

Service Commun de la Documentation

Trabois

**RÉCENTS PROGRÈS EN GÉNIE DES PROCÉDÉS**

**DES MICROPHÉNOMÈNES**

**AUX MICROTECHNOLOGIES**

**Nancy 95**

M.N. PONS  
Coordonnatrice

**VOLUME 10 - 1996**

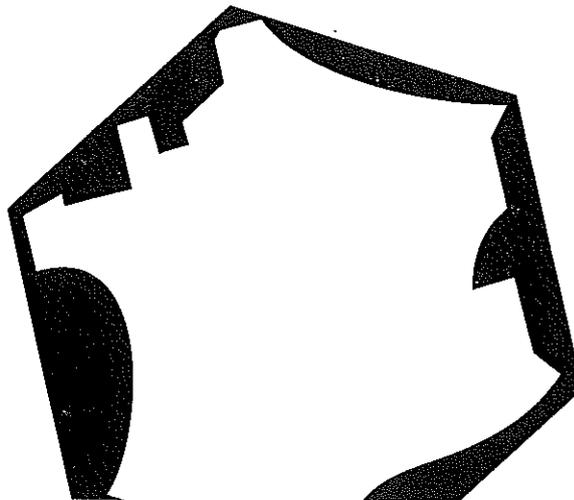
**46**

LAVOISIER  
TECHNIQUE  
ET DOCUMENTATION  
PARIS

**GROUPE  
FRANCO  
DE G  
DES PROCÉDÉS**



D 136 000913 3



# ACCELERATION DE L'AFFINAGE DE FROMAGES AVEC DES ENZYMES ENCAPSULEES DANS DES BILLES D'ALGINATE

---

J.M. REPARET, D. PONCELET

◇ Laboratoire de Biochimie Appliquée  
ENSAIA - INPL  
2, avenue de la Forêt de Haye  
54500 VANDOEUVRE-LES-NANCY

J. SCHER, J.P. RAMET

◇ Laboratoire de Physicochimie et Génie Alimentaires  
ENSAIA - INPL  
2, avenue de la Forêt de Haye  
54500 VANDOEUVRE-LES-NANCY

---

## Résumé

On se propose d'accélérer l'affinage du Saint-Paulin en utilisant un nouveau procédé de bioencapsulation d'enzyme protéolytique élaboré au laboratoire. Dans un premier temps, on observe l'influence du polymère de recouvrement sur la libération de la substance active. Cette première étape ayant donné des résultats concluants, nous suivons l'influence de l'immobilisation enzymatique sur la protéolyse du fromage.

## I. INTRODUCTION

La texture, la saveur et l'aspect sont les trois composants essentiels de la qualité organoleptique des fromages. Ces propriétés se développent lentement au cours de l'affinage, à la suite de réactions enzymatiques, liées à la présence de protéases endogènes et à l'activité enzymatique développée par les bactéries lactiques lors de l'affinage (1, 2).

Pour réduire, le coût d'immobilisation des fromages, pendant cette phase de la fabrication, diverses solutions ont été proposées pour réduire le temps d'affinage : accroissement de l'activité protéolytique et peptidolytique par ajout d'enzyme exogène (3, 4), augmentation de la teneur en ferment lactique ou cellules atténuées (5, 6).

L'ajout direct d'enzyme exogène présente souvent des inconvénients liés d'une part, à la perte en substance active dans le lactosérum, et d'autre part à un taux de protéolyse trop important responsable de l'amertume des fromages, d'où l'intérêt d'utiliser la bioencapsulation pour éviter ces difficultés. La technique des liposomes a été la première technique de bioencapsulation à être utilisée (7, 8, 9). Dans cette étude, une nouvelle méthode de bioencapsulation, utilisant les billes d'alginate comme outil, est testée. Les billes d'alginate sont produites par émulsification et gélification interne (10). La bioencapsulation de molécules nécessite le recouvrement de la bille par un polymère cationique. Nous utilisons, ici la polyéthylèneimine, comme polymère de recouvrement.

Dans un premier temps, la cinétique de libération de l'enzyme par la bille d'alginate recouverte de polyéthylèneimine est suivie pour évaluer l'unité temporelle de la vitesse de relargage de l'enzyme ; dans la seconde partie de l'étude, l'application de la méthode au cas du fromage Saint-Paulin est envisagée.

