

Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages

II. — INFLUENCE DE LA PRESURE COMMERCIALE

par

J. C. GRIPON, M. J. DESMAZEAUD, D. LE BARS
et J. L. BERGERE

*Laboratoire de Biochimie Microbienne
Institut National de la Recherche Agronomique, C.N.R.Z.
78350 Jouy-en-Josas (France)*

INTRODUCTION

Afin d'analyser le phénomène de la protéolyse sous l'action des enzymes microbiennes au cours de la maturation, il est indispensable de connaître au préalable la part prise par la présure dans ces transformations.

Or, bien que plusieurs études aient décrit l'action de la présure sur des solutions de caséine (Vanderpoorten et Weckx, 1972 ; Itoh et Thomasow, 1971 ; El-Negoumy, 1968 et 1970 ; Mickelsen et Fish, 1970 ; Pélissier et *al.*, 1974) peu d'essais ont été réalisés afin de déterminer l'action de cette enzyme seule dans les caillés de fromagerie. Seuls Reiter et *al.* (1969) puis Green et Foster (1974) ont étudié l'influence de la présure dans des caillés sans levains proche des fromages de Cheddar ou d'Edam.

La mise au point d'un caillé-modèle sans aucun développement microbien (Le Bars et *al.*, 1975) nous a donc donné la possibilité d'étudier d'une façon précise les transformations des caséines dues à la présure seule sans interférence avec l'action des levains et des micro-organismes habituellement présents dans les fromages.

Ce mémoire décrit donc de manière quantitative, l'apparition des produits obtenus par action de la présure commerciale au cours de l'affinage des fromages.

Afin de recueillir un maximum d'informations, trois groupes de méthodes ont été employées simultanément : par précipitations fractionnées (Mogensen, 1948 ; Lenoir, 1962) — par chromatographie sur

gel en présence (Fisch et *al.*, 1970) ou non d'agent dissociant — par électrophorèse sur gel double de polyacrylamide-agarose.

MATERIEL ET METHODES

1) « Caillé-modèle » aseptique

La technique de fabrication des caillés aseptiques a été décrite précédemment, la dose de présure (Boll) stérile au 1/5000 utilisée, étant de 10 ml pour 10 l de lait (Le Bars et *al.*, 1975).

2) Remise en suspension du fromage. Dosage des différentes formes d'azote

2.1. Solution citratée de fromage. Dosage de l'azote total

On ajoute 40 ml d'une solution de citrate de sodium 0,5 M de pH 7,0, à 10 g de fromage et l'on porte au bain-marie à 40° C. Deux broyages consécutifs de 30 s sont réalisés à l'aide d'un broyeur ultra-rapide (Ultra-Turrax) puis la solution est refroidie à 22° C. Le volume est alors ajusté à 200 ml, après transvasement dans une fiole jaugée, par de l'eau distillée. Sur une partie aliquote de cette solution citratée on effectue le dosage de l'azote total (N.T.), après minéralisation, par la méthode micro-Kjeldahl.

2.2. Dosage de l'azote soluble

A 150 ml de la solution citratée décrite ci-dessus, on ajoute goutte-à-goutte de l'acide chlorhydrique N afin d'abaisser le pH de la solution à une valeur de 4,40. Après agitation douce pendant 20 mn à la température ambiante et réajustement du pH si nécessaire, on amène le volume final de la solution à 200 ml avec de l'eau distillée. On filtre deux fois de suite en utilisant le même filtre (Whatman n° 42). La solution limpide représente l'azote soluble (N.S.) que l'on dose après minéralisation d'une aliquote, par la méthode Kjeldahl.

2.3 Dosage de l'azote non protéique

A 16 ml de la solution limpide contenant l'azote soluble décrite ci-dessus, on ajoute 4 ml d'une solution à 60 g d'acide trichloracétique pour 100 ml d'eau distillée. Après 1 h de contact à la température ambiante, le précipité obtenu est éliminé sur filtre Whatman n° 42. La solution limpide représente l'azote non protéique (N-NP) que l'on dose après minéralisation d'une aliquote, par la méthode Kjeldahl.

2.4. Dosage de l'azote soluble après précipitation à l'acide phosphotungstique

A 5 ml du filtrat limpide correspondant à l'azote soluble on ajoute 2,5 ml d'une solution d'acide phosphotungstique à 10 p. 100

en eau distillée et 2,5 ml d'une solution d'acide sulfurique à 25 p. 100 (v/v). Après 24 h de contact à la température ambiante, le précipité obtenu est éliminé sur filtre Whatman 42. La solution limpide représente l'azote soluble après précipitation à l'acide phosphotungstique (N-SAPT) elle comprend des peptides de bas poids moléculaire et les acides aminés à l'exclusion des acides diaminés (Mogensen, 1948). Cette fraction azotée est dosée après minéralisation d'une aliquote par la méthode Kjeldahl.

