

PROTEOLYSE IN VITRO DES CASEINES PAR LA PLASMINE SOUS L'ACTION DU pH ET DU NaCl

A. BERBAR (1), G. HUMBERT (2), G. LINDEN (2), J.Y. LE DEAUT (2)

(1) - Université de Blida, Département des sciences vétérinaires, Route de Soumâa, B.P 270, Blida.

(2) - Université de Nancy I, laboratoire de Biochimie appliquée, 54500 Vandoeuvre. France

RÉSUMÉ

La protéolyse par la protéase alcaline (plasmine) du lait bovin a été étudiée *in vitro* sur les caséines sous l'action du pH et du NaCl. Les profils électrophorétiques ont montré que la plasmine a une très forte affinité pour les caséines β et α_s . La caséine K subit une hydrolyse moins accentuée. Le pH associé au NaCl pour des concentrations allant de 4 à 8% produisent une protéolyse plus poussée pour les caséines β et α_s . Le NaCl rend le complexe productif enzyme-substrat très efficace. Le contrôle de ces deux paramètres évite des pertes en rendement fromager. Cependant, la plasmine ne présente pas que des inconvénients. Elle joue un rôle important dans le goût des fromages. Son activité résiduelle dans les fromages réduit la dureté, l'élasticité et le caractère caoutchouteux de ces fromages et participe ainsi à leur maturation.

Mots Clés : Lait bovin, Protéase alcaline, Plasminogène, Plasmine, Activité enzymatique.

SUMMARY

Cow milk alkaline proteinase has been studied *in vitro* on caseins under pH and Na Cl action. The electrophoresis profiles have shown a very strong affinity of the plasmin on β and α_s caseins, the κ -casein showed a less hydrolysis. The pH associated to Na Cl under concentrations between 4 and 8% produced stronger hydrolysis for β and α_s caseins. The Na Cl makes the enzyme-substrate complex very efficient. Controlling this two parameters avoid a diminution in cheese yield. However, the plasmin hasn't got only disadvantages. It plays an important role in the cheese taste. It's residual activity in the cheese reduce or diminish the hardness, the elasticity and participate in their maturation.

Key Words : Cow milk, Alkaline proteinase, Plasminogen, Ezyme activity.

INTRODUCTION

Pour mieux cerner le comportement de la protéase alcaline (plasmine) en fabrication fromagère, nous avons étudié *in vitro* l'activité de l'enzyme sur les caséines en fonction du pH et du Na Cl. L'évolution de ces deux paramètres se manifeste par une modification du pH et du taux de sel entre la périphérie et l'intérieur de la pâte (DESNOUVEAUX *et al.* (1).

L'activité résiduelle de la plasmine est à l'origine de peptides très courts dits peptides "amers" dans les fromages (LEBARS et GRIPON (2), de caséines γ et de quelques protéoses-peptones dans le lait (GIRARDET et LINDEN (3). Cette activité peut être bénéfique dans les fromages, elle réduit leur dureté et participe à leur maturation (MULVHILL et MC CARTHY (4), elle favorise aussi la croissance des bactéries propioniques (BAER et RYBA (5) à l'origine des "yeux" des emmentals et gruyères elle est influencée par le microenvironnement. L'étude de l'activité de l'enzyme dans un milieu complexe présente des difficultés pour comprendre son mécanisme catalytique. Dans ce travail, nous nous sommes limités à une étude *in vitro* pour tenter de cerner le comportement de la plasmine en technologie laitière. L'activité protéolytique résiduelle due principalement à la plasmine est à l'origine des problèmes affectant la qualité du lait et de ses dérivés comme par exemple le phénomène de gélification ou l'apparition de peptides amers (DULLEY (6) ; FOX, (7) ; REIMREDES, (8).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MATERIEL

Acrylamide et Bis-acrylamide Sodium-Dodécyl-Sulfate, (B.D.M. Chemicals, Poole, U.K). Plasminogène du sérum bovin isolé par chromatographie d'affinité sur Lysine-Sepharose d'après DEUTSCH et MERTZ (9). Urokinase Choay (75000 UI) (Laboratoire Choay, Paris).

Activated Ultrogel ACA 22 (IBF, Paris) Sephadex 025, 0100, DEAE Sephadex (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suède) DEAE-Cellulose DE 52 (Whatman LTI Springfield, G.B). Substrat synthétique (S225) (Serva, Heidelberg, RFA).

METHODES

Préparation de la caséine entière

La caséine entière a été préparée selon la méthode de NITSCMMANN et LEHMANN (10). Le lait bovin et récolté en présence de merthiolat (0,50 ml par litre de lait) pour éviter tout développement bactérien. Le lait est écrémé par centrifugation à 3000 tours pendant 30 mn, puis après thermisation à 30°C, son pH est amené à 4,6 avec de l'acide chlorhydrique concentré sous agitation. La caséine entière est précipitée puis séparée du surnageant par centrifugation à 3000 g pendant 30 min. Le précipité est mis en suspension dans l'eau distillée et redissout par l'ajout de la soude 1N. La caséine est précipitée à pH 4,6 par l'acide chlorhydrique. Cette opération est répétée trois fois. La solution de caséine est dialysée contre l'eau distillée à basse température (4°C) pendant 48 heures, concentrée, lyophilisée puis conservée à 4°C.

Purification du Plasminogène à partir du sang bovin

Le plasminogène du sang bovin est purifié par un procédé simple en une seule étape consistant en une chromatographie d'affinité sur Lysine-Sepharose 4B. La lysine est fixée au support par l'intermédiaire de ses groupes ϵ -aminés, les groupes α -aminés et α -carboxylés restant libres. Le produit à purifier (plasminogène) interagit avec les groupements ϵ -aminés. La Lysine-Sepharose 4B, équilibrée en tampon Tris-HCl 0,05M, azoture de sodium 0,02%, pH 8, est coulée dans une colonne (12 x 2,6 cm). Le sang bovin est centrifugé à 4°C pendant 15 min à 5000 g. Le surnageant (plasma sanguin) est

déposé au sommet de la colonne à raison de 500 ml (le débit est de 75 ml/h). Le premier lavage est effectué avec le tampon de départ, un deuxième lavage avec une solution de NaCl 0,5 M dissout dans le tampon de départ afin d'éliminer les protéines non spécifiquement liées. L'éluion du plasminogène est réalisé spécifiquement avec de l'acide ϵ -amino-caproïque 0,2 M dans du Tris-HCl, azoture de sodium 0,02 %, pH 7,5.

Préparation des constituants de la caséine entière

La caséine entière dissoute dans le tampon imidazole 0,01 M urée pH 7,4 est dialysée à 4°C contre ce tampon. La DEAE- Cellulose équilibrée et la caséine entière (10 g de caséine entière dissoute dans 400 ml de tampon imidazole 0,01 M urée pH 7,4) dialysées sont mélangées et mis sous-agitation douce à 4°C. Le mélange est filtré sur Büchner, à température ambiante. La DEAE-Cellulose sous forme de gel est mélangée à nouveau à un volume de tampon de départ égal au volume du premier filtrat recueilli; cette opération est répétée 2 fois. A partir de ce moment, le fractionnement des différentes caséines est assuré par des tampons de force ionique allant de 0,035 M en NaCl jusqu'à 0,175 M en NaCl. L'analyse électrophorétique a permis de contrôler l'homogénéité des différentes caséines. (Méthode en Batch décrite par WEI, T.M., et WHITNEY, R. MEL. (11).

Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS

Nous avons appliqué la méthode en tampons discontinus de LAEMMLI et FAVRE (12) avec un gel d'acrylamide de séparation (T= 15% ; C=2,6) en tampon Tris-HCl 0,4 mol./l pH 8,8 et un gel de concentration (T= 4,8% ; C= 2,6%) en tampon Tris-HCl 0,125 mol./l pH 6,8. Le tampon d'électrodes est un mélange Tris/Gly/SDS (0,05 mol./l/0,1%, pH 8,3).

La migration est effectuée pendant 2 heures avec un courant de 60 mA et une tension de 500 volts. Les protéines sont fixées par le TCA 12% durant 45 minutes et sont colorées par le bleu de Coomassie R250 pendant une heure. Le gel est ensuite immergé dans une solution décolorante acide acétique/méthanol/eau (0,75/3 /6,25). Des protéines étalons ont été utilisées pour estimer la taille des bandes protéiques.

