Contribution à l'étude de l'influence des facteurs de milieu sur la coagulation enzymatique du lait reconstitué

par

J. P. RAMET et F. WEBER*

I. INTRODUCTION

L'utilisation de lait partiellement ou totalement reconstitué tend à se répandre en fromagerie. Dans les pays industrialisés l'incorporation de lait sec dans le lait frais peut contribuer à la régularisation de la composition physico-chimique de la matière première indispensable au développement des procédés mécanisés de fabrication [18, 22, 23]. Dans certains pays en voie de développement, la fabrication du fromage à court ou moyen terme est en partie liée à l'utilisation des laits reconstitués ou recombinaisonnés [7, 22].

La mise en œuvre de ces laits en fromagerie est rendue plus délicate par les modifications physico-chimiques affectant leur aptitude à la coagulation ainsi que l'égouttage et l'affinage du coagulum [7, 10, 11, 12, 20, 24].

Dans notre étude nous nous sommes intéressés à la phase de coagulation et avons plus particulièrement étudié l'influence de quatre facteurs principaux de coagulation sur l'évolution du temps de floculation et des propriétés rhéologiques des coagulums obtenus avec un lait écrémé reconstitué.

II. MATERIELS ET METHODES

II.1. Substrat utilisé

Le milieu utilisé est un lait écrémé reconstitué à partir d'une poudre « low-heat » de bonne qualité microbiologique (tab. 1).

* Laboratoire de Science et Technologie des Aliments, E.N.S.A.I.A.-Laiterie - 54000 Nancy.

TABLEAU 1

Composition microbiologique de la poudre de lait

Aérobies mésophiles	105 000 germes par g
Thermo-résistants aérobies mésophiles	320 germes par g
Thermo-résistants aérobies thermophiles	120 germes par g
Clostridia sulfito-réducteurs	1 germe dans 3 g
Coliformes	absence dans 1 g
Escherichia coli	absence dans 1 g
Staphylocoques pathogènes	absence dans 1 g
Salmonella	absence dans 25 g
Streptocoques fécaux	1 < N < 10 par g
Levures	absence dans 0,1 g
Moisissures	absence dans 0,1 g

La dissolution de la poudre dans l'eau a été faite par agitation mécanique à 50° C pendant 10 min à l'aide d'une turbine spéciale de type défloculeuse. L'eau utilisée a été préalablement pasteurisée à 75° C pendant 20 s, sa composition chimique (tab. 2) montre qu'elle est adaptée à la qualité requise pour la reconstitution [7, 10].

TABLEAU 2

Composition physico-chimique de l'eau de reconstitution

Anions :	
Alcalinité bicarbonique (HCO_3^-)	58,0 mg/kg
Sulfates (SO_4^-)	57,3 mg/kg
Chlorures (Cl^-)	11,1 mg/kg
Cations :	
Calcium (Ca^{++})	29,0 mg/kg
Magnésium (Mg^{++})	7,3 mg/kg
Sodium (Na^+)	9,8 mg/kg
Potassium (K^+)	2,3 mg/kg
Fer total (Fe^{++})	0,16 mg/kg
Cuivre	< 0,01 mg/kg
Plomb	< 0,01 mg/kg
pH	7,25
Dureté totale (T.H.)	10,3° français

TABLEAU 3

Composition physico-chimique du lait reconstitué

Matière sèche	88,20 g/kg
Azote total	5,11 g/kg
Azote soluble (à pH 4,6)	1,18 g/kg
Azote de la caséine	3,93 g/kg
Azote non protéique (en TCA 12 p. 100)	0,27 g/kg
Calcium total	1,21 g/kg
Lactose hydraté	48,50 g/kg
Chlorures (en NaCl)	1,64 g/kg
Matières grasses	traces
pH	6,6
Acidité titrable (° Dornic)	17° D

Les caractéristiques physico-chimiques du lait reconstitué sont présentées dans le tableau 3.

La teneur en calcium du lait a été ajustée par addition de CaCl_2 , $2\text{H}_2\text{O}$; le pH réglé par addition d'acide lactique N/10.

Afin d'obtenir un substrat de qualité homogène et notamment d'assurer la stabilisation des équilibres physico-chimiques, le lait a été conservé 16 h à 6° C avant sa mise en œuvre.

II.2. Conditions de coagulation

Après ajustement de la température d'emprésurage, le lait a été réparti en bassines en acier inoxydable à raison de 20 kg par essai et maintenu au bain-marie thermostaté pendant toute la durée des mesures.

