

## Aptitude à la coagulation enzymatique du lait de jument : étude multifactorielle

Par :

- S. Pochet, INRA, UR 342 Technologie et Analyses Laitières BP20089, F-39801, Poligny
- G. Duboz, INRA, UR 342 Technologie et Analyses Laitières BP20089, F-39801, Poligny
- F. Faurie, INRA, UR 342 Technologie et Analyses Laitières BP20089, F-39801, Poligny
- F. Buchin, ISBA – ENILBIO, place du champ de foire, F-39800, Poligny
- S. Roustel, ISBA – ENILBIO, place du champ de foire, F-39800, Poligny

### Résumé

L'aptitude à la coagulation enzymatique du lait de jument a été testée en tube en faisant varier, seuls ou en combinaison, la concentration par filtration membranaire (10, 50 ou 100 kDa, FCV=3), le traitement thermique (1 min à 55, 65, 75 ou 92°C), l'ajout de chlorure de calcium (0,05 à 0,3g/L), le pH à l'emprésurage (natif, 6,5 ou 6,0), la nature et la dose de coagulant (présures de veau, à force et teneur en chymosine faible ou forte, ou protéase de *Rhizomucor miehei* ou cocktail coagulant pour lait de chamelle Camifloc) et la température de coagulation (32 ou 40°C). Le lait de jument « flocule » mais ne forme pas de gel cohésif. On n'obtient donc pas de signal exploitable avec l'Optigraph ou le Formagraph. Le temps de floculation observé visuellement diminue avec la baisse de pH du lait, l'augmentation de la température de coagulation, l'augmentation de la dose de coagulant (effet curvilinéaire), est influencé par la nature du coagulant (la présure de veau, surtout riche en pepsine, plus favorable que la protéase fongique). L'ajout de calcium a peu d'effet au delà de 0,05 g/L. La concentration des protéines n'a pas d'effet. Le traitement thermique augmente le temps de floculation surtout avec la protéase fongique.

**Mots clés : lait de jument, race Comtoise, coagulation enzymatique, fromage**

### Summary

The ability of mare milk to coagulate with enzymes was studied in tubes, including alone or in combination, the effect of the following parameters : concentration by ultrafiltration (10, 50 or 100 kDa, VCF=3), heat treatment of the milk (1 min at 55, 65, 75 or 92°C), adjunct of calcium chloride (0,05 to 0.3g/L), renneting pH (native, 6.5 or 6.0), the nature and amount of coagulant (bovine rennet, with low or high strength and chymosin content, or a fungal *Rhizomucor miehei* protease or a commercial coagulant dedicated to camel milk, and temperature of coagulation (32 or 40°C). Mare milk makes "flakes" but do not actually coagulate to form gel, which prevents any significant signal from a Formagraph or an Optigraph to be used. The visually observed "coagulation" time decreases with acidification, increase of the test temperature, increase of amount of coagulant (curvilinear effect) and is influenced by the nature of the coagulant (bovine rennet especially the low strength high pepsin content is better than fungal protease). Adding calcium chloride above 0,05 g/l was poorly efficient. The concentration of proteins has no effect. Heat treatment of the milk increases the "coagulation" time, mainly with fungal protease.

**Key-words : mare milk, Comtoise, enzymatic coagulation, cheese**

## Introduction

L'intérêt pour la consommation de lait de jument est croissant en Europe, en raison de ses vertus supposées ou démontrées pour la nutrition et la santé. Comme le lait de chamelle, l'aptitude du lait de jument à la coagulation et à la transformation fromagère est toutefois faible et tient à sa teneur réduite en extrait sec, en protéines fromageables et en caséine  $\kappa$  [1], et peut-être aussi, à la présence d'inhibiteurs de protéases (de la chymosine en particulier) dans la fraction soluble [2, 3]. En revanche, contrairement au lait de vache, la caséine  $\beta$  majoritaire est peu soluble même à basse température et/ou en présence de calcium [4]. Cette étude complète les données disponibles [5] en explorant l'influence de nombreux paramètres technologiques comme le traitement thermique du lait, la concentration par filtration membranaire, le pH à l'emprésurage, l'ajout de calcium, la nature et la dose de coagulant, la température de coagulation, sur le comportement du lait de jument à la coagulation.