3) Fractionnement des produits d'hydrolyse du caillé par la présure, par chromatographie sur gel

3.1. La fraction azotée soluble à pH 4,6 a été fractionnée en sept classes de poids moléculaire par chromatographie sur gel Sephadex G-25 (Pharmacia). 6,3 ml d'échantillon concentré, correspondant à 7,5 mg d'azote, étaient déposés au sommet d'une colonne 114 × 2,8 cm de Sephadex G-25 *medium* équilibrée en acide acétique M. L'élution était réalisée par le même solvant avec une vitesse d'écoulement de 50 ml/h. Le volume des fractions recueillies était de 9 ml. Le repérage des fractions était effectué par enregistrement en continu à 280 et 254,5 nm de la densité optique de l'éluat et par mesure de la densité optique à 570 nm après coloration à la ninhydrine effectuée sur une partie aliquote de 0,2 ou 1 ml (Moore et Stein, 1954). Les fractions étaient regroupées en sept classes de poids moléculaire et l'azote contenu dans chacune d'elles était dosé après minéralisation d'une partie aliquote par la méthode Kjeldahl.

La colonne était étalonnée dans les mêmes conditions en utilisant la caséine (donnant le V_0), un inhibiteur trypsique (8 400 daltons), le glucagon (3 485 daltons), la bacitracine (1 411 daltons), le tryptophane et la glycine.

3.2. La fraction azotée insoluble à pH 4,6 a été fractionnée en neuf classes de poids moléculaires par chromatographie sur gel Bio-gel A 5 m en présence de dissociant selon la méthode de Fish et *al.* (1970). 3 ml d'échantillon concentré, correspondant à environ 7 mg d'azote étaient dégraissés en présence de 50 ml d'éther éthylique. Après remise en solution dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M contenant 1 p. 100 de sodium dodecyl sulfate (S.D.S.) l'échantillon était réduit en présence de 1 p. 100 de β -mercapto-éthanol, par incubation à 65° C pendant 10 mn. Après refroidissement il était déposé au sommet d'une colonne 100 × 2 cm de Bio-gel A 5 m (100-200 mesh) équilibrée en tampon phosphate de sodium 0,1 M contenant 1 p. 100 de S.D.S. L'élution était réalisée par ce même tampon avec une vitesse d'écoulement de 12 ml/h. Le volume des fractions recueillies était de 3 ml. Le repérage des substances éluées était effectué par enregistrement en continu à 280 nm. Les fractions étaient regroupées en neuf classes de poids moléculaire et l'azote contenu dans chacune

d'elles était dosé après minéralisation d'une partie aliquote par la méthode Kjeldahl.

La colonne était étalonnée dans les mêmes conditions en utilisant le Blue-Dextran 2 000 (Pharmacia) (V_0), la sérum-albumine bovine (69 000 daltons), la ribonucléase (13 000 daltons) et le glucagon (3 485 daltons).

4) Fractionnement par électrophorèse des caséines et des produits d'hydrolyse insolubles à pH 4,6

20 ml d'une solution citratée de fromage préparée comme précédemment étaient acidifiés à pH 4,4 par addition d'acide acétique pur. Après 30 mn d'agitation, les protéines étaient récupérées par centrifugation puis reprises dans 5 ml d'urée 9 M contenant 1 p. 100 de β -mercaptoéthanol. Le pH était ajusté à 7,0 et la solution obtenue était dégraissée par addition de 20 ml de tétrachlorure de carbone selon Assenat (1967).

L'électrophorèse était réalisée en gel double d'acrylamide agarose selon la technique d'Uriel (1966) modifiée par l'utilisation d'urée. Avant électrophorèse les plaques de gel (Sebia) étaient réhydratées pendant 16 h en tampon Tris-glycine (Uriel, 1966) contenant de l'urée 4,5 M et 0,1 p. 100 de β -mercaptoéthanol.

L'échantillon obtenu après dégraissage était mélangé avec un volume égal d'agarose 4 p. 100 préalablement fondu puis introduit dans un réservoir creusé dans le gel. La présence d'urée 4,5 M dans le mélange échantillon-agarose empêche à la température ordinaire la gélification de l'agarose. Celle-ci était réalisée par incubation préalable des plaques à 4° C pendant 15 mn.

L'électrophorèse avait lieu à 4° C pendant 3 h sous une tension de 13 volts/cm. Les protéines étaient colorées par le bleu de Coomassie R 250 (Uriel, 1966), puis les gels décolorés dans le mélange méthanol, acide acétique, glycérol, eau (200/50/30/720 ; v/v/v) contenant de la résine Dowex 1 \times 2. Une analyse quantitative des plaques était effectuée sur un densitomètre enregistreur (Vernon). La surface de chaque pic a été mesurée et exprimée en p. 100 de la surface de l'ensemble des pics.

