



Protéolyse et texture des fromages à pâte cuite pressée. II. Influence de la chymosine et des conditions de fabrication

A Delacroix-Buchet, S Fournier

► To cite this version:

A Delacroix-Buchet, S Fournier. Protéolyse et texture des fromages à pâte cuite pressée. II. Influence de la chymosine et des conditions de fabrication. *Le Lait*, 1992, 72 (1), pp.53-72. <hal-00929278>

HAL Id: hal-00929278

<https://hal.science/hal-00929278v1>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

Protéolyse et texture des fromages à pâte cuite pressée. II. Influence de la chymosine et des conditions de fabrication

A Delacroix-Buchet ¹*, S Fournier ²

¹ INRA, Station de recherches en technologie et analyses laitières, BP 89;

² Institut technique du Gruyère, zone centre, 39800 Poligny, France

(Reçu le 7 juin 1991; accepté le 25 octobre 1991)

Résumé — Au cours de deux séries d'essais, 52 minifromages ont été fabriqués selon une technologique pâte cuite pressée en faisant varier les paramètres technologiques susceptibles de modifier la quantité de chymosine résiduelle et son activité protéolytique dans le fromage en cours d'affinage : pH au soutirage, température de chauffage en cuve, dose de présure apportée. Deux niveaux de chacun des facteurs ont été étudiés. Un témoin, sans chymosine, coagulé avec *Endothia parasitica*, a été introduit dans l'essai 2. Les minifromages ont été affinés 40 j et 2 cycles de température d'affinage ont été comparés. Les conditions expérimentales montrent l'évolution de la protéolyse en cours d'affinage. La température d'affinage des fromages a un effet majeur sur la dégradation de la caséine α_{s1} . La production de la fraction α_{s1-i} à partir de la caséine α_{s1} est ralentie par une élévation de la température de chauffage du mélange caillé-sérum en cuve de fabrication de 4 °C, phénomène qui ne peut être attribué que de façon mineure à l'activité de la chymosine. L'augmentation du chauffage en cuve de 4 °C génère, par contre, une accélération de la formation des fractions γ à partir de la caséine β liée à l'activation du système plasmin-plasminogène.

fromage / Gruyère / chymosine / paramètre de fabrication / protéolyse

Summary — Proteolysis and texture of Gruyère-type cheese. II. Influence of chymosin and cheese-making conditions. Fifty-two small cheeses were made under experimental scale Gruyère cheese process. The influence of cooking temperature, drawing off pH and rennet quantity were tested in 2 series of experiments on the amount of residual chymosin and its proteolytic activity in cheeses throughout their 40-d ripening period. Cheese ripening temperature had a major effect on α_{s1} -casein breakdown. Production of α_{s1-i} fraction from α_{s1} -casein was retarded when the cooking temperature was raised in the vat from 52 to 56 °C. However, this phenomenon seemed to be only attributable for a minor part to differences in chymosin activity. A 4 °C increase in cooking temperature was also responsible for an acceleration of production of γ -fractions from β -casein due to an increase in plasmin activity.

cheese / Gruyère / chymosin / cheesemaking parameter / proteolysis

* Adresse actuelle : INRA, Station de recherches laitières, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

INTRODUCTION

En fabrication de fromages à pâte cuite pressée, un certain nombre de défauts moyens sont très généralement imputés à des problèmes de texture de pâte : texture trop ferme en Emmental, lainure en Comté. En dehors du rôle déterminant des teneurs en eau et graisse, l'évolution de la structure protéique du fromage au cours de l'affinage est également très importante (Grappin et Berdagué, 1989).

Cette protéolyse est sous la dépendance de différentes enzymes issues du lait, du coagulant ou des levains utilisés. Collin *et al* (1987) ont réalisé une première étude de la protéolyse dans les Gruyères de Comté. Ces auteurs ont montré que la variation de dégradation de la caséine α_{s1} était très liée à la température de la cave d'affinage et que celle de la caséine β était davantage influencée par la fromagerie (composition du lait, nature des ferments lactiques, technologie) et la saison.

Plus spécifiquement, des travaux ont déjà été consacrés au rôle de la plasmine, une enzyme native du lait, dont la teneur varie beaucoup en fonction de la saison et du stade de lactation des animaux (Benslimane *et al*, 1990) notamment dans l'affinage des fromages à pâte cuite pressée (Trossat, 1988). D'autres ont été menés (Desmazeaud *et al*, 1976) ou sont en cours sur les levains.

Si l'on connaît bien l'activité spécifique de la présure sur la caséine κ , activité qui provoque la coagulation du lait et correspond à la première étape de la fabrication d'un fromage, on sait peu de choses en revanche sur le rôle possible de celle-ci dans l'affinage des fromages à pâte cuite pressée.

La présure, qui est un mélange de chymosine et de pepsine bovine dans une proportion d'activité coagulante d'environ

80/20, est le seul agent coagulant utilisé en fabrication de fromages à pâte cuite pressée d'appellation d'origine : Comté et Beaufort.

La présure ajoutée au lait est en grande partie éliminée avec le lactosérum lors de l'égouttage du caillé. Des auteurs ont essayé de quantifier la présure résiduelle dans les caillés : elle serait de l'ordre de 50% en fabrication de Camembert (Vassal et Gripon, 1984) et de 20% en fabrication de Cheddar (Holmes *et al*, 1977). Son activité au cours de l'affinage varie beaucoup d'un type de fromage à l'autre car les conditions de fabrication jouent un grand rôle dans la rétention et l'activité résiduelle de la présure dans le caillé.

Ainsi, plus le pH du lait et du sérum au décaillage est faible, plus la quantité de présure retenue dans le fromage est importante. Le chauffage dénature la présure et après un chauffage du caillé en cuve à 51–55 °C, son activité résiduelle serait nulle ou faible (Matheson, 1981). Dans ces conditions, dans un caillé modèle type pâte cuite pressée, la pepsine serait totalement inactivée et l'activité résiduelle de la chymosine ne dépasserait pas 1,2% de son activité initiale (Garnot et Mollé, 1987). Mais les quantités exactes d'enzymes retenues ne sont pas précisément connues car les méthodes de détection sont encore imprécises. Des essais de dosage immuno-chimique des quantités d'enzymes résiduelles dans le fromage ont été réalisés par Collin *et al* (1988).

Dans les conditions physico-chimiques du fromage (pH, NaCl), la présure est stable et active (Gripon *et al*, 1975; Stadhouders et Hup, 1975). *In vitro*, l'action de la présure sur les caséines n'est pas spécifique mais dans les fromages, elle hydrolyse préférentiellement la caséine α_{s1} en un fragment α_{s1-1} (Mulvihill et Fox, 1979). On constate alors que même présente en très faible quantité, elle joue un rôle impor-

tant dans l'affinage de nombreux fromages : Cheddar, Camembert et Gouda (Green et Foster, 1974; Gripon *et al.*, 1975 Visser et De Groot-Mostert, 1977). La dégradation de la caséine α_{s1} intervient en quelques jours dans le Cheddar (Ledford *et al.*, 1966). On ignore si de très faibles doses de chymosine ne pourraient pas jouer un rôle important dans des fromages à affinage long comme les fromages à pâte cuite pressée.

Des essais ont donc été conduits pour chercher à quantifier le rôle éventuel de la chymosine dans la protéolyse des fromages à pâte cuite pressée. L'influence des conditions de fabrication des fromages a été étudiée.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Protocoles expérimentaux

L'objet de la présente étude étant de mesurer l'influence de paramètres technologiques sur la protéolyse liée à l'activité de la chymosine dans les fromages à pâte cuite pressée, nous avons fabriqué selon cette technologie des minifromages expérimentaux en faisant varier les paramètres technologiques susceptibles, d'après la littérature, de modifier la quantité de chymosine résiduelle et son activité protéolytique dans le fromage en cours d'affinage : pH au soutirage (effet pH) et température de chauffage en cuve (effet température). L'incidence de la dose de présure apportée a également été étudiée (effet dose).

Dans ce but, 2 séries d'essais ont été menées sur 2 semaines consécutives en novembre 1988 à la fromagerie expérimentale de l'INRA de Poligny, représentant au total 32 minifabrications individuelles.

