

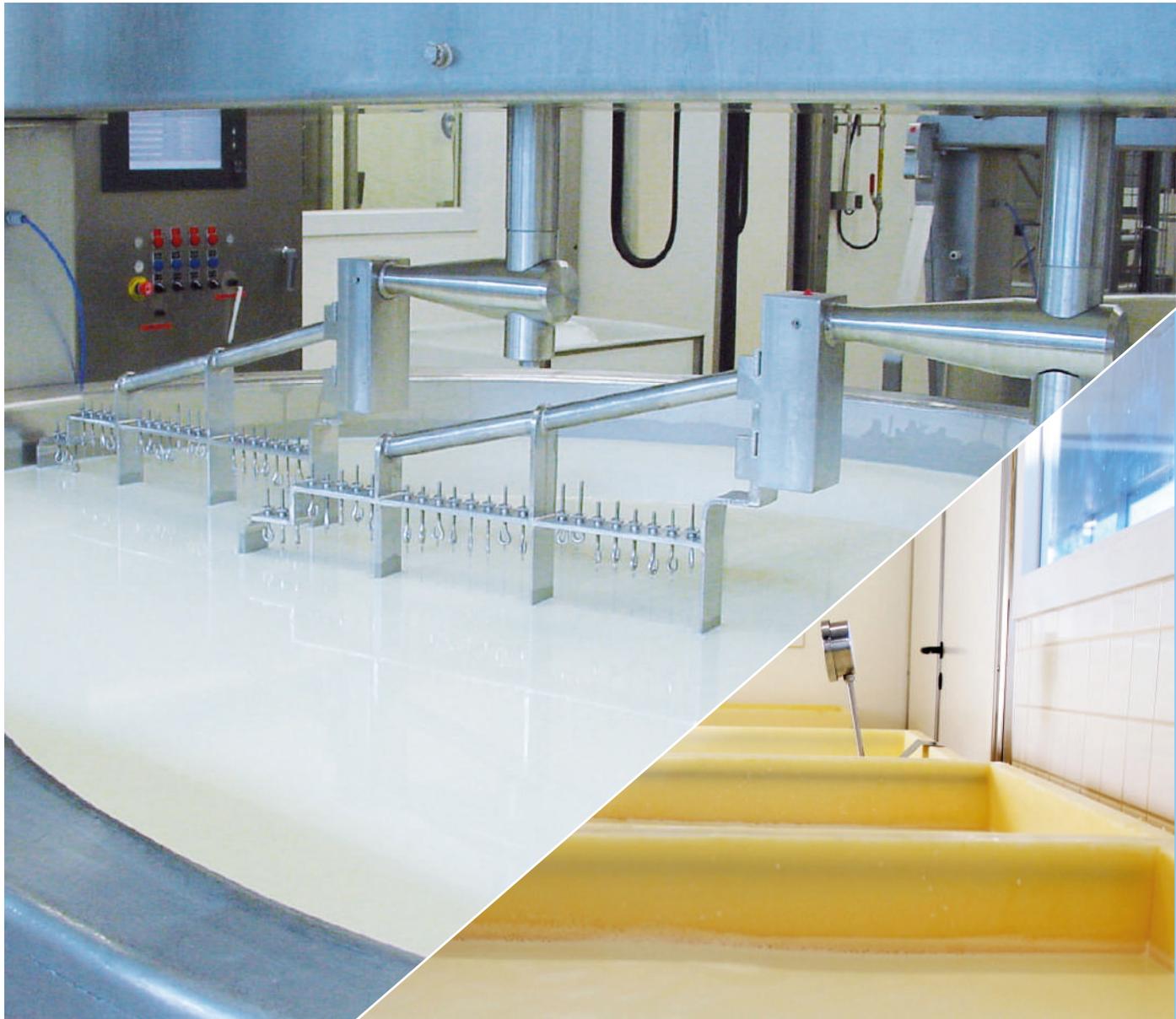


N°347

DÉCEMBRE 2017

REVUE DES

enil



LES COAGULANTS



REVUE DES ECOLES NATIONALES D'INDUSTRIE LAITIÈRE, DE LEURS AMICALES D'ANCIENS ÉLÈVES ET DES ORGANISMES ASSOCIÉS



L'ANFOPEIL (Association Nationale pour la Formation et le Perfectionnement du personnel de l'Industrie Laitière) édite la Revue des ENIL à destination des Ingénieurs et Techniciens de la transformation laitière. Le principal objectif de cette revue est de leur faire partager l'Expertise de notre réseau dans les différents domaines et problématiques techniques de leur activité.

Ce numéro de la Revue des ENIL, 3^{ème} de notre nouveau format mis en place fin 2016, est consacré aux coagulants, ingrédient indispensable en fromagerie. Nos experts, chercheurs et/ou enseignants, vous proposent donc un dossier thématique collectif faisant le point sur les connaissances actuelles relatives aux différents coagulants disponibles sur le marché.

Vous avez, si vous le souhaitez, accès à l'ensemble des dossiers thématiques de cette revue en format PDF sur notre site anfopeil-enil.fr. Ainsi, vous pouvez dès maintenant y consulter nos précédents numéros consacrés aux ferments lactiques et aux capteurs, et cette source d'informations s'enrichira au fil des parutions (semestrielles).

Je vous souhaite à tous une bonne lecture de notre Revue des ENIL.

Didier JOUBERT
Président ANFOPEIL

DIRECTEUR DE LA PUBLICATION :

Didier JOUBERT
Président ANFOPEIL

MISE EN PAGE :

Camille BARBIER

N° ISSN: 0395-6865

IMPRIMERIE Seigle-Ferrand
39800 POLIGNY
Dépot légal Décembre 2017

ANFOPEIL

BP10025
39800 POLIGNY

accueil@anfopeil-enil.fr
03 84 37 27 24

SOMMAIRE



■ INTRODUCTION	1
Stéphane GAVOYE & Benoit PAYSANT, ACTALIA Produits laitiers, Poligny	
■ HISTORIQUE DES COAGULANTS	3
Stéphane GAVOYE & Benoit PAYSANT, ACTALIA Produits laitiers, Poligny	
■ LES DIFFÉRENTES FAMILLES DE COAGULANTS ET LEUR MODE D'OBTENTION	4
Romain RICHOUX, ACTALIA Produits laitiers	
■ COMPOSITION DES DIFFÉRENTS COAGULANTS : ENZYMES ET SUPPORTS	6
Christine ACHILLEOS, INRA-URTAL & Stéphane GAVOYE, ACTALIA	
■ IMPACTS DES COAGULANTS EN TECHNOLOGIE FROMAGÈRE	11
- INTRODUCTION 11	
Jean MILLET, ENILBIO Poligny & Franck NEYERS, ENILIA Surgères	
- IMPACT DES COAGULANTS SUR LES ÉTAPES PRÉCOCES DE LA TRANSFORMATION FROMAGÈRE ... 12	
Romain RICHOUX, ACTALIA Produits Laitiers, Rennes	
- IMPACT DES COAGULANTS SUR L'AFFINAGE ET LA QUALITÉ DES FROMAGES 14	
Bruno VOLLE, ENIL Mamirolle	
- SYNTHÈSE : CRITÈRES DE CHOIX D'UN COAGULANT 18	
Jean MILLET, ENILBIO Poligny & Franck NEYERS, ENILIA Surgères	
■ LES MÉTHODES D'ANALYSES DES COAGULANTS	21
Philippe TROSSAT, ACTALIA	
■ STAGES ANFOPEIL	23
Thierry MICHELET, ANFOPEIL	

INTRODUCTION

Stéphane GAVOYE & Benoit PAYSANT, ACTALIA Produits laitiers, Poligny

LA COAGULATION DU LAIT : UN PEU D'HISTOIRE

La coagulation est un moyen ancestral utilisé pour conserver le lait, aliment hautement périssable par son instabilité physico-chimique et microbiologique.

Comment s'est réalisée la découverte des propriétés coagulantes des caillottes des ruminants ? Plusieurs hypothèses ont été émises. Probablement, le hasard et l'observation sont à la source de cette découverte. Les différentes hypothèses ont pour point commun l'utilisation d'estomacs pour conserver les liquides.

La rencontre de la caillotte et du lait mettra en évidence la transformation de lait liquide en coagulum. Où a pris place cette découverte ? Difficile de retracer exactement cette découverte qui prendrait place il y a 4000 à 5000 ans. En Egypte, en Eurasie ? Les échanges mondiaux étaient plus lents à l'époque. Des régions différentes ont probablement développé leur savoir-faire de manière parallèle [1].



QU'EST-CE QU'UN COAGULANT ?

Un coagulant est une préparation enzymatique dont la principale fonction est de faire coaguler le lait. Il est constitué d'enzymes protéolytiques (concentration inférieure à 0,1% pour les

coagulants liquides) qui reposent sur un support. La composition de ce support est très variable selon qu'il s'agit d'une macération de caillotte traditionnelle, d'une présure, d'un coagulant d'origine fongique ou d'une chymosine fermentaire [2].

La majorité des coagulants sont commercialisés sous forme liquide mais il est possible de s'en procurer sous forme de pâte ou de poudre, la composition spécifique des supports de ces préparations peut avoir un intérêt technologique.

Le tableau 1 montre l'origine et la codification des principales enzymes coagulantes, elles peuvent être d'origine animale, microbienne (protéases fongiques et chymosine fermentaire), végétale.

La majorité des enzymes coagulantes sont des endopeptidases aspartiques (EC.3.4.23.-) et des endopeptidases à cystéine (EC.3.4.22.-) [3].

Tableau 1 : Origine des différentes enzymes coagulantes

Protéase	Codification internationale [3]
Origine animale	
Pepsine	EC 3.4.23.1 EC 3.4.23.2
Chymosine	EC 3.4.23.4
Origine microbienne	
Protéases de <i>Cryphonectria parasitica</i>	EC 3.4.23.22
Protéases de <i>Rhizomucor miehei</i> et <i>Rhizomucor pusillus</i>	EC 3.4.23.23
Origine végétale	
Extrait d'artichaut – Extrait de chardon	
Papaïne (feuilles de papaye)	EC 3.4.22.2
Ficine (latex de figuier)	EC 3.4.22.3
Bromélaïne (tige de l'ananas)	EC 3.4.22.32

UTILISATION DES COAGULANTS

Les coagulants sont utilisés dans le schéma de fabrication de la quasi-totalité des fromages, à des doses plus ou moins importantes en fonction de la technologie. Quelques exceptions se réfèrent à la mise en œuvre d'une simple gélification acide (certains fromages frais) ou d'une précipitation thermo-acide (queso blanco, mascarpone, fromages de lactosérum) [4].

Les doses de coagulants varient de quelques millilitres jusqu'à plus de 30ml (équivalent présure à 520 mg/l de chymosine) pour 100 litres de lait pour respectivement les gels à dominance « lactique » (fromages frais) et les gels à dominance « présure » (fromages à pâte pressée).

La coagulation du lait est la première étape de la fabrication du fromage. Elle consiste à transformer le lait liquide en un gel, que l'on peut également nommer caillé ou coagulum, qui deviendra par la suite un fromage après de multiples étapes de transformations (acidification, égouttage, affinage). La coagulation est provoquée par l'ajout au lait du coagulant qui entraîne la déstabilisation des micelles de caséines et la formation du gel.



Cette étape se déroule en trois phases :

- Hydrolyse enzymatique de la caséine-K (liaison phénylalanine-méthionine PHE105-MET106) pour former la paracéine k et le caséinomacropeptide (CMP).

Cette réaction conduit à une déstabilisation du système colloïdal causée par une réduction du potentiel de surface des micelles et une diminution des répulsions électrostatiques.

- Agrégation des micelles déstabilisées, en présence d'ions calcium, pour former le gel. Cette phase débute lorsque 80 à 85 % des caséines-K sont hydrolysées.

- Organisation et réticulation du réseau protéique mettant en jeu des liaisons intermoléculaires qui se traduisent par un raffermissement du gel.

ET APRÈS LA COAGULATION ... ?

À la suite de l'étape de coagulation, une partie des enzymes coagulantes va être retenue dans le caillé. La proportion retenue dans le caillé va tout d'abord dépendre de l'enzyme en question mais les caractéristiques du milieu peuvent également avoir un effet comme le pH. Pour la chymosine, la quantité qui se fixe au caillé est d'autant plus importante que le pH du milieu est bas.

Les enzymes coagulantes peuvent également subir une dénaturation thermique totale ou partielle notamment en technologie pâte pressée cuite.

Les enzymes peuvent ainsi avoir, en fonction de leurs caractéristiques et de la technologie mise en œuvre, une activité protéolytique durant les étapes de fabrication du fromage et de ce fait impacter le rendement.

Cette activité protéolytique se poursuit généralement durant l'affinage influençant la texture et les caractéristiques organoleptiques du produit fini. Le choix de l'enzyme coagulante ne peut donc pas se faire uniquement par rapport à son activité coagulante. Son impact sur les rendements et l'action souhaitée lors de l'affinage, doivent également entrer en compte.



[1] Collin Jean-Claude et Al., Présure et Coagulants de substitution. Comment faire le bon choix ? Éditions Quæ, 2015.

[2] Rolet-Répécaud, O.; Berthier, F.; Beuvier, E.; Gavoye, S.; Notz, E.; Roustel, S.; Gagnaire, V.; Achilleos, C. 2013. Characterization of the non-coagulating enzyme fraction of different milk-clotting preparations. LWT - Food Sci. Technology 50 : 459- 468.

