



HAL
open science

**Réduire le potentiel acidifiant des fromages pour
améliorer leurs fonctionnalités nutritionnelles :
identification des leviers biochimiques et perspectives
technologiques**

Ecaterina Gore

► **To cite this version:**

Ecaterina Gore. Réduire le potentiel acidifiant des fromages pour améliorer leurs fonctionnalités nutritionnelles : identification des leviers biochimiques et perspectives technologiques. Ingénierie des aliments. Université Blaise Pascal (Clermont Ferrand 2), 2016. Français. NNT : . tel-02331414

HAL Id: tel-02331414

<https://hal.science/tel-02331414>

Submitted on 24 Oct 2019

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.

***ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE,
SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT***

N° d'ordre : 695

THÈSE

CONFIDENTIELLE
jusqu'au 5 janvier
2018

Présentée à l'Université Blaise Pascal
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

Spécialité : Nutrition et Sciences des aliments

Ecaterina GORE

**Réduire le potentiel acidifiant des fromages pour améliorer leurs
fonctionnalités nutritionnelles**

Identification des leviers biochimiques et perspectives technologiques

Soutenue le 5 juillet 2016 devant le jury :

Philippe Michaud	PR, Université Blaise Pascal, Institut Pascal, Clermont	Président
Thomas Croguennec	PR, AgroCampus Ouest, INRA, STLO, Rennes	Rapporteur
François Boué	DR, AgroParisTech, INRA, GMPA, Grignon	Rapporteur
Agnès Nancy	IR, INRA, URA, Nouzilly	Examinatrice
Véronique Coxam	DR, INRA, UMH, Theix	Membre invité
Annick Lebecque	PR, VetAgro Sup, Calityss, Clermont	Directrice de thèse
Julie Mardon	MCF, VetAgro Sup, Calityss, Clermont	Co-encadrante de thèse

**Unité de Recherche CALITYSS
VetAgro Sup - Campus agronomique de Clermont**

REMERCIEMENTS

L'aboutissement de cette thèse est le résultat d'un long parcours rempli de défis, de réflexions, de remises en question, de prises de décision et de réalisations. Je souhaite prendre le temps ici pour adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leurs conseils, leur soutien et leur amitié.

Ce travail a été effectué dans l'unité de recherche Consommateur Aliment TYpique Sécurité Santé (CALITYSS) de VetAgro Sup, campus agronomique de Clermont, avec le financement de VetAgro Sup et FEDER en Auvergne.

Je tiens tout d'abord à remercier **Thomas CROGUENNEC** et **François BOUE** de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse. Merci à **Philippe MICHAUD** qui m'a fait l'honneur de d'accepter d'être président de mon jury de thèse et à **Agnès NARCY** pour sa qualité d'examinatrice dans ce même jury. Merci à **Véronique COXAM** d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Ma gratitude s'adresse à mes deux directrices de thèse, **Anick LEBECQUE** et **Julie MARDON**, pour la confiance qu'elles ont toujours su m'accorder tout au long de ce travail et pour nos riches discussions en réunion qui ont su faire diriger et avancer le projet. Merci à Annick d'avoir été disponible et merci pour ses encouragements. Merci à Julie pour sa grande disponibilité, ses conseils, ses encouragements et les partages de connaissances mais aussi pour la confiance et l'autonomie qu'elle m'a accordé. Je tiens à vous exprimer ici tous mes remerciements et vous dire que vous m'avez apporté un très bon équilibre qui m'a permis de passer ces presque quatre ans très sereinement.

Mes remerciements vont à mon comité de thèse, constitué de **Frédéric GAUCHERON (UMR STLO)**, **Christian DEMIGNE (UNH, retraité)**, **Maud PANOUILLE (UMR GMPA)**, **Annick LEBECQUE** et **Julie MARDON**. Merci de m'avoir fait part de votre expertise pour faire évoluer le projet dans le bon sens.

Je remercie **Cécile BORD** pour son aide et ses connaissances en analyses sensorielles, sans oublier **Delphine GUERINON** qui a participé à la réalisation des tests sensoriels. Merci à **Elise THIEL** pour la formation en statistiques. Encore merci à **Delphine** pour la formation en biochimie au début de ma thèse et ses coups de main pour le dosage des anions organiques. Je remercie également **Christian COUGOUL** et **Laurence ANDASON** d'avoir mis à notre disposition le Spectromètre d'Absorption Atomique et pour leur aide lors du dosage des minéraux.

Je remercie également **Sylvie ALVAREZ**, **Karine FAYOLLE**, **Catherine FOURTIN** pour leur bonne humeur au laboratoire et les pauses café gourmandes. Merci à **Armel GARDANES** pour l'accompagnement et la bonne humeur lors de nombreux déplacements et formations. Merci à **Arlette LAGUET** pour ses formations en « qualité ».

Merci à **Sandrine COUYRAS**, **Sylvie THEIS**, **Madeleine BUET**, **Annabel DAGRIGEON** pour toutes les questions administratives résolues. Merci à **Sylvain JACQUOT** pour ses encouragements dans les moments de solitude à l'étage.

Je pense aussi au Pôle informatique et surtout **Anthony GENSOUS** d'avoir écouté mes pleurnichées en lien avec le matériel informatique ☺ merci Anthony !

Une pensée va à **Brigitte BOYER**, **Dominique POIGNET**, **Jaques PITAVY**, **Jaqueline FAYOLLE** pour leur aide et soutien et surtout pour la bonne humeur.

Merci à **Jérôme COUDON** et mes collègues de VAS pour les cours d'anglais et nos pique-niques « anglais » très sympathiques.

Je n'oublie pas de remercier aussi tous mes amis « stagiaires » ou non, qui sont passés, restés ou repartis ... **Fatma**, **Andrea**, **Mohand**, **Maxime**, **Sandie**, **Thomas**, les années 2013-2015 sont gravées dans ma mémoire et tous les bons moments et repas qu'on a passé ensemble.

Je dis un grand Merci à **Wessam GALIA** pour sa bonne humeur, ses conseils et nos discussions qui me faisaient tant de bien dans des moments difficiles de fin de thèse.

Une pensée pour **Mihaela**, merci pour ton amitié indéfectible et vive les sms illimités !!!

Et bien sûr, le roi des réparations de mon Mac, celui qui trouve toujours une solution, **Valentin**, t'es trop fort. Thanks a lot !!!

Pour finir, ces remerciements ne seraient pas complets si je n'avais pas une pensée pour les êtres qui me sont les plus chers, c'est-à-dire ma famille :

*Je dédie donc cette thèse à mes parents **Simion** et **Aurelia** et à mon frère **Simon**, qui durant ma scolarité m'ont toujours donné la possibilité de faire ce que je voulais et qui ont toujours cru en moi. Merci pour votre soutien à toute épreuve, même à des milliers de km !*

*Je dédie également cette thèse à mon mari **Denis** pour son soutien sans faille, son aide et son amour quotidien ! Merci pour tous les sacrifices que t'as fait pour moi !!! Te iubesc !!!*

Enfin, bonne continuation à tous et vive les fromages AOP !

VALORISATION DES TRAVAUX

ARTICLES RÉDIGÉS :

Ecaterina Gore; Julie Mardon; Delphine Guerinon; Annick Lebecque (2016). Exploratory study of acid-forming potential of commercial cheeses : impact of cheese type. *International Journal of Food Science and Nutrition* 67(4):412-21. Doi: 10.3109/09637486.2016.1166188

Ecaterina Gore; Julie Mardon; Annick Lebecque (2016). Draining and salting as responsible key steps in the generation of the acid-forming potential of cheese. *Journal of Dairy Science* 99(9) :6927-6936. DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11094>

Ecaterina Gore; Julie Mardon; Cécile Bord; Annick Lebecque. Calcium lactate and calcium citrate as attractive compounds to substitute NaCl in blue-veined cheese. [Cet article n'a pas encore été soumis pour publication compte-tenu de la convention de partenariat avec l'entreprise partenaire].