## 1. Matériels et Méthodes

Le lait de jument de race Comtoise (stocké une nuit à 4°C après réception) était amené à température ambiante (20-25°C) et traité, ou non, selon les essais dans l'ordre suivant :

1. concentration par ultrafiltration membranaire (facteur de concentration volumique =3, membranes 10 kDa ou 50 kDa ou 100 kDa),
2. traitement thermique (55, 65, 75 ou 92°C pendant 1 minute),
3. ajout de calcium (0, 0,05, 0,1, 0,2 et 0,3 g CaCl<sub>2</sub>/L lait),
4. acidification ou non par ajout d'acide lactique 50% v/v jusqu'à pH 6,5 ou 6,0.

Les tubes contenant 10 mL de lait étaient ensuite placés à la température de 32°C ou 40°C, 30 minutes avant l'ajout du coagulant. Les coagulants suivants ont été testés à 4 doses (D, 2D, 4D et 10D), « D » étant la dose de coagulant nécessaire et suffisante pour coaguler 10 mL de lait de vache en 5 min environ à 32°C :

- 2 présures de veau variant par la concentration en chymosine et le rapport chymosine/pepsine, fort pour PV (Danisco P700, chymosine=700 mg/L, chymosine/pepsine  $\geq$  1,55) et faible pour pv (Danisco P22, chymosine 335 mg/L, chymosine /pepsine  $\geq$  0,33) ;
- une protéase fongique (PF) de *Rhizomucor miehei* (Coquard, Beaugel 4).
- Un coagulant commercial pour lait de chamelle (Bioserae, Camifloc) à base de protéase de *Rhizomucor miehei*, de pepsine, de phosphate et de chlorure de calcium, de ferments lactiques et de delta-glucono-lactone en concentrations non données (CF) a également été testé aux doses du fabricant pour une technologie pâte fraîche (d), pâte molle (3d), pâte pressée (5d) et pâte dure (6d). La dose « d » a coagulé le lait de vache en 27 min à 32°C.

Le temps de « coagulation » donné pour le lait de jument correspond à l'apparition de flocons sur la paroi du tube. Les observations ont été faites au minimum pendant 90 min et jusqu'à 3h. Des mesures rhéologiques (Formagraph) ou dans l'infrarouge (Optigraph) ont également été effectuées.

## 2. Résultats

Avec le lait de jument, une véritable coagulation, au sens de formation d'un gel texturé, n'a jamais été observée. La seule transformation physique, lorsqu'elle est observée, consiste en une floculation très fine qui rend le milieu apparemment plus dense suivie d'une sédimentation plus ou moins rapide. La matière insoluble, une fois récupérée, n'a pas de cohérence. Les signaux enregistrés avec le Formagraph ou avec l'Optigraph sont trop faibles pour pouvoir être exploités. Au pH natif du lait aucune modification du milieu n'a été observée, quelles que soient les conditions, hormis au bout de 25 et 40 min à 40°C et 32°C respectivement en présence de la plus forte dose de CF (6d). Le traitement thermique du lait, quelle que soit la température, n'apporte pas d'amélioration à la coagulation. A pH 6,0, la coagulation a eu lieu dans la plupart des tubes avant ou pendant l'apport de coagulant ou 1 à 2 min après. Une acidification plus modérée, à pH 6,5, a permis d'observer une variabilité dans l'effet des facteurs. La présure de veau a donné des temps de floculation plus courts que la protéase fongique quelle que soit la dose, mais les écarts entre les deux types de coagulants étaient inférieurs à 40°C (vs 32°C) (figure I A). Le temps de floculation est peu différent pour les 2 présures de veau, mais systématiquement inférieur pour pv (vs PV), en particulier pour les faibles doses (alors que pour les témoins vache, c'est l'inverse). Quel que soit le coagulant, le temps de floculation a diminué avec l'augmentation de la dose ajoutée. Toutefois l'essentiel du gain de temps est effectué entre D et 4D. L'augmentation de la température du lait de 32°C à 40°C a diminué le temps de floculation d'environ 15 à 20 min, particulièrement dans le cas de la présure de veau. L'ajout de chlorure de calcium n'a eu que très peu d'effet au-delà de 0,05g/L (figure I B), quelque soit la dose de coagulant. Jusqu'à 65°C, le traitement thermique du lait augmente le temps de floculation, de façon modérée avec les présures de veau mais de façon beaucoup plus importante pour la présure fongique (figure II). Après un traitement thermique supérieur ou égal à 75°C, le lait ne flocule plus à 32°C