Dans la première série d'essais (1), nous avons comparé indépendamment, mais simultanément, les effets pH, température et dose à un témoin. Deux niveaux de chacun des facteurs ont été étudiés. Le protocole a été répété 5 fois, ce qui a représenté au total 20 fabrications (tableau la).

Dans la deuxième série d'essais (2), nous avons cumulé les effets «réputés» défavorables d'une part, et favorables d'autre part, à la rétention possible de chymosine dans le caillé. Les deux traitements (chymosine mini et maxi) ont été comparés à un témoin, sans chymosine, coagulé avec un extrait fongique (*Endothia parasitica*) détruit dans les conditions de chauffage en cuve des fromages à pâte cuite pressée. Ce protocole a été répété 4 fois et au total, 12 fabrications ont ainsi été réalisées (tableau lb).

Pour chaque série d'essais, les comparaisons entre traitements ont été effectuées le même jour avec le même lait. Les répétitions correspondent à des jours différents de fabrication.

Fabrications

Les fromages ont été fabriqués à partir d'un mélange de laits crus de 12 et 24 h, standardisé en matière grasse à 29,5 g/l. Chaque jour, le lait, était réparti à raison de 11 l par cuve, dans 4 ou 3 minicuves ouvertes Guérin, selon la série expérimentale (essais 1 ou 2).

Le lait était alors réchauffé à 32 °C puis ensémençé respectivement 60 et 20 min avant emprésurage avec 1,5 ‰ d'un mélange de souches de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (mélange STB 01, Ets Boll, Arpajon) cultivé sur lait écrémé et 0,5 ‰ d'un mélange de *Lactobacillus helveticus* (souches CNRZ 32 et CNRZ 303) cultivées sur milieu antiphatage tamponné Phagex (Standa Industrie, Caen). Les laits étaient ensuite coagulés avec une dose de coagulant permettant une prise en 40 min pour le témoin et 20 min pour le traitement «effet dose».

Le coagulant utilisé était soit un extrait de présure liquide Granday (Beaune) à 820 mg de chymosine par litre, soit un extrait fongique d'*Endothia parasitica* (Pfizer France, Orsay). Le moment de la coagulation était déterminé à l'aide du coagulomètre INRA (Bellon *et al.*, 1988). Le chauffage du mélange caillé sérum et son maintien en température était assuré par programmation du cycle thermique du liquide caloporteur circulant dans la double paroi des cuves.

Pour étudier l'effet pH de l'essai 1 et l'effet chymosine maxi de l'essai 2, le pH du sérum au soutirage était abaissé, en début de maturation du lait, de 0,1 unité par addition de glucono-

Tableau I. Schémas expérimentaux. a: essai 1; b: essai 2.

Experimental schemes: a: trial 1; b: trial 2.

Modification technologique	Cuve 1	Cuve 2	Cuve 3	Cuve 4
	Témoin	Effet pH	Effet T°	Effet dose
<i>a : essai 1</i>				
Dose de présure	1 dose	1 dose	1 dose	2 doses
Température de chauffage	52 °C	52 °C	56 °C	52 °C
pH au soutirage	normal	bas (-0,1 unité pH)	normal	normal
	Chymosine mini	<i>Endothia parasitica</i>	Chymosine maxi	
<i>a : essai 2</i>				
Dose de présure	1 dose	1 dose	2 doses	
Température de chauffage	56 °C	56 °C	52 °C	
pH au soutirage	normal	normal	bas (-0,1 unité pH)	

delta-lactone (GDL) à raison de 0,3 g/l de lait (Serpelloni *et al*, 1989).

Les temps technologiques ont été adaptés aux modifications technologiques pour obtenir après 20 h de pressage, des fromages aussi comparables que possible en valeurs de pH et d'extrait sec, c'est-à-dire possédant des valeurs d'activité de l'eau voisines. Ainsi, la réduction du temps de coagulation a été associée à une réduction du temps de durcissement et l'élévation de la température de cuisson du grain en cuve a été compensée par une réduction de son temps de brassage (tableau II).

Après soutirage par gravité à 52 °C du mélange caillé-sérum dans un moule, les fromages ont été pressés 6 h dans une enceinte thermostatée à 42 °C dans laquelle ils ont été maintenus 14 autres heures, sans pressage, jusqu'à leur refroidissement à 30 °C, avant d'être démoulés.

Affinage

Après démoulage, les minifromages obtenus, de forme cylindrique, pèsent environ 900 g, ont un diamètre de 15 cm et une hauteur de 4 cm. Pour permettre des analyses répétées en cours d'affinage, sans modifier le cycle, ni les conditions d'affinage chaque fromage a été découpé en 8 portions égales (fig 1).

Les conditions d'affinage ont été choisies de manière à faire ressortir au mieux l'incidence de l'activité résiduelle de la chymosine éventuellement présente dans la pâte du fromage et à diminuer, voire éviter l'incidence d'autres facteurs de la protéolyse. En particulier, les fromages n'ont pas été salés pour maintenir une activité de l'eau élevée et accroître l'activité protéolytique de la présure très sensible à la teneur en sel (Sanogo *et al*, 1987). Les portions ont été traitées individuellement au démoulage avec un

Tableau II. Diagramme des fabrications expérimentales de gruyères.
Standard manufacturing procedure for experimental gruyère-type cheese.

Opérations	Durée de l'opération ou (temps avant emprésurage)	Température (°C)
Préparation du lait	(la veille)	
Addition des streptocoques	(60 min)	32
Addition des lactobacilles	(20 min)	32
Addition de la présure		32
(temps de prise de base) ^a	40 min	
durcissement ^b	4 min	32
Décaillage	3 min	32
Brassage avec chauffage	35 min	32 → 52 ou 56
Brassage :		
avec maintien à 52 °C ^b	40 min	52
avec maintien à 56 °C ^b	30 min puis 10 min	56 puis 56 → 52
Soutirage		52
Pressage à 150 g/cm ²	6 h	42
Maintien dans la presse	14 h	42 → 30

^a : Valeurs modifiées en fonction des facteurs étudiés. ^b : Valeurs pouvant être modulées pour obtenir des fromages avec des caractéristiques homogènes.

^a Values modified according to factors under study; ^b Values which can be modulated in order to obtain cheeses with homogenous characteristics.

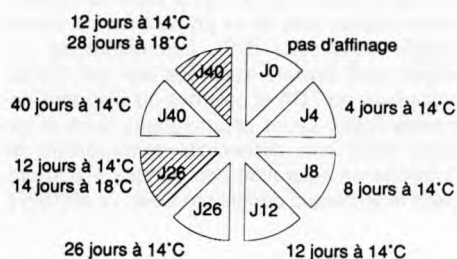


Fig 1. Schéma d'affinage des portions de fromages.

Ripening scheme for cheese portions.

antifongique de surface (pymaricine) pour empêcher le développement d'une morge à leur surface. Elles ont été emballées séparément sous vide dans des sacs, imperméables, à l'eau et aux gaz, en polyéthylène-propylène (Grace Cryovac SA, Épernon) pour éviter leur déshydratation.

Les portions ont été affinées à basse température (14 °C) pour limiter le développement des bactéries lactiques susceptibles de masquer l'action de la chymosine. À titre de comparaison, 2 des 8 portions ont été affinées à 18 °C après 12 jours de préaffinage à 14 °C. La durée totale d'affinage a été de 40 jours.

Méthodes

Analyses des laits et des sérums

Les prélèvements sont effectués soit sur le lait réceptionné, le jour de la fabrication pour les analyses microbiologiques retenues pour caractériser la qualité bactériologique des laits de fabrication, soit sur le lait de cuve avant emprésurage pour les analyses chimiques et le contrôle de l'ensemencement en levain des cuves, ou sur les sérums au moment du soutirage pour connaître les pertes en matière utile de chacune des cuves et contrôler les conditions technologiques.

– Matière grasse : méthode butyrométrique de Gerber (norme NF V-04210).

– Matière protéique totale : méthode colorimétrique au Noir Amido (norme NF V-04216).

– Analyses microbiologiques : numération de la flore totale (Plate Count Agar, 3 jours à 30 °C) sur le lait réceptionné et le lait avant emprésurage, numérations de la flore psychrotrophe (Plate Count Agar, 10 jours à 7 °C) et de la flore

coliforme (Violet Red Bile Agar, 18 à 24 h à 30 °C) sur le lait réceptionné.