COMMUNICATION ORALE EN CONGRES :

Ecaterina Gore. Caractérisation et modulation du potentiel acidifiant des aliments : application aux fromages. Journées de l'Ecole Doctorale Science de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement (ED SVSAE), le 21-22 mai 2015, Clermont-Ferrand, France.

COMMUNICATIONS PAR POSTER :

GORE E., MARDON J., GUERINON D., ZOURANE F., GARDANES A., LEBECQUE A. Caractérisation du potentiel acidifiant de fromages issus de différentes technologies fromagères. Journées de l'ED SVSAE, 12-13 juin 2014, Clermont-Ferrand, France.

GORE E., MARDON J., GUERINON D., GARDANES A., LEBECQUE A. Evolution of Potential Renal Acid Load (PRAL) during the cheese-making process of Fourme d'Ambert cheese. 3rd International Conference and Exhibition on Nutrition & Food Sciences, September 23-25, 2014 Valencia, Spain. **Best Poster Award.**

RESUME

Une caractéristique nutritionnelle peu connue des fromages est leur potentiel acidifiant, qui se révèle au cours du métabolisme et, à long terme, est susceptible d'induire des effets délétères sur la santé du consommateur. Malgré des conséquences physiopathologiques bien connues, très peu d'études se sont intéressées au potentiel acidifiant/alcalinisant des aliments et aucune à celui des fromages.

L'objectif principal était d'évaluer d'une part le potentiel acidifiant des fromages et identifier ses déterminants au cours de la fabrication et d'autre part d'explorer des stratégies d'optimisation technologique permettant de réduire le potentiel acidifiant des fromages, tout en assurant leurs qualités gustatives. Le potentiel acidifiant a été évalué sur la base de l'indice PRAL (Potential Renal Acid Load, en tenant compte des teneurs en protéine, P, Cl, Na, K, Mg et Ca) et de la teneur en anions organiques (lactate et citrate).

Dans un premier temps, l'étude du potentiel acidifiant de cinq types de fromages du commerce a permis d'établir un lien fort entre le type du fromage et son potentiel acidifiant. L'indice PRAL le plus faible est celui du fromage frais avec - 0,8 mEq/100 g, les indices les plus élevés atteignant 25,3 mEq/100 g pour le fromage à pâte pressée non-cuite (Cantal) et 28,0 mEq/100 g pour le fromage à pâte persillée (Fourme d'Ambert). Ce positionnement a ainsi permis de sélectionner un modèle fromage pour la suite des travaux : la Fourme d'Ambert.

Dans une seconde phase, l'égouttage et le salage ont été identifiés comme les deux étapes technologiques déterminantes dans la génération du potentiel acidifiant du modèle fromage choisi, au cours de la transformation fromagère, suivie en milieu industriel. Ces études démontrent un déséquilibre important entre les éléments acidifiants (Cl, P, protéines) et les éléments alcalinisants majeurs (Na et Ca) du PRAL. En particulier, les Cl suivis par le P, ont exercé un très fort impact expliquant les indices élevés obtenus.

Enfin, une substitution du NaCl par des sels organiques de calcium (lactate et citrate de Ca) a été testée en conditions industrielles pendant le salage à sec de la Fourme d'Ambert. Les deux sels ont montré un réel intérêt pour substituer partiellement le sel des fromages, sans affecter les propriétés sensorielles des produits finis et notamment les saveurs salée et amère. La substitution au lactate de Ca permettrait d'optimiser le potentiel acidifiant des fromages, en diminuant le PRAL et la teneur en Na et en augmentant la teneur en lactate. La substitution au citrate de Ca serait plutôt indiquée dans le cadre d'un enrichissement en Ca.

En conclusion, ces études ont permis d'identifier les leviers à maîtriser pour réduire le potentiel acidifiant des fromages. L'approche adoptée a proposé la mise en application d'un concept connu principalement des nutritionnistes jusqu'ici dans les domaines de la biochimie et de la technologie alimentaires. Les perspectives d'innovation envisagées sont pertinentes avec les enjeux de santé publique actuels, en visant la réduction en Na dans les fromages et en participant à la limitation de l'acidose métabolique latente induite par les régimes occidentaux. Enfin, les retombées économiques de ces recherches sont prometteuses pour les filières fromagères.

Mots-clés : Potentiel acidifiant, Potential Renal Acid Load (PRAL), qualités nutritionnelles, lait, fromages, technologie fromagère, égouttage, salage, substitution du sel, lactate de calcium, citrate de calcium, composition minérale, anions organiques

ABSTRACT

A disregarded nutritional feature of cheeses is their acid-forming potential when ingested, associated with deleterious effects for consumers' health. Despite the well-known pathophysiological consequences, very few studies investigated the acidifying/alkalizing potential of foods and especially, none targeted cheeses.

The research project aimed on the one hand to evaluate the acid-forming potential of cheeses and identify the main key steps of the manufacture involved in this phenomenon and on the other hand to explore technological optimization strategies to reduce the acid-forming potential of cheeses, without altering their sensory properties. The acid-forming potential was evaluated on the basis of their Potential Renal Acid Load (PRAL) index (considering protein, P, Cl, Na, K, Mg and Ca contents) and organic anions contents (lactate and citrate).

Firstly, the study of the acid-forming potential of five commercial cheeses from different cheese-making technologies established a strong link between the type of cheese and their acid-forming potential. PRAL index ranged from - 0.8 mEq/100 g for fresh cheese to 25.3 mEq/100 g for hard cheese (Cantal) and 28.0 mEq/100 g for the blue-veined cheese Fourme d'Ambert. This positioning allowed to select Fourme d'Ambert as model cheese for next steps.

Secondly, draining and salting were identified as the main key steps responsible for the generation of the acid-forming potential of the model cheese, by following an industrial cheese-making process. These studies emphasized a great imbalance between acidifying elements of PRAL calculation (Cl, P and proteins elements) and alkalizing ones (Na and Ca). Particularly, Cl followed by P elements had a strong impact on the PRAL value.

Finally, the salt substitution with organic calcium salts (calcium lactate and calcium citrate) was tested under industrial conditions during the dry salting of Fourme d'Ambert cheese. Both salts showed a real nutritional interest to partially replace salt in cheese, without affecting their sensory properties and especially the salty and the bitter flavors. The salt substitution by calcium lactate could reduce the acid-forming potential of cheeses, by decreasing the PRAL and the sodium content and by increasing the lactate content. The calcium citrate substitution would rather be recommended for Ca enrichment of cheeses.

As a conclusion, these studies allowed to identify technological solutions to reduce the acid-forming potential of cheeses. The adopted approach proposed the implementation of a concept, known mainly by nutritionists so far, to the biochemistry and the food technology fields. The considered prospects for innovation are relevant with the current public health issues, targeting the reduction of Na in cheeses and participating in the limitation of the Western diets induced metabolic acidosis. Finally, the economic benefits of this research are promising for cheese-making producers.

