

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

III. — UTILISATION DE LA RENNILASE DANS LA FABRICATION DE FROMAGES A PATE PRESSEE NON CUITE ET DE FROMAGES A PATE PRESSEE CUITE

par

J. P. RAMET et C. ALAIS

Ecole de Laiterie (ENSAIA) et Université de Nancy-I. F 54 000 Nancy

I. — INTRODUCTION

Dans une précédente communication, nous avons exposé les résultats obtenus dans des fabrications de fromages à pâte molle fleurie, réalisées à l'aide de la « Rennilase »*. Ces essais ont montré la bonne aptitude fromagère de l'enzyme coagulante pour la réalisation de fromage type camembert [1]. Comparativement aux fabrications témoins, nous avons noté une légère différence concernant les modalités de déroulement des différentes phases de la fabrication : raffermissement du coagulum plus lent, acidification et égouttage plus poussés avec la Rennilase qu'avec la présure ; caractère plus doux et plus onctueux de la pâte au cours de l'affinage ; composition des fromages des sérums très voisins ; rendements fromagers comparables.

Dans la présente publication, nous complétons l'étude de l'aptitude fromagère de la Rennilase en présentant les résultats obtenus dans la fabrication des fromages à pâte pressée non cuite, de type Saint-Paulin, et de fromage à pâte pressée cuite, de type Emmental.

II. — MATERIELS ET METHODES

Enzymes

Les fabrications expérimentales ont été effectuées à l'aide d'un extrait liquide de Rennilase, référence R 14, lot RN 1001, de force

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

déclarée 1/15000. La présure animale utilisée dans les fabrications témoins est un extrait liquide commercial de force déclarée 1/10000. Au moment de leur addition au lait, ces préparations ont été diluées dans 10 volumes d'eau.

Méthodes de fabrication

Les fabrications de Saint-Paulin ont été conduites selon la technique classique en cuve hollandaise dans la fromagerie expérimentale de l'Ecole de Laiterie de Nancy. Deux séries de fabrications ont été faites ayant donné au total 96 fromages.

Les essais de fabrication d'Emmental ont été réalisés dans une importante usine du Centre-Est de la France* équipée d'un matériel moderne, spécialisée dans la production de pâtes cuites (chaîne mécanisée Guérin) ; 8 fromages essais et 8 fromages témoins ont été fabriqués (poids moyen d'un fromage : 80 kg), à partir de lait thermisé.

Pour chaque série, deux fabrications ont été faites en parallèle dans les mêmes conditions ; dans la fabrication expérimentale, nous avons utilisé la Rennilase, dans la fabrication témoin, la présure. Les conditions propres à chaque type de fabrication sont mentionnées dans les tableaux 1 et 2.

Méthodes analytiques

Nous avons caractérisé les modalités de la coagulation et de la synérèse en mesurant l'évolution de l'acidité et du pH du sérum entre le moment du moulage et la fin du pressage. La composition du sérum et celle du fromage ont été déterminées par les techniques suivantes :

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

Les examens organoleptiques ont été effectués à différents stades de l'affinage des fromages de type Saint-Paulin par notre groupe habituel de dégustateurs. En ce qui concerne les fabrications d'Emmental, l'examen classique relatif à la sélection des fromages à la fin de la maturation a été fait par un jury composé de spécialistes de la fabrication et de l'affinage.

* Nous remercions la Direction, les Cadres et le Personnel de la Société Vivalp à Saint-Laurent-les-Mâcon pour leur collaboration.

TABLEAU 1. — Conditions de fabrication

	Saint-Paulin	Emmental
<i>Lait</i>		
Troupeau	F.F.P.N	Pie Rouge de l'Est
Volume du mélange	1 200 l	30 000 l
Réfrigération du lait cru	8° C - 20 h	6° C - 24 h
Pasteurisation	72° C - 15 s	63° C - 20 s
Maturation en tank	—	4° C - 10 h
Standardisation MG	28 g/l	27,5 g/l
Gras/sec du fromage	45 p. 100	45 p. 100
<i>Coagulation</i>		
Volume unitaire transformé	400 l	8 000 l
Levains lactiques (p. 100 l)	2	2
CaCl ₂ (g/100 l)	10	7
Maturation en cuve avant emprésurage	15 mn	10 mn
Acidité (°D) - pH à l'emprésurage	20 - 6,4	15,5 - 6,60
Température	35° C	31° C
Dose d'enzyme (ml/100 l) :		
Rennilase	17	15,5
Présure	25	23
<i>Egouttage</i>		
En cuve :		
— durée décaillage	5 mn	8 mn
— taille du grain	maïs	riz
— durée brassage	15 mn	20 mn
— volume sérum extraction	200 l	—
— volume eau lavage	200 l	—
— durée montée température	—	40 mn
— brassage	35° C - 15mn	54° C - 50 mn
Sous presse (durée)	4 h	6 h
Salage (durée - température)	8 h - 12° C	48 h - 10° C
<i>Affinage</i>		
Durée - température	20 j - 12° C	90 j - 18° C
Hygrométrie	90 p. 100	90 p. 100