Analyses des fromages

Le tableau III précise la nature et la fréquence des analyses réalisées.

– pH : mesure à l'aide d'un pH-mètre à électrode combinée placée au contact d'un broyat de fromage tassé dans un godet.

– Extrait sec : dosage selon la norme FIL 4A (1982).

– Matière grasse : méthode butyrométrique de Heiss (1961).

– Calcium : dosage complexométrique selon la technique de Pearce (1977) adaptée au fromage par Jeunet (communication personnelle)

– Azote total et fractions azotées : dosage par la méthode Kjeldahl de l'azote total (NT), de l'azote soluble dans l'eau (NS) après préparation selon la méthode de Kuchroo et Fox (1982) et de l'azote soluble dans l'acide phosphotungstique (NPT) après préparation selon la technique de Gripon *et al* (1975).

– Fractions caséines : analyse quantitative des principales caséines et de leurs produits de dégradation (α_{s1} , β , $\alpha_{s1-\beta}$, β dégradées, γ_1 , γ_2 , γ_3) après séparation électrophorétique horizontale (cuve Sebia, Issy-les-Moulineaux) des caséines et lecture densitométrique (lecteur Helena France SA, Saint-Leu-la-Forêt) de plaque d'électrophorèse selon la technique d'Uriel (1966), reprise par Collin *et al* (1987) et Buchet (1987). La caséine entière est préparée par dissolution dans 5 ml d'urée 9 mol/l contenant 1% de β -mercaptoéthanol, de 0,3 g du culot de centrifugation obtenu lors de la préparation de l'azote soluble dans l'eau (NS). Les différentes caséines sont ensuite séparées sur gel PAGE, précipitées au TCA et colorées au Bleu de Coomassie R250. Leurs pourcentages dans la caséine totale sont déterminés après lecture de l'intensité de coloration des bandes à 590 nm, selon la technique décrite par Collin *et al* (1987).

Tableau III. Nature et répartition des analyses effectuées sur les portions de fromages en cours d'affinage.

Nature and distribution of tests carried out on cheese portions during cheese ripening.

Stade d'affinage	Portions	Nature des analyses
J0	1	Matière grasse, calcium
J0, J12 et J40	1, 4, 7 et 8	pH, extrait sec, azote total et fractions azotées
J0, J4, J8, J12, J26 et J40	1 à 8	Fractions caséines

Analyses statistiques

Pour chaque variable sont présentés les moyennes et les écarts types calculés aux différents stades d'affinage.

L'influence respective des différents facteurs sur la protéolyse des fromages a été estimée grâce à l'analyse de variance et visualisée par l'analyse factorielle discriminante.

Les analyses statistiques ont été réalisées à partir des logiciels Microstat, élaborés par l'ITCF (Boigneville) (4^e version 1987-1988).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Maîtrise des paramètres de fabrication et des facteurs étudiés

Maîtrise du facteur pH et caractéristiques des fromages à 20 h

Les résultats sont rassemblés dans les tableaux IVa et IVb respectivement pour les séries d'essais 1 et 2.

La baisse volontaire du pH du lait à l'emprésurage de -0,1 unité, par addition de GDL, se retrouve en fin de travail dans les valeurs de pH mesurées sur les sérums au soutirage des cuves (-0,11 unité pH pour le traitement «pH» de l'essai 1 et -0,09 unité pH pour le traitement «chymosine maxi» de l'essai 2 par rapport au pH du traitement témoin de chaque essai).

Les fromages à 20 h ont un extrait sec (ES) voisin de 61,5% de leur poids et un pH de l'ordre de 5,20. Leurs teneurs moyennes en matière grasse dans l'ES (G/S), en indice d'humidité rapportée à l'extrait sec dégraissé (H/ESD) et en calcium dans l'ES sont respectivement de 47,6, 1,20 et 1,60 g/100 g. Toutes ces valeurs sont des valeurs normales pour des fromages à pâte cuite pressée type gruyère.

L'analyse des valeurs d'ES, de G/S et de H/ESD montre une très bonne homogénéité entre les différents traitements d'une même série d'essais. C'était l'objectif pour-

suivi en modifiant les temps technologiques pour corriger les différences d'égouttage des caillés liées soit à des temps de coagulation variant du simple au double, soit à des températures de chauffage en cuve présentant des écarts relatifs importants pour la plage de température considérée.

Une différence significative ($P < 0,05$) apparaît dans l'essai 1, entre la teneur en calcium des fromages issus du traitement pH et celle des autres fromages (-50 mg/100 g de fromage). La différence observée est liée à la différence des pH des sérums au soutirage des fromages. La baisse volontaire du pH du lait est responsable d'une plus forte déminéralisation du caillé. Cette observation n'est pas significative dans l'essai 2 du fait d'une variabilité relativement importante du pH initial du lait entre jours de fabrication. L'apport de GDL dans les cuves n'a cependant pas affecté suffisamment la solubilité du calcium pour pouvoir modifier la stabilité thermique de la chymosine. La fixation des ions calcium en stabilisant la structure moléculaire de l'enzyme (Dahlquist *et al*, 1976) peut en effet éviter sa dénaturation thermique (Garnot et Mollé, 1987).

Variabilité et composition moyenne des fromages au cours des principaux stades d'affinage

Les résultats sont présentés dans le tableau V.

L'extrait sec des portions de fromage est demeuré stable tout au long des 40 jours d'affinage. L'affinage sous film de polyéthylène a donc bien maintenu l'hydratation des fromages qui a varié de moins de 1% du début à la fin de l'affinage.

L'affinage des fromages à 14 °C par rapport à un affinage à 18 °C a considérablement réduit la production d'azote so-

Tableau IV. pH des sérums au soutirage des cuves et caractéristiques physico-chimiques des fromages à 20 h (moyenne \bar{X} , écart type σ et analyse de la variance en fonction des traitements). a : essai 1; b : essai 2.

pH of whey at drawing off and physico-chemical characteristics of cheeses at 20 h (mean \bar{X} , SD σ and variance analysis according to the different treatments). a: trial 1; b: trial 2.

a

Variables	\bar{X} $\pm (s)$	Traitement (essai 1)				Seuil de signification ¹	Test de Newman Keuls
		1: témoin	2: pH	3: température	4: dose		
pH du sérum au soutirage	6,45 (0,01)	6,48 (0,01)	6,37 (0,02)	6,47 (0,01)	6,47 (0,02)	***	143 2
Extrait sec ^a	61,49 (0,32)	61,22 (0,13)	61,79 (0,41)	61,62 (0,16)	61,31 (0,45)	NS	
Gras/sec ^b	47,63 (0,85)	47,76 (1,06)	47,58 (0,88)	47,71 (0,78)	47,46 (0,61)	NS	
Humidité/extrait sec dégraissé	1,20 (0,02)	1,21 (0,02)	1,18 (0,02)	1,19 (0,01)	1,20 (0,03)	NS	
pH	5,18 (0,05)	5,16 (0,06)	5,17 (0,06)	5,20 (0,04)	5,19 (0,05)	NS	
Calcium ^c	1,59 (0,04)	1,60 (0,03)	1,55 (0,01)	1,63 (0,04)	1,60 (0,05)	*	3 14 2

b

Variables	\bar{X} $\pm (s)$	Traitement (essai 2)			Seuil de signification
		1: Chymosine mini	2: Endothia parasitica	3: Chymosine maxi	
pH du sérum au soutirage	6,57 (0,08)	6,58 (0,09)	6,61 (0,08)	6,52 (0,08)	NS
Extrait sec ^a	61,58 (0,50)	61,34 (0,43)	61,76 (0,66)	61,64 (0,35)	NS
Gras/sec ^b	47,59 (1,01)	47,27 (1,03)	47,63 (0,98)	47,86 (1,00)	NS
Humidité/extrait sec dégraissé	1,19 (0,02)	1,20 (0,01)	1,18 (0,02)	1,19 (0,02)	NS
pH	5,24 (0,05)	5,23 (0,03)	5,25 (0,06)	5,24 (0,06)	NS
Calcium ^c	1,61 (0,07)	1,63 (0,09)	1,64 (0,04)	1,56 (0,06)	NS

^a g/100 g de fromage; ^b %; ^c g/100 g d'extrait sec; NS : Non-Significatif; * : $P < 0,05$; *** : $P < 0,001$.

