



**HAL**  
open science

**ÉTUDE D'UN ENZYME COAGULANT MICROBIEN  
DÉRIVÉ DE ENDOTHIA PARASITICA. I. -  
Propriétés biochimiques de l'enzyme coagulant Pfizer et  
propriétés rhéologiques des caillés formés dans le lait**

C. Alais, G. Novak

► **To cite this version:**

C. Alais, G. Novak. ÉTUDE D'UN ENZYME COAGULANT MICROBIEN DÉRIVÉ DE ENDOTHIA PARASITICA. I. - Propriétés biochimiques de l'enzyme coagulant Pfizer et propriétés rhéologiques des caillés formés dans le lait. *Le Lait*, 1968, 48 (477), pp.393-418. hal-00928463

**HAL Id: hal-00928463**

**<https://hal.science/hal-00928463>**

Submitted on 11 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## ÉTUDE D'UN ENZYME COAGULANT MICROBIEN DÉRIVÉ DE *ENDOTHIA PARASITICA*

### I. — Propriétés biochimiques de l'enzyme coagulant Pfizer (1) et propriétés rhéologiques des caillés formés dans le lait

par

C. ALAIS et G. NOVAK

*Ecole Supérieure de Laiterie de la Faculté des Sciences de Nancy*

#### I. — Introduction

La recherche et l'étude de protéases microbiennes ou végétales, susceptibles de remplacer la présure animale en fromagerie, ont été fortement stimulées, depuis une dizaine d'années, par l'évolution des conditions économiques et zootechniques. Une pénurie de la présure traditionnelle commence à se manifester à l'échelle mondiale ; elle est accompagnée par une grande variabilité des cours de la matière première, la caillette des jeunes veaux, et par une élévation du prix de la présure. La menace d'une pénurie a retenu l'attention des grandes organisations internationales. La Fédération Internationale de Laiterie a inscrit ce problème au programme de la Commission I et un rapport sur les enzymes coagulants a été récemment présenté [1]. De son côté, l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (F.A.O.), préoccupée par une pénurie qui risque de freiner la production fromagère, a organisé une réunion d'experts sur ce thème, à Rome, en avril 1968.

La situation n'est pas la même dans tous les pays, mais il est probable qu'elle ira en s'aggravant dans l'avenir. La production laitière mondiale est en progression du fait de l'amélioration des performances du cheptel laitier et d'une augmentation des effectifs dans certains pays ; or, la demande en fromage s'accroît sensiblement plus vite que la demande en beurre, (cette dernière a même

---

(1) Préparation enzymatique commercialisée sous les noms « Sure-Curd » ou « Suparen ».

marqué une régression dans certaines régions). Le nombre de veaux abattus, pouvant fournir des caillettes de qualité, ne s'accroît pas comme la production fromagère, lorsqu'il ne diminue pas (cas des U.S.A.) ; de plus, dans beaucoup de régions, la tendance est à l'abattage de veaux plus âgés, dont la caillette s'appauvrit en présure. L'interdépendance des marchés de la viande et de la caillette se révèle être défavorable à l'industrie présurière. Enfin, il est possible que l'évolution des méthodes d'élevage des veaux (remplacement précoce du lait maternel par des mélanges le plus souvent constitués de poudre de lait et de suif) ait une influence défavorable sur le contenu en présure des caillettes ; c'est du moins ce qu'on a observé des présuriers français récoltant des caillettes dans des régions où les méthodes d'élevage ne sont pas les mêmes. Il faut donc étudier et résoudre au mieux le problème des produits de remplacement.

La présure est une endopeptidase dont la spécificité, dans les conditions d'emploi en fromagerie (très faible dose d'enzyme par rapport au substrat), est très étroite, puisqu'au cours de la « réaction primaire », qui précède la coagulation, probablement une seule liaison peptidique est rompue, sur un ensemble de plus de 160 liaisons dans le substrat [2]. Mais tous les enzymes possédant cette activité endopeptidasique spécifique ne conviennent pas à la fabrication des fromages. Il faut tenir compte non seulement de l'activité coagulante d'un certain enzyme, mais aussi de son activité protéolytique non spécifique, dans les conditions de  $pH$  et de température qui se présentent en fromagerie. Si l'activité protéolytique est trop élevée, il peut en résulter divers inconvénients : baisse du rendement, coagulum ayant une consistance défavorable, affinage anormal en ce qui concerne la texture et le goût.

La pepsine est un enzyme proche de la présure. Depuis longtemps des chercheurs ont expérimenté l'emploi de la pepsine seule en fromagerie. Des résultats satisfaisants ont été obtenus lorsque les conditions d'emploi ont été bien choisies [3, 4]. Il faut cependant relever ce qui peut constituer des facteurs défavorables ou limitants à l'emploi de la pepsine dans toutes les fabrications fromagères. Il existe un décalage du côté acide des valeurs intéressantes du  $pH$  ( $pH$  optimum,  $pH$  limites), par rapport à la présure ; la pepsine ne caille pas les laits frais, à  $pH$  supérieur à 6,6. Des essais récents [3, 4] ont montré que l'affinage ne se déroule pas exactement de la même manière avec les deux enzymes ; la protéolyse est un peu plus lente avec la pepsine. On a signalé aussi que les préparations commerciales de pepsine n'auraient pas toutes la même valeur en ce qui regarde le goût des fromages [4]. Le mélange de pepsine et de présure est sans doute un meilleur moyen de remédier à la pénurie de présure. A l'échelle industrielle, il ne paraît être utilisé qu'en Amérique du Nord et pour un type de fromage, le Cheddar. Il est à noter, enfin, que la pepsine est aussi un produit d'origine animale (on l'extrait habituellement de l'estomac du

porc). Sa production est également dépendante du marché de la viande.

En ce qui concerne les préparations commerciales d'enzymes d'origine animale, comme la présure et la pepsine, on doit considérer aussi les points de vue de la qualité bactériologique ou hygiénique. Etant donné le mode de préparation des « extraits » par macération des organes, il n'est pas rare d'observer des contaminations microbiennes variées. Tout récemment, des chercheurs hollandais ont signalé des défauts de texture et de goût dans les fromages fabriqués avec des présures mal filtrées [5, 6], et l'on doit remarquer qu'il s'agit, non pas d'espèces dangereuses du point de vue hygiénique, mais de souches de lactobacilles mésophiles proches de ceux qui interviennent dans les fabrications fromagères.

Aux enzymes d'origine animale, on peut comparer les enzymes microbiens. L'industrie des fermentations a connu un énorme développement durant les vingt-cinq dernières années. Elle peut produire en quantités pratiquement illimitées des substances, antibiotiques et enzymes, dont la pureté va en croissant et le prix de revient en diminuant ; elle n'est pas sujette aux fluctuations d'une matière première, dont les quantités disponibles et les prix varient d'une saison à l'autre. Il est raisonnable de souhaiter que l'industrie fromagère dispose, à côté de la présure traditionnelle, d'enzymes coagulants obtenus par fermentation et ayant des propriétés voisines de celles de la présure, mais possédant, dans certains cas ou à certaines époques, des avantages économiques ou technologiques. Il est même permis de penser que l'on pourra trouver des enzymes ayant des caractères particuliers, pouvant être favorablement exploités dans la pratique. En fin de compte, c'est le fromager qui devrait avoir la décision dans le choix de l'enzyme qui convient à la fabrication qu'il entreprend, comme il a le choix du matériel et autres moyens techniques. La réglementation devrait être libérale sur ce point, à condition que la santé publique soit préservée.

Nous nous sommes intéressés depuis 1960 aux enzymes coagulants microbiens. Nous avons tout d'abord étudié une préparation enzymatique provenant de la culture d'un *Bacillus* et produite à l'échelle pilote par une firme française, mais non commercialisée. Ensuite, nous avons obtenu au laboratoire, à partir d'une souche de bactérie sporulée aérobie isolée d'un lactosérum et par précipitation du liquide de culture au sulfate d'ammonium, une autre préparation possédant une très forte activité coagulante dans le lait [7]. Ces deux préparations montraient une activité protéolytique relativement élevée, par rapport à la présure animale, ce qui réduisait leur intérêt pour l'utilisation en fromagerie.

Plus récemment, nous avons entrepris l'étude d'un enzyme coagulant produit industriellement aux U.S.A. par la firme Pfizer et qui paraît posséder des propriétés favorables à son emploi en fromagerie. Cette étude comportera trois parties :

- I. — Propriétés biochimiques de l'enzyme et propriétés rhéologiques des caillés formés dans le lait.
- II. — Essai de fabrication de fromages français avec cet enzyme (dans l'atelier expérimental de l'Ecole de Laiterie de Nancy).
- III. — Etude de la constitution de l'enzyme.

Cet article rapporte les premiers résultats obtenus dans le cadre de la partie [1] de ce programme ; l'expérimentation tenant compte des conditions de la fromagerie.

