

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 82 07484

(54) Procédé destiné à améliorer l'aptitude fromagère du lait entrant dans la préparation des fromages à pâtes pressées non cuites ou demi-cuites.

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). A 23 C 19/032, 19/072; C 12 N 9/52 // C 12 R 1/265.

(22) Date de dépôt..... 30 avril 1982.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 44 du 4-11-1983.

(71) Déposant : ROUSSEL-UCLAF. — FR.

(72) Invention de : Pierre Barthelemy et Michel Desmazeaud.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Jean Claude Vieillefosse, ROUSSEL-UCLAF,
111, route de Noisy, 93230 Romainville.

La présente invention a pour objet un procédé destiné à améliorer l'aptitude fromagère du lait entrant dans la préparation des fromages à pâtes pressées non cuites ou demi-cuites.

On sait maintenant que les progrès techniques réalisés dans la récolte du lait, sa conservation à la ferme à basse température, son transport en citernes et son stockage à la laiterie en récipients isothermes, ont des conséquences gênantes sur la flore bactériologique dont l'activité est essentielle pour la production d'un fromage de qualité.

La conservation du lait à 4° C ou à une température supérieure a notamment pour effet de favoriser le développement de bactéries psychrotrophes qui produisent des enzymes nuisant à la qualité du fromage. La croissance de ces bactéries psychrotrophes se fait au détriment des autres flores qui produisent des peptides stimulant la croissance des bactéries lactiques indispensables à la préparation de fromages de bonne qualité.

La demanderesse a ainsi été amenée à rechercher différentes voies permettant de retrouver l'aptitude fromagère des laits d'autrefois.

Au cours de ces études elle a notamment trouvé que l'addition d'une enzyme extraite d'une culture d'un Micrococcus caseolyticus améliorerait considérablement l'aptitude fromagère du lait entrant dans la préparation des fromages à pâtes pressées non cuites ou demi-cuites.

L'invention a ainsi pour objet un procédé destiné à améliorer l'aptitude fromagère du lait entrant dans la préparation des fromages à pâtes pressées non cuites ou demi-cuites, caractérisé en ce qu'au cours de la préparation desdits fromages à pâtes pressées non cuites ou demi-cuites, l'on ajoute au lait une enzyme extraite d'une culture d'un Micrococcus caseolyticus

L'addition au lait d'une enzyme extraite d'une souche de Micrococcus caseolyticus répond particulièrement bien au problème posé puisqu'elle a pour effet d'une part de préparer ou de compléter l'action de la présure en améliorant l'aptitude à la coagulation du lait et d'autre part de créer par coupure de la caséine des peptides stimulant des bactéries lactiques grâce à cette addition d'enzyme, le fromager tend à retrouver un lait doué d'aptitude fromagère traditionnelle en reconstituant son processus de maturation biologique.

Selon l'invention, le fromage à pâte pressée non cuite ou demi-cuite est un fromage à croûte sèche dont l'extrait sec est compris entre 50 % et 55 %.

Par fromage à croûte sèche dont l'extrait sec est compris 5 entre 50% et 55 % on désigne notamment des fromages tels que le Gouda, le Saint-Paulin, l'Edam, la Tome, les fromages à pâtes persillées ...

Dans la mise en oeuvre du procédé, objet de l'invention, on peut utiliser tout Micrococcus caseolyticus ; on a toutefois 10 trouvé que la souche déposée dans la Collection Nationale de Cultures de Microorganisme (CNCM) à l'Institut Pasteur à Paris sous le n° I. 194 en date du 28 Avril 1982 était particulièrement avantageuse.

Cette souche est identique à la souche déposée dans la 15 collection du CNRZ (Centre National de Recherches Zootechniques à Jouy en Josas - France) sous le n° 467 qui a par ailleurs été déjà décrite dans la littérature.

Le procédé objet de l'invention est donc caractérisé en ce que la souche de Micrococcus caseolyticus est constituée par 20 la souche déposée à l'Institut Pasteur sous le n° I. 194 .