^a g/100 g of cheese; ^b %; ^c g/100 g of dry matter; NS : Non-Significant; * : $P < 0,05$ *** : $P < 0,001$.

Tableau V. Composition physico-chimique moyenne des fromages aux 4 principaux stades d'affinage (moyenne et écart type). a : essai 1; b : essai 2.

Physico-chemical composition (mean and SD) of the cheeses at the 4 main stages of the ripening process. a: trial 1; b: trial 2.

Variables (n = 20)	Stades d'affinage (essai 1)			
	J0	J12	J40 (14 °C)	J40 (18 °C)
<i>a : essai 1</i>				
pH	5,30 (±0,03)	5,46 (±0,05)	5,64 (±0,06)	5,72 (±0,10)
Extrait sec ^a	61,49 (±0,32)	61,31 (±0,34)	61,40 (±0,59)	61,31 (±0,69)
* NS/NT ^b	3,37 (±0,17)	6,40 (±0,32)	13,42 (±0,77)	17,12 (±1,39)
** NPT/NT ^b	0,66 (±0,05)	1,28 (±0,14)	2,96 (±0,31)	4,06 (±0,62)
<i>b : essai 2</i>				
pH	5,30 (±0,02)	5,45 (±0,02)	5,66 (±0,03)	5,76 (±0,05)
Extrait sec ^a	61,58 (±0,50)	61,50 (±0,43)	61,14 (±0,57)	61,21 (±0,70)
* NS/NT ^b	3,37 (±0,14)	6,11 (±0,24)	12,44 (±0,56)	15,75 (±0,99)
** NPT/NT ^b	0,65 (±0,10)	1,26 (±0,16)	2,66 (±0,50)	4,00 (±0,60)

^a g/100 g de fromage; ^b %; * NS : azote soluble dans l'eau; ** NPT : azote soluble dans l'acide phosphotungstique.

^a g/100 g of cheese; ^b %; * NS : water-soluble nitrogen; ** NPT : phosphotungstic acid-soluble nitrogen.

luble à pH 4,6 et surtout d'azote soluble dans l'acide phosphotungstique (respectivement -27% et -53% en moyenne pour l'ensemble des essais).

On sait que l'activité des bactéries lactiques se traduit par une augmentation importante des produits azotés de très faible poids moléculaire, ce que représente l'azote soluble dans l'acide phosphotungstique (Desmazeaud *et al*, 1976; Kleter, 1976; Visser, 1977; O'Keefe *et al*, 1978).

Le choix de la température d'affinage a donc bien limité l'activité des bactéries lactiques, objectif que nous nous étions fixés pour mieux mettre en évidence l'effet possible de nos traitements technologiques sur l'activité résiduelle de la chymosine.

L'affinage des fromages dans l'essai 1 et dans l'essai 2 semble relativement comparable, à l'examen de l'évolution de leurs pH : 5,30 à 5,65 pour un affinage à 14 °C et 5,30 à 5,74 pour un affinage à 18 °C en moyenne, quelle que soit la série d'essais.

Influence des facteurs technologiques sur la protéolyse primaire

La protéolyse primaire correspond à la dégradation des caséines en fractions de haut poids moléculaire dont l'apparition peut être facilement suivie par électrophorèse. Nous nous sommes principalement intéressés aux caséines α_{s1} et β et à l'apparition de leurs produits respectifs de dégradation, les fractions α_{s1} et γ (total des fractions γ_1 , γ_2 et γ_3). Nous avons également observé la vitesse de dégradation de la caséine α_{s2} .

Dégradation de la caséine α_{s1}

La dégradation de la caséine α_{s1} ne semble pas affectée par les traitements étudiés dans l'essai 1 à l'exception du traitement température de chauffage en cuve. En effet, avec le chauffage en cuve à 56 °C, nous observons un ralentissement

de la dégradation de la caséine α_{s1} , significatif à J40 ($P < 0,05$) et perceptible dès J8 (tableau VIa). Bien que peu importante (1 point en moyenne sur la proportion de caséine α_{s1} dans la caséine totale), cette différence montre qu'une élévation de la température de chauffage en cuve de 4 °C ralentit la dégradation de la caséine α_{s1} .

Cette observation est confirmée par la vitesse d'apparition de la fraction α_{s1-I} . À J0, la bande d'électrophorèse correspondant à cette fraction est inexistante. À J4, elle apparaît mais n'est dissociée de celle de la caséine α_{s1} que dans 1/3 environ des cas : elle représenterait alors de l'ordre de 3% de l'ensemble des fractions caséines. À partir de J8, la différence de cinétique d'apparition de la fraction α_{s1-I} entre le traitement température et les autres traitements est très significative ($P < 0,001$) (tableau VIa et fig 2a). L'écart relatif entre les proportions de fraction α_{s1-I} dans la caséine totale mesurées entre le fromage témoin et le fromage fabriqué à 56 °C, tous deux affinés à 14 °C, est un peu plus important à J12 qu'à J40 (respectivement +25% et +19% en moyenne pour les 5 répétitions de l'essai 1).

Les résultats de l'essai 2 montrent une augmentation de la dégradation de la caséine α_{s1} et une accélération de l'apparition de la fraction α_{s1-I} seulement entre les traitements chymosine mini et chymosine maxi ou *Endothia parasitica* et chymosine maxi (tableau VIb et fig 2b). Cette différence est du même ordre que celle mesurée entre le traitement température et le traitement témoin de l'essai 1, ce qui confirme l'absence d'effet des autres paramètres de fabrication étudiés (dose et pH).

Si l'on définit l'action de la chymosine dans les fromages comme l'hydrolyse préférentielle de la caséine α_{s1} pour produire un fragment α_{s1-I} (Mulvihill et Fox, 1979), un chauffage en cuve de 52 °C au lieu

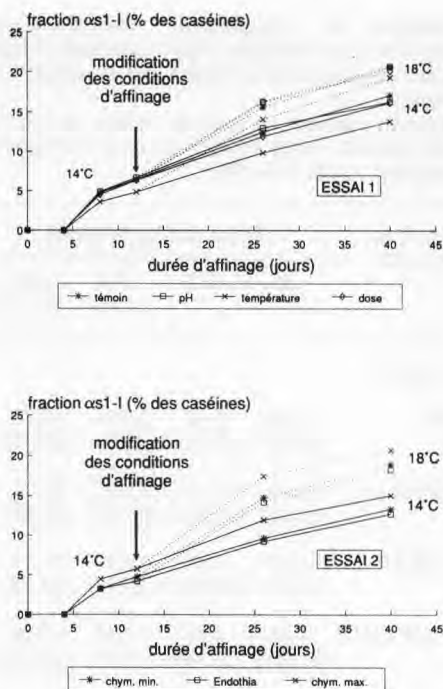


Fig 2. Évolution au cours de l'affinage de la fraction α_{s1-I} exprimée en % des caséines totales.
Evolution during cheese ripening of the α_{s1-I} fraction expressed as percentage of whole casein.

de 56 °C provoquerait une dénaturation moindre de la présure. Cette observation rejoint celle de Garnot et Mollé (1987). Ces auteurs n'ont pas non plus observé de différence dans l'activité résiduelle de la chymosine ajoutée à une dose simple ou double dans des laits chauffés 60 min à 53 °C après emprésurage. Par contre, ils soulignaient l'importance d'une diminution du pH des laits à l'emprésurage de 6,75 à 6,50 sur l'augmentation de stabilité thermique de la chymosine. La variation de pH induite par l'addition de GDL dans nos essais a peut-être été trop faible (-0,1 unité)

Tableau VI. Effet des différents traitements sur l'évolution au cours de l'affinage à 14 °C de la proportion dans la caséine totale de la caséine α_{s1} et de la fraction α_{s1-I} (moyenne, écart type et analyse de la variance). a: essai 1; b: essai 2.

Effects of the different treatments on the evolution of the proportion in whole casein of α_{s1} -casein and α_{s1-I} fraction during cheese ripening at 14 °C (mean, SD and variance analysis). a: trial 1; b: trial 2.