Les conditions de coagulation ont été les suivantes : présure (force : 1/10 000) : 25 ml/100 kg de lait ; CaCl_2 : 10 g/100 kg de lait ; pH à l'emprésurage : 6,60 ; température : 35° C. L'influence de chacune de ces variables a été étudiée indépendamment.

Toutes les manipulations ont été réalisées à l'aide de matériels préalablement stérilisés par voie chimique ou physique, afin de limiter tout risque de contamination microbienne susceptible d'entraîner une variation de composition du milieu (acidification, protéolyse).

II.3. Mesure du temps de floculation

La détermination du temps de floculation a été faite par une méthode dérivée de celle de Berridge [5] ; elle consiste à observer la formation de flocons de caséine dans le film de lait mouillant une lame d'acier inoxydable trempée puis retirée de la masse de lait emprésuré. L'opération doit être fréquente et rapide pour éviter tout écart de température entre le film de lait et le lait restant dans la cuve [17].

II.4. Mesure de la fermeté des coagulums

II.4.1. CHOIX D'UN APPAREIL DE MESURE

L'appréciation des propriétés rhéologiques du coagulum est faite traditionnellement par des méthodes faisant appel à l'acuité et l'expérience tactiles et visuelles du fromager.

La mesure physique de ces propriétés peut être envisagée à l'aide d'appareils spécialisés, mais il est indispensable que ceux-ci respectent la structure très fragile du gel. Tout cisaillement de ce dernier entraîne en effet l'apparition, par synérèse, d'un film de lactosérum qui désolidarise la liaison coagulum-module de mesure et rend aberrante la mesure [21].

Nous avons retenu pour notre étude le torsiomètre Nird-Plint et Partners conçu par Burnett et Scott Blair [6]. En raison de difficultés pratiques rencontrées avec les cylindres de mesure originaux, nous avons réalisé différents corps plongeants en verre pyrex ; ce matériau présente l'avantage d'être insensible à la corrosion et d'adhérer fortement au coagulum lacté [17]. Le module de 770 cm² de surface s'est avéré le plus adapté à notre étude.

Dans ces conditions la répétabilité de la mesure est bonne : le coefficient de variation, établi sur dix essais, est de 1,5 p.100. Il convient toutefois de préciser que pour parvenir à ce résultat plusieurs dispositions sont indispensables [17] :

- maintien du lait à température constante par bain-marie à circulation thermostatée à $\pm 0,5^\circ \text{C}$;

- réduction des déperditions calorifiques du lait par ajustement du niveau d'eau à 5 cm au-dessus de celui du lait et mise en place d'un couvercle de polystyrène expansé (ép. : 30 mm) sur la cuve pendant toute la durée de la mesure (le couvercle est perforé pour permettre le passage de l'axe du plongeur) ;

- nettoyage du module en verre à l'aide d'alcool méthylique ou éthylique, puis séchage avant immersion dans le lait ;

- fixation du module sans contact manuel avec la partie à immerger dans le lait ;

- arrêt des mouvements turbulents du lait, consécutifs au mélange de la présure, avant mise en place du module de mesure.

II.4.2. FACTEURS ÉTUDIÉS

Nous avons étudié l'évolution de la fermeté du coagulum en fonction de quatre variables à l' emprésurage : pH, température, concentration en CaCl_2 et en présure.

Pour chaque essai de coagulation, nous avons tracé la courbe d'évolution de la fermeté du gel en fonction du temps et caractérisé cette courbe par trois paramètres (fig. 1) :

fig. 1

Caractérisation des paramètres de coagulation.

- temps de floculation (T.F.) ;
- temps nécessaire à l'obtention de la fermeté maximale ou temps de raffermissement maximum ;
- amplitude du raffermissement ou indice de fermeté correspondant à la lecture faite sur le vernier du torsiomètre.

III. RESULTATS - DISCUSSION

III.1. Influence des facteurs de coagulation sur le temps de floculation

Les résultats présentés sur la figure 2 montrent que : l'abaissement du pH du lait, l'augmentation de la concentration en enzyme et en CaCl_2 , ajoutés au lait, entraînent un raccourcissement du temps de floculation ; par ailleurs la floculation est la plus rapide à des températures comprises entre 40 et 45° C.

fig. 2

Hypothèse explicative de la cinétique de raffermissement du coagulum.