Selon l'invention, l'addition d'Enzymes dans la préparation des fromages à pâtes pressées non cuites ou demi-cuites a pour effet d'augmenter et de régulariser la protéolyse en conférant à ces fromages une meilleure texture.

25 Cette addition d'enzyme a principalement pour effet d'améliorer la texture de la pâte, de prolonger la période de commercialisation bien au-delà de la durée usuelle, sans apporter d'amertume comme peuvent le faire certaines enzymes.

Le procédé objet de l'invention est ainsi caractérisé en 30 ce que l'addition d'enzyme est effectuée à une dose comprise entre 25 et 250 u/l de lait.

Dans des conditions préférentielles de mise en oeuvre du procédé objet de l'invention, l'addition d'enzyme est effectuée à une dose comprise entre 70 et 150 u/l de lait.

35 L'enzyme améliorant l'aptitude à la coagulation du lait, la dose optimale est celle qui diminue le temps de prise de 3 à 5 minutes. Cette dose, variable en fonction des qualités de laits et des fromages à préparer se situe le plus souvent aux environs de 100 u/litre.

40 L'activité protéolytique de l'enzyme est déterminée par mesure (variation de la densité optique à 275 nm) de la

quantité de caséine hydrolysée par l'enzyme (fraction azotée non précipitable par l'acide trichloracétique) dans des conditions standard.

Une unité est définie comme la quantité d'enzyme qui agissant dans les conditions du dosage, provoque une variation de la densité optique à 275 nm de 0,001 unité de densité optique par minute par millilitre de solution.

Selon le procédé objet de l'invention, l'addition d'enzyme est effectuée avant ou pendant l'emprésurage.

Cette addition d'enzyme est de préférence effectuée de 15 à 30 minutes avant l'emprésurage.

Selon une variante du procédé objet de l'invention l'addition d'enzyme est effectuée au cours du brassage.

La technique de préparation des fromages à pâtes pressées non cuites ou demi-cuites étant bien connue en elle-même, les exemples figurant plus loin dans la partie expérimentale ne sont donnés que pour illustrer l'addition de l'enzyme extraite de Micrococcus caseolyticus.

Il convient de noter que le procédé selon l'invention peut être mis en oeuvre aussi bien au départ du lait naturel entier, qu'au départ de laits reconstitués ou recombinaison.

L'invention a enfin pour objet les fromages à pâtes pressées non cuites ou demi-cuites tels qu'obtenus au moyen du procédé décrit ci-dessus.

L'enzyme extraite de Micrococcus caseolyticus utilisée dans la mise en oeuvre du procédé selon l'invention peut, par exemple être préparée selon la technique décrite dans Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys., 1970, 10 (3) 413-430.

L'enzyme extraite de Micrococcus caseolyticus peut être préparée au départ d'un bouillon de culture de Micrococcus caseolyticus, par centrifugation dudit bouillon pour en éliminer les bactéries, précipitation de l'enzyme par le sulfate d'ammonium, reprise de celle-ci par une solution de chlorure de calcium et concentration par ultrafiltration suivie d'une lyophilisation.

Un exemple d'une telle préparation est donné ci-après :

Préparation du bouillon de fermentation :

Dans un fermenteur, on stérilise à 120° C une solution préparée à partir de 750 l d'eau, 20 kg de corn steep liquide, 20 kg de peptone de caséine, 10 kg d'autolysat de levure et

0,906 kg de chlorure de calcium, solution dont le pH a été ajusté à 7 par addition de lessive de soude. On amène la température du milieu stérile à 30° C puis introduit 15 litres d'une solution stérile de dextrose à 30 % et 10 litres de
5 bouillon pied de cuve d'une culture de Micrococcus caseolyticus (souche déposée à l'Institut Pasteur à Paris sous le n° I.194). On laisse fermenter pendant 24 heures à 30° C, sous agitation et air stérile en maintenant le pH constant pendant les 10 premières heures. Après 24 heures, on recueille 1050 litres
10 de bouillon brut de fermentation.