## II. — L'enzyme Pfizer

L'isolement de cet enzyme est le résultat d'une vaste étude ayant porté sur plusieurs centaines de microorganismes producteurs d'enzymes, effectuée dans les laboratoires de Chas. Pfizer and Co. Inc. (New York). Le microorganisme producteur est une moisissure parasite du châtaignier ; elle appartient à la classe des Ascomycetes ; son nom scientifique est *Endothia parasitica* (ATCC 14729). L'enzyme est extrait du liquide de fermentation et purifié en plusieurs étapes.

Les essais techniques préliminaires ainsi qu'une étude toxicologique très poussée ont été accomplis aux U.S.A. Il en est résulté l'approbation par la « Food and Drug Administration ». C'est la première préparation enzymatique microbienne légalement autorisée aux U.S.A. pour coaguler le lait de fromagerie. Plus récemment, l'autorisation d'emploi a été accordée dans plusieurs états européens.

Le produit commercial se présente sous forme d'une poudre fine, formée de grains bruns et de grains blancs. Il ne contient pas de spores du microorganisme producteur, pas de toxine et n'est pas doué d'activité antibiotique envers de nombreuses espèces de bactéries. La dissolution du produit est immédiate dans l'eau ; la solution est limpide, légèrement colorée en brun, selon la concentration.

Un examen microbiologique a révélé la présence d'environ 200 germes par gramme du produit commercial ; il s'agit de bactéries ressemblant à *Bacillus cereus*. On peut donc dire que la qualité bactériologique de cette préparation est très bonne (1).

---

(1) Nous remercions M<sup>me</sup> Veillet, chef du Laboratoire de Microbiologie de l'Ecole de Laiterie, pour cet examen.

### III. — Méthodes expérimentales

#### 1) Préparations enzymatiques.

Deux lots d'enzyme Pfizer ont été utilisés dans nos expériences (n° 3117-55 et 73-207) ; ils ont donné des résultats presque identiques, mais le deuxième était d'une granulation plus régulière que le premier. L'enzyme a été dissous dans l'eau distillée, le plus souvent à la concentration de 0,05 g/100 ml. La solution est utilisée 30 minutes après l'addition de la poudre à l'eau et dans un délai de deux heures.

Dans tous les cas, on a effectué des expériences comparatives avec une présure animale en poudre, prise comme standard d'activité coagulante : 100 000 (1). Cette valeur découle de la définition de Soxhlet, elle correspond à une activité de 457 unités-présure par gramme, selon la définition de Berridge, et dans les conditions que nous avons précédemment indiquées [8].

Dans certaines expériences, nous avons également comparé l'enzyme Pfizer à la pepsine cristallisée (EC 3.4.4.1.) et à la préparation enzymatique mentionnée plus haut, obtenue dans notre laboratoire ; cette préparation a été dénommée : « enzyme B.S. » ; son activité est 84 000.

Étant donné que les unités employées par divers auteurs ne sont pas basées sur la même définition, les concentrations en enzyme seront indiquées, dans ce texte, en mg des préparations décrites plus haut par ml de lait ou par ml de solution de caséine ; dans ce dernier cas, les temps de coagulation du lait frais à 32° C, correspondant aux concentrations utilisées, seront précisés.

#### 2) Activité coagulante.

Nous avons employé comme substrat, soit le lait frais de mélange reçu le matin à l'école de Laiterie, soit le substrat standard préconisé par Berridge [9]. Ce dernier a été obtenu en dissolvant 12 g de lait écrémé sec, dans 100 ml d'une solution de chlorure de calcium 0,01 M. Deux qualités de lait sec ont été mises en œuvre, un lait « instantané » du commerce et un lait en poudre spécial (2) ayant subi un traitement thermique limité (pasteurisation à 78° C, 20 secondes, préchauffage à 80° C sans chambrage, concentration avec température de sortie de 50° C, « atomisation » sur disque

---

(1) Nous remercions les Etablissements Chr. Hansen pour la fourniture gracieuse de présure animale.

(2) Nous remercions les Etablissements Lesaffre, Cérences, pour la fourniture gracieuse de 25 kg de lait sec utilisé dans nos expériences. Le même stock, conservé hermétiquement clos, à l'abri de la lumière dans un local sec, a servi à toutes les expériences.

avec température maximale de 60° C). Ce dernier lait sec possède une aptitude à la coagulation très supérieure à celle du premier. Dans certaines expériences, la concentration en chlorure de calcium a été modifiée ; dans d'autres, le pH du lait a été modifié par addition d'acide chlorhydrique ou de soude dilués.

On a appelé temps de coagulation, le temps en minutes qui sépare le moment de l'addition de 0,5 ml de solution enzymatique à 10 ml de lait, du moment où apparaissent les premiers flocons visibles sur les parois du tube à essai incliné, subissant une lente rotation. La concentration de la solution enzymatique, dans la plupart des essais, est telle que la coagulation intervient au bout d'une durée voisine de 6 mn, dans le lait frais, à 35° C.

Le temps de coagulation ( $t_c$ ), ainsi défini, est aisé à déterminer et de nombreux auteurs mesurent de cette manière l'activité coagulante ; mais il faut bien remarquer que ce n'est qu'un aspect des propriétés des enzymes coagulants, en ce qui concerne leur aptitude à former le caillé. En pratique, ce qui est le plus important, c'est le temps au bout duquel le caillé peut être « travaillé » ( $t_t$ ) et il n'est pas certain qu'avec différents enzymes, réagissant sur le même lait en vue de l'obtention d'un type donné de caillé, il y ait un rapport constant entre ces deux temps ( $t_t/t_c$ ). L'expérimentation pratique en cours (prochaine publication) a révélé que cette vue est exacte ; avec l'enzyme Pfizer, on obtient un temps de « tranchage » normal en utilisant des doses d'enzymes plus basses que celles qui sont calculées à partir du temps de coagulation, comme on le fait avec la présure animale.

### 3) Activité protéolytique.

L'activité protéolytique a été mesurée par la quantité de substances azotées solubles dans 12 p. 100 d'acide trichloracétique ou solubles après ajustement du pH à 4,6, en opérant dans les conditions précédemment indiquées [10].

On a utilisé une solution aqueuse de caséinate de sodium à la concentration de 2 p. 100 (p : v) et à pH 6,7. La caséine a été préparée au laboratoire à partir de lait écrémé de mélange, par trois précipitations successives à pH 4,6. Les expériences ont été habituellement conduites à 25° C ; 1 ml de solution de présure est ajouté à 100 ml de substrat ; la concentration de la solution de présure est telle que le rapport enzyme/substrat est le même que dans les essais de coagulation.

### 4) Propriétés rhéologiques du coagulum.

Nous avons utilisé la méthode thrombélastographique de Hartert modifiée par Frentz pour son application au lait [11, 12]. Le mélange enzyme-substrat est effectué au bain-marie dans les conditions habituelles des essais de coagulation ; 0,35 ml du mélange

sont rapidement transférés dans la cuve de l'appareil, dont la température est fixée à 30 ou à 35° C. Le papier photographique, qui enregistre les déplacements du spot lumineux, réfléchi par le miroir, se déroule à la vitesse constante de 1 mm/minute. Rappelons que le miroir est supporté par le fil de torsion auquel est suspendu le piston immergé dans la cuvette, contenant le lait emprésuré, et que cette dernière est animée d'un mouvement oscillant (amplitude 4°45, durée 9 secondes).

La partie du diagramme formé d'un trait rectiligne de moins de 1 mm d'épaisseur représente le temps de « prise » ; c'est le paramètre « r ». Quand le milieu se modifie physiquement, le piston est entraîné progressivement dans le même mouvement que la cuvette et cela d'autant plus que la fermeté du coagulum augmente. Le paramètre « K » mesure le temps écoulé, après la coagulation, pour atteindre une fermeté donnée, représentée par l'écartement « E » des deux branches du diagramme. Différentes valeurs de « E » ont été considérées, selon la forme des diagrammes, et en particulier l'écartement maximal « Em » au bout du temps « S ». Pour pouvoir apprécier la synérèse dans un temps assez court, sans intervention de la fermentation lactique, le lait a été acidifié, à différentes valeurs de  $pH$ , par addition d'acide lactique pur dilué.

#### 5) Examen électrophorétique des enzymes.

Ils ont été effectués soit sur papier Whatman n° 1, soit sur bandes d'acétate de cellulose « Oxoïd », avec des tampons dont le  $pH$  s'échelonnait de 3,7 à 8,6 et composés respectivement de formiate, d'acétate, de phosphate et de véronal sodiques. Les essais de séparation en gel d'amidon et en gel d'acrylamide n'ont pas été satisfaisants jusqu'ici.

Les constituants électrophorétiques ont été révélés par coloration au noir amido ou au bleu brillant R 250 (Coomassie).

### IV. — Résultats

#### 1) Activité coagulante de l'enzyme « Pfizer ».

Au cours de séries d'essais dans les conditions habituelles, en prenant comme standard la présure animale d'activité 100 000, on a obtenu pour l'enzyme « Pfizer » des valeurs moyennes d'activité relative différentes, selon que les essais étaient effectués dans le substrat standard ou dans le lait frais :

[substrat standard ( $pH$  6,35) : 260 000,  
[lait écrémé frais ( $pH$  6,70) : 330 000.

