

Février 1983 / 119

Publié par la Station fédérale de recherches laitières

Directeur: Prof. Dr. B. Blanc

CH-3097 Liebefeld

## La coagulation du lait par la présure et par acidification

O. Flüeler

Station fédérale de recherches laitières  
CH - 3097 Liebefeld-Berne

### 1. Introduction

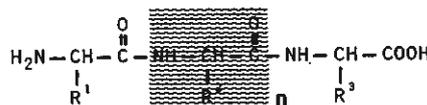
L'étude des moeurs et traditions alimentaires des peuples préhistoriques nous apprend que les techniques de transformation du lait remontent à des temps fort anciens. 5000 à 6000 ans avant notre ère déjà, des peuplades de chasseurs et de pasteurs d'Asie Mineure et d'Arabie semblent avoir utilisé des estomacs et intestins d'animaux fraîchement abattus pour conserver des liquides, notamment du lait. Le plus souvent, le lait devenait sans doute acide et se solidifiait dans ces récipients organiques. La masse blanche de fromage qui se détachait et le petit-lait verdâtre enrichissaient les repas de ces hommes primitifs. De nos jours, peu importe que la coagulation par la présure ou la coagulation acide ait été responsable de cette production involontaire de fromage. En tout cas, les produits laitiers de l'Asie Mineure connus sous le nom de «fromages de nomades» ont gardé leurs principales caractéristiques originales.

Dans la mise au point des nombreuses variétés de fromage que nous connaissons aujourd'hui, l'application variable de la coagulation par la présure et de la coagulation par acidification joue un rôle important. Il serait impossible de fabriquer une si large gamme de produits laitiers les plus raffinés sans l'emploi systématique de ces deux types de coagulation. L'étude suivante a pour but de mettre en évidence les rapports physico-chimique de la coagulation par la présure et de la coagulation

par acidification et d'en montrer les principaux effets sur le produit fini.

### 2. Structure de la caséine

La caséine du lait, comme d'autres protéines, est constituée de longues chaînes non ramifiées, les chaînes polypeptidiques. Les maillons de cette chaîne de polypeptides sont les acides aminés. Une chaîne polypeptidique peut comprendre plusieurs centaines d'acides aminés. MERCIER et al. (9) ont déterminé dans la  $\beta$ -caséine 209 molécules d'acides aminés.



$\alpha_s$ -Casein: n = 199 acides aminés

$\beta$ -Casein: n = 209 acides aminés

$\alpha$ -Casein: n ~ 170 acides aminés

Figure 1: exemple d'une chaîne polypeptidique

Les acides aminés sont des composés organiques. Ils comportent toujours un groupe amine ( $-\text{NH}_2$ ), un groupement carboxyle ( $-\text{COOH}$ ) et un reste (R) qu'on appelle aussi chaîne latérale. Les différents acides aminés d'une chaîne polypeptidique sont solidement liés entre eux par le groupe carboxyle et le groupe amine; le point d'assemblage est appelé pont peptidique. Cette liaison, très solide, ne peut être dissociée que par des acides bouillants ou par des enzymes protéolytiques (protéases). Les restes (R) des aci-

des aminés sont liés à la chaîne polypeptidique sous forme de courtes chaînes latérales.

Les acides aminés ont des propriétés déterminées qu'ils gardent dans les protéines. Ces propriétés nous permettent de distinguer un grand nombre d'acides aminés différents. Dans les protéines naturelles, on compte 20 acides aminés. Les protéines du lait en contiennent 19.

Les propriétés spécifiques des acides aminés leur viennent surtout des restes (chaînes latérales). Selon leurs propriétés chimiques et les réactions qu'elles déclenchent, nous distinguons les chaînes latérales polaires ionisables, les chaînes latérales polaires non ionisables et les chaînes latérales non polaires.