RESULTATS ET DISCUSSION

1) Evolution du pH et des différentes formes d'azote

Les variations de pH observées dans les fromages aseptiques ne subissant que l'action de la présure commerciale sont très faibles. En effet une augmentation de 0,2 unité pH seulement était observée au bout de 20 j (fig. 1).

Les variations des teneurs en azote non protéique et en azote soluble dans l'acide phosphotungstique sont faibles ; leur maximum atteint à 20 j étant respectivement de 6 et 2 p.100 de l'azote total (fig. 1). Par contre, l'azote soluble total à pH 4,6 augmente régulièrement traduisant la libération continue par la présure de peptides jusqu'à 48 j d'affinage. Ainsi, l'azote soluble total peut représenter jusqu'à 18 p.100 de l'azote total du fromage (fig. 1).

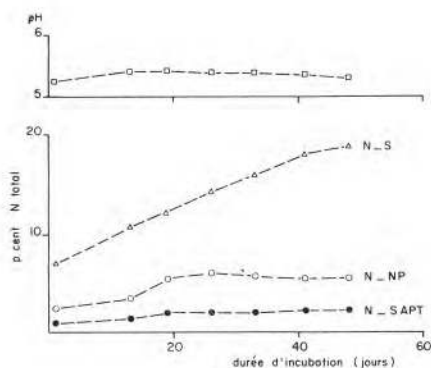


fig. 1

Courbes d'évolution du pH et de l'apparition des différentes fractions azotées sous l'influence de la présure.

2) Etude de la fraction azotée soluble à pH 4,6

Après 40 j d'affinage sous l'influence exclusive de la présure commerciale, 72 p.100 de la fraction azotée soluble à pH 4,6 sont représentés par des peptides de poids moléculaire apparent supérieur à 3 000 daltons (fig. 2) ; les peptides de poids moléculaire moyen (3 000 à 1 000 daltons) ne représentent que 19 p.100 de cette fraction azotée soluble totale. Quant aux très courts peptides et acides aminés aromatiques ou non, ils ne représentent que 9 p.100 de cette fraction. Il apparaît donc que les acides aminés ou les peptides de faible poids moléculaire (inférieur à 3 000 daltons) ne représentent que 28 p.100 de cette fraction, soit environ 5 p.100 de l'azote total. Ceci est en bonne concordance avec les résultats obtenus précédemment par précipitation puisque l'azote non protéique ne représente que 6 p.100 de l'azote total (fig. 1).

3) Etude par chromatographie de la fraction azotée insoluble à pH 4,6

La formation d'agrégats par les caséines ou leurs produits d'hydrolyse nécessite la présence d'un agent dissociant au cours de la chro-

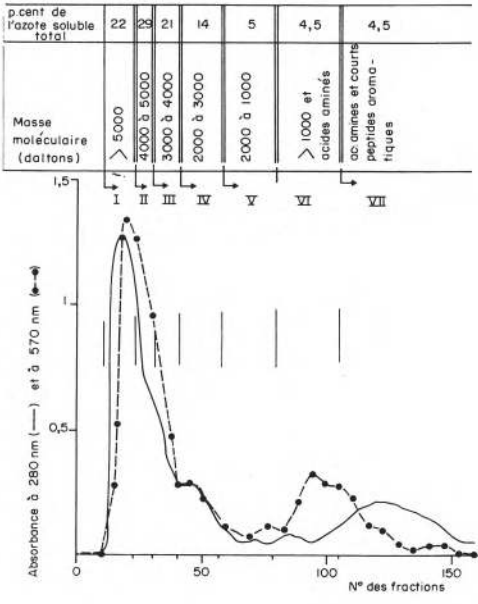


fig. 2

Chromatographie sur Sephadex G-25 de la fraction azotée soluble à pH 4,6 d'un fromage de 40 j.

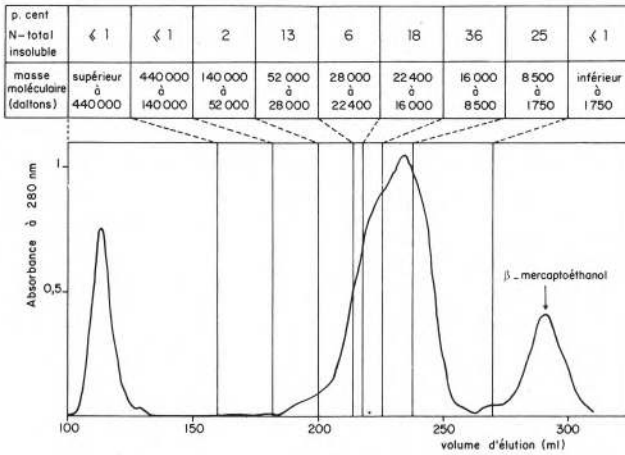


fig. 3

Chromatographie sur Bio-Gel A-5 m de la fraction azotée insoluble à pH 4,6 d'un fromage de 40 j

matographie d'exclusion-diffusion. Le dosage par la méthode de micro-Kjeldahl des fractions de l'éluat, est incompatible avec l'usage d'un dissociant contenant de l'azote : urée (Foster et Green, 1974) ou chlorure de guanidine. Aussi, le sodium dodecyl sulfate (S.D.S.) a-t-il été employé.