Keywords : Acid-forming potential, Potential Renal Acid Load (PRAL), nutritional qualities, milk, cheeses, cheese-making process, draining, salting, salt substitution, calcium lactate, calcium citrate, mineral composition, organic anions

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : acide aminé

AAS : acide aminé soufré

AFNOR : Association Française de Normalisation

AML : Acidose Métabolique Latente

ANSES : Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'Environnement et du travail

AOC : Appellation d'Origine Contrôlée

AOP : Appellation d'Origine Protégée

Ca : calcium

Cl : chlorure

CNAOL : Conseil National des Appellations d'Origine Laitière

CNIEL : Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière

ES : extrait sec

g : gramme

INAO : Institut National de l'Origine et de la qualité

INCA : étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires

K : potassium

L : litre

mEq : milliéquivalent

Mg : magnésium

MG : matière grasse

mg : milligramme

mL : millilitre

Na : sodium

N total : azote total

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P : phosphore

PP : pâte persillée

PPC : pâte pressée cuite

PPNC : pâte pressée non cuite

PRAL : Potential Renal Acid Load

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Liste des tableaux

Tableau 1. Réactions responsables de la production et la consommation de protons (H^+ , acide) dans le cadre du métabolisme des glucides, lipides et protéines (Poupin et al., 2012)

Tableau 2. Le métabolisme des acides organiques alimentaires et endogènes et leur impact sur l'EAB (d'après Gluck (1998) et Poupin et al., 2012)

Tableau 3. Systèmes tampons de l'organisme et leur contribution à la régulation du pH (d'après Poupin et al., 2012)

Tableau 4. Absorption intestinale¹ des minéraux et des protéines ainsi que les éléments pris en compte à la construction des facteurs de conversion du PRAL (de l'apport en nutriments (mg/100 g) en milliéquivalents), qui estiment l'excrétion urinaire des électrolytes correspondants induite par l'alimentation (Remer and Manz, 1995)

Tableau 5. Teneurs en principaux nutriments pour certains fromages et propriétés associées (d'après ANSES, 2013; Gaucheron, 2013)

Tableau 6. Répartition des minéraux entre la fraction aqueuse et la fraction micellaire du lait (d'après Gaucheron et al., 2004)

Tableau 7. Genres des bactéries lactiques, leur type de fermentation et les produits de fermentation (McSweeney and Fox, 2004)

Tableau 8. Caractérisation des 5 types de fromages étudiés à l'étape 1

Tableau 9. Composition des sels de mélange utilisés pour le salage à sec des Fourmes d'Ambert à l'étude préliminaire, étape 3 (pour 100g de sel de mélange)

Tableau 10. Composition des sels de mélange utilisés pour le salage à sec des Fourmes d'Ambert, étape 3 (pour 100g de sel de mélange anhydre)

Tableau 11. Grille de notation pour la Fourme d'Ambert à l'étape préliminaire

Tableau 12. Gamme de concentrations réalisée sur les différents sels pour les seuils de détection

Tableau 13. Solutions testées pour les différents tests triangulaires

Tableau 14. Gamme de concentrations citrate de Ca + NaCl réalisée pour le test de classement

Tableau 15. Grille d'évaluation du profil sensoriel et lexique utilisé

Tableau 16. Extrait sec, composition en minéraux et anions organiques des Fourmes d'Ambert salées à sec avec différents mélanges de sels de Ca/NaCl (étude préliminaire)

Tableau 17. Teneurs et réductions en Na des pâtes des Fourmes d'Ambert salées avec différents sels (mélanges CaLa75, CaCi75, NaCl100, Contrôle) par rapport au Contrôle, à J₅₆

Tableau 18. Valeurs et modulation du PRAL (mEq/100 g) et des teneurs en lactate et en citrate (mg/100 g) des pâtes des Fourmes d'Ambert salées avec différents sels (mélanges CaLa75, CaCi75, NaCl100, Contrôle) par rapport au Contrôle, à J₅₆

Tableau 19. Rapport Ca/P des produits obtenus à différentes étapes de la thèse

Tableau 20. Formations, participations et diplômes obtenues au cours de mon doctorat

Liste des figures

Figure 1. Régulation de l'équilibre acido-basique et prise en charge de l'acidité fixe (modifié d'après Ginty (2003); Poupin et al., 2012)

Figure 2. Régulation de l'équilibre acido-basique dans le cadre de l'AML (d'après Ginty (2003); Poupin et al., 2012)

Figure 3. Ionogramme de l'urine (montrant tous les anions et les cations urinaires quantitativement importants) d'un adulte avec un régime alimentaire mixte riche en protéines (Remer and Manz, 1995)

Figure 4. La charge acide rénale potentielle (PRAL) de certains aliments (pour 100 g de partie consommable) (d'après Remer and Manz, 1995)

Figure 5. Effets des traitements subis par les aliments sur leur potentiel acidifiant. AO, anions organique (Demigné et al., 2004b)

Figure 6. Classification des fromages (d'après St-Gelais and Tirard-Collet, 2002)

Figure 7. Technologies de fabrication de cinq types de fromage (extrait des cahiers des charges)

Figure 8. Micelle et sous-micelle de caséine ((Walstra, 1990)

Figure 9. Evolution de la structure des caséines au cours de la coagulation acide (30 °C) (Walstra, 1990)

Figure 10. Schéma général des processus biochimiques intervenant au cours de la fabrication et de l'affinage (Marilley and Casey, 2004)

Figure 11. Voies de métabolisation du lactate (McSweeney and Fox, 2004)

Figure 12. Démarche expérimentale de la thèse (synthèse)

Figure 13. Choix des produits à l'étape 1

Figure 14. Diagramme de fabrication de la Fourme d'Ambert et prélèvements à l'étape 2

Figure 15. Plan d'expériences étude finale (étape 3)

Figure 16. Découpe des fromages pour le test sensoriel

Figure 17. Les fromages obtenus à l'étude préliminaire à 55 jours d'affinage

Figure 18. Evolution du pH (a) et de la teneur en Ca (b) dans la pâte et la croûte des 4 fromages étudiés

Figure 19. Les fromages obtenus à l'étude finale, à plus de 56 jours d'affinage

Liste des annexes

Annexe 1. Présentation par poster, Journées de l'Ecole Doctorale SVSAE (2014)

Annexe 2. Présentation par poster, International Conference and Exhibition on Nutrition & Food Sciences, Valencia, Spain (2014)

Sommaire

INTRODUCTION	15
1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	17
1.1 Potentiel acidifiant/alcalinisant des aliments.....	17
1.1.1 Homéostasie acido-basique.....	17
1.1.2 Réactions responsables de la production et de la consommation d'acides	18
1.1.3 Mécanismes de régulation de l'équilibre acido-basique	19
1.1.4 Du déséquilibre acido-basique à l'acidose métabolique latente	21
1.1.4.1 Concept d'acidose	21
1.1.4.2 Concept d'acidose métabolique latente	22
1.1.5 Conséquences physiopathologiques de l'AML à long terme	22
1.1.5.1 AML et calculs rénaux.....	22
1.1.5.2 AML et santé osseuse	22
1.1.5.3 AML et fonte protéique	23
1.1.6 Estimation de la charge acide générée par les aliments	24
1.1.7 Le sel, facteur aggravant de l'acidose métabolique latente	26
1.2 Fonctionnalités nutritionnelles des fromages	28
1.2.1 Contribution des fromages aux apports nutritionnels	28
1.2.2 Le potentiel acidifiant des fromages	30
1.3 Conception du fromage	31
1.3.1 Processus de fabrication des fromages	31
1.3.1.1 Composition de la matière première – le lait	32
1.3.1.2 Aptitude du lait à la transformation fromagère.....	33
1.3.1.3 Préparation du lait à la transformation fromagère	34
1.3.1.4 Mécanisme de coagulation du lait	35
1.3.1.4.1 Coagulation par acidification.....	35
1.3.1.4.2 Coagulation par voie enzymatique	36
1.3.1.5 Egouttage du coagulum	37
1.3.1.6 Etape de salage.....	37
1.3.1.7 Modalités de salage des fromages	38
1.3.1.7.1 Salage à sec	38