Les chaînes latérales des acides aminés d'une chaîne polypeptidique sont capables des réactions les plus diverses. Dans certaines conditions, elles peuvent fixer des ions (calcium, phosphate, par exemple) ou entrer en liaison avec les chaînes latérales d'autres acides aminés et des chaînes polypeptidiques voisines (ponts hydrogène, disulfure ou ester de phosphate). Le nombre et la nature des chaînes latérales d'une chaîne de polypeptides ainsi que leur rapport quantitatif à la surface d'une particule protéique (micelle de caséine) sont à l'origine d'importantes propriétés de la caséine. Ainsi, par exemple,

— ils sont responsables de la structure spatiale de la caséine et de la formation des particules de caséine (micelles)

- ils conditionnent l'aptitude de la caséine à entrer en liaison avec le calcium et le phosphate
- ils donnent à la caséine native son caractère légèrement acide et déterminent la charge électrique des micelles de caséine
- ils commandent la fixation d'eau (hydratation) et la solubilité colloïdale de la caséine
- ils rendent la caséine apte à former des sels (caséinates, par ex.)

— ils donnent aux protéines la capacité de migrer dans le champ électrique (analyses électrophorétiques).

Les différences structurales des chaînes polypeptidiques (nombre, genre et configuration des divers acides aminés) nous permettent de distinguer les  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\kappa$ -caséines. La présence et les propriétés spécifiques de ces fractions caséiniques sont présentées dans le tableau 1.

**Tableau 1:** présence et propriétés des fractions caséiniques du lait de vache

Nom	Présence	Propriétés
<b><math>\alpha</math>-caséines:</b>		
— $\alpha_s$ -caséine	45—55%	— sensible au calcium, floculation en présence d'ions Ca, stabilisation par $\kappa$ -caséine
— $\kappa$ -caséine	8—15%	— insensible au calcium, agit comme protection colloïdale de tout le complexe caséinique et commande la solubilité colloïdale, attaquée par la présure
<b><math>\beta</math>-caséine:</b>		
$\gamma$ -caséines	25—35%	— insensible au calcium
R-, S-, TS-caséines	3— 7%	— présentes en petites quantités, fragments de la $\beta$ -caséine

La caséine est présente dans le lait fraîchement traité sous forme de micelles, composées des différentes fractions. Un complexe de caséine est une agglomération des fractions caséiniques  $\alpha_s$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\kappa$ , d'après KIRCHMEIER (6) dans le rapport 9 : 4 : 1 : 3. Les chaînes polypeptidiques sont liées entre elles par les groupes carboxyles et les chaînes latérales réactives. Le calcium joue un rôle important: à l'aide d'ions de calcium et de phosphates de calcium, un grand nombre de complexes de caséine se réunissent pour former des micelles (corps globulaires) (figures 2 et 4). Leur diamètre varie entre 10 et 160 nm (1 nm = 1/1 000 000 mm). Il est environ 10 fois plus petit que celui des globules gras du lait. Quelque 7 000 à 10 000 chaînes polypeptidiques participent à la structure de la micelle de caséine.

Les fractions caséiniques diffèrent considérablement par leur solubilité et leur sensibilité au calcium, la micelle de caséine est constituée d'après un principe déterminé (figure 2). Comme le montrent certains modèles (1, 9), la plus grande partie de la  $\kappa$ -caséine se trouve à la surface de la micelle, la partie électro-négative hydrophile, appelée caséinomacropeptide, s'orientant vers l'extérieur. Les caséines hydrophobes  $\alpha_s$  et  $\beta$  sont en majeure partie confinées à l'intérieur de la micelle.

A l'état natif, les micelles de caséine sont entourées d'un manteau d'hydratation (enveloppe aqueuse), qui a une fonction protectrice. Il est également responsable de la fine répartition de la caséine dans le lait. La formation de ce manteau d'hydratation doit être attribuée principalement aux propriétés hydrophiles de la  $\kappa$ -caséine et à la charge électrique à la surface de la micelle ainsi qu'au caractère polaire des molécules d'eau. L'intensité de cette enveloppe aqueuse dépend surtout de la

valeur pH et de la composition en sels minéraux du lait. Ces facteurs déterminent la coagulabilité du lait.