Dans ces conditions, les protéines perdent leur structure globale et leur chaîne peptidique se déroule (Davison, 1968) ; cependant en utilisant un gel d'agarose faiblement réticulé on conserve une relation linéaire entre le volume d'éluion des protéines et le logarithme de leur poids moléculaire (Fish et *al.*, 1969 et 1970).

En présence de S.D.S. la chromatographie sur agarose ne permet pas de séparer la fraction insoluble en plusieurs pics. L'étalonnage de la colonne par les protéines étalons nous donne cependant la possibilité de classer les protéines de l'éluat en fonction de leur poids moléculaire (fig. 3). Les fractions du poids moléculaire inférieur à 16 000 daltons qui représentent les caséines dégradées forment 61 p.100 de l'azote insoluble. A l'intérieur de cette catégorie les fractions de poids moléculaire inférieur à 8 500 daltons représentent 25 p.100 de l'azote insoluble.

Les caséines non dégradées (P.M. > 16 000 daltons) représentent 39 p.100 de l'azote insoluble à pH 4,6 soit 32 p.100 de l'azote total. Toutefois la présence de fractions de poids moléculaire compris entre 58 000 et 28 000 daltons incite à penser que la dissociation des molécules de caséine et de leurs produits d'hydrolyse n'est pas totale. La valeur de 32 p.100 de caséines non dégradées est donc surestimée. Il apparaît ainsi que la majorité des molécules de caséines ont été modifiées par la présure après 40 j d'affinage. La dissociation incomplète des caséines ou de leurs produits d'hydrolyse a déjà été observée par Foster et Green (1974) en présence d'urée sur gel de Sephadex G-100, la majeure partie des protéines étant éluee à des poids moléculaires apparents voisins de 43 à 30 000 daltons.

4) Etude électrophorétique de l'action de la présure

La figure 4 représente les enregistrements densitométriques des électrophorèses obtenues à partir du lait chauffé utilisé pour la fabrication des fromages après 1, 20 et 40 j d'affinage à 12° C.

Dans les fromages de 24 h on observe la présence des paracaséines dues à l'action spécifique de la présure sur la caséine γ mais également une modification profonde au niveau de la caséine α_{s1} . La surface du pic correspondant à cette caséine est diminuée d'environ 40 p.100 et un pic de surface comparable mais de mobilité un peu supérieure (α_{s1} I) est apparu. Après 20 j d'affinage la caséine α_{s1} a pratiquement disparu et le pic correspondant à la caséine β voit sa surface diminuer d'environ 1/4. α_{s1} I représente alors environ 35 p.100 de la surface totale des pics. Des produits de dégradation

de forte mobilité (X_3 , X_4) et de mobilité intermédiaire à β et α_{S1} (βI , X_7 , X_2) sont apparus. Peu de modifications apparaissent dans les 20 j qui suivent : après 40 j d'affinage on observe seulement une intensification des bandes βI , X_7 , X_2 , X_4 et une légère diminution de $\alpha_{S1} I$ et β .