Variables		J0	J4	Stades d'affinage (essai 1)			
				J8	J12	J26	J40
<i>a : essai 1</i>							
Caséine α_{s1} ^a	\bar{X}	36,74	38,52	33,41	35,00	27,62	21,61
	s	($\pm 2,39$)	($\pm 2,50$)	($\pm 3,29$)	($\pm 2,74$)	($\pm 1,62$)	($\pm 1,07$)
	S	NS	NS	NS	NS	NS	*
	C						3 <u>421</u>
Fraction α_{s1-I} ^a	\bar{X}	/	/	4,44	6,06	11,86	15,95
	s	/	/	($\pm 0,39$)	($\pm 0,56$)	($\pm 0,82$)	($\pm 0,89$)
	S	/	/	***	***	***	***
	C			<u>214</u> 3	<u>214</u> 3	<u>214</u> 3	<u>124</u> 3
<i>b: essai 2</i>							
Caséine α_{s1} ^a	\bar{X}	37,03	39,00	35,03	36,46	28,36	24,56
	s	2,38	1,76	2,21	1,71	2,54	0,77
	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	C						
Fraction α_{s1-I} ^a	\bar{X}	/	/	3,25	4,76	9,63	13,34
	s	/	/	0,53	0,42	0,23	0,45
	S	/	/	*	***	***	***
	C	/	/	3 <u>12</u>	3 <u>12</u>	3 <u>12</u>	3 <u>12</u>

^a % de la caséine totale; \bar{X} : moyenne, $n = 20$ (essai 1), $n = 12$ (essai 2); s : écart type; S : seuil de signification, NS : non significatif; * : $P < 0,05$, *** : $P < 0,001$; C : classement après le test de Newman Keuls du plus grand au plus petit, 1 à 4 : n° des traitements de l'essai 1, 1 à 3 : n° des traitements de l'essai 2.

^a % of whole casein; \bar{X} : mean, $n = 20$ (trial 1), $n = 12$ (trial 2); s : standard deviation; S : Significance level; NS : Non Significant; * : $P < 0,05$, *** : $P < 0,001$; C : classification according to Newman-Keuls test from the largest to the smallest, 1 to 4 : treatment number in trial 1, 1 to 3 : treatment number in trial 2.

pour provoquer une modification perceptible de l'activité de la chymosine dans la mesure où, par ailleurs les pH à l'emprésurage n'étaient pas tout à fait identiques d'un jour à l'autre des fabrications ($6,73 \pm 0,05$).

Les résultats obtenus dans l'essai 2, entre les traitements chymosine mini et *Endothia parasitica*, sont similaires. Dans les conditions de fabrication des pâtes pressées cuites, la protéase d'*Endothia pa-*

rasitica est totalement inactivée (Larson et Whitaker, 1970). D'autre part, cette enzyme ne dégrade pratiquement pas la caséine α_{s1} , contrairement à la chymosine et à l'enzyme de *Mucor miehei* (Christensen *et al*, 1989). Ces résultats laissent donc penser que dans les fromages issus du traitement chymosine mini, l'activité de la chymosine serait quasiment nulle.

Nos résultats confirment en grande partie et dans des conditions réelles de fabrication les résultats de Garnot et Mollé (1987). En particulier, ils montrent que si la quantité de chymosine retenue dans un caillé type fromages à pâte cuite pressée est très faible, l'activité résiduelle de cette enzyme dépend fortement de la température de chauffage en cuve. Comme eux, nous constatons qu'une température supérieure à 55 °C provoque l'inactivation de cette enzyme, phénomène qui correspondrait à un changement de configuration de la molécule.

Dans ces conditions, si la seule activité chymosine présente dans les fromages à pâte cuite pressée résulte d'un chauffage modéré (52 °C) du mélange caillé-sérum en cuve, on peut se poser la question de l'agent responsable de la dégradation principale de la caséine α_{s1} . En effet, si l'on exprime la quantité de caséine α_{s1} en % de l'ES des fromages, nous constatons que pour un affinage de 40 jours à 14 °C, la caséine α_{s1} est dégradée à 63,8% (elle passe de 16,0 g à 5,8 g/100 g ES) après un chauffage à 52 °C et seulement un peu moins, 60% (elle passe de 16,2 à 6,5 g/100 g ES) après un chauffage du lait en cuve de 56 °C.

De nombreux agents protéolytiques peuvent être mis en cause. Kaminogawa *et al* (1980) ont montré qu'une enzyme naturelle du lait, la protéase acide est également capable de dégrader la caséine α_{s1} et de former des fragments α_{s1-1} . Cette en-

zyme présente une bonne stabilité thermique et est donc capable de résister à l'étape de chauffage du caillé. Son pH optimal d'activité est cependant faible. La plasmin (protéase alcaline du lait) est, quant à elle, très active dans les caillés type pâte cuite pressée (Farkye et Fox, 1990), mais elle hydrolyse lentement la caséine α_{s1} pour produire des fractions de mobilité électrophorétique identique à celle des fractions caséines λ (Grufferty et Fox, 1988). Si les streptocoques thermophiles sont peu protéolytiques et ne semblent pas hydrolyser la caséine α_{s1} (Desmazeaud et Juge, 1976), les lactobacilles thermophiles hydrolysent partiellement les caséines α_s et β (El Soda et Desmazeaud, 1982; Zevaco et Gripon, 1988). Des enzymes de la flore de contamination des laits pourraient également participer à la dégradation de la caséine α_{s1} .

En travaillant sur des caillés modèles aseptiques type Gouda, Visser et De Groot-Mostert (1977) ont montré que l'activité des levains mésophiles ne s'exerce sur la caséine α_{s1} qu'après une période de latence de 1 mois. Après 2 mois d'affinage, l'hydrolyse de la caséine α_{s1} par ces levains est à peine de l'ordre de 10% et après 6 mois, elle atteint 40 à 50% de la caséine α_{s1} initiale.

Dans nos fromages, l'hydrolyse de la caséine α_{s1} est précoce et rapide. Elle est déjà décelable au stade J4 par l'apparition de la fraction α_{s1-1} et elle est très importante au stade J40 (pratiquement les 2/3 de la caséine α_{s1} hydrolysés).

Dans ces conditions, on peut admettre que dans les fromages à pâte cuite pressée, la dégradation de la caséine α_{s1} est probablement liée en début d'affinage à l'activité d'un système enzymatique présent dans les caillés frais. Les lactobacilles thermophiles utilisés en fabrication de pâtes cuites pressées sont plus protéolyti-

ques que les bactéries mésophiles utilisées en fabrication de Gouda. On peut donc penser que la dégradation de la caséine α_{s1} est plus rapide avec ceux-ci. D'autre part, l'activité des lactobacilles thermophiles diminue après un chauffage à 56 °C (Castaneda *et al*, 1990). À partir de ces constatations, on peut imaginer que les lactobacilles sont les principaux responsables de la dégradation de la caséine α_{s1} dans nos fromages.

Dégradation des autres caséines

La caséine β représente 1/3 de la caséine totale au stade J0. Son évolution au cours de l'affinage à 14 °C pendant 40 jours est plus modérée que celle de la caséine α_{s1} : elle passe en moyenne pour les 2 séries d'essais de 14,7 à 10,2 g/100 g ES, ce qui représente une hydrolyse de 30% environ.

Aucun des traitements technologiques étudié n'a d'effet significatif sur la vitesse de dégradation de la caséine β (tableau VII), bien qu'on note une légère tendance à l'augmentation de l'hydrolyse de cette caséine après un chauffage en cuve de 56 °C par rapport à un chauffage à 52 °C. Cette tendance est confirmée par une apparition un peu plus rapide des fractions γ dans les fromages fabriqués à 56 °C (essais 1 et 2). La différence est significative ($P < 0,05$) à partir de J26 (tableau VII et fig 3), mais faible puisqu'elle correspond en valeur absolue à environ 1,5 point d'écart de la proportion du total des fractions γ dans l'ensemble des fractions caséines, soit un écart de 10% en valeur relative.