## II. MATERIELS ET METHODES

### II.1. Fabrication du Saint-Paulin

Le Saint-Paulin est fabriqué à partir de lait reconstitué (laiterie du Val d'Ancenis, France). La poudre est dissoute dans l'eau à raison de 10%(p/p). Après un temps de repos de 12 heures, le lait est chauffé à 37°C. On ajoute alors les auxiliaires de coagulation : chlorure de calcium anhydre (0,01%), des ferments lactiques (Ezal 1, type MAO 16, Eurozyme, Texel, Dangé Saint Romain, France) à raison de 2 unités/100 l, constitués de *Streptococcus lactis* et *Streptococcus cremoris*. On procède à l'emprésurage avec une présure (Carlin Texel, Dangé Saint Romain) de force 1/10000ème à la concentration de 25 ml/100l de lait. Après floculation, et durcissement du gel, l'égouttage est déclenché par tranchage, puis poursuivi par un brassage. On procède alors à un délactosage au taux de 50%, puis à un nouveau brassage pendant 30 minutes. Le caillé est ensuite moulé et pressé pendant 24 heures. On place enfin les fromages en cave (température 14°C, humidité 85%) pour développer l'affinage de la pâte.

### II.2. Fabrication des billes d'alginate

La fabrication des billes d'alginate s'effectue suivant la méthode d'émulsification/gélification interne (10). L'alginate de sodium (2% p/p) est dissous dans un mélangeur, muni d'une hélice tripale (300 trs/min. ; 24 heures). La solution est laissée au repos pendant 1 heure pour éliminer les bulles d'air. La préparation d'alginate (100 ml) est ensuite mélangée avec 5 ml de carbonate de calcium (5% p/p). L'ensemble (105 ml) est ensuite ajouté à une huile végétale et maintenue sous agitation à 300 trs/min. pendant 15 minutes. On ajoute alors, 100 ml d'huile végétale contenant 400 µl d'acide acétique glacial. L'acide acétique permet la libération du calcium, qui en se substituant au sodium de l'alginate est à l'origine de la gélification. Après 5 minutes, on arrête l'agitation, on laisse décanter les billes, puis on élimine la phase organique. Les billes sont alors lavées dans du chlorure de calcium (0,05M) puis filtrées sur du papier de porosité 30 µm.

### II.3. Préparation enzymatique

La protéase utilisée pour accélérer l'affinage est la protéase neutre de *Bacillus subtilis* (Gist-Brocades, Delft, Hollande). La concentration de cette enzyme en solution peut-être définie par D.O. (fig1).

### II.4. Etude de la cinétique de transfert de l'enzyme par les billes d'alginate recouvertes de polyéthylèneimine (PEI)

Les billes d'alginate sont mélangées volume à volume avec une solution enzymatique de concentration égale à 25 g/l. Après deux heures, celles-ci sont récupérées par filtration, puis ensuite mélangées, toujours volume à volume avec différentes concentrations de polyéthylèneimine (0,25% ; 0,5% ; 1% ; 1,5% p/p). Après 30 minutes, elles sont à nouveau filtrées, puis on plonge les billes dans un volume identique d'eau ; on mesure l'évolution de la densité optique en fonction du temps pour apprécier le relargage de la protéase.

### II.5. Influence des billes d'alginate recouvertes de polyéthylèneimine sur la protéolyse du Saint-Paulin

Des billes d'alginate contenant 12,5 g/l de la protéase et recouvertes par de la polyéthylèneimine (0,25%) sont ajoutées aux grains de caillé au moment du moulage à raison de 1% (p/p). La protéolyse du Saint-Paulin est suivie, au cours du temps par la méthode Kjeldhal. Le rapport azote non caséinique/azote totale (A.N.C./Nt) correspond à la formation des peptides de hauts poids moléculaires (fig. 3), alors que le rapport azote non protéique/azote totale (A.N.P./Nt) quantifie les peptides de poids

moléculaires inférieurs (fig. 4). Les résultats correspondent à la moyenne de 3 mesures.