dans un délai de 160 min quelque soit la nature et la dose de coagulant et l'ajout de calcium (0,1g/L testé). En revanche, à 40°C, le lait floccule plus vite à 92°C qu'à 75°C, mais dans le meilleur des cas au bout de 50 min seulement (pv, 10D, CaCl<sub>2</sub> 0,1g/L).

Figure I. Influence de la dose de coagulant (A)(voir le texte) et de l'ajout de chlorure de calcium (B) sur le temps de floculation de lait de jument acidifié à pH 6,5 en fonction de la température de coagulation (32 ou 40°C) et de la nature du coagulant : (●) pv = présure de veau (chymosine = 335mg/L, chymosine/pepsine = 0,33), (▲) PF = protéase fongique de *Rhizomucor miehei*. (■) CF = coagulant pour lait de chamelle (Camifloc)

Figure I. Influence of the amount of coagulant (A)(see text) and addition of calcium chloride (B) on the "coagulation" time of mare milk acidified at pH 6,5 as a function of the test temperature (32 or 40°C) and of the type of coagulant : (●) pv : bovine rennet (chymosin = 335mg/L, chymosin/pepsin = 0,33), (▲) PF =fungal protease of *Rhizomucor miehei*, (■) CF =coagulant for camel milk (Camifloc)

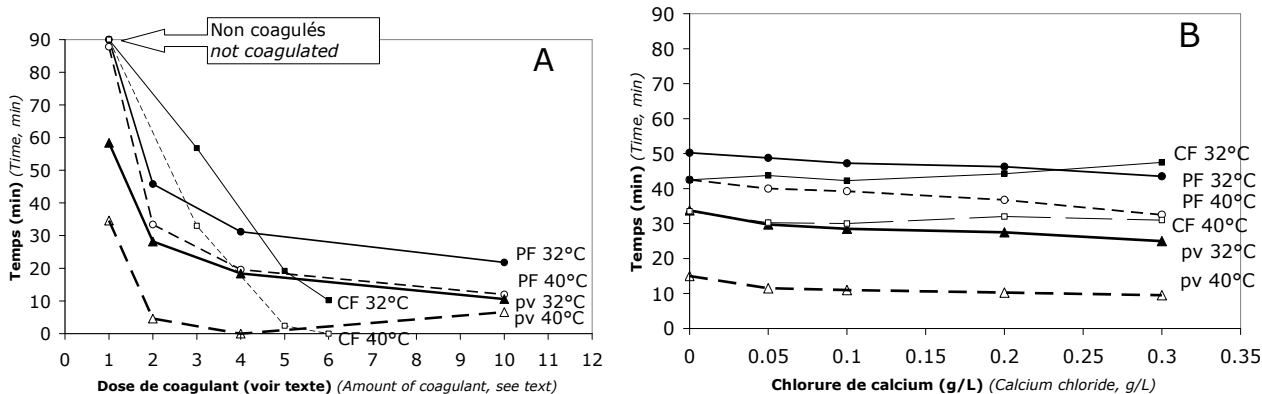
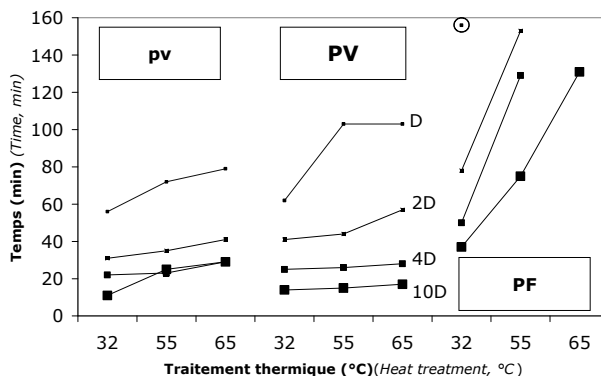