L'activité de la poudre Pfizer que nous avons utilisée est environ trois fois celle de la présure ordinaire, mais les écarts observés révèlent déjà une différence de comportement des deux enzymes,

par rapport aux substrats, qui n'ont pas la même teneur en calcium ionisé, ni le même  $pH$ .

On a observé que la solution aqueuse diluée de l'enzyme Pfizer présente une bonne stabilité, en ce qui concerne l'activité coagulante. Avec la solution à 0,05 p. 100, ayant un  $pH$  voisin de 6,0 (0,5 ml coagule 10 ml de lait frais en 5-7 mn à 35° C), la perte d'activité est inférieure à 10 p. 100 après 20 heures à température ambiante et à l'obscurité ; à la température de la chambre froide (5° C), la perte est négligeable après un jour. La stabilité d'une solution équivalente de présure en poudre (0,2 p. 100) est comparable à celle de la présure Pfizer ; par contre, la solution de notre enzyme bactérien « B.S. » (0,2 p. 100) est nettement moins stable.

La stabilité de la préparation en poudre de l'enzyme Pfizer paraît être excellente ; les deux échantillons que nous avons utilisés, conservés à la chambre froide (4-7° C), ont gardé la même activité coagulante dans le substrat standard pendant dix mois.

## 2) Influence de la concentration en ions calcium sur l'activité coagulante.

Les essais ont été faits avec le lait sec ordinaire, dont l'aptitude à la coagulation est réduite par un traitement thermique « éprouvant », ayant diminué la teneur en calcium ionisé ; la solution de ce lait dans l'eau est enrichie par addition de chlorure de calcium, la molarité en calcium ajouté allant de 0 à 40 mM. Différents essais ont été faits, sans rectifier le  $pH$  ou à  $pH$  constant.

Les résultats sont résumés dans le tableau I où les temps de coagulation sont exprimés en nombres proportionnels, la valeur 100 étant attribuée au substrat standard, à 10 mM de calcium ajouté. On constate que l'enzyme Pfizer est moins sensible aux variations de la teneur en calcium du lait que la présure animale, indépendamment des variations du  $pH$ . La figure 1 montre que si l'on normalise les activités des deux enzymes dans les conditions du substrat standard, l'enzyme Pfizer manifeste une plus grande activité que la présure aux faibles teneurs en calcium. Dans la solution de lait sec, sans calcium ajouté, le rapport des activités coagulantes est proche de 2/1.

## 3) Influence de la température sur l'activité coagulante.

Plusieurs séries d'essais ont été faites avec des laits présentant de légères différences en ce qui concerne les valeurs du  $pH$ . Les résultats sont concordants et montrent que les deux enzymes se comportent d'une manière analogue ; cependant, on observe que l'enzyme Pfizer est un peu moins sensible aux variations de la température que la présure animale. Autrement dit, l'activité coagulante de l'enzyme Pfizer se maintient mieux que celle de la présure lorsque la température diminue. La figure 2 traduit

TABLEAU I

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CALCIUM SUR L'ACTIVITÉ COAGULANTE DE L'ENZYME PFIZER ET DE LA PRÉSURE ANIMALE

Calcium ajouté (mM)	pH	Temps de coagulation (nombres proportionnels) à 35° C	
		Enzyme Pfizer (1)	Présure (2)
<i>1<sup>re</sup> série</i>			
0	6,7	233	450
2	6,7	167	292
4	6,7	128	175
6	6,7	116	122
10	6,7	100	100
15	6,7	85	77
<i>2<sup>e</sup> série</i>			
5	6,7	134	179
10	6,6	100	100
15	6,5	83	74
20	6,4	76	54
30	6,35	66	41
40	6,25	63	37

(1) 0,025 mg/ml de lait reconstitué.

(2) 0,100 mg/ml.

TABLEAU II

INFLUENCE DU pH DU LAIT SUR L'ACTIVITÉ COAGULANTE DE L'ENZYME PFIZER, DE LA PRÉSURE ANIMALE ET DE LA PEPSINE

pH	Temps de coagulation (min.) à 35° C		
	Enzyme Pfizer	Présure	Pepsine
5,68	2,47	2,87	2,90
6,08	2,77	4,87	3,70
6,26	3,25	5,04	—
6,47	5,35	10,55	8,1
6,64	7,47	18,48	19,4
6,76	10,60	25,45	64,9
6,94	21,52	60,6	pas de coagulation
Quantité d'enzyme (mg/ml lait)	0,025	0,05	0,001

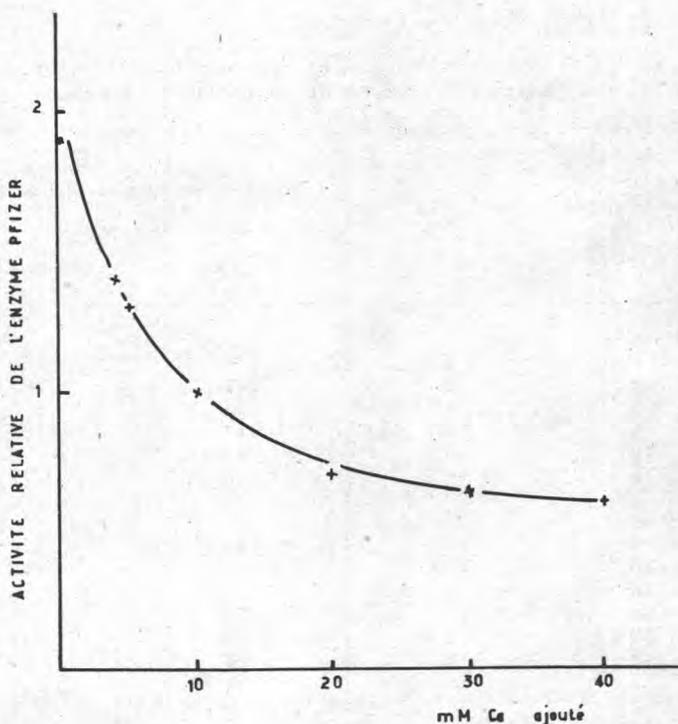


Fig. 1. — Rapport des activités coagulantes  $\frac{\text{Enzyme Pfizer}}{\text{présure animale}}$  en fonction de la teneur en calcium (rapport = 1 pour 10 mM Ca).

les résultats d'une expérience effectuée avec le substrat standard à pH 6,42, le temps de coagulation à 40° C étant pris égal à 100. On sait que l'activité coagulante de la présure dans le lait de vache est maximale autour de cette température. En ce qui concerne l'enzyme Pfizer, nous n'avons pas encore déterminé les conditions d'activité maximale, nous nous sommes limités jusque-là à des conditions en rapport avec la fromagerie.

#### 4) Influence du pH sur l'activité coagulante.

Cette investigation a été faite dans la zone des pH de 5,7 à 7,0, en ajoutant de l'acide chlorhydrique ou de la soude diluée au lait frais écrémé ou au substrat standard. Nous avons introduit un deuxième élément de comparaison, la pepsine, qui est très sensible aux variations du pH dans cette zone.

Le tableau II présente les résultats d'une expérience organisée de telle manière que les temps de coagulation avec les trois enzymes, à la plus basse valeur de pH choisie, soient approximativement les mêmes ; tous les essais étant ensuite réalisés avec la même

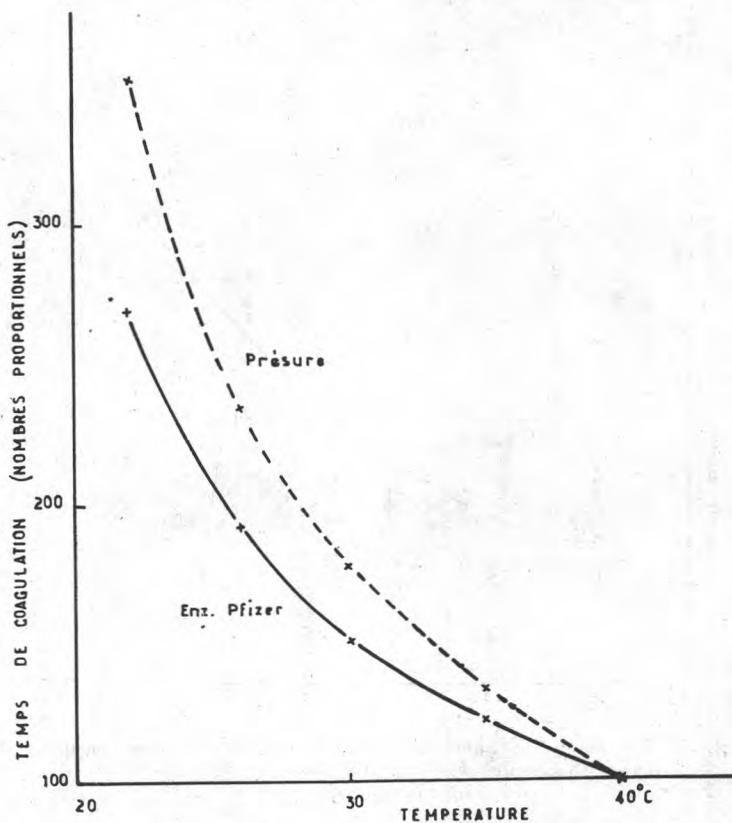


Fig. 2. — Influence des variations de température (de 20 à 40° C) sur l'activité coagulante de l'enzyme « Pfizer » et de la présure animale.