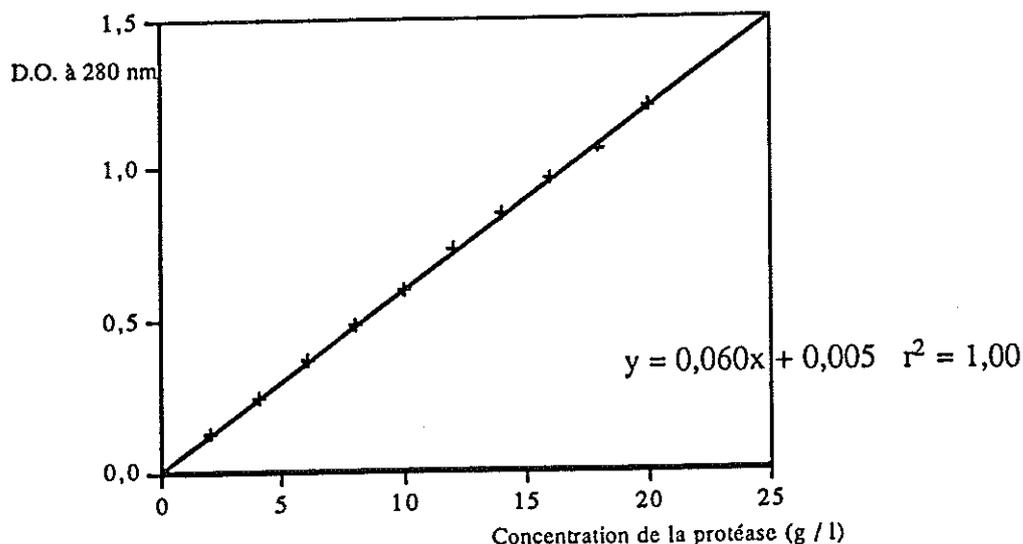


figure 1 : Droite de corrélation entre la concentration en protéase et la D.O. (280 nm)

### III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

#### III.1. Relargage de la protéase B500 par les billes d'alginate recouvertes de polyéthylèneimine (PEI)

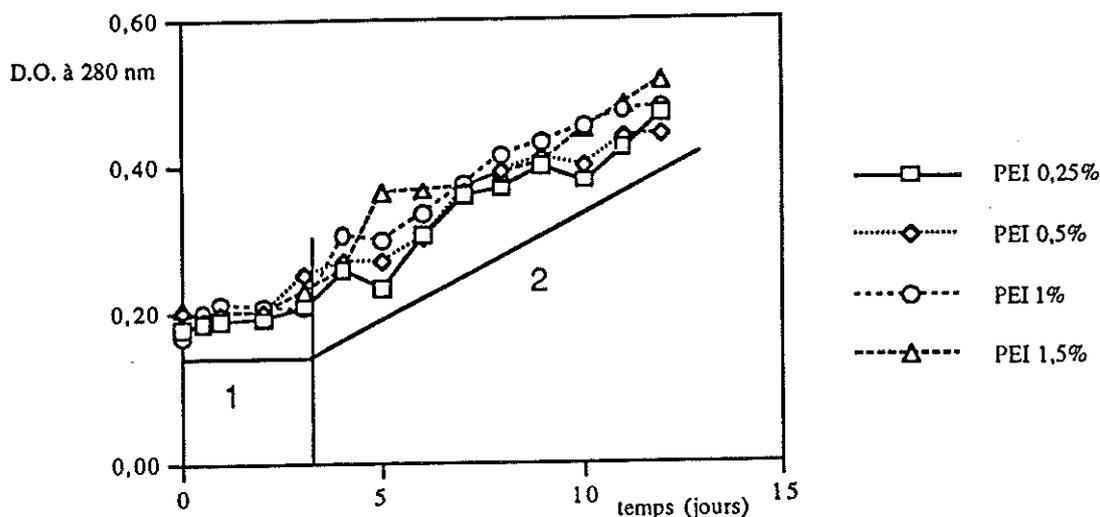


figure 2 : Relargage de la protéase de *B. subtilis* à partir de billes d'alginate recouvertes de PEI

On constate dès le début des mesures une absorbance d'environ 0,2 D.O. sans doute liée à des protéines résiduelles non fixées, libérées dans la solution. Le relargage ultérieur se fait en deux phases (fig. 2) :

- durant les deux à trois premiers jours, on observe une très faible augmentation de la concentration de protéase dans le milieu.

