTMANN, 1993 ; MARTIN et CORRE, 1984
		cameline	52 et 39	--	--	5,8-6,0	50	--	--	ELAGAMY <i>et al</i> , 2000
		caprine	36	4,6-5,1	2 à 3	5,5 à 6,0	65 à pH 5,5/ 46 à pH 6,6	Non glycosylée	--	KUMAR <i>et al</i> , 2006 ; MOSCHOPOULOU <i>et al</i> , 2006
		ovine	36 ± 1	4,8	--	--	--	Non glycosylée	--	BAUDYŠ <i>et al</i> , 1988
		buffle	36 ± 1	--	3	5,5 à 6	45 à 55	Non glycosylée	--	ABDEL MALAK <i>et al</i> , 1996 ; ELAGAMY <i>et al</i> , 2000 ; MOHANTY <i>et al</i> , 2003
	pepsine	bovine	33	3,0	4	1,5 à 2,2	40	--	Oui	MARTIN <i>et al</i> , 1982a ; MARTIN, 1984 ; RAMPILLI <i>et al</i> , 2005
		cameline	35,5 et 34,7	--	2	1.8*	--	Non glycosylée	Oui	ABUHARFEEL ET ABUEREISH, 1984 ; AL-MZAIEN, 2007
		caprine	39 à 41	3,0	A : 3 C : 2	--	--	Non glycosylée	Probable	SUZUKI <i>et al</i> , 1999 ; MOSCHOPOULOU <i>et al</i> , 2006
		ovine	34-37	--	--	--	--	--	--	FOX <i>et al</i> , 1977 ; BAUDYŠ <i>et al</i> , 1988
		porcine	34,5	--	A, B, C et D	1,5 à 2,2	--	--	Ser 68	TANG <i>et al</i> , 1973 ; CUVELLIER, 1993

	végétale	<i>Cynara cardunculus L.</i>	--	--	--	6,0	37	--	--	CHEN <i>et al</i> , 2003
microbienne	Moisissures	<i>Rhizomucor miehei</i>	40,5	--	--	6,6-6,8	60	--	--	PREETHA et BOOPATHY 1997 ; ROGELJ <i>et al</i> , 2001
		<i>Rhizomucor pusillus</i>	49	--	--	--	50	--	--	NOUANI <i>et al</i> , 2009
fermentaire	chymosine	bovine	36 et 40	4,8	--	4,5	37	--	--	VALLEJO <i>et al</i> , 2008 ; JENSEN <i>et al</i> , 2013
		cameline	40	5,5	--	5,8	40	--	--	KAPPELER <i>et al</i> , 2006
		caprine	46 et 49	--	--	--	--	--	--	VEGA-HERNANDEZ <i>et al</i> , 2004
		ovine	40	4,8	--	6,6-6,8	40	--	--	ROGELJ <i>et al</i> , 2001
		<i>Rhizomucor pusillus</i>	44	--	--	5,0	--	--	--	BELDARRAIN <i>et al</i> , 2000

Légende: (--): Non rapportée ; * : activité sur l'hémoglobine

La gastricine est un constituant mineur représentant moins de 1% des enzymes totales chez le veau préruminant et environ 5% chez l'adulte (RAMPILLI *et al*, 2005).

1.3.1.1. Localisation tissulaire et expression

Chez les ruminants, la caillette est divisée histologiquement en trois parties : cardiaque, fundique et pylorique. (GUILLOTEAU *et al*, 1982). Chez le dromadaire, elle est formée de quatre régions différentes : cardiaque, pseudo-cardiaque, fundique et pylorique (WANG *et al*, 2000 ; ABDEL-MAGIED et TAHA, 2003).

Les régions cardiaque et pylorique secrètent du mucus tandis que la région fundique secrète principalement de l'acide chlorhydrique (HCl) et des enzymes (GUILLOTEAU *et al*, 1982) (Figure 02). Cette dernière occupe le 1/5 de l'abomasum chez le dromadaire (DOUGBAG et BERG, 1981), le 2/3 chez les ruminants, plus de 50% de l'estomac chez les carnivores et 80% chez l'homme (EURELL et FRAPPLER, 2006).

Chez le dromadaire, RAJI (2011) a observé, dans ces glandes gastriques, quatre types cellulaires similaires à celles retrouvées chez les autres ruminants :

- les cellules muqueuses productrices de mucus pour protéger la muqueuse de l'activité hydrolytique des protéases et l'HCl ;
- les cellules pariétales produisant du HCl ;
- les cellules principales ou peptiques produisant des protéases ;
- les cellules endocrines libérant la gastrine qui stimule la sécrétion d'HCl et d'enzymes.

Les études immunohistochimiques menées par ANDREN *et al* (1982) ont montré que chez le veau pré-ruminant, le pepsinogène et la prochymosine sont simultanément produits par toutes les cellules principales et une partie des cellules muqueuses. Après sevrage, la prochymosine est uniquement produite par les cellules principales localisées dans la partie supérieure de la glande gastrique alors que le pepsinogène continue d'être produit par toutes les cellules principales et la plupart des cellules muqueuses.

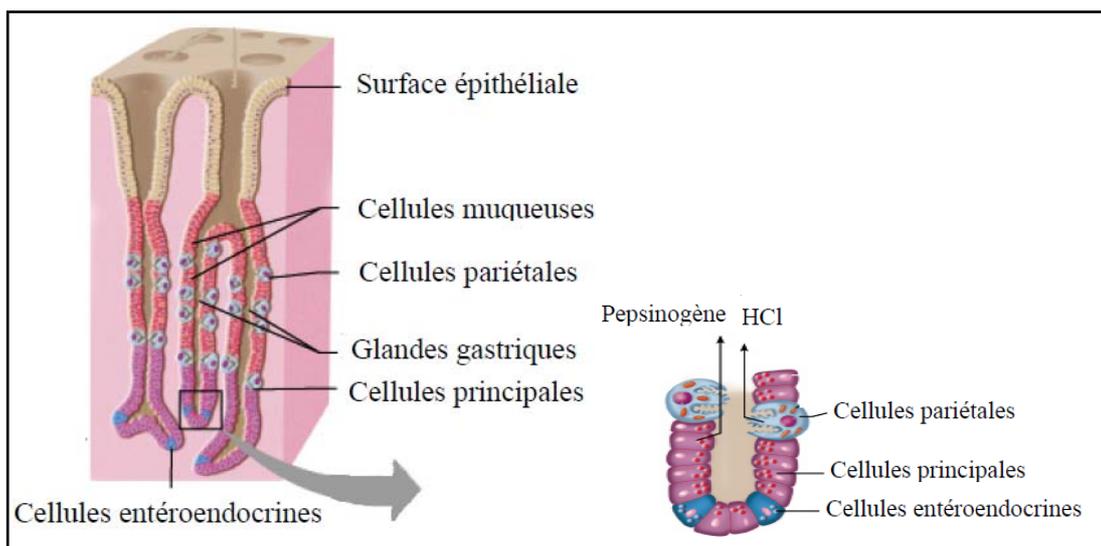


Figure 02 : Coupe d'une crypte gastrique avec agrandissement de la partie de la glande sécrétrice d'enzymes et d'acide (SIDIKOU *et al*, 2005).

1.3.1.2. Les facteurs affectant la sécrétion des enzymes

Les sécrétions enzymatiques abomasales sont influencées par l'âge, le sevrage et le régime alimentaire du ruminant (ANDREN *et al*, 1980 ; GUILLOTEAU *et al*, 1982).

La sécrétion du pepsinogène, de la progastricine et de la prochymosine commence très tôt au cours de la vie fœtale même si elle semble très faible à ce stade de développement (SIDIKOU *et al*, 2005). La prochymosine est produite à la 10^{ème} semaine de gestation (MIURA *et al*, 1988 ; ANDREN, 1992) tandis que le pepsinogène et la progastricine sont produits respectivement à la 20^{ème} et 25^{ème} semaine de gestation chez les fœtus de veau (ANDREN *et al*, 1982).

Après la naissance, chez le veau nouveau-né, les potentialités de sécrétions de la prochymosine et du pepsinogène augmentent au cours des deux premiers jours de vie. Il a été rapporté la présence dans la caillette de concentrations de prochymosine 5 à 10 fois supérieure à celles du pepsinogène A (GUILLOTEAU *et al*, 1984 ; ANDREN, 1992). Au sevrage, 6 à 10 semaines après la naissance, le niveau de prochymosine diminue et la quantité de pepsinogène A et progastricine sécrétées augmentent (ANDREN *et al*, 1982 ; GUILLOTEAU *et al*, 1985). Avec l'âge, le pepsinogène A devient le zymogène dominant dans la muqueuse de la caillette (VALLES et FURET, 1981) ; en revanche, la quantité de prochymosine devient négligeable mais jamais nulle (FOLTMANN, 1992).

La production de la prochymosine est sensiblement liée à la consommation de lait (GARNOT *et al*, 1977 ; ANDREN et BJORCK, 1986). Le pepsinogène est exprimé à de faibles niveaux aussi longtemps que le veau reçoit du lait. Il a été rapporté que la consommation de nourriture solide fait diminuer la sécrétion de prochymosine et augmente celle du pepsinogène (SIDIKOU *et al*, 2005).

Selon GARNOT *et al* (1977), la sécrétion de la chymosine semble être indépendante de l'âge des animaux alors qu'il a été observé que la sécrétion de pepsine augmente avec l'âge du veau. La production de progastricine semblait être influencée seulement par l'âge du veau (CYBULSKI et ANDREN, 1990 ; ANDREN, 1992).

1.3.1.3. Activation des zymogènes

Les enzymes coagulantes sont excrétées à l'état de précurseurs inactifs (zymogènes) : pepsinogène, progastricine et prochymosine, pour protéger le tissu gastrique d'une autodigestion (FOLTMANN, 1981 ; 1988). Ces précurseurs sont stables à pH neutre mais à pH inférieur à 5, ils sont activés (ANTONINI et RIBADEAU DUMAS, 1971).

Cette activation intervient spontanément dans l'estomac suite à différents changements conformationnels ainsi qu'à des clivages intra ou intermoléculaires d'un pro-segment N-terminal qui, à pH neutre, va se loger dans leur site actif, bloque l'entrée du substrat dans le site actif et maintient ainsi l'enzyme sous sa forme inactive (Al-JANABI *et al*, 1972 ; RICHETER *et al*, 1998 ; KHAN et JAMES 1998 ; KAGAYAMA, 2002).

A pH neutre, les interactions électrostatiques entre les acides aminés basiques du pro-segment (Lys 36p) et les deux acides aspartiques (Asp 32 et Asp 215) du site catalytique maintiennent le zymogène sous sa forme inactive. A pH inférieur à 5, les résidus acides de l'enzyme deviennent protonés, ce qui va interrompre les interactions électrostatiques entraînant un changement conformationnel qui conduit à l'apparition du site actif sans coupure du pro-segment (MARCINISZYN *et al*, 1976 ; NIELSEN et FOLTMANN, 1993).

L'activation par le mode intramoléculaire, où la molécule se digère elle-même, est accentuée par la présence d'un pH acide (pH < 3) et une concentration protéique inférieure à 1 mg/ml (AL-JANABI *et al*, 1972 ; HARTSUCK *et al*, 1977). Le prosegment est partiellement clivé ce qui conduit à la formation d'un intermédiaire actif appelé pseudoenzyme (DYKES et KAY, 1976). A pH plus élevé (pH 3-4), l'activation par le mode intermoléculaire, où les molécules enzymatiques se digèrent les unes les autres, devient dominant (KAGEYAMA et TAKAHASHI, 1983). Le prosegment est entièrement clivé (SZECSI, 1992).

1.3.1.4. La pepsine

La pepsine, découverte par Theodor Schwann en 1825, fut la première enzyme identifiée dans la famille des protéases aspartiques. En 1836, Schwann avait dénommé pepsine la protéase qu'il avait obtenue à partir de l'estomac de porc (FOLTMANN *et al*, 1995). Le tableau II résume les caractéristiques de différentes pepsines.

Tableau II : Comparaison des différentes caractéristiques de la pepsine A, B et C.

Paramètres		Pepsine A	Pepsine B	Pepsine C ou Gastricine
localisation		caillettes d'animaux adultes	muqueuse gastrique du porc et du chien	caillettes d'animaux adultes
Nombre d'acides aminés	Pro-enzyme	372	360	374
	Enzyme mature	327	320	331
PM	Pro-enzyme	40	41	40
	Enzyme mature	34,6	39	32,8
pHi		3,5	--	3,5 à 4,0
Phosphorylation (phosphore/mol de P)		0 à 3	--	0 à 2
pH optimum d'activité protéolytique sur l'hémoglobine		2	3	3
Température optimale		40°C	--	40°C
pH d'inactivation		> 6,5	--	> 6,5
Température d'inactivation		> 55°C	--	> 55°C
liaisons préférentiellement clivées		Phe-Trp, Phe-Tyr et Phe-Phe	Phe-Tyr	Tyr-X
Références		TANG <i>et al</i> , 1973 ; MEITNER et KASSELL, 1971 ; HARBOE et FOLTMANN, 1975 ; MUNOZ <i>et al</i> , 2004.	RYLE, 1965 ; NIELSEN et FOLTMANN, 1995 ; NARITA <i>et al</i> , 2002 ; SUCHODOLSKI <i>et al</i> , 2002 ; KAGEYAMA, 2002.	TANG <i>et al</i> , 1959 ; TANG, 1970 ; AUFFRET et RYLE, 1979 ; FOLTMANN et JENSEN, 1982 ; MARTIN <i>et al</i> , 1982b ; KAGEYAMA, 2000 ; HASSAN <i>et al</i> , 2010.

Légende : (--) : Non rapportée ; (phosphore/mol de P) : atomes de phosphore par molécule de pepsine.

La pepsine a un caractère plus acide que la chymosine avec un optimum compris entre pH 1,5 et 2,0 (RAMET, 2006). Elle reste stable, et toujours très actif, lorsque le pH descend à 1,0 (RYLE, 1970). L'activité chute rapidement au-dessus de pH 6,3 (RAMET, 2006) et devient irréversiblement inactive à un pH d'environ 7 (LIN *et al*, 1993).

L'activité protéolytique de la pepsine est assez voisine de celle de la chymosine, mais son action est fortement dépendante du pH du milieu (RAMET, 2006). En milieu acide, la pepsine bovine est plus active que la chymosine (RAMET, 1993) ; Par contre à pH 6,8, la chymosine a une vitesse de protéolyse supérieure (GOURSAUD, 1992). L'activité coagulante décroît fortement au-dessus de pH 6,3; au pH du lait frais (6,65–6,75), la coagulation n'apparaît pas (RAMET, 1993 ; 2006).

En raison de sa large spécificité, la pepsine produit de nombreux peptides lors de la digestion. De ce fait, elle peut être un outil intéressant pour la cartographie des protéines (ZHANG et SMITH, 1993 ; AHN *et al*, 2013). Elle est également utilisée pour l'extraction du collagène (NALINANON *et al*, 2007), de la gélatine (NALINANON *et al*, 2008), en tant que substitut de la présure (AEHLE, 2007) et comme moyen de diagnostic des ulcères chez l'homme (JANOWITZ et HOLLANDER, 1952 ; LEWIN et BONFILS, 1968), et des parasitoses à *Ostertagia* sp. chez le bovin (SIDIKOU *et al*, 2005).

La pepsine a été isolée et étudiée chez divers mammifères, y compris chez l'homme (SOGAWA *et al*, 1983), le singe (KAGEYAMA et TAKAHASHI, 1976), le porc (NIELSEN et FOLTMANN, 1995), le camelin (ABUHARFEEL ET ABUEREISH, 1984 ; AL-MZAIEN, 2007), le bovin (MARTIN *et al*, 1982a), la chèvre (SUZUKI *et al*, 1999), le rat (MUTO et TANI, 1979), le lapin (KAGEYAMA *et al*, 1990) et le poisson (GILDBERG, 1992 ; WU *et al*, 2009).

La pepsine cameline a été isolée et caractérisée par ABUHARFEEL et ABUEREISH (1984) ainsi qu'AL-MZAIEN (2007). Ces auteurs ont mis en évidence l'existence de deux isoenzymes : la pepsine I et la pepsine II, dans la muqueuse gastrique cameline. Leurs poids moléculaires respectifs sont estimés par électrophorèse PAGE-SDS à 35,5 et 34,7 (ABUHARFEEL ET ABUEREISH, 1984) et par chromatographie de perméation à 35 et 36,5 (AL-MZAIEN, 2007).

Selon ces mêmes auteurs, les deux pepsines sont exemptes d'hydrates de carbone, mais contiennent 0,3-0,7 et 1,0-1,1 mole de phosphate organique par mole de protéines, pour la pepsine I et II respectivement. Les mobilités apparentes de la forme phosphorylée et déphosphorylée de chaque pepsine sont indifférentes en électrophorèse. Les résidus N-terminaux de la pepsine I et II sont l'alanine et la leucine, respectivement.

La pepsine A bovine est utilisée en fromagerie en mélange 2/2 appelé aussi présure 50/50. La moitié de l'activité coagulante provient de la chymosine, l'autre moitié de la pepsine. Ce mélange s'utilise surtout sur pâte molle et fromage à affinage court (GERMONVILLE, 2003).

Bien que le mélange 50/50 de la pepsine porcine (pepsine B) et de la présure de veau ait donné des résultats généralement acceptables (FOX et McSWEENEY, 1997), l'emploi de la pepsine porcine est limité à cause de sa sensibilité aux variations de pH (BROWN et EMSTROM, 1988). Elle est instable au-dessus de pH 6,0 (FOX, 1969), et peut être complètement inactivée au cours de la fabrication du fromage (EMMONS 1970 ; FOX et McSWEENEY, 1997).

1.3.1.5. La chymosine

Le nom chymosine, donné par le pharmacien avallonnais Jean-Baptiste Deschamps (1840), dérive du mot grec "Khymos" qui veut dire " liquide gastrique". On l'appelle aussi rennine, mais l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUBMB) préféré le terme chymosine pour éviter la confusion avec la rénine, enzyme plasmatique spécifique qui hydrolyse l'angiotensinogène.

La chymosine (EC 3.4.23.4), est une enzyme néonatale possédant une forte activité coagulante. Elle clive spécifiquement la caséine κ (Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶) provoquant la coagulation du lait dans l'estomac des pré-ruminants (FOLTMANN, 1970 ; 1992 ; KAGEYAMA *et al*, 2000). Ce phénomène permet aux protéines du lait d'être suffisamment exposées aux enzymes gastriques pour une digestion plus complète (PETIT *et al*, 1987 ; CRUYWAGEN *et al*, 1990). De plus, sa faible activité protéolytique permet de préserver les immunoglobulines pendant leur transfère postnatal (FOLTMANN et AXELSEN, 1980 ; FOLTMANN, 1981).

La chymosine est une protéine globulaire constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 323 acides aminés (35,6 kDa) (FOLTMANN, 1992). Elle est synthétisée *in vivo* sous forme de preprochymosine de 381 acides aminés (42,1 kDa) avec une séquence signale amino-terminale de 16 acides aminés hydrophobes, clivés avant la sécrétion, produisant ainsi la prochymosine de 365 acides aminés (40,7 kDa) (FOLTMANN, 1966 ; 1993).

La prochymosine devient active sous l'action de l'acidité présente dans le milieu gastrique. A pH 4-5, elle est convertie en chymosine mature par coupure d'un pro-segment de 42 acides aminés N terminaux, tandis qu'à pH 2, elle subit un clivage d'un peptide de 27 acides aminés N-terminaux générant un intermédiaire actif appelé pseudo-chymosine de 338 acides aminés (37,4 kDa) (PEDERSEN *et al*, 1979 ; RICHTER *et al*, 1998). Ce dernier est stable à un pH inférieur à 3 ou supérieur à 6 mais à pH 4,5, il se transforme en chymosine (KUMAR *et al*, 2010).

Au moins trois variants génétiques ont été mis en évidence pour la chymosine bovine : la chymosine A, B et C (DONNELLY *et al*, 1984a ; DONNELLY *et al*, 1986). Le variant C a été considéré comme un produit de dégradation de la chymosine A, avec perte d'un tripeptide (Asp²⁴⁴-Glu²⁴⁵-Phe²⁴⁶) (DANLEY et GEOGHEGAN, 1988) ainsi qu'un variant génétique (RAMPILLI *et al*, 2005). Le tableau III résume les principales différences entre ces trois variants.

En PAGE SDS, les trois variants ont la même mobilité électrophorétique avec un PM de 35,6, mais ils peuvent être séparés l'un de l'autre par chromatographie liquide haute performance (HPLC) (RAMPILLI *et al*, 2005).

Bien que la chymosine A possède une plus grande activité coagulante que la chymosine B, cette dernière reste la plus utilisée en fromagerie car elle a une plus grande durée de conservation (PALMER *et al*, 2010).

La chymosine bovine est stable à pH 5,3-6,3 (FOLTMANN, 1959); Elle perd rapidement son activité à pH 3-4 probablement à cause d'une auto-dégradation, alors qu'à pH alcalin (supérieur à 9) la perte d'activité est due à un changement conformationnel irréversible (CHEESEMAN, 1965 ; CHITPINITYOL et CRABBE, 1998).

Tableau III : Principales différences entre la chymosine A, B et C (LILLA *et al*, 2005 ; RAMPILLI *et al*, 2005 ; HARBOE *et al*, 2010).

Propriétés	Chymosine A	Chymosine B	Chymosine C
Acides aminés différents	Acide aspartique en position 244	Glycine en position 244	Plusieurs acides aminés différents
MM	35,71 kDa	35,65 kDa	Non déterminé
pHi	4,44	4,57	4,60
Stabilité	Moins stable, facilement dégradable	Plus stable, difficilement dégradable	Plus stable, difficilement dégradable
Abondance dans la présure animale	Peu abondante	La plus abondante	Composant mineur
Activité	Activité coagulante 30% supérieure à celle de la chymosine B ; ≈ 290 IMCU mg ⁻¹	La plus faible activité coagulante ; ≈ 223 IMCU mg ⁻¹	Activité coagulante 65% supérieure à celle de la chymosine B ; ≈ 368 IMCU mg ⁻¹

(IMCU) International Milk Clotting Units ou unités internationales de coagulation du lait.

L'activité optimale de la chymosine bovine a lieu à pH 5,5 et à une température de 42°C. De ce fait, en fromagerie, les conditions de milieu sont ajustées à des valeurs plus ou moins éloignées de ces optimums (entre 30 et 35°C) de manière à moduler leur temps de coagulation tout en maintenant le milieu viable pour la flore lactique (BERRIDGE, 1952).

ELAGAMY (2000) a étudié les propriétés physicochimiques et immunologiques de la présure de chamelle. Il a montré qu'elle était plus thermostable que la présure du buffle avec une température optimum de catalyse de 50 et 45°C respectivement.

1.3.2. Coagulants végétaux

Les coagulants végétaux ont été utilisés pendant des siècles dans la fabrication artisanale de fromages ovins et/ou caprins, principalement au Portugal, dans les régions frontalières de l'Espagne et les pays d'Afrique de l'Ouest (ROSEIRO *et al*, 2003 ; RAPOSO et DOMINGOS, 2008).

De nombreuses protéases aspartiques extraites de plantes supérieures présentent un bon potentiel comme agents coagulants dans l'industrie fromagère (SIMÕES et FARO, 2004). On retrouve la papaïne (feuilles de papaye), la broméline (tige de l'ananas) et la ficine (suc du figuier) (CATTANEO *et al*, 1994 ; LLORENTE *et al*, 2004 ; LOW *et al*, 2006 ; EGITO *et al*, 2007). Ces protéases sont caractérisées par une activité coagulante assez forte mais leur utilisation industrielle est limitée par leur fort pouvoir protéolytique (CLAVERIE-MARTÍN et VEGA-HERNÁNDEZ, 2007).

L'extrait coagulant de *Cynara cardunculus* (une variété de chardon) a été largement utilisé pour la fabrication traditionnelle de fromages de brebis (ROSEIRO *et al*, 2003). Trois protéases aspartiques (cynarase 1 à 3) ont été identifiées dans cet extrait (HEIMGARTNER *et al*, 1990). Ce sont des glycoprotéines dimériques qui diffèrent par la taille de leurs sous-unités, leur degré de glycosylation et leur activité coagulante (CORDEIRO *et al*, 1992).

VERÍSSIMO *et al* (1996) ont isolé deux autres protéases de cet extrait à savoir les cardosines A et B. La cardosine A comporte deux sous-unités ayant une masse moléculaire apparent de 15 et 31 kDa, alors que la cardosine B se compose de deux sous-unités de 14 et 34 kDa (SILVA et MALCATA 1999). La cardosine A clive la même liaison peptidique (Phe105-Met106) que la chymosine, tandis que la cardosine B est semblable à la pepsine en termes de spécificité et d'activité (FARO *et al*, 1995 ; EGITO *et al*, 2007).

Les protéinases aspartiques des plantes sont synthétisées sous forme de zymogènes ayant dans leurs structures primaires une région supplémentaire, d'environ 100 acides aminés, entre le domaine N-terminal et C-terminal. Cette région nommée "insert spécifique aux plantes (PSI)" est clivée durant la maturation (SIMÕES et FARO, 2004).

1.3.3. Coagulants microbiens

Beaucoup de protéases extracellulaires d'origine microbienne agissent de façon similaire que la chymosine et sont, en partie, adaptées à la production de fromage (ROBINSON, 1998). Ces coagulants peuvent être facilement produits par fermentation. Toutefois, ils montrent une forte activité protéolytique pendant la fabrication du fromage, ce qui peut entraîner une perte de protéine, un rendement plus faible, et la génération de saveur désagréable (HARBOE *et al*, 2010).

La grande stabilité thermique a été l'inconvénient majeur de la première génération des protéases fongiques. Les modifications chimiques (HAVERA et HUMPHREYS, 1988 ; SMITH *et al*, 1991) et les outils du génie génétique (YAMASHITA *et al*, 1994) ont été utilisés pour réduire cette stabilité thermique de ces enzymes. A la suite de ces modifications, il est devenu possible de produire d'excellents fromages affinés avec des coagulants fongiques modifiés. À l'heure actuelle, la quasi-totalité des coagulants microbiens disponibles dans le commerce sont déstabilisables thermiquement en recourant en amont aux modifications chimiques (YEGIN et DEKKER, 2013).

Plus de 100 sources microbiennes ont été signalées par GARG et JOHRI (1994), mais trois espèces, à savoir *Rhizomucor miehei* (Moisissure thermostable du sol), *Rhizomucor pusillus* (Moisissure mésophile du sol) et *Cryphonectria parasitica* (Parasite du châtaigner), ont été utilisées pour la production à grande échelle (Annexe 03) (CLAVERIE-MARTÍN et VEGA-HERNÁNDEZ, 2007).

La protéase aspartique produite par *Rhizomucor miehei* (forme TL) est le coagulant microbien le plus couramment utilisé pour la production de fromage (CHITPINITYOL et CRABBE, 1998). Cette enzyme est thermolabile. Cependant certaines fabrications, telles celles de l'emmental, nécessitent un coagulant plus thermolabile. On utilise alors une variante fortement thermolabile (XL) du même coagulant (GERMONVILLE, 2003).

La protéase de *Cryphonectria parasitica* est moins bien caractérisée, mais il est généralement admis que son activité protéolytique est plus élevée (TAM et WHITAKER, 1972 ; VANDERPORTEN et WECKX, 1972) et que, contrairement à la protéase de *Rhizomucor*, elle hydrolyse principalement la β caséine (USTUNOL et ZECKZER, 1996 ; TRUJILLO *et al*, 2000 ; BROOME *et al*, 2006).

Outre les enzymes provenant d'autres espèces fongiques telles que *Mucor mucedo* (YEGIN *et al*, 2012) et *Aspergillus oryzae* (VISHWANATHA *et al*, 2010), ou d'origine bactérienne, principalement à partir de *Bacillus* sp. (AGEITOS *et al*, 2007 ; DING *et al*,

2012) et d'autres comme *Myxococcus* sp. (POZA *et al*, 2003) et *Nocardiosis* sp. (CAVALCANTI *et al*, 2005) ont été testées. Cependant, d'autres études sont nécessaires afin de vérifier leur utilité pour la transformation fromagère.

1.3.4. Chymosine produite par génie génétique (FPC) :

Les méthodes modernes du génie génétique ont permis de cloner le gène de la chymosine bovine (variante B) sur certains micro-organismes tel que *Escherichia coli* K-12 (EMTAGE *et al*, 1983 ; MOHANTY *et al*, 1999), *Kluyveromyces marxianus var. lactis* (VAN DEN BERG *et al*, 1990), *Saccharomyces cerevisiae* (MELLOR *et al*, 1983 ; GOFF *et al*, 1984), *Aspergillus Niger var. awamori* (CULLEN *et al*, 1987 ; TSUCHIYA *et al*, 1993) et *Pichia (Komagataella) pastoris* (NOSEDA *et al*, 2013)

Les chymosines provenant d'autres espèces de mammifères tels que l'agneau (ROGELI *et al*, 2001), le dromadaire (KAPPELER *et al*, 2006), le buffle (VALLEJO *et al*, 2008) et la chèvre (VEGA-HERNANDEZ *et al*, 2004 ; KUMAR *et al*, 2007 ; YANG *et al*, 2007 ; VALLEJO *et al*, 2012) ont également été produites par fermentation.

En 1990, la compagnie Pfizer, Inc. (USA) a reçu l'approbation de la Food and Drug Administration (USA) pour commercialiser la chymosine recombinante (Chy-Max) produite par fermentation de micro-organismes ayant le statut GRAS (Generally Recognized As Safe). Les autres marques utilisant d'autres micro-organismes ont également été approuvées. Le tableau IV donne quelques exemples de ces produits.

La chymosine recombinante est absolument identique en séquence d'acides aminés, poids moléculaire, propriétés enzymatiques et propriétés immunologiques à la chymosine de veau (RAMET, 2006). Elle est totalement exempte de la souche de production et elle ne contient pas d'ADN recombinant (GERMONVILLE, 2003 ; HARBOE *et al*, 2010).

Tableau IV: Exemples de chymosine pure produite par fermentation à l'aide d'un micro-organisme hôte (MISTRY, 2012).

Nom de la préparation	Société productrice	Micro-organismes hôtes
Chy-max	Pfizer Inc. (actuellement Ch. Hansen)	<i>Escherichia coli</i> K-12
Chymogen	Christian. Hansen Lab. (DK)	<i>Aspergillus awamori</i>
ChymoStar	Rhône-Poulenc (actuellement Danisco)	<i>Aspergillus awamori</i>
Maxiren	Gist-Brocades n. v. (NL)	<i>Kluyveromyces lactis</i>
Novoren (Enzyme coagulante de <i>Mucor Miehei</i>)	Novo Nordisk	<i>Aspergillus oryzae</i>

Sur le plan technologique, de nombreuses études ont montré que dans la production fromagère, la saveur, la texture, la composition, le rendement et la qualité du produit fini est le même par rapport aux témoins fabriqués à base de la présure de veau (GREEN *et al*, 1985 ; HICKS *et al*, 1988 ; BINER *et al*, 1989 ; BROOME et HICKEY, 1990 ; O'SULLIVAN et FOX, 1991 ; BARBANO et RASMUSSEN, 1992).

La chymosine produite par fermentation est pratiquement impossible à distinguer de la chymosine d'origine animale (MOHANTY *et al*, 1999). De plus, elle présente de nombreux avantages :

- elle a une faible activité protéolytique en raison de l'absence de pepsine ;
- elle a une activité coagulante plus prévisible ;
- elle est adaptée aux régimes végétariens ;
- elle a acquis l'appui de certaines autorités religieuses (certifiées halal et autres) (KUMAR *et al*, 2010).

Il est possible de reconnaître la chymosine de fermentation de celle extraite de la caillette de veau par un test utilisant une technique immunochimique ELISA. Le test détecte les protéines contaminantes provenant du micro-organisme hôte ou du milieu de culture, toujours présentes dans les solutions de chymosine de fermentation (COLLIN *et al*, 1997). Toutefois, cette procédure pourrait être dépassée en raison des progrès réalisés dans la purification du produit de fermentation (COLLIN *et al*, 2003).

LILLA *et al* (2005) ont introduit une méthode de spectrométrie de masse pour contrôler l'origine de la chymosine. Il a été démontré que certains composants peptidiques mineurs, générés lors de la digestion trypsique, permettent la différenciation entre la chymosine naturelle et la chymosine fermentaire.

Selon VAN DEN BRINK *et al* (2006), l'amélioration de la production de la chymosine par les champignons filamenteux (*Aspergillus niger*) a été réalisée par glycosylation soit de la chymosine elle-même, entraînant une augmentation de plus de 100% de rendement par rapport à l'enzyme native, ou du transporteur qui a également entraîné une augmentation significative. Environ 10% de chymosine bovine produite par fermentation est glycosylée (JENSEN *et al*, 2013).

La prochymosine cameline (*camelus dromedarius*) a été produite pour la première fois par KAPPELER *et al* (2006) dans *Aspergillus niger var awamori*. Ce dernier est un micro-organisme qui est inscrit sur la liste positive GRAS et qui peut excréter dans le milieu de fermentation des quantités importantes d'une enzyme (DUNN-COLEMAN *et al*, 1991 ; KUMAR *et al*, 2010).

La chymosine cameline recombinante (CCR) comporte 323 aa pour une MM de 40 kDa. (KAPPELER *et al*, 2006) ou 43 kDa (ATTALLAH, 2007) avec un pHi de 4,85; l'acide aminé N terminal étant la glycine (KAPPELER *et al*, 2006). Elle a des caractéristiques différentes de celles des bovins, elle a en particulier une stabilité thermique accrue entre 40 et 55°C (KAPPELER *et al*, 2006 ; JENSEN *et al*, 2013).

KAPPELER *et al* (2006) ont démontré que la CCR, utilisée sur le lait bovin, possède une activité coagulante plus élevée d'environ (70%) par rapport à ce que donne la chymosine bovine recombinante (CBR) sur ce lait. Son activité protéolytique est estimée à 20% dans les mêmes conditions. Par contre, la CBR manifeste une faible activité coagulante envers le lait camelin. Dès lors, l'utilisation de la CCR pour les besoins de la coagulation du lait de vache a été rapidement perçue comme une solution appropriée au lieu et place de la CBR avec des avantages certains (rendements plus élevés, goût moins amer en raison de la baisse de l'activité protéolytique...).

La CCR est actuellement produite à l'échelle industrielle, sous le nom de Chy-max M, par la société Chr.Hansen A/S (Hoersholm, Danemark) et est disponible dans le commerce depuis la fin de 2009 (JACOB *et al*, 2011).

Des essais de fabrication de fromage type cheddar (BANSAL *et al*, 2009 ; GOVINDASAMY-LUCEY *et al*, 2010), pâte molle (ABDULSALAM et SHAKER, 2013) et Mozzarella (MOYNIHAN *et al*, 2014) avec la CCR et la CBR ont été réalisés. Les résultats obtenus montrent :

- qu'aucune différence significative n'a été observée dans la composition et le pH entre les fromages fabriqués avec ces deux enzymes ;
- que la protéolyse est significativement plus faible dans les fromages fabriqués avec la CCR qu'avec la CBR ;
- que les fromages élaborés avec la CCR présentaient moins d'amertume avec une qualité microbiologique et sensorielle acceptable que la CBR.

Récemment, VALLEJO *et al* (2012) ont réalisé une étude comparative de quatre chymosines recombinantes différentes (la chymosine de chèvre et du buffle sont exprimées dans *Pichia pastoris* et la chymosine bovine et de dromadaire sont exprimées dans *Aspergillus niger*). Ils ont souligné que la chymosine recombinante de chèvre présentait la meilleure efficacité catalytique par rapport aux trois autres enzymes. Il a été proposé que la chymosine recombinante de chèvre représente une très bonne alternative à la CBR pour une utilisation dans la fabrication du fromage.

1.4. Etude comparative des structures des enzymes coagulantes d'origine animale

1.4.1. Structure primaire

Les structures primaires de la chymosine et de la pepsine ont une identité de séquence de l'ordre de 50% (JENSEN *et al*, 2013). Par ailleurs, ces deux enzymes se caractérisent par une teneur élevée en acides aminés acides et β -hydroxylés et par la présence d'un petit nombre de résidus basiques (FOLTMANN *et al*, 1977 ; HARRIS *et al*, 1982 ; HIDAKA *et al*, 1986 ; KAGAYAMA, 2002).

La comparaison de la séquence de la chymosine cameline avec celle du bovin révèle une forte homologie (de l'ordre de 85% de résidus identiques et 94% de résidus similaires) (SØRENSEN *et al*, 2011 ; JENSEN *et al*, 2013). L'alignement des séquences primaires de la chymosine bovine et cameline ainsi que la pepsine porcine et cameline sont données en annexe 04 et 05 respectivement.