quantité d'enzyme. On voit que, lorsque le  $pH$  s'élève, le temps de coagulation du lait s'accroît sensiblement moins avec l'enzyme Pfizer qu'avec la présure. Si l'on calcule l'activité à chaque valeur du  $pH$ , en prenant comme standard la présure animale, on trouve que l'activité relative de l'enzyme Pfizer est d'autant plus grande que le  $pH$  est plus élevé. C'est ce que montre schématiquement la figure 3. L'activité relative de la pepsine s'accroît d'abord, lorsque le  $pH$  s'élève; ensuite, à partir de  $pH$  6,5, elle décroît très fortement; le maximum observé se situe vers  $pH$  6,3. Alors que la pepsine ne coagule plus les laits à  $pH$  élevé, l'enzyme Pfizer les coagule plus facilement que ne le fait la présure animale.

##### 5) Courbes d'activité protéolytique.

L'activité protéolytique de l'enzyme Pfizer a été comparée à celle de la présure animale et à celle de l'enzyme B.S. Le substrat

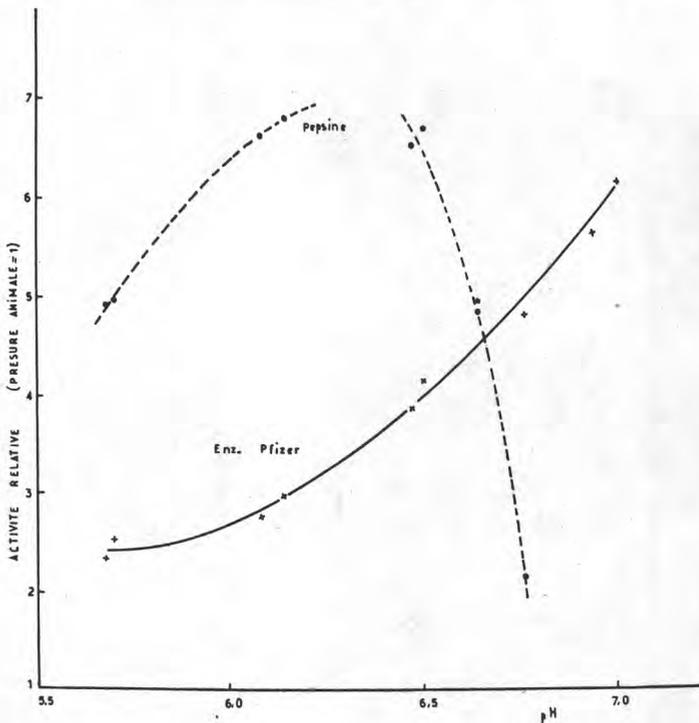


Fig. 3. — Variation de l'activité coagulante relative (par rapport à la présure animale = 1) de l'enzyme Pfizer et de la pepsine, en fonction du pH du lait.

utilisé était la caséine entière de vache, en solution à 2 p. 100. Les figures 4 et 5 présentent les courbes de l'augmentation de la proportion d'azote non protéique, respectivement azote soluble dans 12 p. 100 d'acide trichloracétique et azote soluble à pH 4,6, après des durées de digestion enzymatique allant de 15 à 120 mn, à pH 6,7 et à 32° C. Les quantités d'enzyme ajoutées à la solution de caséine correspondent à celles qui auraient provoqué la coagulation du lait frais en 15 mn, à la température de 32° C, conditions fréquemment réalisées en fromagerie.

Les courbes obtenues avec l'enzyme Pfizer ressemblent à celles que l'on obtient avec la présure, mais la proportion d'azote non protéique libérée au cours de la réaction est un peu plus élevée avec le premier enzyme. Avec la présure, la courbe devient presque horizontale, après la partie initiale, qui représente la « réaction primaire » [13]. Avec l'enzyme Pfizer, la forme des courbes traduit nettement l'existence d'une réaction analogue à la réaction primaire de la présure ; cependant, la deuxième partie des courbes présente une faible pente ; il y a donc des produits de la réaction qui sont

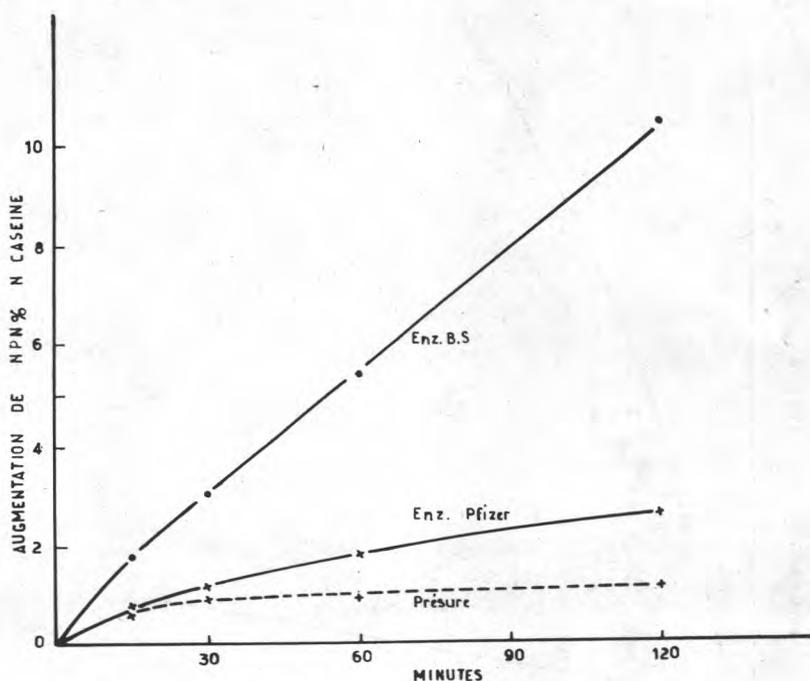


Fig. 4. — Courbes d'activité protéolytique de l'enzyme Pfizer, de la présure animale et de l'enzyme B.S.  
(En ordonnées : azote soluble dans 12 p. 100 d'acide trichloracétique p. 100 de l'azote de la caséine.)

Solution de caséine entière de vache à 2 p. 100, pH 6,7, 32° C.

Concentration en enzyme :	Pfizer	0,017 mg/ml
	Présure	0,060 »
	B. S.	0,071 »

solubles dans 12 p. 100 d'acide trichloracétique. Des expériences effectuées avec des doses croissantes d'enzyme Pfizer ont montré que la pente de la deuxième partie de la courbe dépend de la concentration de l'enzyme. Dans le cas de la présure, on sait que le niveau du palier de la courbe varie très peu en fonction de la concentration de l'enzyme.

Par comparaison avec les précédents, l'enzyme B.S. a un comportement très différent; la proportion d'azote non protéique s'accroît très rapidement et la réaction primaire est à peine visible sur les courbes.

Les quantités d'azote non protéique libéré par les enzymes sont indiquées dans le tableau III, en prenant pour unité les valeurs obtenues avec la présure. Au début de la réaction, la présure et l'enzyme Pfizer libèrent des quantités d'azote comparables, alors

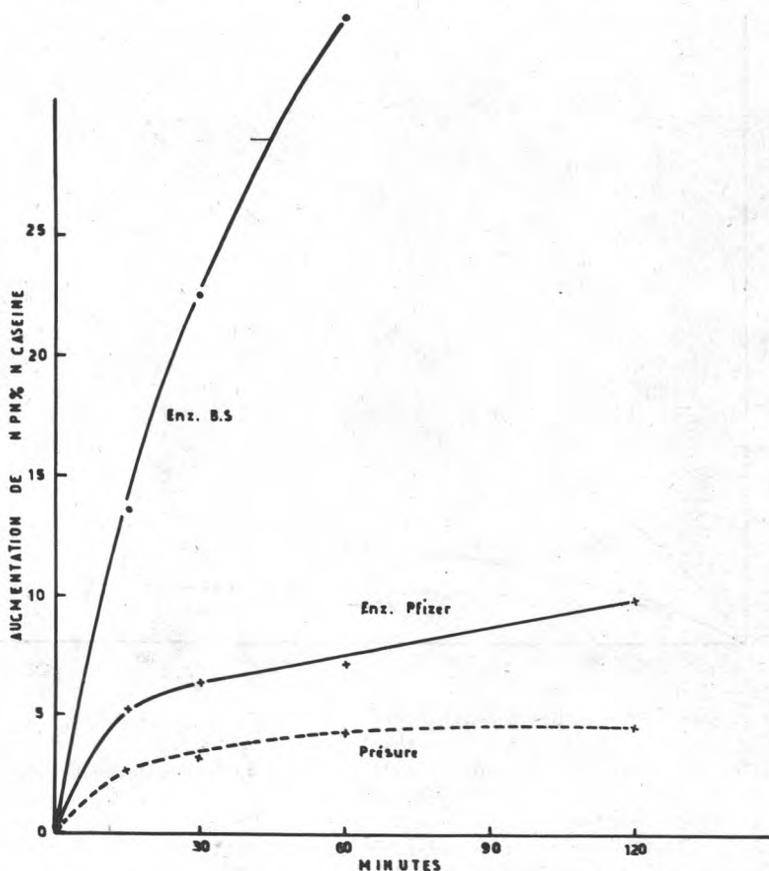


Fig. 5. — Courbes d'activité protéolytique de l'enzyme Pfizer, de la présure animale et de l'enzyme B. S.