- du 3<sup>ème</sup> au 12<sup>ème</sup> jours on note une augmentation rapide de la concentration en protéine dans le surnageant.

### III.2. Ajout d'enzyme encapsulée au fromage

#### III.2.1 Evolution du rapport A.N.C./Nt

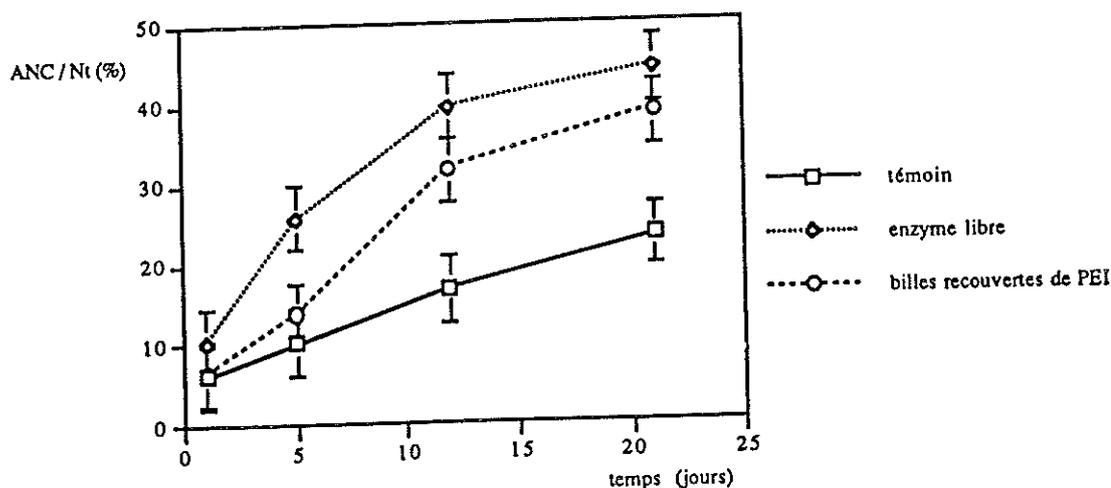


figure 3 : Evolution du rapport A.N.C. / Nt pour un fromage de type Saint-Paulin

#### III.2.2. Evolution du rapport A.N.P./Nt

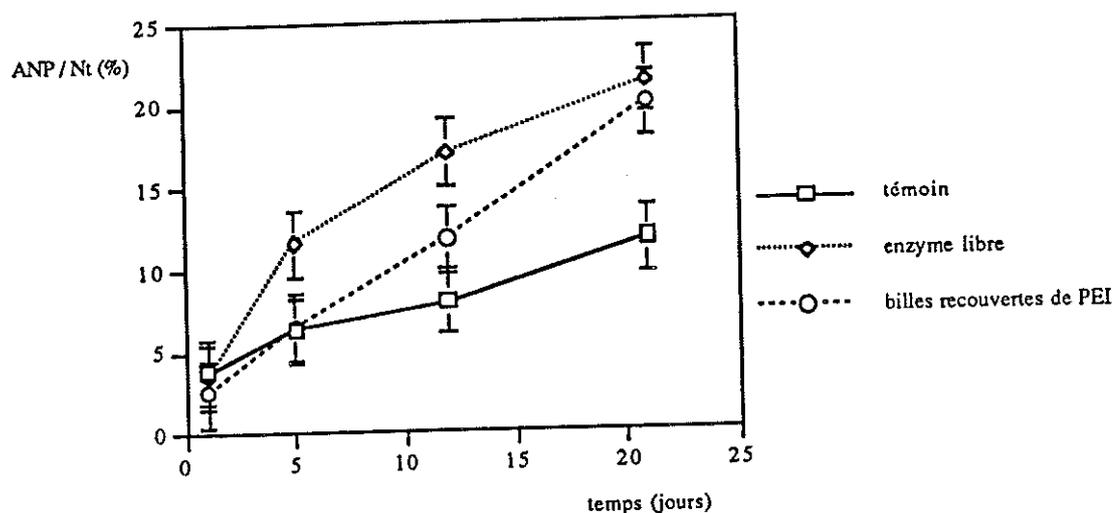


figure 4 : Evolution du rapport A.N.P. / Nt dans un fromage de type Saint-Paulin

Les figures 3 et 4 montrent pour les deux premières mesures effectuées à J+1 et J+5, que l'enzyme bioencapsulée induit une protéolyse proche de celle du témoin. A J+12 et J+21, la protéolyse du fromage avec l'enzyme bioencapsulée se rapproche des valeurs obtenues pour le fromage supplémenté en enzyme libre. On observe entre J+5 et J+12 une nette augmentation de l'affinage dans les fromages avec billes ; l'accroissement semble plus important pour les peptides de poids moléculaires inférieurs à 3000. Cette évolution est sans doute liée à une libération plus importante de l'enzyme entre ces deux prélèvements. Ces résultats indiquent que le recouvrement de la bille par la polyéthylèneimine, ralentit le transfert de l'enzyme vers l'extérieur. Le fromage contenant l'enzyme bioencapsulée est faiblement protéolysé en début d'affinage, alors qu'en fin d'affinage, la protéolyse se rapproche de celle observée dans le fromage supplémenté en enzyme.

#### IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude réalisée montre que la bioencapsulation dans des billes d'alginate, imprégnées d'une protéase bactérienne et ajoutées au fromage de Saint-Paulin permet de moduler la protéolyse par rapport à celle observée dans un fromage supplémenté en enzyme libre.

Le pelliculage de ces billes par de la polyéthylèneimine permet de retarder la libération de l'enzyme dans le temps. Au plan pratique, pour assurer une répartition optimisée de l'enzyme encapsulée dans la masse du fromage, il apparaît préférable de réaliser l'ajout des billes dans le lait plutôt que dans les grains de caillé au moment du moulage. Pour cela, il serait nécessaire d'obtenir des billes de densité exactement identique à celle du lait pour éviter leur sédimentation avant coagulation lorsque le lait est encore liquide.