Activité enzymatique

La plasmine est obtenue après activation du plasminogène bovin par l'urokinase Choay au bain-marie à 37°C pendant 15 min. Le milieu contient du plasminogène (2,4 mg /ml) dans du tetraborate de sodium 0.135M, pH 8,4 et de l'urokinase (100 unités /ml).

Les substrats naturels (caséine entière, [β -CN, α S-CN, κ -CN) ont été incubés à raison de 0,2 % dans du tampon phosphate pH 7,5 en présence de la plasmine (20 μ l) à raison de 2 mg/ml. Le temps d'incubation est 15 minutes au bain marie à 37°C.

Facteurs influençant l'activité de l'enzyme

► Action du pH

Nous avons étudié l'influence du pH en incubant les milieux réactionnels à différents pH (5,5 à 7,5) pendant 15 min à 37°C.

► Action du NaCl

Pour l'étude de l'influence du sel, les caséines sont incubées avec l'enzyme aux pH compris entre 5,5 et 7,5 à 37°C en présence de concentrations croissantes de NaCl (0 à 20%).

► L'activité enzymatique est suivie par le dosage des groupements NH₂ libres par le réactif de CHURCH *et al.*, (13).

► Le dosage des NH₂ libres est effectué selon cet auteur à l'aide de l'acide 2,4,6 trinitro-benzène sulfonique (TNBS) :

200 μ l du milieu réactionnel - 1,7 ml de tampon borate 50 mM-SDS (1 %) chauffé 5 min. dans l'eau bouillante après

refroidissement, on ajoute 0.4 ml de TNBS 1% (m/v) on laisse à l'obscurité et à 25°C pendant 30 min. L'absorbance est mesurée à 346 nm.

Le taux de NH_2 libres est estimé à partir d'une courbe étalon-Leucine.

RÉSULTATS

1. Effet du pH

Nous avons incubé la plasmine en présence de caséines à différents pH. On observe sur la figure 1 que l'activité enzymatique dépend fortement du pH du milieu réactionnel. Dans cette gamme de pH on constate que l'activité est optimale au pH 7,5 sur la caséine entière, α S-CN, β -CN et au pH 7,0 sur la caséine κ -CN. A des valeurs de pH inférieures à 6,0 l'activité de la plasmine sur la caséine κ décroît rapidement, elle devient presque nulle entre pH 5,5 et 6,0.

A des valeurs de pH supérieures à 6,0, l'activité enzymatique croît rapidement. En examinant les substrats protéiques, on remarque que la caséine β -CN est plus rapidement sensible à l'attaque par la plasmine que les caséines κ , α s et la caséine entière.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS et de 2-mercapto-éthanol montre que les produits d'hydrolyse issus de l'action de la plasmine sur les différents substrats naturels ont des compositions différentes selon le pH du milieu réactionnel.

Hydrolyse de la caséine entière

L'hydrolysate contient des polypeptides de poids moléculaires compris entre 12000 daltons dans la zone de pH 5,5 à 7,5 (Figure 2). Au pH de 5,5 l'intensité des bandes de caséines α s et β diminue et de nombreux peptides sont visibles. A pH 6,5, la bande correspondant à la caséine β n'existe plus. On observe qu'à pH 7,5, la caséine α s disparaît par contre la caséine κ est très peu

hydrolysée. On remarque la présence de quatre bandes de forte intensité dont les poids moléculaires sont entre 12000 et 22000 daltons lors de l'hydrolyse de la caséine entière à pH 7,5.

Hydrolyse de la caséine β

L'hydrolysate de la caséine β en relation avec le pH libère trois bandes protéiques ayant des masses moléculaires comprises entre 12000 et 23000 daltons (Figure 3). Les profils électrophorétiques dans la zone de pH 5,5 à 7,5 sont sensiblement les mêmes sauf pour la bande protéique β qui disparaît avec l'augmentation du pH. Par ailleurs, il faut noter la présence d'une bande de 12000 daltons dont l'intensité croît avec le pH. Les produits de dégradation de poids moléculaires environ 23000 et 12000 daltons correspondent aux fragments de la caséine β .

Hydrolyse de la caséine α s

La figure 4 montre que lorsque la caséine α s est incubée en présence de plasmine à différents pH, elle disparaît fortement au profit de la formation de bandes protéiques de masses moléculaires inférieures à 12000 daltons. On observe qu'au cours de l'augmentation du pH, les bandes protéiques de poids moléculaires compris entre 21000 et 18000 daltons sont hydrolysées et libèrent des peptides de taille inférieure à 12000 daltons.

Hydrolyse de la caséine κ

La caséine κ libère sous l'action de la plasmine quelques produits de dégradation (Figure 5). Au pH 5,5 et 6,5 l'analyse des hydrolysats montre des profils électrophorétiques identiques. On observe dans cette zone de pH une bande de masse moléculaire voisine de 20000 daltons qui devient importante au pH 7,5. A ce pH, on constate la présence d'autres bandes protéiques au nombre de 8 de poids moléculaires inférieurs à 14000 daltons.

2. Effet de NaCl

L'activité protéolytique de la plasmine est étudiée en fonction de la concentration en chlorure de sodium aux trois pH étudiés (Figure 6).

Les résultats obtenus indiquent notamment que le pH du milieu réactionnel n'influe pas ou très peu. Entre 0 et 8% de NaCl, il y a toujours gain d'activité pour la caséine entière, α s et β , au-delà l'activité diminue. Celle-ci est marquée avec la caséine β . En ce qui concerne, la caséine κ il y a perte d'activité quelque soit le pH et la concentration en chlorure de sodium. Aux concentrations supérieures à 8%, le chlorure de sodium diminue fortement l'activité de l'enzyme. Cette diminution provient sans doute de l'effet du changement de la force ionique du milieu réactionnel.

L'analyse en électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol montre que les hydrolysats obtenus sont liés à l'action conjuguée du pH et du NaCl.

Hydrolyse de la caséine entière

La figure 7 montre les profils électrophorétiques des hydrolysats de la caséine entière obtenus sous l'action simultanée du pH et du chlorure de sodium. L'analyse des hydrolysats en présence de NaCl (0 à 8%) révèle des diagrammes électrophorétiques sensiblement les mêmes sauf qu'à pH 6,5 en milieu salin une bande polypeptidique supplémentaire de 7000 daltons apparaît. Les principales bandes protéiques sont au nombre de quatre de poids moléculaires compris entre 23000 et 12000 daltons.

Hydrolyse de la caséine β

La figure 8 montre les profils électrophorétiques des hydrolysats de la caséine β obtenus sous l'action simultanée du pH et du chlorure de sodium. Les images électrophorétiques des hydrolysats montre que la vitesse de disparition de la caséine β semble plus rapide quelque soit le pH et la concentration saline. Les polypeptides apparus à pH 5,5 en milieu salin pour un taux en NaCl de 8% forment deux bandes protéiques de forte intensité ayant des masses moléculaires de 17000 et 12000 daltons. A pH

6,5 et 7,5 en présence de sel, on observe des diagrammes électrophorétiques identiques avec deux bandes très intenses, de poids moléculaires 14000 et 7000 daltons.

Hydrolyse de la caséine α s

La figure 9 montre les profils électrophorétiques des hydrolysats de α s obtenus sous l'action simultanée du pH et du chlorure de sodium. La présence de sel dans le milieu réactionnel induit une hausse d'activité de la plasmine qui se traduit par la disparition rapide de la caséine α s.

A pH 5,5 et 6,5 pour des concentrations en sel allant de 0 à 8% ; les peptides libérés ont des masses moléculaires inférieures à 21000 daltons. On remarque que les polypeptides de poids moléculaires compris entre 21000 et 14000 daltons sont hydrolysés à leur tour, pour donner des peptides de taille réduite se situant en dessous de 12000 daltons.

A pH 7,5 en milieu salin, les images électrophorétiques sont les mêmes car les polypeptides apparus ont des masses moléculaires régulièrement réparties en dessous de 14000 daltons ; mais l'activité est plus rapidement marquée pour des concentrations en NaCl plus faibles dans une zone de pH proche du pH optimal.