(En ordonnées : azote soluble après précipitation de la caséine à pH 4,6, p. 100 de l'azote de la caséine.)

Solution de caséine entière de vache à 2 p. 100, pH 6,7, 32° C.

Concentration en enzyme : Pfizer 0,017 mg/ml  
 Présure 0,060 »  
 B. S. 0,071 »

que l'enzyme B.S. donne lieu à une libération d'azote beaucoup plus élevée.

La protéolyse a été également suivie par la mesure de l'absorption à 280 m $\mu$  dans le filtrat trichloracétique. Avec la présure, l'absorption est presque constante tout au long de la réaction ; avec l'enzyme Pfizer on observe une légère augmentation et avec l'enzyme B.S., une forte augmentation de l'absorption. Ces enzymes libèrent donc des fragments peptidiques solubles dans l'acide trichlo-

racétique à 12 p. 100 et renfermant des acides aminés aromatiques, ce qui n'est pas le cas de la présure [14].

### 6) Activité protéolytique en fonction du pH.

La proportion d'azote non protéique soluble dans 12 p. 100 d'acide trichloracétique (NPN) a été déterminée à différentes valeurs du pH, entre 5,2 et 7,6, après 15 et 60 mn de digestion de la solution de caséine à 2 p. 100 et à 25° C. La figure 6 présente les résultats obtenus avec l'enzyme Pfizer, la concentration en enzyme (0,03 mg/ml) correspondant à une coagulation rapide du lait en 5 mn environ. Un maximum d'activité protéolytique est très marqué, vers pH 5,9, après 60 mn ; il est encore apparent après 15 mn de réaction, c'est-à-dire vers la fin de la « réaction primaire ». L'activité de l'enzyme Pfizer décroît rapidement lorsque le pH s'élève au-dessus de 6,0 ; vers pH 7,5, cet enzyme et la présure libèrent la même quantité de NPN après 15 ou après 60 mn de réaction.

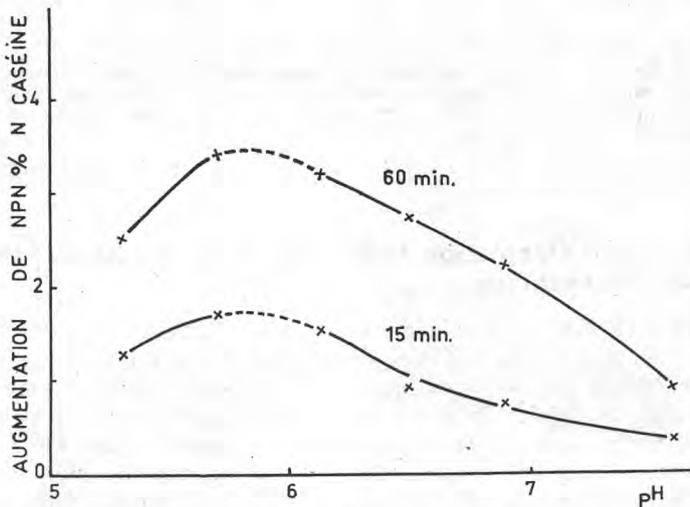


Fig. 6. — Activité protéolytique de l'enzyme Pfizer en fonction du pH.  
(En ordonnées, azote soluble dans 12 p. 100 d'acide trichloracétique après 15 ou 60 minutes de réaction.)

Solution de caséine entière de vache à 2 p. 100, 25° C.  
Concentration en enzyme : 0,03 mg/ml.

Les courbes correspondantes de la présure animale n'ont pas été tracées sur la figure 6, pour des raisons de clarté ; la proportion de NPN formé par la présure, dans ces conditions expérimentales, varient peu de pH 5,3 à pH 6,7 (environ 1,5 p. 100 après 60 mn) et diminuent légèrement au-delà de pH 6,9.

TABLEAU III

PROPORTION D'AZOTE NON PROTÉIQUE (NPN)  
LIBÉRÉE PAR LES ENZYMES PFIZER ET B.S.  
PAR COMPARAISON AVEC LA PRÉSURE ANIMALE (1)

	<i>Enzyme Pfizer</i>	<i>Enzyme B.S.</i>	<i>Présure (2)</i>
<i>NPN — 12% TCA :</i>			
Après 15 mn .....	0,74	2,15	1 (0,81%)
Après 30 mn .....	1,27	3,35	1 (0,91%)
Après 60 mn .....	1,84	5,47	1 (0,99%)
Après 120 mn .....	2,34	9,70	1 (1,14%)
<i>NPN — pH 4,6 :</i>			
Après 15 mn .....	1,97	5,03	1 (2,7%)
Après 30 mn .....	1,96	7,55	1 (3,25%)
Après 60 mn .....	1,70	8,06	1 (4,23%)
Après 120 mn .....	2,17	10,10	1 (4,56%)

(1) Les quantités d'enzymes sont équivalentes en ce qui concerne le temps de coagulation du lait frais (environ 15 mn), soit : Enzyme Pfizer 0,017 ; présure 0,060 ; enzyme B. S. 0,071 mg/ml. Substrat : solution de caséine de vache à 2 p. 100, 25° C, pH 6,7.

(2) L'augmentation de NPN due à la réaction de la présure (entre parenthèses) est prise comme unité.

## 7) Etude de la formation du coagulum par la méthode thrombélastographique.

Lorsque l'on étudie le début de la coagulation, au moyen du thrombélastographe, dans le lait frais et dans le lait reconstitué à partir du lait sec de bonne qualité, on observe que l'enzyme Pfizer se comporte comme la présure animale ; la fermeté du coagulum est la même après une même durée d'emprésurage. Par contre, l'enzyme B.S. donne un coagulum plus mou, dans les mêmes conditions ; l'écartement des branches du diagramme après 30 mn ( $E_{30}$ ), qui est une expression des propriétés rhéologiques du coagulum, n'est que la moitié environ de celui que l'on observe avec l'enzyme Pfizer et avec la présure animale.

Le lait sec instantané du commerce, qui a une aptitude à la coagulation réduite, permet d'observer des différences de comportement. La figure 7 présente les diagrammes obtenus au cours des 45 premières minutes avec les 3 enzymes, le lait ayant reçu une addition de chlorure de calcium à raison de 0,005, 0,01 puis 0,02 M, et le tableau IV indique les paramètres correspondants. Les quantités d'enzymes utilisées donnent le même temps de coagulation dans le lait à 0,02 M de calcium, quantité qui restaure l'aptitude à la

coagulation de ce lait au niveau de celle du lait frais. On voit que le coagulum obtenu avec l'enzyme Pfizer a les mêmes propriétés à 0,01 comme à 0,02 M de calcium, alors qu'avec la présure le coagulum se forme plus lentement et a une texture nettement moins ferme dans le lait ayant reçu seulement 0,01 M de calcium que dans le lait à 0,02 M de calcium, (K plus élevé et E plus faible). Dans le lait à 0,005 M de calcium, tous les coagulums sont plus mous, cependant les paramètres de l'enzyme Pfizer sont encore un peu plus favorables que ceux de la présure.

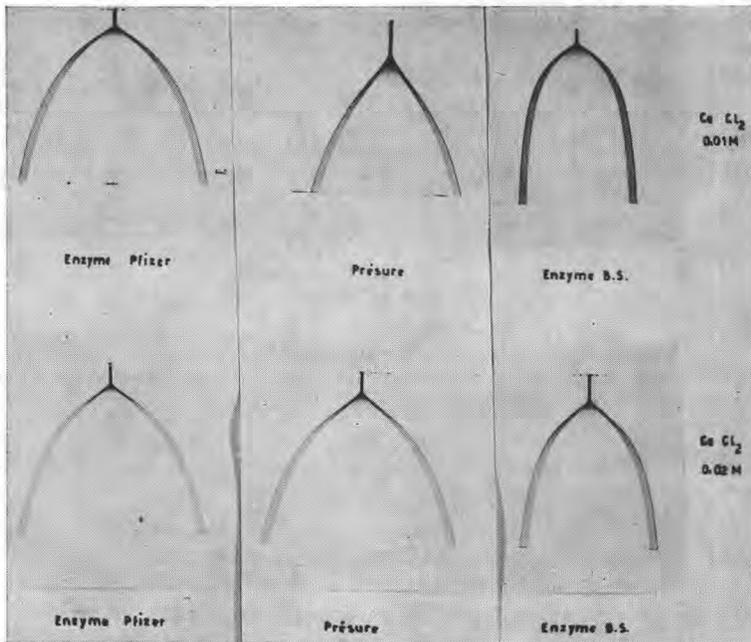


Fig. 7. — Diagramme obtenu au thrombélustographe avec différentes quantités de calcium ajouté au lait sec reconstitué.

