



N° 885-584

Classif. Internat.: A 23 c/c 12 N

Mis en lecture le: 02-02-1981

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la loi du 24 mai 1854 sur les brevets d'invention;

Vu le procès-verbal dressé le 8 octobre 19280 à 15 h 20
au Service de la Propriété industrielle;

ARRÊTE :

Article 1. — *Il est délivré à la Sté dite : CHR. HANSEN'S LABORATORIUM*
A/S
Sankt Annae Plads 3, 1250 Copenhagen K (Danemark),
repr. par le Bureau Gevers S.A. à Bruxelles,

un brevet d'invention pour : Procédé de déstabilisation de l'activité
protéolytique d'enzymes microbiens de caillage du lait,

Article 2. — *Ce brevet lui est délivré sans examen préalable, à ses risques et périls, sans garantie soit de la réalité, de la nouveauté ou du mérite de l'invention, soit de l'exactitude de la description, et sans préjudice du droit des tiers.*

Au présent arrêté demeurera joint un des doubles de la spécification de l'invention (mémoire descriptif et éventuellement dessins) signés par l'intéressé et déposés à l'appui de sa demande de brevet.

Bruxelles, le 31 octobre 19280

PAR DÉLÉGATION SPECIALE :


L. SALPÊTEUR
Directeur

005504

MEMOIRE DESCRIPTIF

déposé à l'appui d'une demande de

BREVET D'INVENTION

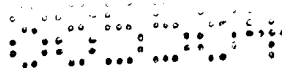
au nom de :

Chr. Hansen's Laboratorium A/S

pour :

"Procédé de déstabilisation de l'activité protéolytique d'enzymes microbiens de caillage du lait"



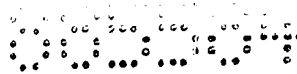


La présente invention est relative à un procédé de déstabilisation de l'activité protéolytique d'enzymes microbiens de caillage du lait, que l'on utilise dans la fabrication de fromages.

Les enzymes microbiens de caillage du lait (coagulants microbiens) sont bien connus, par exemple les enzymes produits par le *Mucor miehei* (voir par exemple le brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 3.988.207 et le brevet danois n° 138.999), le *Mucor pusillus* (voir les brevets des Etats-Unis d'Amérique Nos 3.151.039 et 3.212.905) et l'*Endothia parasitica* (voir notamment le brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 3.275.453). Dans la fabrication de fromages avec utilisation d'un coagulant microbien, il est désirable d'arriver à un effet optimal en ce qui concerne le caillage du lait afin d'obtenir une formation de caillé qui soit aussi proche que possible de la formation de caillé que l'on obtient en utilisant de la présure de veau. L'effet de caillage du lait est un aspect particulier de l'activité protéolytique d'un coagulant et une exigence générale pour qu'un coagulant soit utile dans la production de fromages est qu'il présente une haute activité protéolytique de caillage du lait comparativement à son activité protéolytique générale. Sous ce rapport, la présure de veau montre une combinaison remarquable de propriétés.

Outre qu'elle montre une haute activité de caillage du lait comparativement à son activité protéolytique générale, la présure de veau présente l'avantage que son activité est facilement détruite par chauffage jusqu'à des températures supérieures à 50°C. Cette caractéristique est importante dans la production

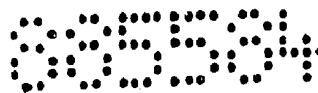




de fromages cuits (par exemple l'Emmenthal) et dans le traitement du petit-lait, car la préparation d'un fromage cuit et le traitement du petit-lait comprennent tous deux des phases de chauffage jusqu'au-dessus de 50°C, de sorte que le produit résultant est pratiquement exempt de toute activité enzymatique protéolytique résiduaire quelconque dérivant de la présure de veau. Cela signifie en outre que, dans l'utilisation ultérieure du petit-lait, par exemple pour des aliments pour bébés, à titre de substrat pour des besoins de fermentation, comme alimentation pour les veaux, etc., il n'y a pas de détérioration des propriétés fonctionnelles désirées des protéines du petit-lait, due à une activité protéolytique résiduaire quelconque dérivant de la présure de veau, et que, dans les fromages cuits, il n'y a pas détérioration du goût et de l'arôme, due à une dégradation des constituants du fromage. Dans les fromages non cuits, la présure de veau montre une activité protéolytique limitée qui est favorable durant la maturation des fromages.