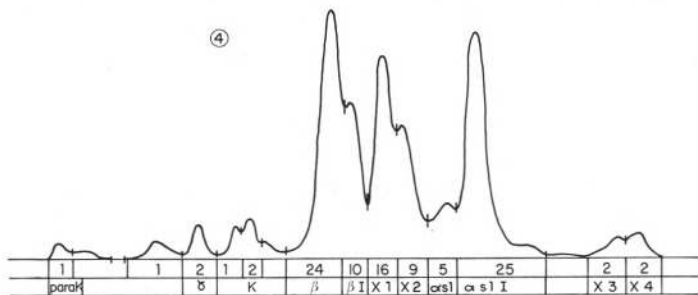
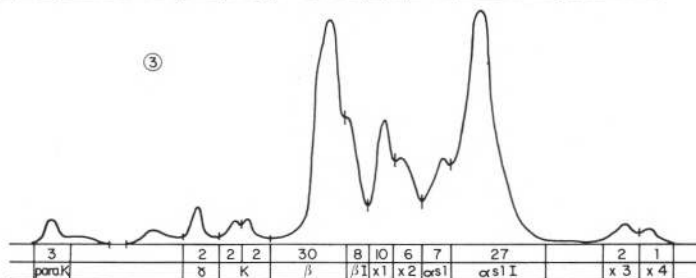
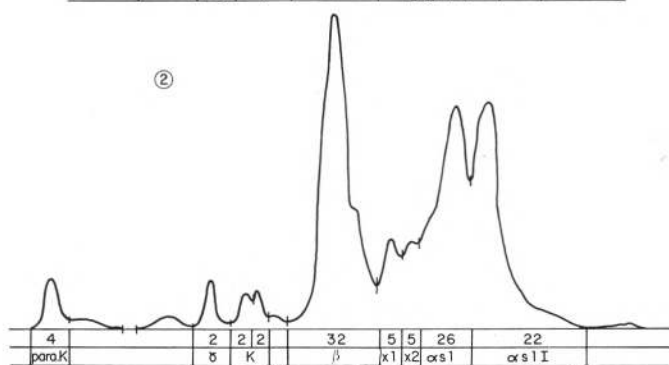
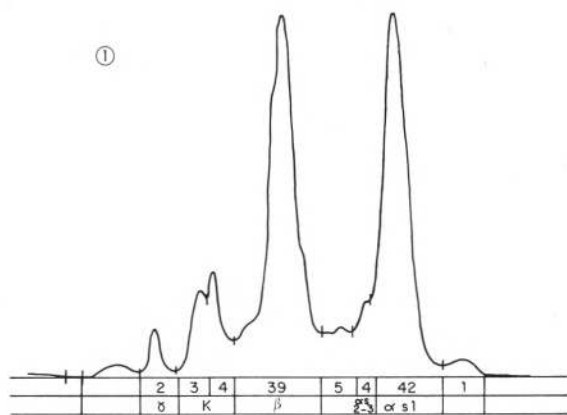
Il apparaît donc que la présure engendre des modifications profondes des caséines puisque en fin d'affinage α_{S1} est pratiquement entièrement dégradée et le pic correspondant à β voit sa surface diminuer de plus de 1/3.

Afin d'identifier les produits de dégradation apparus nous avons comparé l'action de la présure dans les caillés avec son action sur des solutions de caséines purifiées. L'incubation de la présure commerciale utilisée avec la caséine entraîne l'apparition successive de trois bandes βI , βII , βIII , de mobilité supérieure à β (fig. 4). Ce diagramme est identique à celui observé par Creamer et al. (1971) avec de la présure purifiée. Le composé βI que nous avons observé sur la caséine β purifiée possède la même mobilité électrophorétique que le composé βI obtenu dans le fromage affiné. Il s'agit donc très probablement de produits de dégradation identiques.

Selon Creamer et al. (1971) ce peptide βI aurait une masse moléculaire inférieure d'environ 2 000 daltons à celle de la caséine β . Pélissier et al. (1974) ont identifié ce peptide sur la caséine βB comme étant le fragment Arg₁ - Ser₁₀₄.

De même sur la caséine α_{S1} en solution la présure commerciale utilisée libère un composé $\alpha_{S1} I$ de mobilité identique à celle de la bande $\alpha_{S1} I$ obtenue dans les caillés. L'apparition d'un composé de mobilité un peu supérieure à α_{S1} et assimilable à $\alpha_{S1} I$ a été observée par plusieurs auteurs (Mickelsen et Fish, 1970 ; Fox, 1969 ; Itoh et Thomasow, 1971) à partir de solutions de caséine entière hydrolysée par de la présure commerciale non purifiée. Hill et al. (1974) ont observé que la liaison Phe₂₈-Phe₃₁ de la caséine α_{S1} est extrêmement sensible à l'action de la présure. La bande $\alpha_{S1} I$ correspond très probablement à l'hydrolyse de cette liaison.

Il apparaît donc que les composants de dégradation principaux (βI et $\alpha_{S1} I$) obtenus dans un caillé par action de la présure sont identiques à ceux obtenus par la même enzyme sur des caséines purifiées en solution. Par conséquent, la différence de structure physique du substrat dans ces deux milieux d'hydrolyse ne se traduit pas, en ce qui concerne les principaux produits d'hydrolyse, par des différences qualitatives, du moins par la méthode utilisée. Sur des caséines en solution, caséine α_{S1} et β purifiées, caséine entière, micelles sans caséines β , lait sans phosphate colloïdal, lait écrémé, Fox et Guiney (1973) ont constaté que l'intensité de la protéolyse diminuait lorsque la complexité et le degré d'agrégation du substrat augmentait mais ont obtenu, par électrophorèse comme dans notre cas, des