Température 35° C.

Concentration en enzyme : Pfizer : 0,025 mg/ml  
 Présure : 0,100 »  
 B. S. : 0,120 »

Ces résultats complètent ceux obtenus dans les précédentes expériences de coagulation. Quand le calcium fait défaut, le coagulum formé par l'enzyme Pfizer est plus ferme que celui formé par la présure.

La coagulation par l'enzyme B.S. est également peu affectée par l'abaissement de la quantité de calcium ionisé, mais dans ce cas, le coagulum est caractérisé par son manque de fermeté. Même

TABLEAU IV

ETUDE DE LA COAGULATION DU LAIT PAR LE THROMBÉLASTOGRAPHE

$CaCl_2$ (1)	Enzyme Pfizer			Présure			Enzyme B.S.		
	$r$	$K_{10}$	$E_{30}$	$r$	$K_{10}$	$E_{30}$	$r$	$K_{10}$	$E_{30}$
0,005 M	18	24	5	24	29	2,5	12	12	13
0,010 M	8	3,5	39,5	11	6,5	27	8	4	27
0,020 M	7,5	3,5	38	7,5	4	39	8	4	29

$r$  : temps de prise thrombélustographique (mn) ;

$K_{10}$  : temps pour obtenir un écartement de 10 mm, après le temps de prise (mn) ;

$E_{30}$  : écartement (mm), 30 mn après le début de la réaction ;

Concentration en enzyme : Pfizer 0,025 mg/ml ;

Présure 0,10 mg/ml ;

B.S. 0,12 mg/ml.

(1) Chlorure de calcium ajouté au lait reconstitué (la concentration 0,02 M rétablit l'aptitude à la coagulation par la présure au niveau de celle du lait frais).

à 0,02 M de calcium on se trouve en présence d'un coagulum ayant des propriétés rhéologiques peu favorables.

Des mesures effectuées sur de plus grandes quantités de lait, préparé pour la fabrication du fromage, au moyen du « torsiomètre » de Burnett et Scott-Blair [15], ont donné des indications comparables à celles données par le thrombélustographe, (ces résultats seront rapportés dans la prochaine publication).

#### 8) Etude de la rétraction du coagulum par la méthode thrombélustographique.

Le rapprochement des deux branches du diagramme, au-delà de l'écartement maximal ( $E_m$ ), donne une indication sur l'évolution des propriétés du caillé qui se produit au commencement de la synérèse. Dans le lait pas ou peu acide ( $pH$  6,3-6,7), la rétraction du caillé est lente et l'on constate que la diminution de l'écartement des branches du diagramme est moins marqué avec l'enzyme Pfizer qu'avec la présure animale (tableau V, n° 1, valeur  $E$  300).

La synérèse est plus facile à observer, par cette méthode, à des valeurs du  $pH$  inférieures à 6,0. Dans le lait acidifié à  $pH$  5,7, on a obtenu des résultats différents selon la dose d'enzyme et la

température. Avec des doses relativement élevées, donnant un temps de coagulation court à 35° C, la rétraction est plus lente avec l'enzyme Pfizer qu'avec la présure, comme l'indiquent les valeurs S1, dans le tableau V (n° 2). Par contre, dans des conditions plus proches de celles de la fromagerie (doses d'enzyme coagulant le lait frais en 15 mn à 30° C), la rétraction du coagulum de lait acidifié est plus rapide avec l'enzyme Pfizer qu'avec la présure. C'est ce que montrent la figure 8 et le tableau V (n° 3).

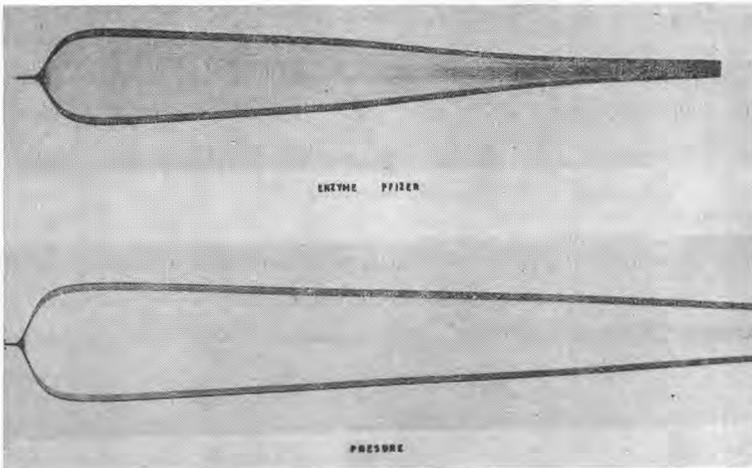


Fig. 8. — Diagrammes obtenus au thrombélustographe, montrant l'évolution des propriétés du coagulum formé à pH 5,7 à 30° C.  
 Concentration en enzyme : Pfizer : 0,017 mg/ml  
 Présure : 0,060 »

Cette méthode de laboratoire ne reproduit pas exactement les conditions de la fromagerie. Elle montre cependant que l'enzyme Pfizer donne des caillés qui se comportent d'une manière favorable, peu différente de celle que l'on observe avec la présure.

### 9) Examens électrophorétiques de l'enzyme Pfizer.

La purification par dialyse contre l'eau s'est avérée nécessaire afin d'éliminer les sels ; nous avons observé que cette opération ne modifie pas sensiblement les activités coagulante et protéolytique de l'enzyme Pfizer. La solution à 5 p. 100 de cet enzyme conserve sa coloration brunâtre après la dialyse ; il ne se produit aucun précipité. Dans les mêmes conditions, un léger précipité blanc se produit avec la présure animale.

Des examens électrophorétiques de l'enzyme Pfizer, par comparaison avec la présure animale du commerce et avec la pepsine cristallisée (qui a servi de base au calcul des mobilités relatives),

TABLEAU V

ETUDE DE LA RÉTRACTION DU COAGULUM PAR LE THROMBÉLASTOGAPHE

Essai	pH (1)	Température	Enzyme Pfizer					Présure				
			mg/ml	r	Em	E <sub>300</sub>	S <sub>1</sub>	mg/ml	r	Em	E <sub>300</sub>	S <sub>1</sub>
N° 1	6,30	35	0,025	4	56	52	—	0,1	3	56	46	—
N° 2	5,74	35	0,025	2,5	38	—	116	0,1	2,5	40	—	73
N° 3	5,70	30	0,017	8	32	—	137	0,06	5,5	40	—	236

r : temps de prise thrombélastographique (mn) ;

Em : écartement (mm) maximal ;

E<sub>300</sub> : écartement (mm) 300 mn après le début de la réaction ;

S<sub>1</sub> : temps nécessaire (mn) pour que l'écartement soit réduit à la moitié de Em.

(1) Ajustement du pH par addition d'acide lactique pur au lait écrémé frais.

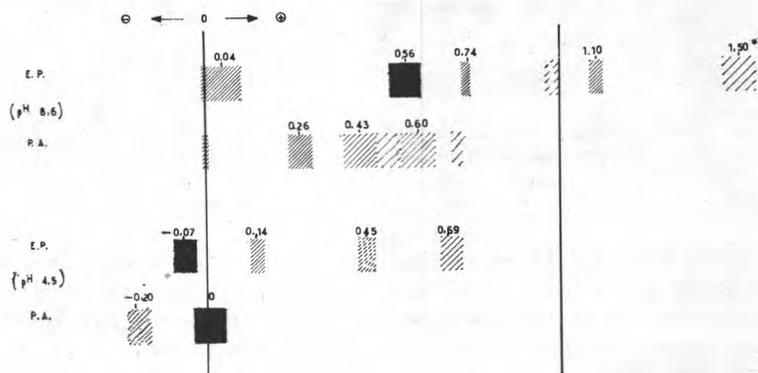


Fig. 9. — Electrophorèse de l'enzyme Pfizer (E. P.) et de la présure animale (P. A.) sur acétate de cellulose, à pH 8,6 (tampon véronal Na) et à pH 4,5 (tampon acétate Na 0,025 M).

Mobilités relatives calculées en prenant la mobilité de la pepsine égale à 1.

\* Constituant naturellement coloré en brun

les autres constituants sont révélés par le noir amido.

ont été effectués sur divers supports: papier Whatman 1, bandes d'acétate de cellulose, gel d'amidon, gel d'acrylamide et gélose.