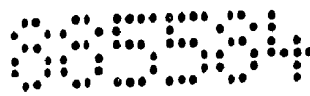
A l'encontre de la présure de veau, les coagulants microbiens montrent un degré plus élevé de stabilité et, de ce fait, ont tendance à montrer une activité protéolytique résiduaire indésirable aussi bien dans des fromages préparés en utilisant de tels coagulants que dans un petit-lait résultant d'une telle production de fromages. Il serait par conséquent désirable de pouvoir modifier les coagulants microbiens de manière à obtenir une réduction de leur activité protéolytique résiduaire dans le petit-lait et dans les fromages, tout en maintenant en même temps une activité satisfaisante de caillage du lait et une stabilité satisfaisante au stockage des coagulants microbiens, permettant leur stockage normal et leur manipulation aisée.





Suivant l'invention, on a maintenant trouvé qu'une telle déstabilisation des coagulants microbiens de manière à conformer plus étroitement leurs caractéristiques avec les caractéristiques désirées de la présure de veau peut être obtenue en soumettant les coagulants microbiens à un traitement d'oxydation à un degré qui ne réduit pas sensiblement leur activité de caillage du lait comparativement à celle obtenue avec l'enzyme non traité, et qui ne réduit pas sensiblement la stabilité de l'enzyme au stockage sous des conditions normales de stockage. A titre d'exemple, le traitement d'oxydation suivant l'invention peut être réalisé de manière que l'enzyme conserve environ 30% au plus de son activité initiale de caillage du lait après traitement thermique pendant 1 heure à 60°C et à un pH de 6,0, tandis que la stabilité de l'enzyme au stockage est maintenue de façon satisfaisante (la caractéristique signalée que l'enzyme conserve environ 30% au plus de son activité initiale de caillage du lait après traitement thermique pendant 1 heure à 60°C et au pH de 6,0 n'implique pas nécessairement que, dans l'utilisation particulière de l'enzyme, un traitement thermique pendant 1 heure à 60°C et au pH de 6,0 sera impliqué ; cette caractéristique citée ne doit être considérée que comme un test quantitatif pratique pour la détermination d'une mesure déterminée de la déstabilisation obtenue suivant l'invention).

Comme cela apparaîtra des résultats expérimentaux présentés par la suite, une déstabilisation de l'activité protéolytique s'obtient en même temps qu'un maintien essentiel de la stabilité de l'enzyme au stockage, ce que l'on mesure par la capacité de caillage du lait sous des conditions raisonnables de stockage (par exemple au réfrigérateur, environ 4°C). On croit que

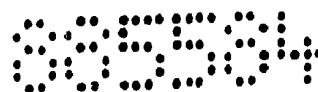


l'effet du traitement de la présente invention est une déstabilisation générale de l'enzyme mais que l'effet de cette déstabilisation devient de plus en plus prononcé au fur et à mesure que la température augmente, ce qui signifie que l'effet de la déstabilisation n'est pas noté dans une mesure importante quelconque durant un stockage raisonnable et lors de l'utilisation de l'enzyme, mais devient très prononcé durant des traitements thermiques ultérieurs à l'utilisation de l'enzyme pour la formation d'un caillé.

Suivant l'invention, le traitement d'oxydation est réalisé de manière que l'enzyme conserve environ 30% au plus de son activité initiale de caillage du lait après traitement thermique pendant 1 heure à 60°C et au pH de 6,0. Le degré du traitement d'oxydation est déterminé par divers paramètres, tels que le pH du traitement, la température, la durée du traitement, etc., et il est réglé de manière que l'enzyme résultant du traitement soit apte à perdre au moins environ 70% de son activité initiale de caillage du lait lors du traitement thermique mentionné ci-dessus pendant 1 heure à 60°C et au pH de 6,0.

Le traitement d'oxydation est réalisé de façon convenable dans une solution aqueuse de l'enzyme. Cette solution peut être un bouillon de fermentation provenant de la production de l'enzyme, ou un concentré. Evidemment, le traitement de déstabilisation devrait être réalisé à un stade tel qu'il ne soit pas suivi par une phase quelconque de production impliquant des conditions qui pourraient prématurément éliminer la déstabilisation. Il est préférable que la solution aqueuse dans laquelle le traitement est réalisé contienne du chlorure de sodium en une concentration comprise entre 0,1 et 20% en poids/volume. On croit





qu'une concentration de chlorure de sodium de 10 à 20% en poids/volume contribue à la protection de l'enzyme durant le traitement d'oxydation, avec ainsi pour résultat une stabilité améliorée du produit au stockage.