Hydrolyse de la caséine κ

La figure 10 montre les profils électrophorétiques des hydrolysats de la caséine κ obtenus sous l'action simultanée du pH et du chlorure de sodium. On observe qu'en présence de 8% en NaCl à pH 5,5 et pH 6,5, la caséine κ résiste à l'hydrolyse en libérant une bande protéique de masse moléculaire d'environ 22000 daltons. A pH 5,5 et pH 7,5 et pour des taux en NaCl compris entre 0 et 4%, la caséine κ produit quelques bandes protéiques. On relève la présence de deux bandes protéiques plus ou moins intenses de poids moléculaires compris entre 22000 et 20000 daltons. Des bandes protéiques de faible

intensité et de masses moléculaires inférieures à 12000 apparaissent.

DISCUSSION

Dans le lait et ses dérivés, l'action des protéases affecte sévèrement leurs qualités nutritionnelles et organoleptiques (MANJI *et al.*, (14), GIRARDET et LINDEN (3). Dans le lait de très bonne qualité microbiologique, le système protéasique majeur est le système plasminogène - plasmine (KAMINOGAWA *et al.*, (15) ; EIGEL *et al.*, (16) ; RICHARDSON et PEARCE, (17) ; ROLLEMA *et al.*, (18) ; KORYCKA-DAHL *et al.*, (19) ; SCHAAR, (20)). La dégradation des protéines majeures du lait de grand mélange serait, pour l'essentiel, liée à l'activité de la plasmine (SNOEREN *et al.*, (21) ; KONING de and KAPER ; (22).

Nous avons étudié l'activité de l'enzyme sur les caséines sous l'influence du pH. Dans la zone de pH étudiée (5,5 à 7,5) et si on prend comme référence le pH du lait (pH 6,6), deux phénomènes s'observent :

1) Aux pH inférieurs à 6,5 la caséine κ est moins susceptible à une protéolyse que les autres caséines. Il ne s'agit pas d'une dénaturation de l'enzyme car en présence des autres caséines l'activité n'est pas nulle dans cette zone de pH. L'accessibilité de l'enzyme à son substrat est liée au pH du milieu réactionnel.

2) Aux pH supérieurs à 6,5, l'activité de la plasmine sur les caséines augmente de façon régulière. La caséine κ n'offre plus de résistance à l'action de la plasmine (28). Selon NOOMEN (23), l'activité de la protéase alcaline croît dans les fromages à partir du pH 5 et surtout au-delà de 6. En présence d'un substrat synthétique (S2251) spécifique à la plasmine, HUMBERT et LINDEN (24) ont montré qu'entre pH 5,5 et 7,5 l'activité enzymatique croît avec l'augmentation du pH.

EIGEL (25 ; 26) en étudiant la spécificité de protéolyse par la plasmine a trouvé des résultats similaires. La caséine est plus rapidement hydrolysée que la caséine $\alpha 1$, la caséine κ est relativement résistante à l'hydrolyse par l'enzyme. Ceci a été également confirmé par SNOEREN *et al.*, (21) ANDREWS et ALICHANIDIS, (27) : ANDREWS, (28) ; GRIEVE et KITCHEN\ (29) qui ont rapporté l'ordre de spécificité de l'enzyme vis-à-vis des caséines comme, étant β -CN > α 1-CN > κ -CN.

SNOEREN et VAN RIEL (30) ont montré de leur côté que la caséine $\alpha 2$ et la caséine β en solution dans un tampon Tris-HCl à pH 7,8 sont hydrolysées de la même façon. En présence de concentrations élevées en sel l'inhibition de la plasmine est plus importante aux pH 5,5 à 7,5. L'inhibition de l'activité protéolytique par le NaCl aux fortes concentrations entraîne un repliement des protéines sur elles-mêmes de la même façon que la température qui provoque le phénomène d'aggrégation de ces protéines FOX, (31).

Les forces d'attraction entre l'enzyme et le substrat aux taux élevés en NaCl sont ainsi réduites. GRUFFERTY (32) montrait que l'ajout de NaCl à une concentration de 6% entraîne une dissociation complète de l'enzyme de son substrat. Par contre, pour un taux de NaCl de 4 % on note l'effet activateur de la réaction enzymatique sur la caséine entière, α s et β .

Dans une étude sur la protéolyse de la caseine bovine en milieu salin, SANOGO *et al.*, (33) ont montré que des protéases telles que la papaïne, la neutrase et l'alcalase ont des activités résiduelles qui demeurent importantes en présence de 10% de NaCl à pH 6.5. L'influence du pH et du NaCl sur l'activité peut intervenir à la fois sur les changements de conformation du substrat et sur le site catalytique de l'enzyme. EL-ABBASSY (34) rapportait que l'activité de la pepsine sur la caseine entière en milieu salin diminuait avec l'augmentation de la concentration

en NaCl ; par contre, la protéase d'*Endolhia parasitica* reste insensible au sel vers 2% à 8% à pH 6,5.

L'effet activateur du NaCl a été observé par d'autres auteurs. Selon NORBERG et HOFSTEN (35) ainsi que JAENICKE (36), les protéases de microorganismes halophiles ne s'activent qu'à de très fortes concentrations en sel (au-delà de 20%). Pour la protéase neutre de *Bacillus subtilis*, EL-MAYDA (37) constatait que 4% de NaCl suffisaient pour atteindre une activité optimale. HUMBERT et LINDEN (24) observaient que l'influence du chlorure de sodium sur la réaction enzymatique dépend du pH du milieu réactionnel et il faut remarquer que l'effet activateur du NaCl disparaît à pH 5,5 et son effet inhibiteur devient important à pH 6,5 en présence de caséine entière.

Le comportement de la plasmine serait différent vis-à-vis des substrats de synthèse. L'enzyme à encore à pH 5,5 et 7,5, 110% d'activité sur le S2251 en solution de 20 % en NaCl.

Le comportement de la même enzyme dans le lait ou dans un fromage pourrait être tout à fait différent puisque NOOMEN (23) en réalisant des expériences sur des "fromages modèles" a montré que l'activité de la protéase native (plasmine) est fortement influencée par le pH et la concentration en NaCl. Les caséines β et α s sont hydrolysées aux faibles concentrations en sel (2 à 3%).

L'analyse électrophorétique en milieu dissociant des hydrolysats de caséines montre que déjà à pH 5,5 la plasmine produit des bandes protéiques de tailles comprises entre 13000 et 20000 daltons. Au cours de l'évolution du pH dans la zone 5,5 à 7,5, les caséines α s et β disparaissent totalement et la caseine κ subit une hydrolyse partielle. Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres auteurs dans des conditions optimales d'hydrolyse (RICHARDSON (38) ; GRIEVE et KITCHEN, (28).

Les hydrolysats produits par la plasmine à partir des protéines natives en milieu salin en fonction du pH et analysés en électrophorèse-SDS montre l'effet activateur du NaCl pour des concentrations se situant entre 0 et 8%. Il apparaît clairement du fait des modifications des profils électrophorétiques que le chlorure de sodium favorise les interactions entre l'enzyme et le substrat. Quelque soit le pH du milieu et pour une concentration en NaCl de 8%, les diagrammes électrophorétiques des hydrolysats de la caseine β et α s montrent que l'enzyme en plus d'une forte activité sur ces caséines, hydrolyserait aussi les produits de la réaction. L'action de l'enzyme sur la caseine κ produit les mêmes types de polypeptides.

MULVIHILL et FOX (39) ; GODINHO et FOX (40) ont montré que l'hydrolyse de la caseine β et α s par la chymosine en présence de sel libère des produits qui sont différents de ceux obtenus en absence de sel.

CONCLUSION

L'étude *in vitro* que nous venons de réaliser a porté sur le comportement de la protéase alcaline bovine (plasmine) dans certaines conditions de pH et de concentration saline. Par le dosage de l'activité enzymatique combiné à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide et en milieu dissociant, nous avons montré le caractère halophile de cette enzyme. Tous ces résultats indiquent que nous avons confirmé *in vitro* des observations faites par d'autres auteurs *in situ* dans le lait. Ainsi, il est évident que la plasmine peut avoir un rôle dans l'affinage des fromages à pâtes molles. En effet, le pH augmente à la fin de l'affinage sous l'action des enzymes, en particulier des protéases.