Nous avons rencontré des difficultés dans la révélation des constituants électrophorétiques par la solution habituelle de noir amido ou par la solution de bleu brillant R 250 (Coomassie). Il

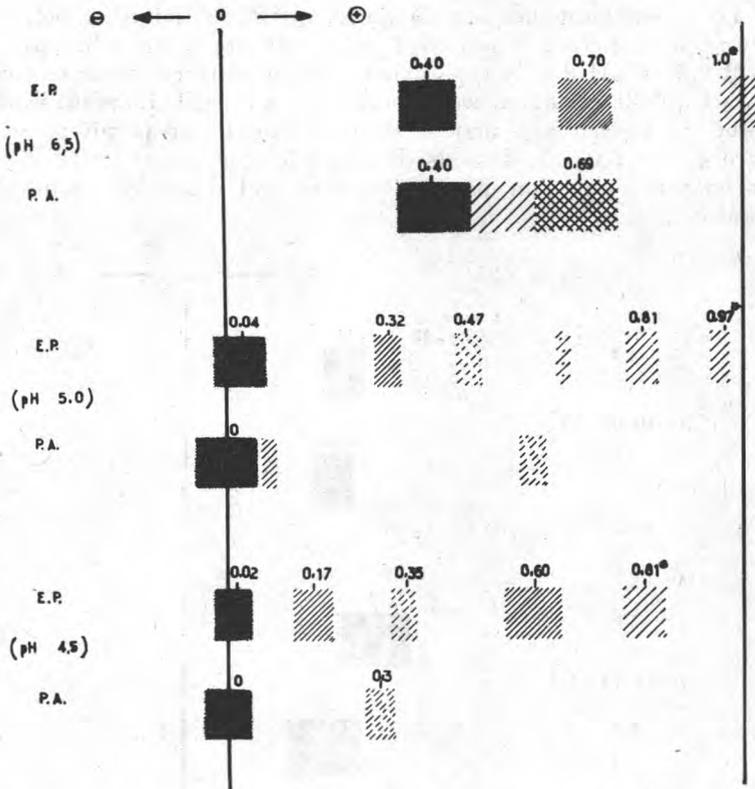


Fig. 10. — Electrophorèse de l'enzyme Pfizer (E. P.) et de la présure animale (P. A.) sur papier, à pH 6,5 (tampon phosphate Na 0,15 M), à pH 5,0 et 4,5 (tampons acétate Na 0,025 M).  
(Voir légende de la figure 9.)

a été nécessaire de supprimer l'eau du solvant (méthanol, acide acétique, eau, 4 : 1 : 5) pour obtenir une bonne coloration. Malheureusement, dans ces conditions, les gels d'amidon et d'acrylamide se désagrègent lorsque l'on emploie des tampons neutres ou alcalins ; nous n'avons obtenu une séparation satisfaisante en gel d'amidon qu'à pH 2,0.

Les examens électrophorétiques sont schématisés dans les figures 9, 10 et 11. Elles montrent que l'enzyme Pfizer contient plusieurs constituants ; mais l'un d'eux paraît être fortement dominant, si l'on en juge d'après la coloration obtenue par le noir amido. Ce constituant est le plus lent, sauf à pH 8,6 où apparaît un constituant mineur très peu mobile. Un constituant naturellement coloré en brun migre devant tous les autres lorsque le pH est égal ou supérieur à 4,5 ; il n'apparaît pas dans les tampons les plus acides. Le noir amido le colore en jaune verdâtre.

Le constituant majeur de l'enzyme Pfizer migre à peu près comme le principal constituant de la présure animale de pH 2,0 à pH 6,5. A pH 8,6, la séparation de la présure est assez confuse ; on sait qu'elle est dénaturée à cette valeur du pH. Le point isoélectrique du constituant majeur de l'enzyme Pfizer paraît se situer entre 4,5 et 5,0. En dessous de pH 4,5, tous les constituants de cet enzyme, que l'on peut déceler en gel d'amidon, sont électropositifs.

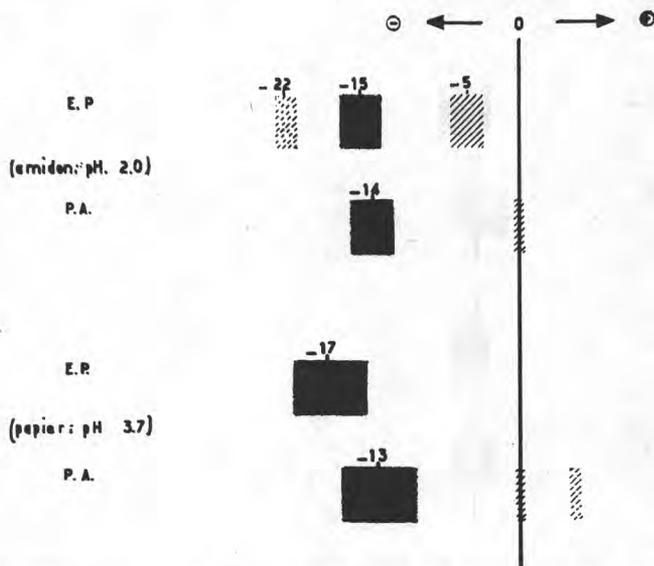


Fig. 11. — Electrophorèse de l'enzyme Pfizer (E. P.) et de la présure animale (P. A.), en gel d'amidon à pH 2,0 (tampon glycocole HCl) et sur papier à pH 3,7 (tampon formiate Na 0,025 M).

Mobilité en millimètres.

L'étude des constituants de l'enzyme Pfizer constitue la troisième partie de notre programme de recherche. Un essai préliminaire, avec élution des bandes, montre que l'activité coagulante paraît être concentrée dans le constituant majeur.

## V. — Discussion

L'étude en laboratoire d'une préparation enzymatique nouvelle, proposée comme produit de remplacement d'un enzyme commun dont les propriétés sont bien connues, doit être poursuivie d'une manière approfondie et comparative. Elle permet de prévoir le comportement du nouvel enzyme dans les conditions très variées, qui peuvent se rencontrer au niveau des fabrications, et de juger

de l'intérêt d'expérimentations pratiquées dans une direction donnée. L'étude de l'enzyme Pfizer a été conduite dans ce sens, et les propriétés biochimiques et rhéologiques que nous avons déjà mises en évidence montrent que cet enzyme s'apparente à la présure animale. Il possède cependant des caractéristiques spécifiques dont certaines peuvent être avantageuses en pratique. Ces caractéristiques permettent aussi de le distinguer d'autres enzymes coagulants proposés récemment comme produit de remplacement de la présure [16, 17, 18, 19, 20, 21]. Il est permis de penser aujourd'hui que c'est parmi les enzymes produits par des microorganismes, et surtout par des moisissures, que se trouvent ceux qui présentent le plus d'intérêt pour l'industrie fromagère.

En général, l'enzyme Pfizer est moins sensible que la présure aux variations des facteurs dont dépend l'activité coagulante de cette dernière. La différence de comportement est faible en ce qui concerne les variations de la température de coagulation ; elle est plus marquée en ce qui concerne les variations du  $pH$  et de la teneur en calcium du lait. L'activité coagulante de l'enzyme Pfizer se maintient mieux lorsque la température ou la teneur en calcium ionisé diminue et lorsque le  $pH$  augmente.

L'activité coagulante de l'enzyme Pfizer est encore notable lorsque le  $pH$  est voisin de 6,9, alors que celle de la présure est faible et celle de la pepsine, nulle. Cette moindre sensibilité aux variations du  $pH$  se retrouve avec des enzymes coagulants provenant de bactéries du genre *Bacillus* [16, 18] ; par contre, il est à noter qu'un enzyme coagulant dérivé d'une autre moisissure [17] se comporte différemment ; ce dernier est plus sensible que la présure aux variations du  $pH$ , mais cependant moins que la pepsine.

La réduction de la teneur en calcium ionisé affecte moins l'enzyme Pfizer que la présure. A ce point de vue, l'enzyme Pfizer se différencie nettement d'autres enzymes coagulants bactériens ou fongiques dont l'activité coagulante dépend beaucoup du calcium [16, 17, 20]. En relation avec ces résultats concernant la floculation proprement dite, on peut considérer ceux qui se rapportent aux propriétés rhéologiques du coagulum. Le coagulum formé par l'enzyme Pfizer a les mêmes caractéristiques que celui formé par la présure, dans un lait contenant suffisamment de calcium ionisé ; lorsque la teneur en calcium ionisé diminue, le coagulum reste ferme et élastique dans le cas de l'enzyme Pfizer, alors qu'il devient plus mou dans le cas de la présure. D'autres enzymes coagulants microbiens, qu'il s'agisse de la préparation B.S. que nous avons étudiée, ou d'enzymes étudiés par d'autres auteurs [17, 19], forment dans le lait un coagulum plus mou que celui formé par la présure.