L'aptitude à la coagulation du lait utilisé est bonne et voisine de celle d'un lait frais. Cette similitude s'explique par l'incidence mineure du traitement thermique, appliqué lors du séchage de la poudre sur les protéines et les équilibres salins [2, 12].

Ces observations confirment les résultats précédemment acquis par divers auteurs [1, 2, 3, 9, 17, 20] concernant la caractérisation de l'activité enzymatique de la présure.

III.2. Evolution de la fermeté du coagulum

Pour chaque essai de coagulation réalisé, la variation de la fermeté du coagulum en fonction du temps à une allure sigmoïde caractéristique est représentée par la courbe F (fig. 2).

Cette évolution laisse supposer que la fermeté à un instant donné est déterminée par deux types de réactions antagonistes. Dans cet

fig. 3

Influence de la variation des facteurs de milieu sur le temps de floculation.

(Conditions de coagulation : présure 25 ml/100 kg lait - CaCl_2 : 10 g/100 kg lait - pH : 6,60 - température 35° C).

ordre d'idée nous pouvons penser schématiquement, que dans nos conditions expérimentales, deux phénomènes se déroulent dans le lait lors de la coagulation :

— une dépolymérisation de la caséine consécutive à la protéolyse par l'enzyme coagulante ; l'allure de la réaction peut être assimilée à l'inverse de celle de la libération du N.P.N. [1] et représentée par la courbe D ;

— une structuration micellaire nouvelle qui s'établit après libération de sites par la protéolyse enzymatique et qui conduit à la formation des agrégats micellaires et du gel (courbe S) [16].

La résultante de ces deux courbes correspond à la courbe F ; elle traduit l'évolution d'un phénomène qui peut être assimilé pratiquement à la cinétique d'évolution de la viscosité du lait avant floculation [15] et à celle de la fermeté du coagulum [8, 17, 19] (fig. 2).

Cette hypothèse permet d'expliquer le comportement rhéologique particulier du coagulum lors de l'utilisation d'enzyme coagulante à activité protéolytique différente et en particulier l'obtention d'un gel très mou lorsque la protéase utilisée est très active [3, 14, 17].

III.3. Influence des facteurs de coagulation sur la fermeté du coagulum

III.3.1. INFLUENCE DU pH

Indice de fermeté

La fermeté maximale acquise par le coagulum est fortement influencée par le pH ; selon la zone de pH considérée, l'évolution est différente :

- pour des valeurs croissantes de pH 5,4 à 5,9, la fermeté augmente rapidement ;
- pour des valeurs croissantes de pH 6,2 à 6,6, la fermeté diminue ;
- pour des valeurs intermédiaires comprises entre 5,9 et 6,2, la fermeté passe par un maximum.

Temps de raffermissement

Le temps nécessaire au raffermissement maximum varie avec le pH :

- pour des valeurs croissantes de pH comprises entre 5,4 et 6,0, le raffermissement est rapide et de durée sensiblement égale ;
- pour les valeurs de pH croissantes de 6,0 à 6,6, le temps nécessaire du raffermissement maximum augmente fortement

La diminution de la fermeté du coagulum lorsque le pH diminue est généralement attribuée à une solubilisation du phosphate de calcium lié à la caséine [13]. Cette hypothèse permet d'expliquer la diminution de pH observée pour les valeurs de pH inférieures à 5,9, mais elle est en contradiction avec l'augmentation de la fermeté observée lorsque le pH diminue de 6,65 à 6,0. Il est donc vraisemblable que des facteurs autres que la solubilisation du Ca influence le raffermissement du gel.

III.3.2. INFLUENCE DE L'ADDITION DE CaCl_2 au lait

L'addition de quantités croissantes de CaCl_2 au lait entraîne une faible augmentation de la fermeté et du temps de raffermissement.

L'accroissement de fermeté observé peut s'expliquer par la variation de la teneur en phosphate colloïdal et la baisse de pH consécutives à la modification des équilibres salins par suite de l'apport de CaCl_2 [4].

fig. 4

Influence de la variation des facteurs de milieu sur l'indice de fermeté maximale du coagulum.

(Conditions de coagulation : présure : 25 ml/100 kg lait - CaCl_2 : 10 g/100 kg lait - pH : 6,60 - température : 35° C).

La prolongation du temps de raffermissement pourrait résulter d'un blocage par salification par le calcium ajouté, de fonctions acides intervenant dans les processus de raffermissement [20].

III.3.3. INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE

L'augmentation de la température de coagulation entraîne une diminution de la rigidité du coagulum et un raccourcissement du temps de raffermissement (fig. 4).