Le pepsinogène A bovin possède un peu plus de résidus acides ($n = 39$) que la prochymosine B ($n = 36$); et inversement, la composition du pepsinogène en résidus basiques est de moitié inférieure à celle de la prochymosine (16 contre 30). Le pepsinogène A porcine semble contenir le plus de résidus acides ($n = 45$) (SIDIKOU *et al*, 2005).

Ces protéines contiennent trois ponts disulfures : Cys45-Cys50, Cys206-Cys210 et Cys250-Cys283 (pepsine numérotation) (TANG *et al*, 1973 ; GILLILAND *et al*, 1990 ; NEWMAN *et al*, 1991). CHEN *et al* (2000) ont démontré que le pont Cys250-Cys283 est indispensable pour le repliement correct de la prochymosine, alors que le pont Cys45-Cys50 est dispensable mais a une certaine contribution à la stabilité et la spécificité de l'enzyme. Le pont Cys206-Cys210 est aussi dispensable mais joue un rôle plus important dans le repliement correct de l'enzyme.

Des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation et la glycosylation sont occasionnellement observés sur la pepsine (KAGAYAMA, 2002). BAUDYŠ et KOSTKA (1983) ont démontré que la pepsine de poulet a un site de

glycosylation localisé sur le résidu Asn 68. Le pepsinogène du singe est aussi N-glycosylé (KAGEYAMA et TAKAHASHI, 1977).

1.4.2. Structure secondaire et tertiaire

La cristallographie aux rayons X a révélé que la chymosine et la pepsine sont constituées principalement par une structure secondaire en feuillet β avec très peu d'hélices α (JAMES et SIELECKI, 1986 ; CHITPINITYOL et CRABBE, 1998). En fait, la chymosine comprend 13% d'hélices α (9 hélices, 44 résidus) et 48% de feuillet β (29 feuillets, 158 résidus) (NEWMAN *et al*, 1991). Celle-ci a révélé aussi que la structure tridimensionnelle de la chymosine bovine est, en générale, très proche de la pepsine du porc (CHITPINITYOL et CRABBE, 1998).

Chacune de ces protéines a une forme bilobée avec un domaine N-terminal et un domaine C-terminal ayant seulement 9% de séquence en acides aminés identiques (NEWMAN *et al*, 1991) et séparés par une fente perpendiculaire capable d'accueillir de sept à huit résidus d'acides aminés d'un substrat (TANG *et al*, 1978). Cette fente constitue un site de liaison du substrat et contient les deux résidus aspartyls impliqués dans le mécanisme catalytique (GILLILAND *et al*, 1990).

La structure tridimensionnelle par diffraction des rayons X du pepsinogène A du porc (Figure 03) (JAMES *et al*, 1986; SIELECKI *et al*, 1991; HARTSUCK *et al*, 1992), de la pepsine A du porc (ABAD-ZAPATERO *et al*, 1990 ; COOPER *et al*, 1990 ; SIELECKI *et al*, 1990), du pepsinogène A de l'homme (BATEMAN *et al*, 1998) et de la progastricine (pepsinogène C) de l'homme (MOORE *et al*, 1995) ont été déterminés, alors que celle de la pepsine cameline n'a pas encore été explorée.

Les structures tridimensionnelles de la CBR (GILLILAND *et al*, 1990 ; NEWMAN *et al*, 1991), d'un mutant de la chymosine bovine (Val111/Phe111) (STROP *et al*, 1990) et d'un complexe chymosine-inhibiteur (GROVES *et al*, 1998) ont été élucidées.

Récemment, JENSEN *et al* (2013) ont publié la structure cristalline d'un variant doublement glycosylée de la CCR (résolution 1,6 Å) ainsi que la structure cristalline de la CBR non glycosylée (résolution 1,8 Å) (Figure 04). Il a été montré que les deux chymosine adoptent un repliement spatial similaire à l'exception des feuillets β antiparallèles centraux qui connectent les domaines N et C terminaux.

1.5. Site actif et mécanisme catalytique des enzymes coagulantes d'origine animale

Les résidus catalytiques (Asp32/Asp215, selon la numérotation de la pepsine) apparaissent au sein d'une séquence type (dite séquence signature) Asp-Thr/Ser-Gly (DUNN, 2002).

Les deux résidus du site actif sont très proches et semblent former des liaisons hydrogène avec une molécule d'eau qui les réunit (COOPER *et al*, 1990 ; GILLILAND *et al*, 1990 ; NEWMAN *et al*, 1991). Un réseau de liaisons hydrogène appelé "grip de pompier" (fireman's grip en anglais) (PEARL et BLUNDELL, 1984 ; NEWMAN *et al*, 1991), qui comprend les groupes hydroxyles de la sérine (Ser35) et de la thréonine (Thr218), stabilise ce site actif (Figure 05) (ANDREEVA et RUMSH, 2001 ; INGR *et al*. 2003).

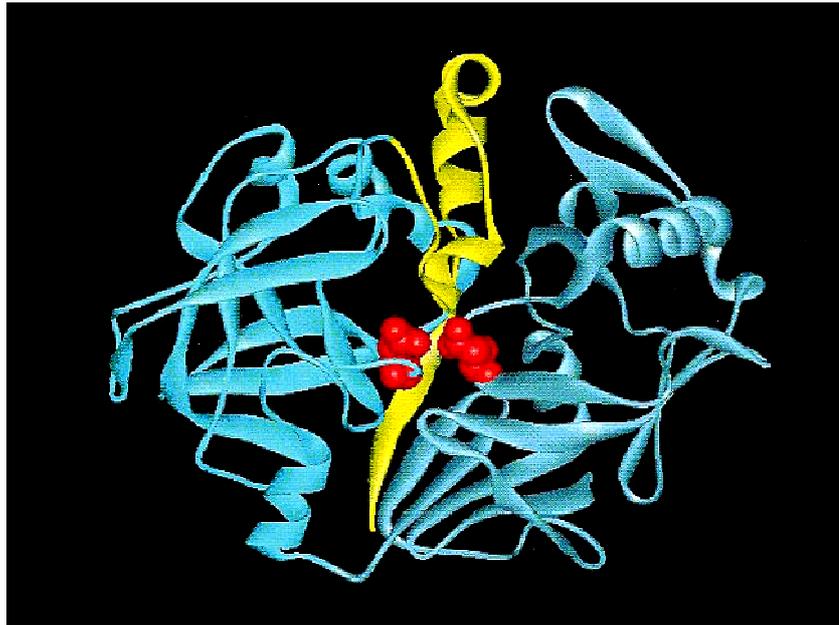


Figure 03 : Structure tridimensionnelle du pepsinogène A porcin (RICHTER *et al*, 1998). Le prosegment inhibiteur en jaune occupant le site actif en rouge.

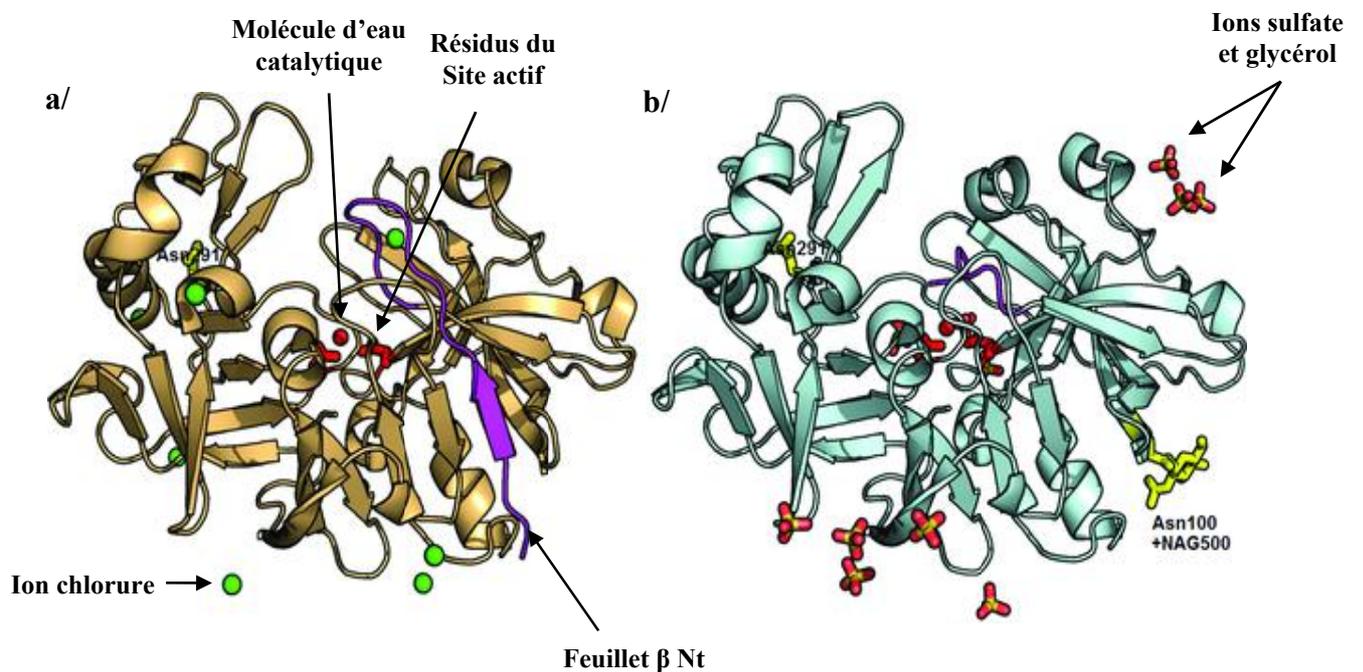


Figure 04 : Structure tridimensionnelle de la chymosine bovine recombinante (a) et cameline recombinante (b). (JENSEN *et al*, 2013). NAG : N acétyl glucosamine.

Deux feuillettes β antiparallèles forment une boucle flexible (boucle en épingle à cheveux β), qui est située à l'entrée du site actif et est communément connue sous le nom de "Flap en anglais" ou anse externe mobile (DAVIES, 1990). Cette anse, composée de résidus 70-85, fournit un environnement hydrophobe autour de la liaison peptidique hydrolysée (TANG, 2010) et forme un canal où le substrat se lie (ŠALI *et al*, 1992 ; CHITPINITYOL et CRABBE, 1998 ; OKONIEWSKA *et al*, 1999). Une chaîne continue de liaison hydrogène entre les résidus Trp 39, Tyr 75, Ser 35, Asp 32 et une deuxième molécule d'eau s'étend depuis la anse jusqu'au site actif (Figure 05) (ANDREEVA et RUMSH, 2001 ; PRASAD et SUGUNA, 2002).

La chymosine bovine existe sous deux formes structurellement en équilibre : une forme auto-inhibée où le site S1 et S3 (sur l'enzyme) sont occupés par le résidu Tyr75 (selon la numérotation de la pepsine), un des résidus de l'anse, bloquant ainsi l'accès au site de liaison du substrat ; et une forme active où les sites S1 et S3 sont libres et prêt à recevoir le substrat (GILLILAND *et al*, 1990 ; NEWMAN *et al*, 1991). Il semblerait que la forme auto-inhibée de la chymosine bovine contribue à l'augmentation de sa spécificité (ANDREEVA *et al*, 1992).

Suzuki *et al*, (1989) ont mené une étude de mutagenèse visant à élucider le rôle du résidu Tyr75 (selon la numérotation de la pepsine) dans le mécanisme catalytique de la chymosine. Il a été postulé que ce résidu a fourni une liaison hydrogène essentiel qui a contribué à l'alignement approprié du substrat. Son remplacement par différents acides aminés (Thr, Ile, Val) a donné lieu à une perte complète d'activité.

Dans une étude de mutagenèse menée par STROP *et al* (1990), où la Val111 (qui fait partie des sous sites S1 et S3 de la chymosine) a été mutée en Phe111 (le résidu correspondant sur la pepsine), la chymosine a montré une diminution significative de l'activité liée à la diminution de l'affinité au substrat. Ces auteurs ont donc émis l'hypothèse que ce résidu jouait un rôle important dans la reconnaissance du substrat.

Le mécanisme catalytique des protéases aspartiques se produit par l'intermédiaire d'une molécule d'eau activée, cette dernière constitue l'agent nucléophile permettant d'attaquer la liaison peptidique. Les résidus impliqués dans la catalyse sont les deux résidus acides (aspartate) (DUNN, 2002), mais les détails exacts du mécanisme restent controversés.

Selon VEERAPANDIAN *et al* (1992) et JAMES *et al* (1992), il s'agit d'un mécanisme général d'acide-base. L'un des résidus d'acide aspartique, agissant comme une base (Asp 215), doit être chargé, alors que l'autre, agissant comme un acide (Asp 32), doit être protoné (SUGUNA *et al*, 1987 ; DAVIES, 1990 ; JAMES *et al*, 1992 ; PARRIS *et al*, 1992). Par conséquent, le premier rôle important des résidus adjacents au centre catalytique est de préserver l'état chargé de l'Asp215 et l'état protoné de l'Asp32 (ANDREEVA et RUMSH, 2001).

Le mécanisme catalytique (Figure 06) implique l'activation simultanée de la molécule d'eau par l'Asp215, l'attaque nucléophile de la molécule d'eau sur le carbone du carbonyle de la liaison peptidique, et la protonation du carbonyle de la liaison peptidique par l'Asp32, ce qui provoque, suite à un réarrangement de charge, la coupure de la liaison amide (VEERAPANDIAN *et al*, 1992 ; JAMES *et al*, 1992).

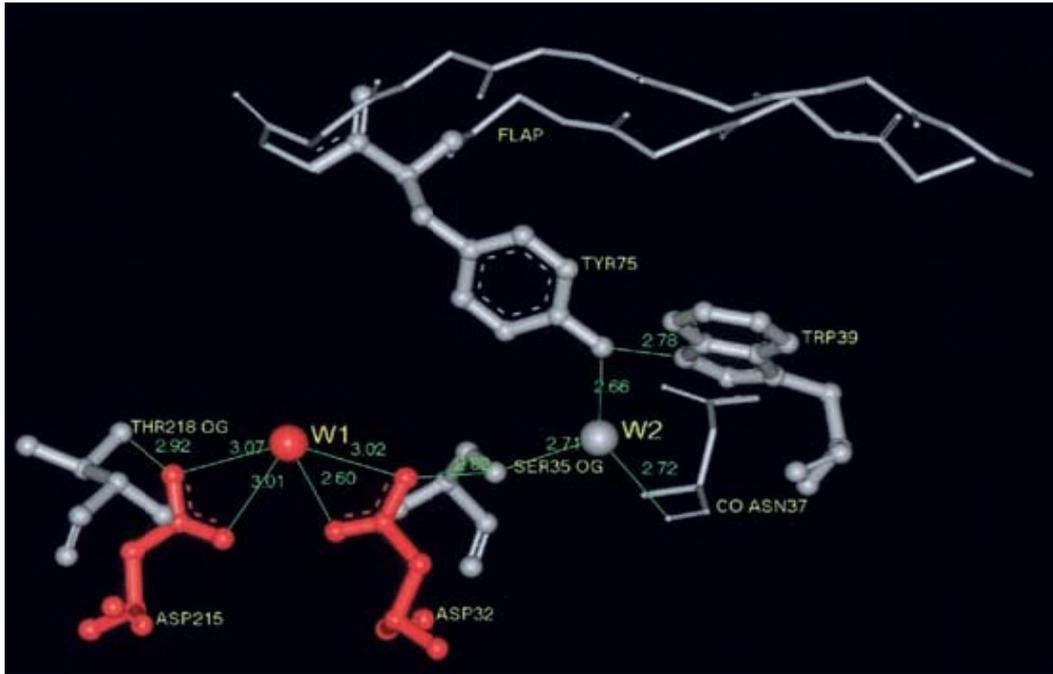


Figure 05 : Structure tridimensionnelle du site actif et la région environnante de la pepsine porcine (SIELECKI *et al*, 1990).

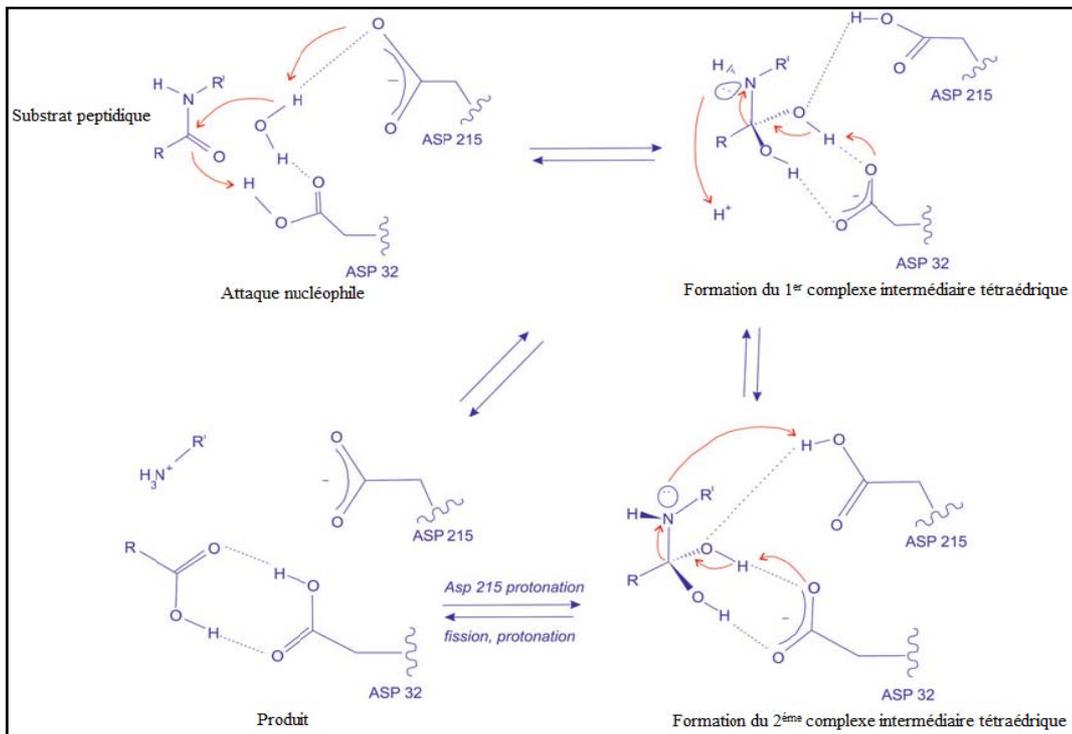


Figure 06 : Mécanisme d'action des protéases aspartiques.

1.6. Le site de liaison du substrat et spécificité

Pour mieux visualiser la spécificité des protéases, SCHECHTER et BERGER (1967) ont proposé une nomenclature qui définit la topologie linéaire des interactions protéase-substrat peptidique. Selon cette nomenclature, les résidus d'acides aminés du substrat sont appelées P et les acides aminés catalytiques de la protéase sont notés S. Les acides aminés de la partie N-terminale du lien peptidique hydrolysé sont numérotés respectivement sur le substrat et l'enzyme P1, P2, P3 et S1, S2, S3 et du côté C-terminal P1', P2', P3' et S1', S2', S3'. Le lien peptidique hydrolysé se situe entre les résidus P1 et P1', alors que les sites d'interaction sur l'enzyme sont représentés par S1 et S1'.

La spécificité protéolytique de la pepsine A et de la chymosine a été étudiée en utilisant une variété d'oligopeptides et de protéines comme substrats.

La pepsine préfère cliver après la phénylalanine (Phe-Trp, Phe-Tyr et Phe-Phe) et la leucine, alors qu'elle clive rarement après l'histidine et la lysine, sauf s'ils sont à côté de la leucine ou la phénylalanine (FRUTON, 1970 ; POWERS *et al*, 1977 ; HAMURO *et al*, 2008). La chymosine a une action similaire à celle de la pepsine dans le sens où elle coupe préférentiellement les liaisons peptidiques situés notamment à droite des acides aminés aromatiques (FOLTMANN, 1992 ; KAGEYAMA, 2002).

La poche S1 de la chymosine, de même que la celle de la pepsine A, est de nature hydrophobe et est plus spécifique que la poche S'1 (CHITPINITYOL et CRABBE, 1998). KAGEYAMA (2004) et H. KAGEYAMA *et al* (2010) ont montré que la poche S'1 de la chymosine est différente de celle de la pepsine A. Dans le cas de la chymosine, la poche S'1, composée de groupes de résidus chargés ou polaires, peut accueillir aussi bien des résidus chargés (Lys et Glu) que des résidus hydrophobes ou aromatiques de P'1. Dans le cas de la pepsine A, cette poche est composé de résidus hydrophobes et interagit préférentiellement avec des résidus hydrophobes ou aromatiques de P1.

La caséine κ (CN- κ) est le substrat primaire de la chymosine bovine qui coupe cette protéine au niveau de la liaison (Phe105-Met106). MØLLER *et al* (2012a) ont constaté que la chymosine cameline recombinante (CCR) possédait une spécificité identique envers cette liaison que la chymosine bovine.

La CN- κ bovine et cameline contiennent 169 et 162 acides aminés respectivement (KAPPELER *et al*, 1998). Cette différence est en partie due à une délétion de 8 résidus d'acides aminés survenant à proximité du fragment qui se lie au site actif (Annexe 06). En raison de cette suppression, le site de clivage de la CN- κ cameline par la chymosine bovine est différent de celui de la CN- κ bovine, l'hydrolyse ayant lieu au niveau de la liaison Phe97-Ile98 (KAPPELER *et al*, 1998 ; SØRENSEN *et al*, 2011).

Des expériences ont montrés que les di-, tri-, ou tetrapeptides contenant une liaison Phe-Met ne sont pas hydrolysés par la chymosine bovine (HILL, 1968). Cependant, sous la forme de pentapeptide la liaison Phe-Met peut être hydrolysée. Par conséquent, la longueur du peptide et les résidus autour de la liaison Phe-Met sont important pour les interactions enzyme-substrat (FOX, 2007).

Il a été montré que les résidus His98 à Lys112 de la CN- κ bovine, correspondant aux résidus P8 à P'7, jouent un rôle dans l'interaction avec la chymosine (VISSER *et al*, 1987). Le résidu Arg97 dans la position P9 est aussi important pour la stabilisation de cette liaison

(PLOWMAN et CREAMER, 1995 ; PALMER *et al*, 2010). Les séquences de la CN-κ autour de la liaison sensibles à l'action de la chymosine provenant de différentes espèces sont représentées sur la figure 07.

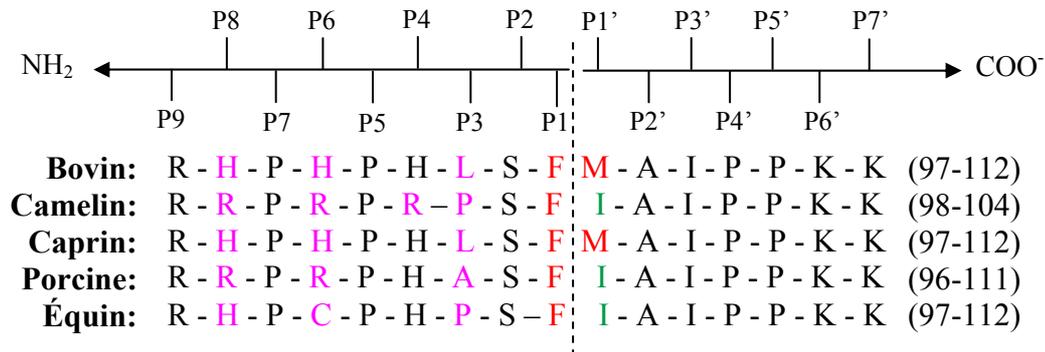


Figure 07 : Les séquences de la caséine κ autour de la liaison sensibles à l'action de la chymosine. Le lien peptidique clivé est en position P1-P1' (SØRENSEN *et al*, 2011).

PLOWMAN et CREAMER (1995) supposait que les résidus proline dans cette séquence stabilisent la conformation correcte de la CN-κ dans le site actif de la chymosine. Tous les résidus prolines (Pro) sont conservés dans la CN-κ du lait de chamelle. Le résidu Leu103 (P3) bovin est remplacé par Pro95. Selon KAPPELER *et al* (1998), cette proline pourrait jouer un rôle important dans la stabilisation de la conformation de la CN-κ cameline et dans l'adhésion de la chymosine cameline au site de clivage.

Plusieurs études ont été menées ces dernières années afin de déterminer les raisons de la faible activité coagulante de la chymosine bovine envers le lait de chamelle.

Des études de mutagenèses de la position P3 (une Leu103 dans la CN-κ bovine) indiquent que la catalyse est promue par la présence de résidus aliphatiques, tolérée par des résidus hydrophiles et défavorisée par la proline (DUNN *et al*, 1986). La CN-κ de chamelle a une proline (Pro95) à cette position ce qui pourrait expliquer pourquoi la chymosine bovine ne peut pas cliver la CN-κ cameline (PALMER *et al*, 2010).

Les études de modélisations moléculaires du complexe chymosine bovine/CN-κ bovine ont suggéré que la Lys 221 réside dans la poche S4 et interagit avec l'His P4 (His 102) (PALMER *et al*, 2010). VISSER *et al* (1987) ont indiqués qu'une mutation du résidu His102 en Lys102 sur la CN-κ est particulièrement défavorable. Les résidus His dans la séquence His98-Pro-His-Pro-His102 de la CN-κ bovine sont remplacés par l'Arg sur la CN-κ cameline, ce qui pourrait expliquer la faible efficacité catalytique de la chymosine bovine envers la CN-κ cameline (PALMER *et al*, 2010).

Dans une étude de modélisation similaire menée par SØRENSEN *et al* (2011), il a été montré que le complexe chymosine bovine/CN-κ cameline était instable. Cette instabilité peut être due à des répulsions de charges entre la lysine 221 en position S4 dans la chymosine bovine et le résidu arginine en position P4 de la CN-κ cameline.

Afin d'essayer de comprendre la différence d'efficacité catalytique entre la chymosine recombinante cameline et bovine envers la CN-κ bovine, très récemment JENSEN *et al* (2013) ont mené une étude très détaillée sur la relation entre la structure et l'activité coagulante de ces deux enzymes. Ils ont conclu que l'amélioration de la coagulation du lait de vache par la chymosine cameline peut être attribuée à l'amélioration

des interactions électrostatiques provenant des variations de la charge de surface qui facilitent l'association entre la chymosine cameline et les micelles de caséines. En outre, les différences en acides aminés, entre la chymosine cameline et bovine, qui délimitent le site de liaison au substrat, contribuent à l'amélioration de la fixation du substrat sur la chymosine cameline (Annexe 07).

1.7. La coagulation :

La coagulation du lait est une étape importante dans la préparation du fromage. Il s'agit de la transformation du lait liquide en un gel, appelé aussi coagulum ou caillé. On distingue deux types de coagulation : la coagulation acide et la coagulation enzymatique. Cependant, en fromagerie, la coagulation du lait résulte le plus souvent de l'action combinée d'une enzyme et de l'acidification, seule varie l'importance relative de leur action coagulante respective.

Les mécanismes d'action de ces deux agents coagulants au niveau de la micelle sont très différents. Bien qu'ils conduisent tous deux à la formation d'un coagulum (gel ou caillé), les propriétés rhéologiques de ce dernier restent caractéristiques du mode de coagulation (FARKYE, 2004 ; JANHØJ et QVIST, 2010) (Annexe 08).

1.7.1. Mécanismes de la coagulation

1.7.1.1. Le substrat spécifique intervenant dans la coagulation

Le substrat spécifique intéressé par le phénomène de coagulation dans le lait est constitué par les protéines, essentiellement représentées par les caséines. Ces dernières sont des phosphoprotéines qui représentent entre 52 et 87% des protéines totales du lait camelin (AL HAJ et AL-KANHAL, 2010), 80% du lait bovin, ovin, caprin et seulement 40% du lait humain (HIPPEL *et al*, 1952 ; MEHAIA *et al*, 1995 ; FOX, 2001). Il existe quatre différents types de molécules de caséine, α S1, α S2, β , et κ .

Comparé au lait bovin, les caséines du lait de dromadaire montrent une faible teneur en caséine κ (3,5% contre 13%) et une proportion plus importante en caséine β (KAPPELER *et al*, 1998 ; CHAOUI-KHEROUATOU et ATTIA, 2008), des structures primaires et secondaires plus ou moins différentes avec un degré de phosphorylation moins important (KAPPELER *et al*, 1998) et des mobilités électrophorétiques très différentes (FARAH et FARAH-RIESEN, 1985 ; LARSSON-RAZNIKIEWICZ et MOHAMED, 1986 ; KAPPELER *et al*, 1998).

Dans le lait, les caséines sont présentes sous la forme de particules colloïdales nommées micelles de caséine. La structure exacte de la micelle de caséine fait encore l'objet de spéculations. Il existe plusieurs modèles de micelles de caséines dont le plus répandu est le modèle avec sous-unités de SCHMIDT (1982).

HETH et SWAISGOOD (1982), DONNELLY *et al* (1984b) et DALGLEISH *et al* (1989) ont rapporté que la taille moyenne des micelles de caséines est d'autant plus élevée que la teneur en CN- κ diminue. En effet, dans le lait camelin (3,5% de CN- κ), le diamètre des micelles de caséines est de 600 nm (avec une moyenne autour de 350 nm), alors qu'il est de 64 nm chez l'homme (17% de CN- κ). La forte teneur en minéraux dans la fraction micellaire des caséines camelines pourrait également jouer un rôle significatif à cet égard (MARTIN *et al*, 2013).

La CN- κ a un rôle exceptionnel car soluble à toutes les températures en présence de calcium minéral représenté dans le lait, elle stabilise les autres caséines par répulsions électrostatiques et stériques et permet la formation de micelles stables (FARRELL *et al*, 2004). Il est maintenant bien établi que la plupart, sinon la totalité, de la CN- κ se trouve à la surface de la micelle de caséine (DALGLEISH et CORREDIG, 2012). Le modèle moléculaire de la CN- κ bovine présenté par KUMOSINSKI *et al* (1991) montre une CN- κ sous la forme d'un cavalier sur son cheval ; la paracaséine- κ correspond au « cheval » et le glycomacropeptide au « cavalier » (Figure 08).

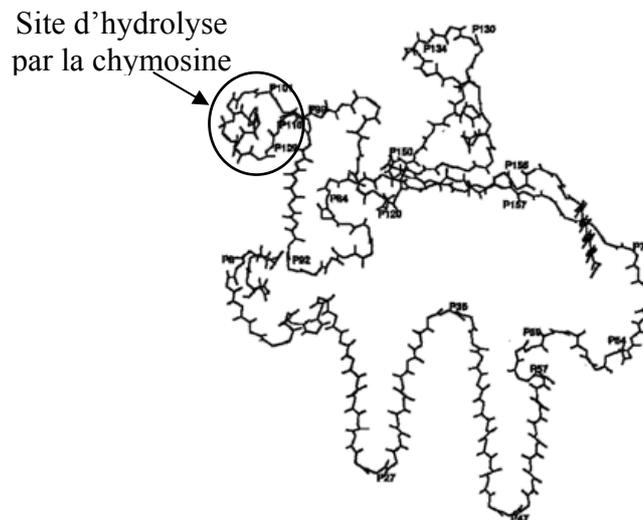


Figure 08 : Modèle hypothétique de la structure tridimensionnelle de la caséine κ bovine (KUMOSINSKI *et al*, 1991)

1.7.1.2. La coagulation acide

Elle consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique (pHi=4,6) par acidification biologique à l'aide de bactéries productrices d'acide lactique (bactéries lactiques contaminant à l'état naturel le lait ou apportées sous forme de levains) (MAHAUT *et al*, 2005) ou par acidification chimique (injection de CO₂ ou addition de gluconodeltalactone) (MAHAUT *et al*, 2000).

Le gel formé présente une perméabilité satisfaisante, mais une friabilité élevée avec une élasticité et plasticité pratiquement nulles dues au manque de structuration du réseau. Les liaisons sont de faibles énergies de type hydrophobe et résistent peu aux traitements mécaniques (MAHAUT *et al*, 2005).

1.7.1.3. La coagulation enzymatique

La présure est le coagulant le plus utilisé pour réaliser la coagulation du lait (MAHAUT *et al*, 2000). Son mécanisme d'action est assez bien établi et comporte trois phases (WALSTRA et JENNESS, 1984 ; DALGLEISH, 1992 ; 1998 ; HYSLOP, 2003).

Une phase primaire ou enzymatique, au cours de laquelle la CN- κ est hydrolysée spécifiquement (Phe105-Met106), générant le fragment 1-105 ou paracaséine κ (hydrophobe) et le fragment 106-169 ou caséinomacropeptide (CMP) (hydrophile) (FOX *et al*, 2000 ; McSWEENEY, 2004). Cette liaison est également préférentiellement hydrolysée par les pepsines et les protéases acides de *Rhizomucor miehei* et *Rhizomucor pusillus*, à l'exception de la protéase de *Cryphonecteria parasitica* qui clive la liaison Ser104-Phe105

(DRØHSE et FOLTMANN, 1989). La réaction d'hydrolyse obéit à la cinétique de Michaelis-Menten et, de ce fait, dépend de la concentration en enzyme (McMAHON et BROWN, 1984 ; HYSLOP, 2003).

Une phase secondaire qui correspond à la coagulation proprement dite. Elle commence lorsque, à pH 6,6, 80 à 90% de la CN- κ est hydrolysée (MAHAUT *et al*, 2005). Les micelles déstabilisées peuvent se rapprocher et former des liens hydrophobes (WALSTRA et JENNESS, 1984 ; HIDALGO *et al*, 2010). Il a été observé que dans le lait de vache, un réseau homogène de micelles de caséine existe (RAMET, 1993) alors que dans le lait de dromadaire, l'association de micelles de caséine est plus tardive et le réseau formé est plus lâche et moins compact (FARAH et BACHMANN, 1987).

A ces deux phases s'ajoutent une phase tertiaire ou phase de formation du gel qui se traduit par une lente protéolyse de toutes les caséines, suivie de la synérèse du coagulum qui s'accompagne de la rétraction et de l'expulsion du lactosérum (BRULÉ *et al*, 2006).

Selon le procédé de fabrication utilisé, une certaine quantité de présure (de 0 à 15%) demeure emprisonnée dans le caillé et c'est cette dernière qui amorcera l'affinage en s'attaquant de préférence à la caséine α S1 (SOUSA *et al*, 2001; McSWEENEY, 2004).

Une action intensive de la chymosine sur la CN- α S1 conduit à la coupure de plus de 25 liaisons (CHOISY *et al*, 2006). La liaison Phe23-Phe24 est beaucoup plus sensible que les autres (HYNES, *et al*, 2001 ; DAVE *et al*, 2003). Les produits d'hydrolyse de la CN- α S1 ne produisent quant à eux aucune amertume (KIM *et al*, 2004).

Dans la caséine β (CN- β), la liaison Leu192-Tyr193 est la plus sensible (TRIJILLO *et al*, 2000 ; CHOISY *et al*, 2006). Le fragment 193-209 formé par ce clivage est très amer (VISSER *et al*, 1983 ; SINGH *et al*, 2005). L'hydrolyse de cette liaison (Leu192-Tyr193) est fortement inhibée par l'ajout de 5-10 % de NaCl, un taux généralement pas trouvé dans la plupart des fromages (AWAD *et al*, 1998).

Par rapport à la CN- α S1, la CN- α S2 est plus résistante à l'hydrolyse par la chymosine. Son clivage est limité aux régions hydrophobes (McSWEENEY, 2004).

Møller *et al* (2012b) ont rapporté que la chymosine cameline recombinante est moins active sur la CN- α S1 et la CN- β d'où se forment la plupart des saveurs amères.

1.8. L'aptitude du lait de chamelle à la coagulation enzymatique :

Environ un tiers de la production mondiale de lait est destinée à la production de fromage (FARKYE, 2004). La transformation du lait en fromage est une méthode de conservation très largement utilisée dans le monde, au plan artisanal et industriel. Dans le cas particulier du lait de dromadaire, cette opération est réputée difficile en raison des difficultés rencontrées pour réaliser la coagulation (RAMET, 1989).

FARAH et BACHMANN (1987) ainsi que FARAH et RÜEGG (1989) précisent que la coagulation du lait de chamelle est 2 à 3 fois plus lente que pour le lait de vache.

La coagulation du lait de chamelle par la présure suit un mécanisme similaire à celui du lait de vache (MEHAIA *et al*, 1988). Toutefois, l'action de la présure sur le lait de chamelle conduit à la coagulation sous forme de flocons et les gels formés sont peu structurés (FARAH et BACHMANN, 1987 ; BORNAZ *et al*, 2009). Ce comportement est attribué à la teneur réduite en matière sèche totale et en caséine, notamment en saison

chaude (RAMET, 2003), le diamètre élevé des micelles de caséine (FARAH et RÜEGG, 1989 ; BORNAZ *et al*, 2009), et la teneur réduite en caséine kappa (KAPPELER, 1998).