Le type de fromage influera sur l'activité de la plasmine. L'action de cette enzyme est bénéfique dans le fromage du type gouda, elle accélère l'affinage (SCHERZ *et al.*, (1994).

La protéolyse endogène due principalement à la plasmine peut influencer négativement sur la fabrication fromagère.

La dégradation de l'état sanitaire de la mamelle est le facteur principal de cette protéolyse. La mesure d'indicateurs (teneur en chlorures, pH, dénombrement cellulaire), dès la traite, pourrait permettre d'éviter cette protéolyse.

Il faut instaurer des outils de mesure de la protéolyse endogène pour permettre un tri du lait à la ferme, un tri du lait avant transformation mais aussi des circuits de collecte adaptés.

L'objectif étant de fournir un lait de très bonne qualité conforme aux besoins de l'industrie laitière.

Références bibliographiques

- 1) DESNOUVEAUX R., LINDEN G., DRIOU, A. (1985). In. "Les enzymes non coagulantes dans la filière lait : propriétés, utilisations industrielles et développements futurs" Actualités scientifiques et techniques en industrie agro-alimentaires, 37, CDIUPA, cd. APRIA, Paris.
- 2) LEBARS D., GRIPON J.C. (1989). Hydrolysis of bovine α s-casein by plasmin. *J. Dairy Res.*, 56, 551.
- 3) GIRARDET J.M., LINDEN G. (1996). PP3 component of bovine milk: a phosphorylated whey glycoprotein (review article). *J. Dairy Res.*, 63, 333.
- 4) MULVIHILL D.M., MC CARTY A. (1994). Proteolytic and rheological changes during ageing of cheese analogues made from rennet caseins. *Int. Dairy J.*, 4, 15.
- 5) BAER A., RYBA I. (1996). Influence of coagulating enzymes and plasmin on the growth of starter bacteria at the very beginning of emmental cheese manufacture. IDF Symposium, Ripening and quality of cheeses. Besançon, 26-28 février 1996.
- 6) DULLEY J.R. (1972). Bovine milk protease. *J. Dairy Res.*, 39, 1.
- 7) FOX P.F. (1981). Proteinases in Dairy Technology. *Neth. Milk Dairy J.* 35, 233.
- 8) REIMERDES E.H. (1983). New aspects of naturally occurring protease in bovine milk. *J. Dairy Sci.*, 66, 1591.
- 9) DEUTSCH D.G., MERTZ E.T. (1970). Plasminogen : purification from human plasma by affinity chromatography. *Science*, 170 1095.
- 10) NITSCHMANN U.S., LEHMANN W. (1947). Zur Problem der Labwirkung auf Casein. *Helv. Chim. Acta*, 30, 804.
- 11) WEI T.M., WHITNEY M., MEL. (1985). Batch fractionation of bovine caseins with Diethyl-Amino-Ethyl-Cellulose. *J. Dairy Sci.*, 68, 1630.
- 12) LAEMMLI W.K., FAVRE M. (1973). Maturation of the head of bacteriophage T4. I : DNA packaging events. *J. Mol.*, 80, 575.
- 13) CHURCH F.C., PORTER D. II. ; CATAGNANI G.L., SWAIGOOD II.E. (1985). An O-phtaldhydespectrophotometric assay for proteinases. *Anal. Biochem.*, 146, 343.
- MANJI B., KAKUDA Y. (1988). The role of protein denaturation extent of proteolysis and storage temperature on the mechanism of age gelation in a model system. *J. Dairy Sci.*, 1, 1455.
- 14) MANJI B., KAKUDA Y., ARNOTT D.R. (1986). Effect of storage temperature on age gelation of ultra-high-temperature milk processed by direct and indirect heating systems. *J. Dairy Sci.*, 69, 2994.

- 15) KAMINOGAWA S., MIZOBUCMI II. and YAMAUCHI K. (1972). Comparison of bovine milk protease with plasmin. *Agric. Biol. Chcm.*, 36, 2163.
- 16) EIGEL W.N., HOFMANN C.J., CLUBBER B.A.K., TOMICH J.M./KEENAN T.W., MERTZ E.T. (1979). Plasmin-mediated proteolysis of casein in bovine milk. *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 76, 2244.
- 17) RICHARDSON B.C., PEARCE K.N. (1982). The determination of plasmin in Dairy products. 21^{er} Congr. Intern. Laiterie, Moscou, vol. 1., livre 2, 243.
- 18) ROLLEMA S., VISSER S., POLL J.K. (1983). Spectrophotometric assay of plasmin and plasminogen in bovine milk. *Milchwissenschaftl.* 38, 214.
- 19) KORYCKA-DAHL M., RIBADEAU-DUMAS B., CHENE N., MARTAL J. (1983). Plasmin activity in milk. *J. Dairy Sci.*, 66, 704.
- 20) SCHAAR J. (1985). Plasmin activity and proteose-peptone content of individual milk. *J. Dairy Res.*, 52, 369.
- 21) SNOEREN T.H.M., VAN DER SPECK C.A., DEKKER R., BOTH P. (1979). Proteolysis during the storage of U.H.T-sterilized whole milk. 1. Experiments with milk heated by the indirect system for 4 seconds at 142°C. *Neth. Milk Dairy J.*, 33, 31.
- 22) KONING P.J., KAPER J. (1985). Effects on some proteinase inhibitors and the Maillard Reaction on the process of age-thinning and gelation of UHT-sterilized concentrated casein micells dispersion. *Neth. Milk Dairy J.*, 71, 1728.
- 23) NOOMEN A. (1978 a). Activity of proteolytic enzymes in simulated soft cheeses (Meshanger type). 1. Activity of milk protease. *Neth. Milk Dairy J.*, 32, 26.
- 24) HUMBERT G., LINDEN G. (1987). Influence de traitements et conditions technologiques sur le comportement de la plasmine et du plasminogène (protéase alcaline du lait). *Sci. Aliments*, 7, (H.S.VIII), 213.
- 25) EIGEL W.N. (1977a). Effect of bovine plasmin on α s1- β and κ -caseins. *J. Dairy Sci.*, 60, 1399.
- 26) EIGEL W.N. (1977b). Formation of γ 1- γ 2, γ 2- γ 2 and γ 3-A2 caseins by *in vitro* proteolysis of β -casein A2 with bovine plasmin. *Int. J. Biochem.*, 8, 187.
- 27) ANDREWS A.T., ALICHANIDIS E. (1983). Proteolysis of caseins and the proteose-peptone fraction of bovine milk. *J. Dairy Res.*, 50, 275.
- 28) ANDREWS A.T. (1983a). Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *J. Dairy Res.*, 50, 45.
- 29) GRIEVE P.A., KITCHEN B.J. (1985). Proteolysis in milk : the significance of proteinases originating from milk leucocytes and a comparison of the action of leucocyte, bacterial and natural milk proteinases on casein. *J. Dairy Res.*, 52, 101.
- 30) SNOEREN T.H.M., RIEE J.A.M. VAN (1979). Milk proteinase, its isolation and action on α s2 and (3-cascin. *Milchwissenschaftl.* 72, 528.
- CHEN J.If., LEDFORD R.A. (1971). Purification and characterization of milk protease. *J. Dairy Sci.*, 54, 763.

31) FOX P.F. (1969). Influence of temperature and pH on the proteolytic activity of rennet extract. *J. Dairy Sci.*, 52, 1214.

32) GRUFFERTY M.B. (1986). Alcaline Milk proteinase : some of its characteristics and its influence and that of milk salts, on some processing properties of milk. Thesis for the degree of doctor of Philosophy, These Ph. D., CORK (Irlande).

33) SANOGO T.T., PAQUET D., LINDEN G. (1987). Proteolyse de la caséine bovine en milieu salin : étude de quatre protéases. *Sci. Aliments*, 7, 385.

34) EL-ABBASSY F. (1988). Influence of pH, temperature and sodium chloride concentration on the proteolysis of goat's casein by chymosin, pepsin and *Endothia parasitica* protease. *Egyptian J. Dairy Sci.*, 16, 23.

35) NORBERG P., HOFSTEN B.V. (1969). Proteolytic enzymes from extremely halophilic bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 55, 251.

36) JAENICKE R. (1981). enzymes under extremes of physical conditions. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 10, 1.