Parmi les fractions γ , la fraction γ_1 , ne semble pas affectée. Comme elle correspond au fragment le plus long; on peut penser qu'elle ne constitue qu'une étape de l'hydrolyse de la caséine β . Collin *et al*

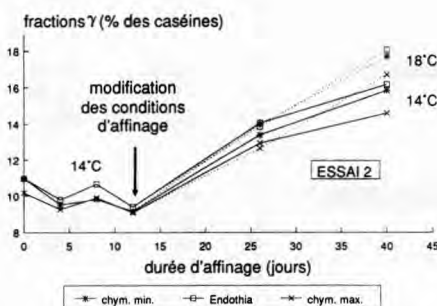
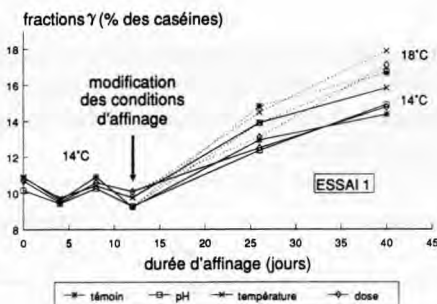


Fig 3. Évolution au cours de l'affinage des fractions γ exprimée en % des caséines totales. Evolution during cheese ripening of the γ_{s1} fraction expressed as percentage of whole casein.

(1987) avaient déjà fait observer une différence de cinétique dans la production de la caséine γ_1 par rapport aux fractions γ_2 et γ_3 au cours de l'affinage du gruyère de Comté.

On sait que les fractions γ sont les produits spécifiques de la dégradation de la caséine β par la plasmine. Cette enzyme naturelle du lait est thermostable (Kaminogawa *et al*, 1972) et son activité est accrue après thermisation ou mieux, après pasteurisation du lait (Noomen, 1975; Richard-

Tableau VII. Effet des différents traitements sur l'évolution au cours de l'affinage à 14 °C de la proportion type et analyse de la variance). a: essai 1; b: essai 2.

Effects of the different treatments on the evolution of proportions in whole casein of α_{s2} , β -caseins a: trial 1, b: trial 2.

Variables		Stades d'affinage (essai 1)					
		J0	J4	J8	J12	J26	J40
Caséine α_{s2} ^a	\bar{X}	6,85	5,90	5,55	4,71	3,16	2,09
	s	0,72	0,60	0,40	0,71	0,39	0,31
	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	C						
Caséine β ^a	\bar{X}	32,90	31,44	29,84	30,04	27,52	25,01
	s	1,18	0,85	1,46	1,17	0,69	0,86
	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	C						
Fraction β -dég ^a	\bar{X}	4,02	3,88	4,05	3,44	4,23	5,09
	s	0,72	0,53	0,75	0,51	0,55	0,42
	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	C						
Fraction γ_1 ^a	\bar{X}	2,86	2,67	3,16	3,07	4,59	5,28
	s	0,47	0,25	0,40	0,39	0,34	0,38
	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	C						
Fraction γ_2 ^a	\bar{X}	4,55	3,99	4,21	3,53	4,41	5,00
	s	0,53	0,61	0,59	0,39	0,33	0,38
	S	NS	NS	NS	NS	*	*
	C					<u>31 24</u>	<u>3 24 1</u>
Fraction γ_3 ^a	\bar{X}	3,24	2,88	3,17	2,98	3,93	4,69
	s	0,44	0,33	0,42	0,33	0,16	0,19
	S	NS	NS	NS	NS	**	NS
	C					<u>3 142</u>	
Total des fractions γ ^a	\bar{X}	10,65	9,55	10,54	9,57	12,93	14,97
	s	1,41	1,11	1,37	1,08	0,75	0,74
	S	NS	NS	NS	NS	*	*
	C					<u>3 142</u>	<u>3 24 1</u>

^a % de la caséine totale; \bar{X} : moyenne, $n = 20$ (essai 1), $n = 12$ (essai 2); s : écart type; S : seuil de signification, plus petit, 1 à 4 : n° des traitements de l'essai 1, 1 à 3 : n° des traitements de l'essai 2.

Non Significant; * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$; C : classification according to Newman-Keuls test from the largest to

tion dans la caséine totale des caséines α_{s2} , β et des fractions β dégradées, γ_1 , γ_2 et γ_3 (moyenne, and degraded β , γ_1 , γ_2 and γ_3 fractions during ripening at 14 °C (mean, SD and variance analysis).

Variables		J0	J4	Stades d'affinage (essai 1)			
				J8	J12	J26	J40
Caséine α_{s2} ^a	\bar{X}	6,18	5,96	5,33	4,53	3,08	1,93
	s	0,29	0,32	0,43	0,36	0,43	0,23
	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	C						
Caséine β ^a	\bar{X}	32,22	31,73	21,27	31,37	28,07	25,58
	s	0,82	0,77	0,93	2,17	1,02	0,59
	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	C						
Fraction β -dég ^a	\bar{X}	4,57	3,60	3,86	3,43	4,51	4,80
	s	0,48	0,24	0,50	0,29	0,61	0,49
	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	C						
Fraction γ_1 ^a	\bar{X}	2,83	2,64	3,01	2,84	4,63	5,41
	s	0,16	0,22	0,30	0,29	0,23	0,20
	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	C						
Fraction γ_2 ^a	\bar{X}	4,75	4,04	40,2	3,48	4,76	5,29
	s	0,34	0,43	0,52	0,34	0,42	0,28
	S	NS	NS	NS	NS	*	*
	C					<u>2 1 3</u>	<u>21 3</u>
Fraction γ_3 ^a	\bar{X}	3,12	2,84	3,08	2,88	4,08	4,84
	s	0,17	0,12	0,30	0,31	0,26	0,17
	S	NS	NS	NS	NS	*	*
	C	/	/			<u>21 3</u>	<u>21 3</u>
Total des fractions γ ^a	\bar{X}	10,70	9,52	10,12	9,20	13,47	15,54
	s	0,64	0,74	1,07	0,90	0,85	0,51
	S	NS	NS	NS	NS	NS	**
	C					<u>21 3</u>	<u>21 3</u>

NS : non significatif; * : $P < 0,05$, ** : $P < 0,01$; C : classement après le test de Newman Keuls du plus grand au ^a % of whole casein; \bar{X} : mean, $n = 20$ (trial 1), $n = 12$ (trial 2); s : standard deviation; S : Significance level; NS : the smallest, 1 to 4 : treatment number in trial 1, 1 to 3 : treatment number in trial 2.

son, 1983). Il semble donc que l'activation du système enzymatique «plasmine» soit déjà effective pour un écart de chauffage du lait de 4 °C.

Nous n'avons cependant pas observé de différence, quels que soient les traitements, dans la cinétique d'hydrolyse de la caséine α_{s2} (tableau VII), quoique cette caséine soit le substrat privilégié de la plasminase (Le Bars et Gripon, 1989; Visser *et al*, 1989) et disparaisse très rapidement au cours de l'affinage des fromages à pâte cuite pressée. Nous constatons effectivement que pour l'ensemble des essais, elle disparaît à 72% pour un affinage constant à 14 °C pendant 40 jours et à 78% pour un affinage à 14 °C, 12 jours, puis 18 °C, 28 jours. Sa valeur exprimée en % de l'ES du fromage évolue alors respectivement de 2,90 à 0,80 et 0,65 g/100 g ES.

Influence de la température d'affinage

La température d'affinage a une influence très hautement significative ($P < 0,001$) sur l'évolution des principales caséines (tableau VIIIa et b). Les écarts sont du même ordre en fin d'affinage (stade J40) pour une même fraction caséine dans l'essai 1 et l'essai 2. L'effet de l'augmentation de température d'affinage de 4 °C se manifeste dès le stade J26, c'est-à-dire après 2 semaines de changement de la température d'affinage de 14 à 18 °C. Il se traduit surtout par une accélération de la dégradation de la caséine α_{s1} et de l'apparition de la fraction α_{s1-I} . En exprimant les teneurs en caséine α_{s1} des fromages en g/100 g ES, au stade J40, nous constatons que 4 semaines d'affinage à une température supérieure de 4 °C ont entraîné un ac-

croissement de l'hydrolyse de cette caséine de 30% dans l'essai 1 comme dans l'essai 2 (tableau IX). Collin *et al* (1987) avaient déjà montré que la température d'affinage jouait un rôle primordial dans la dégradation de la caséine α_{s1} en cours de l'affinage du gruyère de Comté.