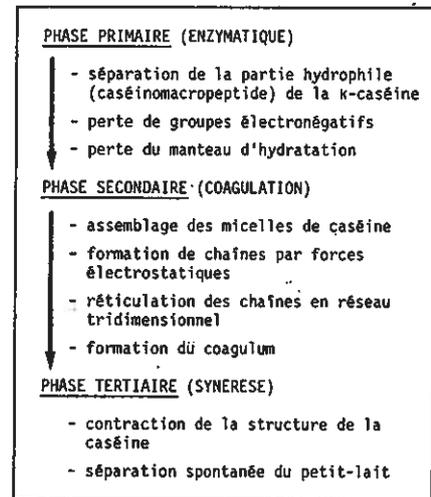
### 3. Coagulation par la présure et facteurs d'influence

La coagulation par la présure comprend trois phases principales:

- phase enzymatique ou primaire
- phase de coagulation ou secondaire
- phase de la synérèse ou tertiaire.

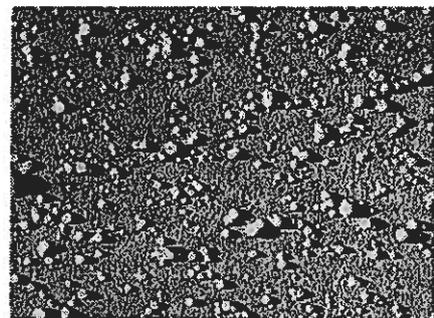
La figure 3 schématise les processus se déroulant dans le lait après l'addition de présure.

MECANISME DE LA COAGULATION PAR LA PRESURE

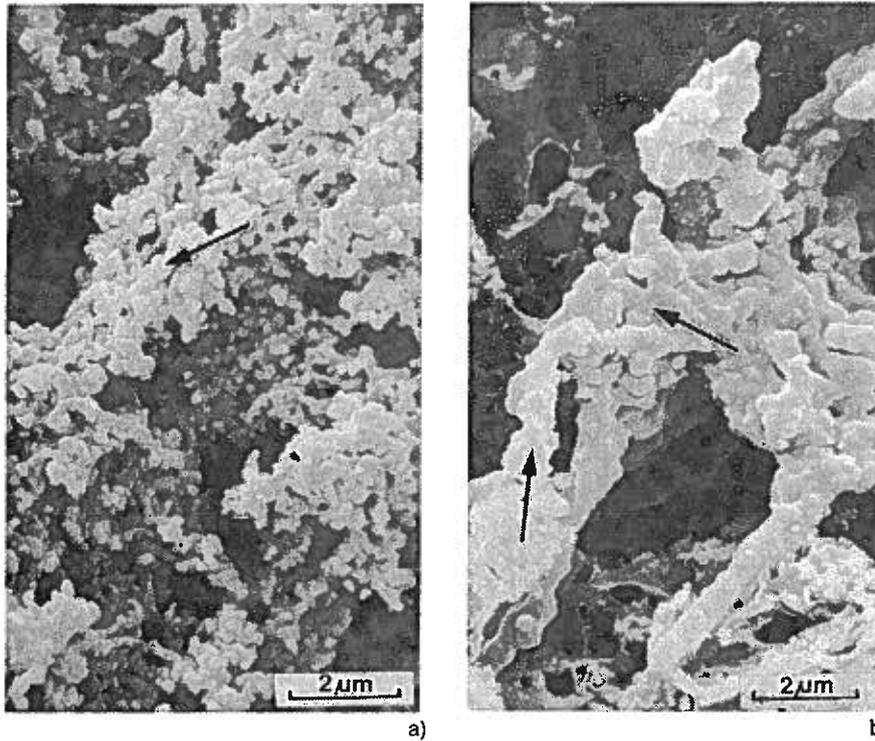


**Figure 3:** processus de coagulation du lait par la présure

Dans le lait frais, les particules sphériques de caséine sont finement réparties (figure 4). Elles ont une forte charge négative et, de ce fait, se repoussent. Après l'adjonction de la présure au lait, la partie hydrophile, fortement électro-négative, de la  $\kappa$ -caséine à la surface des micelles se détache sous l'effet de l'en-