Extraction de l'enzyme :

On sépare par centrifugation sur centrifugeuse Alfa-Laval type LX les bactéries contenues dans 5000 litres d'un bouillon de culture préparé comme indiqué ci-dessus et recueille 4770
15 litres de centrifugeat limpide.

Au centrifugeat obtenu, on ajoute 2670 kg de sulfate d'ammonium puis, après agitation pendant 30 minutes 1,2 kg d'Hyflosupercel. On laisse reposer 24 heures puis élimine le surnageant.

20 On introduit la fraction insoluble obtenue ci-dessus dans 330 litres d'une solution de chlorure de calcium, agite 15 mn et filtre. On recueille 390 litres d'une solution que l'on concentre par ultrafiltration. Après 12 heures on obtient 50 litres d'une solution concentrée d'enzyme titrant 50500
25 unités/cm³.

La solution concentrée d'enzyme est alors répartie en flacons de 24 cm³ et lyophilisée.

Il va être donné maintenant à titre non limitatif, des exemples de mise en oeuvre de l'invention.

30 Exemple 1 : Fabrication de fromage de type "Gouda"

On enseme avec des ferments congelés (levain) 100 litres de lait entier préalablement pasteurisé à 72° C pendant 20 mn. On effectue une maturation pendant 16 heures à 11-12° C puis introduit l'enzyme extraite de la souche de Micrococcus caseo-
35 lyticus (déposée à l'Institut Pasteur à Paris sous le n° I.194). à la dose de 90 Unités par litre de lait. Quinze minutes après on effectue l'emprésurage.

Après coagulation, on élimine le sérum, effectue un premier brassage puis un traitement thermique à 40° C. On délactose
40 partiellement le caillé par addition d'eau et effectue un second brassage. On recueille le caillé égoutté, effectue un

moulage et un pressage selon les techniques usuelles.

On enrobe alors les fromages de cire et effectue l'affinage à 12° C à 95 % d'humidité relative pendant 90 jours.

On obtient finalement des fromages de 250 g de type
5 "Gouda".

Simultanément à la préparation ci-dessus, on a préparé par la même technique, des fromages sans addition d'enzyme.

Ces essais ont montré que la texture des fromages "traités" étaient beaucoup plus régulière que celle des fromages "témoins".

10 Exemple 2 : Etude de l'action de l'enzyme

Afin d'étudier l'action de l'enzyme lors de la préparation des fromages à pâtes pressées non cuites ou demi-cuites, selon l'invention, on a voulu rechercher l'action de celle-ci en augmentant considérablement la dose utilisée. Pour cette étude
15 on a utilisé le protocole suivant :

On ensemence avec des ferments congelés (levain) 87 litres de lait entier préalablement pasteurisé à 72° C pendant 20 mn
On effectue une maturation pendant 16 heures à 11-12° C puis ajoute 45000 unités d'enzyme extraite de la souche Micrococcus
20 caseolyticus déposée à l'Institut Pasteur à Paris sous le n° I.194 (correspondant à environ 520 u/litre de lait).
Quinze minutes après, on effectue l'empressurage.

Après coagulation, on élimine le sérum, effectue un premier brassage puis un traitement thermique à 40° C. On délactose
25 partiellement le caillé par addition d'eau et effectue un second brassage. On recueille le caillé égoutté, effectue un moulage et un pressage selon les techniques usuelles.

On enrobe alors les fromages de cire et effectue un affinage à 12° C à 95 % d'humidité relative. On effectue des prélèvements
30 de fromages à différentes périodes au cours de l'affinage.

On obtient finalement des fromages de 250 g environ de type "Gouda".

Simultanément à la préparation ci-dessus, on a préparé par la même technique des fromages sans addition d'enzyme.

