Etude d'une protéase coagulante produite par *Mucor Miehei*

II. — UTILISATION DE LA RENNILASE DANS LA FABRICATION DE FROMAGES A PATES MOLLES

par

J. P. RAMET et C. ALAIS

Ecole de Laiterie (E.N.S.A.I.A.) et Université de Nancy I

INTRODUCTION

Dans une première communication [1] nous avons présenté les résultats d'une étude biochimique de la « Rennilase » (*). Elle ressemble à la présure animale par deux propriétés essentielles : activité protéolytique faible par rapport à une activité coagulante élevée dans le lait et même sensibilité aux variations du pH, en ce qui concerne la vitesse de coagulation. Par contre la Rennilase est plus sensible que la présure aux variations de la température et de la teneur en calcium soluble.

L'étude de l'activité protéolytique en fonction du temps a montré qu'elle est plus progressive avec cette enzyme qu'avec la présure ; au moment de la coagulation, la quantité d'azote libéré de la caséine est plus faible. Le pH optimum doit être peu différent de celui de la présure, entre 3,5 et 5,5. L'étude électrophorétique a montré l'homogénéité de la préparation.

Les aptitudes fromagères de la Rennilase ont déjà été éprouvées avec succès dans un nombre limité d'essais d'applications, consacrés surtout à la fabrication de fromages à pâte ferme : Emmental [2], Edam et Tilsitt [3, 4], Saint-Paulin [5], Domiati [6]. Une publication concerne des fromages à pâte molle : Camembert et Limbourg [4].

Dans la présente communication nous rapportons les résultats des premières séries de fabrications de fromage à pâte molle et à croûte fleurie, de type Camembert, selon deux techniques différentes. Plus tard nous publierons les résultats concernant des fromages à pâte pressée et à pâte cuite.

(*) Enzyme coagulante produite par Novo Industri A/S, Copenhague.

MATERIEL ET METHODES

Enzyme

Les fabrications expérimentales ont été effectuées avec la Rennilase R-14, lot RN 1001, de force déclarée 1/15 000 ; cet extrait se présente sous forme d'un liquide légèrement visqueux et coloré en brun. La présure animale utilisée dans les fabrications témoins est un extrait liquide commercial de force déclarée 1/10 000. Au moment de leur addition au lait, ces préparations sont diluées dans 10 volumes d'eau.

Méthode de fabrication

Nous avons réalisé des fabrications de Camembert selon deux techniques :

1) Procédé traditionnel en bassine, à la fromagerie d'essai de l'Ecole de Laiterie.

2) Procédé mécanisé (Chaîne Corblin), dans une importante usine de l'Est de la France (*).

Dans chaque essai, deux fabrications sont menées en parallèle, dans les mêmes conditions : une fabrication expérimentale avec la Rennilase et une fabrication témoin avec la présure.

Les conditions particulières sont mentionnées dans le tableau 1. Les temps de coagulation et de tranchage sont donnés avec les résultats.

Méthodes analytiques

L'évolution des propriétés rhéologiques du caillé obtenu avec chacun des deux enzymes a été suivie à l'aide du Torsiomètre NIRD-Plint [7] en utilisant du lait écrémé, qui donne un plus grand développement de la fermeté que le lait gras.

Afin de caractériser le type de synérèse du coagulum, nous avons mesuré durant tout l'égouttage le poids du sérum, son acidité, sa teneur en azote total et en extrait sec. En fin d'égouttage on a déterminé la teneur moyenne des sérums et fromages en extrait sec et matière grasse :

- acidité : méthode Dornic,
- matière grasse des laits et sérums : méthode Gerber,
- matière grasse des fromages : méthode van Gülick,
- extrait sec : étuve 102° C à poids constant,
- azote total : méthode Kjeldhal-Büchi.

Les examens organoleptiques ont été pratiqués par notre groupe habituel de dégustateurs à différents stades de l'affinage.

(*) Nous remercions la Direction et le Personnel de l'Union Laitière Vitelloise, à Bulgneville (88), pour leur active collaboration.

RESULTATS

Coagulation

Les doses de Rennilase ont été déterminées de façon à obtenir le même temps de floculation que dans la fabrication témoin. On a constaté que les coagulums expérimentaux se raffermissent moins vite que leur témoin ; cependant, la fermeté au moment du tranchage était du même ordre.