**Figure 4:** vue au microscope électronique de micelles de caséine du lait avant l'adjonction de présure



**Figure 5:** vue au microscope électronique: coagulum frais (a) immédiatement après la coagulation et (b) 80 minutes plus tard, à la fin du processus de fabrication du gruyère (température de chauffage = 56 °C). On peut facilement reconnaître la fusion des micelles de caséine. (Les vues au microscope électronique ont été réalisées par M. M. Rüegg et Mlle U. Moor, que je remercie cordialement.)

zyme de la présure (chymosine) et se dissout comme caséinomacropéptide (→ phase primaire). L'action de la présure a pour effet que la surface des micelles comporte à peu près autant de charges négatives que positives, qui s'associent aux ions du lait (calcium, par ex.) ou aux chaînes latérales de micelles avoisinantes. Cela conduit à un assemblage de micelles caséiniques et à la formation de longues chaînes non-ramifiées (→ phase secondaire). Ensuite les chaînes micellaires s'enlacent pour former un dense réseau. Dans les cavités de cette structure, il y a de l'eau, avec des composants dissous du lait, et des globules gras. Ce stade correspond au coagulum frais dans la chaudière avant la formation du grain. La figure 5a montre une vue au microscope électronique d'un

coagulum peu après la coagulation. On peut toujours y distinguer les micelles de caséine de forme globulaire.

Dès le début de la coagulation, le lait tend normalement à se solidifier: les distances entre les micelles se raccourcissent et les points d'assemblage se multiplient. Le petit-lait inclus dans la structure de la caséine est expulsé (→ synérèse). A un stade plus avancé, les micelles changent de forme (figure 5b). Dans la fabrication du fromage, la synérèse de la caséine est secondée par le décaillage, le brassage avant le feu, le chauffage et le brassage final du mélange petit-lait — grain. Les processus de coagulation se déroulent de façon que certaines phases coïncident en partie et se développent parallèlement.

**Tableau 2:** influence de la température de coagulation sur la quantité de présure à utiliser dans la fabrication d'emmental (fabrication parallèle dans trois chaudières, n = 15)\*

		Variante 1	Contrôle	Variante 2
Température d'emprésurage	°C	30	32	34
Quantité de présure ajoutée (ml/100 l lait)	$\bar{x}$	163	151	141
	s	10	8	9
Temps de coagulation (minutes)	$\bar{x}$	32	32	32
Emploi de présure en plus ou en moins	(%)	+7,9	—	—6,6

\* Essai réalisé par la SFRL en 1978/79 (3)

La phase primaire commence juste après l'adjonction de la présure au lait de chaudière. Le détachement des caséinomacropéptides est à son maximum au début de la coagulation par la présure et diminue par la suite. Les caséinomacropéptides détachés peuvent être détectés dans le lait sous forme d'azote non protéinique.

L'association des micelles caséiniques en chaînes non ramifiées (phase secondaire) commence également tôt. Elle est lente au début et s'accélère dans la mesure où elle s'approche du point de floculation. Dans cette phase, le lait reste liquide. D'après KNOOP et al. (8), la ramification des chaînes micellaires et l'édification de la charpente caséinique se déclenchent peu avant l'apparition de la floculation. C'est à ce moment que le fromager observe la contraction dans la chaudière.

Au fur et à mesure que la coagulation progresse, le réseau devient plus dense et le coagulum se solidifie de plus en plus. Des influences mécaniques sur le lait en coagulation, telles que le changement de la température, le brassage ou le remuage du lait perturbent la formation du coagulum et sont défavorables à la synérèse, ce qui peut avoir une influence sur les propriétés de la pâte du fromage.

Dans le processus de coagulation par la présure, les facteurs suivants jouent un rôle important: température et pH du lait emprésuré, concentration en présure et composition en sels minéraux du lait.

**Température:** la vitesse d'une réaction enzymatique augmente avec la température. Dans la coagulation à caillette de veau du commerce, ceci est valable jusqu'à une limite de température de 38 à 41 °C. Des températures supérieures entraînent l'inactivation de l'enzyme de la présure. Le tableau 2, qui présente les résultats d'un essai de fabrication de fromages d'Emmental, effectué dans la fromagerie expérimentale d'Uettligen, montre le rapport entre température de coagulation et quantité de présure à utiliser.