CONCLUSION

Les conditions expérimentales de cette étude montrent l'évolution de la protéolyse au cours de l'affinage d'un mini fromage de type pâte cuite pressée.

Elles mettent en évidence que si la température d'affinage des fromages a un effet majeur sur la dégradation de la caséine α_{s1} , la production de fraction α_{s1-I} à partir de la caséine α_{s1} est également sensible à la température de chauffage du mélange caillé-sérum en cuve de fabrication : une élévation de 4 °C en cuve ralentit la dégradation de la caséine α_{s1} .

Les divers traitements appliqués lors de la fabrication conduisent à n'accorder à la chymosine qu'un rôle mineur dans cette dégradation de la caséine α_{s1} , même dans les conditions de fabrication estimées favorables pour cette enzyme. Ceci confirme l'idée émise par Garnot (1985) selon laquelle «on ne peut pas exclure l'hypothèse d'une activité résiduelle de la chymosine après chauffage du caillé à 53 °C à pH 6,5». Il conviendrait toutefois de définir l'origine de la dégradation de la fraction α_{s1} en fraction α_{s1-I} .

Cette étude montre aussi qu'une augmentation du chauffage en cuve de 4 °C génère également une différence de cinétique de dégradation de la caséine β : celle-

Tableau VIII. Influence de la température d'affinage sur l'évolution des proportions dans la caséine totale des principales fractions caséines (α_{s1} , α_{s1-l} , α_{s2} , β et γ) (moyenne, écart type et analyse de la variance). a: essai 1; b: essai 2.

Influence of ripening temperature on the evolution of proportion in whole casein of main casein fractions (α_{s1} , α_{s1-l} , α_{s2} , β and γ) (mean, SD and variance analysis). a: trial 1; b: trial 2.

Stades d'affinage (essai 1)						
Variables	26 jours		S	40 jours		S
	Températures d'affinage 14 °C	18 °C		Températures d'affinage 14 °C	18 °C	
a : essai 1						
Caséine α_{s1} ^a	27,62 ($\pm 1,48$)	22,70 ($\pm 0,86$)	***	21,61 ($\pm 0,98$)	15,39 ($\pm 1,23$)	***
Fraction α_{s1-l} ^a	11,86 ($\pm 0,75$)	15,59 ($\pm 0,89$)	***	15,95 ($\pm 0,82$)	20,22 ($\pm 0,97$)	***
Caséine α_{s2} ^a	3,16 ($\pm 0,36$)	2,71 ($\pm 0,34$)	***	2,09 ($\pm 0,29$)	1,66 ($\pm 0,16$)	***
Caséine β ^a	27,52 ($\pm 0,64$)	26,79 ($\pm 1,18$)	NS	25,01 ($\pm 0,79$)	23,62 ($\pm 1,06$)	***
Total des fractions γ ^a	12,93 ($\pm 0,69$)	14,08 ($\pm 0,93$)	***	14,97 ($\pm 0,68$)	17,10 ($\pm 1,14$)	***
b : essai 2						
Caséine α_{s1} ^a	27,10 ($\pm 1,81$)	24,38 ($\pm 0,98$)	***	24,20 ($\pm 0,89$)	17,35 ($\pm 0,56$)	***
Fraction α_{s1-l} ^a	10,27 ($\pm 0,55$)	15,45 ($\pm 1,05$)	***	13,70 ($\pm 0,47$)	19,28 ($\pm 0,90$)	***
Caséine α_{s2} ^a	3,08 ($\pm 0,38$)	2,73 ($\pm 0,44$)	NS	1,93 ($\pm 0,21$)	1,62 ($\pm 0,19$)	**
Caséine β ^a	28,07 ($\pm 0,93$)	26,42 ($\pm 0,75$)	***	25,58 ($\pm 0,53$)	23,60 ($\pm 0,92$)	***
Total des fractions γ ^a	13,47 ($\pm 0,77$)	13,50 ($\pm 0,81$)	NS	15,54 ($\pm 0,46$)	17,48 ($\pm 0,63$)	***

^a % de la caséine totale; S : seuil de signification, NS : non significatif; ** : $P < 0,01$; *** : $P < 0,001$.

^a % of whole casein; S : Significance level; NS : Non Significant; * : $P < 0,01$; *** : $P < 0,001$.

Tableau IX. Influence de la température d'affinage sur la teneur en fractions caséines (en g/100 g d'extrait sec) au stade J40 (essais 1 et 2).

Influence of the ripening temperature on the amount of casein fractions (expressed in g/100 g of dry matter) after 40 days ripening (trials 1 and 2).

Variables	Essai 1			Essai 2		
	Températures d'affinage		S	Température d'affinage		S
	14 °C	18 °C		14 °C	18 °C	
Caséine α_{s1} ^a	8,70 ($\pm 0,41$)	6,00 ($\pm 0,55$)	***	9,76 ($\pm 0,42$)	6,81 ($\pm 0,35$)	***
Fraction α_{s1-I} ^a	6,42 ($\pm 0,32$)	7,88 ($\pm 0,40$)	***	5,53 ($\pm 0,22$)	7,56 ($\pm 0,46$)	***
Caséine α_{s2} ^a	0,84 ($\pm 0,12$)	0,65 ($\pm 0,06$)	***	0,78 ($\pm 0,09$)	0,64 ($\pm 0,08$)	**
Caséine β ^a	10,07 ($\pm 0,35$)	9,21 ($\pm 0,50$)	***	10,32 ($\pm 0,30$)	9,25 ($\pm 0,53$)	***
Total des fractions γ ^a	6,03 ($\pm 0,30$)	6,66 ($\pm 0,38$)	***	3,71 ($\pm 0,33$)	6,09 ($\pm 0,26$)	***

^a % de la caséine totale; S : seuil de signification, NS : non significatif; ** : $P < 0,01$; *** : $P < 0,001$.

^a % of whole casein; S : Significance level; NS : Non Significant; *** : $P < 0,01$; *** : $P < 0,001$.

ci est accentuée avec formation plus rapide des fractions γ , action liée à l'activation de la plasmine ou du plasminogène.

Une analyse factorielle discriminante réalisée à partir des données expérimentales de l'essai 1 résume parfaitement ces résultats (fig 4). Deux variables, la proportion de fraction α_{s1-I} et celle de fraction γ_3 dans la caséine totale, discriminent bien suivant l'axe 2, les fromages affinés à 18 °C des fromages affinés à 14 °C, et suivant l'axe 1, les fromages fabriqués à 56 °C (traitement 3) des fromages fabriqués à 52 °C (traitements 1, 2 et 4). L'effet négatif du traitement technologique 3 sur

la production du fragment α_{s1-I} persiste du stade J26 au stade J40, bien que l'effet positif de l'affinage à 18 °C sur l'hydrolyse de la caséine α_{s1} augmente d'un stade d'affinage à l'autre.

REMERCIEMENTS

Ce programme a reçu une aide financière de la région Franche-Comté (contrat 3202 A). Nous remercions également G Duboz de l'INRA Poligny pour sa contribution technique à la réalisation des fabrications fromagères et C André de l'ITG, zone sud, pour la dactylographie du présent article.

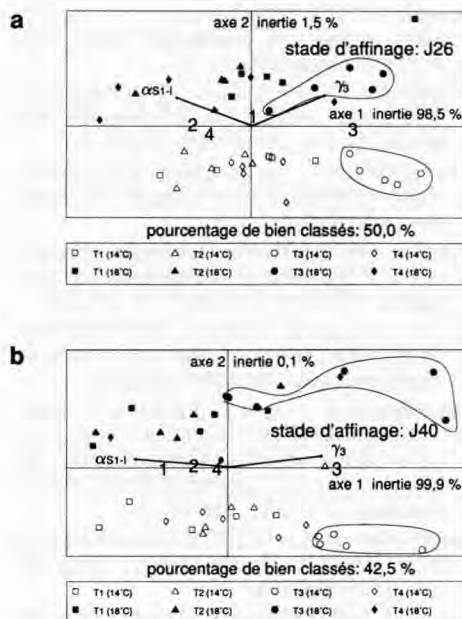


Fig 4. Analyse factorielle discriminante aux stades J26 (a) et J40 (b) des fromages fabriqués suivant 4 technologies et affinés à 2 cycles différents de température à partir de 2 variables : les fractions α_{S1-I} et γ_3 exprimées en % des caséines totales.