La coagulation acide n'est pas meilleure. Riche en produits antibactériens, le lait de chamelle a tendance à inhiber naturellement l'acidification lactique par voie fermentaire. Il présente un pouvoir tampon élevé ralentissant la baisse de pH, et au final, on obtient une très faible structuration du gel avec formation d'un précipité floconneux (RAMET, 2003).

Dans le but de remédier au retard à la coagulation du lait de chamelle, des adaptations technologiques ont été proposées par divers auteurs (Tableau V).

Dans la plupart des études, la chymosine bovine a été utilisée pour coaguler le lait de chamelle, mais l'enzyme d'une espèce particulière coagule plus efficacement le lait de cette même espèce. Cela a été confirmé pour l'agneau (HERIAN et KRCAL, 1971), le porc (FOLTMANN *et al*, 1981 ; HOUEN *et al*, 1996) et le dromadaire (EL-AGAMY et KAMAL, 1998 ; EI-AGAMY, 2000).

Tableau V : Méthodes de correction de l'aptitude fromagère du lait de chamelle.

Étapes		Corrections	Auteurs
Préparation du lait	Traitement thermique	Thermisation (62° C/1 min) ou pasteurisation basse (72 et 75° C/15 à 30 secondes).	RAMET, 1987
	Augmentation de la teneur en matière sèche	Apport de laits caséux réputés de bonne aptitude fromagère (de chèvre, de brebis ou de bufflonne).	RAO <i>et al</i> , 1970 ; YAGIL, 1987 ; RAMET, 1990 et 2003
	Correction des équilibres salins	Ajout de chlorure, phosphate de calcium, chlorure de sodium.	RAMET, 1989 et 2001 ; EL ZUBEIR et SAMAH 2008
Conduite de la coagulation	Sélection de la préparation coagulante	Utilisation de la pepsine bovine	RAMET, 1985 ; 1990 ; 1987
		Utilisation de la pepsine provenant de l'estomac de dromadaire adulte	EL-ABASSY, 1987 ; EL-BATAWY <i>et al</i> , 1987
		Utilisation des enzymes gastriques de dromadaire	WANGOH <i>et al</i> , 1993
		Utilisation d'un ferment (CamiflocND)	VIAS FRANCK <i>et al</i> , 2003
		Utilisation de protéases gastriques extraites de caillettes de dromadaires âgés	SIBOUKEUR <i>et al</i> , 2005 ; BOUDJENAH-HAROUN <i>et al</i> , 2011
	Augmentation de la concentration en enzyme coagulante et ajustement du pH	Ajout de grande quantité de présure correspondant à 50 à 100 fois la quantité nécessaire pour le lait de vache	LARSSON-RAZNIKIEWICZ et MOHAMED, 1986
		Acidifier légèrement le lait au moment de l'emprésurage (1 à 2% de ferments lactiques, apport d'un sel de calcium ou de sodium ou d'acide lactique	RAMET, 1993
Augmentation de la température	Température admissible est en général entre 25–40° C	FARAH et BACHMANN, 1987	
l'égouttage	il est nécessaire de limiter l'intensité et la durée des traitements mécaniques du gel en raison de sa fragilité.	RAMET, 1993 et 2003	

Récemment, les travaux menés par SIBOUKEUR *et al* (2005) ont montré que l'extrait issu de caillettes de dromadaires adultes permet d'avoir une bonne activité coagulante et une activité protéolytique limitée. Selon BOUDJENAH-HAROUN *et al* (2011), l'optimisation du temps de floculation par ces extraits gastriques s'obtient à des conditions de coagulation de pH de 5,8, à une température de 42°C et à une concentration en CaCl₂ de 0,01M.

1.9. Les facteurs affectant la coagulation enzymatique du lait

1.9.1. Effet de la température

Le phénomène de coagulation est fortement dépendant de la température (DYBOWSKA et FUJIO, 1996). Au-dessous de 10°C, la coagulation du lait ne se produit pas. La vitesse de formation du coagulum augmente progressivement de 20 à 40-42 °C, mais à des températures plus élevées, le processus de coagulation ralentit et au dessus de 65°C, il n'y a plus de coagulation, l'enzyme est inactivée (DYBOWSKA et FUJIO, 1996 ; BRULÉ *et al*, 2006).

1.9.2. Effet du pH

L'influence du pH sur le temps de coagulation est la plus importante (NÁJERA *et al*, 2003). La diminution du pH du lait de 7,0 à 5,2 cause la diminution du temps de coagulation, le pH optimal d'action sur la CN-κ par la chymosine étant 5,1-5,3 (HUMME, 1972 ; VAN HOOYDONK *et al*, 1986 ; LÓPEZ *et al*, 1998) et 2-3 pour la pepsine (MIETTON *et al*, 1994). En revanche, à pH supérieur à 7, il n'y a plus de coagulation, l'enzyme étant rapidement inactivée (LENOIR *et al*, 2006).

Ainsi, les effets les plus importants de l'abaissement du pH du lait sont la solubilisation du phosphate de calcium micellaire (DALGLEISH et LAW, 1989 ; Le GRÄET et BRUL, 1993 ; VISSER *et al*, 1980), la diminution de la charge nette et la dissociation de la caséine des micelles (DALGLEISH et LAW, 1988 ; GASTALDI *et al*, 1996). Il a également été rapporté que la coagulation du lait par la présure n'est pas très efficace à un pH inférieur à 5,0 (KOWALCHYK et OLSON, 1977).

1.9.3. Effet de la teneur en ions calcium (CaCl₂)

L'addition au lait de chlorure de calcium, pratique courante en fromagerie, diminue le temps de coagulation et accroît la fermeté du coagulum (MONTILLA *et al*, 1995 ; BALCONES *et al*, 1996 ; SOLORZA et BELL, 1998) mais à haute concentrations de CaCl₂ (≥ 0,3M), le temps de coagulation peut être augmenté (McMAHON *et al*, 1984). L'ajout de CaCl₂ permet également de réduire le pH du lait résultant en une augmentation du taux d'agrégation des protéines (GASTALDI *et al*, 1994).

1.9.4. Effet de la dose d'enzyme et de sa nature

Le temps requis pour la coagulation du lait diminue avec l'augmentation de la concentration de l'enzyme, mais la fermeté du gel n'est pas modifiée (MAHAUT *et al*, 2005). La coagulation est également dépendante de la source de la chymosine. La chymosine porcine était huit fois plus active sur le lait porcin que sur le lait de vache (HOUEN *et al*, 1996), inversement, la chymosine de veau avait seulement la moitié de son activité contre le lait porcin que contre le lait de vache (FOLTMANN, 1992).



Matériels et méthodes

2. Matériels et méthodes :

La présente étude a été réalisée au laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) de l'université M. Mammeri de Tizi-Ouzou. Elle a été sous tendue par le matériel et les méthodes énumérés ci-dessous.

2.1. Matériels :

2.1.1. La source enzymatique:

- **Caillettes de dromadaires**

Les caillettes proviennent de dromadaires sélectionnés, d'une part, selon leur âge et, d'autre part, selon leur régime alimentaire (non sevrés, régime mixte et sevrés) (tableau VI). Après l'abattage au niveau de l'abattoir communal de Ouargla, le dernier tiers du troisième compartiment de leurs estomacs est prélevé. Les caillettes sont alors lavées à l'eau de robinet, dégraissées, hachées, mises dans des sacs en plastique puis congelées à -18°C.

Tableau VI : Caillettes de dromadaires utilisées.

Dromadaire	Non sevré (NS)	Alimentation mixte (M)	Adulte (A)
Age	< 1 ans	1 à 2 ans	9 ans
Régime alimentaire	Le chamelon tête encore sa mère	Il tête mais complète sa ration en broutant	Alimentation variée

2.1.2. Matériel biologique :

- **Poudre de lait écrémé type « low heat » :** Cette poudre de lait nous a été fournie gracieusement par la Laiterie de Drâa Ben Khedda (wilaya de Tizi- Ouzou) ;

- **Caséines camelines lyophilisées :** Elles sont obtenues selon le protocole décrit par SCHAMET *et al* (1992), à partir de lait préalablement écrémé ;

- **Enzymes coagulantes :**

- pepsine (EC 3.4.23.1), extraite d'estomacs de porc ;
- chymosine bovine recombinante Chy-Max (Christian. Hansen Lab. (DK) qui nous a été fournie gracieusement par la Laiterie de Drâa Ben Khedda (wilaya de Tizi-Ouzou).

- **Sérum albumine bovine (BSA),** (SIGMA chemical Co., U.S.A) ;

- **Kit pour l'étalonnage des gels d'électrophorèse en PAGE-SDS :** ce kit, préparé au sein du laboratoire comprend 4 protéines de PM connu : l' α -Lactalbumine, la β -Lactoglobuline, l'ovalbumine et la sérum albumine bovine.

2.1.3. Appareillage :

- unité d'électrophorèse sur mini-cuves verticales (Hoefer SE 200 et SE 280, U.S.A) comprenant : couleur de gels, cuves d'électrophorèse (dimensions 10 × 8 cm et 10 × 12 cm), générateur de courant (max : 250 V et 100 mA), plaques en verre et en hydroxyde d'alumine (10 × 8 cm, 10 × 12 cm), espaceurs d'épaisseurs variées (0,75 ; 1 ; 1,5 mm).

- unité de chromatographie liquide basse pression comprenant cinq (5) éléments : un réservoir à éluant, une colonne chromatographique contenant le gel (dimension 1 x 10 cm et 1 x 20 cm), un détecteur UV, une pompe péristaltique et un enregistreur graphique.
- Autres matériel d'analyses usuelles (agitateurs variés, balance de précision à 1mg bain-Marie, centrifugeuse, pH mètre, spectrophotomètre lyophilisateur à plateau...).

2.1.4. Petit matériel :

Un certain nombre de petit matériel approprié a été également utilisé dans cette étude. Il s'agit de : micropipettes, micro-seringues Hamilton, membranes de dialyse (seuil d'exclusion 10.000 Da), gants et masques pour manipulation de l'acrylamide ainsi que différents types de verrerie (bêchers, fioles jaugées, fiole à vide, pipettes graduées, tubes à essais, burette...etc).

2.1.5. Produits et réactifs spécifiques :

- colorants et réactifs : acrylamide, bleu de bromophénol, bleu de Coomassie R250, nitrate d'argent, dodécyl sulfate de sodium, glycine, 2-mercaptoéthanol, N, N'méthylène-bis- acrylamide, persulfate d'ammonium, réactif de Folin-Ciocalteu, TEMED....
- supports chromatographiques (diéthylaminoéthyl cellulose (DEAE cellulose DE 52) et Sephacryl S200.

2.2. Méthodes :

2.2.1. Extraction des enzymes coagulantes :

L'extraction est effectuée selon la méthode de VALLES et FURET (1977) pour le bovin et adapté par nos soins aux extraits issus de caillettes de dromadaires (Figure 09). Un échantillon de caillette de poids PU (g) est décongelé et macéré dans un volume ($1,25 \times$ PU) d'une solution d'HCl 0,2M, à une température de 42°C pendant 60 minutes. Après filtration du mélange on obtient un extrait brut total.

Après macération, les extraits obtenus sont clarifiés par l'ajout de 1% (V/V) d'une solution de sulfate d'aluminium $Al_2(SO_4)_3$, 1M et 5% (V/V) d'une solution de sulfate dissodique Na_2SO_4 , 1M, chauffée quelques minutes à 42 C°. Après filtration, on obtient un filtrat jaune auquel nous faisons subir une concentration par addition d'une solution saturée de NaCl, additionnée à 1% (V/V) d'une solution d'HCl ($d= 1.19$). Après un repos d'une heure suivie d'une centrifugation ($2100 \times g / 20min$), nous obtenons un précipité humide que l'on fait dissoudre dans un volume minimal d'eau distillée. Le pH de ces extraits enzymatiques clarifiés est ajusté à 5,5 par une solution de phosphate dissodique, 1M.

Les extraits obtenus ont été dénommés ECD NS (extraits issus d'animaux non sevrés, ECD M (extraits issus d'animaux à alimentation mixte) et ECD A (extraits issus d'animaux adultes). La conservation de ces ECD est réalisée à 4°C après addition de quelques grains de thymol.

2.2.2. Optimisation des conditions d'extraction des enzymes coagulantes :

Dans le but de déterminer les conditions optimales d'extraction des enzymes gastriques de dromadaire, nous avons procédé à quelques modifications des conditions expérimentales préconisées par VALLES et FURET (1977) pour le cas des enzymes gastriques bovines.

Ces modifications ont touché la phase de macération (concentration en HCl et la température de macération). Pour cela, les températures de 38, 40 et 42 ont été choisies pour chaque une des différentes concentrations d'HCl (0,1 ; 0.2 et 0.3 M).

Les variations de l'activité coagulante, exprimées en unité présure (UP), des extraits dans les différentes conditions ainsi que leur activité protéolytique ont été suivies.

2.2.3. Caractérisation des extraits coagulants gastriques :

La caractérisation des extraits enzymatiques consiste en la détermination de leur teneur en protéines, par la méthode LOWRY *et al*, 1951, et leurs activités coagulante et protéolytique.

2.2.3.1. Détermination de la teneur en protéines :

Le dosage est réalisé selon la méthode spectrophotométrique de LOWRY *et al* (1951). Elle est facile à mettre en œuvre et assez reproductible. Le réactif de Folin Ciocalteu ou acide phospho-tungsto-molybdique, additionné à une solution protéique diluée, est plus ou moins réduit par les protéines, notamment les groupements phénoliques de la tyrosine et indoles du tryptophane et, dans une moindre mesure, ceux de la cystéine, cystine et histidine.

Cette réaction donne naissance à un complexe coloré : le bleu de molybdène dont l'intensité peut être mesurée au spectrophotomètre à 750 nm.

La sensibilité du dosage est augmentée par un traitement préalable de la réaction par un réactif au cuivre en milieu basique. Ce réactif agit sur les liaisons peptidiques.

La densité optique (DO) lue au spectrophotomètre à 750 nm permet de déterminer la concentration en protéines de l'échantillon analysé en se référant à une courbe d'étalonnage $DO=f(C)$ établie avec des solutions en concentrations protéiques connues (Figure 10).

Le mode opératoire est donné en annexe 09.

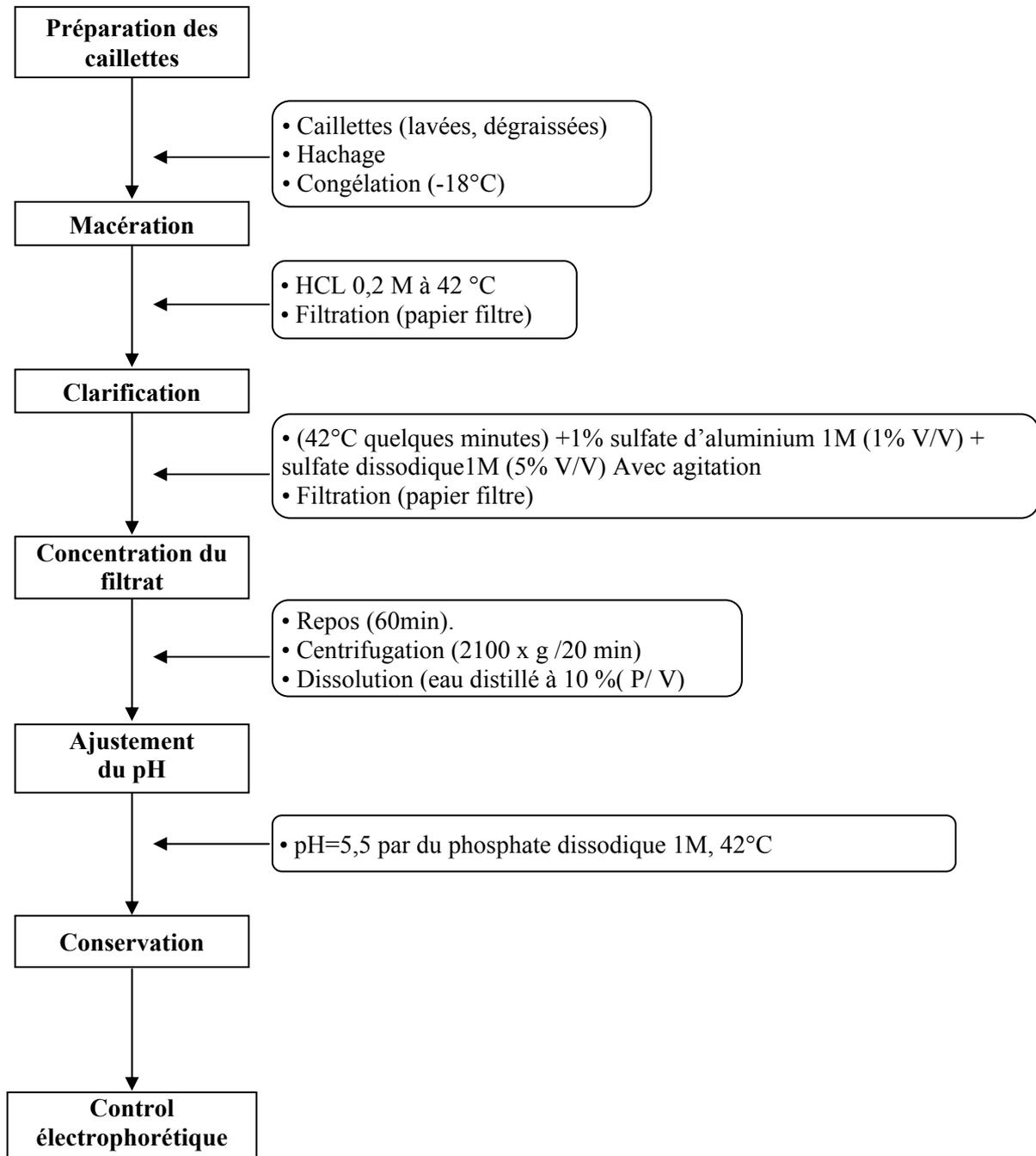


Figure 09 : Protocole d'isolement des extraits enzymatiques gastriques préconisé par VALLES et FURET (1977) pour le bovin, et adapté aux extraits issus de caillettes de dromadaires

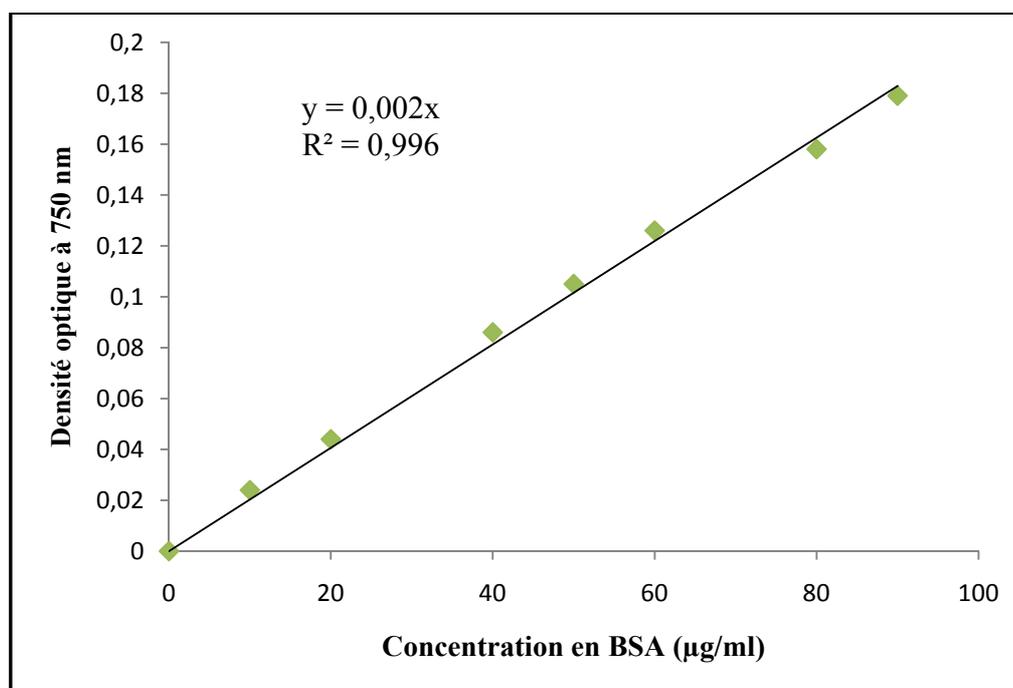


Figure 10 : Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de LOWRY *et al* (1951). L'albumine sérique bovine (BSA) est utilisée comme protéine de référence ; R^2 = coefficient de corrélation.

2.2.3.2. Détermination de l'activité coagulante :

L'activité coagulante des extraits enzymatiques est déterminée selon la méthode de BERRIDGE (1945) modifiée par COLLIN *et al* (1977). Cette méthode consiste à déterminer visuellement dans des conditions standardisées, le temps d'apparition des flocons dû à la formation d'agrégats de caséine. Cette transformation s'observe mieux sur un film fin de lait dans un tube en rotation, disposé sur un fond noir. Cette méthode donne des résultats fiables avec une bonne reproductibilité.

La méthode consiste à ajouter 1 ml d'extrait coagulant à 10 ml de substrat standard (poudre de lait reconstituée) à 30°C puis à noter le temps de coagulation.

La préparation du substrat standard consiste à la dissolution de la poudre de lait type (low heat) à 10% (P/V) dans une solution de CaCl_2 (0,01M) et ajustement du pH à 6,5 par l'ajout d'une solution de NaOH (0,1N) (Figure 11).

Le substrat standard est ensuite reparti dans des tubes à essais, à raison de 10 ml/tube, suivi d'une incubation dans un bain marie à 30 °C pendant 15 min. L'addition de l'extrait coagulant est réalisée à raison de 1ml/10ml du substrat standard. Une homogénéisation immédiate et rapide est nécessaire. Dans le bain marie, les trois retournements successifs du mélange après 30 secondes correspondent au temps zéro (Figure 12).

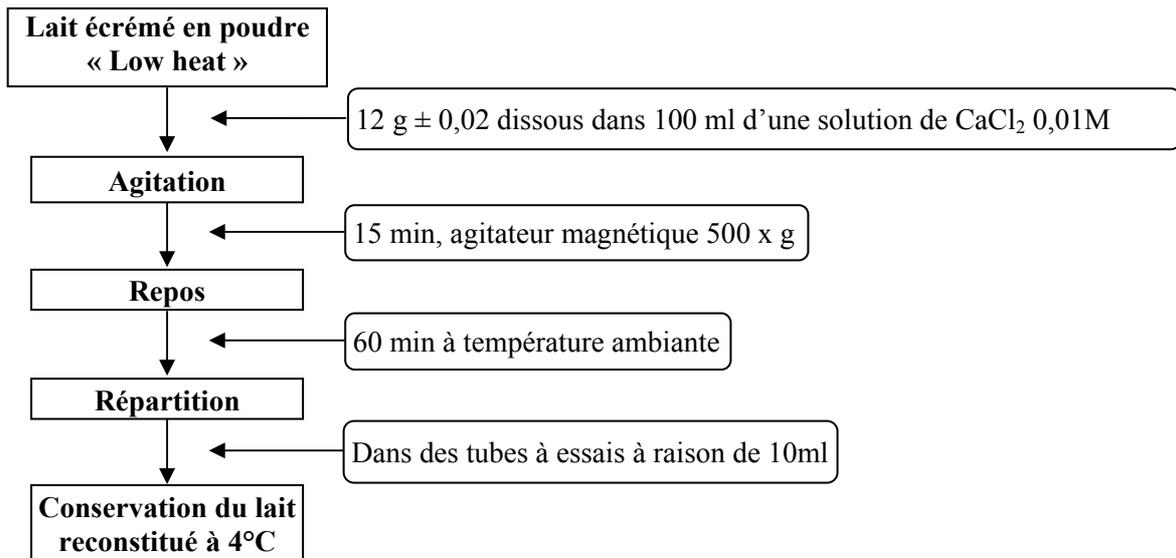


Figure 11 : Préparation du substrat standard (poudre de lait reconstitué).

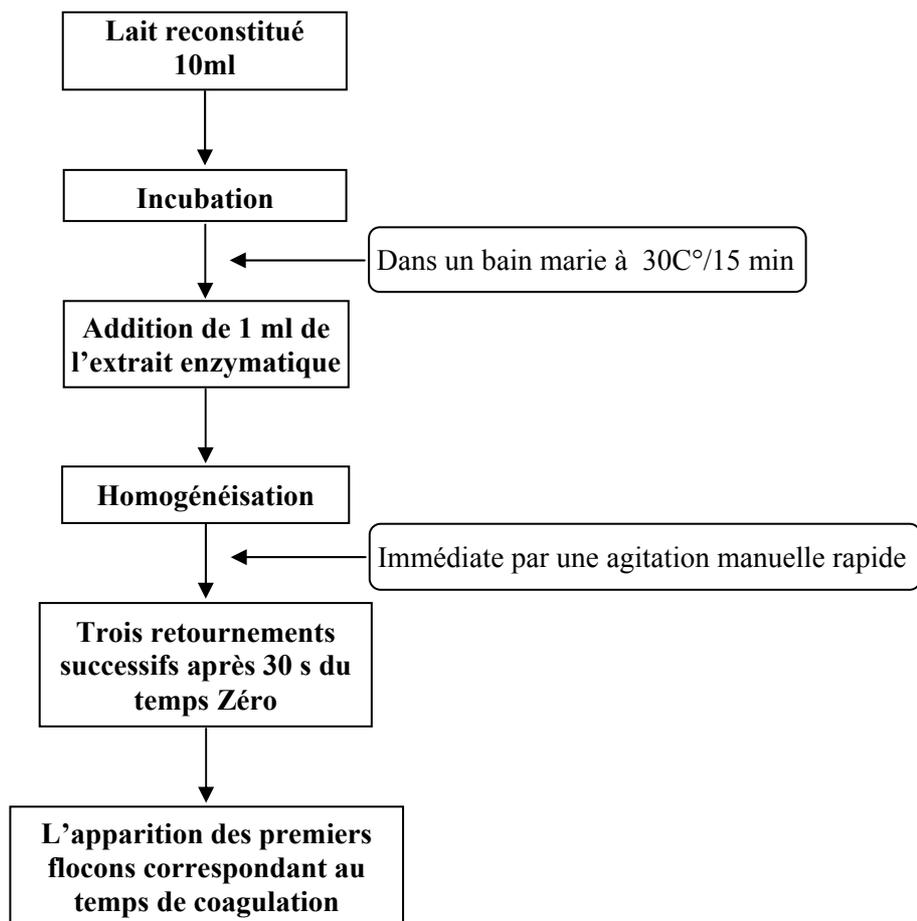


Figure 12 : Mesure du temps de floculation par la méthode de BERRIDGE (1945) modifiée par COLLIN *et al* (1977).

L'unité d'activité coagulante (U.A.C) ou "unité présure" (U.P) est définie comme étant la quantité d'enzyme par millilitre d'extrait enzymatique qui provoque la floculation de 10 ml de substrat en 100 sec à 30 °C. Elle est calculée comme suit :

$$UP=10 \times V / Tc \times Q$$

UP : unité présure ;

V : volume de substrat standard utilisé (ml) ;

Q : volume d'extrait coagulant (ml) ;

Tc : temps de coagulation (secondes).

2.2.3.3. Détermination de l'activité protéolytique :

La mesure de l'activité protéolytique des ECD est fondée sur l'intensité de la protéolyse des caséines camelines en solution sous l'action enzymatique de ces extraits. Les peptides formés au cours de l'hydrolyse enzymatique peuvent être séparés des caséines non hydrolysées par précipitation de ces dernières à l'acide trichloroacétique (TCA 12%). A cette concentration, le TCA permet la défécation de tous les peptides en ne laissant en solution que ceux de faible poids moléculaire.

Après filtration, la mesure de l'absorption à 280 nm permet d'apprécier la richesse en peptide, du filtrat obtenu. Celle-ci étant proportionnelle à l'activité protéolytique.

2.2.3.3.1. Préparation des caséines :

Les caséines camelines sont préparées selon la méthode de SHAMET *et al* (1992) à partir du lait camelin. Le lait est écrémé par centrifugation à 3500×g pendant 20 min à 30°C. Le pH est ensuite ajusté à 4,3, comme préconise par WANGOH *et al* (1998), par ajout progressif d'HCl 4N. après centrifugation à 4000xg/30min, il y a formation d'un précipité de caséines. Ce dernier est dissout dans l'eau distillée, puis dialysés contre l'eau distillée à 4°C pendant 48 à 72 heures, afin d'éliminer les composés azotés non protéiques (NPN), le lactose et les sels minéraux. Après la dialyse, les échantillons de protéines sont congelés et lyophilisés.

2.2.3.3.2. Les conditions d'hydrolyse :

Pour déterminer l'activité protéolytique des ECD, quatre étapes sont suivies :

- l'ajustement de l'activité coagulante qui consiste à la dilution des ECD brutes avec de l'eau distillée jusqu'à un niveau qui permet d'obtenir un temps de coagulation fixé à 15min (SHAMET *et al* ,1992) ;
- l'hydrolyse enzymatique est réalisée par l'incubation à 35°C pendant 60min d'un volume de 1 ml du substrat caséinique (solubilisation des caséines camelines lyophilisées (2% ; P/V) dans l'eau distillée) additionné d'extrait coagulant dilué (1ml) ;
- le blocage de la réaction enzymatique est réalisé au bout de 60min d'incubation par addition de 5ml de TCA à 12% (P/V) ;
- enfin, la mesure de la protéolyse est effectuée à 280 nm sur le mélange filtré après un repos de 15 min à la température ambiante ;

2.2.4. Méthode électrophorétique :

- **Principe :**

L'électrophorèse désigne une méthode d'analyse et de fractionnement, basée sur la migration différentielle de particules chargées (dans ce cas les protéines) sous l'effet d'un champ électrique.

2.2.4.1. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) :

En dehors de l'électrophorèse en veine liquide, les séparations des particules dans un champ électrique sont souvent réalisées sur des supports solides (papier, agarose, acétate de cellulose et polyacrylamide). Parmi ces supports, le gel de polyacrylamide étant l'un des plus utilisés en raison d'un certain nombre d'avantages qu'il procure :

- transparence du gel, permettant une analyse quantitative des protéines par densitométrie ;
- reproductibilité élevée et facilité de mise en œuvre ;
- possibilité de servir comme tamis moléculaire.

Notons que le gel de polyacrylamide correspond à un mélange à des proportions convenables de l'acrylamide et son comonomère : le N,N' méthylène-bis-acrylamide en utilisant des catalyseur comme le persulfate d'ammonium est le TEMED (tétra méthyl éthylène diamine).

Ainsi, le degré de porosité du gel (ou de réticulation) est variable selon les indices T et C choisis selon la relation :

$$T = (a+b/v) \cdot 100 (\%) ;$$

$$C = (b/a+b) \cdot 100 (\%) ;$$

a : acrylamide (g) ;

b : N,N'-méthylène-bis-acrylamide (g) ;

v : volume final de la solution (ml) ;

T : pourcentage de la concentration totale en (acrylamide + bis-acrylamide) ;

C : pourcentage de la concentration en (bis-acrylamide) par rapport au total (acrylamide et bisacrylamide).

2.2.4.2. Conditions générales et conduite de l'électrophorèse :

2.2.4.2.1. Préparation des échantillons destinés à l'analyse électrophorétique :

L'extrait enzymatique est prélevé à raison de 1 à 2mg/ml, puis additionné d'un tampon approprié. La composition de ce dernier dépend du type d'électrophorèse à réaliser.

Du bleu de bromophénol est ajouté comme indicateur coloré au tampon pour permettre le suivi de la migration et repérer la fin de l'électrophorèse.

2.2.4.2.2. Dépôt de l'échantillon dans le gel et mise sous tension :

L'échantillon à analyser est déposé à raison de 20 à 25 μ l dans chaque puits, à l'aide d'une microsiringue. L'unité d'électrophorèse est mise sous tension appropriée et la migration doit se dérouler en courant et voltage constants (20mA ; 200V).

2.2.4.2.3. Révélation des bandes de migration électrophorétique :

A la fin de la migration, les gels d'électrophorèse ont été révélés au bleu de Coomassie et au nitrate d'argent.

- **Coloration au bleu de Coomassie :**

- **fixation** : les protéines sont fixées par immersion dans une solution d'acide trichloracétique (TCA) 12% (p/v) pendant 45 mn ;
- **coloration** : le gel est immergé 2 à 4 h dans une solution de coloration contenant du bleu de Coomassie 0,2% (p/v) dissous dans une solution constituée du mélange eau distillée (1 volume), méthanol (1 volume) et TCA 2% (p/v) ;
- **décoloration** : elle est réalisée par immersion du gel dans le mélange (eau/ méthanol/ acide acétique).

- **Coloration au nitrate d'argent :**

- **fixation** : les protéines sont fixées par immersion dans une solution constituée du mélange eau distillée, éthanol 30% (v/v), acide acétique 10% (v/v) pendant une nuit ;
- **sensibilisation** : le gel est immergé dans une solution de thiosulfate de sodium 0,02% (p/v) pendant 1min ;
- **Bain d'argent** : dans une solution de nitrate d'argent (AgNO_3) 0,1% (dans l'eau p/v) pendant 30min ;
- **Développement** : elle est réalisée par immersion du gel dans le mélange carbonate de Na (Na_2CO_3) / thiosulfate de Na 2% (p/v) / formaldéhyde / eau distillée) ;
- **Arrêt du développement** : dans une solution d'acide acétique 1% (v/v) pendant 5min.

2.2.4.3. Conditions expérimentales :

Les protocoles ont été optimisés au laboratoire (LABAB) en utilisant des mini-cuves Hofer SE 200 et SE 280 (Figure 13).

2.2.4.3.1. Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE native) :

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans les conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE native) est une méthode particulièrement résolutive pour les protéines globulaires. Celles-ci migrent dans ce cas selon leur charge nette et leur poids moléculaire.

En nous basant sur la méthode de HILLIER (1976) (Annexe 10), nous avons utilisé un gel de polyacrylamide à T= 12% et C= 2.7%. Le tampon de gel est composé de (TRIS, 0,75 M, pH 8,9). Le tampon d'électrode est constitué de (TRIS, 5mM ; glycine, 77 mM ; pH 8,3). Les échantillons protéiques sont préparés à raison de 2 mg/ml dans une solution contenant le tampon de gel (1/10 V/V), de l'eau distillée (7/10 V/V) et du glycérol 10% (V/V).

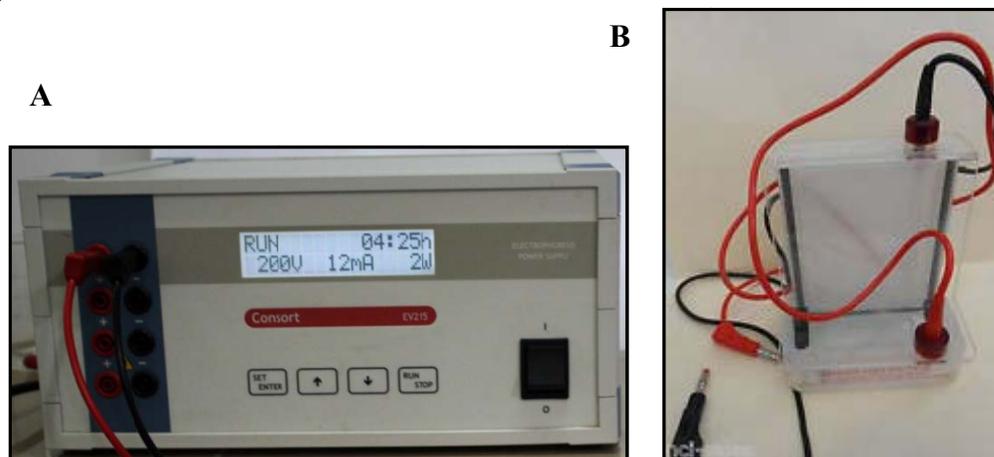


Figure 13 : Photographie de l'unité d'électrophorèse sur mini-cuve HOFFER SE 280. A : Générateur ; B : Cuve de migration.

2.2.4.3.2. Electrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes en présence de SDS et de 2-ME (PAGE-SDS) :

Les électrophorèses sont réalisées selon la méthode de LAEMMLI et FAVRE (1973) en conditions dissociantes et dénaturantes (Annexe 11).

Le dodécyle sulfate de sodium «SDS» ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{11}\text{-OSO}_3, \text{Na}^+$), est un détergent anionique et un puissant agent dénaturant. En présence d'un agent réducteur chargé de rompre les ponts disulfures, tel le 2-mercaptoéthanol, et à température élevée (3 à 4 mn à 100°C), il permet de solubiliser les protéines et de se fixer à ces dernières (dont les chaînes sont ouvertes) en leur conférant une charge négative.