TABLEAU 1. — Conditions de fabrication du camembert

	Fabrication traditionnelle	Fabrication mécanisée
a) Lait		
Vaches	Française frisonne	Pie rouge de l'Est
Volume	1 000 l	10 000 l
Réfrigération du lait cru	8° C - 20 h	10-12° C - 20 h
Pasteurisation	72° C - 15 sec	68° C - 30 sec
Standardisation matière grasse	26 g/l	47 g/l
Gras/sec du fromage	45 p. 100	60 p. 100
b) Coagulation		
Volume unitaire caillé	100 l	800 l
Ferments lactiques mésophiles (p. 100 l)	2	2
Ensemencement en spores de <i>Penicillium</i>	+	+
Chlorure de calcium (g/100 l)	10	0
Maturation avant emprésurage (mn)	20	25
Acidité/pH à l'emprésurage	21/6,4	21/6,4
Température à l'emprésurage	35° C	38° C
Dose d'enzymes (ml/100 l) R	15	22
P	21	30
c) Egouttage		
Tranchage	sabre	tranche-caillé
Repos avant moulage (mn)	20	60
Durée d'égouttage/température	3 h/28° C	5 h/28° C
Durée d'égouttage/température	17 h/20° C	13 h/22° C
Salage (saumure saturée)	50 mn/8° C	60 mn/10° C
d) Affinage		
Durée/température	20 j/12° C	12 j/12° C
Hygrométrie	90 p. 100	90 p. 100

Les mesures au Torsiomètre confirment cette évolution, comme le montre la figure 1. Il existe un décalage entre les deux courbes ; le raffermissement du caillé à la Rennilase est plus lent au début, mais par la suite, les courbes sont approximativement parallèles.

fig. 1

Propriétés rhéologiques des coagulums,
mesurées au torsiomètre

P = présure (25 ml), R = Rennilase (17 ml/100 l lait),
F = temps de floculation. Lait écrémé, pasteurisé
72° C/20 sec, avec 10 g/100 l de CaCl_2 et 3 p. 100 de
levain lactique, pH 6,45, température 35° C.

Egouttage

Les courbes de la figure 2 montrent que les vitesses d'égouttage et d'acidification du sérum sont un peu plus grandes avec la Rennilase qu'avec la présure. La différence entre l'acidité des sérums devient sensible après 3 h ; elle se maintient ensuite jusqu'au démoulage ; par contre, la différence entre les poids de sérum écoulé est notable dès le début de l'égouttage. Par voie de conséquence, l'extrait sec des fromages à la Rennilase est en général un peu plus élevé que celui des témoins (tab. 2).

La figure 3 présente l'évolution de la composition du sérum au cours de l'égouttage de la série n° 1 et révèle de légères différences. On note que dans les deux essais, les teneurs en extrait sec et en azote décroissent un peu après 2 h. Le premier flot de sérum évacue probablement de fines particules de caillé, libérées lors de la mise en moule, et ensuite retenues par un effet de filtre dans le caillé moulé. Ensuite les teneurs augmentent progressivement.

fig. 2

Acidité et poids du lactosérum au cours de l'égouttage

P = présure ; R = Rennilase

Avec la Rennilase, on observe que l'extrait sec du sérum, à un moment donné, dans cette même série, se maintient un peu au-dessus de celui de l'essai témoin durant tout l'égouttage ; par contre, il n'y a pas un écart continu dans le cas de la teneur en azote.

Le tableau 2 montre que les extraits secs moyens des sérums sont du même ordre dans les essais comparatifs ; les différences ne sont pas significatives.

TABLEAU 2. — Résultats des fabrications

Série d'essais (*)	Enzyme (ml/100 l)	Coagulation		Acidité		Résultats analytiques moyens					Rendement (kg/100 l)	
		Temps de floculation (mn)	Temps de tranchage (mn)	Au moulage	Après (n) heures	Lactosérums			Fromages		Poids frais	Poids sec
						EST (g/l)	MG (g/l)	NT (g/l)	EST (g/l)	G/S (p. 100)		
1	R (15)	14	60	14	106 (21)	67,3	2	1,505	42,2	44,1	11,6	4,9
	P (22)	15	60	14	104 (21)	66,9	2	1,451	43,0	44,2	11,9	5,0
2	R (15)	13	60	13	110 (21)	67,1	3	1,470	45,0	45,0	11,4	5,1
	P (22)	13	60	14	103 (21)	67,0	3	1,485	43,5	45,1	11,6	5,0
3	R (21)	9	35	12	43 (8)	68,5	3	1,310	53,5	53,5		
	P (30)	9	35	12	38 (8)	69,2	3	1,328	53,0	53,2		
4	R (21)	8	60	13	45 (9)	68,9	3	1,413	53,6	53,6		
	P (30)	9	55	13	38 (9)	69,1	3	1,422	53,3	53,3		

(*) n° 1 et 2, selon la technique traditionnelle.
 n° 3 et 4, fabrication mécanisée.
 R = Rennilase ; P = présure animale.

EST = extrait sec total g/l (sérum) et p. 100 (fromage).