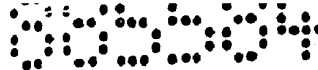
Le pH de la solution d'enzyme durant le traitement d'oxydation est convenablement de l'ordre de 3 à 7, de préférence de l'ordre de 3 à 6. Le réglage du pH est normalement réalisé par addition d'un acide organique ou minéral approprié.

En pratique, l'oxydation est habituellement réalisée en ajoutant un composé chimique d'un haut potentiel d'oxydation à la solution contenant l'enzyme. Bien qu'en principe tout composé chimique quelconque d'un haut potentiel d'oxydation puisse être envisagé comme étant intéressant dans le présent procédé, des composés d'un haut potentiel d'oxydation, qui conviennent spécialement bien et qui sont connus comme étant intéressants pour la modification de protéines (voir par exemple *Methods in Enzymology* 25, (1972), 393-400) sont les perchlorates, les perborates, les perbromates et les peroxydes.

Ces composés sont ajoutés au mélange de réaction en une concentration de l'ordre de 0,1 à 3% en poids/volume.

Un agent oxydant préféré pour le procédé est le peroxyde d'hydrogène que l'on ajoute à la solution d'enzyme à une concentration comprise entre 0,1 et 3%. Dans les formes de réalisation tout particulièrement préférées dont il est question par la suite, la concentration à laquelle on ajoute le H_2O_2 est d'environ 1% en poids/volume. On croit que cette faible concentration contribue à la stabilité améliorée au stockage du produit.

Le traitement d'oxydation peut être réalisé, de façon convenable, à n'importe quelle température comprise entre 0 et



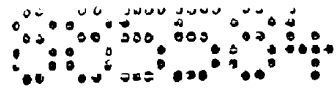
40°C mais, dans la plupart des cas, il est de préférence réalisé sans chauffage quelconque de la solution d'enzyme, c'est-à-dire, en d'autres mots, à la température ambiante d'environ 20°C.

La période pendant laquelle l'enzyme est incubé avec l'agent d'oxydation est de préférence d'au moins 1 heure et peut aller jusqu'à plusieurs heures ou jours. Sous des conditions à part cela identiques pour obtenir la déstabilisation, la stabilité du produit au stockage est d'autant meilleure que la période de traitement est plus courte.

Bien que le traitement d'oxydation puisse être relativement facilement réglé pour donner la déstabilisation désirée de l'activité protéolytique de l'enzyme, il faut veiller à ce que l'enzyme, malgré sa capacité de déstabilisation créée par le traitement d'oxydation, conserve une stabilité suffisante au stockage pour permettre celui-ci pendant des périodes raisonnables et pour permettre une manipulation de la manière traditionnelle dans les préparations d'enzymes de caillage du lait. On a constaté que la stabilité au stockage de l'enzyme traité par l'agent d'oxydation dépend dans une très grande mesure de la séparation effective de tout surplus quelconque de l'agent oxydant. Si le surplus d'agent oxydant n'est pas séparé de manière efficace après que l'on a atteint le degré désiré de traitement d'oxydation, la préparation enzymatique résultante aura tendance à présenter une mauvaise stabilité au stockage.

Suivant l'invention, la séparation de l'agent oxydant utilisé est de préférence réalisée par addition d'un agent réducteur ou d'un enzyme catalysant une réduction, en une quantité suffisante pour amener toute quantité résiduaire quelconque de



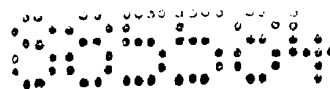


l'agent oxydant, par exemple de H_2O_2 , à moins de 1 partie par million dans le mélange de réaction. Lorsque l'agent oxydant est le H_2O_2 , sa quantité résiduaire peut être vérifiée grâce, par exemple, à la méthode "Peroxide Test Strips" de Merck, Darmstadt. On croit que la restriction que la teneur résiduaire quelconque de l'agent oxydant doit être amenée en dessous de 1 partie par million dans le mélange de réaction peut être considérée comme une condition très générale d'obtention d'une stabilité désirée au stockage de l'enzyme modifié, quelle que soit l'identité de l'agent oxydant utilisé.