#### V. REFERENCES

- (1) O'KEEF A.M., FOX P.F., and DALY C., Proteolysis in Cheddar cheese : role of coagulant and starter bacteria, *Journal of Dairy Research.*, 45, 465-477 (1978)
- (2) PUCHADES R., LEMIEUX L., and SIMARD R., Evolution of free amino-acids during the ripening of cheddar cheese containing added *Lactobacilli* strain, *Journal of Food Science.*, 54, 885-888 (1989)
- (3) FERNANDEZ-GARCIA E., OLANO A., CABEZUDO D., MARTIN-ALVAREZ D.J., RAMOS M., Accelerated ripening of Manchego type cheese by added commercial enzyme preparation from *Aspergillus oryzae*, *Enzyme Microbiology Technology.*, 519-524 (1994)
- (4) SEMINEGA T. and RAMET J.P., AccÉlération de l'affinage de fromages de type Saint-Paulin à l'aide de la protéase neutre de *Bacillus subtilis*, *Sciences des Aliments.*, hors series VIII, 193-199 (1987)
- (5) BUSTILLO-ARMENDARIZ G., and COCHET N., Fromages : la tradition à la base de l'innovation, *Biofutur.*, 119, 26-29 (1993)
- (6) KIRBY J.C., Microencapsulation and controlled delivery of food ingredients, *Food Sciences Technology Today.*, 5, 74-78 (1991)
- (7) PIARD J.C., EL SODA M., ALKHALAF W., ROUSSEAU., VASSAL L., J.C. GRIPPON., Acceleration of cheese ripening with liposome-entrapped proteinase, *Biotechnology Letters.*, 8, 241-246 (1986)
- (8) SCOLARI G., VESCOVO M., SARRA P.G., BOTTAZZI V., Proteolysis in cheese made with liposome-entrapped proteolytic enzymes, *Le Lait.*, 73, 281-292 (1993)
- (9) SKEIE S., NARVHUS J.A., and ABRAHAMSEN R.K., Addition of liposome-encapsulated enzymes SP446 and Flavourzyme to low fat (10% fat) Gouda-type cheese, *Milchwissenschaft.*, 50 (3), 134-138 (1995)
- (10) PONCELET D., LENCKI R., BEAULIEU C., HALLE J.P., NEUFELD R.J., FOURNIER A., Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology, *Applied Microbiology Biotechnology.*, 38, 39-45 (1992)