**Valeur pH:** l'activité des enzymes dépend largement de la valeur pH. Dans le lait, le temps de coagulation par la présure se raccourcit dans la mesure où la valeur pH du lait s'abaisse (figure 6). Le pH optimal pour l'activité de l'enzyme de la présure (chymosine) oscille entre 5,3 et 6,3. Le degré d'acidité ou la valeur pH du lait de chaudière au moment

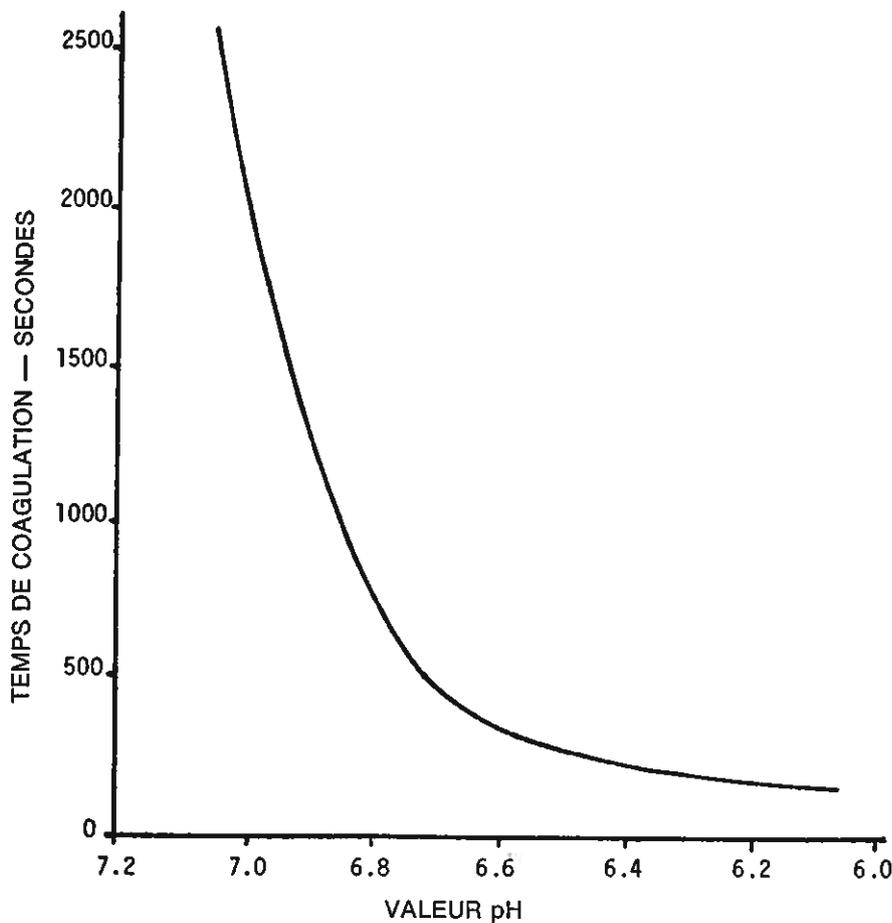


Figure 6: temps de coagulation par la présure en fonction de la valeur pH du lait

Tableau 3: effets de l'adjonction d'eau au lait de chaudière sur l'emploi de présure (fabrication parallèle dans trois chaudières; valeurs moyennes, n = 15)\*

		Chaudière 1	Chaudière 2	Chaudière 3
Lait	(kg)	1 009	1 009	1 009
Adjonction d'eau	(%) $\bar{x}$	0	10	20
Adjonction de présure (ml extrait/chaudière)	$\bar{x}$	135	150	165
	s	7	8	9
Temps de coagulation	(min) $\bar{x}$	31,6	31,2	32,5
	s	0,7	1,0	1,3
Adjonction de présure supplémentaire	(%)	—	+11,1	+22,2

\* Essai réalisé par la SFRL en 1979 (3)

de l'emprésurage est donc très important.