Figure II. Influence de la température de prétraitement du lait de jument sur le temps de floculation à 32°C et pH 6,5 avec différentes doses (D, 2, 4D, 10D – voir texte) et nature de coagulants : pv (présure de veau : chymosine = 335mg/L, chymosine/pepsine ≥ 0,33) ou PV (présure de veau : chymosine=700 mg/L, chymosine/pepsine ≥ 1,55) ou PF (protéase fongique de *Rhizomucor miehei*).

Figure II. Influence of the heat pre-treatment of mare milk on the "coagulation" time at 32°C and pH 6.5 with different amounts (D, 2D, 4D, 10D –see text) and type of coagulants : pv (bovine rennet : chymosin = 335mg/L, chymosin/pepsin = 0.33), or PV (bovine rennet : chymosin=700 mg/L, chymosin/pepsin ≥ 1.55) or PF (fungal protease of *Rhizomucor miehei*)



## Conclusions

Le lait de jument peut être « flocculé » et non pas « coagulé » par l'ajout de présure de veau dans des temps comparables à ceux observés pour la coagulation du lait de vache, mais après acidification à pH 6,5, à 40°C, avec des doses de présure 2 à 10 fois supérieures et en ajoutant du calcium (0,05g/L au minimum). Toutefois un temps de floculation raisonnable de 20 min peut être obtenu sans ajout de calcium (qui introduit un risque d'amertume) en utilisant uniquement une dose de présure de veau 2 fois supérieure et une température de 40°C. En comparant les résultats obtenus avec les deux types de présures de veau, il semble que la pepsine joue un rôle égal ou supérieur à la chymosine dans la floculation. Le cocktail coagulant pour le lait de chamelle bien qu'efficace à pH natif a été abandonné par la suite car la dose nécessaire pour obtenir des temps de floculation équivalents à ceux obtenus avec la présure de veau sans calcium (3d) entraînait trop d'amertume dans les produits. La protéase fongique n'est pas intéressante. Le traitement thermique et la concentration des protéines par ultrafiltration ne permettent pas d'améliorer l'aptitude à la coagulation ni la cohésion du flocculat obtenu. La mise en œuvre technologique de ce flocculat nécessite une adaptation importante des matériels de fromagerie pour pouvoir être récupéré. A la suite de ces essais, seul l'ajout d'un faible pourcentage de lait de vache (résultats non

montrés) a permis d'obtenir une véritable coagulation et un gel, qui bien que fragile, a permis de fabriquer plus facilement des fromages dont la texture fine a été appréciée.

## **Références bibliographiques**

1. Egito, A.S., Girardet, J.M., Miclo, L., Molle, D., Humbert, G., and Gaillard, J.L., 2001. Susceptibility of equine kappa- and beta-caseins to hydrolysis by chymosin. *International Dairy Journal* 11, 885-893.
2. Kotts, C. and Jenness, R., 1976. Isolation of Kappa-Casein-Like Proteins from Milks of Various Species. *Journal of Dairy Science* 59, 816-822.
3. Huppertz, T., Uniacke, T., Kelly, A.L., and Fox, P.F., 2006. Inhibition of the proteolytic activity of indigenous plasmin or exogenous chymosin and pepsin in bovine milk by blood serum. *International Dairy Journal* 16, 691-696.
4. Fox, P. and Guiney, J., 1973. Casein micelle structure: susceptibility of various casein systems to proteolysis. *Journal of Dairy Research* 40, 229-234.
5. Chang, O.K., Humbert, G., Gaillard, J.L., and Lee, B.O., 2006. Characterization of equine milk and cheese making. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 26, 368-374.