1.3.1.7.2	Salage par saumurage	39
1.3.1.7.3	Processus de diffusion du sel dans le fromage	40
1.3.1.8	Affinage des fromages	40
1.3.1.8.1	Métabolisme du lactose résiduel.....	41
1.3.1.8.2	Métabolisme du lactate	41
1.3.1.8.3	Métabolisme du citrate	42
1.3.1.8.4	Lipolyse	42
1.3.1.8.5	Protéolyse	43
1.4	Stratégies de réduction de la teneur en sel des fromages et perceptions des consommateurs	44
1.4.1	Amélioration nutritionnelle des fromages et perceptions des consommateurs	44
1.4.2	Facteurs influençant la composition nutritionnelle des fromages.....	45
1.4.3	Stratégies de réduction de la teneur en sel des fromages	45
2	Objectifs du travail de thèse et démarche expérimentale	48
2.1	Enjeux et objectifs	48
2.2	Démarche expérimentale : une approche en trois étapes.....	48
2.2.1	1 ^{ère} étape : Caractérisation du potentiel acidifiant de fromages issus de technologies fromagères différentes	48
2.2.2	2 ^{ème} étape : Identification des leviers technologiques déterminants dans la génération du potentiel acidifiant des fromages au cours de la transformation.....	49
2.2.3	3 ^{ème} étape : Exploration des optimisations technologiques pertinentes permettant de réduire le caractère acidifiant des fromages	49
3	MATERIEL ET METHODES	51
3.1	Protocoles expérimentaux et méthodes d'échantillonnage	51
3.1.1	Echantillonnage des produits dans le commerce (étape 1)	51
3.1.2	Echantillonnage des produits dans l'entreprise (étape 2)	52
3.1.2.1	Fabrication de la Fourme d'Ambert.....	52
3.1.2.2	Echantillonnage	53
3.1.3	Protocole d'optimisation nutritionnelle de la Fourme d'Ambert – substitution partielle du NaCl par des sels de calcium (étape 3)	53
3.1.3.1	Nature des sels de substitution.....	53
3.1.3.2	Granulométrie	54
3.1.3.3	Intervention étude préliminaire.....	54

3.1.3.4	Intervention étude finale	54
3.1.3.5	Affinage	54
3.1.3.6	Echantillonnage	55
3.2	Méthodes d'analyse biochimique	55
3.2.1	Préparation des échantillons	55
3.2.2	Caractérisation globale des produits	56
3.2.2.1	Détermination du pH	56
3.2.2.2	Teneur de la matière sèche.....	56
3.2.2.3	Teneur de la matière grasse	56
3.2.2.4	Détermination de la teneur en cendres.....	57
3.2.2.5	Dosage de l'azote total.....	57
3.2.3	Détermination de la teneur en minéraux	58
3.2.3.1	Dosage du K, Na, Ca, Mg par spectrométrie d'absorption atomique	58
3.2.3.2	Dosage du phosphore par colorimétrie	58
3.2.4	Analyse des anions (chlorure, citrate et lactate)	59
3.2.4.1	Dosage des chlorures par potentiométrie	59
3.2.4.2	Dosage enzymatique du citrate et lactate.....	59
3.3	Protocole expérimental pour la caractérisation sensorielle des Fourmes d'Ambert salées avec différents types de sel.....	60
3.3.1	Observations sensorielles à l'étape préliminaire.....	60
3.3.2	Caractérisation sensorielle par un jury entraîné à l'étape finale	60
3.3.2.1	Jury qualifié	60
3.3.2.2	Nature des échantillons à tester	60
3.3.2.3	Découpe des fromages	61
3.3.2.4	Déroulement des différentes étapes de l'étude sensorielle	61
3.3.2.4.1	Etape 1 : Séances d'entraînement	61
3.3.2.4.2	Etape 2: Séances d'évaluation	62
3.4	Méthodes statistiques	63
3.4.1.1	Analyses biochimiques (étape 1 - 3).....	63
3.4.1.2	Validation des performances du panel sensoriel (étape 3)	63
3.4.1.3	Analyse du profil sensoriel (étape 3)	63
4.	Résultats et discussion	65
4.1	Etape 1 : Caractérisation du potentiel acidifiant de fromages issus de technologies fromagères différentes	65
4.1.1	Contexte de l'étude	65

4.1.2	Objectifs	65
4.1.3	Principaux résultats et discussion	66
4.1.4	Conclusions et perspectives	68
4.1.5	Article 1. « Exploratory study of acid-forming potential of commercial cheeses: impact of cheese type »	69
4.2	Etape 2 : Identification des apports et pertes en composants modulant le caractère acidifiant/alcalinisant des fromages au cours de la transformation.....	70
4.2.1	Contexte de l'étude	70
4.2.2	Objectifs	70
4.2.3	Principaux résultats et discussion	72
4.2.4	Conclusions et perspectives	73
4.2.5	Article 2. « Draining and salting as responsible key steps in the generation of the acid-forming potential of cheese : application to a soft blue-veined cheese»	74
4.3	Etape 3 : Exploration des optimisations technologiques pertinentes permettant de réduire le caractère acidifiant des fromages	85
4.3.1	Contexte de l'étude	85
4.3.2	Objectifs	86
4.3.3	Principaux résultats et discussion	87
4.3.3.1	Etude préliminaire : principaux résultats et discussions	87
4.3.3.2	Etude finale : principaux résultats et discussions	90
4.3.3.2.1	Caractérisation biochimiques des produits	90
4.3.3.2.2	La substitution de sel par du lactate et du citrate de Ca appliquée permet-elle de diminuer la teneur en Na ?	91
4.3.3.2.3	Comment expliquer l'évolution des teneurs en Ca dans le produit au cours de l'affinage ?	91
4.3.3.2.4	La substitution à 75% du sel sec par le lactate et le citrate de Ca permet-elle de limiter le potentiel acidifiant de la Fourme d'Ambert ?	93
4.3.3.2.5	Caractérisation sensorielle des produits.....	94
4.3.3.3	Conclusions et perspectives	95
4.3.4	Article 3. « Calcium lactate and calcium citrate as attractive compounds to substitute NaCl in blue-veined cheese »	96
5.	Conclusions générales et perspectives.....	109
5.1	Apports scientifiques, technologiques et socio-économiques de la thèse	109

5.2	Retour sur la démarche	112
5.2.1	Pertinence nutritionnelle de l'approche	112
5.2.2	Pertinence de l'utilisation du PRAL	112
5.2.3	Pertinence de l'approche pluridisciplinaire	113
5.2.4	Limites de l'étude	114
5.3	Retombées de la thèse	115
5.4	Perspectives de recherche.....	116
5.5	Apports personnels de la thèse de doctorat	117
Annexes	120
6.	Références bibliographiques	122

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Fort du constat que la nutrition constitue un des déterminants majeurs de la santé humaine, il est aujourd'hui évident que la préservation, voire l'amélioration, de la santé de la population nécessite d'orienter les consommateurs vers un régime alimentaire sain. Dans ce contexte, les autorités de santé publique incitent les professionnels de l'agroalimentaire à s'interroger sur la **qualité nutritionnelle** de leur offre et à la faire évoluer vers une offre plus saine et durable.

La modulation des fonctionnalités nutritionnelles des produits alimentaires semble un moyen pertinent pour améliorer sensiblement la santé du consommateur, tout au moins pour limiter son exposition à certains facteurs de risques de pathologies dégénératives. Le projet de thèse s'insère dans ce contexte et propose une approche originale centrée sur l'étude du **potentiel acidifiant** des produits alimentaires, une problématique peu abordée par la communauté scientifique et présentant pourtant un intérêt de santé publique certain.

En effet, les **régimes alimentaires occidentaux** présentent un déséquilibre acido-basique quasi systématique, au profit d'une charge acide (Cordain *et al.*, 2005). Ce caractère acidifiant du régime induit l'installation d'une acidose métabolique latente (AML) au niveau systémique, pouvant présenter, à long terme, des **conséquences délétères** sur plusieurs fonctions physiologiques et induire des lithiases rénales, voire une mobilisation des minéraux de l'os et des acides aminés des protéines musculaires (Frassetto *et al.*, 2001; Pedone *et al.*, 2010).