La fixation en excès du SDS sur les protéines permet d'éliminer le facteur de séparation selon la charge. De ce fait, les différents composés ne seront différenciés par migration électrophorétique que selon leur poids moléculaire.

La PAGE-SDS utilise un système biphasiques, comprenant deux gels : un gel de concentration faiblement réticulé qui n'exerçant aucun effet de tamisage sur les protéines, et un gel de séparation où les composés seront séparées selon leur poids moléculaire.

Pour cela, nous avons utilisé un gel de concentration (T= 4,8% et C = 2,8 %) en tampon (TRIS, 0,5 M ; pH 6,8) et un gel de séparation (T= 17 % et C= 2,7%) en tampon (TRIS, 1,50 M ; pH 8,8). Le tampon d'électrode est composé de (TRIS, 49 mM ; glycine, 384 mM ; SDS 1%, p/v ; pH 8,3).

Les échantillons protéiques sont préparés et mis en solution dans le tampon de gel de concentration (TRIS 0.5M), de SDS (10%, p/v), de 2-mercaptoéthanol (4%, v/v) et d'eau distillée. Ils sont chauffés à 100°C pendant 3 à 4 minutes puis additionnés de glycérol (50% v/v).

2.2.4.3.3. Electrophorèse bidimensionnelle (EBD) :

Elle consiste en une combinaison de deux principes de séparations électrophorétiques : une séparation selon le rapport charge/PM, selon le point isoélectrique ou selon le PM (conditions non dénaturantes) en première dimension, suivie d'une séparation selon le PM en deuxième dimension.

Les combinaisons des techniques électrophorétiques possibles sur gel de polyacrylamide sont : PAGE-native×PAGE-SDS, PAGE-urée×PAGE-SDS, IEF×PAGE-SDS, PAGE-SDS (en absence de 2-ME)×PAGE-SDS (en présence de 2-ME).

Dans cette étude, l'EBD est réalisée en combinant, en première dimension, la PAGE-native avec la PAGE-SDS en conditions réductrices, en deuxième dimension.

A la fin de la première dimension (PAGE native), une bande de gel de 1 cm de largeur est découpée longitudinalement suivant le sens de migration. Elle est immergée quelques minutes dans le tampon [TRIS, 0,125 M (pH 6,8) ; SDS 2% (p/v) ; 2-mercaptoéthanol 0.1% (v/v) ; glycérol 5% (v/v)]. Dans ce cas le chauffage n'est pas indispensable. Elle est ensuite insérée sur la partie supérieure du gel d'électrophorèse pour être séparée selon la deuxième dimension (PAGE SDS).

2.2.4.3.4. Détermination des poids moléculaires des protéines :

L'existence d'une relation linéaire dans la zone de fractionnement entre le Log (PM) et la distance de migration, permet la détermination des poids moléculaires des protéines.

Pour cela, nous avons fait migrer dans les mêmes conditions, des protéines de MM connus, à savoir, la sérum albumine (67 kDa), l'ovalbumine (45 kDa), la β -Lactoglobuline (18 kDa) et l' α -Lactalbumine (14 kDa). Une courbe de calibration du gel de séparation, établie en utilisant ces dernières protéines, a été tracée. Les PM des différentes entités protéiques sont déterminés graphiquement sur cette courbe $\text{Log (PM)} = f(\text{distance})$ (Figure 14).

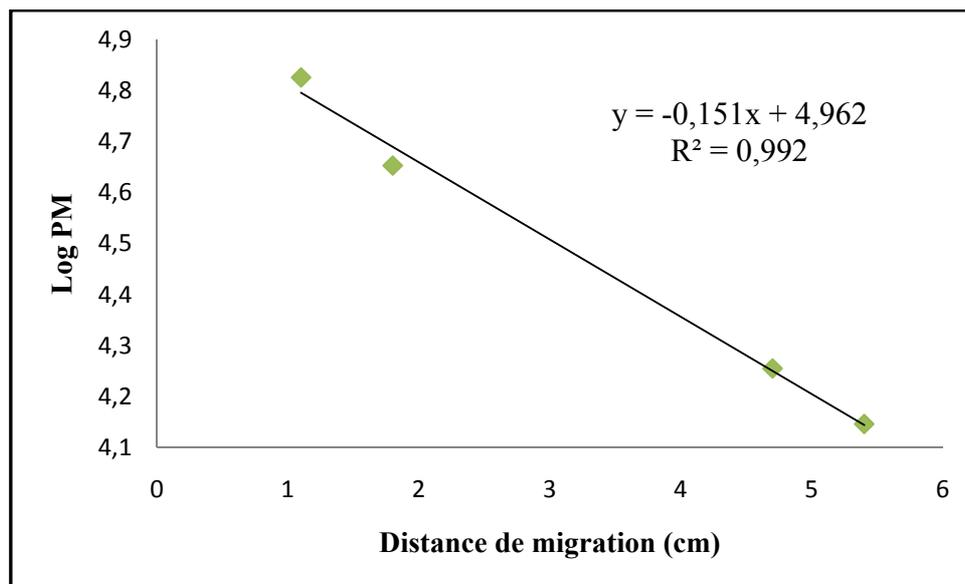


Figure 14 : Courbe de calibration du gel de séparation en PAGE-SDS établie en utilisant un standard protéique composé de BSA (67 kDa), Ovalbumine (45 kDa), β -Lactoglobuline (18 kDa) et α -Lactalbumine (14 kDa).

2.2.5. Purification de l'extrait enzymatique brut issu de caillettes de dromadaires adulte sur unité de chromatographie liquide basse pression (Biorad) :

Les protocoles ont été optimisés au laboratoire (LABAB) en utilisant une unité de chromatographie liquide basse pression (Biorad) (Figure 15).

2.2.5.1. Chromatographie d'échange d'anions sur DEAE-cellulose :

La chromatographie échangeuse d'ions est basée sur l'affinité que les ions ou les molécules en solution ont pour les ions de charge opposée de la phase stationnaire.

Le support que nous avons utilisé est la DEAE-cellulose DE52 (Figure 16) qui est un échangeur anionique faible. La phase stationnaire est constituée d'une résine qui échange réversiblement des anions, elle est donc chargée positivement. Le groupement positif, ammonium quaternaires, est lié à la résine (cellulose) de façon covalente. La phase mobile permet d'éluer sélectivement les protéines suivant un ordre décroissant de leurs charges, et ce par passage de tampons ayant des concentrations croissantes en chlorure de sodium.

2.2.5.1.1. Conditions expérimentales :

La DEAE-cellulose (environ 2g) est gonflée au préalable par lavages successifs à travers le verre fritté successivement au moyen des solutions suivantes :

- 200 ml d'hydroxyde de sodium 0,1 N ;
- 200 ml d'acide chlorhydrique, 0.1 N ;
- et enfin, avec le tampon de chromatographie (phosphate de sodium pH 5,5) jusqu'à ce que le pH du filtrat atteigne le pH du tampon utilisé.

La chromatographie est réalisée selon la méthode de ROTHE *et al* (1976) sur une colonne (10cm×1cm) contenant de la DEAE-cellulose comme gel de séparation, équilibrée avec le tampon phosphate de sodium pH 5,5 (Annexe 12).

L'élution est réalisée à température ambiante en opérant un gradient continu de concentration croissante en NaCl à un débit de 0,5ml/min. L'élution des protéines de la colonne chromatographique a été suivie à la longueur d'onde de 280 nm. Des fractions de 1,5ml chacune sont collectées à l'aide d'un collecteur de fractions automatique et leurs activités coagulantes sont déterminées. Les fractions actives sont rassemblées, concentrées et leur degré de pureté est déterminé par électrophorèse sur gel (SDS-PAGE).

2.2.5.1.2. Préparation des échantillons :

- **Extrait brut total** : Environ 5 ml d'extrait brut, de pH ajusté à 5,5 (avec du tampon phosphate dissodique Na₂HPO₄ 1M), dialysé contre le même tampon phosphate pH5,5, est déposé en haut de la colonne ;
- **Chymosine bovine recombinante Chy-max** : constituée d'un mélange de chymosine, caséine peptone et de chlorure de sodium. Pour cela, 520mg de chymosine sont dissous dans 20ml du tampon phosphate pH5,5 et dialysés contre le même tampon. 2ml (26mg/ml) sont déposés en haut de la colonne ;
- **Pepsine porcine commerciale** : 150mg de pepsine sont dissous dans 10ml du tampon phosphate pH5,5 et dialysés contre le même tampon. 2ml (15mg/ml) sont déposés en haut de la colonne.

2.2.5.2. Chromatographie de perméation sur Sephacryl S200 :

Dans la chromatographie de perméation, les molécules sont séparées selon leur taille et leur forme. Ici la phase stationnaire est constituée par des billes d'une substance hydratée spongiforme dont les pores correspondent à une zone relativement étroite de dimensions moléculaires.

Dans le présent travail, la phase stationnaire est constituée du gel de Sephacryl S200 qui est préparé par réticulation covalente d'un allyle de dextran avec du N, N' méthylène bisacrylamide (Figure 17). Ce gel, ayant une grande stabilité, possède un domaine de fractionnement situé entre 5.10^3 et $2.5.10^5$ Da.

2.2.5.2.1. Conditions expérimentales :

Le gel (environ 10 g) est mis en contact du tampon de départ (tampon phosphate de Na, pH 5,5 + 0,15M NaCl) pendant 30 mn à température ambiante. Il est ensuite dégazé sous vide, puis coulé dans la colonne (20 x 1cm) en une seule fois.

Après équilibrage de la colonne par l'éluant et stabilisation du débit à 0,3ml/min, le volume mort de la colonne est déterminé (V_0) par injection du bleu de dextrane à raison de 1 mg/ml, qui a une masse moléculaire élevée (10^6 Da).

La fraction douée d'une forte activité coagulante issue de l'échange ionique est déposée en haut de la colonne et éluée dans ces conditions à débit constant. Des fractions de 1,5 ml sont recueillies et caractérisées (activités coagulante, teneurs protéiques et électrophorèse).

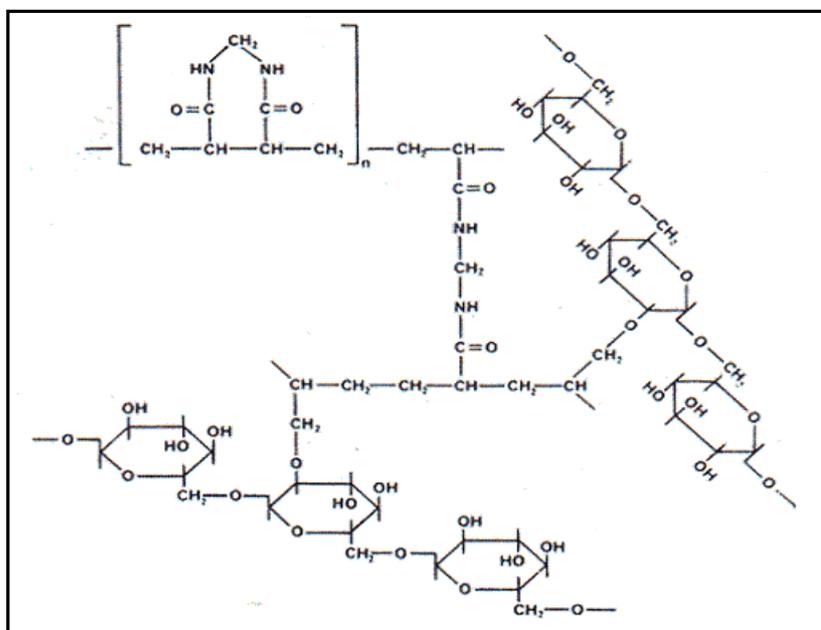


Figure 17 : Structure partielle du Sephacryl S200.

2.2.5.2.2. Détermination du poids moléculaire de l'enzyme :

Il existe une relation linéaire entre le volume d'éluion d'une substance et le logarithme de sa masse moléculaire.

Pour cela, nous avons utilisé des protéines de MM connus, à savoir, l'albumine (67 kDa), l'ovalbumine (45 kDa), la chymotrypsinogène A (25 kDa) et la ribonucléase A (13,7 kDa). On porte le logarithme de la masse moléculaire en fonction du volume d'éluion, comme indiqué dans la figure 18 : $\log MM = f(V_e)$.

La précision de cette technique est relative, dans la mesure où les formes des molécules connues et inconnues sont supposées identiques. Néanmoins, la chromatographie de perméation est souvent utilisée pour estimer des masses moléculaires car elle est applicable à des échantillons non purifiés.

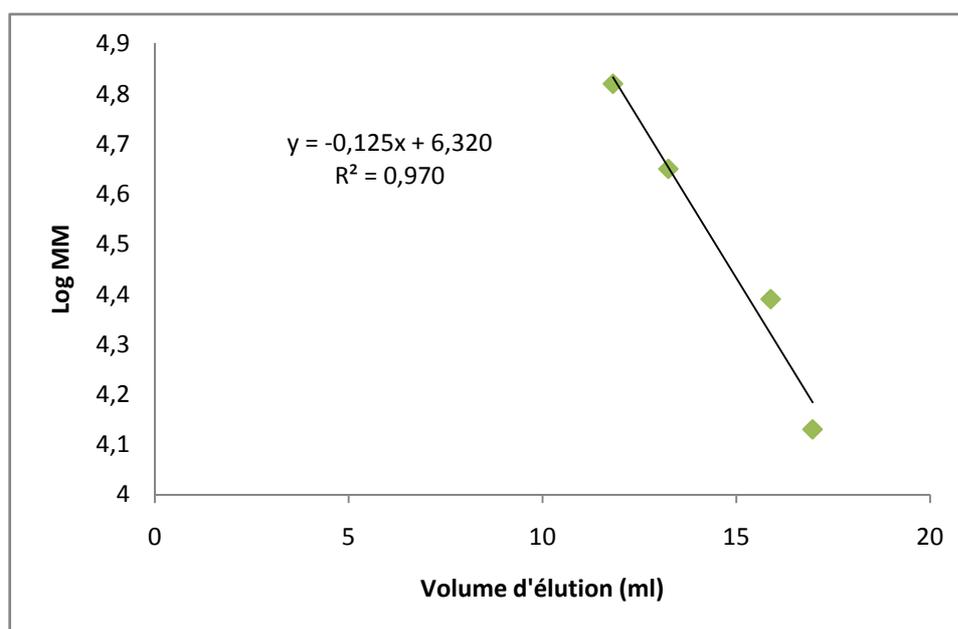


Figure 18 : Graphique du log de la masse moléculaire en fonction du volume élué



Résultats et discussion

3. Résultats et discussion :

3.1. Optimisation des conditions d'extraction des enzymes coagulantes :

La méthode traditionnelle pour la préparation d'extraits coagulants à partir de caillettes d'animaux comporte fondamentalement l'extraction des pro-enzymes des caillettes, leur activation, la clarification des extraits et, éventuellement, leur concentration. Dans le processus d'extraction, le tampon phosphate de sodium, les sels (notamment le NaCl) et l'eau distillée sont les solvants les plus couramment utilisés (CHOW et KASSEL, 1968 ; FOX, 1969 ; GREEN, 1972 ; O'LEARY et FOX, 1973).

Dans le présent travail, nous avons isolé des extraits enzymatiques à partir de trois types de caillettes issues de dromadaires non sevrés, à alimentation mixte et adultes selon la méthode décrite par VALLES et FURET (1977) et que nous avons désignés ECD NS, ECD M et ECD A respectivement. Cette méthode est basée sur une macération des caillettes en milieu acide, généralement dans des solutions d'acide chlorhydrique. Dans ces procédés, l'extraction et l'activation des pro-enzymes se font simultanément, de sorte que l'obtention des enzymes actives est plus rapide en général que dans le procédé traditionnel.

Notons qu'une autre procédure d'extraction par ultrasons a été introduite par KIM et ZAYAS (1991). L'activité de la chymosine dans ces extraits était plus élevée que dans les extraits classiques, et aucun effet sur l'activité protéolytique, ni sur la stabilité de l'enzyme, durant le stockage, ont été observés.

Afin de déterminer les conditions optimales d'extraction, on a macéré ces caillettes à différentes températures (38, 40 et 42° C) et à des concentrations variables en acide chlorhydrique (0,1 M, 0,2 M et 0,3 M).

Les essais réalisés montrent que :

- l'activité coagulante (exprimée en UP) des ECD NS, à alimentation mixte et adultes atteint son maximum pour une température de macération des caillettes et une concentration en HCl de 40°C/0,3M, 40°C/0,2M et 42°C/0,2M respectivement ;
- l'activité protéolytique reste en moyenne stable avec l'accroissement de la température et la concentration en HCl de la solution extractive. Cependant, cette activité est relativement plus élevée dans le cas des extraits issus d'animaux jeunes que ceux provenant d'animaux âgés ;
- à une température de macération des caillettes de 42°C et une concentration en HCl de 0,2M (Figure 19), l'extrait issu de caillettes de dromadaires adultes permet d'avoir une activité coagulante supérieure à celle des autres préparations ; avec la plus faible activité protéolytique.

Ces résultats concordent avec ceux rapportés par SIBOUKEUR *et al* (2005) et BOUDJENAH-HAROUN *et al* (2011) qui ont pu montrer que les préparations enzymatiques gastriques issues de dromadaires âgés présentent une meilleure affinité pour le lait de chamelle que celles issues de jeunes dromadaires.

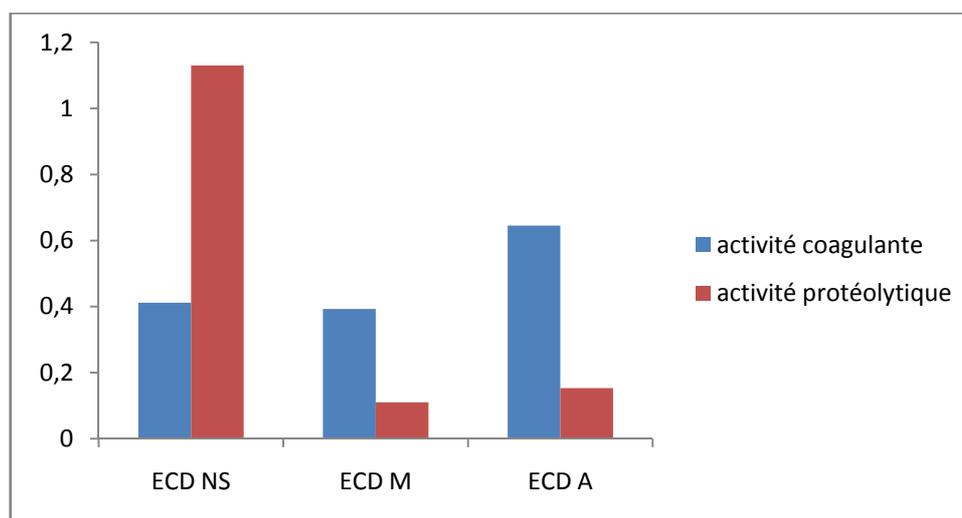


Figure 19 : Variation moyenne de l'activité coagulante et protéolytique pour les trois ECD dans les conditions de macération de 42°C et 0,2 M.

A la lumière de ces résultats, nous pouvons conclure que :

- les conditions optimales d'extraction pour l'ECD non sevrés sont à une température de 40°C et une concentration en HCl de 0,3M. Elles sont de 40°C/0,2M et 42°C/0,2M pour l'ECD à alimentation mixte et l'ECD adultes respectivement ;
- l'ECD adultes a montré une plus grande thermostabilité que l'ECD non sevrés et à alimentation mixte ;
- l'ECD adultes présente le rapport activité coagulante/activité protéolytique (Ac/Ap) le plus élevé dans les conditions de macération de température et d'HCl de 42°C/0,2M. Cette caractéristique fourni le choix de cet extrait pour la coagulation du lait de chamelle car plus ce rapport est grand, plus l'enzyme est spécifique et les fromages obtenus sont de haute qualité avec de bon rendements fromagers ; tandis qu'un rapport Ac/Ap faible donne des rendements fromagers réduits avec des fromages ayant des saveurs désagréables.

Sur la base de ces résultats, l'ECD adultes a été retenu pour la suite des essais de caractérisation moléculaire et de purification.

3.2. Analyse électrophorétique des extraits coagulants bruts :

3.2.1. Analyse électrophorétique des extraits de caillettes de dromadaires non sevrés (NS), à alimentation mixte (M) et adultes (A) :

Les sécrétions abomasales de ruminants n'ont généralement fait l'objet que d'études ponctuelles. Les auteurs se sont surtout intéressés au volume, à l'acidité et à l'activité pepsique du suc gastrique.

Le suc gastrique des ruminants est très bien pourvu en enzymes digestives. Outre les enzymes protéolytiques (principalement, la chymosine et la pepsine), le suc gastrique contient les lysozymes C (agissant sur la paroi bactérienne mais en quantité peu importante chez le préruminant), une enzyme glycolytique (amylase) et des enzymes nucléolytiques

(ribonucléase et désoxyribonucléase) (GUILLOTEAU *et al*, 1994). Cependant, le suc gastrique du dromadaire est très peu étudié d'où la difficulté à interpréter les résultats.

Afin d'avoir une idée sur la nature des différences pouvant être mises en évidence entre un extrait de caillette provenant d'un animal non sevré, à alimentation mixte et celui provenant d'un animal adulte, nous avons examiné le comportement de ces extraits en électrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes en présence de Dodécyl Sulfate de Sodium (SDS) et de β mércaptoéthanol à T=17%.

La figure 20 montre l'analyse électrophorétique des extraits de la muqueuse abomasale du dromadaire non sevré (ECD NS), à alimentation mixte (ECD M) et adulte (ECD A) isolés selon le protocole décrit précédemment.

Sur le profil électrophorétique (Figure 20), les protéines majeures apparaissent sous forme de bande de migration de largeur et d'intensité (de coloration) plus ou moins importante notées A, B et C selon l'ordre croissant de leur migration. Sur l'électrophorégramme figure aussi deux zones, notées (a) et (b), constituées le plus souvent de bandes protéiques de faibles intensités avec des niveaux de migration très proches.

En examinant le comportement de ces extraits en électrophorèse, on constate qu'il y a une différence assez nette entre les profils provenant des trois origines sur le plan qualitatif et quantitatif. De ce fait, il est possible de vérifier l'origine des caillettes et dire si elles proviennent d'un dromadaire non sevré, à alimentation mixte ou adulte.

En comparant les profils des trois ECD, nous pouvons relever les observations suivantes :

- la bande A de forte intensité est présente dans l'ECD NS, M et A. Toutefois on remarque que dans l'ECD A, elle est bien focalisée et beaucoup plus intense que sur les deux autres ECD. Cette bande de MM d'environ 42 Da présente un niveau de migration très proche de la chymosine bovine recombinante (environ 44 kDa) mais légèrement inférieur à celui de la pepsine porcine (46 kDa) utilisées comme référence ;
- la bande B sur l'ECD NS, ayant une forte intensité de coloration, a un PM d'environ 38. Cette bande est très faiblement présente dans l'ECD M et l'ECD A ;
- la bande C a une masse molaire d'environ 17 kDa, c'est une bande bien focalisée et intense présente dans l'ECD NS et A sauf pour le cas de l'ECD M qui ne présente pas cette bande suite à sa dégradation.

La bande A pourrait être associée à la pepsine mais sans grande certitude car elle est localisée au voisinage immédiat de la chymosine et de la pepsine utilisées comme référence.

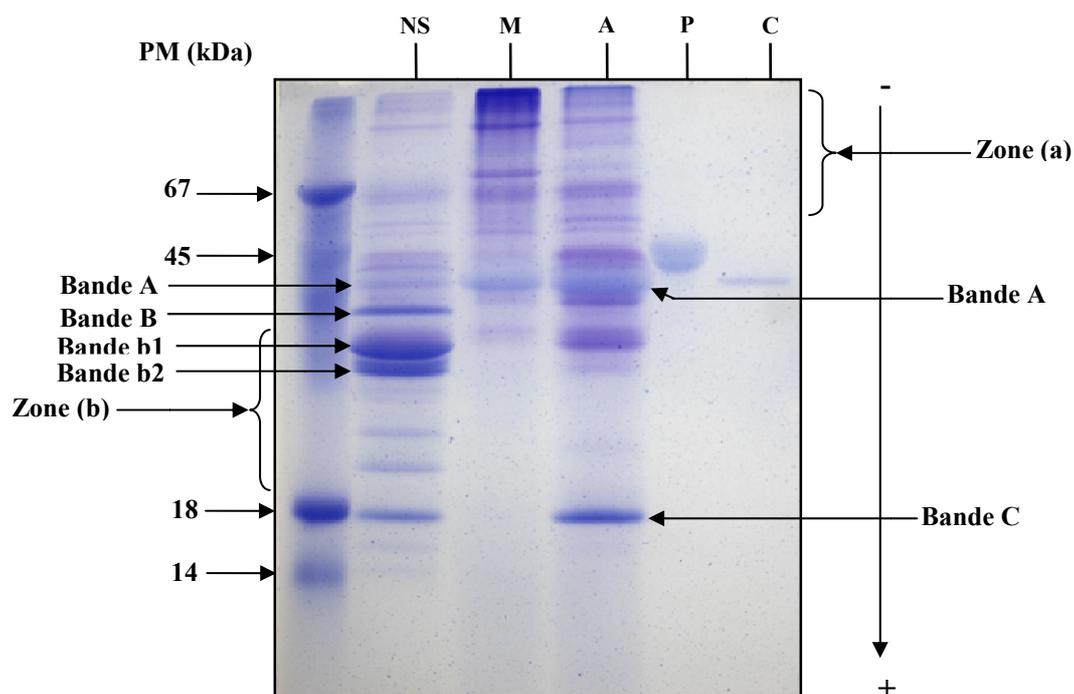


Figure 20 : Profil électrophorétique en PAGE-SDS avec β -ME des extraits de caillottes de dromadaires. (T=17%, C= 2,7%)

NS : extraits de caillottes de dromadaires non sevrés (ECD NS) ;

M : extraits de caillottes de dromadaires à alimentation Mixte (ECD M) ;

A : extraits de caillottes de dromadaires adultes (ECD A) ;

P : pepsine porcine ;

C : chymosine recombinante (Chymax) ;

Protéines étalons (Bovine Serum Albumine 67 kDa ; Ovalbumine 45 kDa ; β -Lactoglobuline 18 kDa et α -Lactalbumine 14 kDa).

La différence d'intensité de la bande A pourrait être liée à sa concentration dans les ECD. ANDREN (1992) signale que la concentration du pepsinogène est très faible chez le veau nouveau-né. VALLES et FURET (1981) indiquent quant à eux que la pepsine est l'enzyme prépondérante dans la caillette des bovins à l'état ruminant (environ 90% des enzymes présentes). En se référant à ces résultats, nous pouvons dire que l'augmentation de l'intensité de cette bande de l'ECD NS à l'ECD A s'explique par le fait que la concentration de cette protéine dans la caillette augmente vraisemblablement en fonction de l'âge et du régime alimentaire de ces animaux.

La bande B pourrait correspondre à la chymosine cameline avec une légère différence de PM comparée à sa forme recombinante de 40 rapportée par KAPPELER *et al* (2006). VALLES et FURET (1981) ont démontré que les jeunes veaux avaient dans leurs caillettes un contenu en chymosine plus élevé que les adultes. En effet, plusieurs auteurs ont montré que le lait est directement responsable de l'activation de la sécrétion de la chymosine (GARNOT *et al*, 1977 ; ANDREN *et al*, 1982). Selon GARNOT *et al* (1977), la sécrétion de la chymosine est indépendante de l'âge de l'animal.

La bande C pourrait correspondre au lysozyme. Selon JOLLÈS *et al* (1990), le lysozyme camelin (EC : 3.2.1.17) a une masse moléculaire de l'ordre de 14,795 Da. Il migre en une seule bande bien focalisée lors d'une électrophorèse PAGE SDS. C'est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse des liaisons glycosidiques particulières à certains mucopolysaccharides qui constituent les parois des cellules bactériennes.

La forte intensité de la bande C pourrait s'expliquer par le fait que la protéine correspondant (lysozyme) est exprimée en grande concentration chez le jeune animal comme chez l'adulte. En effet, DOBSON *et al* (1984) ont rapporté que les ruminants sécrètent de grandes quantités de lysozymes dans la lumière de leurs caillettes. Cette enzyme est exprimée à tous les âges et à des niveaux élevés aussi bien chez le jeune ruminant que chez l'adulte.

Le profil électrophorétique obtenu révèle aussi la présence de zones différentes. On constate que :

- les bandes de migration de la zone (a) dont le PM est supérieur à 50 sont de faibles intensités assez condensées les unes les autres. Cette zone présente une similitude dans le nombre et le niveau de migration de bandes protéiques présentes dans les trois ECD. Une bande ayant un niveau de migration dans la zone de poids moléculaire de la sérum albumine bovine (BSA) a été observée. Selon BELLA *et al* (2012), la BSA est souvent considérée comme le principal contaminant durant le processus d'extraction, cependant on pourrait suggérer qu'elle correspondrait à la BSA ;
- la zone (b) est constituée de bandes protéiques intenses et de MM allant de 33 kDa à 20 kDa. Cette zone est caractérisée par la présence de bandes sur l'ECD NS qui n'apparaissent pas sur l'ECD M et A, notamment les bandes b1 et b2 de forte intensité et de MM respectif d'environ 33 et 30 kDa. Ceci pourrait suggérer que l'ECD NS renfermerait des protéines spécifiques que les deux autres ECD auraient perdues.

Si d'ores et déjà la pepsine, la chymosine et le lysozyme ont été attribués à certaines bandes, d'autres protéines sont encore non identifiées. Toutefois, il demeure entendu que l'identification précise des protéines nécessite des études approfondies (isolement des protéines individuelles, établissement et comparaison des séquences... etc).

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-native) est bien adaptée pour la séparation des protéines globulaires. Dans ces conditions, les entités protéiques se distinguent par des bandes de migration dont la position et l'intensité varient en fonction de leur différence de charge, de leur poids moléculaire et de leur concentration.

Les ECD sont analysés en PAGE-native à T=12% (Figure 21). L'analyse de ce profil met en évidence des bandes majeures bien focalisées et intenses, notées bande I, II, III et IV et des bandes de faibles intensités qui apparaissent sur l'ECD NS mais pas sur l'ECD M et A car l'exploitation photographique a atténué les contrastes.

La PAGE-native des différentes préparations montrent une certaine hétérogénéité dans le nombre et la localisation des bandes majeures entre les trois ECD étudiés.

L'ECD NS présente au moins 5 bandes majeures de forte intensité contre 2 pour l'ECD A et une bande sur le profil de l'ECD M. Ces bandes protéiques sont bien séparées en PAGE native du fait de leur structure ordonnée. On pourrait suggérer que l'ECD NS serait plus riche en protéines que les deux autres ECD.

Sur l'ECD A, la zone 1 se caractérise par un déplacement très faible sur le gel donnant une bande assez large et diffuse avec un niveau de migration analogue à celui des immunoglobulines sériques.

Sur le profil de l'ECD NS, la bande I a un déplacement faible sur le gel donnant une bande assez large et diffuse. Elle est caractéristique de cet extrait car elle n'apparaît ni sur l'ECD M ni sur l'ECD A.

La bande II est intense et bien focalisée. On la retrouve dans l'ECD NS et A mais pas dans l'ECD M. Ceci pourrait être dû à son hydrolyse.

La bande III, de forte intensité, est seulement présente dans l'ECD NS. Elle présente un niveau de migration proche de celui de la pepsine porcine utilisée comme référence.

La bande IV est présente dans les trois extraits. Elle est très intense et bien focalisée dans l'ECD M et A et de faible intensité dans l'ECD NS. Elle présente un niveau de migration qui coïncide avec celui de la pepsine porcine. Cette bande pourrait correspondre à la pepsine.

Il est à noter qu'aucune bande majeure ne coïncide avec celle des protéines sériques du lait bovin.

L'électrophorèse bidimensionnelle (Figure 22) que nous avons réalisée, sur l'ECD NS, en combinant la PAGE-native en première dimension avec la PAGE-SDS avec agent réducteur en deuxième dimension a pour but de montrer s'il y a des protéines possédant des sous unités notamment reliées par des ponts S-S.

Les entités protéiques majeures observées en conditions réductrices sont désignées par les lettres alphabétiques A, B, b1, b2 et C couvrant les zones de PM (42 ; 38 ; 33 ; 30 et 17). En conditions natives, les entités protéiques majeures sont désignées par les chiffres romains I, II, III et IV.

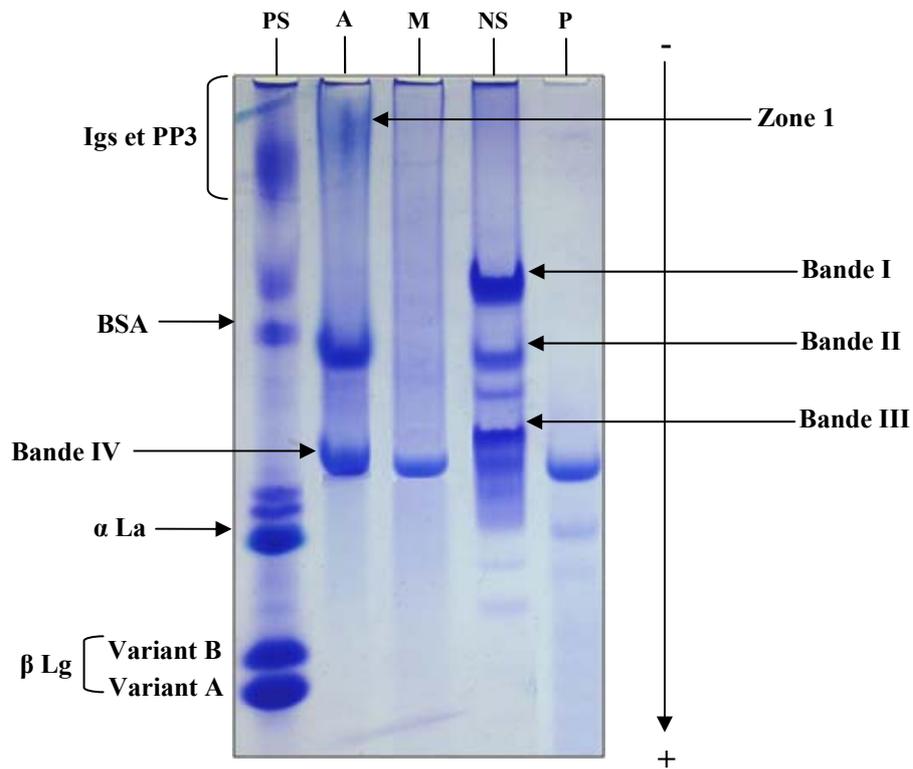


Figure 21 : Profil électrophorétique en PAGE-Native des extraits de caillettes de dromadaires. (T=12%, C= 2,7%)

NS : ECD NS ; M : ECD M ; A : ECD A ; P : pepsine porcine ; PS : protéines sériques du lait bovin.

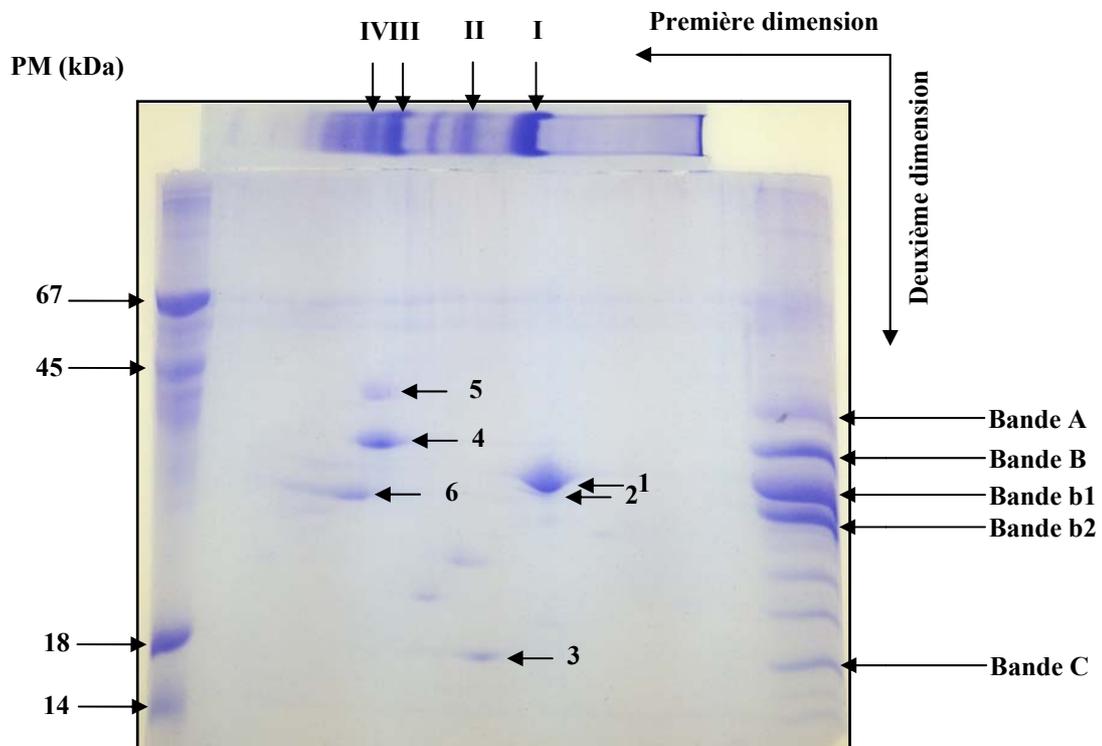


Figure 22 : Profil électrophorétique des extraits de caillettes de dromadaires non sevrés en électrophorèse bidimensionnelle

Première dimension : PAGE-Native ; Deuxième dimension : PAGE-SDS avec β -ME.

