

# CARACTERISATION DES COAGULANTS: UN OUTIL AU SERVICE DES INDUSTRIES FROMAGERES

Les coagulants sont des auxiliaires technologiques indispensables en fromagerie. Ces derniers peuvent avoir plusieurs origines :

- **Animale** : obtenus principalement par macération des caillettes de ruminants et contenant généralement un mélange d'enzyme : chymosine et pepsine à des concentrations différentes suivant l'âge et le type d'alimentation du jeune ruminant.
- **Microbienne** : obtenus par fermentation en conditions contrôlées et dont les trois principales et disponibles actuellement sont :
  - La protéinase acide native de *Cryphonectria parasitica* (anciennement *Endothia parasitica*)
  - La protéinase acide native de *Rhizomucor pusillus* (anciennement *Mucor pusillus*)
  - La protéinase acide de *Rhizomucor miehei* (anciennement *Mucor miehei*).
- **Fermentaire** : produits après clonage du gène producteur de la prochymosine chez *Aspergillus niger var awamori* et *Kluyveromyces lactis*.

## LES METHODES

Différentes méthodes existent pour caractériser ces coagulants d'un point de vue qualitatif, quantitatif et de leur activité coagulante :

### ◆ Détermination qualitative et quantitative

- **La méthode officielle française, publiée au JORF de janvier 1981** pour la détermination de la teneur en chymosine et pepsine bovines qui est scindée en 2 parties :
  - Une méthode qualitative (Partie A) pour identifier les enzymes présentes et s'assurer de la seule présence de chymosine et de pepsine bovines dans l'extrait de présure (par une méthode d'immunodiffusion au moyen d'anticorps spécifiques).
  - Une méthode quantitative (Parties B et C) ayant pour objet de déterminer les quantités de chymosine et pepsine bovines actives (en mg/L) dans l'extrait de présure. Cette méthode comporte une séparation des deux enzymes par une technique chromatographique sur colonne échangeuse d'ions et une mesure du temps de coagulation, à 30°C, d'un substrat de lait en poudre reconstitué en présence de chlorure de calcium 0,1M (pH 6,35).

Cette méthode correspond à la méthode FIL 110 dans sa version A de 1987.

- **La méthode FIL 110 dans sa version actuelle (B : 1997)** qui présente les modifications suivantes par rapport à la version FIL 110 A :
  - Après la séparation chromatographique des enzymes, un renvoi à la norme ISO 11815/ FIL 157 pour la mesure de l'activité coagulante de chaque enzyme **à une température de coagulation à 32° C (contre 30°C dans le norme FIL 110 A)** réalisée sur un substrat reconstitué à partir de lait en poudre en présence de chlorure de calcium (**présentant un pH de 6,5**).
  - Introduction d'une expression des résultats en % de chymosine et pepsine (à partir des valeurs IMCU/g ou ml : International Milk Clotting Unit) à l'aide de poudres étalons de chymosine et pepsine bovines, en plus de la concentration en mg/L présente dans la version antérieure.

#### ◆ **Détermination de l'activité coagulante**

- **La norme ISO 11815 / FIL 157** appliquée aux présures bovines animales et aux chymosines fermentaires pour la détermination de l'activité coagulante totale du lait.

Les mesures sont réalisées sur un substrat reconstitué à partir de lait en poudre et de chlorure de calcium présentant un pH de 6,5 à une température de 32°C par comparaison à des standards de chymosine et de pepsine titrant 1000 IMCU/ g.

Dans un premier temps, une activité de coagulation est calculée par rapport aux standards, puis le calcul de coagulation totale est exécuté par interpolation à l'aide d'une solution de référence présentant la même composition (cf Norme FIL 110).

- **La norme ISO 15174 / FIL 176** appliquée aux coagulants microbiens pour la détermination de l'activité coagulante totale du lait.

La mesure est réalisée sur un substrat reconstitué à partir de lait en poudre et de chlorure de calcium présentant un pH de 6,5 à une température de 32°C par comparaison à un standard de coagulant microbien (*Rhizomucor miehei*) titrant 1000 IMCU/ g.

#### LES PRESTATIONS SUR LE SITE DE POLIGNY

- Les prestations sur les coagulants proposées par CECALAIT / ACTILAIT (contact X. Quervel : [x.quervel@cecalait.com](mailto:x.quervel@cecalait.com)) sont les suivantes :
  - Détermination quantitative de la chymosine et de la pepsine dans la présure animale selon la méthode **JO RF de 1981** ou alors la méthode **FIL 110 B**.
  - Détermination de l'activité coagulante des présures bovines selon la norme **ISO 11815 / FIL 157** et des coagulants microbiens selon la norme **ISO 15174 / FIL 176**.
  - La fourniture d'un lait en poudre étalon pour réaliser les essais quantitatifs et d'activité coagulante fourni avec les coefficients  $K_c$  et  $K_p$  à un pH de 6,3 et de 6,5 et des correspondances mg/L ↔ IMCU/g pour la chymosine et la pepsine bovine.
- L'Unité de Recherches de l'INRA de Poligny (contact O. Rolet-Répécaud : [rolet@poligny.inra.fr](mailto:rolet@poligny.inra.fr)) propose :
  - La méthode qualitative selon le **JORF de 1981** ou la méthode **FIL 110 B**.
  - La recherche de chymosine d'origine fermentaire

L'ensemble des compétences sur le site de Poligny, permet de proposer, aux différents acteurs de la filière, une offre analytique complète permettant de caractériser les enzymes coagulantes.

Ph. TROSSAT et X.QUERVEL