Lorsqu'on utilise un agent réducteur pour la séparation de l'agent oxydant, il peut s'agir d'un agent réducteur traditionnel quelconque capable de réagir avec l'agent oxydant employé, par exemple du bisulfite de sodium, de l'acide ascorbique, des hypochlorites ou du nitrite de sodium. Bien que, du fait de l'utilisation finale envisagée de caillage du lait pour la préparation de fromages destinés à la consommation humaine, tous les réactifs utilisés doivent être choisis de telle manière que, dans les concentrations où ils peuvent réapparaître dans le produit final destiné à la consommation, ils soient physiologiquement acceptables, on peut signaler, d'une manière générale, que, du fait des quantités relativement faibles qui seront impliquées, le choix aussi bien de l'agent oxydant que de l'agent réducteur n'est relativement pas critique.

Suivant l'invention, on a constaté qu'il est particulièrement avantageux d'utiliser, comme agent pour séparer le surplus d'agent oxydant, un enzyme catalysant une réduction, en particulier une catalase. Les catalases sont des enzymes bien connus



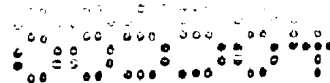


que l'on peut isoler de diverses sources, telles que le foie de boeuf, et de sources bactériennes et fongiques, voir par exemple "The Enzymes", édition P. Boyer, Academic Press, New York, 1975. Un autre enzyme catalysant une réduction, intéressant pour la séparation du surplus de l'agent oxydant, est la peroxydase et on peut se reporter à ce sujet à la même littérature que ci-dessus. Lorsqu'on utilise un enzyme catalysant une réduction, en particulier une catalase, pour séparer un surplus de peroxyde d'hydrogène, un mode pratique consiste à ajouter de petites proportions de catalase (par exemple 0,1 ml de la solution de catalase utilisée dans l'Exemple 1) à des intervalles de 1 heure jusqu'à ce que le niveau résiduaire de peroxyde d'hydrogène, tel que vérifié, par exemple, grâce à la méthode de Merck mentionnée ci-dessus, ait diminué jusqu'à 1 ppm ou moins.

Avant la séparation du surplus d'agent oxydant, le pH du mélange de réaction est convenablement ajusté pour favoriser cet enlèvement par l'agent particulier utilisé à cet effet. Lorsque l'enlèvement est réalisé grâce à une catalase, le pH du mélange de réaction est convenablement réglé à environ 4,5-7 avant l'addition de catalase. D'une façon générale, il est préférable de régler le pH à une valeur se situant dans la partie élevée de cet intervalle, par exemple à une valeur de l'ordre de 6 à 7.

Le traitement de modification suivant la présente invention comprend plusieurs paramètres, et la valeur particulière de chaque paramètre pour obtenir les résultats les meilleurs dépendra de divers facteurs, notamment de l'origine de l'enzyme à modifier, de l'identité de l'agent d'oxydation et de l'identité



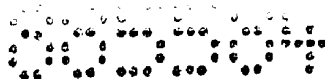


de l'agent employé pour séparer le surplus d'agent oxydant.

On a constaté, lorsque l'enzyme est une protéinase de *Mucor miehei*, que l'agent oxydant est le H_2O_2 et que l'agent utilisé pour séparer le surplus de H_2O_2 est une catalase, la concentration de chlorure de sodium du mélange de réaction est de préférence de l'ordre de 10% en poids/volume ou moins, la concentration de H_2O_2 est de préférence de l'ordre de 1% en poids/volume ou moins, la température de l'incubation avec le H_2O_2 est de préférence aussi élevée que possible tout en permettant encore d'obtenir une valeur raisonnable d'activité de caillage du lait, normalement une température de 20 à 40°C, et la durée d'incubation est de préférence de plusieurs jours (mais peut, à des températures plus élevées, devoir être raccourcie quelque peu tout en donnant un rendement raisonnable de traitement). Le pH lors du traitement avec une catalase est, comme mentionné précédemment, de préférence dans la partie supérieure de l'intervalle cité, par exemple à environ 6,6, et l'addition de catalase est de préférence réglée pour assurer une séparation efficace du H_2O_2 jusqu'à une concentration résiduaire de 1 ppm ou moins. Des traitements particuliers qui ont donné des enzymes modifiés très intéressants sont présentés par les Exemples.