37) EL-MAYDA E., PAQUET D., RAMET J.J. (1985). Enzymatic proteolysis in a salt environment with a *Bacillus subtilis* neutral protease preparation. *J. Food Sci.*, 50, 1745.

38) RICHARDSON B.C. (1983). The proteinase of bovine milk and the effect of pasteurization on their activity. *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.*, J. 8, 233.

39) MULVIHILL D.M., FOX P.F. (1979). Proteolytic specificity of chymosin on α s and β caseins. *Irish J. Food Sci., Technol.*, 3, 73.

40) GODHINO M., FOX P.F. (1982). Ripening of blue cheese. Influence of salting rate on proteolysis. *Milchwissenschaft*, 37, 72.

41) SCHERZE, I., SIENKIEWICZ, T., KRENKEE, K. (1994). Untersuchung zum proteolytischen Abbau der casein. 2. Einfluß von Plasmin auf die Proteolyse in Gouda kase. *Milchwiss.*, 49, 564.

Annexes

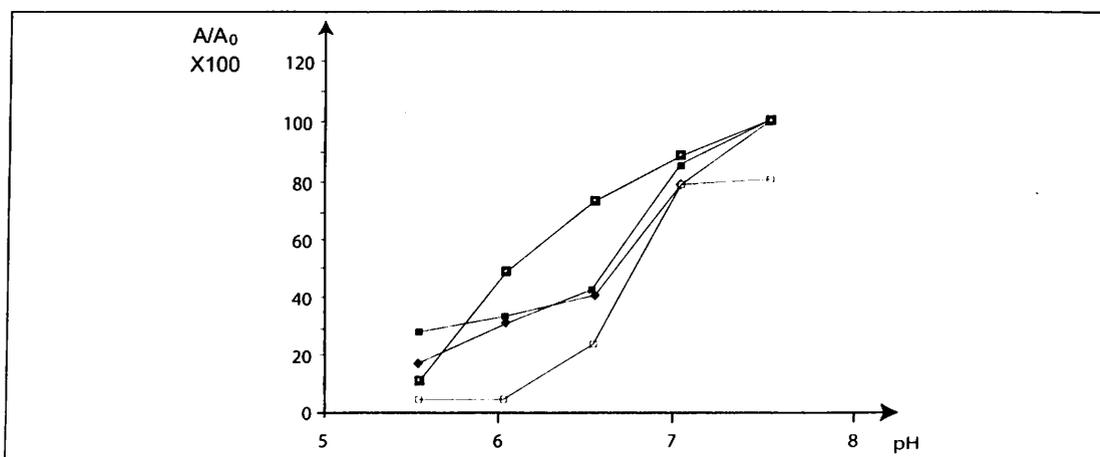


Figure 1 : Influence du pH sur l'hydrolyse des différentes caséines par la plasmine à une température de 37°C. temps d'incubation = 15 min.

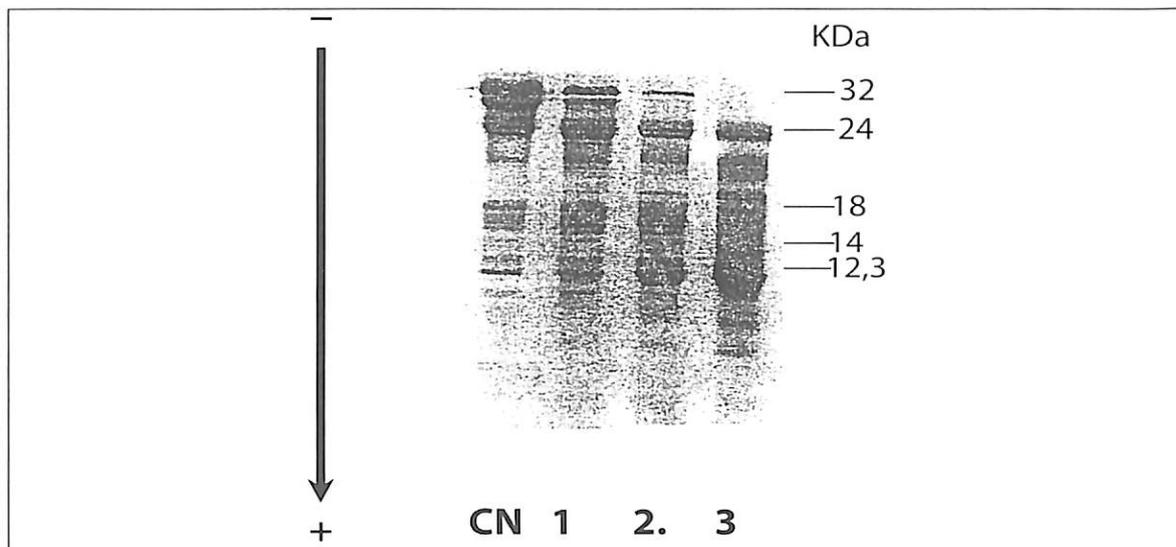


Figure 2 : Effet du pH sur l'hydrolyse de la caséine entière par la plasmine. Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS et en présence de 2-mercaptoethanol. CN : caséine entière ; 1 : caséine entière hydrolysée à pH 5,5 ; 2 : caséine entière hydrolysée à pH 6,5 ; 3 : caséine entière hydrolysée à pH 7,5.

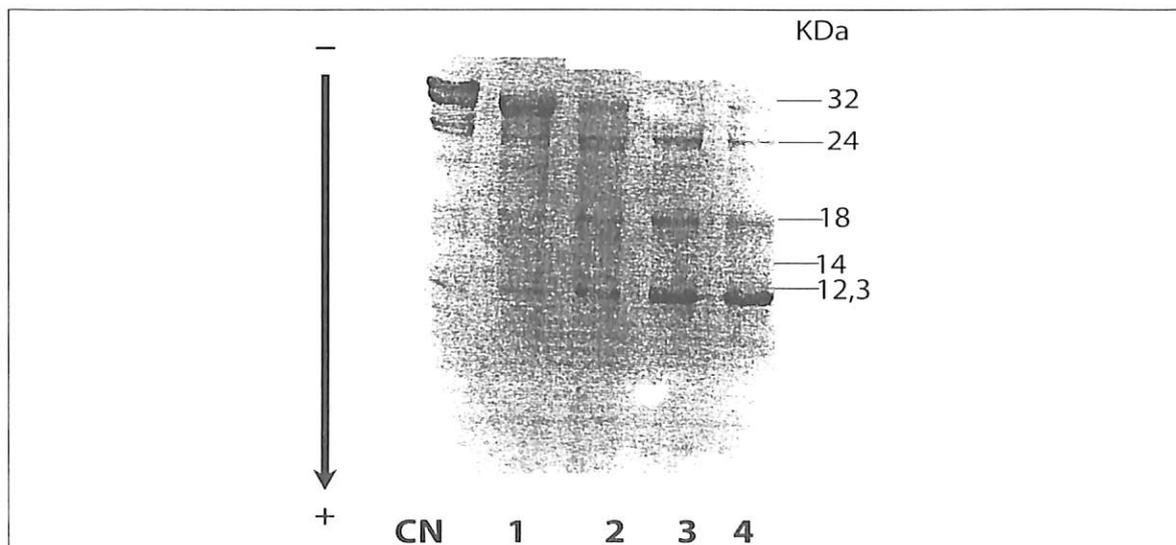


Figure 3 : Effet du pH sur l'hydrolyse de la caséine β par la plasmine. Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS et en présence de 2-mercaptoethanol. CN : caséine entière ; 1 : caséine β ; 2 : (β -CN hydrolysée à pH 5,5 ; 3 : β -CN hydrolysée a pH 6,5 ; 4 : (β -CN hydrolyses a pH 7,5.