**Concentration en présure:** la vitesse de coagulation par la présure obéit largement à la loi de STORCH et SEGELCKE (11). D'après cette loi, il existe un rapport linéaire entre la concentration en présure du lait emprésuré et le temps de coagulation. La durée de coagulation du lait diminue avec l'augmentation de la quantité de présure ajoutée. Une éventuelle adjonction d'eau au lait de chaudière diminue la concentration enzymatique et entraînerait donc une prolongation de la durée

de coagulation (tableau 3). Dans ce cas, quand on veut maintenir une durée de coagulation déterminée, il faut augmenter la quantité de présure en fonction de la quantité d'eau ajoutée.

**Teneur en sels minéraux du lait:** le comportement du lait lors de la coagulation dépend surtout de sa teneur en sels minéraux et de leur solubilité. D'après de récents travaux, la coagulation est provoquée principalement par le calcium, le citrate et le phosphate ainsi que par la caséine (8, 2). La teneur en sels minéraux du lait diffère naturellement d'une

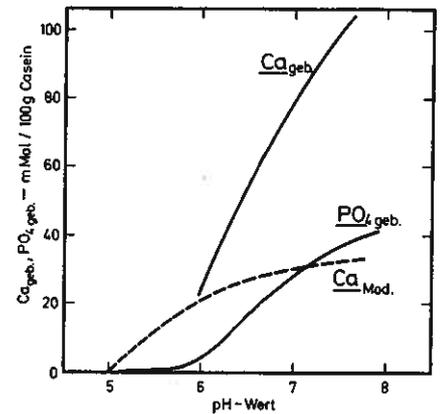
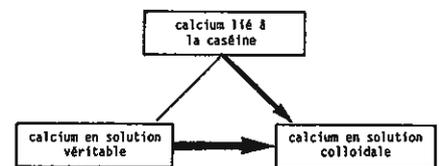
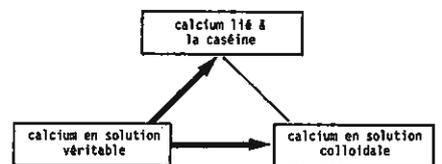


Figure 7: calcium et phosphate liés à la caséine (Ca lié, PO<sub>4</sub> lié) en fonction du pH du lait d'après ZITTELE, C. A. et al. (12)

- PASTEURISATION:



- ADDITION DE CaCl<sub>2</sub>:



- ACIDIFICATION:

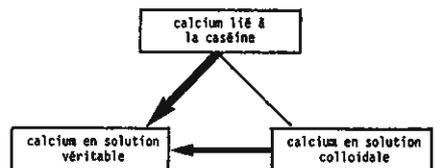


Figure 8: Influences de quelques mesures technologiques sur la solubilité du calcium dans le lait

vache à l'autre. Ces différences sont plus marquées encore quand l'animal souffre de mammite. On sait que le lait de mammite (résultats positifs de l'épreuve à la soude caustique) coagule mal (4, 10).

Le calcium est de première importance pour la coagulation par la présure. Dans le lait, il se rencontre en solution vraie (Ca<sup>++</sup>, CaC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub><sup>-</sup>, CaPO<sub>4</sub><sup>-</sup>, etc.), en solution colloïdale (Ca<sub>3</sub> [PO<sub>4</sub>]<sub>2</sub>) ou lié à la caséine. Ces différentes formes de solution se trouvent dans un rapport d'interdépendance déterminé. Il y a plusieurs rapports d'équilibre. Lorsque le rap-

domaine acide	domaine isoélectrique	domaine basique
$^+H_3N-\overset{\overset{R}{ }}{\underset{\underset{COOH}{ }}{C}}-H$	$H_2N-\overset{\overset{R}{ }}{\underset{\underset{COOH}{ }}{C}}-H$	$H_2N-\overset{\overset{R}{ }}{\underset{\underset{COO^-}{ }}{C}}-H$
pH < 4,10	pH = 4,10 - 4,60	pH > 4,60

Figure 9: comportement de la caséine adjonction d'acide ou de base

port entre deux formes de solution est modifié par une mesure technologique telle que le chauffage, l'addition de chlorure de calcium ou l'acidification, les autres rapports d'équilibre changent également (figures 7 et 8). Le calcium lié à la caséine est le plus important: à mesure que le taux de cette forme de caséine augmente, la coagulabilité du lait s'améliore.