[3] <http://www.chem.qmul.ac.uk>

[4] Richoux Romain. Substituts de la présure Synthèse bibliographique pour ARILAIT, ITFF Rennes, 2001.

HISTORIQUE DES COAGULANTS

Stéphane GAVOYE & Benoit PAYSANT, ACTALIA Produits laitiers, Poligny

À L'ORIGINE ... UNIQUEMENT À BASE DE CAILLETES

Au début de la fabrication fromagère, la caillette (quatrième poche stomacale des ruminants) était directement mise en contact avec le lait pour en assurer la coagulation. Puis le séchage des caillettes a permis d'en améliorer la conservation en évitant la détérioration et l'apparition de mauvaises odeurs [1].

Ces caillettes sèches étaient et restent utilisées pour la réalisation de macérations à la fromagerie. Le lactosérum issu de la fabrication est utilisé pour incuber des lanières de caillettes sèches.

Les durées, températures d'incubation ainsi que l'acidification par les bactéries lactiques permettent de plus ou moins bons rendements d'extraction. Au milieu du XIX^e siècle, des industriels ont commencé à extraire les enzymes présentes dans les caillettes de veaux, les premières présures commerciales sont ainsi apparues sur le marché.



© CNIEL

À cette époque, l'absence de froid industriel rend la conservation des présures difficiles puisque l'activité de l'enzyme est altérée à température ambiante.

L'amélioration des connaissances sur les techniques de conservation ainsi que l'arrivée du froid industriel prolonge la durée de vie des présures [1].

LA PRODUCTION MONDIALE DE FROMAGE AUGMENTE

Dès le début des années 60, la quantité de présure de veaux disponible est devenue insuffisante face à l'augmentation de la production mondiale de fromages. Afin d'éviter la pénurie mais également pallier aux fluctuations qualitatives, de nombreux substituts ont été proposés : d'origine animale (trypsine, chymotrypsine, pepsine porcine) ; d'origine végétale (extrait d'artichaut, de chardon ...) ; d'origine fongique [2].

Quelques-uns seulement se sont révélés aptes à la production fromagère et ont été autorisés pour la transformation fromagère.

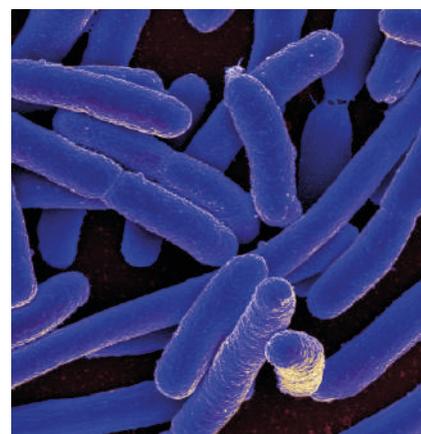
LES ANNÉES 1980 : DÉBUT DU GÉNIE GÉNÉTIQUE

Les progrès réalisés durant les années 1980 dans le domaine de la biochimie des protéines, de leur composition en acides aminés et le développement du génie génétique ont permis aux industriels de mettre au point un nouveau substitut : la chymosine fermentaire ou recombinante arrivée sur le marché en 1990.

Elle est obtenue en introduisant

artificiellement le gène de la prochymosine dans des micro-organismes tels que *Aspergillus niger var awamoris*, *Kluyveromyces lactis* ou encore *Escherichia coli*. [1],[3].

La chymosine fermentaire est aujourd'hui le coagulant majoritairement utilisé au niveau mondial.



© INRA

[1] Collin Jean-Claude et Al., Présure et Coagulants de substitution. Comment faire le bon choix ? Éditions Quæ, 2015.

[2] Germonville Alain. Agents coagulants. Techniques de l'ingénieur, F 4 700.

[3] Richoux Romain. Substituts de la présure Synthèse bibliographique pour ARILAIT, ITFF Rennes, 2001

LES DIFFÉRENTES FAMILLES DE COAGULANTS ET LEUR MODE D'OBTENTION

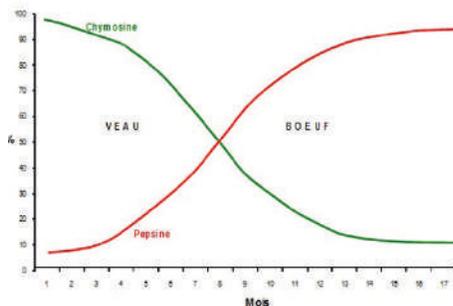
Romain RICHOUX, ACTALIA Rennes Produits laitiers

Pour coaguler le lait, il existe différentes familles d'enzymes : les présures et les autres préparations d'origine animale, les coagulants végétaux, fongiques ou fermentaires. Les deux premiers types sont issus de la macération d'estomacs ou de fleurs. Les coagulants fongiques et fermentaires sont obtenus par voie biotechnologique : extraction d'enzymes endogènes ou production de chymosine à l'aide de micro-organismes génétiquement modifiés. Cet article propose un point sur les différentes familles de coagulants et leur mode d'obtention.

Même si la présure constitue le coagulant de référence, différentes familles de coagulants enzymatiques sont disponibles pour la fabrication fromagère : présures et autres coagulants animaux, les coagulants fongiques, fermentaires ou encore végétaux.

Animaux	Fongiques	Fermentaires	Végétaux
Présures liquides Présures en poudre Macération de caillettes Présures en pâte Pepsines	Protéases de <i>Rhizomucor miehei</i> thermolabile et extra-thermolabile Protéases de <i>Cryphonectria parasitica</i>	Chymosine recombinante bovine Chymosine recombinante de chameau	Macération de fleurs de chardon

Les présures, composées de chymosine et de pepsine selon un rapport massique supérieur ou égal à 1,38, sont obtenues par macération de caillettes (la quatrième poche stomacale des ruminants) de jeunes ruminants nourris au lait. En effet, au cours de la croissance et de la diversification alimentaire du jeune veau se déroule une inversion des proportions de chymosine et de pepsine. Dans la caillette, la proportion de chymosine active chute ainsi de plus de 90 % à moins de 10 % chez le bovin adulte.



© ABIA

Les présures liquides peuvent être obtenues par deux voies : la voie traditionnelle d'extraction lente et une

méthode plus récente d'extraction rapide.

Dans le premier cas, on récupère bien sûr les enzymes protéolytiques (chymosine et pepsine) mais également un environnement spécifique composé de peptides, d'acides aminés et d'autres enzymes susceptibles de jouer sur la qualité et la typicité des fromages (Granday, 2015).

Le procédé d'extraction lente commence par la découpe en morceaux des caillettes, qui ont été préalablement vidées, dégraissées et congelées sous forme de pains d'une vingtaine de pièces.

Les caillettes sont alors mises à macérer dans une saumure à 10-12% de sel pendant plusieurs jours. Une acidification à l'acide chlorhydrique (pH 2 à 4) permet l'activation des enzymes qui sont présentes sous forme de précurseurs inactifs dans les caillettes : prochymosine et pepsinogène.

Après clarification, le pH est standardisé vers 5.5-5.7, la valeur de stabilité maximale de la chymosine.

On standardise enfin l'activité coagulante de la présure par dilution ou concentration par ultrafiltration, ainsi que sa teneur en sel (15- 20 %).

Une filtration stérilisante termine le process. Comme pour tous les coagulants, un apport de conservateur (sorbate et/ou benzoate) peut être pratiqué.

Le procédé par extraction rapide, plus couramment utilisé, se distingue de la technique traditionnelle par un broyage des caillettes et par une extraction des enzymes à une température inférieure à 40 °C, assistée par un pressage mécanique.

On retrouve là aussi les opérations d'activation à pH acide, de clarification, de standardisation du pH et de l'activité coagulante. Il existe aussi une méthode de filtration des enzymes sur résines échangeuses d'ions. Ce procédé d'extraction rapide ne prend qu'une dizaine de jours contre plusieurs semaines pour l'extraction lente.

À noter que la teneur en pepsine peut également être standardisée par un apport de pepsine bovine.

Celle-ci est obtenue grâce à un process similaire à celui utilisé pour la production de la présure, les caillettes mises en œuvre étant celles de bovins adultes. Des mélanges de présure et de pepsine bovine sont également produits.

La présure en poudre est obtenue par concentration de la présure par ultrafiltration, puis par séchage et tamisage. Une voie alternative consiste en la précipitation des enzymes par un salage de la solution, suivi d'un séchage à basse température sur lit fluidisé. Les poudres titrent de 5 000 à 7 500 mg d'enzyme active/kg, principalement de la chymosine (à comparer aux 520mg/L de l'extrait de présure).

Elles sont particulièrement adaptées aux zones difficiles d'accès et aux pays chauds.

La présure en pâte s'obtient par un simple broyage des caillettes (souvent d'agneaux et/ou de chevreaux) et apport de sel (généralement 20 % à 30 %). Elle renferme des éléments originels du contenu stomacal : lipases, estérases, activateurs de ferments.

Son emploi (après dissolution et filtration sur toile) conduit à des fromages plus typés grâce à l'activité de ces enzymes lipolytiques.

Pour des raisons microbiologiques, cette présure en pâte traditionnelle peut être remplacée par la présure en pâte reconstituée. Il s'agit d'un mélange de poudre de lait avec des enzymes coagulantes, en principe de la présure sous forme liquide. Des estérases prégastriques sont également ajoutées.

Pour cette raison, l'emploi de présure en pâte reconstituée est interdit en France.

La mise en œuvre de macérations de caillettes traditionnelles sur recuite reste une pratique courante dans plusieurs technologies traditionnelles, notamment en beaufort où cette utilisation est inscrite dans le cahier des charges de l'AOP.

Une petite quantité de lactosérum est chauffée à 95 °C puis additionnée d'acide acétique ou d'aisy (liquide acide résultant du mûrissement spontané ou provoqué d'une recuite) pour flocculer les protéines résiduelles. Ce sérum déprotéiné est alors refroidi et des caillettes sèches découpées en lanières y sont ajoutées. La macération est conduite à une température voisine de 42 °C pendant un à deux jours avec un ensemencement naturel ou exogène en ferments lactiques, l'acidification permettant l'activation des enzymes.

Les enzymes fongiques, aujourd'hui essentiellement celles de *Rhizomucor miehei* (variants thermolabiles ou fortement thermolabiles) et de *Cryphonectria parasitica* (anciennement *Endothia parasitica*), sont obtenues en quelques jours par fermentation en batch sur des cultures liquides. Les enzymes extracellulaires sont libérées dans le milieu et séparées de la biomasse par filtration et/ou centrifugation.

Elles sont alors concentrées par ultrafiltration, formulées et stérilisées par filtration. Un traitement d'oxydation est pratiqué sur l'enzyme de *R. miehei* de manière à accroître sa thermolabilité. Pour limiter la production concomitante d'enzymes indésirables (lipases, amylases), une grande attention est portée au choix des souches, à la composition du milieu et aux conditions de culture.

Les coagulants végétaux sont traditionnellement utilisés dans de nombreux pays, dans un usage essentiellement domestique. Dans la péninsule ibérique cependant, les

macérations de fleurs de chardon (*Cynara cardunculus*) sont largement utilisées pour la fabrication de pâtes molles et de pâtes pressées au lait de brebis : la serena, serra da estrella, etc. L'emploi d'un tel coagulant fait d'ailleurs partie du cahier des charges de l'AOP serra da estrella. De nombreuses autres protéases végétales ont également la propriété de coaguler le lait : tiges de l'ananas (bromelaïne), feuilles de papayer (papaine), sève de figuier (ficine), graine du melon (cucumisine). Leur activité protéolytique générale confère souvent aux fromages une amertume marquée.



BIBLIOGRAPHIE

A. Germonville (2003). Agents coagulants. Techniques de l'ingénieur. Editions T.I., Saint Denis. Document F4700, 11p.

P. Granday (2015). Les préparations coagulantes utilisées en fromagerie. In : Présures et coagulants de substitution. Comment faire le bon choix ? J.C. Collin coord., Edition Quae, Versailles, 11-60.

M. Harboe, L. Hubert, H. van den Brink (2015). La chymosine produite par fermentation. In : Présures et coagulants de substitution. Comment faire le bon choix ? J.C. Collin coord., Edition Quae, Versailles, 77-101.

COMPOSITION DES DIFFÉRENTS COAGULANTS : ENZYMES ET SUPPORTS

Christine ACHILLEOS – INRA-URTAL & Stéphane GAVOYE - ACTALIA

Les coagulants sont des extraits enzymatiques dont la composition varie selon les méthodes d'extraction et de préparation utilisées. Ils se caractérisent par une fraction active qui englobe les enzymes coagulantes et éventuellement d'autres enzymes, telles que des enzymes lipolytiques et lysozyme, voire des micro-organismes, et par une fraction inactive qui contient plus ou moins de minéraux et matières azotées et éventuellement des conservateurs.

FRACTION ACTIVE

1.1. Enzymes coagulantes

Présure : Les enzymes coagulantes de la présure sont la chymosine et la pepsine.

Chez le jeune veau, la caillette contient majoritairement de la chymosine. Les proportions s'inversent avec la croissance du veau. Les proportions de la chymosine et de la pepsine dans les présures sont importantes car les deux enzymes n'ont pas la même activité protéolytique et la pepsine est moins spécifique (Jacob et al., 2011).