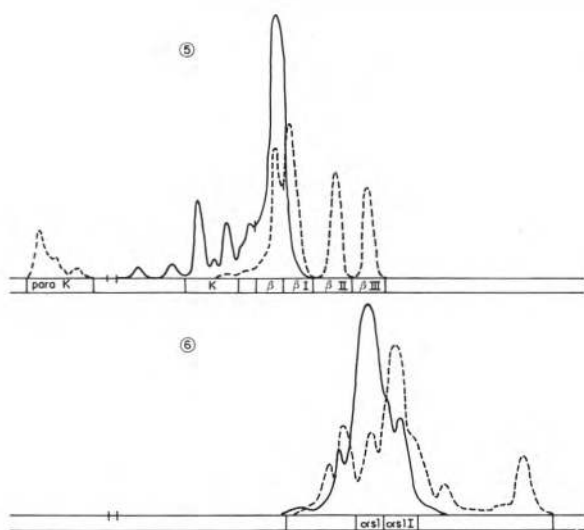


fig. 4

Electrophorèse des produits insolubles à pH 4,6

- 1 : Lait de fabrication (après chauffage).
 2 : Caillé aseptique de 1 j.
 3 : Caillé aseptique après 20 j d'affinage.
 4 : Caillé aseptique après 40 j d'affinage.
 5 : Caséine β hydrolysée par la présure :
 Substrat à 2 p. 100 en tampon acétate 0,05 M pH 5,2.
 Concentration finale en présure : présure commerciale diluée 10 fois.
 ——— Témoin.
 - - - - Hydrolysats 15 mn à 35° C.
 6 : Caséine α_{s1} hydrolysée par la présure :
 Substrat à 2 p. 100 en tampon acétate 0,05 M pH 5,2.
 Concentration finale en présure : présure commerciale diluée 10 fois.
 ——— Témoin.
 - - - - Hydrolysats 15 mn à 35° C.

produits de dégradation de mobilité indépendante de l'état physique du substrat.

Il est à noter que nous n'avons pas remarqué de différence (par électrophorèse) entre l'hydrolyse des caséines α_{s1} et β en solution par la présure commerciale utilisée ou par la présure purifiée. Ceci traduit soit l'absence ou du moins la présence en faible quantité de pepsine bovine dans la préparation commerciale utilisée, soit un mode d'action très similaire de ces deux enzymes sur les caséines. Fox (1969) sur des caséines en solution n'avait pas observé de différence notable entre l'action de la présure et celle de la pepsine bovine.

L'influence éventuelle de protéase dans le lait de fabrication (protéases du lait ou protéases sécrétées par des micro-organismes préalablement au traitement thermique) a été testée en incubant le lait chauffé pendant 1 mois, à 12° C en présence du mélange d'antibiotiques utilisé pour la préparation du caillé. L'électrophorégramme de ce lait présente des différences avec celui d'un lait non incubé. On constate la présence de composés de forte mobilité électrophorétique ainsi qu'une diminution sensible de la surface des pics des caséines β et α_{S1} . Toutefois aucun des principaux produits de dégradation décrits ci-dessus n'est présent ce qui donne à penser que l'influence des enzymes autres que la présure reste très faible par rapport à l'action de cette dernière dans les caillés aseptiques. En outre, le pH des caillés est beaucoup moins favorable à l'action de la protéase du lait que celui du lait.

CONCLUSIONS

La mise au point d'un caillé aseptique sans développement de micro-organismes a rendu possible l'étude et la caractérisation du rôle de la présure sans interférence avec les protéases microbiennes libérées au cours de la maturation.

Les différentes méthodes utilisées conduisent à un ensemble cohérent de résultats qui permet de définir le mode d'action général de la présure dans les fromages.

Il apparaît que la présure libère principalement des peptides de haut poids moléculaire (fig. 5). En effet, la chromatographie de la fraction insoluble à pH 4,6 a montré que les peptides de poids moléculaires inférieurs à 16 000 daltons représentent plus de 61 p. 100 de celle-ci (soit 50 p. 100 de l'azote total). D'autre part, les petits peptides sont libérés en faible quantité : la fraction azotée soluble

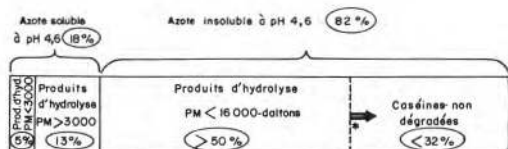


fig. 5

Répartition des différentes formes d'azote en fonction de leur poids moléculaire (déterminé par filtration sur gel) et de leur solubilité à pH 4,6 après 40 j d'affinage. Pourcentages exprimés en p. 100 d'azote total.

* Imprécision due à l'agrégation résiduelle des produits d'hydrolyse au cours de la chromatographie.

à pH 4,6 comprend moins de 28 p. 100 de peptides de poids moléculaire inférieur à 3 000 daltons (soit 5 p. 100 de l'azote total). Ceci est confirmé par les précipitations fractionnées qui montrent que les taux d'azote non protéique et d'azote soluble dans l'acide phosphotungstique restent très faibles (6 et 2 p. 100 de l'azote total). Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par Reiter et *al.* (1969) ainsi que Green et Foster (1974) qui ont conclu que la présure libérait principalement des peptides de haut poids moléculaire.