MG = matière grasse g/l.

NT = azote total.

G/S = matière grasse p. 100 de l'extrait sec du fromage.

fig. 3

Extrait sec (EST) et azote total (N tot) du lactosérum
au cours de l'égouttage

Fromages

Les poids de fromage frais obtenu à partir de 100 l de lait, dans les séries 1 et 2, sont très légèrement inférieurs avec la Rennilase ; mais l'écart est nul ou inversé si l'on considère le poids sec.

Il n'y a pas de différence appréciable en ce qui concerne la pousse du *Penicillium* et l'aspect des fromages avant et après la coupe. Le goût est sensiblement le même après 10 j. Lorsque le fromage vieillit, on a relevé que ceux qui sont fabriqués avec la Rennilase ont un goût plus doux et une texture plus onctueuse que les fromages témoins à la présure animale ; aucune trace d'amertume n'a été décelée.

Nous n'avons pas adopté un système de notation, peu significatif dans ce genre d'essais comparatifs, mais la majorité des dégustateurs a préféré le fromage à la Rennilase.

DISCUSSION

La phase de latence dans le processus de durcissement du coagulum, suivi à l'aide du torsiomètre, est plus longue avec la Rennilase qu'avec la présure, pour des doses d'enzymes équivalentes en ce qui concerne le temps de floculation. C'est probablement une caractéristique des enzymes coagulants microbiens ; en effet, nous

l'avons observée avec d'autres enzymes [8]. Comme nous l'avons déjà dit [9], il est probable que le nombre et la nature des liaisons s'établissant au cours de la formation du gel et de la synérèse ne sont pas les mêmes avec différents enzymes, d'où apparition de propriétés rhéologiques particulières.

Le raffermissement plus lent n'est pas gênant dans des fabrications du type de celles qui font l'objet de cette communication ; le retard au tranchage est négligeable ou nul. Dans le cas de fabrication à faibles doses d'enzyme ou avec un tranchage intervenant peu après la coagulation, le délai observé pourrait devenir gênant, dans la mesure où le tranchage ne pourrait être effectué dans les délais habituels et où le manque de fermeté contribuerait à accroître les pertes. Pour y remédier on pourrait avantageusement utiliser la technique d'emprésurage anticipé précédemment décrite [10].

La plus grande vitesse d'acidification, au cours de l'égouttage, avec les fabrications expérimentales est une autre caractéristique des enzymes coagulantes microbiennes ; nous l'avons déjà signalée [8]. L'accélération de la formation de l'acide lactique est probablement due à un effet activateur indirect des enzymes. La Rennilase doit produire des peptides qui stimulent le développement des bactéries lactiques du levain. Desmazeaud et Devoyod [11] ont montré que des streptocoques et des lactobacilles étaient stimulés par des peptides de poids moléculaire compris entre 1 000 et 2 000 et provenant de l'hydrolyse de la caséine par la protéase neutre produite par un microcoque.

L'accroissement de l'acidification entraîne une meilleure « perméabilisation » de la pâte et, par voie de conséquence, un égouttage plus poussé du fromage. Dans la pratique, on peut exploiter ce fait comme un avantage lorsqu'on se heurte à des difficultés d'égouttage. Dans le cas où l'on redouterait un extrait sec trop élevé dans le fromage et un pH trop bas, avec modification du cours de l'affinage, on pourrait limiter l'acidification par un ensemencement réduit en levain lactique et par un tranchage plus grossier du coagulum.

Les compositions moyennes des fromages et des sérums, ainsi que la composition des sérums à un temps donné, sont très voisines pour les fabrications à la Rennilase et à la présure ; les rendements fromagers sont pratiquement identiques.

L'affinage des fromages se déroule de la même manière avec les deux enzymes. Aucun défaut d'aspect, de texture ni de goût n'a été décelé ; cependant, on a observé que les fromages à la Rennilase acquièrent plus rapidement une saveur plus douce et une texture plus onctueuse que les fromages à la présure. L'accélération de l'affinage, en ce qui concerne la solubilisation de la caséine, a déjà été relevée avec d'autres enzymes coagulants microbiens et aussi pour d'autres types de fromages. Il est fort probable qu'elle est la conséquence d'une protéolyse plus active avec la Rennilase qu'avec la présure animale, dans ce qui a été dénommé « réaction tertiaire ». Un effet indirect, par stimulation de micro-organismes producteurs

de protéase, est également à envisager. Dans cet ordre d'idée on doit signaler les résultats analytiques de Benke et Siewert [4] : avec de petits camemberts fabriqués selon le procédé Waldheim, une différence significative est apparue entre les valeurs de l'azote non-caséinique et entre celles de l'azote non-protéique des fromages affinés ; ces valeurs sont plus élevées avec la Rennilase qu'avec la présure.