Ainsi, si les conséquences de l'AML sur la santé des consommateurs sont aujourd'hui évidentes, le champ d'investigation restant à explorer pour prévenir son établissement reste vaste. Dans un contexte où les entreprises agroalimentaires sont de plus en plus sollicitées pour **optimiser** la **qualité nutritionnelle** de leurs produits, il paraît intéressant de proposer des démarches visant à diminuer le caractère acidifiant d'aliments reconnus comme tels.

Deux leviers d'action peuvent être envisagés :

- 1) Le premier vise à promouvoir auprès du consommateur des associations alimentaires pertinentes pour « équilibrer » le régime alimentaire et donc limiter l'installation de cet état d'AML ;
- 2) Le second consiste à explorer et moduler les déterminants du caractère acidifiant d'aliments reconnus comme tels, de façon à réduire ce caractère.

Ce second levier n'a jamais été exploré. Il semble donc pertinent d'évaluer le potentiel d'une telle stratégie en basant cette approche sur l'étude des aliments présentant le caractère acidifiant le plus marqué : les **fromages** (Remer and Manz, 1995). Ces produits sont largement consommés par la population française (95% de consommateurs d'après CNIEL, 2013). Ils présentent un intérêt nutritionnel reconnu en tant que forts contributeurs aux apports en calcium (20,4% des apports nutritionnels), en protéines (8,6%). Cependant il s'agit également de vecteurs importants de sodium (6,9%) (INCA2).

Il a été suggéré dans la littérature que le caractère acidifiant des fromages serait induit par la **transformation fromagère** (Demigne et al., 2004). Cependant depuis les travaux précurseurs de l'équipe de Remer (Remer & Manz, 1995), très peu d'études se sont intéressées au potentiel acidifiant/alcalinisant des aliments et aucune à celui des fromages. L'approche consistant à évaluer dans quelle mesure le caractère acidifiant des fromages peut être modulé a donc fait l'objet de cette thèse, sans perdre de vue l'enjeu global de contribuer à l'amélioration nutritionnelle de ces produits.

Le manuscrit est organisé en plusieurs chapitres :

1. Le chapitre 1 est une **étude bibliographique** présentant l'état de l'art sur le potentiel acidifiant des fromages, la transformation fromagère et son rôle supposé dans la génération du caractère acidifiant des fromages ;
2. Le chapitre 2 présente les **objectifs et la démarche expérimentale** du projet ;
3. Le chapitre 3 est consacré à la description des **matériels et méthodes** utilisés ;
4. Le chapitre 4 expose les **résultats et les éléments de discussion** de ce travail ;
5. Le dernier chapitre présente les **conclusions générales**, les **retombées**, ainsi que les **perspectives** envisagées.

Chapitre 1.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Potentiel acidifiant/alcalinisant des aliments

En raison des profondes modifications des modes de vie dans les pays occidentaux survenues au cours des deux cent dernières années, la composition de l'alimentation a fortement évolué (Cordain et al., 2005; Frassetto et al., 2001). En particulier, les procédés de transformation des aliments développés pendant les périodes d'industrialisation ont fondamentalement modifié certaines caractéristiques nutritionnelles des régimes alimentaires telles que l'apport en acides gras, le ratio Na/K, le contenu en fibres et en micronutriments (Cordain et al., 2005). Cette évolution rapide des modes de vie a été suggérée comme contribuant au développement des maladies dites de « civilisation » (Cordain et al., 2005; Frassetto et al., 2001; Neel, 1999).

Parmi les équilibres altérés par ces bouleversements, l'**équilibre acido-basique** (EAB) de l'organisme fait partie de ces fonctions élémentaires dont on a sans doute largement sous-estimé l'implication sur la santé (Frassetto et al., 2001).

1.1.1 Homéostasie acido-basique

L'**homéostasie** acido-basique se définit comme le processus physiologique permettant de maintenir l'ensemble des paramètres physico-chimiques de l'organisme entre les limites des valeurs normales nécessaires à son bon fonctionnement (Bernard, 1985). Un de ces paramètres est le pH des fluides extracellulaires, qui est déterminé par la concentration et les propriétés des acides et des bases qu'ils contiennent (Shaw, 1989). Les concentrations plasmatiques des acides et des bases sont régulées par des mécanismes sophistiqués pour maintenir le pH plasmatique à des valeurs proches de la neutralité, entre 7,38 et 7,42, et le pH intracellulaire entre 6,80 et 7,45 en fonction du type de cellule et de tissus (Atherton, 2009).

Les acides présents au niveau de l'organisme peuvent être distingués en fonction de leur caractère volatil (l'acide carbonique, H_2CO_3) ou fixe (non-volatils). Ils peuvent provenir à la fois du métabolisme endogène et de l'apport alimentaire (Poupin et al., 2012; Shaw, 1989), mais en conditions physiologiques normales la production nette d'acides endogènes (NEAP) est principalement influencée par l'alimentation (Poupin et al., 2012).

Les principales réactions biochimiques responsables de cette production d'acidité au niveau métabolique sont présentées ci-après.

Tableau 1. Réactions responsables de la production et la consommation de protons (H^+ , acide) dans le cadre du métabolisme des glucides, lipides et protéines* (Poupin et al., 2012)

	Production H^+	Consommation H^+
Glucides	<ul style="list-style-type: none"> La glycolyse : Glucose \rightarrow lactate + H^+ <p>1300 mEq/j¹ en H^+</p>	<ul style="list-style-type: none"> Régénération du glucose à partir du lactate + $H^+ \rightarrow$ glucose Oxydation complète du glucose : Lactate + $H^+ \rightarrow$ CO_2 + H_2O <p>1300 mEq/j en H^+</p>
Lipides	<ul style="list-style-type: none"> Lipolyse des TG \rightarrow AG + H^+ Cétogenèse AG \rightarrow corps cétoniques + H^+ <p>300 mEq/j H^+</p>	<ul style="list-style-type: none"> Synthèse des triglycérides AG + $H^+ \rightarrow$ TG Synthèse des AG corps cétoniques + $H^+ \rightarrow$ AG <p>300 mEq/j H^+</p>
Protéines et acides aminés (AA)	<ul style="list-style-type: none"> Synthèse de l'urée : AA \rightarrow NH_4^+ \rightarrow urée + H^+ Catabolisme général des AA AA cationiques (arginine, lysine) \rightarrow Glucose ou TG + urée + H^+ AAS \rightarrow glucose ou TG + urée + H_2SO_4 	<ul style="list-style-type: none"> Oxydation des corps cétoniques des AA + $H^+ \rightarrow$ glucose ou TG neutres \rightarrow Glucose ou TG + urée AA anioniques + $H^+ \rightarrow$ glucose ou TG + urée

Abréviations : AG, acide gras ; TG, triglycéride ; AA, acide aminé ; AAS, acide aminé soufré

*Les réactions chimiques présentées dans le tableau sont qualitatives : elles ne sont pas équilibrées et montrent seulement les molécules d'intérêt dans la production et la consommation des acides et des bases

¹ L'équivalent gramme est constitué par le quotient de masse atomique du corps simple considéré, par sa valence (nombre d'électro-polarité). Par exemple, pour le magnésium bivalent (Mg^{2+}) de masse moléculaire 24,3, une concentration de 20,3 mEq/L est synonyme de $20,3/2 = 10,15$ mg/L (Demigné et al., 2013).

1.1.2 Réactions responsables de la production et de la consommation d'acides

L'enjeu majeur de l'homéostasie acido-basique est de maintenir la concentration de protons H^+ (acides) à des niveaux appropriés. Le cycle journalier de production/consommation de H^+ est estimé à 150 000 mEq (1Eq = 1 mol/valence). La production nette d'acidité avoisine les 15 000 mEq sous forme d'acidité volatile (CO_2) et les 70 à 100 mEq sous forme d'acidité fixe (Cohen et al., 1997; Gluck, 1998).