Ainsi la circulaire du 20 janvier 1981 stipule que les présures doivent posséder un ratio chymosine active sur pepsine bovine active supérieur ou égal à 1,38.

Il existe aussi un polymorphisme génétique de la chymosine. Deux variants sont majoritaires : la chymosine A et la chymosine B. La chymosine A est plus active mais elle est plus instable par autolyse (Granday,

2015). Rampilli *et al.* (2005) ont mis en évidence un troisième variant : la chymosine C qui était confondue avant avec la chymosine A2 issue de l'autolyse de la chymosine A. Le variant de la chymosine C est intéressant car il présente une activité coagulante supérieure de 20 % à la chymosine B (Jacob *et al.*, 2011) mais le variant C est minoritaire avec une fréquence de 8 % sur 90 échantillons d'extraits de caillette de veau (n=80) et de bœuf (n=10) (Rampilli *et al.*, 2005).

Quant à la pepsine bovine, aucun polymorphisme génétique n'a été mis en évidence. On trouve toutefois différentes fractions provenant de différents degrés de phosphorylation (Martin, 1984).

Les concentrations en chymosine varient généralement de 50 à 800 mg de chymosine active par litre de solution liquide. Quant aux présures en poudre, les concentrations peuvent dépasser 4000 mg de chymosine active par kg de présure en poudre.

Coagulants d'origine microbienne : Ces coagulants sont essentiellement d'origine fongique (*Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* et *Cryphonectria parasitica*).

La protéase de *C. parasitica* possède une très forte activité protéolytique qui limite son usage aux pâtes pressées cuites ou pâtes filées où la température va inactiver l'enzyme. Quant aux protéases de *Rhizomucor*, elles ont sans cesse été améliorées (spécificité protéolytique, sensibilité thermique) pour répondre aux différentes

technologies fromagères.

Elles ont toutefois tendance à être supplantées par les chymosines fermentaires.

Chymosine fermentaire : La chymosine fermentaire, obtenue par génie génétique, est strictement identique au variant de la chymosine B des présures. L'utilisation du variant B (25% moins actif que le variant A) s'explique par sa plus grande stabilité.

Si la chymosine fermentaire est génétiquement identique à la chymosine des présures, elle est toutefois présente dans un environnement différent des présures (peptides, facteurs de croissance...). La chymosine fermentaire est aujourd'hui le coagulant le plus utilisé au niveau mondial.

En France, son utilisation est un peu moins importante car interdite par le cahier des charges des fromages AOP / IGP.

Coagulants végétaux : Des extraits végétaux peuvent également être utilisés pour assurer la coagulation du lait. La composition enzymatique est directement dépendante du végétal utilisé : cardosine dans le cas du chardon, ficine pour le figuier, papaïne pour la papaye...

Ces enzymes présentent une forte activité protéasique qui limite leur utilisation en transformation fromagère.

Toutefois, les courants visant à une utilisation plus large des végétaux tendent à réactiver cette famille de coagulants.

1.2. Enzymes lipolytiques

Les présures en pâtes traditionnelles obtenues par macération de caillettes d'agneaux et/ou de chevreaux utilisées en Europe du sud contiennent des enzymes lipolytiques. La nature et la quantité de ces lipases/estérases sont liées au régime alimentaire des animaux lors de l'abattage, lait ou pâturage, ainsi qu'aux conditions d'abattage, favorisant la production de lipases pré-gastriques chez les ruminants non sevrés, et de lipases gastriques chez les ruminants plus âgés (Addis *et al.*, 2008).

Ainsi, l'activité lipolytique des présures en pâtes traditionnelles est très variable (0,28 à 30,26 unité/g (Bustamante *et al.*, 2000 ; Ferrandini *et al.*, 2008 ; Gil *et al.*, 2007 ; Pirisi *et al.*, 2007)) et influence la lipolyse des fromages pendant l'affinage (Addis *et al.*, 2005 ; Moschopoulou, 2011). Ces enzymes hydrolysent la matière grasse du lait et libèrent des acides gras libres à chaîne courte contribuant aux caractéristiques sensorielles particulières propres aux fromages AOP d'Europe du sud : Canestrato Pugliese, Fiore Sardo, Pecorino Romano en Italie, Idiazabal et Roncal en Espagne, Feta en Grèce (Addis *et al.*, 2008).

1.3. Autres

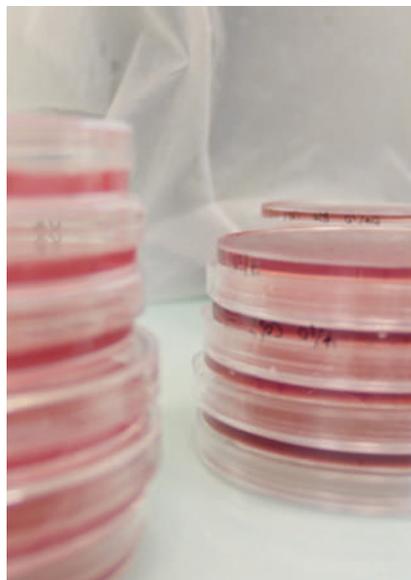
La présence d'autres enzymes dans les présures a été mentionnée par différents auteurs (Lilla *et al.*, 2001 ; Rolet-Répécaud *et al.*, 2013), notamment le lysozyme.

Lilla *et al.* (2001) soulignent son rôle éventuel pour limiter la croissance bactérienne dans la présure en rendant les bactéries sensibles à la pression osmotique par fragilisation de leur paroi.

1.4. Microbiote

Les présures traditionnelles contiennent un microbiote varié en termes de composition et niveaux de populations directement lié à leur mode de préparation : milieu de macération, teneur en sel, origine de la caquette et quantité, température et durée d'incubation, ensemencement ou non en souches sélectionnées. Ce microbiote peut atteindre des niveaux de population importants : bactéries mésophiles aérobies totales jusqu'à 10^8 ufc/mL pour une préparation liquide sans ensemencement et jusqu'à 10^5 ufc/g pour une préparation en pâte (Florez *et al.*, 2006 ; Moschopoulou, 2011 ; Moschopoulou *et al.*, 2007).

Différents groupes microbiens ont été dénombrés parmi lesquels figurent des lactobacilles, streptocoques, lactocoques, leuconostocs, entérocoques, staphylocoques, coliformes, clostridia et des levures et moisissures.



FRACTION INERTE (INACTIVE)

La composition chimique et en protéines des coagulants présentent une grande variabilité liée à l'origine des enzymes extraites et des procédés d'obtention mis en œuvre (Tableaux 1 et 2, Figure 1).

2.1. Minéraux et pH

Les présures commerciales, les chymosines fermentaires et les coagulants microbiens issus de *R. miehei* sont les plus riches en minéraux et présentent les valeurs de pH les plus élevées. Les présures commerciales se distinguent par des teneurs en phosphore très variables (écart d'un facteur 10) qui s'expliquent par l'utilisation éventuelle de phosphate di-sodique pour remonter le pH des solutions d'enzymes extraites à 5,5 – 5,7 (Granday, 2015) et sont caractéristiques du fabricant.

Les présures traditionnelles de veaux sont très différentes des présures commerciales : faibles valeurs en minéraux et faible pH.

Ces valeurs basses de pH traduisent la croissance des bactéries lactiques présentes dans le lactosérum de macération, ensemencement dirigé ou non, et qui acidifient le milieu. Des valeurs également faibles sont mesurées dans les présures traditionnelles d'agneaux et de chevreaux (Florez *et al.*, 2006 ; Moschopoulou *et al.*, 2007).

Les coagulants microbiens issus de *C. parasitica*, contrairement aux coagulants microbiens issus de *R. miehei*, présentent des teneurs en minéraux très faibles.

Les valeurs mesurées en sodium et chlorure sont directement liées à l'apport de sel lors du procédé d'extraction : teneur en sel des caillettes, des milieux de macération et standardisation en NaCl selon la teneur finale retenue par le fabricant ou le fromager (Florez et al., 2006 ; Granday, 2015 ; Moschopoulou et al., 2007).

Les plus faibles valeurs sont observées dans les présures traditionnelles de veaux car il n'y a pas apport de sel au lactosérum de macération ni de standardisation finale.

	pH	Na	Cl	P	condres
Présures commerciales	5,7	6,8	10,7	0,022-0,217	17,7
Présures traditionnelles	3,6	0,05	0,1	0,044	0,6
Chymosine fermentaire	5,5	4,8	7,5	0,013-1,021	12,2
Coagulant microbien issu de <i>R. miehei</i>	5,5	6,7	10,2	0,004-0,034	16,9
Coagulant microbien issu de <i>C. parasitica</i>	4,4	0,01	0,01	0,005	0,8

Tableau 1. Valeurs moyennes de pH et composition en minéraux (g/100 g) de différentes préparations coagulantes liquides d'origine animale et microbienne.

Les valeurs basses et hautes sont précisées lorsque la variabilité est grande dans une même famille.

2.2. Matière azotée

Les présures commerciales se caractérisent par une grande variabilité en ammoniac, protéines, peptides et acides aminés, visibles sur les profils électrophorétiques plus ou moins complexes et intenses selon le fabricant (Figure 1).

Différentes protéines d'origine bovine, natives ou dégradées, de 15 kDa à 197 kDa, ont été identifiées en quantité variable telle que la sérum-albumine bovine qui contribuerait à la stabilité des présures en limitant l'oxydation de la chymosine et sa dénaturation (Lilla et al., 2001 ; Rolet-Répécaud et al., 2013).

Cette variabilité est liée aux procédés d'extraction des enzymes : ajout possible d'ammoniaque pour remonter le pH des solutions d'enzymes extraites

à 5,5 – 5,7, après activation des pro-enzymes, durée des macérations de quelques heures (macération rapide) à plusieurs jours (macération longue) (Granday, 2015) et éventuelle utilisation de la chromatographie pour purification (Lilla et al., 2001).

Les présures traditionnelles, comme les présures commerciales, présentent une diversité protéique liée à la taille et la quantité de caillettes sèches mises en macération, à la température et durée d'incubation (Rolet-Répécaud et al., 2013).

Les coagulants microbiens issus de *C. parasitica* se distinguent de tous les autres coagulants par des valeurs très élevées qui peuvent être attribuées à une forte activité métabolique de *C. parasitica* en culture et une activité protéolytique importante de la protéase de *C. parasitica* (Jacob et al., 2011 ; Sousa et al., 2001)

présente à une forte concentration. Peu de bandes caractérisent les profils électrophorétiques des coagulants microbiens et des chymosines fermentaires exprimant une faible diversité protéique.



	NH ₃ (mg/100g)	NPT ¹ (mg N/100g)	NH ₂ libre ² (mEq Gly/100g)
Présures commerciales	5,7	6,8	10,7
Présures traditionnelles	3,6	0,05	0,1
Chymosine fermentaire	5,5	4,8	7,5
Coagulant microbien issu de <i>R. miehei</i>	5,5	6,7	10,2
Coagulant microbien issu de <i>C. parasitica</i>	4,4	0,01	0,01

¹ NPT = azote soluble dans l'acide phosphotungstique

² NH₂ libre = fonction amine libre (exprimé en équivalent glycine)

Tableau 2. Valeurs moyennes de la matière azotée de différentes préparations coagulantes liquides d'origine animale et microbienne.

Les valeurs basses et hautes sont précisées lorsque la variabilité est grande dans une même famille.

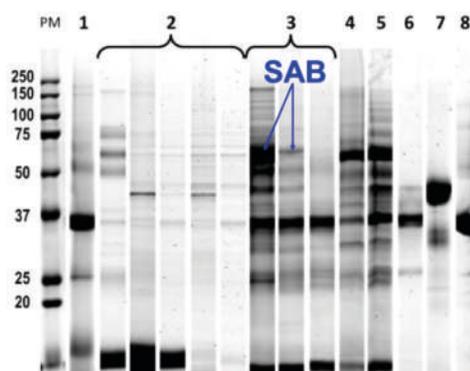


Figure 1. Profils électrophorétiques de différents coagulants liquides obtenus par électrophorèse SDS-PAGE. PM = marqueur de poids moléculaire (kDa). 1 = chymosine bovine purifiée ; 2 = présures traditionnelles ; 3 = présure de veau ; 4 = présure de chevreau ; 5 = présure d'agneau ; 6 = chymosine fermentaire ; 7 = coagulant *R.miehei* ; 8 = coagulant *C.parasitica*. SAB = sérum-albumine bovine.

2.3. Conservateurs

Les coagulants peuvent contenir des agents conservateurs (arrêté du 19 octobre 2006 relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires).

Ce sont essentiellement des sorbates et/ou benzoates, autorisés jusqu'à 1 % maximum, et du sorbitol ou glycérol, retrouvé uniquement dans les coagulants microbiens issus de *C. parasitica* (de 7 jusqu'à 40 %) (Granday, 2015). Il existe aujourd'hui de nouvelles gammes de présures sans benzoate pour répondre à une demande de consommateurs soucieux d'une alimentation à teneur en additifs réduite.

RÉFÉRENCES

Addis, M., Piredda, G., Pirisi, A. 2008. The use of lamb rennet paste in traditional sheep milk cheese production. *Small Ruminant Research* 79 (1) : 2-10.