35 Analyse sensorielle :

Les fromages "traités" et les fromages "témoins" ont été soumis à l'analyse d'un jury de dégustation entraîné, constitué de 16 personnes.

La texture a été appréciée selon 4 caractères notés chacun
40 de 0 à 4 : dur, friable, glissant, onctueux. La flaveur a été

appréciée selon 17 caractères notés chacun de 0 à 4 et dont les principaux étaient : amer, acide, piquant, degré d'affinage.

Aucun défaut d'amertume n'a pu être détecté dans les fromages
5 "traités" au cours des 90 jours d'affinage. Pour les autres caractères de flaveur testés, aucune différence significative n'a été observée si ce n'est au niveau de l'appréciation du degré d'affinage (les fromages "traités" étant considérés comme plus affinés en fin de maturation).

10 Au niveau de la texture, les fromages traités ont été considérés comme plus "friables" après 28 jours de maturation et "moins durs" après 90 jours de maturation.

Mesures de texture :

Les variations de texture dans les fromages "traités" et
15 "témoins" au cours de la période d'affinage ont été appréciées par des tests de fluage réalisés à l'aide d'un appareil décrit dans : "Le Lait" 56, 486-494 .

Le "module de viscosité" et le "module d'élasticité" ont été mesurés sur des éprouvettes cylindriques (diamètre 2 cm -
20 Hauteur 2 cm).

Les mesures rhéologiques ont révélé une nette différence dans l'évolution de la texture.

Pour les fromages "témoins", le module d'élasticité a augmenté régulièrement au cours de l'affinage. Pour les fromages
25 "traités" une augmentation plus faible a été observée jusqu'au 50 ème jour, puis une diminution a été constatée ensuite jusqu'au 90 ème jour.

Pour les fromages "témoins", le module de viscosité a augmenté fortement entre le 1er et le 14ème jour, puis plus lentement
30 par la suite. Pour les fromages "traités", l'évolution du module de viscosité, a été analogue à celle des fromages "témoins" jusqu'au 14ème jour. Une nette diminution a été observée au 24 ème jour puis une lente augmentation ensuite jusqu'à la fin de l'affinage.

35 En conclusion, cette étude montre que l'addition de l'enzyme de Micrococcus caseolyticus à une dose très supérieure à la dose normale d'utilisation se traduit par une protéolyse plus importante des fromages qui n'est pas accompagnée d'amertume contrairement à ce qui a pu être constaté avec d'autres enzymes.

REVENDEICATIONS

- 1°) Procédé destiné à améliorer l'aptitude fromagère du lait entrant dans la préparation des fromages à pâtes pressées non cuites ou demi-cuites, caractérisé en ce qu'au cours de la préparation desdits fromages à pâtes pressées non cuites ou demi-cuites, l'on ajoute au lait une enzyme extraite d'une culture d'un Micrococcus caseolyticus.
- 2°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le fromage à pâte pressée non cuite ou demi-cuite est un fromage à croûte sèche dont l'extrait sec est compris entre 50 % et 55 %.
- 3°) Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la souche de Micrococcus caseolyticus est constituée par la souche déposée à l'Institut Pasteur sous le n° I.194.
- 4°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que l'addition d'enzyme est effectuée à une dose comprise entre 25 et 250 u/l de lait.
- 5°) Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'addition d'enzyme est effectuée à une dose comprise entre 70 et 150 u/l de lait.
- 6°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que l'addition d'enzyme est effectuée avant ou pendant l'emprésurage.
- 7°) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'addition d'enzyme est effectuée de 15 à 30 minutes avant l'emprésurage.
- 8°) Variante du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l'addition d'enzyme est effectuée au cours du brassage.
- 9°) Fromages à pâtes pressées non-cuites, tels qu'obtenus au moyen du procédé décrit à l'une quelconque des revendications 1 à 8.
- 10°) Application d'une enzyme extraite d'une culture de Micrococcus caseolyticus à la préparation de fromages à pâtes pressées non cuites ou demi-cuites en vue de leur affinage.