Ces derniers auteurs [4] ont conclu que l'enzyme coagulant produit par *Mucor miehei* convient bien à la fabrication des fromages. Nos propres résultats nous poussent également à conclure à la très bonne aptitude fromagère de la Rennilase pour la fabrication des pâtes molles.

Résumé

L'enzyme coagulante Novo (Rennilase) a été utilisée dans la fabrication de camembert selon le procédé traditionnel en bassine et selon un procédé mécanisé. Les fromages obtenus ont été d'excellente qualité ; un peu plus onctueux et doux que les fromages des essais témoins à la présure animale ; la composition des fromages et le rendement ne diffèrent pas d'une manière significative.

On a observé un léger retard du raffermissement du caillé, avec la Rennilase, et une acidification et un degré d'égouttage plus grand qu'avec la présure.

L'enzyme Rennilase possède une bonne aptitude à la fabrication des fromages à pâte molle.

Summary

The milk coagulating enzyme Rennilase has been used in the manufacture of camembert according to both the traditional vat-method and a mechanized process. The cheeses made with Rennilase have been of excellent quality ; a little mellower and milder than the calf rennet control cheeses. The chemical composition of the cheeses and the yield do not differ significantly when either of the two enzymes are used.

A slight delay in the hardening of the curd and greater acidification and whey-drainage have been observed for Rennilase relative to calf rennet.

The enzyme Rennilase is well suited for the manufacture of soft cheese.

Zusammenfassung

Das Gerinnungsenzym Rennilase wurde zur Herstellung von camembert-käse nach der üblichen « Wanne-Methode » und nach einer

mechanisierten Methode verwendet. Die Versuchskäse haben eine sehr gute Qualität gezeigt und sind ein wenig milder und geschmeidiger als der Kontrollkäse ausgefallen. In der chemischen Zusammensetzung und in den Ausbeuteverhältnissen haben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollkäse erwiesen.

Bei Rennilase wurden eine geringfügige, langsamere Härtung der Milchgallerte, ein schnellerer Säuerungsverlauf und eine grössere Molkenabgabe beobachtet.

Das Enzym Rennilase ist durchaus als gut geeignet für die Herstellung von Weichkäse anzusehen.

Bibliographie

- [1] ALAIS (C.) et LAGRANGE (A.) (1972). — Etude biochimique d'une protéase coagulante produite par *Mucor miehei*. *Le Lait*, 52, 407-427.
- [2] MAYR (A.) (1971). — Versuche zur Herstellung von Emmentalerkäse unter Verwendung von mikrobiellen Lab « Rennilase ». *Deutsche Molkerei Zeit*, 92, 544-546.
- [3] THOMASOW (J.), MROWETZ (G.) und SCHMANKE (E.) (1971). — Untersuchungen zur Verwendung von Lab aus *Mucor miehei* zur Käseherstellung. *Kieler Milchwirt. Ber.*, 23, 57-68.
- [4] BENKE (U.) und SIEWERT (R.) (1969). — Untersuchungen über die Verwendbarkeit von *Mucor miehei* - Lab bei der Herstellung von Camembert, Limburger, Edamer und Tollenser. *FBM Milch Standard*, 11, 66-72.
- [5] AARNES (G.) (1971). — St-Paulin og Jarlsbergost ystet med Rennilase. *Meieriposten*, 44, 1-21.
- [6] EDELSTEN (D.), HAMDY (A.) and EL KOUSY (L.) (1969). — A study of Milk coagulating enzymes. Yearbook of Royal Veterinary and agricultural University, Copenhagen, 201-212.
- [7] PLINT (M. A.), BURNETT (J.) and SCOTT-BLAIR (C. W.) (1967). — Note on an improved dairy torsionmeter. *Dairy industries*, 32, 104.
- [8] RAMET (J. P.), ALAIS (C.) et WEBER (F.) (1969). — Etude d'un enzyme coagulant microbien dérivé de *Endothia parasitica*. *Le Lait*, 49, 40-52.
- [9] ALAIS (C.) (1971). — Les enzymes coagulant le lait. *Technique Laitière*, n° 719, 63-65.
- [10] RAMET (J. P.) et SCHLÜTER (A. S.) (1970). — Considérations pratiques sur la cinétique de la coagulation à l'aide d'un enzyme microbien Pfizer. *Revue Laitière Française*, n° 280, 730.
- [11] DESMAZEAUD (M.) et DEVOYOD (J. J.) (1970). — Action stimulante des microcoques caséolytiques sur les bactéries lactiques. *Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.*, 10, 413-430.

Reçu pour publication en septembre 1972