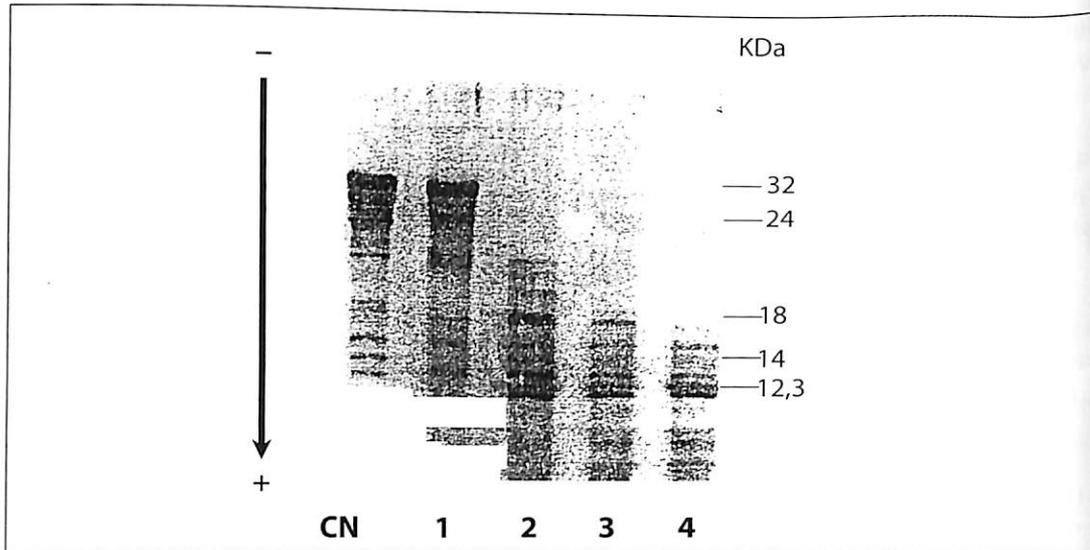


Figure 4 : Effet du pH sur l'hydrolyse de la caséine α_s par la plasmine. Electrophorèse en gel de polyacrylamide -SDS et en présence de 2-mercaptoethanol. CN : caséine entière ; 1 : caséine α_s ; 2 : α_s -CN hydrolysée à pH 5,5 ; 3 : α_s -pH 6,5 ; 4 : α_s -CN hydrolysée à pH 7,5.

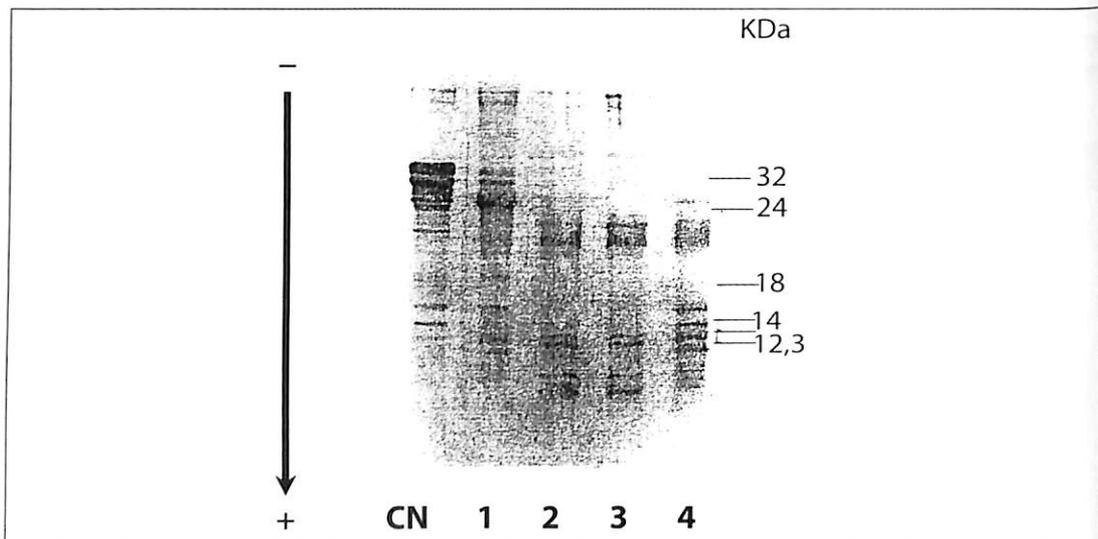


Figure 5 : Effet du pH sur l'hydrolyse de la caséine κ par la plasmine. Electrophorèse en gel de polyacrylamide -SDS et en présence de 2-mercaptoethanol. CN : caséine entière ; 1 : caséine κ ; 2 : caséine κ hydrolysée à pH 5,5 ; 3 : κ -CN hydrolysée à pH 6,5 ; 4 : κ -CN hydrolysée à pH 7,5.

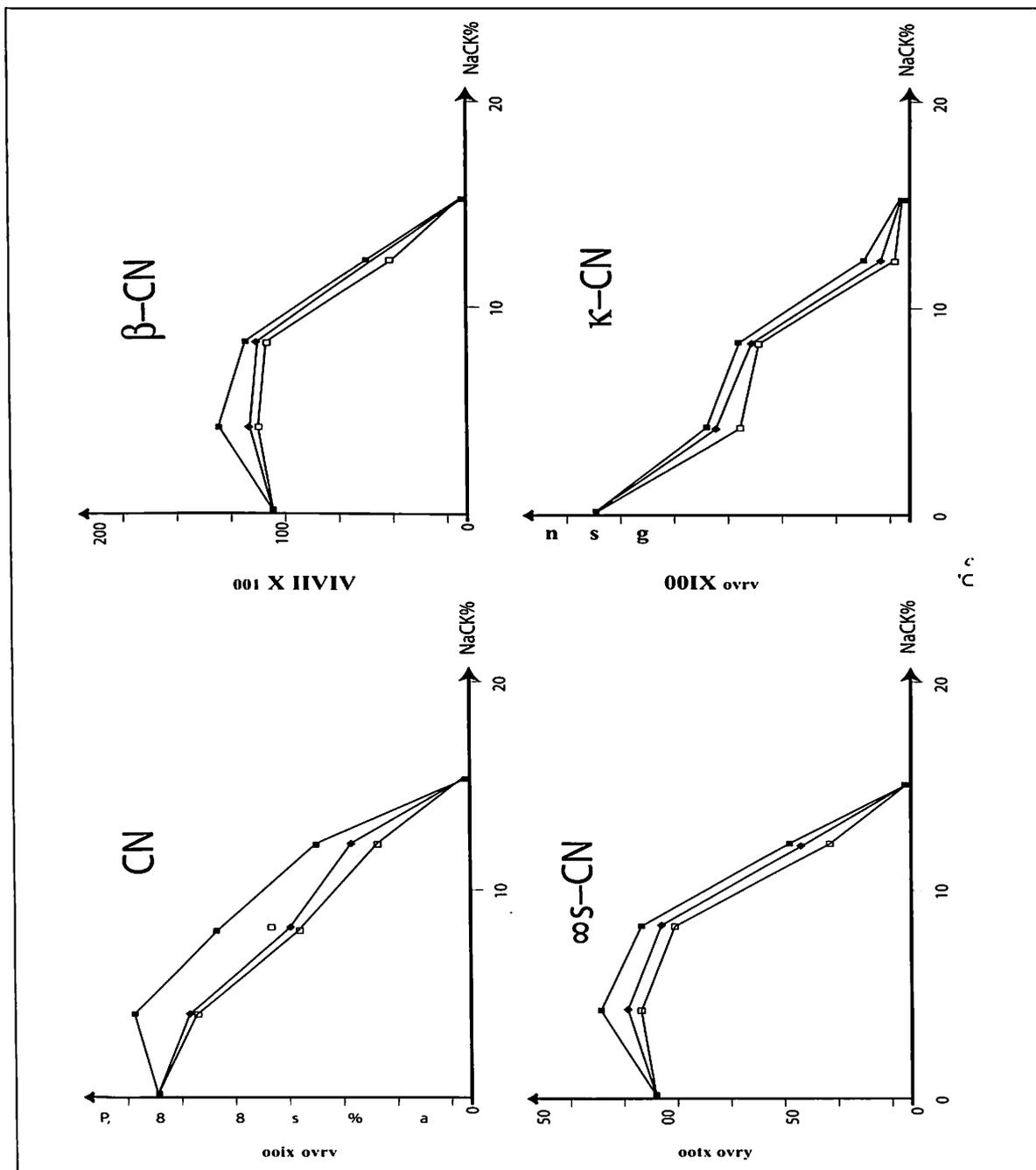


Figure 6 : Influence du chlorure de sodium sur l'hydrolyse des diverses caséines par la plasmine à pH 5,5 (□---□) ; pH 6,5 (○---○) et pH 7,5 (△---△).
 A x 100 / Ao = activité résiduelle.