L'électrophorogramme obtenu (Figure 22) sur l'ECD NS montre que :

- la bande I observée en 1ère dimension migre en deux spots contigus notés 1 (de forte intensité) et 2 (de faible intensité) au niveau de la bande b1 qui apparaît fortement en 2ème dimension. L'intensité de la bande I en 1ère dimension semble masquer une bande protéique mineure de PM similaire ou voisine ce qui explique qu'elle se sépare en deux spots (1 et 2) d'intensité différente ;
- la bande II migre en un spot (3) au niveau de la bande C. la bande C qui correspondrait au lysozyme semble avoir une structure monomérique. En effet, les travaux de JOLLÈS *et al* (1990) avaient révélé que le lysozyme camelin est formé d'une seule chaîne protéique de forme globulaire de 130 acides aminés comportant 4 ponts disulfures intrachainés et donnant une bande intense en électrophorèse en conditions réductrices (PAGE SDS) et en conditions natives ;
- l'entité protéique migrant au niveau III donne en 2ème dimension un spot de coloration intense (noté 4), et qui migre au niveau B (38 kDa). Cette dernière, qui correspondrait à la chymosine, serait constituée d'une seule unité. Selon FOLTMANN (1992), la chymosine est une endopeptidase du suc gastrique des nouveau-nés permettant la digestion spécifique de la caséine. C'est une protéine globulaire constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 35,6 kDa ;
- la bande IV migre en un spot (5) de faible intensité au niveau de la bande A qui apparaît faiblement. La protéine correspondant à cette bande et qui correspondrait à la pepsine semble avoir une structure monomérique ;
- des spots uniques d'intensité moyenne sont aussi observés sur le profil et qui correspondent aux bandes de même intensité en 2ème dimension à l'exception du spot désigné 6 qui apparaît plus intense et qui migre au niveau de la bande b2 d'environ 30 kDa.

Il est à noter que les bandes III et IV, qui correspondraient à la chymosine et la pepsine respectivement, ont un niveau de migration proche aussi bien en conditions réductrices (PAGE SDS) qu'en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE native). Ceci pourrait s'expliquer par leur structure voisine. En effet, il a été montré que la structure tridimensionnelle de la chymosine est, en générale, très proche de la pepsine (CHITPINITYOL et CRABBE, 1998).

3.2.2. Caractérisation électrophorétique des extraits de caillettes de dromadaires adultes (A) :

Afin de caractériser l'ECD A, nous avons réalisé une PAGE-SDS avec et sans agent réducteur de ponts S-S qui nous permettra de mettre en évidence l'existence ou pas de telles liaisons au niveau inter-chaines. Le profil électrophorétique est illustré par la figure 23.

En comparant le profil de l'ECD adulte avec ou sans β mercapto éthanol, on constate que les bandes principales ont le même niveau de migration avec la même intensité.

La bande A qui pourrait correspondre à la pepsine ne semble pas renfermer de ponts disulfures inter chaines. Toutefois, la présence de ponts disulfures intra chaines n'est pas à exclure. Les travaux de TANG *et al* (1973) portant sur la structure de la pepsine porcine ainsi que ceux de NEWMAN *et al* (1991) sur celle de la chymosine bovine témoignent que ces protéines contiennent trois ponts disulfures intra chaines jouant un rôle important dans le repliement correct de l'enzyme.

Sur le profil électrophorétique (Figure 24), nous observons :

- la présence de plusieurs bandes de PM allant de 17 à plus de 70 en conditions réductrices (PAGE SDS) et seulement 3 bandes en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE native) ;
- la zone 1 migre en 3 spots nommés α , β et γ qui correspondent à des bandes de PM voisins en 2ème dimension; La forme diffuse et assez large de la zone 1 pourrait s'expliquer par la complexité de l'entité protéique présente, alors qu'après l'utilisation du SDS et du 2-mercapto éthanol, l'entité protéique se scinde en 3 parties indiquant qu'elle pourrait refermer des sous unités qui peuvent être liées entre elles par des ponts disulfures ;
- la bande II en 1ère dimension se focalise en un spot κ de forte intensité correspondant à la bande C de MM 17 kDa et qui correspondrait au lysozyme comme précédemment indiqué dans l'ECD NS ;
- la bande IV attribuée en PAGE native à la pepsine se focalise en un spot μ de forte intensité migrant au niveau de la bande A en 2ème dimension. Il semblerait que la protéine correspondant à cette bande aurait une structure globulaire et monomérique. La pepsine est une enzyme du suc gastrique retrouvée essentiellement chez l'adulte, sa structure globulaire lui permet de se focaliser en une bande fine sur le gel. Elle est constituée d'une seule chaîne peptidique de 327 résidus d'acides aminés (34 600 Da) (TANG *et al*, 1973).

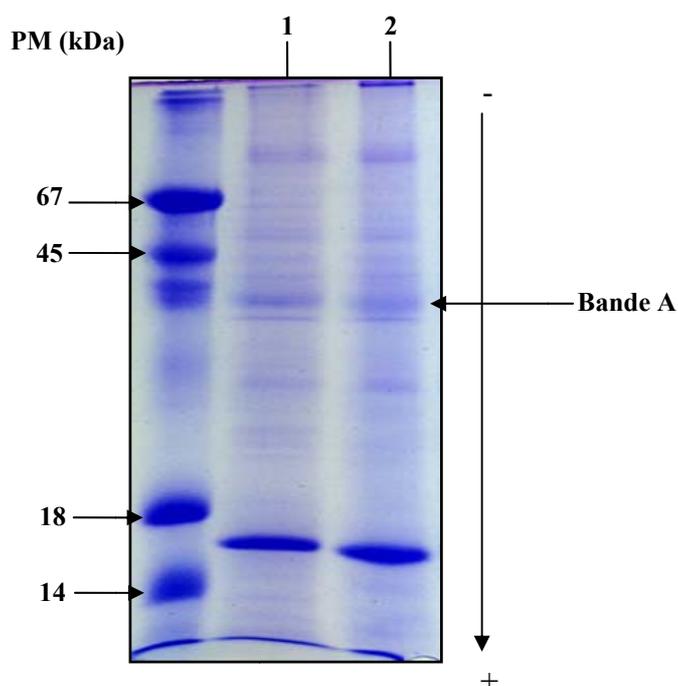


Figure 23 : Profil électrophorétique en PAGE-SDS des extraits de caillettes de dromadaires adultes (T=17%, C= 2,7%)

1 : ECD A avec β -ME ; 2 : ECD A sans β -ME.

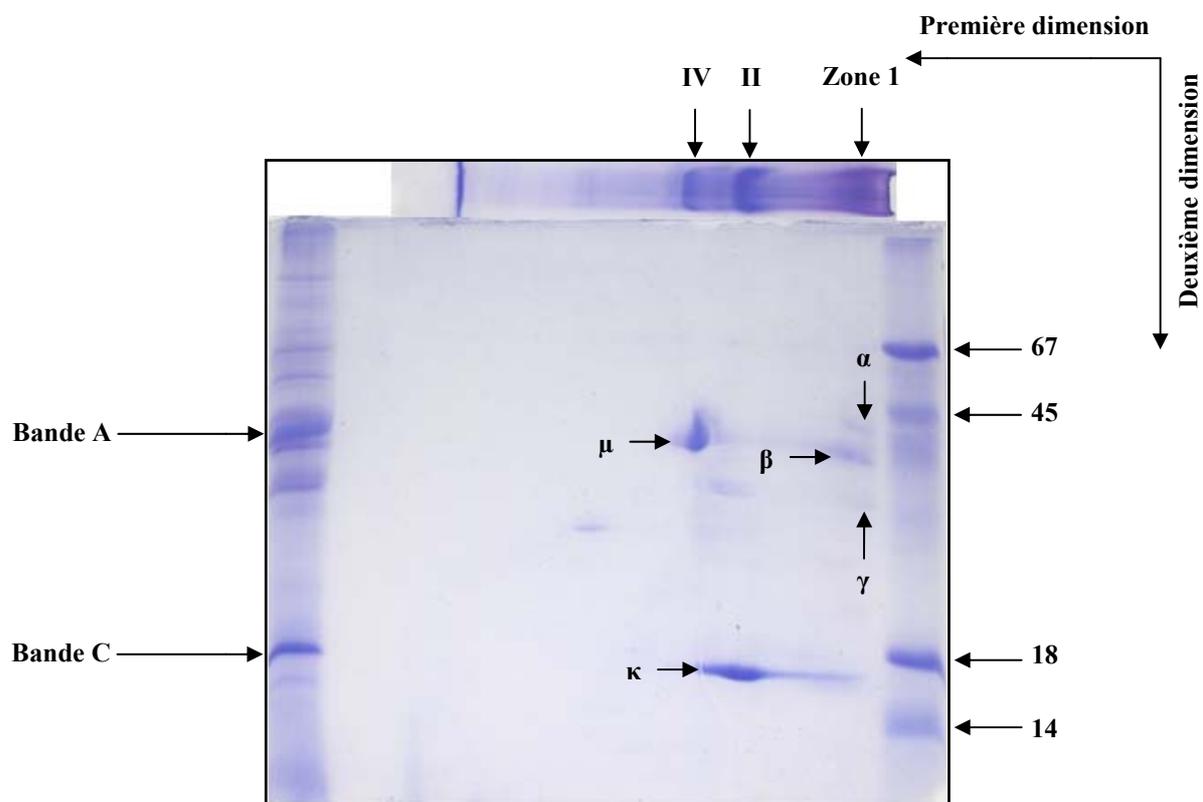


Figure 24 : Profil électrophorétique des extraits de caillettes de dromadaires adultes en électrophorèse bidimensionnelle

Première dimension : PAGE-Native ; Deuxième dimension : PAGE-SDS avec β -ME.

3.3. Purification de l'enzyme coagulante issue de l'extrait de caillettes de dromadaires adultes par chromatographie :

A chaque étape de purification, les fractions présentant une activité coagulante ont été regroupées, dessalées, concentrées et contrôlées par électrophorèse en PAGE SDS. Les résultats de la purification sont résumés dans le tableau VII.

Tableau VII : Résumé de la purification de l'extrait coagulant du dromadaire adulte.

étapes	Protéine (mg)	Activité (UP)	Activité spécifique (UP/mg)	Taux de purification	Rendement %
Extrait brut	30,8	3,91	0,127	1 fois	100
Filtration	25,41	3,56	0,140	1,10 fois	91
DEAE-cellulose	1,848	0,702	0,379	3 fois	17,95
Sephacryl S200	0,904	0,555	0,614	4,84 fois	14,19

L'extrait issu de caillettes de dromadaires adultes est caractérisé par une activité coagulante de 3,91 UP mesurée en utilisant le lait standard comme substrat, et une quantité en protéine de 2,2 mg/ml.

3.3.1. Isolement de l'enzyme coagulante par chromatographie échangeuse d'ions :

Afin d'explorer les conditions favorables pour une bonne séparation et l'isolement de la protéine coagulante issue de caillettes de dromadaires adultes, plusieurs profils d'élution ont été testés, à savoir plusieurs modes d'élution (isocratique, gradient linéaire et leur combinaison). Il a été constaté que les meilleures conditions sont obtenues avec un gradient linéaire en sel (NaCl).

ISHIHARA et YAMAMOTO (2000) ainsi que SAKAKIBARA et YANAGISAWA (2007) ont signalé que l'élution avec un gradient linéaire est souvent le mode d'élution optimal pour purifier des protéines. En outre, la concentration de sel utilisée dans l'élution des protéines ne doit pas être supérieure à 1 M, car plus la force ionique de la solution augmente, les molécules peuvent se rapprocher les unes des autres en raison d'une réduction de l'épaisseur de la double couche électrique (SONG *et al*, 1999), ce qui évite une bonne séparation.

L'extrait enzymatique dialysé et filtré a été déposé sur une colonne de DEAE cellulose DE52 équilibrée avec le tampon phosphate de sodium 0,06M (pH 5,5). Dans ces conditions, les protéines inertes sont éliminées avec le tampon de départ. Les protéines liées sont éluées en augmentant la force ionique du milieu avec un gradient linéaire allant de 0 à 1M en NaCl dans le même tampon.

Le profil de la chromatographie sur la DEAE 52 (Figure 25a) montre cinq pics distincts (notés de F1 à F5) dont deux pics (F3 et F5) sont actifs. La fraction F3 est éluée à une concentration en NaCl de 0,1M, tandis que la fraction F5 est éluée à 0,45M. Ceci confirme que ces enzymes sont chargées négativement dans les conditions d'élution utilisées et que leur pHi est inférieur à pH5,5.

Selon FRUTON (1976), les enzymes coagulantes sont des enzymes protéolytiques appartenant à de la famille des protéinases aspartiques et qui ont un pHi dans la gamme des acides.

Du fait que la fraction F3 est éluée en premier, elle n'est donc pas liée fortement à l'échangeuse d'anions. Son pHi est plus élevé que la fraction F5. AL-MZAIEN *et al* (1992) et FOX *et al* (1977) ont indiqué que la chymosine est éluée avant la pepsine car la chymosine à un pHi supérieur à celui de la pepsine.

La chymosine bovine produite par fermentation (Chy-max) ainsi que la pepsine porcine ont été utilisées comme témoin. Leur profil d'élution sur DEAE-cellulose est représenté sur les figures 26 et 27 respectivement.

La chymosine fermentaire est éluée à 0,26M en NaCl alors que la pepsine est éluée à 0,44M en NaCl. Nous constatons que la chymosine bovine ainsi que la pepsine porcine commerciale sont éluées dans les mêmes conditions à des concentrations similaires en NaCl dans le même tampon que celles observées pour les fractions F3 et F5 respectivement.

Travaillant sur des extraits similaires, ABUHARFEEL et ABUEREISH (1984) et AL-MZAIEN (2007) ont obtenus deux pics, ayant une activité enzymatique élevée, correspondant à la pepsine cameline notées pepsine I (ou A) et pepsine II (ou B) lors de la chromatographie d'échange ionique de l'extrait de caillette de dromadaires adultes.

Avec le même support chromatographique mais en un tampon acétate de sodium pH 5,3, AL-MZAIEN (2007) a fait éluer la pepsine I et la pepsine II respectivement à 0,43 et 0,54 M en NaCl tandis que ABUHARFEEL et ABUEREISH (1984) les ont fait éluées, dans le tampon sodium glycérophosphate 10 mM, pH 6,5, à des forces ioniques plus basses (0,3 et 0,4 M en NaCl).

Ces données comparables laissent supposer que la fraction F5, douée d'une activité coagulante très significative, éluée à 0,45M, pourrait correspondre à la pepsine. Cependant, l'enzyme apparait sous un seul pic.

Fox *et al* (1977) dans une étude similaire sur la pepsine ovine ont obtenu un seul pic ayant une activité enzymatique lors de la chromatographie d'affinité sur Sepharose-polylysine.

Notons que plusieurs auteurs ont souligné la présence d'isoenzymes de la pepsine dans les extraits de caillettes d'animaux âgés. En effet, KAGEYAMA et TAKAHASHI (1976) ont élué cinq isoenzymes du pepsinogène du singe japonais avec un tampon phosphate de sodium pH 7 sur DEAE cellulose. De même, SUZUKI *et al* (1999) ont obtenu cinq pics correspondant à cinq isoformes du pepsinogène caprin sur DEAE-Sephacel avec le même tampon. De son côté, en utilisant une chromatographie sur hydroxyapatite, MARTIN (1984) a observé quatre isoenzymes de la pepsine chez le bovin.

Ces résultats suggèrent que l'enzyme se trouve soit sous une seule forme moléculaire, soit que d'autres formes moléculaires (isoenzymes) existent mais elles sont masquées (concentration est suffisamment faible pour ne pas être détecté dans les conditions expérimentales).

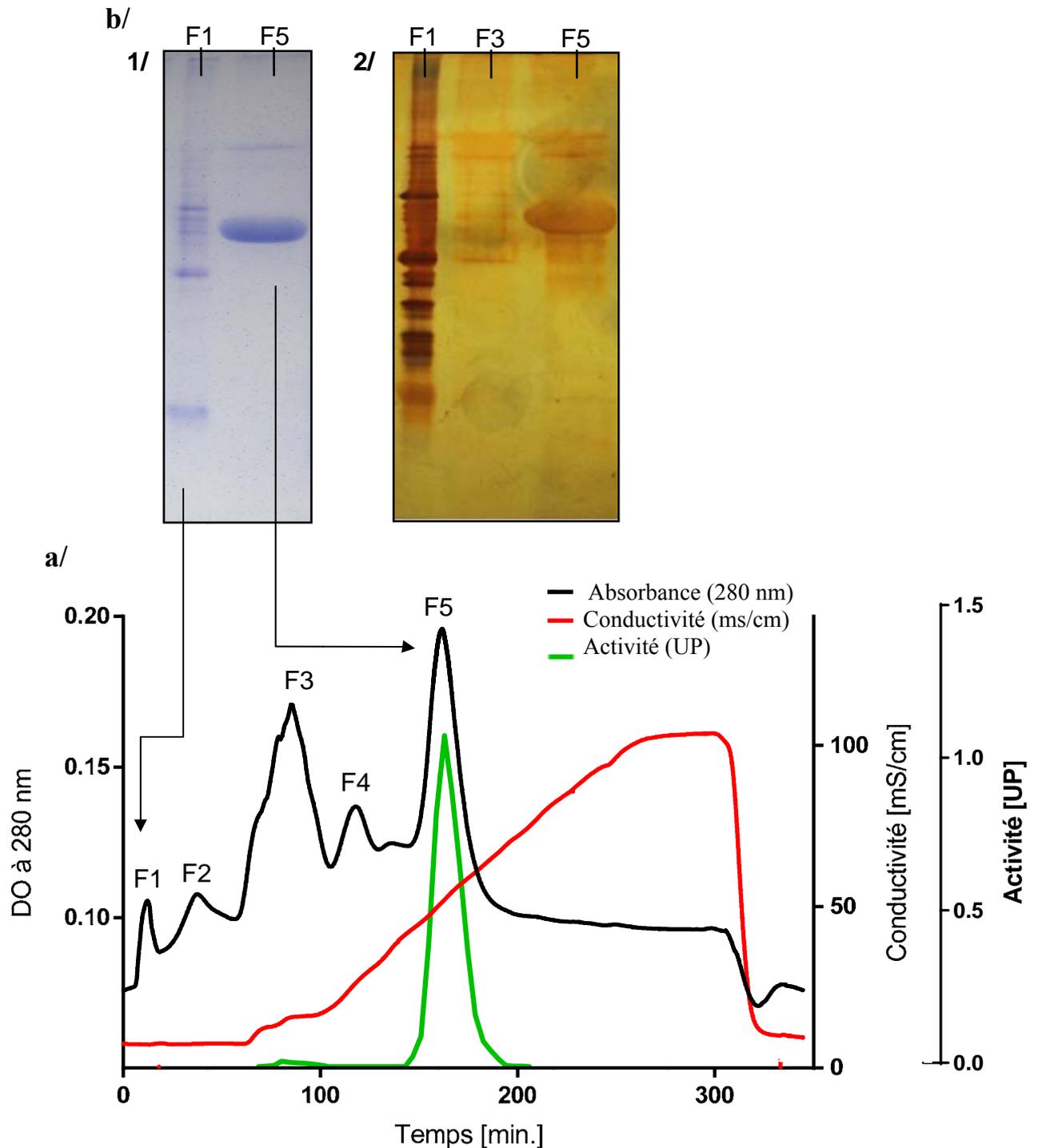


Figure 25a : Profil d'élution sur DEAE-Cellulose DE52 de l'extrait enzymatique brut issu de caillettes de dromadaires adultes (colonne 1x10cm, tampon d'élution phosphate de Na 0,06M pH 5,5, gradient NaCl 0 à 1,0 M, débit 0,5ml/min, fraction de 1,5ml)

Figure 25b : PAGE-SDS des fractions collectées durant l'élution (F1 à F5). 1 : révélation au bleu de Coomassie ; 2 : révélation au nitrate d'argent.

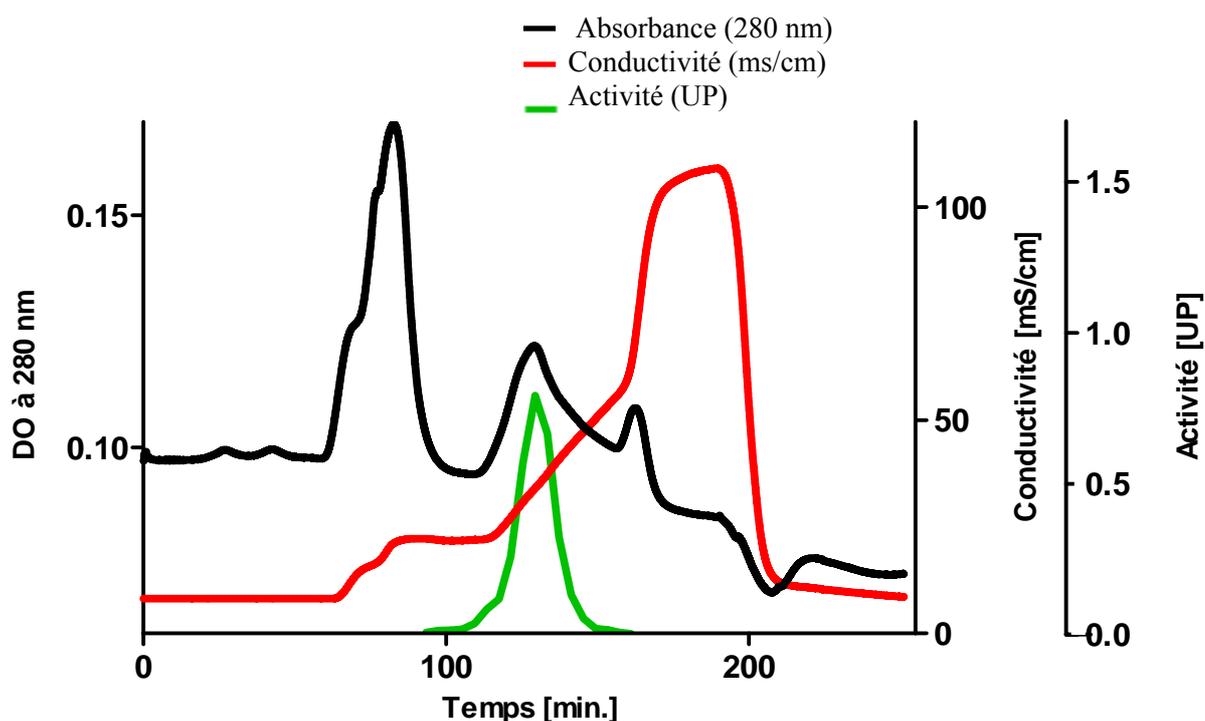


Figure 26 : Profil d'élution sur DEAE-Cellulose DE52 de la chymosine recombinante (ChyMax) (colonne 1x10cm, tampon d'élution phosphate de Na 0,06M pH5,5, gradient NaCl 0 à 1,0 M, débit 0,5ml/min, fraction de 1,5ml).

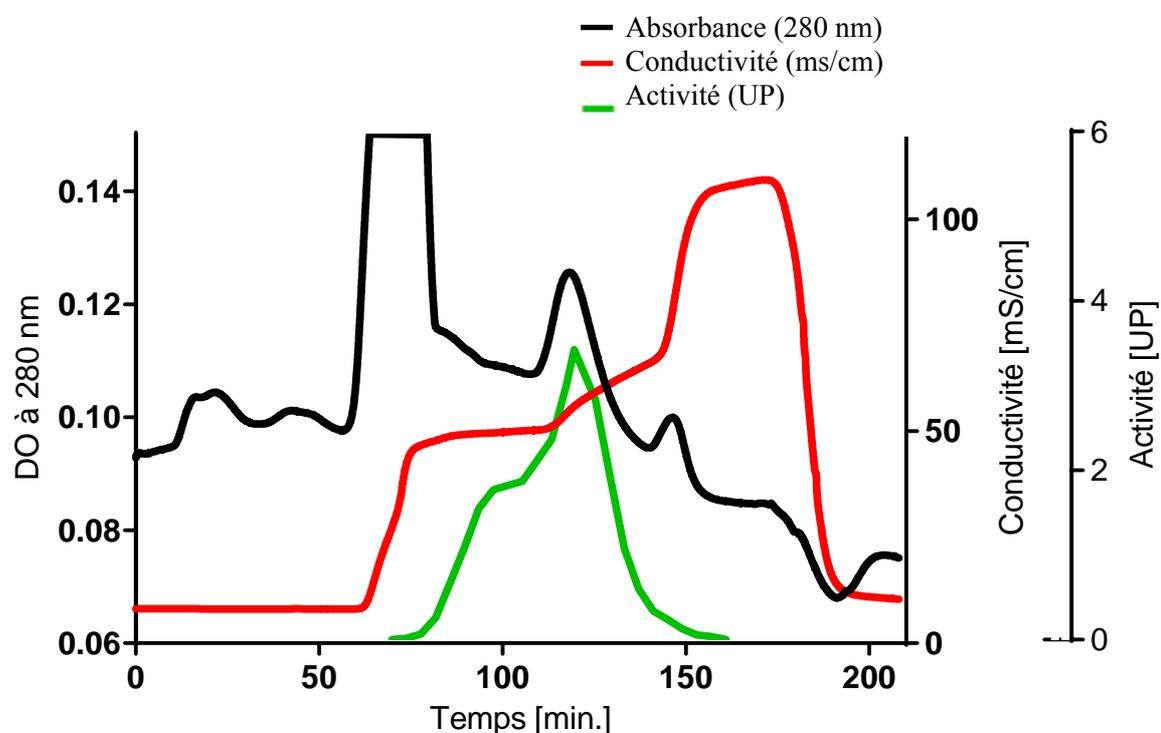


Figure 27 : Profil d'élution sur DEAE-Cellulose DE52 de la pepsine porcine (colonne 1x10cm, tampon d'élution phosphate de Na 0,06M pH 5,5, gradient NaCl 0 à 1,0 M, débit 0,5ml/min, fraction de 1,5ml).

Pour vérifier ce résultat, plusieurs profils d'élutions, à savoir plusieurs pH doivent être testés. SHEN et FREY (2004) ont signalé que la résolution optimale entre deux protéines lors de l'utilisation de la chromatographie échangeuse d'ions avec une élution à gradient de sel est souvent obtenue lorsque le pH de la phase mobile est proche du pHi de la protéine.

La présente étude révèle aussi la présence d'une très faible activité coagulante correspondant à la fraction F3 et qui est éluée avec le gradient NaCl à une concentration de 0,1M. Ce résultat est en accord avec celui d'AL-MZAIEN (2007) qui a aussi rapporté la présence d'une faible activité coagulante correspondant à la fraction éluée à 0,24 M en NaCl et qui correspondrait à la chymosine. Cependant, ABUHARFEEL et ABUEREISH (1984) n'ont pas rapporté l'existence de cette enzyme dans la muqueuse fundique du dromadaire. La fraction F3 pourrait correspondre à la chymosine mais dans cette étude, on ne s'est pas focaliser sur cette fraction à cause de sa très faible activité coagulante.

Il ressort de cette étape de purification que les extraits de caillottes issus de dromadaires adultes contiennent deux fractions actives dont la fraction F5 correspondrait à la pepsine cameline qui est dominante représentant la plus forte activité par rapport à la fraction F3 qui correspondrait à la chymosine cameline.

Ce résultat est en accord avec ceux rapportés par de nombreux auteurs, notamment GARNOT *et al* (1977) qui ont rapporté qu'avec l'âge, le pepsinogène devient le zymogène dominant dans la muqueuse de la caillotte ; en revanche, la quantité de prochymosine devient négligeable mais jamais nulle.

Cette étape a permis d'obtenir un facteur de purification de 3, en revanche, après une échangeuse d'anions sur DEAE cellulose, AL-MZAIEN (2007) a obtenu un facteur de purification trois fois supérieur à celui observé dans la présente étude. Cette différence pourrait être liée au fait que AL-MZAIEN (2007) a réalisé une précipitation saline au sulfate d'ammonium avant l'échangeuse d'anions ce qui lui a permis de concentrer l'enzyme d'environ 6 fois, comparée à l'extrait brut.

Fox et collaborateurs (1977) ont quand a eux obtenu un facteur de purification de 50 lors de la purification de la pepsine ovine sur chromatographie d'affinité sur Sepharose-polylysine.

L'activité spécifique a augmenté de 0,127 UP/mg pour l'extrait brut à 0,379 UP/mg après l'étape de l'échangeuse d'anions. Cependant le rendement a chuté à 17,95% (Tableau VII). Ce rendement est inférieur à celui obtenu par AL-MZAIEN (2007) pour la purification de la pepsine cameline.

Notons que la tendance à recourir à d'autres techniques chromatographiques pour la purification des enzymes coagulantes est de mise sur les extraits de caillottes d'animaux.

C'est ainsi que Burton *et al* (1997) ont développé une méthode de purification de la chymosine basée sur l'utilisation d'une chromatographie en mode mixte sur une matrice de Sepharose et de Perloza (perles de cellulose). Cette méthodes est efficace, peu coûteuse et a fourni une très bonne résolution de la chymosine à partir d'une source recombinante brute.

La chromatographie d'affinité a également été utilisée avec succès pour la purification de la chymosine (KOBAYASHI et MURAKAMI, 1978 ; AMOURACHE et

VIJAYALAKSHMI, 1984), ainsi que la pepsine bovine (NEVALDINE et KASSELL, 1971 ; SUBRAMANIAN, 1987).

La méthode ATPS, pour Aqueous Two Phase System ou système à deux phases aqueuses, a également été utilisée pour la purification de la pepsine bovine (SPELZINI *et al*, 2005 ; IMELIO *et al*, 2008) ainsi que la chymosine recombinante (SPELZINI *et al*, 2005). Ce système est formé de deux solutions aqueuses non miscibles, un polymère et un sel (TUBÍO *et al*, 2007 ; NALINANON *et al*, 2009). Au cours du processus de séparation, les enzymes seront déplacées vers la phase riche en polymère en raison des fortes interactions hydrophobes entre protéines et polymères (IMELIO *et al*, 2008). Cependant, le degré de pureté n'est pas aussi grand que celui obtenu avec les méthodes classiques mais elle est reconnue comme une technique prometteuse utilisée en tant que première étape de purification des protéines (ALBERTSSON *et al*, 1987).

Etant donné que la fraction (F5) présente l'activité coagulante la plus élevée, elle a été purifiée d'avantage par chromatographie sur gel filtration et caractérisée.

3.3.2. Électrophorèse des fractions collectées durant l'élution en chromatographie échangeuse d'ions :

L'électrophorèse en milieu SDS (Figure 25 b1) des différentes fractions camelines issues de la chromatographie échangeuse d'anions et visualisée avec le bleu de Coomassie montre que :

- la migration de la fraction F1 présente une succession de bandes majeures et mineures de haut et de faibles poids moléculaires ;
- la migration de la fraction F5 présente deux bandes l'une bien définie de masse moléculaire d'environ 42 kDa et l'autre diffuse de masse moléculaire égale à 66 kDa.

La visualisation de protéines avec le bleu de Coomassie est suffisamment sensible. Toutefois, si l'on s'intéresse à la détermination de la pureté absolue d'une protéine ou l'on souhaite visualiser des composants mineurs alors une techniques de visualisation plus sensible doit être utilisé (WIRTH et ROMANO, 1995).

La coloration au nitrate d'argent est 100 fois plus sensible que la coloration au bleu de Coomassie avec une sensibilité comparable, voire supérieure, à une autoradiographie (WIRTH et ROMANO, 1995).

L'électrophorèse en milieu SDS (Figure 25 b2) des différentes fractions camelines issues de la chromatographie échangeuse d'anions et visualisée avec le nitrate d'argent montre que :

- La fraction F1 a donné plus de bandes que celles observées avec le bleu de Coomassie ;
- La fraction F3 douée d'une faible activité coagulante montre la présence de plusieurs bandes de MM allant de 30 à 67 kDa ;
- La migration de la fraction F5 montre la présence de bandes de PM inférieur à 42.

Les électrophorégrammes (Figure 25 b1 et b2) des fractions issues de la chromatographie échangeuse d'ions révèlent que :

- une quantité importante de protéines non actives a été éliminée avec le tampon de départ de la chromatographie (fraction F1) ;
- la fraction F3, renfermant la chymosine, n'est pas pure et on ne peut localiser la bande correspondant à la chymosine à cause de sa faible concentration dans l'extrait comme indiqué plus haut ;
- plusieurs protéines étaient présentes dans l'extrait brut initial, pourtant seulement deux bandes protéiques ont été révélées après la séparation par SDS-PAGE (révélation au bleu de Commassie), de la fraction active (F5) obtenue après la chromatographie échangeuse d'anions. Ceci montre que la fraction active (F5) obtenue était débarrassée de nombreuses protéines contaminantes seulement après cette première étape ;
- la fraction F5, renfermant l'enzyme, n'est pas tout à fait homogène. Par conséquent, il est nécessaire de recourir à la perméation pour une meilleure purification de l'enzyme.

3.3.3. Isolement de l'enzyme coagulante par chromatographie de perméation sur Sephacryl S200 :

Afin d'éliminer toutes contaminations, les fractions actives collectées à partir de la chromatographie échangeuse d'anions ont été séparées à nouveau sur colonne de perméation sur Sephacryl S200. Cependant, il fallait appliquer un débit plus faible pour pouvoir collecter que les fractions correspondantes aux sommets des pics. Le chromatogramme de la fraction analysée est donné sur la figure 28a.

Le chromatogramme révèle la présence de deux pics d'élution étroitement espacés ; un pic majeur noté F'1 et un pic mineur noté F'2. Cependant, un seul pic d'activité correspondant à la première fraction (F'1) a été obtenu.

Au cours de cette étape, une légère augmentation de l'activité spécifique et du facteur de purification a été constaté ; l'enzyme est concentrée d'environ 5 fois, comparée à l'extrait brut. Toutefois, le rendement en activité reste faible (14,19%).

Toutefois, il est nécessaire de mentionner que dans ce cas précis, nous n'avons pas réalisé d'optimisation dans les conditions de purification. Nous avons voulu comparer nos résultats avec ceux d'ABUHARFEEL et ABUEREISH (1984) et d'AL-MZAIEN (2007), qui ont purifié la pepsine cameline issu de caillettes de dromadaires adultes en adoptant une précipitation au sulfate d'ammonium, une échangeuse d'anions (DEAE cellulose) et une perméation (Sephadex G-100). Le bilan de la purification s'est traduit par un rendement de 36 et 24% pour la pepsine I (ou A) et II (ou B) respectivement (AL-MZAIEN, 2007).

Afin de s'assurer de l'homogénéité de la fraction active, une électrophorèse en PAGE SDS visualisée au bleu de Coomassie ainsi qu'au nitrate d'argent a été appliquée (Figure 28 b).