Discriminant analysis after 26 and 40 days ripening of cheeses made according to 4 different processes and ripened according to 2 different temperature cycles with 2 variables : α_{S1-I} and γ_3 fractions expressed as percentage of whole casein.

RÉFÉRENCES

- Bellon JL, Quiblier JP, Durier C, Noël Y (1988) Un nouveau capteur industriel de mesure du temps de coagulation du lait. *Tech Lait Mar- ket* 1033, 29-32
- Benslimane S, Dognin-Bergeret MJ, Berdagué JL, Gaudemer Y (1990) Variation with season and lactation of plasmin and plasminogen concentrations in Montbéliard cows' milk. *J Dairy Res* 57, 423-435
- Buchet C (1987) Essai de quantification des caséines des fromages à pâte cuite pressée sé- parées par électrophorèse sur gel PAGE. Etude ITG, non publiée, 20 p
- Castaneda R, Vassal L, Gripon JC, Rousseau M (1990) Accelerated ripening of a Saint-Paulin cheese variant by addition of heat-shocked *Lactobacillus* suspensions. *Neth Milk Dairy J* 44, 49-62
- Christensen TMIE, Christiansen KR, Madsen JS (1989) Proteolysis in cheese investigated by high performance liquid chromatography. *J Dairy Res* 56, 823-828
- Collin JC, Berdagué JL, Dognin-Bergeret M, Grappin R (1987) Affinage et qualité du gruyère de Comté. IV. Étude de la protéolyse. *Lait* 67, 299-318
- Collin JC, Compagnone P, Ryba I, Baer A (1988) Determination of plasmin (alkaline milk proteinase) and chymosin in milk products by the ELISA assay. *Lait* 68, 235-239
- Dahlquist FW, Long JW, Bigbee WL (1976) Role of calcium in the thermal stability of thermolysin. *Biochemistry* 15, 1103-1111
- Desmazeaud MJ, Juge M (1976) Caractérisation de l'activité protéolytique et fractionnement des dipeptidases et des aminopeptidases de *Streptococcus thermophilus*. *Lait* 56, 241-260
- Desmazeaud MJ, Gripon JC, Lebars D, Bergère JL (1976) Étude du rôle des microorganismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. III. Influence des microorganismes. *Lait* 56, 379-396
- El Soda M, Desmazeaud MJ (1982) Les peptides hydrolases des lactobacilles du groupe thermobacterium. I. Mise en évidence de ces activités chez *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. bulgaricus*. *Can J Microbiol* 28, 1181-1188
- Farkye NY, Fox PF (1990) Observations on plasmin activity in cheese. *J Dairy Res* 57, 413-418
- FIL (1982) Fromages et fromages fondus. Détermination de l'extrait sec total, méthode de référence, norme 4A
- Garnot P (1985) Heat-stability of milk-clotting enzymes. Technological consequences. *Bull Fed Int Lait* 194, 2-7
- Garnot P, Mollé D (1987) Heat stability of milk clotting enzymes in conditions encountered in Swiss cheese making. *J Food Sci* 52, 75-77
- Grappin R, Berdagué JL (1989) Affinage et qualité du gruyère de Comté. VIII. Synthèse et conclusions. *Lait* 69, 183-196

- Green ML, Foster PMD (1974) Comparison of the rates of proteolysis during ripening of Cheddar cheeses made with calf rennet and swine pepsin coagulants. *J Dairy Res* 41, 269-282
- Gripon JC, Desmazeaud MJ, Lebars D, Bergère JL (1975) Étude du rôle des microorganismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II. Influence de la présure commerciale. *Lait* 55, 502-513
- Grufferty MB, Fox PF (1988) Milk alkaline protease. *J Dairy Res* 55, 609-630
- Heiss E (1961) Essai de dosage de la matière grasse dans le fromage par des méthodes rapides. *Dtsch Molk Ztg* 82, 67-70
- Holmes DG, Duerch JW, Ernstrom CA (1977) Distribution of milk clotting enzymes between curd on whey and their survival during Cheddar cheese making. *J Dairy Sci* 60, 862-869
- Kaminogawa S, Mizobuchi H, Yamauchi K (1972) Comparison of bovine milk protease with plasmin. *Agric Biol Chem* 36, 2163-2167
- Kaminogawa S, Yamauchi K, Miyazama S, Koga Y (1980) Degradation of casein components by acid protease of bovine milk. *J Dairy Sci* 63, 701-704
- Kleter G (1976) The ripening of Gouda cheese made under strict aseptic conditions. 1. Cheese with no other bacterial enzymes than those from a starter *Streptococcus*. *Neth Milk Dairy J* 30, 254-270
- Kuchroo CN, Fox PF (1982) Soluble nitrogen in Cheddar cheese. *Milchwissenschaft* 37, 331-335
- Larson MK, Whitaker JR (1970) *Endothia parasitica* protease. Parameter affecting stability of the rennin like enzyme. *J Dairy Sci* 53, 262-269
- Le Bars D, Gripon JC (1989) Specificity of plasmin towards bovine α_{s2} -casein. *J Dairy Res* 56, 817-821
- Ledford RA, O'Sullivan AC, Nath KR (1966) Residual casein fractions in ripened cheese determined by polyacrylamide-gel electrophoresis. *J Dairy Sci* 49, 1098-1101
- Matheson AR (1981) The immunochemical determination of chymosin activity in cheese. *NZJ Dairy Sci Technol* 15, 33-41
- Mulvihill DM, Fox PF (1979) Proteolytic specificity of chymosin on bovine α_{s1} -casein. *J Dairy Res* 46, 641-651
- Noomen A (1975) Proteolytic activity of milk protease in raw and pasteurized cow's milk. *Neth Milk Dairy J* 29, 153-161
- O'Keefe AM, Fox PF, Daly G (1978) Proteolysis in Cheddar cheese: role of coagulant and starter bacteria. *J Dairy Res* 45, 405-477
- Pearce KN (1977) The complexometric determination of calcium in dairy products. *NZJ Dairy Sci Technol* 12, 113-115
- Richardson BC (1983) The proteinases of bovine milk and the effect of pasteurisation on their activity. *NZJ Dairy Sci Technol* 18, 233-245
- Sanogo T, Paquet D, Linden G (1987) Protéolyse de la caséine bovine en milieu salin : étude de quatre protéases. *Sci Alim* 7, 385-398
- Serpelloni M, Dusautois C, Boudier JF, Lablée J, Mietton B (1989) Intérêt de la gluconolactone dans la standardisation des laits de fromagerie : optimisation du pH d'emprésurage. *Rev ENIL* 133, 26-33
- Stadhouders J, Hup G (1975) Factors affecting bitter flavour in Gouda cheese. *Neth Milk Dairy J* 29, 335-353
- Trossat P (1988) Étude du rôle de la plasmine sur la protéolyse et la texture des fromages à pâte pressée cuite. Rapport DEA, univ Besançon, 25 p
- Uriel J (1966) Méthode d'électrophorèse dans des gels d'acrylamide-agarose. *Bull Soc Chim Biol* 48, 969-982
- Vassal L, Gripon JC (1984) L'amertume des fromages à pâte molle de type camembert : rôle de la présure et de *Penicillium caseicolum*, moyens de la contrôler. *Lait* 64, 397-417
- Visser FMW (1977) Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 3. Protein breakdown: analysis of the soluble nitrogen and amino acid fractions. *Neth Milk Dairy J* 31, 210-239
- Visser FMW, De Groot-Mostert AEA (1977) Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 4. Protein breakdown: a gel electrophoretic study. *Neth Milk Dairy J* 31, 247-264
- Visser FMW, Slangen KJ, Alting AC, Vreeman H (1989) Specificity of bovine plasmin in its action on bovine α_{s2} -casein. *Milchwissenschaft* 44, 335-339
- Zevaco C, Gripon JC (1988) Properties and specificity of a cell-wall proteinase from *Lactobacillus helveticus*. *Lait* 68, 393-408