La libération des peptides par la présure seule est suffisamment importante pour atteindre des valeurs d'azote soluble comparables à celles obtenues dans les fabrications classiques, par exemple de Saint-Paulin. En effet, pour des fromages de Comté, Camembert et Saint-Paulin affinés, Lenoir (1963) a montré que l'azote soluble atteignait respectivement 30 p. 100, 32 p. 100 et 18 p. 100 de l'azote total. Ainsi, l'action de la présure constitue un phénomène essentiel dans la protéolyse du fromage au cours de la maturation. La présure reste active dans les caillés puisque l'azote soluble augmente régulièrement jusqu'à 48 j. De même, Green et Foster (1974) ont démontré dans des Cheddar fabriqués aseptiquement que l'action de la présure se poursuit sur des périodes plus longues allant jusqu'à 7 mois. Ces conclusions sont en désaccord avec celles de Ledford et *al.* (1966) qui, sur des fromages fabriqués sans bactéries lactiques ont conclu qu'après 5 j d'affinage la présure n'agissait plus dans les fromages. De même plus récemment Dulley (1974) a postulé qu'elle était à une concentration trop faible pour être active.

L'action de la présure se manifeste principalement sur la caséine α_{s1} puisque après 20 j d'affinage celle-ci est en proportion très faible dans les diagrammes d'électrophorèse. En outre, l'action sur cette caséine est très rapide puisque 1 j après la fabrication, 40 p. 100 de celle-ci sont déjà modifiés en un composant de mobilité supérieure (α_{s1} I). Ceci traduit probablement l'existence d'une liaison très sensible au niveau de cette molécule (Hill et *al.*, 1974). La caséine β est moins sensible, en effet seulement 35 p. 100 de cette caséine ont disparu après 40 j d'affinage. Évaluée par densitométrie après électrophorèse, la fraction restante de cette caséine représente 25 p. 100 de l'azote insoluble (soit environ 20 p. 100 de l'azote total). Cette valeur est assez voisine de celle des caséines non dégradées obtenue par filtration sur gel : moins de 32 p. 100 de l'azote total. Ceci confirme bien le fait observé par électrophorèse que la caséine β constitue la majeure partie des caséines non dégradées.

Remerciements

Nous remercions M. Hermier pour les suggestions et critiques qu'il a fait à propos de ce travail. Nous remercions également Mlle Marie-Françoise Outurquin et Mme Catherine Ansel-Lespinnasse qui ont participé à ce travail en tant que stagiaires.

Résumé

Le rôle de la présure dans la maturation des fromages a été étudié dans un caillé aseptique où n'intervient aucun développement de micro-organisme, par conséquent en l'absence de protéase microbienne.

La dégradation des caséines dans les caillés a été suivie simultanément par précipitations fractionnées, chromatographie sur gel en présence ou non de dissociant, et électrophorèse en gel d'acrylamide-agarose.

La libération des peptides par la présure seule est suffisamment importante pour atteindre des valeurs d'azote soluble à pH 4,6 comparables à celles obtenues dans les fabrications classiques (par ex. le Saint-Paulin).

La présure libère principalement des peptides de haut poids moléculaire. Les petits peptides de poids moléculaire inférieur à 3 000 ne représentent que 5 p. 100 de l'azote total après 40 j d'affinage.

L'action de la présure se manifeste principalement sur la caséine α_{s1} . Après 20 j d'affinage celle-ci a pratiquement disparu des diagrammes d'électrophorèse. Par contre la caséine β est plus résistante et représente la majeure partie des caséines non dégradées : les 2/3 de celle-ci ne sont pas attaqués après 40 j d'affinage.

Summary

An aseptic model curd free of micro-organisms was used to study the action of rennet without microbial proteases interference during cheese ripening.

Casein degradation was followed with several methods : precipitation techniques, gel filtration column with and without dissociating solvent system and acrylamide agarose gel electrophoresis.

The release of peptides in curds by rennet itself is sufficient to obtain soluble nitrogen (pH 4.6) values similar to those obtained with commercial cheeses (for example : Saint-Paulin).

Rennet mainly yields high molecular weight peptides. After 40 days of ripening, low molecular weight peptides (MW < 3 000 daltons) represent only 5 p. 100 of the total nitrogen.

α_{s1} -casein is extensively degraded and has nearly disappeared after 20 days of ripening. β -casein is more resistant, after 40 days of ripening 2/3 of this casein remain unaltered representing the major part of intact caseins.

Reçu pour publication en mai 1975.