Addis, M., Piredda, G., Pes, M., Di Salvo, R., Scintu, M. F., Pirisi, A. 2005. Effect of the use of three different lamb paste rennets on lipolysis of the PDO Pecorino Romano Cheese. *International Dairy Journal* 15 (6-9) : 563-569.

Bustamante, M., Chavarri, F., Santisteban, A., Ceballos, G., Hernandez, I., Miguelez, M. J., Aranburu, I., Barron, L. J. R., Virto, M., De Renobales, M. 2000. Coagulating and lipolytic activities of artisanal lamb rennet pastes. *Journal of Dairy Research* 67 (3): 393-402.

Ferrandini, E, Lopez, M. B., Castillo, M., De Renobales, M., Virto, M., Hernandez, I., Price, A. V., Laencina, J. 2008. Technological Characterization of Experimental Natural Rennets Pastes. *Food Science and Technology International* 14: 63-70.

Flórez, A. B., Hernández-Barranco, A. M., Marcos, I., Mayo, B. 2006. Biochemical and microbiological characterization of artisan kid rennet extracts used for Cabrales cheese manufacture. *LWT - Food Sci. Technology* 39 (6) : 605-612.

Gil, P. F., Conde, S., Albisu, M., Pérez-Elortondo, F. J., Etayo, I., Virto, M., de Renobales, M. 2007. Hygienic quality of ewes' milk cheeses manufactured with artisan-produced lamb rennet pastes. *Journal of Dairy Research* 74 (3): 329-335.

Granday, P. 2015. Les préparations coagulantes utilisées en fromagerie. Présures et coagulants de substitution. Editions Quae, France. 11-60.

Jacob, M., Jaros, D., Rohm, H. 2011. Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology* 64 (1) : 14-33.

Lilla, S., Caira, S., Ferranti, P., Addeo, F. 2001. Mass spectrometric characterisation of proteins in rennet and in chymosin-based milk-clotting preparations. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 15 (13) : 1101-1112.

Martin, P. 1984. Influence du degré de phosphorylation de la pepsine A bovine sur son activité enzymatique. *Biochimie* 66 : 371-384

Moschopoulou, E. 2011. Characteristics of rennet and other enzymes from small ruminants used in cheese production. *Small Ruminant Research* 101 (1-3) : 188-195.

Moschopoulou, E., Kandarakis, I., Anifantakis, E. 2007. Characteristics of lamb and kid artisanal liquid rennet used for traditional Feta cheese manufacture. *Small Ruminant Research* 72 (2-3): 237-241.

Pirisi, A., Pinna, G., Addis, M., Piredda, G., Mauriello, R., De Pascale, S., Caira, S., Mamone, G., Ferranti, P., Addeo, F., Chianese, L. 2007. Relationship between the enzymatic composition of lamb rennet paste and proteolytic, lipolytic pattern and texture of PDO Fiore Sardo ovine cheese. *International Dairy Journal* 17 (2) : 143-156.

Rampilli, M., Larsen, R., Harboe, M. 2005. Natural heterogeneity of chymosin and pepsin in extracts of bovine stomachs. *International Dairy Journal* 15(11) : 1130-1137.

Rolet-Répécaud, O.; Berthier, F.; Beuvier, E.; Gavoye, S.; Notz, E.; Roustel, S.; Gagnaire, V.; Achilleos, C. 2013. Characterization of the non-coagulating enzyme fraction of different milk-clotting preparations. *LWT - Food Sci. Technology* 50 : 459-468.

Sousa, M. J., Ardö, Y., McSweeney, P. L. H. 2001. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal* 11 (4-7) : 327-345.

IMPACTS DES COAGULANTS EN TECHNOLOGIE FROMAGERE

Jean MILLET (Ancien Professeur de Technologie Fromagère et Qualité, ENILBIO Poligny) – Franck NEYERS (ENILIA Surgères)

INTRODUCTION

Les actions des agents coagulants sont diverses :

- Activité protéolytique sur la caséine κ et coagulation du lait ;
- activité protéolytique pendant les étapes précoces de transformation et impacts sur l'égouttage et les rendements ;
- activité protéolytique au cours de l'affinage et impacts sur la texture et sur l'aromatisation des fromages.

Ces différentes actions vont se dérouler dans un environnement physico-chimique à prendre en compte car chaque enzyme coagulante possède des caractéristiques spécifiques :

sensibilité à la température, au pH, aux ions calcium.

COAGULATION :

La coagulation du lait par la présure s'accompagne d'une protéolyse rapide mais limitée (Mietton, 2015). La caséine Kappa est hydrolysée avec la libération du caséino-maclopeptide (ou glyco-maclopeptide). A cette étape de protéolyse limitée succède une phase de protéolyse plus lente, appelée, phase de protéolyse générale ou non spécifique qui peut avoir des incidences sur les rendements.

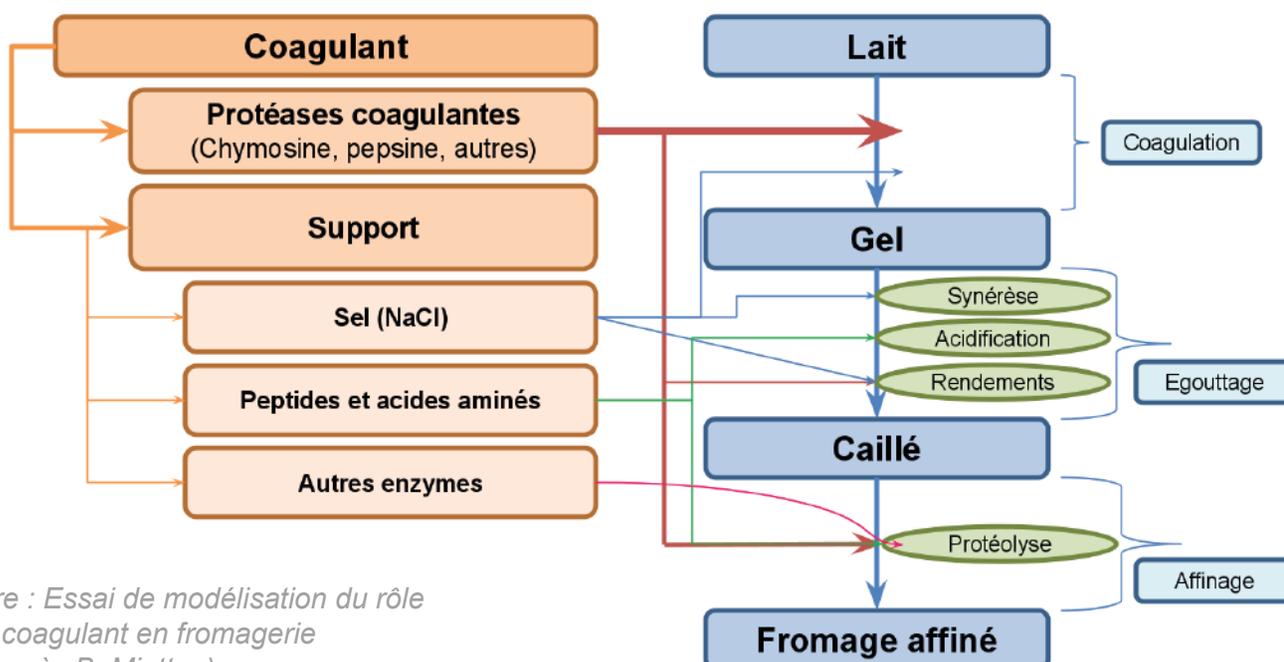
EGOUTTAGE :

D'autre part, les enzymes coagulantes ont aussi des impacts sur la cinétique

d'organisation des gels. Par ailleurs, les coagulants peuvent avoir un impact sur l'égouttage des caillés via des incidences sur la synérèse et l'activité acidifiante des bactéries lactiques.

AFFINAGE :

Selon la technologie fromagère, la protéolyse générale peut se poursuivre pendant l'affinage. Ainsi dans les fromages à pâte pressée non cuite, les enzymes coagulantes peuvent participer pour 45 à 55 % dans la protéolyse primaire (rapport azote soluble sur azote total) et pour 45 % en pâte molle à croûte fleurie (Mietton, 2015).



Titre : Essai de modélisation du rôle du coagulant en fromagerie (d'après B. Mietton)

IMPACT DES COAGULANTS SUR LES ÉTAPES PRÉCOCES DE LA TRANSFORMATION FROMAGÈRE

Romain RICHOUX, ACTALIA Produits Laitiers, Rennes

Prise, durcissement, synérèse, pertes dans le lactosérum ; les coagulants influencent d'abord les étapes précoces de la transformation fromagère

LA COAGULATION :

La formation du coagulum : c'est, bien entendu, la première fonctionnalité du coagulant. Rappelons que la coagulation peut être caractérisée par trois descripteurs : le temps de gélification (ou temps de prise), la vitesse de raffermissement et la fermeté maximale du gel. Plusieurs facteurs jouent sur ces paramètres : ceux liés aux conditions de coagulation et ceux inhérents aux caractéristiques du lait.

Nous nous intéresserons prioritairement à l'impact du coagulant lui-même mais pour rappel, les principaux leviers dans l'utilisation d'un coagulant sont les suivants :

- La dose de coagulant est inversement et linéairement corrélée au temps de prise. La concentration en enzyme accroît la vitesse de raffermissement mais reste sans effet sur la fermeté maximale du gel.

- Le pH influence à la fois l'activité des coagulants et les caractéristiques physico-chimiques des caséines. Les enzymes coagulantes ont en effet un pH optimal acide : 5,5 pour la chymosine et 2-3 pour la pepsine par exemple.

L'abaissement du pH réduit aussi les répulsions électrostatiques entre caséines et libère du calcium ionique. Il en découle une diminution du temps

de prise et une augmentation de la vitesse de raffermissement. La fermeté maximale montre un optimum vers pH 5,8-5,9.

- La température joue également sur les deux tableaux : caractéristiques des enzymes et comportement des protéines. La température optimale des protéases se situe aux alentours de 40°C. Dans la gamme des températures utilisées en fromagerie, la vitesse d'hydrolyse varie selon un Q_{10} (facteur multiplicatif de la vitesse lorsque la température est accrue de 10°C) de 2 à 3.

La vitesse d'organisation des gels est beaucoup plus sensible et suit un Q 10 compris entre 10 et 12.



- La teneur en calcium ionique (Ca^{2+}) est déterminante puisque la phase secondaire de la coagulation requiert impérativement sa présence. Rappelons que l'apport de chlorure de calcium dans les laits réfrigérés et traités thermiquement permet de rétablir, au moins partiellement, leur aptitude à la coagulation.

Au-delà de ces paramètres environnementaux d'utilisation des coagulants, la nature des enzymes

coagulantes joue également sur la coagulation du lait. A durée de prise identique, la vitesse de raffermissement obtenue peut être classée par ordre décroissant comme suit :

1. protéase de *Cryphonectria parasitica* ;
2. chymosine fermentaire ;
3. extrait de présure concentré ;
4. extrait de présure ;
5. protéase de *Rhizomucor miehei* ;
6. mélange chymosine/pepsine bovine.

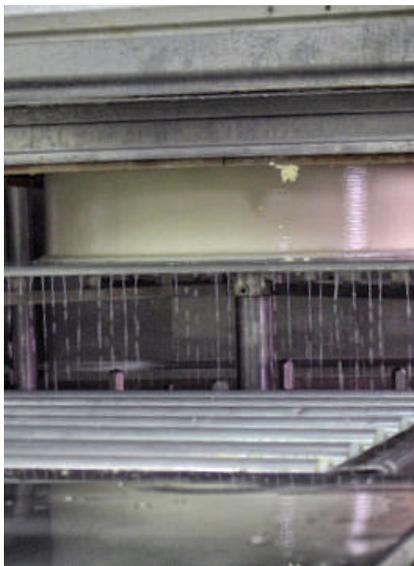
A noter que les dernières générations des protéases acides de *Rhizomucor miehei* sont considérées comme équivalentes à la présure en termes de vitesse de raffermissement. La chymosine fermentaire de chameau a la particularité de coaguler le lait à une concentration (en IMCU) 20% à 30% inférieure à celle de la chymosine fermentaire bovine.

La sensibilité des enzymes aux principaux facteurs de coagulation (température, pH, calcium) apparaît également déterminante. On va rechercher un comportement similaire à celui de la présure autant pour conserver les réflexes du fromager que pour permettre une utilisation universelle du coagulant. La protéase de *Cryphonectria parasitica* et la chymosine fermentaire de chameau s'avèrent les moins sensibles aux variations de pH, de température et de teneur en calcium. La chymosine bovine de fermentation se comporte de manière similaire à la présure, à l'exception d'une moindre sensibilité au pH en raison de l'absence de pepsine.

L'ÉGOUTTAGE :

Le type de coagulant influence également la synérèse et l'égouttage. De nombreux essais réalisés dans diverses familles de fromages (pâtes molles, pâtes pressées cuites et non cuites) ont montré que la chymosine bovine de fermentation conduit à un égouttage identique à celui obtenu avec la présure. Les données plus fragmentaires sur la chymosine fermentaire de chameau vont dans le même sens. La protéase de *Cryphonectria parasitica* donne un égouttage plus prononcé en pâtes pressées cuites.