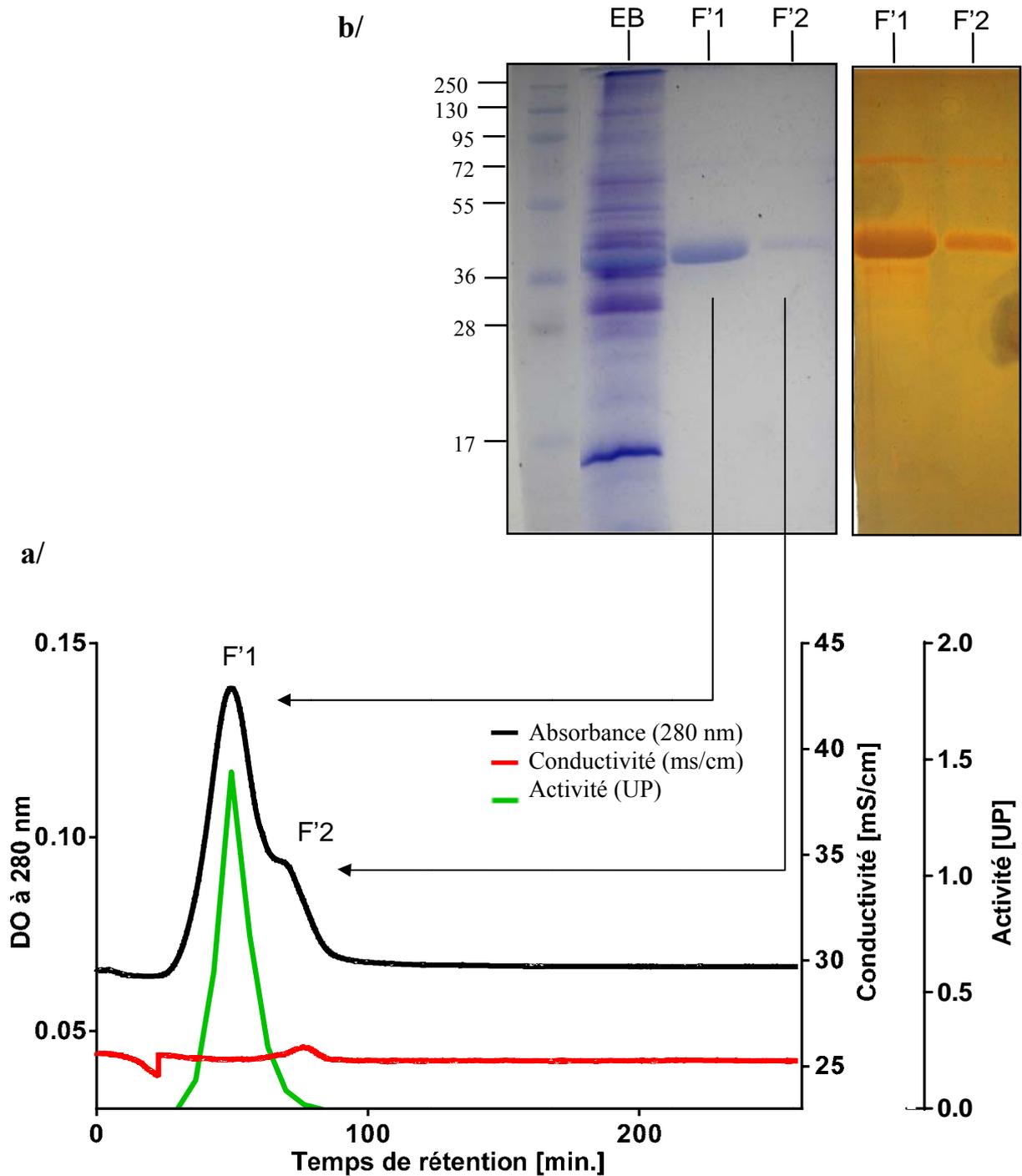


Figure 28a : Profil d'élution sur Sephacryl S200 de la fraction coagulante issue de l'échange ionique (colonne 1x20cm, tampon d'élution phosphate de Na 0,06M pH 5,5, débit 0,3ml/min, fraction de 1,5ml)

Figure 28b : PAGE-SDS des fractions collectées durant l'élution (F'1 et F'2). 1 : révélation au bleu de Coomassie ; 2 : révélation au nitrate d'argent ; EB: extrait brut.

Le contrôle électrophorétique, en PAGE-SDS, réalisé sur ces fractions (Fig. 28 b1) montre que :

- la protéine enzymatique a migré en bande unique dans les conditions réductrices ;
- les deux fractions (F'1 et F'2) présentent la même bande principale, mais elles diffèrent l'une de l'autre par l'intensité de cette bande. La bande de la fraction F'1 est plus intense que celle de la fraction F'2.

La coloration au nitrate d'argent (Fig. 28 b2) a révélé la présence de bandes protéiques mineures, dans la fraction F'1, autour et en dessus de la bande protéique majeure qui ont tendance à être co-élués avec elle et qui n'ont pas été éliminées dans cette étape.

Ces résultats suggèrent que la protéine enzymatique est éluee dans la fraction F'1 et à une faible concentration dans la fraction F'2 avec un niveau de pureté assez élevé. Toutefois, la présence de plus d'une bande par fraction prouve que la fraction n'est pas tout à fait homogène. Par conséquent, la protéine enzymatique doit être purifiée davantage par des techniques appropriées telles que des techniques chromatographiques de haute performance.

L'estimation de la masse moléculaire de la fraction a été déterminée. L'électrophorétoqramme (révélation au bleu de Coomassie) indique que le PM de l'enzyme estimée par cette méthode est de 42638,31. Cette valeur est en désaccord avec celle de la masse moléculaire native de l'enzyme estimée à 30370,8 Da par la chromatographie de perméation. Cette différence observée pourrait être liée aux conditions expérimentales.

Le PM obtenu par chromatographie semble être erronément bas. La valeur de 42 a donc été maintenue. Ce poids moléculaire est cependant plus élevé par rapport aux données de la littérature de 36 ± 1 sur chromatographie de perméation et de 35 ± 1 sur SDS-PAGE (ABUHARFEEL et ABUEREISH, 1984 ; AL-MZAIEN, 2007), et aussi plus élevé que celui obtenu chez le bovin (FOX *et al*, 1977), l'ovin (FOX *et al*, 1977), le singe japonais (KAGEYAMA et TAKAHASHI, 1976), la souris (ESUMI *et al*, 1978) et le porc (RAJAGOPALAN *et al*, 1966).



Conclusion générale

Conclusion générale

L'utilisation des enzymes coagulantes en fromagerie est une étape prépondérante qui conditionne pour une grande part l'obtention d'un produit dérivé répondant aux caractéristiques recherchées.

Dans une première étape et, à partir d'un protocole d'isolement approprié, nous avons obtenu des extraits bruts issus de caillettes de dromadaires non sevrés, à alimentation mixte et adultes.

Ces préparations enzymatiques ont été caractérisées par la suite par la mesure de leur activité coagulante et protéolytique.

Les résultats obtenus ont montré que l'ECD adulte présente le rapport activité coagulante/activité protéolytique (Ac/Ap) le plus élevé pour une macération réalisée à 42°C avec ajout d'acide chlorhydrique à 0,2M. Cet extrait a aussi montré une plus grande thermostabilité.

Concernant la composition du suc gastrique des trois ECD (non sevrés, à alimentation mixte et adultes), nous avons notamment montré par électrophorèse, qu'il existe une variation non négligeable dans la composition en protéines du suc gastrique, avec des différences qualitatives et quantitatives et qu'il est possible de vérifier l'origine des caillettes en examinant leur comportement électrophorétique.

Les techniques électrophorétiques ont révélé que l'ECD adulte refermerait la pepsine de masse moléculaire évaluée 42 kDa. Cette masse est similaire avec ou sans ajout de β -mercaptoéthanol. En PAGE native, l'enzyme migre en une seule bande de forte intensité ayant un niveau de migration similaire avec celui de la pepsine porcine. En électrophorèse bidimensionnelle (PAGE native x PAGE SDS), cette bande se focalise en un spot unique, assez intense.

Les essais de purification de l'extrait coagulant issu de caillettes de dromadaires adultes ont donné un profil (similaire à celui de la pepsine) où la fraction active est éluee à 0,45M en NaCl. Une très faible activité coagulante a aussi été détectée. Cette dernière est obtenue quand la concentration en NaCl est portée à 0,1M.

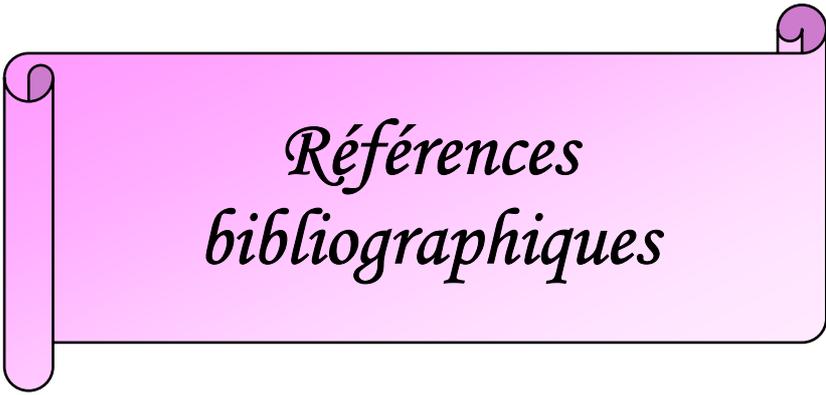
Il ressort de cette étape de purification que les extraits de caillettes issus de dromadaires adultes contiennent deux fractions actives : la fraction (F5) dominante (représentant la plus forte activité) correspondrait à la pepsine et fraction F3 correspondrait à la chymosine.

Ces résultats suggèrent aussi que l'enzyme se trouve soit sous une seule forme moléculaire, soit que d'autres formes moléculaires (isoenzymes) existent mais elles sont masquées. L'électrophorèse PAGE SDS a montré un niveau suffisamment élevé de pureté pour cette entité protéique.

Ces étapes de purification sur chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE-cellulose et sur perméation sur Sephacryl S200 ont permis d'obtenir un facteur de purification d'environ 5. Par contre, l'activité coagulante de la fraction purifiée (F5) a donné une valeur plus faible que celle de l'extrait brut. Le rendement est d'environ 14%.

Les essais réalisés dans le cadre de ce présent mémoire ainsi que les résultats obtenus préalablement au laboratoire LABAB sur l'amélioration des aptitudes à la coagulation du lait camelin permettent d'entrevoir des perspectives intéressantes à ces investigations sur le double plan fondamental et appliqué :

- au niveau fondamental, le fait que l'extrait coagulant issu de dromadaires adultes, qui a des caractéristiques proches de celles de la pepsine, donnent les activités coagulantes les plus importantes, contrairement à ce qui est enregistré sur le bovin où l'activité protéolytique est la plus marquée, interpelle sur l'élucidation du comportement particulier de cette enzyme au niveau du dromadaire. En effet, il faudra explorer la relation structure/fonction pour voir quels sont les réarrangements qui ont lieu pour que l'enzyme soit limitée dans son activité hydrolytique ;
- au niveau appliqué, il s'agira de réaliser, en incorporant ces extraits, des essais de fabrications fromagères en utilisant le lait camelin, le lait bovin et le mélange des deux à différentes proportions. Les fromages seront évalués sur le plan de leur rendement et de leurs qualités organoleptiques. Une étude économique s'impose dans le cas d'un transfert favorable des résultats encourageants obtenus au stade laboratoire (coût d'installation d'unités d'élaboration d'enzymes coagulantes et des moyens qui vont avec).



*Références
bibliographiques*

- ABAD-ZAPATERO C., RYDEL T.J. and ERICKSON J. (1990).** Revised 2.3 Å structure of porcine pepsin: evidence for a flexible subdomain. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, 8, 62-81.
- ABDEL MALAK C.A., ABOU EL ADAB I.F.G., VUKASHINOVIC V., ZALUNIN IA., TIMOKHINA E.A., LAVRENOVAT G.I. and STEPANOV V.M. (1996).** Buffalo (*Bos buffali L*) chymosin purification and properties. *Comp. Biochem. Physiol.*, 113, 57–62.
- ABDEL-MAJIED E.M. AND TAHA A.A.M. (2003).** Morphological, morphometric and histochemical characterization of the gastric mucosa of the camel (camelus dromedaries). *Anat. Histol. Embryol.*, 32, 42-47.
- ABDUSALAM M.N. and SHAKER K. A. (2013).** Using of recombinant camel chymosin in producing soft cheese from camel milk. *Euphrates Journal of Agriculture Science*, 5 (2), 176-183.
- ABUHARFEEL N.M. and ABUEREISH G.M. (1984).** Isolation and characterization of Camel Pepsins. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 77(11), 175-182.
- AEHLE W. (2007).** Enzymes; In Industry: Production and Applications. 3rd ed, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 136-137.
- AGEITOS J.M., VALLEJO J.A, SESTELO A.B.F., POZA M. and VILLA T.G. (2007).** Purification and characterization of a milk clotting protease from *Bacillus licheniformis* strain USC13. *J. Appl. Microbiol.*, 103, 2205–2213.
- AHN J., CAO M.J., YU Y.Q. and ENGEN J.R. (2013).** Accessing the reproducibility and specificity of pepsin and other aspartic proteases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1834, 1222–1229.
- AL HAJ O.A. and AL- KANHAL H.A. (2010).** Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk. *Int. Dairy. J.*, 20, 811–821.
- AL JASSIM R. and HOGAN J. (2013).** Camel Nutrition for Meat Production; in: “Camel Meat and Meat Products” ed CABI, India.
- ALBERTSSON P., CAJARVILLE A., BROOKS D.E. and TJERNELD F. (1987).** Partition of proteins in aqueous polymer two-phase systems and the effect of molecular weight of the polymer. *Biochim. Biophys. Acta.*, 926, 87-93.
- AL-JANABI J., HARTSUCK J.A. and TANG J. (1972).** Kinetics and mechanism of pepsinogen activation. *J. Biol. Chem.*, 247, 4628-4632.
- AL-MZAIEN K.A. (2007).** Extraction, purification and characterization of camels pepsin (*Camelus dromedarius*). *Iraqi. J. Biotech.*, 6(2), 64-76.
- AL-MZAIEN K. A., SAIED N. A. and AL-JAFF G. E. (1992).** Extraction and Isolation of some Caprine Gastric Enzymes. *Mesopotamia J. Agric.*, 24(1), 109-117.
- AMOURACHE L. and VIJAYALAKSHMI M.A. (1984).** Affinity chromatography of kid chymosin on histidyl-Sepharose. *J. Chromatogr.*, 303, 285–290.
- ANDREEVA N.S. and 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.

ANDREEVA N.S., DILL J. and GILLILAND G. L. (1992). Can enzymes adopt a self-inhibited form? Results of X-ray crystallographic studies of chymosin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 184, 1074-1081.

ANDRÉN A. (1992). Production of prochymosin, pepsinogen and progastricsin, and their cellular and intracellular localization in bovine abomasal mucosa. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 52 (210), 59-64.

ANDRÉN A. and BJÖRCK L. (1986). Milk-feeding maintains the prochymosin production in cells of bovine abomasal mucosa. *Acta. Physiol. Scand.*, 126, 419-427.

ANDRÉN A., BJOERCK L. and CLAESSION O. (1980). Quantification of chymosin (rennin) and pepsin in bovine abomasum by rocket immunoelectrophoresis. *Swedish J. agric. Res.*, 10, 123-130.

ANDRÉN A., LENNART B. and CLAESSION O. (1982). Immunohistochemical studies on the development of prochymosin and pepsinogen-containing cells in bovine abomasal mucosa. *J. physiol.*, 327, 247-254.

ANONYME 1. (2010). Les enzymes coagulantes sur le marché français. SPPAIL Syndicat Professionnel des Producteurs d'Auxiliaires Pour l'industrie Laitière. http://www.cniel.com/quifait/Syndicat/SPPAIL/pdf/SPPAIL_marchefrancaisenzymescoagulantes_2010.pdf.

ANONYME 2. (2010). Chymosin. GMO Compass. <http://www.gmo-compass.org/eng/database/enzymes/83.chymosin.html>.

ANTONINI J. and RIBADEAU-DUMAS B. (1971). Isolation, purification and properties of 2 bovine gastric zymogens: properties of the corresponding proteases. *Biochimie*, 53, 321-329.

ATTALLAH A.G. (2007). Characters of chymosin gene isolated from different animal sources at molecular level. *J. Appl. Sci. Res.*, 3 (9), 904-907.

AUFFRET C.A. and RYLE A P. (1979). The catalytic activity of pig pepsin C towards small synthetic substrates. *Biochem. J.*, 179, 239-246.

AWAD S., LUTHI-PENG Q.Q. and PUHAN Z. (1998). Proteolytic activities of chymosin and porcine pepsin on buffalo, cow, and goat whole and β -casein fractions. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4997-5007.

BALCONES E., OLANO A. and CALVO M.M. (1996). Factors affecting the rennet clotting properties of ewe's milk. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1993-1996.

BANSAL N., DRAKE M.A., PIRAINO P., BROE M.L., HARBOE M., FOX P.F. and MCSWEENEY P.L.H. (2009). Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for Cheddar cheese. *Int. Dairy J.*, 19, 510-517.

BARBANO D.M. and RASMUSSEN R.R. (1992). Cheese yield performance of fermentation-produced chymosin and other milk coagulation. *J. Dairy Sci.*, 75, 1-12.

BARBARA N. and BEATRICE K. (1971), Bovine pepsinogen and pepsin. A new method of purification of the pepsin. *Biochim. Biophys. Acta*, 250, 207-209.

BATEMAN K.S., CHERNAIA M.M., TARASOVA N.I. and JAMES M.N. G. (1998) Crystal structure of human pepsinogen A. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 436, 259-263.

BAUDYŠ M. and KOSTKA V. (1983). Covalent structure of chicken pepsinogen. *Eur. J. Biochem.*, 136, 89-99.

- BAUDYŠ M., ERDENE T.G., KOSTKA V., PAVLÍK M. and FOLTMANN B. (1988).** Comparison between prochymosin and pepsinogen from lamb and calf. *Comp. Biochem. Physiol.*, 89, 385-391.
- BELDARRAÍN A., ACOSTA N., MONTESINOS R., MATA M. and CREMATA J. (2000).** Characterization of *Mucor pusillus* rennin expressed in *Pichia pastoris*: enzymic, spectroscopic and calorimetric studies. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 31, 77-84.
- BELLA A., SOUSA N.M, DEHIMI M.L. and BECKERS J.F. (2012).** Pregnancy-associated glycoprotein, chymosine and pepsinogen immunoreactivity of proteins extracted from fetal gastric tissue in bovine species. *Res. Vet. Sci.*, 92, 378-386.
- BERNAL J. D. and CROWFOOT D. (1934).** X-Ray photographs of crystalline pepsin. *Nature*, 133, 794-795.
- BERRIDGE N. J. (1945).** The purification and crystallization of rennin. *Biochem. Journal*, 39, 179-187.
- BERRIDGE N. J. (1952).** Some observations on the determination of the activity of rennet. *Analyst.*, 77, 57-60.
- BINER V.E.P., YOUNG D. and LAW B.A. (1989).** Comparison of Cheddar cheese made with a recombinant calf chymosin and with standard calf rennet. *J. Dairy Res.*, 56, 657-664.
- BORNAZ S., SAHLI A., ATTALAH A. and ATTIA H. (2009).** Physicochemical characteristics and renneting properties of camels' milk: A comparison with goats', ewes' and cows' milks. *Int. J. Dairy Tech.*, 62 (4).
- BOUDJENAH-HAROUN S., LALEYE C.L., MOULTI-MATI F., SI AHMED S., MAHBOUB N., SIBOUKEUR O. and MATI A. (2011).** Comparative study of milk clotting activity of crude gastric enzymes extracted from camels' abomasum at different ages and commercial enzymes (rennet and pepsin) on bovine and camel milk. *Emir. J. Food Agric.*, 23 (4), 301-310.
- BROOME M.C. and HICKEY M.W. (1990).** Comparison of fermentation produced chymosin and calf rennet in cheddar cheese. *Aust. J. Dairy Tech.*, 45, 53-59.
- BROOME M.C., XU X. and MAYES J.J. (2006).** Proteolysis in Cheddar cheese made with alternative coagulants. *Aust. J. Dairy Tech.*, 61, 85-87.
- BROWN R.J. AND EMSTROM C.A. (1988).** Milk-Clotting Enzymes and Cheese Chemistry Part I-Milk-Clotting Enzymes; In « Fundamentals of Dairy Chemistry » ed N.P. WONG et al. Van. Nostrand Reinhold Company Inc.
- BRULÉ G., LENOIR J. et REMEUF F. (2006).** La Micelle de Caséine et la Coagulation du Lait ; in : « Le fromage » éd. Eck et Gillis. Technique et Documentation, 3ème éd., Lavoisier, Paris.
- BUNN C.W., MOEWS P.C. and BAUMBER M.E. (1971).** The crystallography of calf rennin (chymosin). *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 178, 245-258.
- BURTON S.C., HAGGARTY N.W. and HARDING D.R. (1997).** One step purification of chymosin by mixed mode chromatography. *Biotechnol. Bioeng.*, 56, 45-55.
- CATTANEO T.M. P., NIGRO F., MESSINA G. and GIANGIACOMO R. (1994).** Effect of an enzymatic complex from pineapple pulp on the primary clotting phase. *Milchwissenschaft*, 49, 269-272.

- CAVALCANTI M.T.H., MARTINEZ C.R., FURTADO V.C., NETO B.B., TEIXEIRA M.F., LIMA FILHO J.L. and PORTO A.L.F. (2005).** Milk-clotting protease production by *Nocardioopsis* sp. in an inexpensive medium. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 151–154.
- CHAOUI-KHEROUATOU N. and ATTIA H. (2008).** Étude comparative des caséines camelines (*Camelus dromedarius*) et bovines. *Sci. & Tech.*, N°28, 73 -79.
- CHEESEMAN G.C. (1965).** Denaturation of rennin: Effect on activity and molecular configuration. *Nature*, 205, 1011-1012.
- CHEHMA A. (2003).** Productivité pastorale et productivité laitière en Algérie. Lait de chamelle pour l'AFRIQUE. FAO ; *Production et Santé Animale*, 2, 43-51.
- CHEN H., ZHANG G., ZHANG Y., DONG Y. and YANG K. (2000).** Functional implications of disulfide bond, Cys206- Cys210, in recombinant prochymosin (chymosin). *Biochem.*, 39, 12140–12148.
- CHEN S.J., AGBOOLA S. and ZHAO J. (2003).** Use of Australian cardoon extract in the manufacture of ovine milk cheese. A comparison with commercial rennet preparations. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 38, 799-807.
- CHITPINITIYOL S. and CRABBE M.J.C. (1998).** Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chem.*, 61 (4), 395-418.
- CHOISY C., DESMAZEAUD M., GRIPONJ.C., LAMBERET G. et LENOIR J. (2006).** La Biochimie de L'affinage ; In : « Le fromage » éd. Eck et Gillis. Technique et Documentation, 3ème éd., Lavoisier, Paris.
- CHOW R.B. and KASSELL B. (1968).** Bovine pepsinogen and pepsin. Isolation, purification and some properties of the pepsinogen. *J. Biol. Chem.*, 243, 1710-1724.
- CLAVERIE-MARTÍN F. and VEGA-HERNÁNDEZ M.C. (2007).** Aspartic Proteases Used in Cheese Making; In « Industrial Enzymes » ed Polaina and A.P. MacCabe, Springer.
- COLLIN J.C., GRAPPIN R. et LEGREAT Y. (1977).** Etude de la méthode de mesure, selon BERRIDGE, du temps de coagulation du lait additionné d'une solution enzymatique. *Revue Laitière Française*, 355, 389-394.
- COLLIN J.C., MOULINS I., ROLET-RE'PE'CAUD O., BAILLY C. and LAGARDE G. (1997).** Detection of recombinant chymosins in calf rennet by enzyme-linked immunosorbent assay. *Lait*, 77 425–431.
- COLLIN J.C., REPELIUS C. and HARBOE M.K. (2003).** Detection of fermentation-produced chymosin (FPC) in rennet. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 380, 21–24.
- COOPER J.B., KHAN G., TAYLOR G., TICKLE I. J. and BLUN- DELL T.L. (1990).** X-ray analyses of aspartic proteinases II: Three-dimensional structure of the hexagonal crystal form of porcine pepsin at 2.3 Å. *J. Mol. Biol.*, 214, 199-222.
- CORDEIRO M., JAKOB E., PUHAN Z., PAIS M.S. and BRODELIUS P. (1992).** Milk clotting and proteolytic activities of purified cynarases from *Cynara cardunculus*—comparison to chymosin. *Milchwissenschaft*, 47, 683–687.

- CRUYWAGEN C.W., BRISSON G.J. and MEISSNER H.H. (1990).** Casein curd-forming ability and abomasal retention of milk replacer components in young calves. *J. Dairy Sci.*, 73, 1578-1585.
- CULLEN D., GRAY G.L., WILSON L.J., HAYENGA K.J., LAMSA M.H., REY M.W., NORTON S. and BERKA R.M. (1987).** Controlled expression and secretion of bovine chymosin in *Aspergillus Nidulans*. *BioTechnology*, 5, 369–376.
- CUVELLIER G.F. (1993).** Production des Enzymes ; in : « Biotechnologie » ed. Coord Scriban, Technique et Documentation, 4^{ème} éd., Lavoisier, Paris.
- CYBULSKI W. and ANDREN A. (1990).** Immunohistochemical studies on the development of cells containing progastricsin (minor pepsinogen) in comparison to prochymosine and pepsinogen in bovine abomasal mucosa. *Anatomical rec.*, 227, 458-463.
- DALGLEISH D.G. (1992).** The Enzymatic Coagulation of Milk. In P. F. Fox (Ed.), *Advanced dairy chemistry Proteins*, 1, 579–619. London: Elsevier Applied Science Publishers.
- DALGLEISH D.G., and LAW J.R. (1988).** pH-induced dissociation of bovine casein micelles. I. Analysis of liberated caseins. *J. Dairy Res.*, 55, 529–537.
- DALGLEISH D. G., and LAW J. R. (1989).** pH-induced dissociation of bovine casein micelles. II. Mineral solubilization and its relation to casein release. *J. Dairy Res.*, 56, 727-735.
- DALGLEISH D.G. and CORREDIG M. (2012).** The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 3, 449–67.
- DALGLEISH D.G., HORNE D.S. and LAW A.J.R. (1989).** Size-related differences in bovine casein micelles. *Biochim. Biophys. Acta.*, 991, 383–387.
- DANLEY D.E. and GOEGHEGAN K.F. (1988).** Structure and mechanism of formation of chymosin C derived from recombinant chymosine. *A. J. Biol. Chem.*, 263, 9785-9789.
- DAVE R.I., MC MAHON D.J., OBERG C.J. and BROADBENT et J.R. (2003).** Influence of coagulant level on proteolysis and functionality of mozzarella cheeses made using direct acidification. *J. Dairy Sci.*, 86, 114-116.
- DAVIES D.R. (1990).** The structure and function of aspartic proteinases. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 19, 189-215.
- DELLMANN H.D., BLIN P.L. and FAHMY M.F.A. (1968).** Contribution à l'étude de l'anatomie microscopique du tube digestif chez le Chameau, *Rev. Elev Med. vt.*, 21 (1), 1-32.
- DING Z., WANG W., WANG B., OUYANG A., XIAO S., WANG Y., LIU S., DING M., ZHANG L. and SHI G. (2012).** Production and characterization of milk-clotting enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* JNU002 by submerged fermentation. *Eur. Food Res. Technol.*, 234, 415–421.
- DOBSON D.E., PRAGER E.M. and WILSONG A.C. (1984).** Stomach lysozymes of ruminants: I. Distribution and catalytic properties. *J. Biol. Chem.*, 259 (18), 11607-11616.
- DONNELLY W.J., O'CALLAGHAN D.M. and CARROLL D.P. (1984a).** Multiple forms of calf prochymosin and chymosin. *Biochem. Soc. T.*, 12, 440-441.

- DONNELLY W.J., MCNEILL G.P., BUCHHEIM W. and MCGANN T.C.A. (1984b).** A comprehensive study of the relationship between size and protein composition in natural bovine casein micelles. *Biochim. Biophys. Acta.*, 789, 136–143.
- DONNELLY W.J., CARROLL D.P., O'CALLAGHAN D.M. and WALLS D. (1986).** Genetic polymorphism of bovine chymosin. *J. Dairy Res.*, 53, 657-664.
- DOUGBAG A.S., BERG R. (1981).** Histological and histochemical studies on the fundic mucosa of the camel's stomach (*Camelus dromedarius*). *Anat. Anz.*, 149 (1), 72-8.
- DRØHSE H.B. and BENT FOLTMANN B. (1989).** Specificity of milk-clotting enzymes towards bovine κ -casein. *Biochim. Biophys. Acta.*, 995, 221-224.
- DUNN B.M., JIMENEZ M., PARTEN B.F., VALLER M.J., ROLPH C.E. and KAY J. (1986).** A systematic series of synthetic chromophoric substrates for aspartic proteinases. *Biochem. Journal*, 237, 899-906.
- DUNN B.M. (2002).** Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chem. Rev.*, 102, 4431–4458.
- DUNN-COLEMAN N S., BLOEBAUM P., BERKA R.M., BODIES E., ROBINSON N., ARMSTRONG G., WARD M., PRZETAK M., CARTER G.C., LACOST R., WILSON L.J., KODAMA K. H., BALIU E.F., BOWER B., LAMSA M. and HEINSOHN H. (1991).** Commercial level of chymosin production by *Aspergillus*. *Biotechnology*, 9, 976-981.
- DYBOWSKA E. and FUJIO Y. (1996).** Effect of temperature and gluconod- lactone (GDL) concentration on milk aggregation and gelation process as revealed by optical method. *Milchwissenschaft*, 51, 557–560.
- DYKES C.W. and KAY J. (1976).** Conversion of pepsinogen into pepsin is not a one-step process. *Biochem. J.*, 153, 141-144.
- EGITO A.S., GIRARDET J.M., LAGUNA L.E., POIRSON C., MOLLE D., MICLO L., HUMBERT G. and GAILLARD J.L. (2007).** Milk clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine κ -casein. *Int. Dairy J.*, 17, 816–825.
- EL ZUBEIR I.E.M and SAMAH O.J. (2008).** Fresh cheese from camel milk coagulated with Camifloc. *Int. J. Dairy Tech.*, 61, 90–95.
- EL-ABASSY (1987) cité par WANGOH et al (1993)**
- ELAGAMY E.I. (2000).** Physicochemical, molecular and immunological characterization of camel calf rennet: a comparison with buffalo rennet. *J. Dairy Res.*, 67, 73-81.
- EL-AGAMY E.I. and KAMAL N.M. (1998).** Studies on camel rennet. I. Preparation, storage stability, clotting ability and proteolytic activity. *J. Agric. Sci.*, 23, 3861–3868.
- EL-BATAWY M.A., AMER S.N. and IBRAHIM S.A. (1987).** Camel Abomasum as a source of rennet substitute. *Egypt. J. Dairy Sci.*, 15, 93-100.
- EMMANUEL B., HOWARD B.R. and EMADY M. (1976).** Urea degradation in the camel. *Can. J. Anim. Sci.*, 56, 595-601.
- EMMONS D.B. (1970).** Inactivation of pepsin in hard water. *J. Dairy Sci.*, 53, 1177-1182.

- EMTAGE J. S., ANGAL S., DOEL, M. T., HARRIS T. J.R., JENKINS, B., LILLEY G. and LOWE P. A. (1983).** Synthesis of calf prochymosin (prorennin). *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 80, 3671–3675.
- ESUMI H., SATO S., SUGIMURA T. AND FURIHATA C. (1978).** Purification of mouse pepsinogens by pepstatin-affinity chromatography. *FEBS. Lett.*, 86, 33-36.
- EURELL. and FRAPPLER. (2006).** cité par **RAJI. (2011).**
- FARAH Z. and FARAH-RIESEN M. (1985).** Separation and characterization of major components of camel milk casein. *Milchwissenschaft*, 40, 669-671.
- FARAH Z. and BACHMANN M.R. (1987).** Rennet coagulation properties of camel milk. *Milchwissenschaft*, 42, 689-692.
- FARKYE N.Y. (2004).** Cheese technology. *Int. J. Dairy Tech.*, 57, 91-98
- FARO C., VERISSIMO P., LIN Y., TANG J. AND PIRES E. (1995).** Cardosin A and B, aspartic proteases from the flowers of cardoon. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 362, 373-377.
- FARRELL H.M. JR. JIMENEZ-FLORES R., BLECK G.T., BROWN E.M., BUTLER J.E., CREAMER L.K., HICKS C.L., HOLLAR C.M., NG-KWAI-HANG K. F. and SWAISGOOD H.E. (2004).** Nomenclature of the proteins of cows' milk sixth revision. *J. Dairy Sci.*, 87, 1641–1674.
- FAYE B., BENGOUNI M., BARKAT A. (2003).** Le développement des systèmes camélins laitiers périurbains en Afrique. Lait de chamelle pour l'AFRIQUE. *FAO Production et Santé Animale* 2, 115-125.
- FOLTMANN B. (1959).** Studies on rennin: II on the crystallization, stability and proteolytic activity of rennin. *Acta. Chem. Scand.* 13, 1927-1935.
- FOLTMANN B. (1966).** A review on prorennin and rennin. *Compt. Rend. De. Trav. Du. Lab. Carl.*, 35, 143-231.
- FOLTMANN B. (1970).** Prochymosin and chymosin (Prorennin and rennin). *Methods. Enzymol.*, 19, 421–436.
- FOLTMANN B. (1981).** Gastric proteinases Structure, function, evolution, and mechanism of action, *Essays Biochem.*, 17, 52-84.
- FOLTMANN B. (1988).** Structure and function of propeptides in zymogens for aspartic proteinases. *Biol. Chem.*, 369, 311-314.
- FOLTMANN B. (1992).** Chymosin: a short review on foetal and neonatal gastric proteases. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 52(210), 65-79.
- FOLTMANN B. (1993).** General and Molecular Aspects of Rennets; In Fox PF. (eds), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 37-88, London, Elsevier.
- FOLTMANN B. and AXELSEN N.H. (1980).** Gastric proteinases and their zymogens. Phylogenetic and developmental aspects. *FEBS. Proceedings*, 60, 271-280.
- FOLTMANN B. and JENSEN A.L. (1982).** Human progastricsin. Analysis of intermediates during activation into gastricsin and determination of the amino acid sequence of the propeptide. *Eur. J. Biochem.*, 128, 63–70.

- FOLTMANN B., PEDERSEN V.B., JACOBSEN H., KAUFFMANT D. and WYBRANDTF G. (1977).** The complete amino acid sequence of prochymosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 74, 2321-2324.
- FOLTMANN B., LONBLAD P. and AXELSEN N. H. (1978).** Demonstration of chymosin (EC 3.4.23.4) in the stomach of newborn pig. *Biochem. Journal* 160, 425-427.
- FOLTMANN B., JENSEN A.L., LANBLAD P., SMIDT E. and AXELSEN N.H. (1981).** A developmental analysis of the production of chymosin and pepsin in pigs. *Comp. Biochem. Physiol.*, 68, 9-13.
- FOLTMANN B., HARLOW K., HOUEEN G., NIELSEN P.K. and SANGILD L.P. (1995).** Comparative Investigations On Pig Gastric Proteases And Their Zymogens; In Aspartic Proteinases: Structure. Function, Biology. and Biomedical Implications Edited by Kenji Takahashi, Plenum Press, New York.
- FOX P.F. (1969).** Milk clotting and proteolytic activities of rennet and of bovine pepsin and porcine pepsin. *J. Dairy Res.*, 36, 427-433.
- FOX P.F. (2001).** Milk proteins as food ingredients. *Int. J. Dairy Technol.*, 54(2), 41- 55.
- FOX P.F. (2007).** Exogenous enzymes in dairy technology—a review. *J. Food Biochem.*, 17(3), 173-199
- FOX P.F. and MCSWEENEY P.L.H. (1997).** Rennets: Their Role In Milk Coagulation And Cheese Ripening; In Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk, 2nd edn., Law B A, ed. London: Chapman & Hall. 1-49.
- FOX P.F. and KELLY A.L. (2004).** The Caseins; In Proteins in Food Processing, YADA R.Y, ed. Boca Raton, FL: CRC Press., 29-71.
- FOX P. F., WHITAKER J. R. and O'LEARY P. A. (1977).** Isolation and characterization of sheep pepsin. *Biochem. J.*, 161, 389-398.
- FOX P.F., GUINEE T.P., COGAN T.M., and MCSWEENEY P.L.H. (2000).** Chemistry Of Milk Constituents; In Fundamentals of Cheese Science, Aspen Publishers, Gaithersburg, MD. 19-44.
- FRUTON J.S. (1970).** The specificity and mechanism of pepsin action. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.*, 33, 401-43.
- FRUTON J.S. (2002).** A history of pepsin and related enzymes, *Q.Rev. Biol*, 77, 127-147.
- GALLOUIN F.M. and FOCANT (1980).** Bases physiologiques du comportement alimentaire chez les ruminants. *reprod. nutr. Develop.*, 20 (5B), 1563-1614.
- GARG S.K. and JOHRI B.N. (1994).** Rennet: current trends and future research. *Food Rev. Int.*, 10, 313-355.
- GARNOT P., TOULLEC R., THAPON J.L., MARTIN P., HOANG M.T., MATHIEU C.M. and RIBADEAU-DUMAS B. (1977).** Influence of age, dietary protein and weaning on calf abomasal enzymic secretion, *J. Dairy Res.*, 44, 9-23.
- GASTALDI E., PELLEGRINI O., LAGAUE A. and TARODO DE LA FUENTE B. (1994).** Functions of added calcium in acid milk coagulation. *J. Food Sci.*, 59, 310-320.
- GASTALDI E., LAGAUE A., TARODO DE LA FUENTE B. (1996).** Micellar transition state in casein between pH 5.5 and 6.0. *J. Food Sci.*, 61, 1-7.