Références bibliographiques

- ASSENAT (L.) (1967). — Contribution à l'étude d'une méthode d'identification des laits et fromages au moyen de l'électrophorèse sur gel de polycrylamide. *Le Lait*, 47, 393-414 et 495-502.
- CREAMER (L. K.), MILLS (O. E.) and RICHARDS (E. L.) (1971). — The action of rennet on the caseins. I. Rennin action on β -casein B in solution. *J. Dairy Res.*, 38, 269-280.
- DAVISON (P. F.) (1968). — Proteins in denaturing solvents : gel exclusion studies. *Science*, 161, 906-907.
- DULLEY (J. R.) (1974). — The contribution of rennet and starter enzymes to proteolysis in cheese. *Austr. J. Dairy Technol.*, 29, 65-69.
- EL-NEGOMY (A. M.) (1968). — Starch gel electrophoresis of products of action of crystalline rennin on casein and its components. *J. Dairy Sci.*, 51, 1013-1017.
- EL-NEGOMY (A. M.) (1970). — The tertiary phase of rennin action on α_s — and β -caseins. *J. Dairy Res.*, 37, 437-444.
- FISH (W. W.), MANN (K. G.) and TANFORD (C.) (1969). — The estimation of polypeptide chain molecular weights by gel filtration in 6 M guanidine hydrochloride. *J. Biol. Chem.*, 244, 4989-4994.
- FISH (W. W.), REYNOLDS (J. A.) and TANFORD (C.) (1970). — Gel chromatography of proteins in denaturing solvents. Comparison between sodium dodecyl sulfate and guanidine hydrochloride as denaturants. *J. Biol. Chem.*, 245, 5166-5168.
- FOSTER (P. M. D.) and GREEN (M. L.) (1974). — A quantitative gel-filtration method for analysis of the proteinaceous fraction of Cheddar cheese. *J. Dairy Res.*, 41, 259-268.
- FOX (P. F.) (1969). — Milk-clotting and proteolytic activities of rennet, and of bovine pepsin and porcine pepsin. *J. Dairy Res.*, 36, 427-433.
- FOX (P. F.) and GUINEY (J.) (1973). — Casein micelle structure : susceptibility of various casein systems to proteolysis. *J. Dairy Res.*, 40, 229-234.
- GREEN (M. L.) and FOSTER (P. M. D.) (1974). — Comparison of the rates of proteolysis during ripening of Cheddar cheeses made with calf rennet and swine pepsin as coagulants. *J. Dairy Res.*, 40, 269-282.
- HILL (R. D.), LAHAV (E.) and GIVOL (D.) (1974). — A rennin-sensitive bond in α_{s1} B-casein. *J. Dairy Res.*, 41, 147-153.
- ITOH (T.) and THOMASOW (J.) (1971). — Action of rennet and other milk-clotting enzymes on casein fractions. *Milchwissenschaft*, 26, 671-695.
- LE BARS (D.), DESMAZEAUD (M. J.), GRIPON (J. C.) et BERGERE (J. L.) (1975). — Etude du rôle des micro-organismes et de leurs enzymes dans la maturation des fromages. I. Fabrication aseptique d'un caillé modèle. *Le Lait*, n° 547, 377.
- LEDFORD (R. A.), O'SULLIVAN (A. C.) and NATH (K. R.) (1966). — Residual casein fractions in ripened cheese determined by polyacrylamide-gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.*, 49, 1098-1101.
- LENOIR (J.) (1962). — Sur la dégradation des protides au cours de la maturation du Camembert. *C.R. Acad. Agr.*, 48, 160-169.
- LENOIR (J.) (1963). — Note sur la composition en matières azotées des fromages affinés de Camembert, Saint-Paulin et Gruyère de Comté. *Ann. Technol. Agric.*, 12, 51-57.
- MICKELSEN (R.) and FISH (N. L.) — Comparing proteolytic action of milk-clotting enzymes on caseins and cheese. *J. Dairy Sci.*, 53, 704-710.

- MOGENSEN (M. T. S.) (1948). — Determination of the degree of proteolytic decomposition in cheese with special reference to the formol titration. *Meddlande Frau Statens Mejeriförsök*, 21, 281-436.
- MOORE (S.) and STEIN (W. H.) (1954). — A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.*, 211, 907-913.
- PELISSIER (J. P.), MERCIER (J. C.) et RIBADEAU-DUMAS (B.) (1974). — Etude de la protéolyse des caséines α_{S1} et β bovines par la présure. Spécificité d'action. Peptides amers libérés. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 14, 343-362.
- REITER (B.), SOROKIN (Y.), PICKERING (A.) and HALL (A. J.) (1969). — Hydrolysis of fat and protein in small cheeses made under aseptic conditions. *J. Dairy Res.*, 36, 65-76.
- URIEL (J.) (1966). — Méthode d'électrophorèse dans des gels d'acrylamide-agarose. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 48, 969-982.
- VANDERPOORTEN (R.) and WECKX (M.) (1972). — Breakdown of casein by rennet and microbial milk-clotting enzymes. *Neth. Milk Dairy J.*, 26, 47-59.
-