En revanche, les résultats sont plus controversés pour l'enzyme de *Rhizomucor miehei*. On a ainsi pu mettre en évidence aussi bien un renforcement de l'égouttage, que le contraire ou encore l'absence d'effet. Ces différences sont à mettre en lien avec des différences de synérèse et de stimulation de la microflore lactique, en lien avec l'activité protéolytique du coagulant.



L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE :

Cette activité protéolytique globale peut être classée par ordre croissant comme suit :

1. chymosine fermentaire de chameau;
2. chymosine fermentaire bovine;
3. présure;
4. pepsine bovine;
5. protéase de *Rhizomucor miehei* ;
6. protéase de *Cryphonectria parasitica*.

Cette dernière se caractérise par une forte aptitude à la dégradation des caséines alpha s 1 et bêta. A l'inverse, la chymosine fermentaire de chameau s'avère extrêmement spécifique à la caséine kappa. Son ratio activité coagulante/activité protéolytique globale est sept fois plus élevé que celui de la chymosine bovine fermentaire. Il est environ vingt fois supérieur à celui de la protéase de *Rhizomucor miehei*.

LES RENDEMENTS :

Cette activité protéolytique globale se répercute directement sur les rendements fromagers puisqu'elle joue étroitement sur le coefficient de récupération des protéines. La précision des mesures de rendements est cependant souvent insuffisante pour mettre en évidence des différences faibles mais d'importance considérable en termes économiques.

Il faut alors avoir recours à des tests de laboratoire simulant les conditions fromagères pour appréhender ces différences, par des mesures des pertes dans le lactosérum notamment. Comparativement à l'emploi de présure, la mise en œuvre de chymosine fermentaire bovine tend à

donner des rendements équivalents voire légèrement supérieurs (+0,1 % relatifs).

Résultats obtenus dans un grand nombre d'études et de technologies : camembert, fêta, édam, gouda, cheddar, grana, emmental, etc. Cette différence tient probablement à la présence de pepsine dans la présure, enzyme qui est connue pour dégrader les rendements (-0,5 % en moyenne). Selon son fournisseur, la Chymax M (chymosine fermentaire de chameau) donnerait des résultats supérieurs de 0,2 % à la chymosine bovine fermentaire. Très peu d'études ont cependant été publiées sur ce sujet.

Pour la protéase de *Rhizomucor miehei*, une réduction significative des rendements est observée : -0,63 % en moyenne (- 0,47 à -0,93 %) par rapport à l'emploi de présure. Les nouvelles générations d'enzymes auraient cependant des performances légèrement meilleures. La protéase de *C. parasitica* dégrade fortement les rendements, avec une chute comprise entre -0,6 % et -4,5 %. Une dénaturation thermique rapide de l'enzyme est donc requise pour limiter ses pertes.

C'est la raison pour laquelle (avec les risques d'amertume) cette protéase est exclusivement utilisée pour la fabrication des fromages à pâte cuite.

BIBLIOGRAPHIE

B. Mietton (2015). Description, choix des préparations enzymatiques coagulantes et éléments de maîtrise. In : Présures et coagulants de substitution Comment faire le bon choix ? J. C. Collin coord., Ed. Quae, Versailles, 103-142.

IMPACT DES COAGULANTS SUR L’AFFINAGE ET LA QUALITÉ DES FROMAGES

Bruno VOLLE, Chargé d’application R&D, Systèmes analytiques et biotechnologie, ENIL Mamirolle

Les fromages sont des produits issus d’un procédé de transformation long et complexe. L’évaluation de leur qualité repose sur des critères organoleptiques (aspect visuel, texture, flaveur, valeur nutritionnelle...), des propriétés fonctionnelles (fondant, filant...) et des aspects de sécurité des aliments.

L’atteinte de ces critères dépend de nombreux facteurs intégrés au procédé de transformation parmi lesquels le choix du coagulant intervenant dans la gélification et avec un rôle qui se prolonge lors de l’affinage et contribue à la protéolyse.

COAGULANT ET ACTION PROTÉOLYTIQUE

En transformation fromagère, un agent coagulant est caractérisé, en premier lieu, par sa spécificité vis à vis de la coagulation du lait et son activité coagulante mais également par son activité protéolytique globale.

Bien que la majeure partie du coagulant ajouté au lait soit perdu dans le lactosérum, une fraction de coagulant reste piégée dans le caillé. En effet, la distribution du coagulant entre le lactosérum et le caillé semble être influencée par des interactions électrostatiques entre les caséines et le coagulant [2]. La quantité de chymosine résiduelle retrouvée dans le caillé varie de 15 à 30% [1]. Cependant, de telles quantités suffisent à assurer un rôle significatif dans la protéolyse au cours de l’affinage. Pour la chymosine, le pH d’égouttage reste l’un des facteurs les plus déterminants dans sa rétention dans le caillé. En effet, la quantité retenue augmente avec la diminution du pH (fig 2). La rétention des agents coagulants d’origine microbienne semble, quant à elle, indépendante du pH.

Elle s’établit entre 3 et 5% pour la protéase produite par *R meihe* (fig 2) [3].

Au cours de l’affinage, le coagulant contribue à la protéolyse pri-

maire (Fig 1) au cours de laquelle des liaisons peptidiques spécifiques des caséines sont hydrolysées en libérant des peptides de tailles intermédiaires [1]. Les caséines visées par les agents coagulants sont principalement la caséine α_{s1} et dans une moindre mesure (selon le type d’agent coagulant) la caséine β .

La protéolyse imputée à l’agent coagulant dépendra de différents paramètres, interconnectés, inhérents au type de coagulant, à la quantité de coagulant résiduel, aux conditions réactionnelles définies par la composition du caillé et au procédé de transformation.

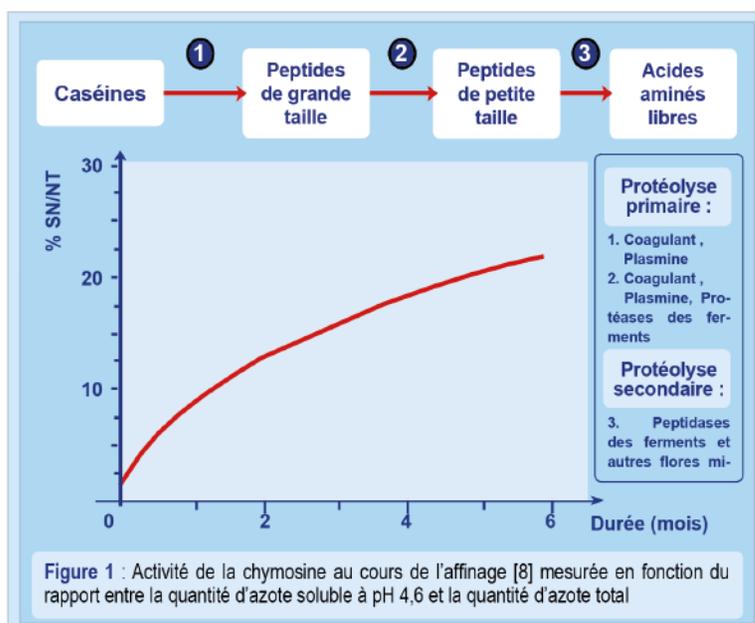
IMPACT DU COAGULANT SUR LE PRODUIT :

La texture

Le fromage est l’un des produits les plus étudiés en termes de relations rhéologie- texture.

C’est l’exemple d’un gel alimentaire pour lequel le bon niveau de fermeté est d’une importance capitale tant pour satisfaire les exigences du consommateur que pour assurer une production efficace de fromage au cours de certaines opérations (manipulation au moment de l’égouttage, découpage, mise en portions, stockage).

Le fromage jeune (0 à 7 jours) est plus élastique et plus dur que les fromages plus âgés, qui deviennent plus tendres et ont tendance à rompre plus facilement. [4] Cette évolution du profil textural est corrélée avec le degré de protéolyse et la diminution de la teneur en eau. Elle peut également être attribuée aux effets plus perceptibles de la protéolyse chez les fromages affinés.



En effet, la fragilisation de la matrice de la caséine entraîne une diminution de la résistance à la fracture du fromage, de la fermeté et de la dureté [5].

L'hydrolyse de la caséine α_{s1} est bien corrélée avec l'évolution de la dureté au cours de l'affinage [6]. La dureté diminue avec la protéolyse apparente de la caséine α_{s1} puis reste constante (Fig 3). La caséine β demeure relativement inchangée dans le fromage au lait pasteurisé au cours d'une période de 16 semaines. Elle est hydrolysée plus lentement que la caséine α_{s1} [6].

Même si les enzymes coagulantes appartiennent majoritairement au groupe des aspartyl protéases, elles ne présentent pas la même spécificité.

La nature et la quantité des peptides formés suite à l'hydrolyse des caséines, dans les conditions identiques, sont différentes.

La spécificité protéolytique des coagulants pourrait donc contribuer à des différences dans les propriétés rhéologiques du fromage.

L'utilisation de la chymosine de chameau, comparée à la chymosine de veau, provoque un niveau de protéolyse

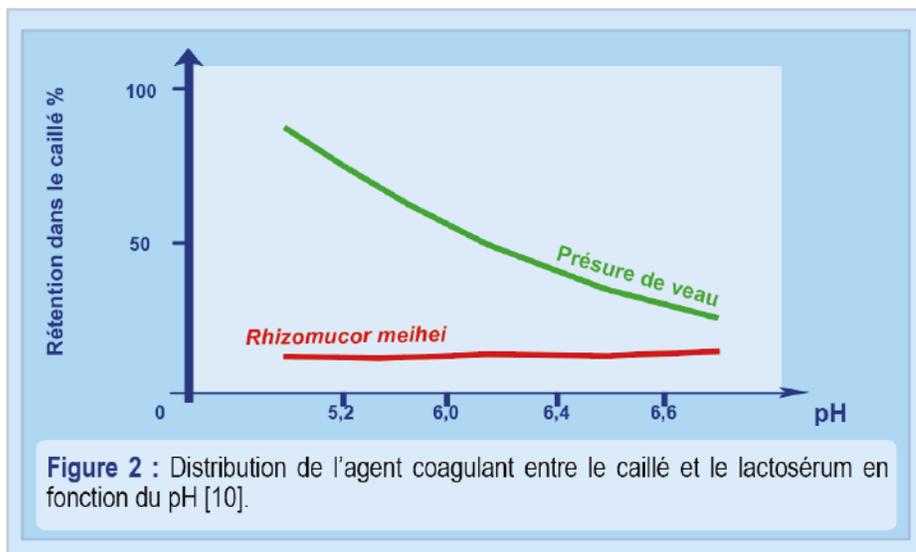


Figure 2 : Distribution de l'agent coagulant entre le caillé et le lactosérum en fonction du pH [10].

primaire inférieur avec une production de peptides plus faible. Elle ne produit pas de peptides issus de l'hydrolyse de la caséine β .

Les niveaux de caséine α_{s1} intacte sont plus élevés [1, 2]. Le fromage qui résulte d'une fabrication avec de la chymosine de chameau est plus dur (Fig 3) avec une mâche plus importante vers la fin de l'affinage [1, 2].

Dans le cheddar à faible teneur en matières grasses réalisé avec de la chymosine de chameau, les quantités d'azote soluble (TCA 12%), indicatrices du niveau de protéolyse

sont plus faibles [7, 9].

Une plus forte résistance à la rupture est également constatée. Elle est mise en corrélation avec un réseau protéique caractérisé par un niveau plus élevé de la caséine α_{s1} intacte [9]. Cette résistance à la rupture est également supérieure à celle de fromage obtenu avec la chymosine bovine. Dans ces diverses études, le pH et les niveaux de calcium ont été maintenus constants et seuls les niveaux de caséine α_{s1} intacte ont varié impliquant, de fait la protéolyse primaire.

Le développement d'amertume

Il est établi que le développement de l'amertume des fromages résulte de la libération de peptides à caractère hydrophobe pendant la fabrication ou l'affinage. [10, 11]. La libération de peptides amers par la chymosine est réalisée pour des pH de l'ordre de 6 [12]. Le type d'agent coagulant entraîne l'apparition d'une amertume plus ou moins marquée.

Ainsi les fromages produits à partir de chymosine de chameau présentent une amertume moindre comparés à ceux provenant de l'utilisation de la chymosine bovine ou des enzymes coagulantes microbiennes [9].

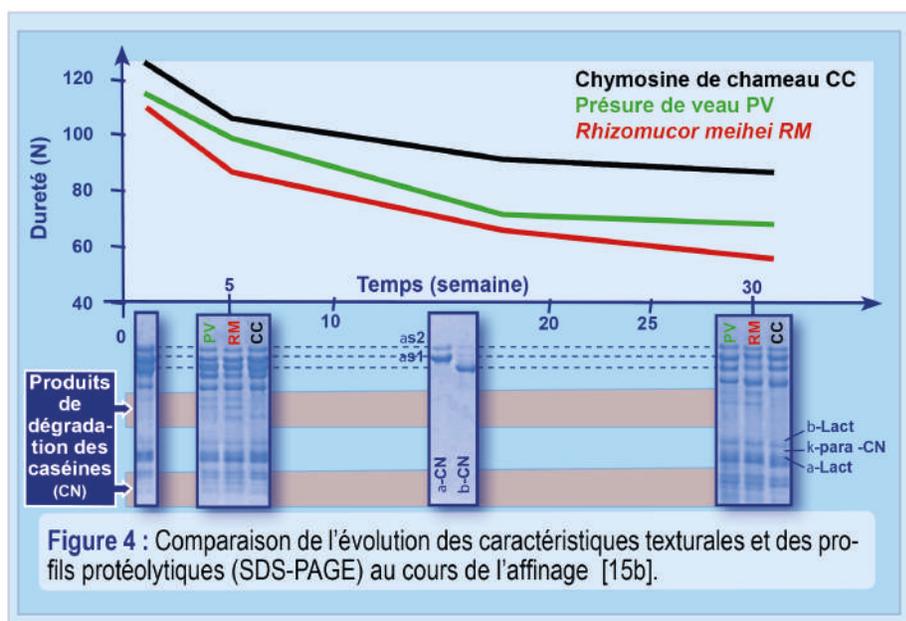


Figure 4 : Comparaison de l'évolution des caractéristiques texturales et des profils protéolytiques (SDS-PAGE) au cours de l'affinage [15b].