La principale source de H^+ dans l'organisme est la réaction réversible impliquant l'hydrolyse de l'ATP cellulaire, qui se produit au cours du métabolisme des glucides, des lipides et des protéines (**tableau 1**). L'oxydation complète de ces composés implique la formation de quantités importantes d'acides volatils. En conditions normales et suite à la production et la consommation continue de ces acides, ils ne s'accumulent pas dans l'organisme (Cohen et al., 1997). Par exemple, les glucides subissent la glycolyse, qui produit environ 1300 mEq/j de H^+ ainsi que du lactate, dont le métabolisme ultérieur (par oxydation totale en CO_2 et H_2O ou gluconéogenèse dans le foie) consomme une quantité équivalente de H^+ . Le métabolisme des lipides et des **protéines** fonctionne de la même manière, avec des exceptions pour les acides aminés soufrés et les phosphoprotéines. L'oxydation des **acides aminés soufrés** (AAS) (méthionine, cystéine et cystine), d'origine alimentaire ou endogène (protéines du muscle), se traduit par une production d'acidité sous forme de H^+ et de SO_4^{2-} (Lemann et al., 2003) selon la réaction² : $R-SH \rightarrow CO_2 + \text{urée} + 2H^+ + SO_4^{2-}$.

Le métabolisme des **phosphoesters** et des **phosphoprotéines** est une autre source d'acides :



Les phosphates produits dans ces réactions seront excrétés dans l'urine (Oh, 2000).

Les **acides organiques** alimentaires ou endogènes participent aussi à la production d'acides et de bases. On distingue alors les acides organiques métabolisables (AOH) et non-métabolisables :

- Les AOH sont considérés comme de potentielles sources d'acides dès lors que leur métabolisme implique une génération d'anions organiques (AO^- , acides relativement forts) via la consommation d'une base selon la réaction :

² Les réactions chimiques présentées dans ce sous-chapitre sont qualitatives : elles ne sont pas équilibrées et montrent seulement les molécules d'intérêt dans la production et la consommation des acides et des bases

Tableau 2. Métabolisme des acides organiques alimentaires et endogènes et impact sur l'EAB* (d'après Gluck (1998) et Poupin et al., 2012)

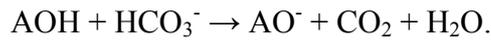
AOH	Elimination	Impact sur l'EAB	Exemple acide	Réaction
<i>Alimentaires</i>				
AOH Métabolisables	CO ₂ + H ₂ O	Neutre	Citrique, malique	AOH → CO ₂ + H ₂ O
AOH non- métabolisables	AO ⁻ excrété dans l'urine	Acidifiant (Consommation ^a HCO ₃ ⁻)	Urique, oxalique, hippurique	AOH + HCO ₃ ⁻ , X ⁺ → AO ⁻ , X ⁺ + CO ₂ + H ₂ O
AO ⁻ métabolisables sous forme de X ⁺		Alcalinisant (production HCO ₃ ⁻)	Citrate, malate, lactate	AO ⁻ , X ⁺ + H ₂ CO ₃ → CO ₂ + H ₂ O + HCO ₃ ⁻ , X ⁺
AO ⁻ non- métabolisables		Neutre	Tartrate, oxalate	
<i>Endogènes</i>				
AOH métabolisables	CO ₂ + H ₂ O	Neutre	Citrique, lactique,	AOH → CO ₂ + H ₂ O
AOH métabolisables partiellement oxydés	AO ⁻ excrété dans l'urine	Acidifiant (consommation ^a HCO ₃ ⁻)	Citrique, lactique, oxalique	AOH + HCO ₃ ⁻ , X ⁺ → AO ⁻ , X ⁺ + CO ₂ + H ₂ O
AOH non- métabolisables	AO ⁻ excrété dans l'urine	Acidifiant - (consommation ^a HCO ₃ ⁻)	Hippurique	

Abréviations utilisés : AOH, acide organique ; EAB, équilibre acido-basique ; AO⁻, anions organiques ; X⁺, cations inorganiques (Ca²⁺, K⁺, Na⁺, Mg²⁺) ; X⁻, AO⁻, sels X; bicarbonate, HCO₃⁻ ; ^a Consommation HCO₃⁻ = production d'acide

*Les réactions chimiques présentées dans le tableau sont qualitatives : elles ne sont pas équilibrées et montrent seulement les molécules d'intérêt dans la production et la consommation des acides et des bases

Tableau 3. Systèmes tampons de l'organisme et contribution de ces systèmes à la régulation du pH (d'après Poupin et al., 2012)

Localisation	Bicarbonate (%)	Phosphate/Protéines (%)
Extracellulaire	86	14
Intracellulaire	36	64
Reins	-	100



C'est l'exemple des acides citrique et lactique, qu'ils soient d'origine alimentaire ou endogène (**tableau 2**). Ces anions ne s'accumulent pas dans l'organisme et leur métabolisme ultérieur conduit à la formation de bicarbonate :



Au total, l'oxydation complète des AOH ne contribue pas à la production d'acidité dans l'organisme (Oh, 2000). Une production nette d'acidité surviendrait seulement dans le cas où les acides organiques ne seraient pas complètement métabolisés et pourraient être perdus dans l'urine, avant d'être oxydés en CO_2 et H_2O (Poupin et al., 2012). Cette situation peut avoir lieu uniquement dans des conditions particulières (cétonurie ou exercices physiques très intenses), quand les réactions de production et de consommation des AOH ne sont pas concomitantes et n'ont pas de bilans matières équivalents (Oh, 2000). L'impact alcalinisant des anions organiques métabolisables d'origine alimentaire et parvenus sous forme de sels (**tableau 2**) repose sur : (1) leur profil anionique et (2) leur profil cationique où prédominent le K, Mg, Ca ou Na. Cet impact est d'autant plus marqué pour les anions organiques polycarboxyliques (citrate et malate) (Demigné, 2008).

- La classe des acides non-métabolisables est constituée principalement d'acides inorganiques et certains acides organiques comme l'acide tartrique et oxalique. Généralement, ces acides sont peu absorbables et/ou peu métabolisables, la fraction absorbée est essentiellement dirigée vers l'excrétion urinaire, avec un impact neutre sur l'EAB (Demigné, 2008; Sabboh et al., 2007).

1.1.3 Mécanismes de régulation de l'équilibre acido-basique

Afin de maintenir l'homéostasie acido-basique, les acides alimentaires ou endogènes sont rapidement pris en charge par des **systèmes tampons** intra et extracellulaires (Cohen et al., 1997; Poupin et al., 2012; Remer, 2000), dont les principaux sont le bicarbonate/acide carbonique, le phosphate disodique/phosphate monosodique et les protéinates/protéines :

- Le **système bicarbonate/acide carbonique** ($\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3$) est le système tampon le plus important du liquide extracellulaire. En cas d'addition d'un acide fort le bicarbonate agit comme une base faible et capte les ions H^+ :



Réduire le potentiel acidifiant des fromages pour améliorer leurs fonctionnalités nutritionnelles