L'enzyme modifié, préparé par le procédé de la présente invention, peut être caractérisé, de façon convenable, par les particularités définies dans les revendications 17 à 21. Les enzymes sont emballés et transportés de façon appropriée de la même manière que des compositions traditionnelles de coagulants microbiens, mais ils sera préférable d'éviter des températures trop élevées durant le stockage afin d'éviter une élimination

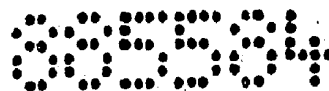




non voulue de leur déstabilisation. C'est pourquoi un stockage sous des conditions raisonnablement froides, de préférence des conditions de réfrigération, sera le stockage optimal. Lorsqu'on utilise les enzymes de la présente invention, on emploie leurs concentrations normales, telles que celles traditionnellement employées dans l'application particulière, et en outre, sous tous les autres rapports, on utilise les enzymes de la manière habituelle connue pour les coagulants microbiens.

La déstabilisation provoquée par le procédé de la présente invention peut, comme on l'a mentionné précédemment, être vérifiée par le test de chauffage pendant 1 heure à 60°C et au pH de 6,0. Cependant, suivant ce qui a été signalé précédemment, cela ne signifie pas nécessairement que la température accrue est la seule condition extrême qui assurera la déstabilisation des enzymes. Au contraire, il y a lieu de considérer qu'une déstabilisation provoquée est une déstabilisation générale qui se produira sous n'importe quelle condition extrême, notamment, à titre d'exemple le plus typique en dehors de la température élevée, sous des conditions extrêmes de pH, en particulier à des valeurs très basses de pH et à des valeurs très élevées de pH, par exemple à des valeurs de pH en dessous de 2 ou au-dessus de 9. Evidemment, l'influence d'un paramètre particulier sur la condition de stabilité de l'enzyme dépendra de la durée de cette influence, et sous ce rapport, par exemple, une courte période à un pH extrême peut correspondre à une plus longue période à un pH moins extrême.

On considère également que la déstabilisation se produira aussi à un degré suffisant même sous les conditions qui ne



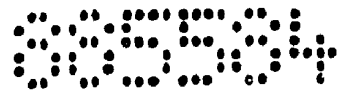
sont pas très extrêmes et qui prévalent dans un fromage lors d'un mûrissement de longue durée (par exemple de 2 mois et plus), ce qui signifie que l'enzyme déstabilisé montrera un intérêt généralement accru pour presque n'importe quelle production de fromage.

Les unités Anson dont il sera question ci-après sont déterminées de la manière bien connue, telle que décrite dans J. Gen. Physiol. 22, 79 (1938).

La méthode CHL pour la détermination de l'activité de caillage du lait (exprimée en unités CHU) est appliquée de la façon décrite dans J. Dairy Res., 43, 85, (1976), G.A.L. Rothe, N. H. Axelsen, P. Johnk, P. Foltmann : "Immunochemical, Chromatographic and Milk-Clotting Activity for Quantification of Milk-Clotting".

Exemple 1

Une solution enzymatique d'un enzyme de caillage du lait produit par le Mucor miehei (Rennilase 14 de la société Novo Industri A/S, Copenhague ; produit commercial contenant un enzyme en une concentration correspondant à environ 64 CHU/ml, que l'on mesure par la méthode CHL décrite ci-dessus, ainsi que des protéines, des hydrates de carbone et du chlorure de sodium) est mélangée avec du chlorure de sodium solide et une solution d'acide chlorhydrique, et elle est ensuite amenée à 97 ml avec de l'eau, la concentration finale de chlorure de sodium étant de 10%, le pH final étant de 4,4 et la concentration finale de l'enzyme étant de 10 CHU/ml. A une température de 20°C, on ajoute 2,3 ml d'une solution à 30% de H_2O_2 et on laisse reposer la solution de réaction à 20°C pendant 41 heures. Ensuite, on ajuste le