Les propriétés fonctionnelles

La protéolyse totale et la protéolyse des caséines individuelles sont significativement affectées par la nature de l'enzyme coagulante.

L'intensité avec laquelle des coagulants affectent les propriétés fonctionnelles par leur action protéolytique a largement été étudiée [13, 14].

Tout paramètre de fabrication affectant la teneur résiduelle et la stabilité du coagulant dans le fromage doit donc être pris en compte (pH d'égouttage, température et durée traitement thermique, durée d'affinage).

La capacité à fondre de cheddars produits avec l'enzyme coagulante de *C. parasitica* est plus importante. La protéolyse de la - caséine α_{s1} est associée à cette évolution alors qu'elle est corrélée négativement à la dureté.

L'hydrolyse de la caséine β a une incidence contraire sur ces deux mêmes paramètres [14, 15, 16]. Les capacités à fondre et à filer de la mozzarella sont largement reliées à l'action des enzymes coagulantes résiduelles [17].

Si au cours de cette production des traitements thermiques inactivent les agents coagulants, ainsi des produits réalisés avec du coagulant de *C. parasitica* fondent plus facilement et développent une texture plus molle en libérant plus de matière grasse que le fromage fabriqué avec la protéase de *M. miehei*, la présure de veau ou une chymosine produite par génie fermentaire.

La concentration de caséine α_{s1} a diminué significativement au cours du stockage à 4°C, mais n'a pas été significativement affectée par le type de coagulant.

Le taux de caséine β est resté constant dans

le fromage fabriqué avec les protéases de *M. miehei* ou une chymosine produite par génie fermentaire, mais a diminué de façon significative dans la mozzarella produite avec *C. parasitica*. Dans le cas de la mozzarella, l'activité protéolytique des enzymes coagulantes vis-à-vis de la caséine β affecte la capacité du fromage à fondre.

De plus, la réduction de la concentration de coagulant, et de la teneur en coagulant résiduel piégé dans le caillé, diminue significativement l'exsudation de matière grasse lors de la fonte [18, 19, 20].

CONCLUSION

Même si les présures et leurs substituts sont sélectionnés en fonction de leur capacité à entraîner la coagulation du lait, elles n'en demeurent pas moins des protéases qui placées dans un contexte favorable, réalisent la protéolyse à des degrés divers, en fonction de leurs caractéristiques spécifiques (affinité pour le substrat, vitesse de réaction et sensibilité thermique).

L'hydrolyse de polypeptides n'est donc pas strictement similaire d'une protéase à l'autre, même si elles appartiennent au même groupe. Les modifications moléculaires qui en résultent peuvent donc être d'une importance minime ou très significativement différentes.

Ces différences peuvent elles-mêmes entraîner (ou pas) des modifications physico-chimiques du milieu (solubilisation du phosphate de calcium colloïdal, variation de pH, fragilisation de la microstructure protéique), des pertes de rendements (article page 13), l'évolution de propriétés texturales voire des propriétés fonctionnelles.

Outre les aspects technologiques, il est important de confronter ces différents éléments lors du choix des coagulants.

BIBLIOGRAPHIE

1. Proteolysis in cheese during ripening. Upadhyay, V. K., McSweeney, P. L. H., Magboul, A. A. A. and Fox, P. F. 2004. Proteolysis in cheese during ripening. p 391-433.
2. Comparison of the level of residual coagulant activity in different cheese varieties. Bansal N, Fox P F and McSweeney P L H (2009b) Journal of Dairy Research 76 290-293
3. Effects of commercial enzymes on proteolysis and ripening in Cheddar cheese. M.G. Wilkinson, T.P. Guinee, D.M. O'Callaghan, P.F. Fox. Lait 72 (1992) 449-459.
4. Relationships between sensory and rheological measurements of texture in maturing commercial Cheddar cheese over a range of moisture and pH at the point of manufacture. Everard, C.D., D.J. O'Callaghan, T.V. Howard, C.P. O'Donnell, E.M. Sheehan, C.M. Delaunty. 2006. J. Text. Stud. 37:361-382.
5. Feeney, E.P., Guinee, T.P., Fox, P.F. Effect of pH and calcium content on proteolysis in Mozzarella cheese. J. Dairy Sci. 2002;85:1646-1654.
6. Effect of whey drainage pH on composition, rheology, and melting properties of reduced-fat Cheddar cheese. Tunick, M. H., Guinee, T. P., Van Hekken, D. L., Beresford, T. P. and Malin, E. L. 2007. Milchwissenschaft 62(4): 443-446.
7. Impact of camel chymosin on the textural and sensory properties of low-fat Cheddar cheese. Govindasamy-Lucey, S., Y. Lu, J.J. Jaeggi, M.E. Johnson, and J.A. Lucey. 2010. Aust. J. Dairy Technol. 65:139-142.

8. Kevany Soodam, Lydia Ong, Ian B. Powell, Sandra E. Kentish, Sally L. Gras. Effect of rennet on the composition, proteolysis and microstructure of reduced-fat Cheddar cheese during ripening. *Dairy Science & Technology*, 2015, 95 (5), pp.665-686.
9. Impact of selected coagulants and starters on primary proteolysis and amino acid release related to bitterness and structure of reduced-fat Cheddar cheese. Børsting MW, Qvist KB, Rasmussen M, Vindeløv J, Vogensen FK & Ardö Y 2012 *Dairy Science & Technology* 92 593 – 612
10. Fallico, V., McSweeney, P.L.H., Siebert, K.J., Horne, J., Carpino, S., Licitra, G. Chemometric analysis of proteolysis during ripening of Ragusano cheese. *J. Dairy Sci.* 2004;87:3138–3152.
11. Taste and flavor of artisan and industrial Manchego cheese as influenced by the water-soluble extract compounds. G Taborda, JA. Gómez-Ruiz, I Martínez-Castro, L Amigo, M Ramos, E Molina. *Eur Food Res Technol* (2008) 227:323–330
12. Affinity between chymosin and individual caseins at varying, pH-values. Larsson K.I., Andren A., *Int. Dairy J.* 7 (1997) 615 –61820.
13. Mozzarella cheese: Impact of cooking temperature on chemical composition, proteolysis, and functional properties. Yun, J.J., Kiely, L.J., Barbano, D.M., Kindstedt, P.S. *J. Dairy Sci.* 1993;76:3664–3673.
14. Melt and rheological properties of mozzarella cheese as affected by starter culture and coagulating enzymes. Dave R I, Sharma P and McMahon D J (2003a) *Lait* 83 61–77.
15. Combined use of chymosin and protease from *Cryphonectria parasitica* for control of meltability and firmness of Cheddar cheese. Kim S Y, Gunasekaran S and Olson N F (2004) *Journal of Dairy Science* 87 274–283.
16. Bansal N, Drake M A, Piraino P, Broe M L, Harboe M, Fox P F and McSweeney P L H (2009a) Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for Cheddar cheese. *International Dairy Journal* 19 510-517
17. Effect of manufacturing factors, composition and proteolysis on the functional characteristics of mozzarella cheese. Kindstedt, P.S., 1993. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 33: 167-187.
18. Mozzarella cheese: Impact of coagulant concentration on chemical composition proteolysis and functional properties. Kindstedt, P.S., J.J. Yun, D.M. Barbano and K.L. Larsoe, 1995. *J. Dairy Sci.*, 78: 2591-2597.
19. Effects of starter culture and coagulating enzymes on viscoelastic behavior and melt of Mozzarella cheese. Dave R I, Sharma P and Muthukumarappan K (2003) *Journal of Food Science* 68 1404–1410.
20. Production of Mozzarella Cheese Using Rennin Enzyme from *Mucor miehei* Grown at Rice Bran Molasses Medium I H Rusdan¹ and J Kusnadi². 2017, *International Conference On Food Science and Engineering*.

SYNTHÈSE : CRITÈRES DE CHOIX D'UN COAGULANT

Jean MILLET (Ancien Professeur de Technologie Fromagère et Qualité, ENILBIO Poligny) – Franck NEYERS (ENILIA Surgères)

Si les aspects réglementaires (cahier des charges AOP) ou économiques sont des critères de choix des coagulants, cet article propose une synthèse des critères technologiques.

Parmi ces critères, nous pouvons citer :

- L'activité coagulante (nature des enzymes, ratios, concentration dans la préparation) ;
- La composition du support (teneurs en NaCl, petits peptides et acides aminés...);
- L'activité protéolytique ;
- La stabilité thermique des enzymes coagulantes.

Ces points techniques sont autant d'éléments, qui s'ajoutant à la praticité du produit peuvent aider à construire un cahier des charges dépendant de la technologie fromagère et des qualités finales ciblées.

QUELS SONT LES CRITÈRES DE CHOIX D'UNE PRÉPARATION ENZYMATIQUE COAGULANTE ?

Réglementation et cahier des charges :

Ils dépendent déjà de contraintes technologiques liées aux fromages eux-mêmes.

Les fromages AOP sont très majoritairement obtenus par coagulation du lait par la présure, pas par des coagulants de substitution.

Il convient de se référer aux cahiers des charges (CDC) de ces AOP pour respecter les exigences fixées.

Autres contraintes, le respect de cahiers des charges spécifique à des interdits alimentaires :

- Utilisation de présures issues de l'abattage « rituels » d'animaux pour des fromages « hallal » ou « kasher » ; utilisation de coagulants végétaux ou microbiens pour ces mêmes raisons ;
- Utilisation de coagulants végétaux ou microbiens pour des fromages pour végétariens ;
- Utilisation de coagulants végétaux ou microbiens, de présures issues d'abattage rituel, pour des lactosérums valorisés en alimentation humaine soumis à CDC « hallal » ou « kasher » ;
- Utilisation de coagulant sans benzoate pour les CDC « agriculture biologique ».

Au-delà de ces obligations fixées par des CDC, les coagulants se choisissent essentiellement par les différentes fonctions qu'ils vont remplir.

Fonction coagulation : Nature et concentration en enzymes, ratio chymosine sur pepsine...

Cette fonction coagulation sera aussi raisonnée en fonction des impacts qu'elle peut avoir sur les rendements (vitesse d'organisation des gels, coefficients de récupérations des matières utiles, productions de fines...).

Fonction protéolyse durant la fabrication : Dégradation des caséines et impact sur la texture et les rendements, fixation d'eau plus ou moins forte, production de fines, pertes de constituants de la micelle.

Fonction protéolyse durant l'affinage : Thermostabilité des enzymes coagulantes, présence d'autres enzymes et notamment de lipases.

Par exemple dans le cas des technologies lactiques commercialisées en frais, pour les pâtes molles et pâtes pressées non cuites pour lesquelles un cycle d'affinage et une DDM (date de durabilité minimale) longs sont souhaités, une présure à fort ratio chymosine/pepsine, voire de la chymosine fermentaire est à retenir afin de limiter la protéolyse due à l'enzyme coagulante au cours de l'affinage.

A l'inverse, s'il est souhaité d'obtenir une texture de pâte, aussi bien en pâte molle qu'en pâte pressée non cuite, avec une DDM qui ne soit pas une contrainte, une présure à forte teneur en pepsine, une préparation enzymatique contenant la protéase de *R. miehi* thermolabile, voire un mélange présure/pepsine peut être envisagé. Toutefois, si les cycles d'affinage se font à température trop élevée, il y a un risque de développer de l'amertume et d'autant plus, si les flores employées (bactéries lactiques, flores d'affinage...) ont une forte activité protéasique, mais une faible activité aminopeptidasique.

Fonction activation des flores lactiques : Présence dans les supports de préparation d'azote facilement assimilable (acides aminés, peptides, facteurs de croissance...), activité protéolytique à l'origine de facteurs de croissance.

Ainsi la présence de petits peptides et acides aminés pourrait être favorable à la croissance des bactéries lactiques protéases -, en parallèle des protéases +, limitant ainsi la protéolyse primaire en cours d'affinage et participant à améliorer les qualités sensorielles et la conservabilité des fromages. (P. Granday, 2015).

Fonction minéralisation : teneur en sodium, chlorures, phosphore, calcium.

Fonctions complémentaires :

En complément de ces fonctionnalités, d'autres critères doivent être pris en compte :

- Critères de choix par la valorisation des lactosérums : ces derniers assurent parfois la valorisation principale. Ils vont recueillir la majorité des éléments solubles dont ceux des coagulants.

Ces derniers sont donc à raisonner en fonction des débouchés lactosérum et de leurs traitements.

- Critères de choix par la praticité : type de conditionnement, DLUO / DDM aux températures usuelles, nécessité de dilution ou non.