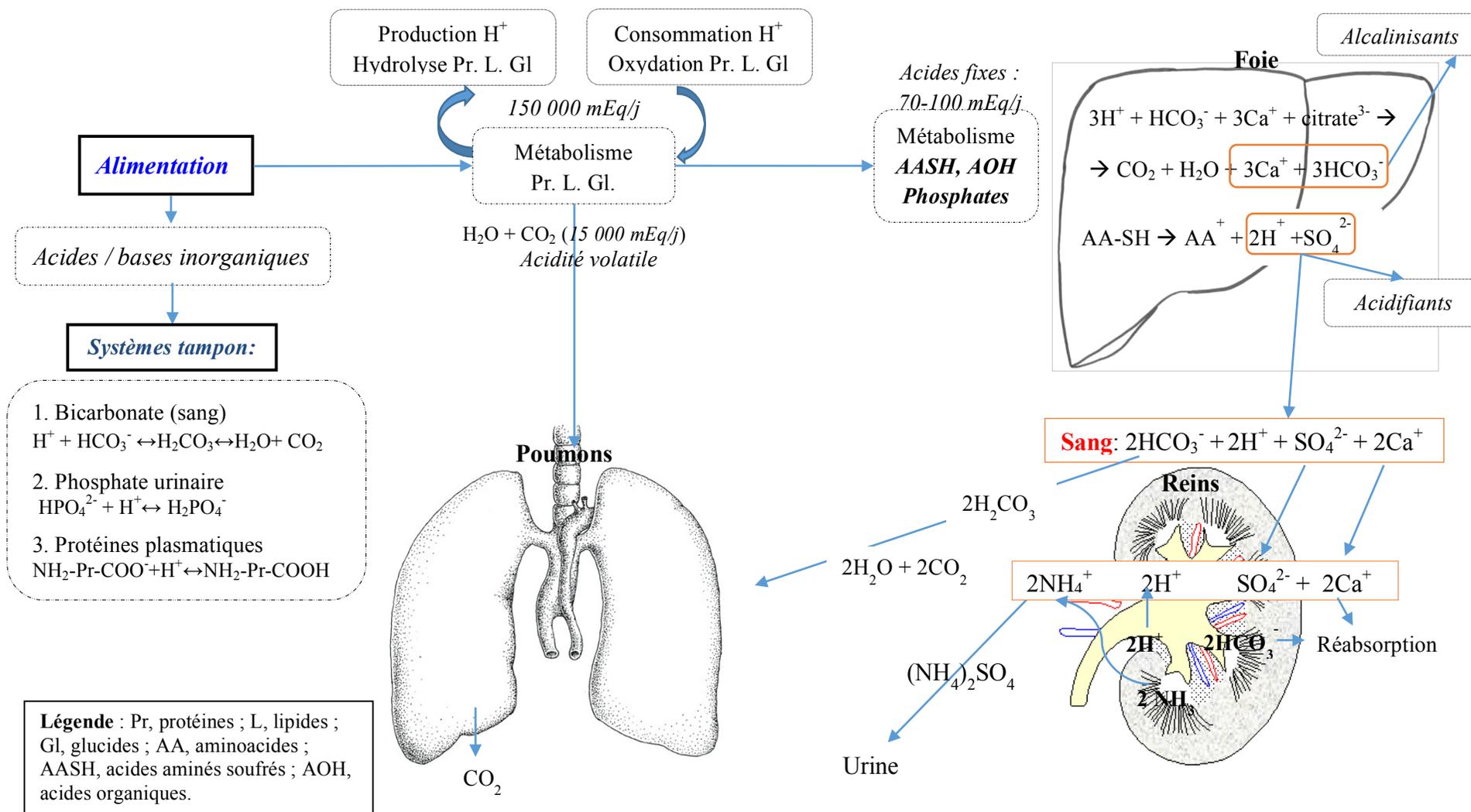


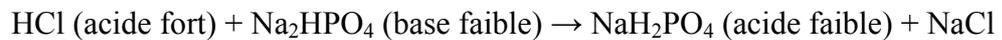
Figure 1. Régulation de l'équilibre acido-basique et prise en charge de l'acidité fixe au niveau métabolique (d'après Ginty (2003); Poupin et al., 2012)

En cas d'addition d'une base forte l'acide carbonique va se dissocier pour former des ions H^+ qui se lient aux ions hydroxydes libérés par la base forte :

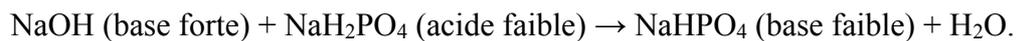


Une des particularités de ce système tampon repose sur sa capacité à éliminer des acides sous forme de CO_2 ($H_2CO_3 \leftrightarrow CO_2 + H_2O$) par les poumons (à l'inverse des autres systèmes tampons pour lesquels la partie acide reste en solution) (Atherton, 2009; Poupin et al., 2012).

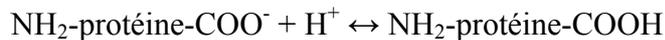
- Le **système phosphate disodique/phosphate monosodique** (Na_2HPO_4/NaH_2PO_4) est un tampon important dans l'urine et le liquide intracellulaire (Clancy and McVicar, 2007). Ce système utilise le même principe. Les ions H^+ libérés par des acides forts se lient à des bases faibles pour former un acide faible :



En présence d'une base forte a lieu la réaction :



- Les propriétés tampons des **protéines plasmatiques et intracellulaires** résident dans les groupes amine (NH_2) et carboxyle ($COOH$) (Clancy and McVicar, 2007). Au niveau sanguin (pH alcalin) les protéines se trouvent sous leur forme anionique et peuvent agir en tant que bases en fixant les protons :



Tout excès de H^+ peut à tout moment être pris en charge par les protéines non-chargées :



Les contributions relatives de ces systèmes tampons aux mécanismes intra- et extracellulaires sont présentées dans le **tableau 3**.

La **figure 1** présente les différents organes impliqués dans le maintien de l'EAB et leurs interactions. Le CO_2 issu du métabolisme complet des protéines, lipides et glucides est éliminé en continu par le **système pulmonaire**, à l'aide du système tampon bicarbonate plasmatique.

Ainsi la ventilation pulmonaire, représente un régulateur majeur de la pression de CO_2 du sang, qui maintient une concentration de l'ordre de 24 mmol/L dans le plasma (Shaw, 1989). Si les poumons fonctionnent correctement, aucun changement de l'apport alimentaire n'aura d'effet sur la concentration plasmatique du CO_2 . Le **foie** participe à la dégradation, par

Réduire le potentiel acidifiant des fromages pour améliorer leurs fonctionnalités nutritionnelles