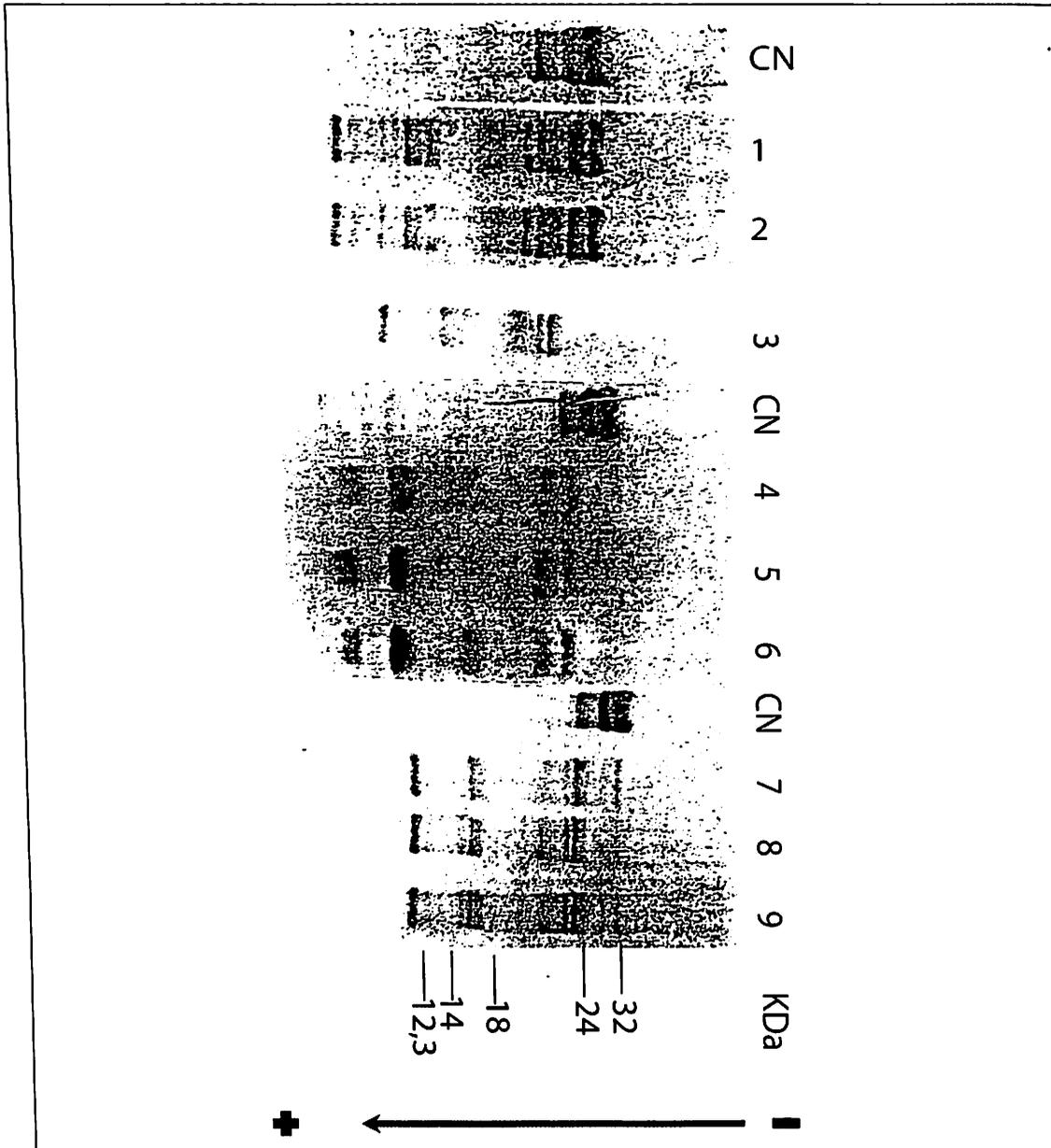


Figure 7 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS et en présence de 2-⁻ mercaptoéthanol de la caséine entière (CN) hydrolysée sous l'action du pH et du NaCl.

1 : pH 5,5, 0% NaCl, 2 : pH 5,5, 4% NaCl, 3 : pH 5,5 , 8% NaCl.

4 : pH 6,5, 0% NaCl, 5 : pH 6,5, 4% NaCl, 6 : pH 6,5, 8% NaCl.

7 : pH 7.5, 0% NaCl, 8 : pH 7,5, 4% NaCl, 9 : pH 7,5. 8% NaCl.

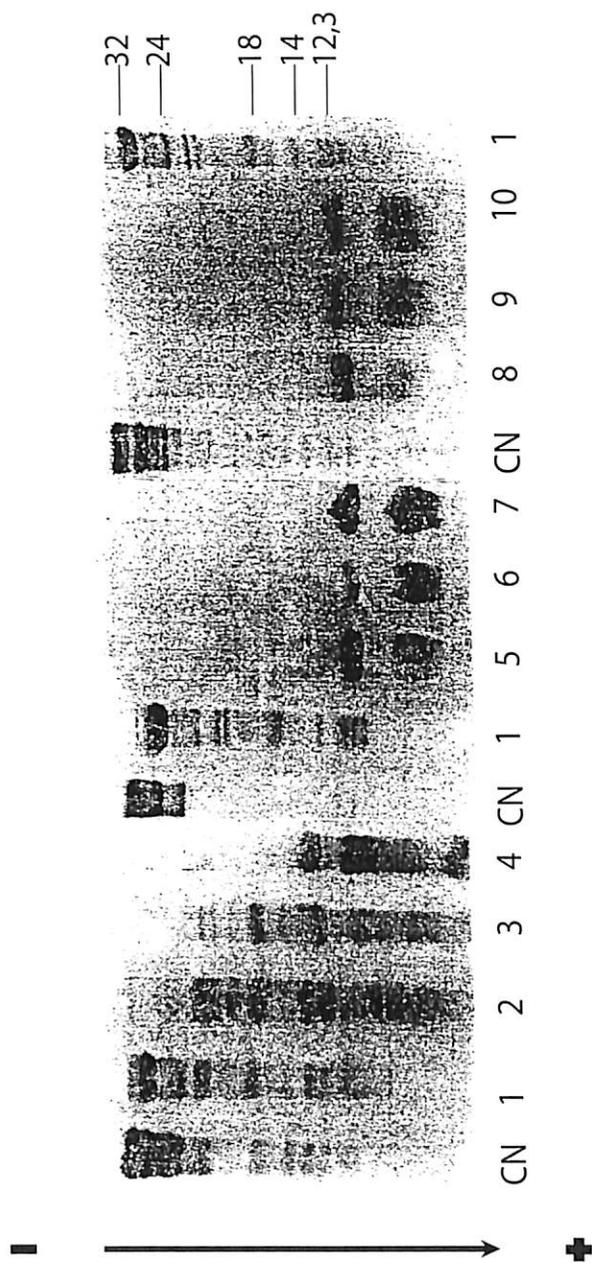


Figure 8 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS et en présence de 2-mercaptoéthanol de la caseine β -CN hydrolysée en milieu salin par la plasmine. 1 : pH 5,5, 0% NaCl, 2 : pH 5,5, 4% NaCl, 3 : pH 5,5, 8% NaCl. 4 : pH 6,5, 0% NaCl, 5 : pH 6,5, 4% NaCl, 6 : pH 6,5, 8% NaCl. 7 : pH 7,5, 0% NaCl, 8 : pH 7,5, 4% NaCl, 9 : pH 7,5, 8% NaCl.