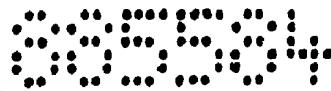


pH à 6,6 par addition d'une solution à 3% d'hydroxyde de sodium, et on ajoute 0,1 ml de catalase de foie de boeuf (que l'on peut obtenir de la société Worthington Biochemical Corp., concentration de catalase de 30.000 UI/ml). Le mélange résultant est incubé pendant 1 heure à la température ambiante (avec refroidissement pour maintenir la température à cette valeur ambiante). Comme on peut le vérifier grâce à la méthode "Peroxide Test Strips" la concentration de H_2O_2 est encore au-dessus de 1 ppm et on ajoute 0,1 ml supplémentaire de la solution de catalase, avec une incubation pendant 1 heure à la température ambiante. On constate alors que la concentration de H_2O_2 est inférieure à 1 ppm. L'activité de caillage du lait de l'enzyme de *Mucor miehei* ainsi traité est vérifiée suivant la méthode CHL décrite précédemment. On a constaté que l'activité de caillage du lait est de 104% de l'activité initiale de l'enzyme. Ensuite, le pH d'une partie du mélange est réglé à 6,0 avec de l'acide chlorhydrique, et le mélange est chauffé à 60°C pendant 1 heure. On a constaté qu'après ce court chauffage, l'activité de caillage du lait est de 27% de l'activité avant le chauffage. Une autre portion du mélange est stockée pendant 14 jours à 4°C. On a constaté que l'activité de caillage du lait est ensuite de 103% de l'activité avant la période de stockage.

Exemple 2

On suit le même procédé que dans le cas de l'Exemple 1, sauf que la température d'incubation avec le H_2O_2 est de 40° et que le réglage du pH, avant le traitement à la catalase, se fait au pH de 4,6. L'activité de caillage du lait est de 92% par rapport à l'activité initiale. L'activité de caillage du lait conservée





après le traitement thermique pendant 1 heure à 60°C et au pH de 6,0 est de 24%. La stabilité au stockage est la même que dans le cas de l'Exemple 1.

Exemple 3

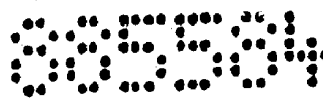
On suit le même procédé que dans le cas de l'Exemple 1, mais sous les exceptions suivantes : le pH à l'incubation au H_2O_2 est de 3,6, la température d'incubation est de 40°C, la durée d'incubation est de 1 heure et la quantité de la solution de catalase que l'on ajoute est de 0,1 ml. Le rendement du traitement de caillage du lait est de 106% comparativement à l'activité initiale et l'activité de caillage conservée après le traitement thermique pendant 1 heure à 60°C et au pH de 6,0 est de 33%. L'activité de caillage après 14 jours de stockage à 4°C est de 105% de l'activité avant la période de stockage.

L'addition graduelle de catalase que l'on réalise dans les Exemples précédents constitue la méthode préférée d'addition d'un enzyme de neutralisation du peroxyde, car les peroxydes ont en eux-mêmes une tendance à détruire de tels enzymes. En outre, l'addition de la catalase sous des conditions modérées (c'est-à-dire lentement, graduellement et avec refroidissement) contribue, croit-on, à la stabilité du produit de stockage.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de déstabilisation de l'activité protéolytique des enzymes de caillage du lait destinés à une utilisation dans la production de fromages, caractérisé en ce qu'il consiste à soumettre un tel enzyme à un traitement d'oxydation à un degré qui ne réduit pas sensiblement l'activité de caillage du lait comparativement à l'activité de l'enzyme non traité, et qui per-





met de conserver sensiblement la stabilité de l'enzyme au stockage.

2. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le traitement d'oxydation est réalisé à un degré tel que l'enzyme conserve environ 30% au plus de son activité initiale de caillage du lait après traitement thermique pendant 1 heure à 60°C et au pH de 6,0.

3. Procédé suivant la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la préparation d'enzyme soumise au traitement d'oxydation est une solution aqueuse de l'enzyme.

4. Procédé suivant la revendication 3, dans lequel la solution aqueuse contient du chlorure de sodium en une concentration comprise entre 0,1 et 20% en poids/volume.

5. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 3 et 4, dans lequel le pH de la solution d'enzyme est de 3 à 7, de préférence de 3 à 5.

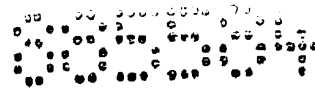
6. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'oxydation est réalisée par addition d'un composé chimique d'un haut potentiel d'oxydation.

7. Procédé suivant la revendication 6, dans lequel le composé chimique est choisi parmi les perchlorates, les perborates, les perbromates, et les peroxydes.