La sensibilité relativement faible de l'enzyme Pfizer aux facteurs qui interviennent dans l'activité coagulante peut être considérée comme un avantage technologique. Les variations du  $pH$  ou de la quantité de calcium ionisé modifient moins l'activité coagulante

de cet enzyme que celle de la présure, de la pepsine ou d'autres enzymes microbiens. En particulier, l'enzyme Pfizer coagule aisément les laits frais, ce qui est un point favorable dans la fabrication de divers types de fromages, et le problème d'un ajustement précis de la teneur en calcium ne se pose pas.

L'étude de l'activité protéolytique de l'enzyme Pfizer montre que la réaction primaire se produit comme avec la présure animale, pendant la période qui correspond à la coagulation ; ensuite, la proportion de caséine qui devient soluble dans 12 p. 100 d'acide trichloracétique croît lentement dans le cas de l'enzyme Pfizer, alors qu'elle varie peu dans le cas de la présure. L'activité protéolytique non spécifique de l'enzyme Pfizer est donc plus élevée que celle de la présure ou de la pepsine, mais dans un rapport relativement faible par comparaison avec d'autres enzymes coagulants [16, 17, 18] et avec diverses protéases étudiées dans les mêmes conditions [22]. Il est à noter que l'expérimentation pratique en cours (prochaine publication) a montré que l'on peut utiliser, pour la coagulation du lait en fromagerie, des doses d'enzyme Pfizer plus faibles que celles déduites de l'épreuve de floculation. Dans ces conditions, la protéolyse non spécifique, qui dépend de la concentration en enzyme, sera peu différente de celle de la présure, après 60 mn d'« emprésurage ».

Le maximum d'activité protéolytique de l'enzyme Pfizer doit se situer vers  $pH$  5,9, lorsque la caséine entière de vache est utilisée comme substrat et lorsque l'on emploie la méthode de précipitation à l'acide trichloracétique. Dans ces conditions, seule la réaction primaire de la présure animale (dont le substrat spécifique est la caséine kappa) se manifeste ; des valeurs différentes ont été publiées par plusieurs auteurs en ce qui concerne l'optimum de cette dernière réaction : entre  $pH$  3,5 et 5,5 [23], vers  $pH$  4,0 [24], sur la caséine entière, et vers  $pH$  5,5 [25], sur la caséine kappa. L'optimum de la réaction protéolytique non spécifique de la présure n'est pas connu, mais on sait que le maximum de protéolyse de l'hémoglobine se situe vers  $pH$  3,7 [26]. L'enzyme Pfizer est probablement une protéase un peu moins « acide » que la présure. Il est permis de penser que la protéolyse dans le fromage jeune, sera un peu plus rapide avec l'enzyme Pfizer qu'avec la présure. L'expérimentation en cours a révélé, en effet, une maturation plus régulière et un peu plus rapide des fromages à « pâtes molles », lorsque l'enzyme Pfizer a été utilisé.

Comme d'autres préparations enzymatiques coagulant le lait, récemment mises au point [16, 21], l'enzyme Pfizer est constitué de plusieurs protéines. L'un des constituants est dominant ; il migre dans le voisinage du principal constituant de la présure animale, de  $pH$  2,0 à  $pH$  6,5. La séparation électrophorétique et chromatographique des constituants de l'enzyme Pfizer et l'étude particulière de chacun d'eux ont été entreprises ; les résultats feront l'objet d'une publication ultérieure.

### Résumé

L'étude en laboratoire de l'enzyme coagulant Pfizer a montré qu'il s'apparente à la présure animale et qu'il doit bien convenir à la coagulation du lait de fromagerie. Cet enzyme possède des caractères spécifiques qui le distinguent d'enzymes coagulants provenant d'autres moisissures ou de bactéries. Il est moins sensible aux variations du  $pH$  et de la teneur en calcium ionisé du lait que la présure et que d'autres produits de remplacement. La « réaction primaire » paraît se dérouler de la même manière, avec la présure et avec l'enzyme Pfizer, mais ce dernier provoque une protéolyse non spécifique un peu plus forte. Le coagulum formé dans le lait par l'enzyme Pfizer a des propriétés rhéologiques tout à fait comparables à celles du coagulum formé par la présure. L'étude électrophorétique du nouvel enzyme a été entreprise.

### Summary

Laboratory testing of the Pfizer coagulating enzyme has shown that it is similar in its essential enzymological and technological properties in cheesemaking to animal rennet. This enzyme has specific properties which differentiate it from other bacterial or fungal coagulating enzymes. It is less sensitive to variations in the  $pH$  and ionic calcium content of milk than are animal rennet or other milk coagulating enzymes. The « primary reaction » develops in the same manner with rennin as with the Pfizer enzyme, but the latter causes a slightly more pronounced unspecific reaction.

The rheological properties of the curd are quite similar with both enzymes. The electrophoretical study of the new enzyme has been undertaken.

### Zusammenfassung

Die Prüfung des Milchgerinnungsenzyms von Pfizer in unserem Laboratorium hat gezeigt, dass es sich hinsichtlich seiner enzymologischen und technologischen Eigenschaften in der Käseherstellung ähnlich dem tierischen Lab verhält. Dieses Enzym hat spezifische Eigenschaften, durch die es sich von anderen bakteriellen oder Schimmelpilz-Koagulierungsenzymen unterscheidet. Es ist weniger empfindlich gegen Veränderungen des  $pH$ -Wertes oder des Gehalts an Calciumionen der Milch als tierisches Lab oder andere Milchgerinnungsenzyme. Die « Primärreaktion » verläuft mit tierischem Lab wie mit dem Pfizer Enzym, letzteres hat jedoch eine etwas ausgeprägtere unspezifische Reaktion.

Die rheologischen Eigenschaften des Bruchs sind bei beiden Enzymen sehr ähnlich. Das neue Enzym wurde elektrophoretisch untersucht.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] NAUDTS (M.). Rapport sessions annuelles. *Fédér. Internat. Laiterie*, 1967.
- [2] JOLLÈS (P.), ALAIS (C.), et JOLLÈS (J.). *Biochim. Biophys. Acta*, **69**, 1963, 511.
- [3] MELACHOURIS (N. P.) et TUCKEY (S. L.). *J. Dairy Sci.*, **47**, 1964, 1.
- [4] RAADSVELD (C. W.). *Misset's Zuivel*, **70**, 1964, 51.
- [5] BADINGS (H. T.), STADHOUDERS (J.) et VAN DUIN (H.). *J. Dairy Sci.*, **51**, 1968, 31.
- [6] STADHOUDERS (J.) et VERINGA (H. A.). *Netherl. Milk Dairy J.*, **21**, 1967, 192.
- [7] ALAIS (C.). Travaux non publiés.
- [8] ALAIS (C.). *Ann. Technol. Agric.*, **4**, 1955, 113.
- [9] BERRIDGE (N. J.). *Biochem. J.*, **39**, 1945, 179. *Analyst*, **77**, 1952, 57.
- [10] ALAIS (C.). 14<sup>e</sup> Congr. Internat., *Laiterie*, vol. II, 1956, 823.
- [11] FRENTZ (R.). *Le Lait*, **45**, 1965, 489.
- [12] TARADO DE LA FUENTE (B.) et FRENTZ (R.). *Lait*, **46**, 1966, 371.
- [13] ALAIS (C.), MOCQUOT (G.), NITSCHMANN (Hs.) et ZÄHLER (P.). *Helv. Chim. Acta*, **36**, 1953, 1955.
- [14] ALAIS (C.). Thèse science, Paris, 1962.
- [15] BURNETT (J.) et SCOTT-BLAIR (G. W.). *Dairy Industry*, **28**, 1963, 220.
- [16] TUCKEY (S. L.), Conférence Nancy, 1967. *Rev. Lait. Franc.*, n° 244, 1967, 364. *J. Dairy Sci.*, **51**, 1968, 650.
- [17] RICHARDSON (G. H.), NELSON (J. H.), LUBNOW (R. E.) et SCHWARBERG (R. L.). *J. Dairy Sci.*, **50**, 1967, 1066.
- [18] BEHNKE (U.). *Milchwissenschaft*, **22**, 1967, 563.
- [19] SCHALINATUS (E.) et BEHNKE (U.). *Milchwissenschaft*, **22**, 1967, 601.
- [20] IWASAKI (S.), TAMURA (G.) et ARIMA (K.). *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 1967, 546.
- [21] IWASAKI (S.), YASUI (T.), TAMURA (G.) et ARIMA (K.). *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 1967, 1421.
- [22] MATTENHEIMER (H.) et NITSCHMANN (Hs.). *Helv. Chim. Acta*, **38**, 1955, 687.
- [23] NITSCHMANN (Hs.) et BOHREN (H. U.). *Helv. Chim. Acta*, **38**, 1955, 1953.
- [24] FOLTMANN (B.). *Acta Chem. Scand.*, **13**, 1959, 1927.
- [25] GARNIER (J.), MOCQUOT (G.), RIBADEAU-DUMAS (B.) et MAUBOIS (J. L.). *Ann. Nutr. Alim.*, **22**, 1968 B., 495.
- [26] BERRIDGE (N. J.). *Biochem. J.*, **39**, 1945, 179.