Le raccourcissement de la durée du raffermissement peut être expliqué par l'influence du coefficient de température au niveau de la réaction enzymatique de protéolyse (phase primaire) et de la phase d'agrégation des micelles et de gélification (phase secondaire). La diminution de fermeté consécutive à l'augmentation de la température, pourrait être due à un effet semblable à celui observé sur la viscosité.

III.3.4. CONCENTRATION EN ENZYME

La concentration en enzyme n'a pas d'influence sur la fermeté maxima du coagulum, mais le temps nécessaire à ce raffermissement décroît fortement lorsque la concentration enzymatique augmente.

Le rapport enzyme/substrat apparaît donc déterminant sur la cinétique de libération de sites réactionnels, puis d'établissement de liaisons contribuant au raffermissement du coagulum. L'indice de fermeté restant constant, les deux phénomènes apparaissent qualitativement et quantitativement indépendants de la concentration enzymatique.

fig. 5

Influence de la variation des facteurs de milieu sur le temps de raffermissement maximum.

(Conditions de coagulation : préure : 25 ml/100 kg lait - CaCl₂ : 10 g/100 kg lait - pH : 6,60 - température : 35° C).

CONCLUSION

Il ressort de notre étude que la poudre à basse température que nous avons utilisée possède une aptitude à la coagulation voisine de celle du lait frais.

Elle précise par ailleurs le rôle majeur des facteurs de milieu au niveau des phases primaire et secondaire de la coagulation ; ceux-ci déterminent à la fois l'activité protéolytique de l'enzyme coagulante, mais conditionnent également les modes de liaison du coagulum. L'hypothèse que nous avons émise permet de schématiser ces mécanismes.

Les facteurs étudiés déterminent de façon spécifique le temps de floculation et l'évolution des propriétés rhéologiques : le temps de floculation est fortement influencé par le pH, la température et la concentration en présure ; il est peu modifié par la supplémentation du lait en calcium.

La cinétique de raffermissement du gel lacté est fortement dépendante du pH et de la température ; la concentration enzymatique modifie la vitesse de raffermissement, mais non l'indice de fermeté maximale. L'ajout de calcium a peu d'influence sur les caractéristiques rhéologiques.

Les résultats soulignent également la nécessité impérative de maîtriser étroitement en pratique fromagère ces facteurs de coagulation ; il est inutile de rappeler que ceux-ci déterminent en effet directement les temps technologiques de fabrication, les rendements fromagers et donc la valorisation de la matière première. Il convient enfin de remarquer que dans nos conditions expérimentales, chacun des facteurs a été étudié isolément ; les résultats acquis ne sont donc pas transposables systématiquement aux conditions de fabrication où plusieurs variables peuvent évoluer simultanément et où les modalités de la coagulation résultent alors des interactions entre ces différents facteurs.

En outre, il faut noter que dans nos conditions expérimentales, l'équilibre salin du lait utilisé est peu perturbé : ceci permet d'expliquer le rôle mineur du calcium ajouté sur les modalités de la coagulation. Lorsque le passé thermique du lait a été plus traumatisant (réfrigération longue, traitement thermique énergétique), sa présence devient essentielle.

Résumé

L'influence de quatre facteurs de coagulation sur la cinétique de floculation et de raffermissement du coagulum a été étudiée en

utilisant un lait écrémé reconstitué à partir d'une poudre « low-heat ».

Le temps de floculation est fortement influencé par le pH, la température et la concentration en présence ; il est peu modifié par la supplémentation du lait en calcium.

En ce qui concerne l'évolution des propriétés rhéologiques du coagulum, il apparaît que les facteurs pH et température ont un rôle prépondérant sur la cinétique de raffermissement. La concentration enzymatique modifie la vitesse de raffermissement, mais non l'indice de fermeté maximale. L'ajout de calcium influence peu les caractéristiques rhéologiques étudiées.

Les conséquences pratiques en fromagerie sont envisagées.

Summary

The influence of four parameters upon milk's coagulation and curd's hardening's kinetic has been studied by using skimmed reconstituted milk from « low-heat » milk powder.

Flocking time is deeply induced by pH, temperature and enzyme's concentration, but few modified after adding of calcium.

Concerning rheological properties of curd, it appeared that pH, temperature have preponderant effect upon hardening's kinetic. Rennet's concentration influences only hardening's speed but do not appear significant for determination of highest level of firmness. Adding of calcium induces few effect upon the studied rheological characteristics.