- GERMONVILLE A. (2003).** Agents coagulants. Éditions Techniques de l'Ingénieur, traité Agroalimentaire. Paris, France.
- GIHAD E.A., EL-GALLAD T.T., SOOUD A.E., MFA F. and ABOU EL-NASR H.M. (1989).** Feed and water intake, digestibility and nitrogen utilization by camels compared to sheep and goats fed low protein desert by-products. *Options Méditerranéennes -Série Séminaires*, 2, 75-81.
- GILDBERG A. (1992).** Recovery of proteinases and protein hydrolysates from fish viscera. *Bioresource Technol.*, 39, 271-276.
- GILLILAND G.L., WINBORNE E.L., NACHMAN J., WLODAWER A. (1990).** The three-dimensional structure of recombinant bovine chymosin at 2.3 Å resolution. *Proteins: Struct., Funct., Genet.*, 8, 82-101.
- GOFF C.G., MOIR D.T., KOHNO T., GRAVIUS T.C., SMITH R.S., YAMASAKI E. and TAUNTON-RIGBY A. (1984).** Expression of calf prochymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 27, 35-46.
- GOURSAUD J. (1992).** Coagulation Enzymatique du Lait ; In « Biotechnologie ». Ed. Tec. Doc, Lavoisier, Paris.
- GOVINDASAMY-LUCEY S., LU Y., JAEGGI J.J., JOHNSON M.E. and LUCEY J.A. (2010).** Impact of camel chymosin on the texture and sensory properties of low-fat cheddar cheese. *Aust. J. Dairy Tech.*, 65(3), 139-142.
- GREEN M.L. (1972).** Assessment of swine, bovine and chicken pepsins as substitutes for cheddar cheese-making. *J. Dairy Res.*, 39, 261.
- GREEN M. L., ANGAL S., LOWE P. A. and MARSTON F.A.O. (1985).** Cheddar cheese-making with recombinant calf chymosin synthesized in *Escherichia coli*. *J. Dairy Res.*, 52, 281-286.
- GROVES M.R., DHANARAJ V., BADASSO M., NUGENT P., PITTS J. E., HOOVER D. J., and BLUNDELL T. L. (1998).** A 2.3 Å resolution structure of chymosin complexed with a reduced bond inhibitor shows that the active site beta-hairpin flap is rearranged when compared with the native crystal structure. *Protein. Eng.*, 11, 833-840.
- GUILLOTEAU R. P. and DELANSORNE R.T. (1982).** Répartition des concentrations enzymatiques dans la muqueuse abomasale du veau préruminant. Evolution avec l'âge. *reprod nutr. Develop.*, 22(3), 511-522.
- GUILLOTEAU P., CORRING T., TOULLEC R. and ROBELIN J. (1984).** Enzyme potentialities of the abomasum and pancreas of the calf. I. and mdash; Effect of age in the preruminant, *Repro. Nutri. Develop.*, 24(3), 315-325.
- GUILLOTEAU P., CORRING T., TOULLEC R. and GUILHERMET R. (1985).** Enzyme potentialities of the abomasum and pancreas of the calf. II. Effects of weaning and feeding a liquid supplement to ruminant animals. *Repro. Nutri. Develop.*, 25(3), 481-493
- HAMURO Y., COALES S.J., MOLNAR K.S., TUSKE S.J. and MORROW J.A. (2008).** Specificity of immobilized porcine pepsin in H/D exchange compatible conditions. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22, 1041-1046.
- HARBOE M.K. and FOLTMANN B. (1975).** Bovine pepsin: the sequence of the first 65 amino acid residues (completing the sequence of the first 110 residues of bovine pepsinogen). *FEBS. Lett.*, 60,

- HARBOE M., BROE M.L. and QVIST K.B. (2010).** The Production, Action and Application of Rennets and Coagulants; In *Technology of Cheesemaking*, 2nd ed. LAW B. A. and TAMIME A.Y. Eds. Wiley-Blackwell: Oxford, UK, 98-129.
- HARRIS T.J.R., LOWE P.A., THOMAS P.A.W., MILLICAN T.A., PATEL T.A., BOE C.C., CAREY N.H. and DOEL M.T. (1982).** Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA coding for calf preprochymosin. *Nucleic Acids Res.*, 10, 2177-2187.
- HARTSUCK J.A., MARCINISZYN J., HUANG J.S. and TANG J. (1977).** Intramolecular activation of pepsinogen. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 95, 85-102.
- HARTSUCK J.A., KOELSCH G. and REMINGTON S.J. (1992).** The high resolution crystal structure of porcine pepsinogen. *Proteins*, 13, 1-25.
- HASSAN MD.I., TOOR A. and AHMAD F. (2010).** Progastriscin: Structure, Function, and Its Role in Tumor Progression. *J. Mol. Cell. Biol.*, 2, 118–127
- HAVERA H.J. and HUMPHREYS J.D. (1987).** Method for increasing the milk clotting activity of thermolabile Rhizomucor pusillus rennet. European Patent Application, EP 230231 A2 19870729
- HAVERA H.J. and HUMPHREYS J.D. (1988).** Method for increasing the milk clotting activity of thermolabile Rhizomucor pusillus rennet. US Patent 4722900
- HEIMGARTNER U., PIETRZAK M., GEERTSEN R., BRODELIUS P., DA SILVA FIGUEIREDO A.C. and PAIS M.S.S. (1990).** Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry*, 29, 1405–1410.
- HERIAN K. and KRCAL Z. (1971).** Suitability of lambs' stomachs for industrial manufacture of rennet. *Prumyst. Potravin.*, 22(5), 137–139.
- HETH A.A. and SWAISGOOD H.E. (1982).** Examination of casein micelle structure by a method for reversible covalent immobilization. *J. Dairy Sci.*, 65, 2047.
- HICKS C.L., O'LEARY J. and BUCY J. (1988).** Use of recombinant chymosine in the manufacture of Cheddar and Colby cheeses. *J. Dairy Sci.*, 71, 1127–1131.
- HIDAKA M., SASAKI K., UOZUMI T. and BEPPU T. (1986).** Cloning and structural analysis of the calf prochymosi gene. *Gene*, 43, 197-203.
- HIDALGO M.E., PIRES M.S. and RISSO P.H. (2010).** A study on bovine kappa-casein aggregation after the enzymatic action of chymosine. *Colloids Surf. B.*, 76, 556-563.
- HILL R.D. (1968).** The nature of the rennin-sensitive bond in casein and its possible relation to sensitive bonds in other proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 33, 659–663.
- HILLIER R.M. (1976).** The quantitative measurement of whey proteins using polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Dairy Res.*, 43, 259-265.
- HIPP N.J., GROVES M.L., CUSTER J.H. and MCMEEKIN T.L. (1952).** Separation of α -, β - and γ -casein. *J. Dairy Sci.*, 35, 272–281.
- HOUEN G., MADSEN M.T., HARLOW K.W., LONBLAD P. and FOLTMANN B. (1996).** The primary structure and enzymatic properties of porcine prochymosin and chymosine. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 28, 667-675.

- HUMME H.E. (1972).** The optimum pH for the limited specific proteolysis of k-casein by rennin (primary phase of milk clotting). *Neth. Milk Dairy J.*, 26, 180–185.
- HYNES E.R., MEINARD C.A., SABBAG N., CATTARIO T., CANDIOTI M.C. and ZALAZAR C.A. (2001).** Influence of milk clotting enzymes concentration on the α 1-casein hydrolysis during soft cheeses ripening. *J. Dairy Sci.*, 84, 1335- 1340.
- HYSLOP D.B. (2003).** Enzymatic Coagulation Of Milk. In: Advanced dairy chemistry. Proteins. Eds P.F. Fox, &P.L.H. McSweeney. (Vol. 1. 3rd ed.). London: Elsevier Applied Science Publishers pp. 839–878.
- IMELIO N., MARINI A., SPELZINI D., PICÓ G. and FARRUGGIA B. (2008).** Pepsin extraction from bovine stomach using aqueous two-phase systems: Molecular mechanism and influence of homogenate mass and phase volume ratio. *J. Chromatogr. B*, 873, 133-138.
- INGR M., UHLÍKOVÁ T., STRISOVSKY K., MAJEROVÁ E. and KONVALINKA J. (2003).** Kinetics of the dimerization of retroviral proteases: the “fireman’s grip” and dimerization. *Protein Sci.*, 12(10), 2173–2182.
- ISHIHARA T. and YAMAMOTO S. (2000).** Separation behavior of proteins near the isoelectric points in electrostatic interaction (ion exchange) chromatography. *Prog. Biotechnol.* 16, 93–98.
- JACOB M., JAROS D. and ROHM H. (2011).** Recent advances in milk clotting enzymes. *Int. J. Dairy Technol.*, 64, 14–33.
- JAMES M.N.G. and SIELECKI A.R. (1986).** Molecular structure of an aspartic proteinase zymogen, porcine pepsinogen, at 1.8 Å resolution. *Nature*, 319, 33-38.
- JAMES M.N.G., SIELECKI, A.R., HAYAKAWA K., and GELB, M.H. (1992).** Crystallographic analysis of transition state mimics bound to penicillopepsin: Difluorostatine- and difluorostatone-containing peptides. *Biochemistry*, 31, 3872–3886.
- JANHØJ T. and QVIST K.B. (2010).** The Formation of Cheese Curd; In Technology of Cheesemaking, 2nd ed.; Law, B. A., Tamime, A. Y., Eds.; Wiley-Blackwell: Oxford, U.K; pp 98-129.
- JANOWITZ H.D. and HOLLANDER F.I. (1952).** The basal secretion of pepsin by the human stomach. *J. Clin. Invest.*, 31, 338-340.
- JENSEN L.J., MØLGAARD A., POULSEN J.C.N., HARBOE M.K., SIMONSEN J.B., LORENTZEN A.M., HJERNØ K., VAN DEN BRINK J.M., QVIST K.B. and LARSEN S. (2013).** Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese-making properties. *Acta Cryst.*, 69, 901–913.
- JOHNSON M.E. and LUCEY J.A. (2006).** Major technological advances and trends in cheese. *J. Dairy Sci.*, 89, 1174–1178.
- JOLLES J., SCHOENTGEN F., ALAIS C. and JOLLES P. (1972).** Studies on the primary structure of cow kappa-casein. The primary sequence of cow para-kappa-casein." *Chimia*, 26, 645-646.
- JOLLÈS J., PRAGER E.M., ALNEMRI E.S., JOLLÈS P., IBRAHIMI I.M. and WILSON A.C. (1990).** Amino Acid Sequences of Stomach and Nonstomach Lysozymes of Ruminants. *J. Mol. Evol.*, 30, 370-382.

- JOUANY J. P. and KAYOULI C. (1989).** La digestion microbienne chez les camélidés. Options Méditerranéennes - Série Séminaires - n," 2 ,89-96.
- KAGEYAMA T. (2000).** New world monkey pepsinogens A and C, and prochymosins: purification, characterization of enzymatic properties, cDNA cloning, and molecular evolution. *J. Biochem.*, 127, 761–770.
- KAGEYAMA T. (2002).** Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: Structure, function, evolution, and development. *Cell. Mol. Life Sci.*, 59, 288-306.
- KAGEYAMA T. (2004).** Role of S'1 loop residues in the substrate specificities of pepsin A and chymosin. *Biochemistry*, 43, 15122_15130
- KAGEYAMA T. and TAKAHASHI K. (1976).** Pepsinogens and pepsins from gastric mucosa of Japanese monkey. Purification and characterization. *J. Biochem.*, 79, 455-468.
- KAGEYAMA T. and TAKAHASHI K. (1977).** The carbohydrate moiety of Japanese monkey pepsinogens. Its composition and site of attachment to protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 74, 789-95.
- KAGEYAMA T. and TAKAHASHI K. (1983).** Occurrence of two different pathways in the activation of porcine pepsinogen to pepsin. *J. Biochem.*, 93, 743-54.
- KAGEYAMA T. and TAKAHASHI K. (1986).** The complete amino acid sequence of monkey progastricsin. *J. Biol. Chem.*, 261, 4406-4419.
- KAGEYAMA T., TANABE K. and KOIWAI O. (1990).** Structure and development of rabbit pepsinogens. Stage-specific zymogens, nucleotide sequences of cDNAs, molecular evolution, and gene expression during development. *J. Biol. Chem.*, 265, 17031-17038.
- KAGEYAMA T., TANABE K. and KOIWAI O. (1991).** Development dependent expression of isozymogens of monkey pepsinogens and structural differences between them, *Eur. J. Biochem.*, 202, 205-215.
- KAGEYAMA T., ICHINOSE M., TSUKADA-KATO S., OMATA M., NARITA Y., MORIYAMA A. and YONEZAWA S. (2000).** Molecular cloning of neonate/infant-specific pepsinogens from rat stomach mucosa and their expressional change during development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 267, 806-812.
- KAGEYAMA H., UEDA H., TEZUKA T., OGASAWARA A., NARITA Y., KAGEYAMA T. and ICHINOSE M. (2010).** Differences in the P1' substrate specificities of pepsin A and chymosine. *J. Biochem.*, 147(2), 167–174.
- KAPPELER S., FARAH Z. and PUHAN Z. (1998).** Sequence analysis of Camelus dromedarius milk caseins. *J. Dairy Res.*, 65, 206-222.
- KAPPELER S.R., VAN DEN BRINK H.M., RAHBECK-NIELSEN H., FARAH Z., PUHAN Z., BECH HANSEN E. and JOHANSEN E. (2006).** Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 342, 647–654.
- KAY R.N.B. and MALOIY G.M.O. (1989).** Digestive secretions in camels. Options Méditerranéennes - Série Séminaires - n° 2, 83-87.
- KAYOULI C., JOUANY J.P., DARDILLAT C. and TISSERAND J.L. (1995).** Particularités physiologiques du dromadaire : conséquences pour son alimentation. Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches 03.

- KHAN A.R. and JAMES M.N.G. (1998).** Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci.*, 7, 815-836.
- KIM S.M. and ZAYAS J.F. (1991).** Comparative quality characteristics of Chymosin extracts obtained by ultrasound treatment. *J. Food Sci.*, 56, 406-410.
- KOBAYASHI H. and MURAKAMI K. (1978).** Rapid and large scale isolation of chymosin rennin by pepstatin amino hexylagarose. *Agric. Biol. Chem.*, 42, 2227-2231.
- KOWALCHYK A.W. and OLSON N.F. (1977).** Effects of pH and temperature on the secondary phase of milk clotting by rennet. *J. Dairy Sci.*, 60, 1256-1259.
- KUMAR A., SHARMA J., MOHANTY A.K., GROVER S. and BATISH V.K. (2006).** Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat (*Capra hircus*). *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.*, 145,108-113.
- KUMAR A., SHARMA J., GROVER S., MOHANTY A. K. and BATISH. V.K. (2007).** Molecular cloning and expression of goat (*capra hircus*) prochymosin in *E.coli*. *Food Biotechnol.*, 21, 57-69.
- KUMAR A., GROVER S., SHARMA J. and BATISH V.K. (2010).** Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 30(4), 243-58.
- KUMOSINSKI T.F, BROWN E.M. and FARRELL Jr.H.M. (1991).** Three dimensional molecular modeling of bovine caseins: κ -casein. *J. Dairy Sci.*, 74, 2879-2887.
- LE GRÄET Y. and BRUL G. (1993).** Les équilibres minéraux du lait: influence du pH et de la force ionique. *Lait*, 73, 51-60.
- LECHNER-DOLL M., VON ENGELHARDT W., ABBAS A.M., MOUSA H.M., LUCIANO L. and PEALE E. (1995).** Particularities In Forestomach Anatomy, Physiology And Biochemistry Of Camelids Compared To Ruminantia; In: Elevage et alimentation du dromadaire. Camel production and nutrition, Options Méditerranéennes. Série B: Tisserand JL (Ed.). n°13, CIHEAM, 19-32.
- LENOIR J., REMEUF F. et SCHNEID N. (2006).** Le Lait de Fromagerie in : « Le fromage » éd. Eck et Gillis. Technique et Documentation, 3ème éd., Lavoisier, Paris.
- LEWIN M. and BONFILS S. (1968).** Statistic evaluation of the correlation of acid-pepsin (K25) in human gastric juice in health and disease. *Rev. Fr. Etud. Clin. Biol.*, 13, 780-791.
- LILLA S., MOGNA G. and ADDEO F. (2005).** Validation of recombinant and bovine chymosin by mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 5230-5238.
- LIN X., LOY J.A., SUSSMAN, F. and TANG J. (1993).** Conformational instability of the N- and C-terminal lobes of porcine pepsin in neutral and alkaline solutions. *Protein Sci.*, 2 (9), 1383-1390.
- LLORENTE B.E., BRUTTI C.B and CAFFINI N.O. (2004).** Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L). *J. Agric. Food Chem.*, 52, 8182-8198.
- LÓPEZ M.B., LOMHOLT S.B., and QVIST K.B. (1998).** Rheological properties and cutting time of rennet gels. Effect of pH and enzyme concentration. *Int. Dairy J.*, 8, 289-293.

- LOW Y.H., AGBOOLA S., ZHAO H. and LIM M.Y.(2006).** Clotting and proteolytic properties of plant coagulants in regular and ultrafiltered bovine skim milk. *Int. Dairy J.*, 16, 335–343.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J. (1951).** Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biochem.*, 193, 265-275.
- MAHAUT M., JEANTET R. et BRULE G. (2005).** Initiation a la technologie fromagère. Tec & Doc, Paris, France. 1-21
- MAHAUT M., JEANTET R., BRULE G. and SCHUCK P. (2000).** Les produits industriels laitiers. Tec and Doc, Paris, France, p 41.
- MARCINISZYN J., HUANG J.S., HARTSUCK J.A. and TANG J. (1976).** Mechanism of intramolecular activation of pepsinogen. *J. Biol. Chem.*, 25(70), 95-102.
- MARTIN P. (1984).** Hydrolysis of the synthetic chromophoric hexapeptide Leu-Ser-Phe(NO₂)-Nle-Ala-Leu-Ome catalyzed by bovine pepsin A. *Biochim. Biophys. Acta*, 791, 28-36.
- MARTIN P. and CORRE C. (1984).** Fractionation of the multiple forms of bovine gastric aspartic proteases by chromatofocusing. *Anal. Biochem.*, 143, 256-264.
- MARTIN P., CEBO C. and MIRANDA G. (2013).** Interspecies Comparison of Milk Proteins: Quantitative Variability and Molecular Diversity. eds P.L.H. McSweeney and P.F. Fox, *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects*, 4th Edition, Springer Science+Business Media New York.
- MARTIN P., TRIEU-CUOT P., CORRE C. and RIBADEAU DUMAS B. (1982a).** Study of the heterogeneity of bovine pepsin A by pseudo isoelectric focusing. *Biochimie*, 64 (1), 55-64.
- MARTIN P., TRIEU-CUOT P., COLLIN J.C. and RIBADEAU DUMAS B. (1982b).** Purification and characterization of bovine gastricsin. *Eur. J. Biochem.*, 122, 31-39.
- MCMAHON D.J., RICHARDSON, G.H. and BROWN, R.J. (1984).** Enzymic milk coagulation: Role of equations involving coagulation time and curd firmness in describing coagulation. *J. Dairy Sci.*, 67, 1185–1193.
- MCSWEENEY P.L.H. (2004).** Biochemistry of cheese ripening. *Int. J. Dairy Technol.*, 57, 127-144.
- MEHAIA M.A., ABOU EL-KHEIR A.M. and HABAS M.A. (1988).** Enzymatic coagulation of camel milk. A study using soluble and immobilised chymosin. *Milchwissenschaft*, 43(7), 438–441.
- MEHAIA M.A., HABLAS M.A., ABDEL-RAHMAN K.M. and EL-MOUGY S.A. (1995).** Milk composition of Majaheim, Wadah and Hamra camels in Saudi Arabia. *Food Chem.*, 52, 115-122.
- MEITNER P.A. and KASSELL B. (1970).** Bovine pepsinogens and pepsins: a series of zymogens and enzymes that differ in organic phosphate content. *Biochem. J.*, 121, 249-256.
- MELLOR J., DOBSON M.J., ROBERTS N.A., TUIE M.F., EMTAGE J.S., WHITE S., LOWE P.A., PATEL T., KINGSMAN A.J. and KINGSMAN S.M. (1983).** Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*, *Gene*, 24, 1–14.

- MeMAHON D. J. and BROWN R. J. (1984).** Enzymic coagulation of casein micelles: a review. *J. Dairy Sci.*, 67, 919-929.
- MIETTON B., DESMAZEAUD M., DE ROISSARD H. et WEBER F. (1994).** Transformation du lait en fromage ; in : « Bactéries lactiques II » Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.
- MISTRY V.V. (2006).** Chymosin In Cheese Making ; In Food biochemistry and Food Processing Second Edition Edited by BENJAMIN K. Simpson, Blackwell Publishing. 241-252.
- MIURA H., YAMADA J., KITAMURA N., YAMASHITA T. and ANDRÉN A. (1988).** An immunohistochemical study of prochymosin and pepsinogen-immunoreactive cells in the abomasal mucosa of cattle fetuses. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.*, 102, 101-110.
- MOHANTY A.K., MUKHOPADHYAY U.K., GROVER S. and BATISH V.K. (1999).** Bovine chymosin: production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnol. Adv.* 17 205–217.
- MOHANTY A.K., MUKHOPADHYAY U.K., KAUSHIK J.K., GROVER S. and BATISH V.K. (2003).** Isolation, purification and characterization of chymosin from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). *J. Dairy Res.*, 70, 37–43.
- MØLLER K.K., RATTRAY F.P. and ARDÖ Y. (2012b).** Camel and Bovine Chymosin Hydrolysis of Bovine α S1- and β Caseins Studied by Comparative Peptide Mapping. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 11421–11432
- MØLLER K.K., RATTRAY F.P., SØRENSEN J.C. and ARDÖ Y. (2012a).** Comparison of the Hydrolysis of Bovine κ -Casein by Camel and Bovine Chymosin: A Kinetic and Specificity Study. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 5454–5460
- MONTILLA A., BALCONES E., OLANO A. and CALVO M.M. (1995).** Influence of heat treatments on whey protein denaturation and rennet clotting properties of cow's and goat's milk. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1908–1911.
- MOORE S.A., SIELECKI A.R., CHERNAIA M.M., TARASOVA N.I. and JAMES M.N.G. (1995).** Crystal and molecular structures of human progastricsin at 1.62 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 247, 466-485.
- MORAVEK L. and KOSTKA V. (1974).** Complete amino acid sequence of hog pepsin. *FEBS. Lett.*, 43, 207-211.
- MOSCHOPOULOU E.E., KANDARAKIS I.G., ALICHANIDIS E. and ANIFANTAKIS E.M. (2006).** Purification and characterization of chymosin and pepsin from kid. *J. Dairy Res.*, 73, 49-57.
- MOYNIHAN A.C., GOVINDASAMY-LUCEY S., JAEGGI J.J., JOHNSON M.E., LUCEY J.A. AND MCSWEENEY P.L.H. (2014).** Effect of camel chymosin on the texture, functionality, and sensory properties of low-moisture, part-skim Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.*, 97, 85–96.
- MUNOZ R., GARCIA J.L., CARRASCOSA A.V. and GONZALEZ R. (2004).** Cloning of the authentic bovine gene encoding pepsinogen A and its expression in microbial cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 2588-2595.
- MUTO N. and TANI S. (1979).** Purification and characterization of rat pepsinogens whose contents increase with developmental progress. *J. Biochem.*, 85, 1143- 1149.

- NÁJERA DE RENOBALLES M. and BARRONA L.J.R. (2003).** Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. *Food Chem.*, 80, 345–352.
- NALINANON S., BENJAKUL S., VISESSANGUAN W. and KISHIMURA H. (2007).** Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthustayenus*). *Food Chem.*, 104, 593-601.
- NALINANON S., BENJAKUL S., VISESSANGUAN W. and KISHIMURA H. (2008).** Improvement of gelatin extraction from bigeye snapper skin using pepsin-aided process in combination with protease inhibitor. *Food Hydrocolloid.*, 22, 615-622.
- NALINANON S., BENJAKUL S., VISESSANGUAN W. and KISHIMURA H. (2009).** Partitioning of protease from stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*) by aqueous two-phase systems. *Process Biochem.*, 44, 471-476.
- NARITA Y., ODA S., MORIYAMA A. and KAGEYAMA T. (2002).** Primary structure, unique enzymatic properties, and molecular evolution of pepsinogen B and pepsin B. *Arch. Biochem. Biophys.*, 404, 177-185.
- NEWMAN M., SAFRO M., FRAZAO C., KHAN G., ZDANOV A., TICKLE I.J, BLUNDELL T.L. and ANDREEVA N. (1991).** X-ray analysis of aspartic proteinases IV. Structure and refinement at 2.2 Å resolution of bovine chymosin. *J. Mol. Biol.*, 221, 1295-1309.
- NIELSEN S. and FOLTMANN B. (1993).** Activation of porcine pepsinogen A. The stability of two non-covalent activation intermediates at pH 8.5. *Eur. J. Biochem.*, 217, 137-142.
- NIELSEN P.K. and FOLTMANN B. (1995).** Purification and characterization of porcine pepsinogen B and pepsin B. *Arch. Biochem. Biophys.*, 322, 417-422.
- NOSEDA D.G., RECUPERO M.N., BLASCO M., ORTIZ G.O. and GALVAGNO M.A. (2013).** Cloning, expression and optimized production in a bioreactor of bovine chymosin B in *Pichia* (*Komagataella*) *pastoris* under AOX1 promoter. *Protein Express. Purif.*, 92, 235–244
- NOUANI A., BELHAMICE N., SLAMANI R., BELBRAOUE T., FAZOUANE F. and BELLAL M.M. (2009).** Extracellular protease from *Mucor pusillus*: purification and characterization. *Int. J. Dairy Technol.*, 62, 112–117.
- O’LEARY P.A. and FOX P.F. (1973).** Ovine pepsin suitability as a rennet substitute. *Ir. J. Agric. Res.*, 12, 267-273.
- O’SULLIVAN M. and FOX P.F. (1991).** Evaluation of microbial chymosin from genetically engineered *Kluyveromyces lactis*. *Food Biotechnol.*, 5(1), 19–32.
- OKONIEWSKA M., TANAKA T. and YADA R.Y. (1999).** The role of the flap residue, threonine 77, in the activation and catalytic activity of pepsin A. *Prot. Eng.*, 12(1), 55–61.
- PALMER D.S., CHRISTENSEN A.U., SØRENSEN J., CELIK L., QVIST K.B. and SCHIØTT B. (2010).** Bovine chymosin: a computational study of recognition and binding of bovine κ-casein. *Biochemistry*, 49, 2563–2573.
- PARRIS K.D., HOOVER D.J., DAMON D.B. and DAVIES D.R. (1992).** Synthesis and crystallographic analysis of two rhizopuspepsin inhibitor complexes. *Biochemistry*, 31, 8125–8141.

- PEARL L. and BLUNDELL T.L. (1984).** The active site of aspartic proteinases. *FEBS Letts.*, 174, 96-101.
- PEDERSEN V.B., CHRISTENSEN KA. and FOLTMANN B. (1979).** Investigations on the activation of bovine prochymosin. *Eur. J. Biochem.*, 94, 573-580.
- PETIT H.V., IVAN M. and BRISSON G.J. (1987).** Duodenal flow of digesta in preruminant calves fed clotting or nonclotting milk replacer. *J. Dairy Sci.*, 70, 2570-2576.
- PLOWMAN J.E. and CREAMER L.K. (1995).** Restrained Molecular Dynamics Study of the Interaction between Bovine Kappa-Casein Peptide 98-111 and Bovine Chymosin and Porcine Pepsin. *J. Dairy Res.*, 62, 451-467.
- POWERS J.C., HARLEY A.D. and MYERS D.V. (1977).** Subsite specificity of porcine pepsin. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 95, 141-157.
- POZA M., SIEIRO C., CARREIRA L., BARROS-VELAZQUEZ J. and VILLA T.G. (2003).** Production and characterization of the milk-clotting protease of *Myxococcus xanthus* strain 422. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 691-698.
- PRASAD B.V. and SUGUNA K. (2002).** Role of Water Molecules in the Structure and Function of Aspartic Proteinases. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 58, 250-259.
- PREETHA S. and BOOPATHY R. (1997).** Purification and characterization of a milk clotting protease from *Rhizomucor miehei*. *World J. Microb. Biot.*, 13, 573-578.
- RAJAGOPALAN T. C., MOORE S. AND STEIN W.H. (1966).** Pepsin from pepsinogen: preparation and properties. *J. Biol. Chem.*, 241, 4940-4950.
- RAJI A.R. (2011).** Morphological and histochemical investigation of the camel (*Camelus dromedarius*) abomasal mucous membrane by light and scanning electron microscopy (SEM). *Iran. J. Vet. Res.*, 37, 304-308.
- RAMET J.P. (1985).** Study of Enzymatic Coagulation of Camel Milk in Saudia-Arabia. Mission Report, FAO.
- RAMET J.P. (1987).** La Préparation du Caillé, in : « Le Fromage » ed. Eck, 2ème édition Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.
- RAMET J.P. (1989).** L'aptitude fromagère du lait de dromadaire. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.* 42 (1), 105-111.
- RAMET J.P. (1990).** Processing of Dairy Production from Camel Milk. Mission Report, FAO.
- RAMET J.P. (1993).** La Technologie des Fromages au Lait de Dromadaire (*Camelus dromedarius*). Etude FAO, production et santé animale, 113, Rome.
- RAMET J.P. (2001).** The Technology of Making Cheese from Camel Milk (*Camelus dromedarius*); In FAO Animal Production and Health. No. 113, pp. 74. Rome, Italy: FAO.
- RAMET J. P. (2003).** Aptitude à la conservation et à la transformation fromagère du lait de chamelle. Actes de l'Atelier International sur : "Lait de chamelle pour l'Afrique", 5-8 novembre, Niamey, Niger.
- RAMET J.P. (2006).** Les Agents De La Transformation Du Lait ; in : « Le fromage » éd. Eck et Gillis. Technique et Documentation, 3ème éd., Lavoisier, Paris.

- RAMPILLI M., LARSEN R. and HARBOE M. (2005).** Natural heterogeneity of chymosin and pepsin in extracts of bovine stomachs. *Int. Dairy J.*, 15, 1130-1137.
- RAO M.B., GUPTA R.C. and DASTUR N.N. (1970).** Camel milk and milk products. *Indian J. Dairy Sci.*, 23(2), 71-78.
- RAPOSO S. and DOMINGOS A. (2008).** Purification and characterization milk-clotting aspartic proteinases from *Centaurea calcitrapa* cell suspension cultures. *Process Biochem.*, 43, 139-144.
- RAWLINGS N.D., TOLLE D.P. and BARRET A.J. (2004).** MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acid Res* 32, Database issue, D160-D164. <http://www.merops.sanger.ac.uk>.
- RICHTER C., TANAKA T. and YADA R.Y. (1998).** Mechanism of activation of the gastric aspartic proteinases : pepsinogen, progastricsin and prochymosin. *Biochem. J.*, 335, 481-490.
- ROBINSON R. K. (1998).** Coagulants and Precipitants ; In « Cheesemaking Practice » Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- ROGELI I., PERKO B., FRANCKY A., PENCA V. and PUNGERCAR J. (2001).** Recombinant lamb chymosin as an alternative coagulating enzyme in cheese production. *J. Dairy Sci.*, 84(5), 1020-1026.
- ROSEIRO L.B., BARBOSA M., AMES J.M. and WILBEY R.A. (2003).** Cheesemaking with vegetable coagulants-the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. *Int. J. Dairy Tech.*, 56, 76-85.
- ROTHER G.A.L., AXELSEN N.H., JOHNLE P. and FOLTMANN B. (1976).** Immunochemical, chromatographic, and milk-clotting activity measurements for quantification of milk-clotting enzymes in bovine rennet's. *J. Dairy Res.*, 43, 85-95.
- RYLE A. P. (1965).** Pepsinogen B: the zymogen of pepsin B. *Biochem. J.*, 96, 6-16.
- RYLE A.P. (1970).** The porcine pepsin and pepsinogens. *Methods Enzymol.*, 19, 316-336.
- SAKAKIBARA Y. and YANAGISAWA H. (2007).** Techniques for the separation of proteins by isoelectric point column chromatography. *Nat. Sci.*, 56, 45-49.
- ŠALI A., VEERAPANDIAN B., COOPER J. B., MOSS D. S., HOF-MANN T. and BLUNDELL T. L. (1992).** Domain exibility in aspartic proteinase. *Proteins: Struct., Funct., Genet.*, 12, 158-170.
- SALIMI NAGHANI E. (2011).** Histometric study of the third compartment in one-humped camel (*Camelus dromedarius*) during prenatal development. *Global veterinaria*, 6(3), 329-332.
- SALIMI NAGHANI E., POUSTY I. and ABEDI M. (2010).** Histogenesis of the abomasum in one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *J. Anim. Vet. Adv.*, 9 (7), 1108-1111.
- SCHECHTER I. and BERGER A. (1967).** On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 27, 157-162.
- SCHMIDT D.G. (1982).** Association of Caseins and Casein Micelle Structure ; In Developments of Dairy Chemistry-1. Proteins. Applied Science Publishers, London and New York.

- SELIM H.M., IMAI S., EL-SHEIKH A.K., ATTIA H., OKAMOTO E., MIYAGAWA E. AND MAEDE Y. (1999).** Rumen Ciliate Protozoal Fauna of Native Sheep, Friesian Cattle and Dromedary Camel in Libya. *J. Vet. Med. Sci.*, 61 (3), 303-305.
- SHAMET K.M., BROWN R. J. and Mc MAHON D.J. (1992).** Proteolytic activity of some milk clotting enzymes on caseins. *J. Dairy Sci.*, 75 (6), 1373-1379.
- SHEN H. AND FREY D.D. (2004).** Charge regulation in protein ion-exchange chromatography: development and experimental evaluation of a theory based on hydrogen ion Donnan equilibrium. *J. Chromatogr. A*, 1034, 55-68.
- SIBOUKEUR O., MATI A. et HESSAS B. (2005).** Amélioration de l'aptitude à la coagulation du lait camelin (*Camelus dromedarius*): utilisation d'extraits enzymatiques coagulants gastriques de dromadaires. *Cahiers Agric.*, 5, 473-478.
- SIDIKOU I.D., REMY B., HORNICK J.L., LOSSON B. and DUQUESNOY N. (2005).** Le pepsinogène et la prochymosine des bovins : connaissances actuelles, applications et perspectives dans la stratégie de lutte contre les verminoses gastrointestinales, *Ann. Med. Vet.*, 149 (4), 213-228.
- SIELECKI A.R., FEDOROV A.A., BOODHOO A., ANDREEVA N.S. and JAMES M.N.G. (1990).** The molecular and crystal structures of monoclinic porcine pepsin refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 214, 143-170.
- SIELECKI A.R., FUJINAGA M., READ R.J. and JAMES M.N.G. (1991).** Refined structure of porcine pepsinogen at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 219, 671-692.
- SILVA S.V. and MALCATA X.M. (1999).** On the activity and specificity of cardosin B, a plant proteinase, on ovine caseins. *Food Chem.*, 67, 373-378.
- SIMÕES I. and FARO C. (2004).** Structure and function of plant aspartic proteinases. *Eur. J. Biochem.*, 271, 2067-2075.
- SINGH T.K., YOUNG N.D., DRAKE M. and CADWALLADER K.R. (2005).** Production and sensory characterization of a bitter peptide from β -casein. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1185-1189.
- SMITH J.L., BILLINGS G.E. and YADA R.Y. (1991).** Chemical modification of amino groups in *Mucor miehei* Aspartyl proteinase, porcine pepsin and chymosin. 1. Structure and function. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2009-2016.
- SOGAWA K., FUJII-KURIYAMA Y., MIZUKAMI Y., ICHIHARA Y. and TAKAHASHI K. (1983).** Primary structure of human pepsinogen gene. *J. Biol. Chem.*, 258, 5306-5311.
- SOLORZA F.J. and BELL A.E. (1998).** The effect of calcium addition on the rheological properties of a soft cheese at various stages of manufacture. *Int. J. Dairy Tech.*, 51, 23-29.
- SONG J.H., KIM W., PARK H., YU E. AND LEE D.W. (1999).** Retention characteristics of various proteins in flow field-flow fractionation: effects of pH, ionic strength, and denaturation. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 20(10), 1159-1164.
- SØRENSEN J., PALMER D.S., QVIST K.B. and SCHIØTT B. (2011).** Initial stage of cheese production: A molecular modeling study of bovine and camel chymosin complexed with peptides from the chymosin-sensitive region of κ -casein. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 5636-5647.