III. — RESULTATS

Les principaux résultats sont mentionnés dans le tableau 2.

a) Coagulation

Saint-Paulin

Les doses de Rennilase ont été choisies de façon à obtenir un temps de floculation identique à celui obtenu avec la présure. Dans

ces conditions, nous avons observé que la fermeté des coagulums expérimentaux s'accroît moins vite que celle des coagulums témoins, dans les premières minutes suivant la prise ; mais par la suite, le durcissement du gel expérimental évolue plus rapidement, ce qui permet de pratiquer le tranchage dans les délais et des conditions de fermeté comparables aux fabrications témoins. Nous retrouvons donc ici un phénomène précédemment décrit [1].

Emmental

En utilisant des doses d'enzymes dans le même rapport que pour la fabrication du Saint-Paulin ($P/R = 1,5$), on a observé qu'il n'y avait plus d'équivalence dans les conditions de la coagulation pour la fabrication de l'Emmental. Le temps de floculation relevé lors de l'emploi de la Rennilase a été plus long que celui observé avec la présure ; le coagulum s'est raffermi plus lentement et le temps de tranchage a été augmenté jusqu'à obtention d'une fermeté suffisante du coagulum.

b) Egouttage

Saint-Paulin

Les vitesses d'acidification du sérum d'égouttage sont légèrement plus rapides dans les fabrications à la Rennilase que dans celles à la présure. Les différences sont peu sensibles au cours du travail en cuve, mais deviennent plus marquées au cours de l'égouttage sous presse (tab. 2).

La contraction du grain au cours du brassage et du lavage est plus accentuée pour les fromages expérimentaux. Ce phénomène, associé à l'acidification accélérée, améliore l'égouttage et contribue à accroître l'extrait sec final des fromages à la Rennilase.

Le tableau 2 montre que la composition moyenne des sérums d'extraction de cuve est très voisine (matière grasse, extrait sec total, azote total).

Les poids frais des fromages obtenus à partir de 100 l de lait transformés sont plus faibles avec la Rennilase qu'avec la présure en raison de leur extrait sec supérieur. En considérant les rendements fromagers exprimés en poids sec, la différence devient minime et non significative.

Emmental

La vitesse d'acidification des sérums au cours du travail en cuve évolue de façon identique, quel que soit l'enzyme utilisée ; le pH des caillés au moment du soutirage est très voisin. La rapidité de ressuyage du grain est un peu plus grande pour les fromages à la Rennilase que pour ceux à la présure.

TABLEAU 2. — Résultats des fabrications

Type de fromage	Enzymes (ml/100 l)	Coagulation		Acidité/pH			Résultats analytiques					Rendements fromagers (kg/100 l)	
		Floculation (mn)	Tranchage (mn)	Mou-lage	Pressage après (n) heures		Sérums cuve (g/l)			Fromage (p. 100)		Poids frais	Poids sec
					EST	MG	NT	EST	G/S				
Saint-Paulin	R (17)	10	30	8	(2) 16,5	(4) 37	68,0	5	1,323	46,3	45,5	11,1	5,135
	P (25)	10	30	7,5	15	34	68,1	5	1,311	44,4	45,0	11,5	5,106
Saint-Paulin	R (17)	9	25	9	(2) 17	(3) 28	69,0	5	1,408	45,9	45,5	11,3	5,186
	P (25)	9	25	9	15,5	26	69,1	5	1,395	45,6	44,5	11,3	5,152
Emmental	R (15,5)	30	40	7/6,30	(3) 50/4,98	(6) 54/4,89	69,3	6,5	1,484				
	P (23)	18	25	7/6,30	48/5,00	55/4,9	69,2	6,5	1,419				

EST : extrait sec total.

MG : matière grasse.

NT : azote total.

G/S : gras/sec.

R : Rennilase.

P : Présure animale.

La composition moyenne des sérums d'extraction de cuve, en extrait sec total et matière grasse est la même dans les deux fabrications ; la teneur en azote total est légèrement différente. Les fromages n'ont pas été analysés.

c) Affinage

Saint-Paulin

En cours de maturation, la texture des fromages expérimentaux a été jugée plus souple et plus onctueuse que celle des fromages témoins ; leur goût plus doux a été également relevé et apprécié. Aucune amertume n'a été signalée. Dans l'ensemble, la qualité organoleptique des fromages expérimentaux a été estimée supérieure à celle des fromages témoins.