- Autres critères de choix: microbiologie (microflores utiles, d'altération, pathogènes), métaux lourds (plomb, arsenic, mercure, cadmium), allergènes, OGM, coût.

Il existe donc de nombreux critères pour choisir son coagulant, en fonction du ou

des fromages que l'on fabrique, de la valorisation du lactosérum que l'on souhaite, des cahiers des charges auxquels on veut répondre.

La diversité des solutions coagulantes proposées aujourd'hui permet de répondre à tous ces critères de choix, en fonction des éléments importants que chaque utilisateur souhaite prioriser. Bien sûr, le critère économique reste une composante très importante venant parfois occulter les critères technologiques.

Tableau de synthèse des éléments techniques permettant le choix d'une préparation enzymatique coagulante (Présures et coagulants de substitution, Jean-Claude Collin, coord, 2015).

Concentration support

		Nature des enzymes coagulantes						En enzymes		Nacl		pp et aa	
		Ch	Pb	R.m	R.p	C.p (3)	CF	-	+	-	+	-	+
Législation	Lait chèvre et brebis	x	N	x	N	N	x						
	Fromages AOP	x	N	N	N	N	N						
	Produits kascher, végétarien	N	N	x	x	x	x						
	Autres	x	x	x	x	x	x						
Lait	Pauvre en MAP (1)								xx	xx			
	Riche en MAP (2)							xx			xx		
Technologie	Lactiques	xx	N	N	N	D	xx	x	-	-	x		x
	Pâte molle mixte	x	(x)	x	N	D	x	x	(x)	x	x		xx
	Pâte molle présure	x	(x)	x	N	D	x	(x)	x	x	(x)		x
	PP	x	(x)	x	(x)	D	x	-	x	x	(x)		x
	PPC	xx	D	(x)	N	x	xx	-	x	x	(x)		xx
	Pâte filée	xx	D	x	(x)	x	xx	-	x	x	(x)		x
Durée affinage	Courte	x	(x)	x	(x)	(x)	x						
	Longue	xx	N	(x)	N	D	xx						xx
Rendement fromagers		xx	x	x	x	N	xx						

Ch : Chymosine «présure» ; **Pb** : Pepsine bovine ; **R.m** : Rhizomucor miehei ; **R.p** : Rhizomucor pusillus ; **Cp** : Cryphonectria parasitica ; **CF** : Chymosine fermentaire ; **pp** : petits peptides ; **aa** : acides aminés .(x) : emploi avec quelques risques ; N : non autorisé pour l'aspect législation ; x : emploi possible ou non recommandé quand autorisé ; xx :emploi recommandé ; **D** : fortement déconseillé , même quand autorisé

Les éléments du tableau de synthèse indiquent :

(1) pour les laits pauvres en protéines fabriqués en technologie fromage minéralisé (présure), l'emploi d'une préparation coagulante à forte concentration en enzymes avec un support faible en NaCl pour limiter son effet déstructurant est recommandé.

(2) au contraire avec des laits riches en protéines ou enrichis en caséine et en plus transformés en technologie mixte (moyennement minéralisée) ou lactique (faiblement minéralisé) il faut privilégier des préparations à faible concentration enzymatique et riches en NaCl, pour diminuer l'effet tampon du caillé.

(3) malgré son effet négatif sur les rendements, provenant de sa forte activité protéolytique, *Cryphonectria parasitica* peut être utilisée en pâtes cuites en raison de sa faible sensibilité aux variations de condition du milieu (pH, température, calcium...) et de sa sensibilité thermique.

B. Mietton (2015). Description, choix des préparations enzymatiques coagulantes et éléments de maîtrise. In :Présures et coagulants de substitution Comment faire le bon choix ? J. C. Collin coord., Ed. Quae, Versailles, 103-142.

BIBLIOGRAPHIE

P. Granday (2015). Les préparations coagulantes utilisées en fromagerie. In :Présures et coagulants de substitution Comment faire le bon choix ? J. C. Collin coord., Ed. Quae, Versailles, 11-60.

TROUVEZ VOTRE FUTUR EMPLOYÉ AVEC ENILJOB.FR



Un service qui vous met en **relation** avec des **candidats** motivés, diplômés dans les ENIL et compétents dans **les secteurs qui vous intéressent** !

- Diffusion et Consultation d'offres en ligne
- Accès à la CVthèque
- Contact direct avec les candidats
- Affichage des offres dans les ENIL
- Suivi des offres
- Gratuité des offres de stage

TARIFS

Entreprise de -10 salariés
1 offre/ 3 mois **42 €**

Entreprise + 10 salariés
1 offre/ 3 mois **100 €**

Cabinet de recrutement/Agence intérim
1 offre / 3 mois **210 €**

PACKS ANNONCES
5 offres/ 1 an **400 €**
10 offres/ 1an **700 €**
50 offres/ 1 an **3000 €**

**Pour diffuser une offre d'emploi ou une offre de stage :
Créez un compte en ligne sur www.eniljob.fr ou contactez-nous**



@eniljob

www.eniljob.fr

Ecrivez-nous : service.emploi@anfopeil-enil.fr

LES MÉTHODES D'ANALYSES DES COAGULANTS

Philippe TROSSAT, ACTALIA

Il existe plusieurs méthodes de mesure de l'activité coagulante des enzymes utilisées en transformation fromagère.

Les méthodes normalisées disponibles sont spécifiques du type de coagulant et correspondent « *in fine* » à une mesure de coagulation réalisée sur un substrat défini (poudre de lait) à pH 6,5 et à une température de 32 °C.

Cette mesure d'activité coagulante est définie dans un document normatif spécifique, la norme :

ISO 11815 I FIL 157.

L'expression de cette activité peut être différente selon le type de coagulants (et les documents normatifs associés) : mg / litre d'enzyme active ; unité internationale de coagulation : IMCU (International Milk Clotting Unit) par ml ou par g.

Suivant les types de coagulants, les méthodes disponibles sont les suivantes :

1) PRÉSURE DE VEAU ET COAGULANT ISSU DE BOVINS ADULTES : MÉTHODE ISO I 15163 FIL 110

L'activité coagulante des deux enzymes constituant la présure (chymosine et pepsine) est déterminée après une séparation chromatographique des deux enzymes (gel filtration) sur la présure ayant subi un dessalage (par

dialyse ou filtration sur gel).

Celle-ci est déterminée sur un substrat à pH 6,5 et à 32 °C, soit pour une expression en mg d'enzyme active / litre à l'aide d'un lait étalon* (selon les dispositions de la norme

ISO 15163 I FIL 110), ou soit pour une expression en IMCU chymosine et IMCU pepsine selon les dispositions de la norme **ISO 11815 I FIL 157** à l'aide d'étalons chymosine et pepsine (valeur de référence d'environ 1000 IMCU/g).

À noter qu'une valeur IMCU « globale » représentant une activité totale de coagulation peut être calculée par sommation des activités individuelles.

La reproductibilité de cette méthode, exprimée en CV,R % [(SR/moyenne du taux) x 100] est de 6.9 % pour la chymosine et 12 % pour la pepsine.

Parallèlement, à cette méthode le Journal Officiel de la République Française de 1981 (JORF) décrit une méthode française basée sur une version antérieure de la norme FIL 110 (FIL 110 A vs FIL 110 C en vigueur) qui se différencie de la méthode en vigueur par le pH du substrat (6,3 vs 6,5 sur la version en vigueur) et la température de mesure (30 °C vs 32°C sur la version en vigueur) et par une expression unique en mg d'enzyme active (chymosine ou pepsine) / litre.

**Le lait étalon est actuellement disponible pour une mesure à pH 6,3 et à une température de 30 °C uniquement.*

2) COAGULANTS D'ORIGINE FERMENTAIRE ISO 11815 I FIL 157

L'analyse de l'activité de la chymosine d'origine fermentaire est réalisé via la mesure d'activité totale de coagulation conformément à la norme ISO 11815 I FIL 157 par comparaison avec un étalon « chymosine » à environ 1000 IMCU / g.

Le résultat obtenu est exprimé en IMCU/g ou / ml.

La reproductibilité de cette méthode, exprimée en CV,R % [(SR/moyenne du taux) x 100] est de 3.5 %.

3) COAGULANTS MICROBIENS ISO 15174 I FIL 176

L'analyse de l'activité coagulante des coagulants microbiens est réalisée selon les dispositions de la norme **ISO 15174 I FIL 176** en utilisant sur un substrat à pH 6,5 à 32 °C par comparaison avec une poudre étalon de référence de coagulant microbien (*Rhizomucor miehei*).

Le résultat obtenu est exprimé en IMCU/g ou / ml. La reproductibilité de cette méthode, exprimée en CV,R % [(SR/moyenne du taux) x 100] est de 5.6 %.

4) PRÉSURES OVINES ET CAPRINES : (LIQUIDE ET EN PÂTE) ISO 23058 | FIL 199

L'activité coagulante (totale) des présures ovines et caprines est réalisée conformément aux dispositions de la méthode utilisée pour la présure de veau par sommation de l'activité en IMCU de la chymosine et de la pepsine pour définir une activité « totale » du coagulant (par comparaison aux étalons de référence chymosine et pepsine correspondant).

Le résultat obtenu est exprimé en IMCU / g ou / ml.

La reproductibilité de cette méthode, exprimée en CV,R % [(SR/moyenne du taux) x 100] est de 4,1 % pour les produits liquides et 13 % pour les produits en pâte.

Il faut également noter l'existence d'une méthode d'analyse qualitative des coagulants (définie dans l'annexe

A de la norme **ISO 15163 | FIL 110**).

Cette méthode permet de déterminer l'occurrence des 6 enzymes de coagulation différentes (chymosine, pepsine bovine, pepsine porcine, enzymes provenant de *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* et *Cryphonectria parasitica* dans les coagulants d'origine bovine commerciaux et utilise un principe d'immunodiffusion double sur gel (réactions antigène-anticorps spécifiques).

En ce qui concerne les chymosines d'origine fermentaire, étant donné qu'elles présentent la même séquence d'acides aminés que la chymosine d'origine animale, une méthode ELISA visant à rechercher les protéines « environnantes » (provenant soit du microorganisme hôte, soit du milieu de culture) a été mise au point pour les identifier. (Collin, 2015).

Il existe donc des méthodes standardisées et normalisées pour l'ensemble des coagulants utilisés en

transformation fromagère. Ces normes décrivent clairement les domaines d'application pour lesquelles elles sont utilisables et il convient de s'y conformer précisément.

Il est également important de noter que des comparaisons de résultats d'activité « totale » de coagulation (IMCU global) entre coagulants peuvent dans certains cas s'avérer difficile compte-tenu de l'aspect « composite » de l'activité totale (IMCU chymosine + IMCU pepsine) pour certains coagulants, chaque enzyme contribuant pour partie à l'activité « totale ».

BIBLIOGRAPHIE

JC. Collin (2015). Analyse, contrôle et traçabilité des présures. In : Présures et coagulants de substitution. Comment faire le bon choix ? J.C. Collin coord., Edition Quae, Versailles, 143-171.

PRÉSURES



MILIEUX DE CULTURE

FERMENTS LACTIQUES



FERMENTS D'AFFINAGE

ÉPICES POUR FROMAGES



"Un vrai fromage se doit d'être d'une qualité irréprochable. Alors nos présures traditionnelles, aux valeurs exceptionnelles seront vos outils indispensables dans votre quête de perfection ..."

PLUS DE **140 ANS** D'EXPÉRIENCE

Présures Granday



Présures Granday® et Présures Berthelot® sont des marques des **Laboratoires ABIA**
 ZA les Champs Lins - 51 Impasse du pré des taupes / 21190 MEURSAULT - FRANCE
 Fax : +33(0)3 8020 8001 - Tél : +33(0)3 8020 8000 / contact@laboratoires-abia.com - www.laboratoires-abia.com

STAGES ANFOPEIL

Thierry MICHELET, Coordinateur-Responsable pédagogique, ANFOPEIL

Les agents coagulants sont des auxiliaires indispensables en fromagerie dont le rôle principal est bien sûr de « faire coaguler le lait » mais dont les incidences sur le process et le produit fini sont nombreuses. Ils peuvent en effet impacter les rendements, le processus d'affinage, les qualités organoleptiques du fromage ...

Dans tous les stages de technologie fromagère proposés par l'ANFOPEIL, ainsi que dans l'offre de formation à distance (Webalim), ce thème est abordé. Le sujet est traité de manière simple dans le stage « Bases de technologie fromagère » ou dans le module BA08 et de manière plus complexe et complète dans les stages de perfectionnement aux différentes technologies fromagères et dans nos stages « experts ».