- SOUILEM O. and DJEGHAM M. (1994).** La digestion gastrique chez le dromadaire (*Camelus dromedarius*). *Rec. Méd. Vét.*, 172, 199-208.
- SOUILEM O. and BARHOUMI K. (2009).** Physiological particularities of dromedary (*Camelus dromedarius*) and experimental implications. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.*, 36 (1).
- SOUSA M.J., ARDO Y. and MCSWEENEY P.L.H. (2001).** Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy J.*, 11, 327-345.
- SPELZINI D., FARRUGGI B. and PICÓ G. (2005).** Features of the acid protease partition in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol-phosphate: chymosin and pepsin. *J. Chromatogr. B*, 821, 60-66.
- STROP P., SEDLACEK J., STYS J., KADERABKOVA Z., BLAHA, I., PAVLICKOVA L., POHL J., FABRY M., KOSTKA V. and NEWMAN M. (1990).** Engineering Enzyme Subsite Specificity: Preparation, Kinetic Characterization, and X-Ray Analysis at 2.0 Å Resolution of Val111Phe Site-Mutated Calf Chymosin. *Biochemistry*, 29, 9863-9871.
- SUBRAMANIAN S. (1987).** Separation of chymosin and pepsin in calf rennet by dye-ligand chromatography. *Prep. Biochem.*, 17, 297-312.
- SUCHODOLSKI J., STEINER S., RUAUX J.M., BOARI C.G.A. and WILLIAMS, D. A. (2002).** Purification and partial characterization of canine pepsinogen A and B. *Am. J. Vet. Res.*, 63, 1585-1590.
- SUGRUE R., MARSTON F.A.O., LOWE P.A. and FREEDMAN R.B. (1990).** Denaturation studies on natural and recombinant bovine prochymosin (prorennin). *Biochem. Journal*, 271, 541-547.
- SUGUNA K., PADLAN E.A., SMITH K.W., CARLSON W.D. and DAVIES D.R. (1987).** Binding of a reduced peptide inhibitor to the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis*: Implications for a mechanism of action. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 84, 7009-7013.
- SUZUKI J., SASAKI K., SASAO Y., AKIO H., KAWASAKI H., NISHIYAMA M., HORINOUCHE S., and BEPPU T. (1989).** Alteration of catalytic properties of chymosin by site-directed mutagenesis. *Protein Eng.*, 2, 563-569.
- SUZUKI M., NARITA Y., ODA S., MORIYAMA A. and TAKENAKA O. (1999).** Purification and characterization of goat pepsinogens and pepsins. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 122, 453-460.
- SZECSI P.B. (1992).** The aspartic proteases. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 210, 5-22.
- TAM J.R. and WHITAKER J.R. (1972).** Rate and extents of proteolysis of several caseins by pepsin, rennin, *Endothia parasitica* protease and *Mucor pusillus* protease. *J. Dairy Sci.*, 55, 1523-1533.
- TANG J. (1970).** Gastricsin and pepsin. *Methods Enzymol.*, 19, 406-421.
- TANG J. (2010).** Aspartic Proteases: Structure, Function, and Inhibition ; In: Aspartic Acid Proteases as Therapeutic Targets. Ghosh AK (ed). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim, Germany.
- TANG J., WOLF S., CAPUTTO R. and TRUCCO R.E. (1959).** Isolation and crystallization of gastricsin from human gastric juice. *J. Biol. Chem.*, 234, 1174-1178.

- TANG J., SEPULVEDA P., MARCINISZYN J., CHEN K.C.S., HUANG W-Y., TAO N., LIU D. and LANIER J.P. (1973).** Amino-acid sequence of porcine pepsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 70, 3437-3439.
- TANG G., JAMES M.N.G., HSU I.H., JENKINS J.A. and BLUNDEL L. (1978).** Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteinases. *Nature*, 271, 618–621.
- TSUCHIYA K., GOMI K., KITAMOTO K., KUMAGAI C. and TAMURA G. (1993).** Secretion of calf chymosin from the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 327–332.
- TRUJILLO A.J., GUAMIS B., LAENCINA J. and LOPEZ M.B. (2000).** Proteolytic activities of some milk clotting enzymes on ovine casein. *Food Chem.*, 71, 449–457.
- TUBÍO G., NERLI B. and PICÓ G. (2007).** Partitioning features of bovine trypsin and a-chymotrypsin in polyethyleneglycol-sodium citrate aqueous two phase system. *J. Chromatogr. B*, 852, 244-249.
- USTUNOL Z. and ZECKZER T. (1996).** Relative proteolytic action of milk-clotting enzyme preparations on bovine alpha-, beta and kappa-casein. *J. Food Sci.*, 61, 1136–1138.
- VALLEJO J.A., AGEITOS J.M., POZA M. and VILLA T.G. (2008).** Cloning and expression of buffalo active chymosin in *Pichia pastoris*. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 10606–10610.
- VALLEJO J.A., AGEITOS J.M., POZA M. and VILLA T.G. (2012).** A comparative analysis of recombinant chymosins. *J. Dairy Sci.*, 95, 609–613.
- VALLENAS A., CUMMINGS J. F. and MUNNELL J. F. (1971).** A gross study of the compartmentalized stomach of two new world camelids, the lama and guanaco. *J. Morphol.*, 134, 399-424.
- VALLES E. and FURET J.P. (1977).** Etude des caillottes des bovins à l'état ruminant pour l'obtention des extraits coagulants à base de pepsine bovine ; méthodes d'extraction. *Lait*, 61, 601-617.
- VALLES E. et FURET J.P. (1981).** Etude des caillottes des bovins à l'état ruminant pour l'obtention d'extraits coagulants à base de pepsine bovine II. Influence de la race, de l'âge et du sexe sur leur contenu enzymatique. *Lait*, 61, 590-618.
- VAN DEN BERG J.A., VAN DER LAKEN K.J., VAN OUYEN A.J., RENNIERS T.C., RIETVELD K., SCHAAP A., BRAKE A.J., BISHOP R.J., SCHULTZ K. and MOYER D. (1990).** Kluyveromyces as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. *Biotechnology*, 8, 135–139.
- VAN DEN BRINK H.M, PETERSEN S.G, RAHBK-NIELSEN H., KARSTEN H. and HARBOE M. (2006).** Increased production of chymosin by glycosylation. *J. Biotechnol.*, 125, 304–310.
- VAN HOOYDONK A.C.M., BOERRIGTER I.J., and HAGEDOORN A.G. (1986).** pH-induced physico-chemical changes of casein micelles in milk and their effect on renneting. 2. Effect of pH on renneting of milk. *Neth. Milk Dairy J.*, 40, 297–313.
- VANDERPORTEN R. and WECKX M. (1972).** Breakdown of casein by rennet and microbial milk-clotting enzymes. *Neth. Milk Dairy J.*, 26, 47–59.

VEERAPANDIAN B., COOPER J.B., SALI A., BLUNDELL T.L., ROSATI R.L., DOMINY B.W., DAMON D.B. and HOOVER D.J. (1992). Direct observation by X-ray analysis of the tetrahedral 'intermediate' of aspartic proteinases. *Protein Sci.*, 1, 322–328.

VEGA-HERNÁNDEZ M.C., GÓMEZ-COELLO A., VILLAR J. and CLAVERIE-MARTÍN F. (2004). Molecular cloning and expression in yeast of caprine prochymosin. *J. Biotechnol.*, 114, 69-79.

VERÍSSIMO P., FARO C., MOIR A.J., LIN Y., TANG J. and PIRES E. (1996). Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus* L. *Eur. J. Biochem.*, 235, 762–768.

VIAS FRANCK S.G., BONFOH B., GARBA M., ILOU I., KAMIL H. et FAYE B. (2003). Valorisation du lait de chamelle au Sahel : Opération "fromages camelins" dans le Tadsit (Niger) et à Tombouktou (Mali). Actes de l'Atelier International sur : "Lait de chamelle pour l'Afrique", 5-8 novembre, Niamey, Niger.

VISHWANATHA K.S., APPU RAO A.G. and SINGH S.A. (2010). Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85(6), 1849–1859.

VISSER S., VAN ROOYEN P.J., and SLANGEN C. J. (1980). Peptide substrates for chymosin (rennin). Isolation and substrate behaviour of two tryptic fragments of bovine k-casein. *Eur. J. Biochem.*, 108, 415–421.

VISSER S., SLANGEN K.J., HUP G. and STADHOUDERS J. (1983). Bitter flavour in cheese. 2. Model studies on the formation and degradation of bitter peptides by proteolytic enzymes from calf rennet, starter cells and starter cell fractions. *Neth. Milk Dairy J.*, 37, 169-180.

VISSER S., SLANGEN C. J. and VAN ROOIJEN P. J. (1987). Peptide substrates for chymosin (rennin): interaction sites in casein related sequences located outside the (103-108) hexa- peptide region that fits into the enzyme's active site cleft. *Biochem. Journal*, 244, 553-558.

WALSTRA P. and JENNESS R. (1984). Casein Micelles ; In Dairy chemistry and physics pp. 229–253. New York : John.

WANG J.L., LAN J., WANG G.X., LI H.Y. and XIE Z.M. (2000). Anatomical subdivisions of the stomach of the Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *J. Morphol.*, 245(2), 161-167.

WANGO J., FARAH Z. and PUHAN Z. (1993). Extraction of rennet and its comparison with calf rennet extract. *Milchwissenschaft*, 48, 322-325.

WANGO J., FARAH, Z and PUHAN Z. (1998). Composition of milk from three camel (*Camelus dromedarius*) breeds in Kenya during lactation. *Milchwissenschaft*, 53, 136-139.

WILIAMS V. J. (1963). Rumen function in the camel. *Nature*, 197, 1221.

WILSON R.T. (1989). The nutritional requirements of camel. Options Méditerranéennes - Série Séminaires-n°2, 171-179.

WIRTH P.J. and ROMANO A. (1995). Staining methods in gel electrophoresis including the use of multiple detection methods. *J. Chromatogr. A*, 698, 123-143.

WU T., SUN L.C., DU C.H., CAI Q.F., ZHANG Q.B., SU W.J. and CAO M.J. (2009). Identification of pepsinogens and pepsins from the stomach of European eel (*Anguilla Anguilla*). *Food Chem.*, 115, 137-142.

YAGIL R. (1987). Camel milk-A review. *Farm. Animals*, 2(2), 81–99.

YAMASHITA T., HIGASHI S., HIGASHI T., MACHIDA H., IWASAKI S., NISHIYAMA M. and BEPPU T. (1994). Mutation of a fungal aspartic protease, *Mucor pusillus* rennin, to decrease thermostability for use as a milk coagulant. *J. Biotechnol.*, 32, 17–28.

YANG B., WANG X., LUO J., TANG G., LI W. and ZHANG L. (2007). Cloning and Sequence analysis of preprochymosin cDNA of Xinong Saanen milk goat. *Life Sci. J.*, 4, 64–69.

YEGIN S. and DEKKER P. (2013). Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering. *Dairy Sci. & Technol.*, DOI 10.1007/s13594-013-0137-2

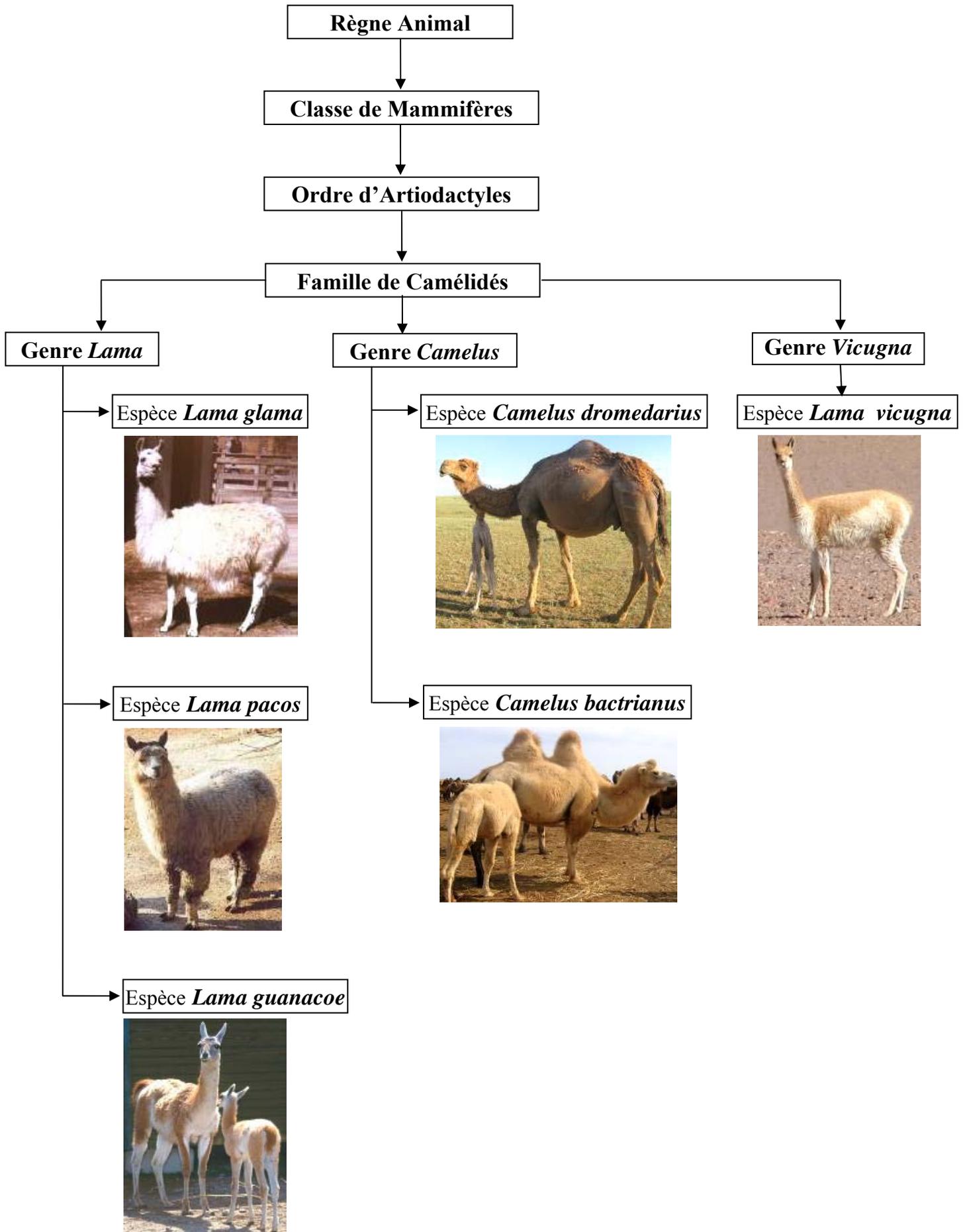
YEGIN S., GOKSUNGUR Y. and FERNANDEZ-LAHOURE M. (2012). Purification, structural characterization, and technological properties of an aspartyl proteinase from submerged cultures of *Mucor mucedo* DSM 809. *Food Chem.*, 133(4), 1312–1319

ZHANG Z. and SMITH D.L. (1993). Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: a new tool for protein structure elucidation. *Protein Sci.*, 2, 522-31.

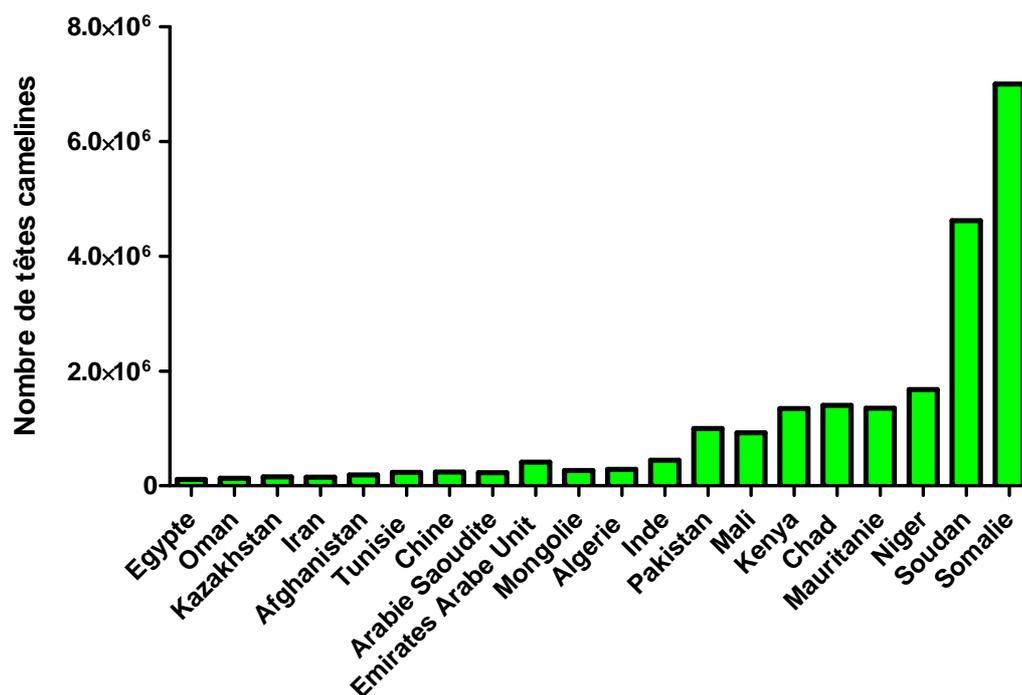


Annexes

Annexe 01 : Systématique des camélidés.



Annexe 02 : Nombre de dromadaire dans les pays ayant plus de 0,1 million de tête camelines (FAO 2010).



Annexe 03 : Les principaux fournisseurs de coagulants microbiens (GERMONVILLE, 2003)

Nom de la préparation	Société productrice	Source
FROMASE TL ou FROMASE XL	DSM Food Specialties	<i>Rhizomucor miehei</i>
SUPAREN		<i>Cryphonectria parasitica</i>
HANNILASE, MODILASE	Christian. Hansen Lab	<i>Rhizomucor miehei</i>
THERMOLASE		<i>Cryphonectria parasitica</i>
MARZYME	Rhodia Food	<i>Rhizomucor miehei</i>

Annexe 04 : Alignement de la séquence primaire de la chymosine bovine (variant B) (FOLTMANN *et al*, 1977) et cameline (KAPPELER *et al*, 2006)

1	MRCLVLLAVFALSQGAETRIPLYK GKSLRKALKEHGLLEDFLQKQQYGISSKYSGE	60	P00794	CHYM_BOVIN
1	MRCLVLLAALALSQASGITRIPLHKGKTLRKALKERGLLEDFLQKQQYAVSSKYSSLGK	60	Q9GK11	Q9GK11_CAMDR
	*****.:***.: *****:***:*****:*****:***.:*****.:**:			
61	VASVPLTNYLDSQYFGKIYLGTPPQEFTVLFITGSSDFWVPSIYCKSNAKKNHQRFDPRK	120	P00794	CHYM_BOVIN
61	VAREPLTSYLDLDSQYFGKIYIGTPPQEFTVVFDTGSSDLWVPSIYCKSNVCKNHHRFDPRK	120	Q9GK11	Q9GK11_CAMDR
	** ***,*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:			
121	SSTFQNLGKPLSIHYGTGSMQGI LGYDVTVTSNIVDIQQTVGLSTQEPGDVFTYAEFDGI	180	P00794	CHYM_BOVIN
121	SSTFRNLGKPLSIHYGTGSMQGI LGYDVTVTSNIVDPNQTVGLSTQEPGEVFTYSEFDGI	180	Q9GK11	Q9GK11_CAMDR
	****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:			
181	LGMAYPSLASEYSIPVFDNMNRLHVAQDLFSVYMDRNGQESMLTLGAIDPSYTGSLHW	240	P00794	CHYM_BOVIN
181	LGLAYPSLASEYSVPVFDNMMDRHLVARDLFSVYMDRNGQESMLTLGAIDPSYTGSLHW	240	Q9GK11	Q9GK11_CAMDR
	:* ***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:			
241	VPVTVQQYQFTVDSVTISGVVVAEGGCQAILDTGTSKLVGPSSDILNIQQAIGATQNQ	300	P00794	CHYM_BOVIN
241	VPVTLQQYQFTVDSVTINGVAVACVGGCQAILDTGTSLVFGPSSDILKIQAIGATENR	300	Q9GK11	Q9GK11_CAMDR
	****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:			
301	YGEFDIDDNLSYMPVTVFEINGKMYPLTSPAYTSQDQGFCTSGFQSENHSQKWILGDVF	360	P00794	CHYM_BOVIN
301	YGEFDVNCGNLRSMPVTVFEINGRDYPLSPAYTSKQDQGFCTSGFQGDNNSELWILGDVF	360	Q9GK11	Q9GK11_CAMDR
	*****:*** ** *****:***:*****:*****:*****:*****:*****:			
361	IREYYSVFDNRANNLVGLAKAI	381	P00794	CHYM_BOVIN
361	IREYYSVFDNRANNRVGLAKAI	381	Q9GK11	Q9GK11_CAMDR
	***** *****			

CHYM_BOVIN: Chymosine bovine (*Bos Taurus*).

Q9GK11_CAMDR: Chymosine cameline (*Camelus dromedarius*).

Les acides aminés colorés en bleu indiquent le peptide signal qui est clivé avant la sécrétion.

Les acides aminés colorés en rouge indiquent le propeptide qui est clivé au moment de l'activation.

Les deux acides aminés catalytiques (Asp34 et Asp216) sont colorés en rouge.

Les cystéines colorées en bleu clair sont liées par un pont disulfure.

Les acides aminés ombrés indiqués par un Astérisx indiquent les régions conservées.

Alanine : A ; Arginine : R ; Asparagine : N ; Aspartate ou acide aspartique : D ; Cystéine : C ; Glutamate ou acide glutamique : E ; Glutamine : Q ; Glycine : G ; Histidine : H ; Isoleucine : I ; Leucine : L ; Lysine : K ; Méthionine : M ; Phénylalanine : F ; Proline : P ; Sérine : S ; Thréonine : T ; Tryptophane : W ; Tyrosine : Y ; Valine : V.

Annexe 05 : Alignement de la séquence primaire de la pepsine porcine (Pepsine A) (MORAVEK et KOSTKA, 1974) et cameline (KAPPELER *et al*, 2006)

1	MKWL LL SLVVLSECLV--KVPLV R RK K SLRQNLIKNGKLDKDFL K THKHNPASKYFPE---A	56	P00791	PEPA_PIG
1	MRWLL L LGLVALSECI T HKVPLV K K K SLRKNL T EQGKLDKDFL K HHHNLASKYFPATSEA	60	Q9GK10	Q9GK10_CAMDR
	*:*****.**.*:*****.*****:*****:* :***** *:* ** *			
57	AAIIGDEPLENYLDTEYFGTIGIGTPAQDFTVIF T IGSSNLWVPSVY C SSLACSDHNQFN	116	P00791	PEPA_PIG
61	ANFLDEQPLENYLDTEYFGTISIGTPAQNFTVIFD T GSSNLWVPSIY C SSSACTNHNRFN	120	Q9GK10	Q9GK10_CAMDR
	* : : :*****.*****:*****:*****:**** * : : : : *			
117	PDDSSTFEATSQELSITYGTGSMIGILGYD T VQVGGISD T NQIFGLSETEPGSFLYYAPF	176	P00791	PEPA_PIG
121	PEESSTYQGTDE T LSITYGTGSMIGILGYD T VQVGGISD V NQIFGLSETEPGSFLYYAPF	180	Q9GK10	Q9GK10_CAMDR
	*:*****.**.*:*****.*****:*****.*****:*****:*****			
177	DGILGLAYPSISASGATPVFDNLWDQGLV S QDLFSVYLSSNDDSGSVLLGGIDSSYYTG	236	P00791	PEPA_PIG
181	DGILGLAYPSISSGGT P VFDNIWDEGLISEDLFSVYLSSNDESGSVVIFGIDSSYYTG	240	Q9GK10	Q9GK10_CAMDR
	*****:*.*****:***:***:*****:*****:*****:*****			
237	SLN W VVPSVEGYWQITLDSITMDGETIACSSG C QAI V DTGTSLLTGPTSAIANIQSDIGA	296	P00791	PEPA_PIG
241	SLN W VVPSVEGYWQITVDSITMEGESIACSSG C QAI V DTGTSLLAGPTDAISNIQSYIGA	300	Q9GK10	Q9GK10_CAMDR
	*****:*****:***:***.*****:*****:***.***:*** **			
297	SENSD G EMVIS C SSIDSLPDI V FTINGVQYPLSPSAYILQDDDS C TSGFEGMDVPTSSGE	356	P00791	PEPA_PIG
301	SEDSY G DMV V SCSSIS S LPNIVFTINGVQYPLSPSAYILEDD S CTSGFEGMDLSS-SEE	359	Q9GK10	Q9GK10_CAMDR
	: *:*:*****.***:*****.*****:*****:*****: : * *			
357	LWILGDV F IRQY T VFDRANNK V GLAPVA--	385	P00791	PEPA_PIG
360	LWILGDV F IRQY T VFDRANNQ V GLAAVAQA	390	Q9GK10	Q9GK10_CAMDR
	*****:*****:*****:*** **			

PEPA_PIG : Pepsine porcine (*Sus scrofa*).

Q9GK10_CAMDR : Pepsine cameline (*Camelus dromedarius*).

Les acides aminés colorés en bleu indiquent le peptide signal qui est clivé avant la sécrétion.

Les acides aminés colorés en rouge indiquent le propeptide qui est clivé au moment de l'activation.

Les deux acides aminés catalytiques (Asp32 et Asp215) sont colorés en rouge.

Les cystéines colorées en bleu clair sont liées par un pont disulfure.

Les acides aminés ombrés indiqués par un Astérisx indiquent les régions conservées.

Annexe 06 : Alignement de la séquence primaire de la CN-κ bovine (variant A) (JOLLÈS *et al*, 1972) et cameline (KAPPELER *et al*, 1998)

1	MK S FFLVV T ILAL T LPFLGA Q EQNQEQPIRCEKDERFFSDKI A KYIPIQYVLSRYPSYG	60	P02668	CASK_BOVIN
1	-MK S FFLVV T ILAL T LPFLGA E VQ N QEQPTCFEKVERLLNEKTVKYFPIQFVQSRYP S YG	59	P79139	CASK_CAMDR
	*****:*****:***** ** *:::* .**:*:*:*****			
61	LNYYQ Q KPVALINN Q FLPY P YAKPA A VRSPAQILQ W QVLSNTVPAKSCQAQPTMARHP	120	P02668	CASK_BOVIN
60	INYYQ H RLAVPIN N QFI P Y P NYAK E VAIRLHAQIPQCQALPNI-----DPPTVERRP	111	P79139	CASK_CAMDR
	:*****:.. *****:*** ***.**:* ** * *.* * :* * : *			
121	HPHLS F MAI P PKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATILED S PEVI-ESPPE	179	P02668	CASK_BOVIN
112	R R PS F IAI P PKKTQDKTVNPAINTVATVEPPVIPTAEPVNTV V IAEASSEFIT T STPE	171	P79139	CASK_CAMDR
	: *:*:*****.*** **:*:*: ** **:* . .**.* * * * * **			
180	INTVQVTSTAV	190	P02668	CASK_BOVIN
172	TTTVQITSTEI	182	P79139	CASK_CAMDR
	.***:*** :			

CASK_BOVIN: CN-κ bovine (*Bos Taurus*).

CASK_CAMDR: CN-κ cameline (*Camelus dromedarius*).

Les acides aminés colorés en bleu indiquent le peptide signal qui est clivé avant la sécrétion.

Les acides aminés colorés en violet indiquent le site de coupure par la chymosine.

Les acides aminés ombrés indiqués par un Astérisx indiquent les régions conservées.

**Annexe 07 : Les acides aminés qui délimitent le site de liaison de la chymosine
cameline et bovine au substrat (JENSEN *et al*, 2013)**

Acides aminés	Bovin	Camelin	Sous sites
32	Leu	Val	S1
112	Asp	Glu	
117	Ala	Ser	S3
187	Val	Leu	
221	Lys	Val	S4
223	Val	Phe	S2 + S4
240	Gln	Glu	
242	Gln	Arg	S9 + S10
249	Asp	Asn	
289	Ser	Gly	
290	Glu	Asp	
292	His	Asn	
294	Gln	Glu	S'1 + S'3
295	Lys	Leu	

Annexe 08 : Caractères comparés des gels lactiques et présures.

CARACTERES	GEL PRESURE	GEL LACTIQUE
Temps de prise	Quelques minutes (10-20)	Plusieurs heures (6-24)
pH	=6,5	=4,5
Degré de minéralisation (Ca lié à la caséine)	+	-
Structure micellaire	Peu modifiée	Détruite
Friabilité	+	-
Perméabilité	-	+
Pouvoir de contraction	+	-
Tension	+	-
Aptitude aux traitements mécaniques	+	-
Aptitude à l'égouttage spontané	-	+
Humidité du caillé égoutté	-	+
Cohésion du caillé égoutté	+	-
	Caractère fort +	Caractère fort +

**Annexe 09 : Détermination de la teneur en protéines par la méthode de LOWRY *et al*
(1951)**

1. Solutions :**Solution alcaline A :**

- Soude 0,1 N.....500 ml
- Carbonate de sodium anhydre (Na₂CO₃).....10 g

Solution cuivrique B :

- CuSO₄, 5 H₂O (0,32 g/100 ml).....2 ml
- Tartrate double de Na et de K (1 g/100 ml).....2 ml

Solution C :

- Solution A.....50 ml
- Solution B.....1 ml

Solution mère de BSA :

- BSA.....10 mg
- Eau distillée (qsp).....100 ml

Gamme étalon :

A partir de la solution mère de BSA, des dilutions sont préparées suivant le tableau ci-dessous :

Concentration en BSA µg/ml	0	10	25	50	75	100
Solution mère de BSA (µl)	0	100	250	500	750	1000
Eau distillée (µl)	1000	900	750	500	250	0

2. Méthode :

- 1 ml d'échantillon contenant 100 µg de protéine maximum et 25 µg minimum ;
- ajouter 5 ml de solution C et mélanger ;
- laisser 10 mn à température ambiante ;
- ajouter 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu ;
- laisser 30 mn à l'obscurité ;
- lire la DO à 750 nm.

3. Expression des résultats :

Une courbe étalon est tracée en portant sur l'axe des abscisses, les concentrations en BSA des dilutions (gamme étalon) préalablement préparées et sur l'axe des ordonnées, les D.O mesurées respectivement pour chaque dilution.

La concentration en protéine inconnue X, est déterminée en portant la valeur de la D.O correspondante sur l'axe des ordonnées qui est ensuite projetée sur l'axe des abscisses.

Annexe 10 : Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-native)

1. Solutions :

Solution d'acrylamide (A)

Acrylamide.....	37,5g
Bis-acrylamide.....	1g
Eau distillée (qsp).....	100ml

Tampon de gel (B)

Tris.....	9.14g
Eau distillé.....	100ml

Ajuster à pH 8.9 avec de HCl 4N

Tampon d'électrode (pour une plaque)

Tris.....	0.12g
Glycine.....	0.58g
Eau distillé.....	200ml

Ajuster à pH 8.3 avec du Tris

Tampon d'échantillon

Tampon du gel (B).....	100µl
Eau distillée	700µl
Glycérol 50%.....	200µl
Bleu de Bromophénol.....	une tête d'aiguille

Dissoudre 2 mg de protéines lyophilisées dans 1 ml de ce tampon

2. Electrophorèse :

Préparation du gel : T = 12 % et C = 2,7 % (pour une plaque)

Solution (A)	3.25 ml
Solution (B)	5 ml
Eau distillée	68 ml

Dégazer le mélange (maximum 2 mn)

TEMED.....	10 µl
Solution de persulfate d'ammonium 10%.....	75 µl

Couler et mettre le peigne immédiatement

Dépôt d'échantillon : 10 à 20 μ l

Mise sous tension : 20 mA, 200 V

Fixation : 45mn dans la solution de fixation.

Coloration : 1 heure dans la solution de coloration.

Décoloration : dans la solution de décoloration.

Annexe 11 : Electrophorèse en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-SDS).

1. Solutions :

Solution d'acrylamide (A) :

Acrylamide.....	37,5 g
Bis-acrylamide.....	1 g
Eau distillée (qsp).....	100 ml

Tampon du gel de séparation (S) :

Tris.....	18,15 g
Eau distillée.....	100 ml
Ajuster à pH 8,8 avec de l'HCl 4 N (6N)	

Tampon du gel de concentration (C) :

Tris.....	6 g
Eau distillée (qsp).....	100ml
Ajuster à pH 6,8 avec de l'HCl 4 N (6N)	

Tampon d'électrode 5X (garder à +4°C) solution mère :

Tris.....	15g
Glycine.....	72g
Eau distillée (qsp).....	1000ml

Ajuster à pH 8,3 avec du Tris si le pH de la solution est \square valeur normal (8,3-8,5)

Tampon d'électrode 1X + SDS (garder à T ambiante) :

Tampon d'électrode 5X.....	200ml
SDS.....	10ml (10%)
Eau distillée (qsp).....	1000ml

Tampon d'échantillon 2X :

Solution (C).....	500 μ l
Eau distillée.....	250 μ l
SDS 10 %.....	200 μ l
2-mercaptoéthanol.....	50 μ l

Dissoudre 1 mg de protéines lyophilisées dans 800 µl de ce tampon
 Chauffage à 95°C pendant 4 à 5 mn puis refroidir dans un bain d'eau froide
 Ajouter 200 µl d'une solution de glycérol 50 % (v/v) et quelques grains de bleu de
 bromophénol

- **Coloration au Bleu de Coomassie R 250 :**

Solution de fixation :

TCA.....12g
 Eau distillée (qsp).....100ml

Solution de coloration :

Bleu de Coomassie R 250.....0,5g
 TCA.....4g
 Méthanol.....100ml
 Eau distillée.....100ml

Solution de décoloration :

Acide acétique.....37,5ml
 Eau distillée.....312,5ml
 Méthanol.....150ml

Solution de persulfate d'ammonium :

Persulfate d'ammonium.....0,1g
 Eau distillée (qsp).....1ml

- **Coloration au nitrate d'argent :**

Solution de fixation : (pendant 1 nuit)

Ethanol 30%.....150ml
 Acide acétique 10%.....50ml
 Eau distillée (qsp).....500ml

Solution de sensibilisation : (pendant 1min)

Thiosulfate de sodium0,02%

Solution de coloration (Bain d'argent) : (pendant 30min)

Nitrate d'argent.....0,1%

Emballez la solution avec du papier d'aluminium et couvrez aussi le bac pendant le bain.

Solution de développement :

Carbonate de Na (Na₂CO₃).....12g
 Thiosulfate de sodium 2%.....40µl
 Formaldéhyde.....200µl
 Eau distillée (qsp).....1000ml

Arrêt du développement : (pendant 5min)

Acide acétique.....1%

2. Electrophorèse :**Préparation du gel de séparation : T = 17 % et C = 2,7 % (pour une plaque)**

Solution (A).....3,23ml

Solution (S).....1,87ml

Eau distillée.....2,27ml

SDS 10 %.....75µl

TEMED.....11µl

Persulfate d'ammonium 10 %.....100µl

Couler à environ 1,5 cm du sommet de la plaque de moindre hauteur

Préparation du gel de concentration : T = 4 % et C = 2,7 % (pour une plaque)

Solution (A).....500µl

Solution (C).....1,25ml

Eau distillée.....3,2ml

SDS à 10%.....50µl

TEMED.....11µl

Persulfate d'ammonium à 10%.....50µl

Couler immédiatement sur le gel de séparation polymérisé et mettre le peigne

Dépôt d'échantillon : 20 µl

Mise sous tension : 20 mA, 200 V

Fixation : 45 minutes dans la solution de fixation (cas de la coloration au Bleu de Coomassie)

Coloration : 1 heure dans la solution de coloration.

Décoloration : dans la solution de décoloration.

Annexe 12 : Préparation des solutions pour chromatographie

- tampon phosphate pH 5,5 :

Solution A : 9,073g (KH_2PO_4) par litre d'eau distillée.

Solution B : 11,87g (Na_2HPO_4) par litre d'eau distillée.

Tampon phosphate : 97,3ml A + (100-97,3)ml B.

- solutions de chlorure de sodium (NaCl) 1M

Tampon NaCl (1M) : 58,44g de NaCl dissous dans 1000ml de tampon phosphate pH 5,5.

Toutes les solutions sont dégazées en utilisant un bain d'eau à ultrasons et une pompe à vide pendant 15min.