L'évolution de l'aspect extérieur des fromages a été semblable au cours de la maturation : aucun défaut de croûte n'a été relevé ; à la coupe, la pâte a présenté un aspect homogène ainsi qu'une couleur normale et uniforme.

Emmental

En fin d'affinage, le tri technique effectué a classé les fromages expérimentaux et témoins en catégorie « choix B ». Pour les deux lots de fromage, les examinateurs ont relevé une ouverture chargée ; aucune différence de goût, ni d'odeur n'a été remarquée. La qualité organoleptique des fromages témoins et expérimentaux obtenus est identique.

IV. — DISCUSSION

Nos essais ont confirmé l'évolution particulière des propriétés des coagulums formés avec la Rennilase, que nous avons observée précédemment [1] : il existe une phase de latence plus longue au début du processus de raffermissement des coagulums formés avec la Rennilase qu'avec la présure. Cela ne perturbe pas le déroulement de la fabrication des fromages à pâte molle et des fromages à pâte pressée car le temps de tranchage pratiqué est égal à plusieurs fois le temps de floculation. Au contraire lorsque le tranchage intervient peu de temps après la floculation, comme dans les fabrications de fromages à pâte cuite, il devient nécessaire de prolonger le temps de coagulation total afin que le caillé acquiert une tension suffisante pour limiter les pertes en extrait sec dans le sérum.

En utilisant des doses d'enzymes dans le rapport des forces indiquées ($P/R = 1,5$), on obtient le même temps de coagulation et de tranchage dans les essais de Saint-Paulin, mais non pas dans les essais d'Emmental. L'écart des temps (respectivement 12 et 15 mn) doit être dû, au moins pour une part, à la différence de

sensibilité des deux enzymes aux facteurs de la coagulation [2]. Dans le cas de l'Emmental, le lait est coagulé à plus basse température et avec moins de calcium ajouté. Il serait assez facile de réduire le retard au tranchage en modifiant légèrement ces conditions. De plus, les laits utilisés dans les deux fabrications n'ont pas subi le même traitement thermique. Il est probable qu'à elle seule la pasteurisation normale du lait pour l'Emmental (au lieu de la thermisation) aurait suffi à réduire ou à annuler les écarts observés. Les études que nous poursuivons actuellement sur la relation : temps de coagulation / concentration en enzyme, en fonction du traitement thermique, nous ont en effet montré un comportement particulier de certaines enzymes [9].

Nous avons déjà signalé la plus grande vitesse d'acidification des lactosérums lors de l'emploi d'enzymes coagulantes microbiennes [1, 3] et expliqué cet effet activateur par la production de peptides [4]. L'incidence sur le degré final d'égouttage des fromages est moins marquée dans les fabrications de fromages à pâte pressée que dans celle des fromages de type pâte molle. On sait, en effet, que dans le procédé de fabrication des fromages à pâte ferme, la plus grande partie du sérum est éliminée au cours du travail en cuve, dans un délai relativement court pendant lequel la différence d'acidification n'est pas suffisamment marquée pour engendrer une variation sensible du degré d'égouttage. Il est donc vraisemblable que le ressuyage plus rapide du grain en cuve que nous avons constaté, résulte d'une contraction meilleure, propre au gel obtenu avec la Rennilase. Comme nous l'avons suggéré précédemment, il est probable que les gels formés avec les enzymes coagulantes diffèrent, par le nombre et la nature des liaisons, de ceux résultant de l'action de la présure [1, 5].

Dans le cas particulier de nos essais de fabrication d'Emmental où le tranchage a été retardé, la synérèse meilleure du coagulum a permis de compenser partiellement la perte de temps ; en divisant plus finement le caillé il doit être possible d'annuler cet écart.

Les compositions moyennes des fromages et des sérums sont très voisines et les rendements fromagers comparables, (dans le cas du Saint-Paulin). Nous retrouvons ici une observation déjà faite lors de nos essais de fabrication de camembert [1].

En ce qui concerne l'affinage, il apparaît nécessaire de différencier le cas des fromages type Saint-Paulin de ceux de type Emmental.

Dans nos fabrications de pâte pressée non cuite, nous avons noté une texture de pâte plus onctueuse et un goût plus doux des fromages à la Rennilase. Nous avons déjà fait cette observation au cours de nos précédentes expérimentations [1] ; cette caractéristique est vraisemblablement la conséquence d'une activité protéolytique tertiaire de l'enzyme microbienne et d'une stimulation de

micro-organismes producteurs de protéases. De plus on peut remarquer que la différence de texture et de goût entre fromages témoins et expérimentaux de type Saint-Paulin est plus marquée que dans les fabrications correspondantes de fromages à pâte molle ; ceci n'est guère surprenant étant donné le rôle majeur que joue la présure dans le processus d'affinage des pâtes pressées non cuites.