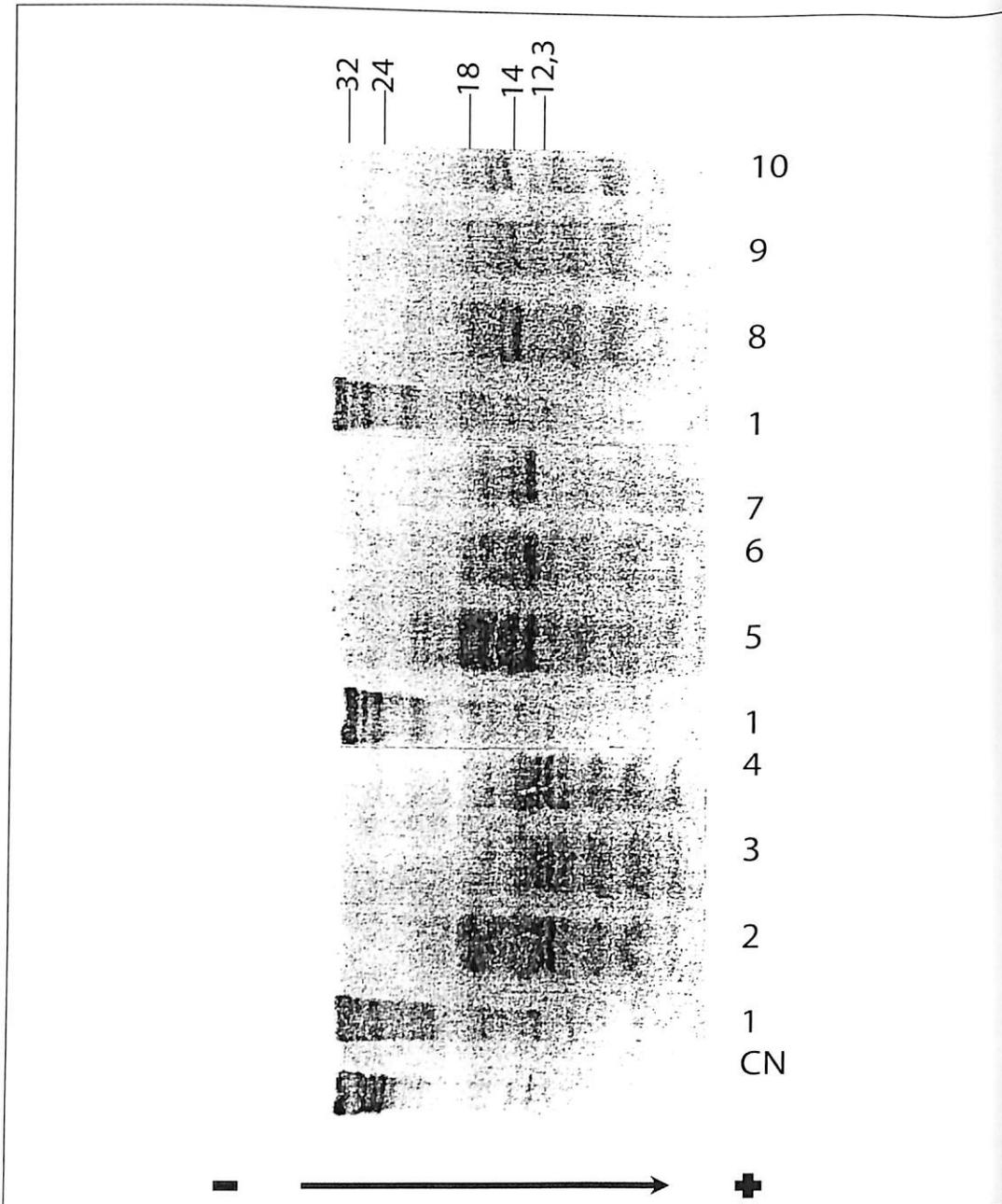


Figure 9 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS et en présence de 2-mercaptoéthanol de la caséine α_s hydrolysée en milieu salin par la plasmine. 1 : pH 5,5 , 0% NaCl, 2 : pH 5,5, 4% NaCl. 3 : pH 5,5, 8% NaCl. 4 : pH 6,5, 0% NaCl, 5 : pH 6,5, 4% NaCl, 6 : pH 6,5, 8% NaCl. 7 : pH 7,5. 0% NaCl. 8 : pH 7,5, 4% NaCl, 9 : pH 7,5, 8% NaCl.

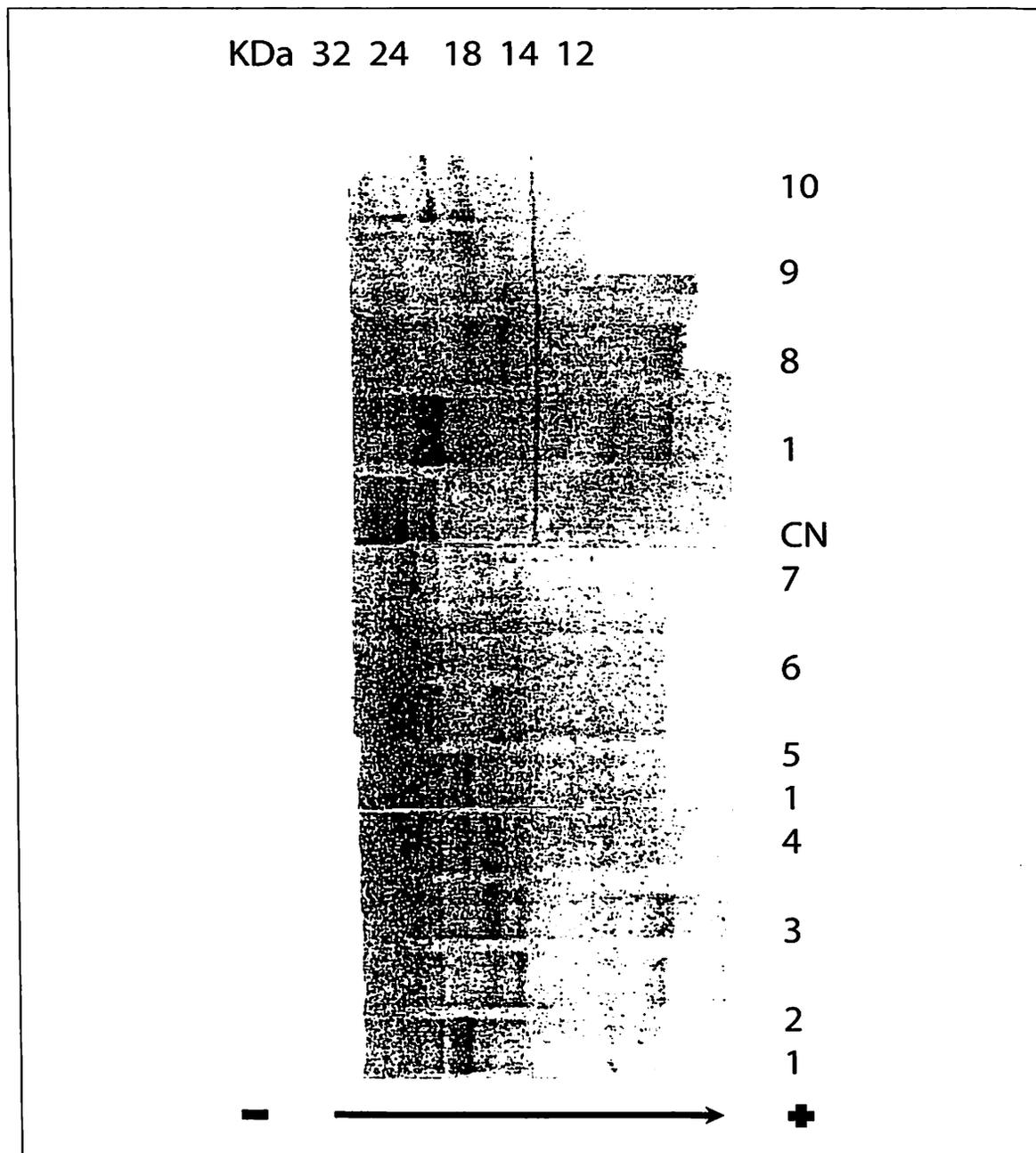


Figure 10 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS et en présence de 2-mercaptoéthanol de la caseine κ hydrolysée en milieu salin par la plasmine. 1 : pH 5,5 , 0% NaCl, 2 : pH 5,5, 4% NaCl. 3 : pH 5,5, 8% NaCl. 4 : pH 6,5, 0% NaCl, 5 : pH 6,5, 4% NaCl, 6 : pH 6,5, 8% NaCl. 7 : pH 7,5, 0% NaCl, 8 : pH 7,5, 4% NaCl, 9 : pH 7,5, 8% NaCl.