#### 4. Coagulation par acidification

La coagulation par acidification se base sur le déplacement de l'équilibre de dissociation des groupes réactifs à la surface des micelles de caséine. Une augmentation de la concentration en ions H (abaissement du pH), provoquée soit par la production d'acide des bactéries lactiques (yogourts, par ex.) soit par addition d'acide, mène à une liaison non dissociée entre les groupements carboxyles de la caséine et les ions H de l'acide:  $R-COO^- + H^+ \rightarrow R-COOH$ . L'excès d'électronégativité de la caséine est ainsi supprimé, et les micelles de caséine perdent leur

manteau d'hydratation (8). Comme nous l'avons déjà démontré dans les chapitres précédents, la surface des micelles caséiniques comporte non seulement des groupements carboxyles électronégatifs, mais aussi des groupes amines électropositifs. Lorsque la concentration en ions H a atteint un certain niveau, la dissociation des groupements carboxyles se réduit au point qu'il y a autant de charges négatives que positives à la surface des micelles. Cet état est appelé point isoélectrique. Dans le lait, il se range entre pH 4,1 et 4,6. A ce stade, toutes les protéines ont une solubilité minimale.

Le point isoélectrique correspond à la charge électrique minimale; à cette valeur pH, la micelle de caséine présente l'enveloppe aqueuse la plus faible. La coagulation par acidification est donc une précipitation isoélectrique de la caséine à la suite d'une fixation d'ions H et d'un détachement de calcium lié à la caséine. Contrairement à la coagulation par la présure, la coagulation par acidification est un processus réversible. L'addition d'une base recharge la caséine d'électricité et la dissout.

Dans la fabrication de fromage, la coagulation se produit, en général, par l'effet combiné de la présure et de l'acide. La synérèse d'un coagulum frais peut être influencée, selon le type de fromage, par l'acidification. Une connaissance exacte des processus se déroulant pendant la coagulation offre au fromager un moyen efficace d'exercer une influence sur les propriétés de la pâte de fromage.

#### LITTÉRATURE

- 1 FARREL, J.R.: J. Dairy Sci., **56**, 1195—1206 (1973)
- 2 FLÜELER, O.: Diss.-Nr. 6045, ETH-Zürich (1977)
- 3 FLÜELER, O., SCHÄR, H. und KAUFMANN, H.: Interne Berichte Nr. 32 und 39, EFAM-Liebfeld (1979/80)
- 4 GUTHY, K.: Die Molkerei-Zeitung Welt der Milch, **33**, 105—107 (1979)
- 5 KIRCHMEIER, O.: Z. f. Lebensm.-Untersuchung und -Forschung, **149**, 211—217 (1972)
- 6 KIRCHMEIER, O.: Milchwissenschaft, **24**, 336—343 (1969)
- 7 KNOOP, A.M. und PETERS, K.-H.: Kieler Milchw. Forschungsberichte, **27**, 227—248 (1975)
- 8 KNOOP, A.M. und PETERS, K.-H.: Milchwissenschaft, **31**, 338—345 (1976)
- 9 MERCIER, J.C., GROSCLAUDE, F. et RIBADEAU-DUMAS, B.: Milchwissenschaft, **27**, 402—407 (1972)
- 10 RASELLI, R.: Vet. Med. Diss. Bern, 1958
- 11 STORCH und SEGELCKE zit. nach HOSTETTLER, H. et al.: Schweiz. Milchzeitung, **81**, Wiss. Beil. 23, 24 (1955)
- 12 ZITTLE, C.A., DELLA MONICA, E.S., RUDD, R.K. und CUSTER, J.H.: Archs. Biochem. Biophys., **76**, 334—353 (1958)