Dans les fabrications d'Emmental, on n'a pas observé de différence sensible de texture et de goût entre la pâte des fromages expérimentaux et celle des fromages témoins. On ne retrouve donc pas les variations signalées plus haut ; il est probable que le traitement thermique subi par le caillé au cours de la cuisson inactive les agents coagulants (présure ou Rennilase), qui ne modifient donc pas de façon sensible le cours de l'affinage.

Les résultats observés dans l'ensemble de nos essais concordent avec les travaux d'autres auteurs [6, 7, 8]. L'enzyme coagulante produite par *Mucor Miehei* possède donc une bonne aptitude fromagère.

Résumé

L'enzyme coagulante produite par *Mucor Miehei* (Rennilase) a été utilisée dans la fabrication de fromages à pâte pressée non cuite (Saint-Paulin) et à pâte pressée cuite (Emmental). La fermeté du coagulum formé avec la Rennilase évolue plus lentement dans les premières minutes, par rapport à celle du coagulum obtenu avec la présure. Cependant, dans les fabrications expérimentales de Saint-Paulin, le tranchage du coagulum peut intervenir dans les délais habituels, à un degré de fermeté équivalent à celui du gel témoin.

Dans les fabrications d'Emmental avec la Rennilase, le temps de tranchage a été prolongé par suite d'une tension insuffisante du caillé, mais la synérèse plus rapide du grain en cuve a permis de raccourcir le temps de cuisson et de compenser le retard enregistré à la coagulation.

La composition de la pâte, des sérums témoins et expérimentaux sont comparables ; les rendements fromagers sont voisins. Au cours de l'affinage du Saint-Paulin, l'utilisation de la Rennilase a permis d'obtenir des fromages plus doux et plus onctueux que les fromages témoins à la présure. Aucune différence n'a été notée en ce qui concerne les caractères organoleptiques des fromages d'Emmental.

Summary

The coagulating enzyme produced by *Mucor Miehei* (Rennilase) has been used in the manufacture of semi-hard cheese (Saint-Paulin)

and of hard cheese (Emmental). The firmness of the coagulum made with Rennilase evolves more slowly during the first minutes compared with that of the coagulum obtained with calf rennet.

However, in the experimental manufacture of Saint-Paulin, cutting of the coagulum could be done within the usual time-limit, at a firmness equal to that of the control curd.

In the manufacture of Emmental with Rennilase, the cutting-time had to be prolonged as a result of an insufficient tension of the cheese curd. However, the more rapid syneresis of the curd grains in the vat made it possible to shorten the time of cooking and thereby to compensate for the delay registered in the coagulation.

The composition of the curd, and of the whey from the control- and experimental vats, are comparable ; the yields are similar.

During the ripening of Saint-Paulin the use of Rennilase resulted in softer and more mellow cheeses than the rennet control-cheeses. No difference was noticed in the organoleptic characteristics of the Emmental-cheeses.

Reçu pour publication en janvier 1973.

Bibliographie

- [1] RAMET (J. P.) et ALAIS (C.) (1972). — Etude d'une protéase coagulante produite par *Mucor miehei*. II. Utilisation de la Rennilase dans la fabrication de fromages à pâtes molles. *Le Lait*, 52, 654-663.
- [2] ALAIS (C.) et LAGRANGE (A.) (1972). — Etude biochimique d'une protéase coagulante produite par *Mucor miehei*. I. Activité coagulante et activité protéolytique. *Le Lait*, 52, 407-427.
- [3] RAMET (J. P.), ALAIS (C.) et WEBER (F.) (1969). — Etude d'un enzyme coagulant microbien dérivé de *Endothia parasitica*. *Le Lait*, 49, 40-52.
- [4] DESMAZEAUD (M.) et DEVOYOD (J. J.) (1970). — Action stimulante des microcoques caséolytiques sur les bactéries lactiques. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, 10, 413-430.
- [5] ALAIS (C.) (1971). — Les enzymes coagulant le lait. *Technique Laitière*, n° 719, 63-65
- [6] MAYR (A.) (1971). — Versuche zur Herstellung von Emmentalerkäse unter Verwendung von Lab aus *Mucor miehei*. *Deutsche Molkerei Zeit*, 92, 544-546.
- [7] AARNES (G.) (1971). — St-Paulin og Jarlsbergost ystet med Rennilase. *Meieriposten*, 44, 1-21.
- [8] 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 Standart*, 11, 66-72.
- [9] ALAIS (C.). — Travaux non publiés.