Subsequently practical considerations in cheesemaking are investigated.

Reçu pour publication en octobre 1979.

Bibliographie

- [1] ALAIS (C.) (1962). — Etude de l'action enzymatique de la présure sur la caséine. Isolement et composition du caséino-glycopeptide. Thèse Doct. Sci., Paris, n° 759.
- [2] ALAIS (C.) (1965). — Influence de divers traitements sur l'aptitude du lait à la coagulation par la présure. *Revue Lait. Française*, 218-219, 90-95.
- [3] ALAIS (C.) (1975). — Science du lait. Principes des techniques laitières. 3^e édit. édit. SEP, Paris.
- [4] ASHWORTH (U. S.), NEBE (J.) (1960). — The effect of pH and concentration of soluble calcium on rennet curd-tension. *J. Dairy Sci.*, 43, 6, 853.
- [5] BERRIDGE (N. J.) (1942). — The second phase of rennet coagulation. *Nature*, 149, 194.
- [6] BURNETT (J.), SCOTT-BLAIR (G. W.) (1963). — A speed compensated torsionmeter for measuring the setting of milk by rennet. *Dairy Ind.*, 28, 4, 220.

- [7] CHERREY (G.) (1975). — Les laits reconstitués. *La Technique laitière*, 862, 49-55.
 - [8] DOUILLARD (R.) (1973). — Rheological analysis of curd tension. *J. Texture Studies*, 4, 158.
 - [9] GARNIER (J.) (1962). — Etude cinétique de la protéolyse par la présure de la caséine Kappa. Thèse Doct., Fac. Sci. Paris.
 - [10] KING (N.) (1966). — Dispersibility and reconstitutability of dried milk. *Dairy Sci. Abst.*, 28, (3), 105-118.
 - [11] LABLÉE (J.) (1979). — Fabrication de fromages à partir de lait recombiné. *Rev. Lait. Franç.*, 373, 17-20.
 - [12] LORIENT (D.), ALAIS (C.) (1970). — Dégradation thermique des caséines α_s et β de vache. *Bull. Soc. Biol.*, 52, 915.
 - [13] JEN (J. J.), ASHWORTH (U. S.) (1970). — Factors influencing the tension of rennet coagulated milk. Salt balance. *J. Dairy Sci.*, 53, 1201-1206.
 - [14] NAUDTS (M.) (1969). — Les différents types de présure. *Bull. Ann. F.I.L.*, partie VII.
 - [15] GUTHY (K.), NOVAK (G.) (1971). — Observations on the primary phase of milk coagulation by rennet under standardized conditions. *J. Dairy Res.*, 44, 362-366.
 - [16] OLSON (N. F.), BOTAZZI (V.) (1977). — Rheology of milk gels formed by milk clotting enzymes. *J. of Food Sci.*, 42, (3), 669-673.
 - [17] RAMET (J. P.) (1976). — Etude de l'aptitude fromagère d'une enzyme coagulante extraite de *Endothia parasitica*. Cas des fromages à pâte molle et à pâte pressée. Thèse, Université Nancy I, C.N.R.S. AO 12 170.
 - [18] RAMET (J. P.) (1978). — La mécanisation en fromagerie. Conférence 3^e cours F.A.O. pour l'Amérique latine, Valdivia (Chili).
 - [19] RAMET (J. P.), SCHLÜTER (A.) (1970). — Considérations pratiques sur la cinétique de coagulation du lait en fromagerie à l'aide d'un enzyme microbien Pfizer. *Rev. Lait. Franç.*, 280, 730-741.
 - [20] TARODO DE LA FUENTE (B.) (1973). — Etude de l'hydratation de la caséine en relation avec les phénomènes de coagulation acide et enzymatique du lait. Thèse Doct., Université Nancy I, C.N.R.S. AO 5 131.
 - [21] THOMASOW (J.), VOSS (E.) (1977). — Méthodes pour la détermination de la fermeté du coagulum de lait. *Bull. Ann. F.I.L.*, Doc. n° 99.
 - [22] VEISSEYRE (R.) (1975). — Technologie du lait. 3^e édit., *La Maison Rustique*, Paris.
 - [23] WEBER (F.) (1974). — Les procédés modernes de fromagerie. Technologie et mécanisation. *Revue Lait. Franç.*, 322, 467-478.
 - [24] WEBER (F.) (1976). — Etude de l'égouttage des coagulums de laits et composition des lactosérums. Thèse Université Caen, C.N.R.S. AO 12 690.
-