<p>Module Webalim BA08 Les agents coagulants</p>	<p>Objectifs : définir agent coagulant, enzyme et présure ;</p> <ul style="list-style-type: none"> • citer les différents agents coagulants utilisés en fromagerie ; • expliquer le rôle et les facteurs influant sur l'activité des enzymes coagulantes ; • choisir un agent coagulant et calculer les doses à mettre en œuvre. 	<p>Contenu :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Introduction 2. Définition des agents coagulants 3. Composition des préparations coagulantes et réglementation 4. Fabrication des agents coagulants 5. Rôle et mécanisme d'action d'une préparation coagulante 6. Choix et mise en œuvre d'une présure 												
<p>Stage 5 «Les bases de la technologie fromagère» 2018 4 Jours Niveau Initiation</p>	<table border="1"> <tr> <td>ENIL Saint-Lô</td> <td>Semaine 5 du 29/01 (13h30) au 02/02 (12h)</td> </tr> <tr> <td>ENIL Mamirolle</td> <td>Semaine 10 du 05/03 (13h30) au 09/03 (12 h)</td> </tr> <tr> <td>ENILV Aurillac</td> <td>Semaine 24 du 11/06 (13h30) au 15/06 (12 h)</td> </tr> <tr> <td>ENILV La Roche-sur-Foron</td> <td>Semaine 38 du 17/09 (13h30) au 21/09 (12h)</td> </tr> <tr> <td>ENILBIO Poligny</td> <td>Semaine 46 du 13/11 (13h30) au 16/11 (12 h)</td> </tr> <tr> <td>ENILIA Surgères</td> <td>Semaine 47 du 19/11 (13h30) au 23/11 (12 h)</td> </tr> </table>	ENIL Saint-Lô	Semaine 5 du 29/01 (13h30) au 02/02 (12h)	ENIL Mamirolle	Semaine 10 du 05/03 (13h30) au 09/03 (12 h)	ENILV Aurillac	Semaine 24 du 11/06 (13h30) au 15/06 (12 h)	ENILV La Roche-sur-Foron	Semaine 38 du 17/09 (13h30) au 21/09 (12h)	ENILBIO Poligny	Semaine 46 du 13/11 (13h30) au 16/11 (12 h)	ENILIA Surgères	Semaine 47 du 19/11 (13h30) au 23/11 (12 h)	<p>Contenu :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Composition du lait - Définition • Classification des fromages • Principes et paramètres de la fromagerie • Méthodes et moyens pour élaborer des produits de qualité • Approche scientifique et technologique
ENIL Saint-Lô	Semaine 5 du 29/01 (13h30) au 02/02 (12h)													
ENIL Mamirolle	Semaine 10 du 05/03 (13h30) au 09/03 (12 h)													
ENILV Aurillac	Semaine 24 du 11/06 (13h30) au 15/06 (12 h)													
ENILV La Roche-sur-Foron	Semaine 38 du 17/09 (13h30) au 21/09 (12h)													
ENILBIO Poligny	Semaine 46 du 13/11 (13h30) au 16/11 (12 h)													
ENILIA Surgères	Semaine 47 du 19/11 (13h30) au 23/11 (12 h)													
<p>Stages - 4 jours - 2018 Niveau Perfectionnement</p>	<p>Différentes technologies : pâtes molles, pâtes persillées, chèvre, pâtes pressées non cuites, pâtes pressées cuites ...</p>													
<p>Stages de 1 à 8 jours - 2018 Niveau Expert</p>	<p>Défauts en fromagerie, Technologie fromagère approfondie, Affinage et conditionnement pâtes molles ...</p>													

NB : Les descriptifs complets des stages sont disponibles sur notre site : www.anfopeil-enil.fr

N'hésitez pas à contacter le Réseau des ENIL/ANFOPEIL pour toute demande de formation « à la carte » sur ces thématiques ou d'autres.

Le réseau des ENIL/ANFOPEIL

BP 10025 • 39801 POLIGNY CEDEX
Tél : 03 84 37 27 24 • Fax : 03 84 37 08 61
accueil@anfopeil-enil.fr

Responsable administrative

Christine GRILLOT
christine.grillot@anfopeil-enil.fr

Coordinateur - Responsable pédagogique :

Thierry MICHELET : thierry.michelet@anfopeil-enil.fr
06 44 71 15 83



« MAPPING SKILLS NEEDS AND SUPPLY IN THE DAIRY SECTOR »

PROJET EUROPÉEN FINANCÉ SUR PROGRAMME ERASMUS
CONÇU ET PORTÉ PAR AEDIL



3 ANS (2017 À 2019)

11

PARTENAIRES PARTICIPANTS (DONT AFDIL)



40

PARTENAIRES ASSOCIÉS

DANS **13** PAYS DE L'UE



L'AEDIL est l' **Association of European Dairy Industry Learning**, c'est un réseau d'acteurs de **13 pays** qui ont des intérêts dans l'**enseignement laitier** (entreprises, universités, écoles, organisations professionnelles ...)

L'**AFDIL** est l'Association Française des Diplômés de l'industrie Laitière. Elle regroupe les amicales des anciens élèves des ENIL et de l'IESIEL, l'association du SIEL, le réseau des ENIL et l'ANFOPEIL.

L'AFDIL participe à ce projet européen dont les enjeux sont :

- Pour les écoles laitières et les universités : une meilleure adaptation des enseignements laitiers aux besoins des entreprises et aux attentes des étudiants et des jeunes travailleurs,
- Pour les entreprises laitières : une meilleure connaissance des systèmes éducatifs et des institutions en Europe qui forment les diplômés de l'enseignement laitier.

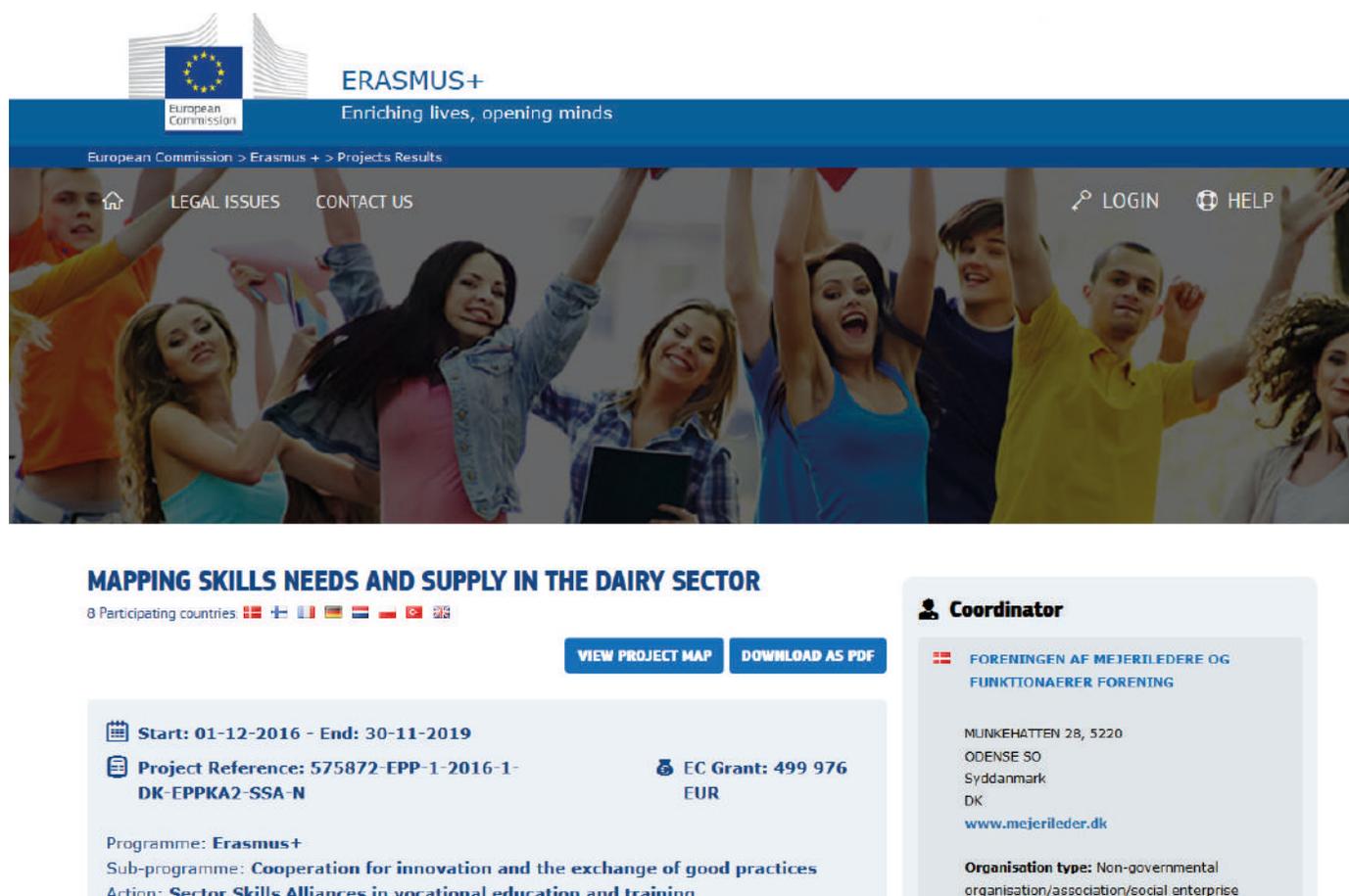
La finalité est de faciliter les recrutements et la mobilité des travailleurs en europe.

Pour toute information concernant ce projet : thierry.michelet@anfopeil-enil.fr

L'AFDIL fait partie du comité de pilotage avec le Danemark, l'Allemagne, la Turquie et l'Angleterre.

Le cadrage du projet et l'enquête auprès des entreprises et organismes de formation européen a démarré en 2017.

L'analyse des résultats et la consolidation au niveau européen se dérouleront courant 2018
Des recommandations seront rédigées pour 2019



The screenshot shows the Erasmus+ project details page. At the top, there is the European Commission logo and the Erasmus+ slogan 'Enriching lives, opening minds'. Below this is a navigation bar with 'LEGAL ISSUES' and 'CONTACT US' links, and 'LOGIN' and 'HELP' buttons. The main heading is 'MAPPING SKILLS NEEDS AND SUPPLY IN THE DAIRY SECTOR'. Underneath, it lists '8 Participating countries' with flags for Denmark, Finland, Germany, Hungary, Italy, Poland, Turkey, and the UK. There are two buttons: 'VIEW PROJECT MAP' and 'DOWNLOAD AS PDF'. A summary box contains the following information: Start: 01-12-2016 - End: 30-11-2019; Project Reference: 575872-EPP-1-2016-1-DK-EPPKA2-SSA-N; EC Grant: 499 976 EUR; Programme: Erasmus+; Sub-programme: Cooperation for innovation and the exchange of good practices; Action: Sector Skills Alliances in vocational education and training. To the right, the 'Coordinator' section lists 'FORENINGEN AF MEJERILEDERE OG FUNKTIONÆRER FORENING' with the address: MUNKEHATTEN 28, 5220 ODENSE SO, Syddanmark, DK, and website: www.mejerileder.dk. The 'Organisation type' is listed as 'Non-governmental organisation/association/social enterprise'.

Plus d'information sur :

<http://ec.europa.eu/programmes/erasmus-plus/projects/eplus-project-details-page/?nodeRef=workspace://SpacesStore/477f2c04-a8f8-4d85-af30-8d69d3a6e7f8>

Ou

<https://www.aedil.org>



Le soutien apporté par la Commission Européenne à la production de la présente publication ne vaut pas approbation du contenu, lequel ne reflète que l'opinion des auteurs. La commission ne peut être tenue pour responsable de l'utilisation qui pourrait être faite des informations contenues dans la présente étude.

LE RÉSEAU ANFOPEIL



ENIL
 25620 MAMIROLLE
 Tél. 03 81 55 92 00
 Fax 03 81 55 92 17
DIRECTRICE : G. FOURNIER
 Conseiller Formation : A. COINTE
 E-mail : adeline.cointe@educagri.fr
Portes ouvertes : 27/01 et 03/03 2018



ENILBIO
 39801 POLIGNY
 Tél. 03 84 73 76 76
 Fax 03 84 37 07 28
DIRECTRICE : G. FOURNIER
 Conseiller Formation : I. FRIMOUT
 E-mail : isabelle.frimout@educagri.fr
Portes ouvertes : 27/01 et 03/03 2018



ENIL
 50620 LE HOMMET D'ARTHENAY
 Tél. 02 33 77 80 82
 Fax 02 33 77 80 84
DIRECTRICE : F. MARTIN
 Conseillère Formation : A. deschenes
 E-mail : agnes.deschenes@educagri.fr
Portes ouvertes : 27/01 et 17/03 2018



ACTALIA
 01000 BOURG-EN-BRESSE
 Tél. 04 92 34 71 86
 Fax 04 92 34 72 97
DIRECTEUR PRODUITS LAITIERS : J.M. HÉRODET
 Conseillère Formation : S. FONTAINE
 E-mail : s.fontaine@actalia.eu



ENILIA
 17700 SURGÈRES
 Tél. 05 46 27 69 00
 Fax 05 46 07 31 49
DIRECTEUR : M. FAOURI
 Conseiller Formation : E. AUDEBERT
 E-mail : emmanuel.audebert@educagri.fr
Portes ouvertes : 03/02 et 26/05 2018



ENILV
 15000 AURILLAC
 Tél. 04 71 46 26 60
 Fax 04 71 46 26 40
DIRECTEUR : J.P. CHAPUT
 Conseillère Formation : C. ARSAC
 E-mail : celine.arsac@educagri.fr
Portes ouvertes : 10/02 et 10/03 2018



ENILV
 74805 LA ROCHE-SUR-FORON
 Tél. 04 50 03 47 13
 Fax 04 50 97 61 23
DIRECTRICE : V. DROUET
 Conseillère Formation : J. DEBALLON
 E-mail : julie.deballon@educagri.fr
Portes ouvertes : 03/02 et 10/03 2018

Membres du réseau des ENIL