8. Procédé suivant la revendication 7, dans lequel le composé en question est ajouté au mélange de réaction en une concentration de 0,1 à 3% en poids/volume.

9. Procédé suivant la revendication 8, dans lequel l'oxydation est réalisée par addition de H_2O_2 à une concentration de 0,1-3%, de préférence d'environ 1%.

10. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la température lors du traitement d'oxy-



dation est comprise entre 0 et 40°C, en étant de préférence d'environ 20°C.

11. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'enzyme est traité avec l'agent oxydant sur une période d'au moins 1 heure.

12. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le mélange de réaction, après le traitement d'oxydation, est soumis à une opération de séparation de tout surplus quelconque de l'agent oxydant utilisé.

13. Procédé suivant la revendication 12, dans lequel la séparation du surplus d'agent oxydant est réalisée par addition d'un agent réducteur ou d'un enzyme catalysant une réduction.

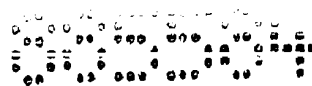
14. Procédé suivant la revendication 13, dans lequel l'agent oxydant est un peroxyde et la réduction du peroxyde est réalisée par addition de catalase à titre d'enzyme catalysant une réduction.

15. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 12 à 14, dans lequel, avant la séparation du surplus d'agent oxydant, le pH du mélange de réaction est ajusté pour favoriser cette séparation de l'agent oxydant.

16. Procédé suivant la revendication 15, dans lequel l'agent oxydant est un peroxyde et la séparation de celui-ci est réalisée grâce à une catalase, ce procédé comprenant l'ajustement du pH du mélange de réaction, avant l'addition de la catalase, à une valeur d'environ 4,5-6,5.

17. Procédé suivant la revendication 13, dans lequel la séparation du surplus d'agent oxydant est réalisée par addition d'un enzyme catalysant une réduction, ce procédé comprenant





la réalisation de la séparation par addition de l'enzyme par portions, avec une incubation suivant l'addition de chaque portion.

18. Procédé suivant la revendication 17, dans lequel l'agent oxydant est du H_2O_2 et l'enzyme catalysant la réduction est une catalase.

19. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 12 à 18, dans lequel l'agent oxydant est séparé à un degré tel que toute quantité résiduaire quelconque de cet agent ne dépasse pas 1 ppm, cette valeur étant calculée par rapport au mélange de réaction.

20. Enzyme microbien de caillage du lait, destiné à une utilisation dans la production de fromages et montrant une activité de caillage du lait d'au moins 20 unités CHU/mg de protéines enzymatiques et une activité protéolytique, telle que mesurée en milli-unités Anson, qui est au plus de 1/10 de l'activité de caillage du lait exprimée en unités CHU, l'enzyme ayant été rendu apte à perdre au moins environ 70% de son activité initiale de caillage du lait par traitement thermique pendant 1 heure à 60°C et au pH de 6,0, grâce à un traitement d'oxydation.

21. Enzyme suivant la revendication 20, qui montre une activité de caillage du lait d'environ 26 unités CHU/mg de protéines enzymatiques et une activité protéolytique d'environ 1,6 milli-unité Anson.

22. Enzyme suivant la revendication 20 ou 21, qui est un enzyme dérivant d'un Mucor.

23. Enzyme suivant la revendication 22, qui est un enzyme dérivant de Mucor miehei.

24. Enzyme de caillage du lait, dérivant d'un Mucor



et destiné à une utilisation dans la production de fromages, cet enzyme ayant été rendu capable de perdre au moins 70% de son activité initiale de caillage du lait après traitement thermique pendant 1 heure à 60°C et au pH de 6,0, grâce à un traitement d'oxydation.

25. Enzyme suivant l'une quelconque des revendications 20 à 24, se trouvant dans une solution aqueuse contenant du chlorure de sodium, des protéines et des hydrates de carbone.

26. Composition d'enzyme à utiliser dans la production de fromages, consistant en une solution aqueuse d'un enzyme de caillage du lait, contenant du chlorure de sodium, des protéines et des hydrates de carbone, l'enzyme étant de l'un des types suivant l'une quelconque des revendications 20 à 25.

Bruxelles, le 8 octobre 1980

P.Pon de Chr. Hansen's Laboratorium A/S

P.Pon du Bureau GEVERS, société anonyme

A handwritten signature in dark ink, appearing to be 'P. Pon', written over a horizontal line.