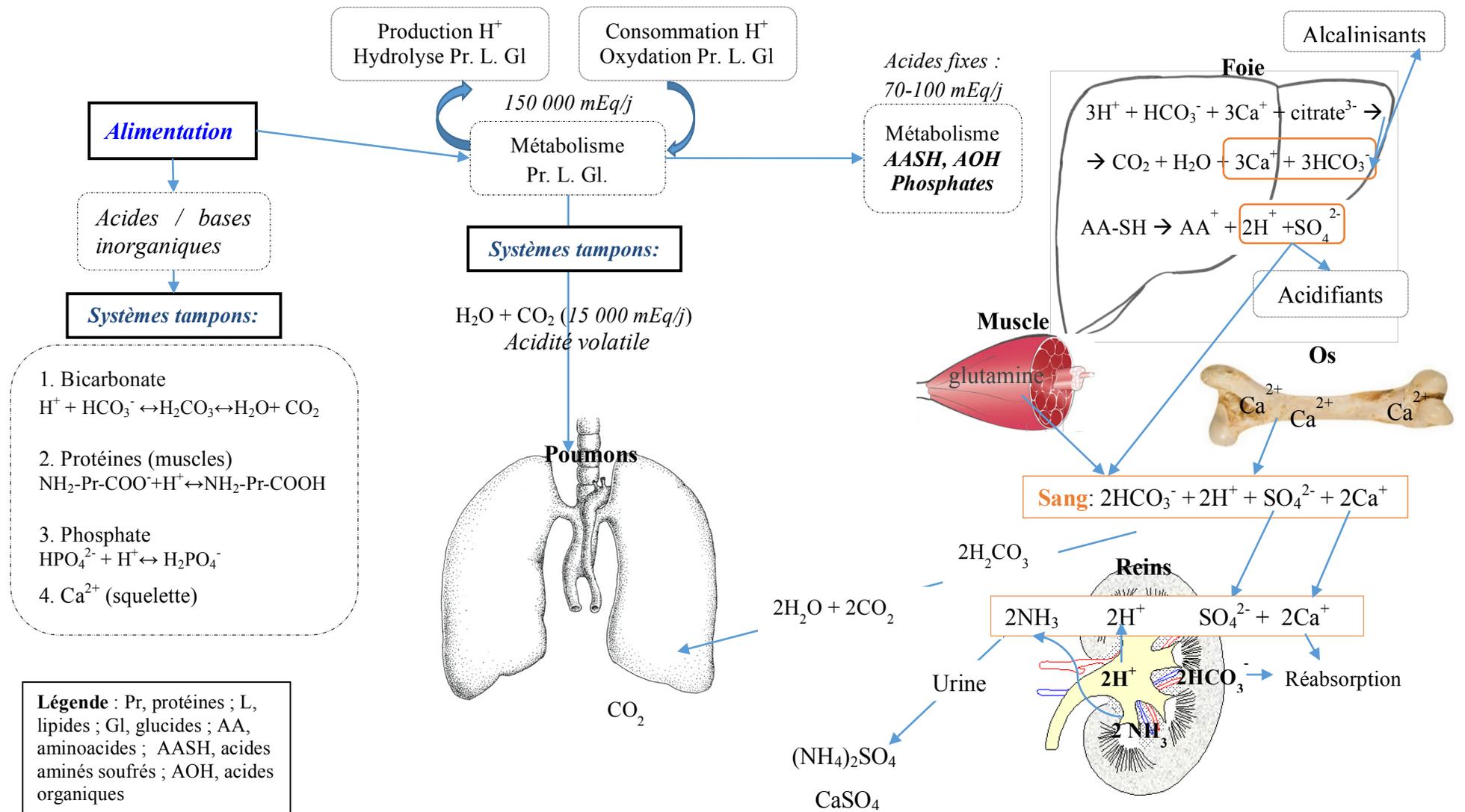


Figure 2. Régulation de l'équilibre acido-basique dans le cadre d'une situation d'acidose métabolique latente (d'après Ginty (2003); Poupin et al., 2012)

oxydation, des AAS et des AOH, étant directement impliqué dans la production d'acides (H^+) et de bases (HCO_3^-). Les bases seront réabsorbées et utilisées par l'organisme pour neutraliser les acides fixes. Ainsi, les acides fixes sous forme de H^+ vont s'associer au tampon HCO_3^- et seront éliminés par le système pulmonaire sous forme de CO_2 . En ce qui concerne la partie anionique des acides (SO_4^{2-} , Cl^- , PO_4^{3-}) ils vont s'associer aux cations (NH_4^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), liés au HCO_3^- , pour former des sels qui seront éliminés via le **système rénal**.

1.1.4 Du déséquilibre acido-basique à l'acidose métabolique latente

1.1.4.1 Concept d'acidose

L'**acidose métabolique** correspond à une perturbation de l'EAB de l'organisme. Elle se caractérise par un pH sanguin inférieur à 7,38 et par une diminution de la concentration plasmatique des bicarbonates (< 22 mmol/L). Cette réduction en bicarbonates peut résulter d'une surproduction d'acides organiques *in vivo* (acide lactique, corps cétoniques), d'une moindre élimination d'acides par le rein ou d'une perte excessive de bases, très souvent liées à la dégradation des fonctions rénales avec l'âge (Wiederkehr and Krapf, 2001).

L'état d'acidose induit le recrutement du centre respiratoire du tronc cérébral (qui adapte la fréquence et l'amplitude de la respiration) et des mécanismes rénaux visant à régler la concentration sanguine des ions H^+ :

1. Dans un premier temps, les chémorécepteurs sensibles au pH sanguin induisent une hyperventilation permettant de compenser la production excessive d'acidité volatile (H_2CO_3), par une élimination équivalente de CO_2 au niveau pulmonaire. Cette première réponse tend à rétablir le pH sanguin à la normale ($7,4 \pm 0,02$).
2. Si l'acidose se maintient au-delà de quelques heures voire jours, les mécanismes de compensation rénaux sont à leur tour stimulés (**figures 1, 2**). L'excrétion de NH_4^+ est accrue suite à l'activation de l'ammoniagénèse au niveau du tubule proximal et de la réabsorption des protons dans les parties distales du néphron. L'excrétion d'acidité se fait soit associée à des tampons urinaires (25 mEq/j), soit associée à des molécules d'ammoniac issues de la dégradation de la glutamine, permettant d'évacuer en moyenne 45 mEq d'acides/j. De retour à un état stable, le rein excrète une quantité de bases équivalente à la charge acide, se traduisant par une concentration en bicarbonates faible mais stable (Wiederkehr and Krapf, 2001).

1.1.4.2 Concept d'acidose métabolique latente

Le concept d'**acidose métabolique latente (AML)** désigne un état d'acidose de faible intensité, généralement bien compensé, qui se traduit par un pH sanguin pratiquement normal et des taux de bicarbonates peu altérés (Frassetto et al., 2001). La modification la plus sensible se situe au niveau de l'excrétion urinaire d'acidité, qui se trouve augmentée (pH urinaire entre 5,6 pour un apport de 140 mEq/j et 6,7 pour 20 mEq/j) (Remer, 2000; Remer and Manz, 1995).

Le phénomène d'AML sollicite au niveau de l'organisme les mécanismes compensatoires décrits précédemment, mais, à plus long terme sollicite d'autres systèmes en continu, en particulier les fonctions osseuses et musculaires. Le recrutement de ces systèmes est susceptible de contribuer à long terme à la génération d'effets métaboliques délétères pouvant conduire à l'apparition de calculs rénaux, d'altérations du tissu osseux, voire du tissu musculaire (**figure 2**) plaçant ainsi l'organisme dans un état catabolique (Alpern, 1995).

1.1.5 Conséquences physiopathologiques de l'AML à long terme

La littérature scientifique compte de nombreuses études présentant les conséquences des régimes alimentaires acidifiants sur la santé.

1.1.5.1 AML et calculs rénaux

Un régime fortement acidifiant peut générer une acidose métabolique. Cette phase initiale se poursuit par une adaptation des reins pour éliminer l'excès d'acidité engendré et ainsi maintenir le pH sanguin et la concentration en HCO_3^- à des plages normales (Alpern, 1995). Cependant, cette adaptation se traduit par la perturbation de l'homéostasie du Ca. Plusieurs études cliniques ont clairement démontré que l'acidose métabolique induisait des pertes de Ca (Osther, 2006; Remer and Manz, 1995; Rylander et al., 2006) au niveau rénal, en augmentant le risque de formation des calculs rénaux (Alpern, 1995). La nature des calculs urinaires est variable, avec cependant une prédominance de calculs à base d'oxalate de Ca (70% du total) et dans une moindre mesure de phosphates de Ca (14%) et de purines (10%) (Demigné, 2008).

1.1.5.2 AML et santé osseuse

Dans le cas où les mécanismes rénaux sont dans l'incapacité de maintenir l'EAB dans des limites convenables, l'organisme est susceptible de mobiliser le tissu osseux pour neutraliser la charge acide excédentaire (**figure 2**).

En effet, le système osseux constitue une réserve de bicarbonates et carbonates (Bettice, 1984) et la mobilisation de ce réservoir peut permettre de contrecarrer l'acidose (Barzel, 1995). L'action délétère de l'acidose métabolique sur le squelette a souvent été attribuée à la dissolution de la fraction minérale du tissu osseux, pouvant alors être comparé à « une colonne échangeuse d'ions géante » chargée d'éléments alcalins (Green and Kleeman, 1991). A l'état aigu, l'acidose métabolique cause la libération du HCO_3^- osseux associé à la libération du Na^+ et du K^+ . A l'état chronique, la mobilisation de l'os s'accompagne de la libération du CaCO_3 associée au remodelage osseux (Bonjour, 2013).

Il est donc probable que la sollicitation à long terme de ce système provoque une perte osseuse. Ceci semble également conforté par d'autres travaux ayant démontré d'une part une action inhibitrice sur la minéralisation de la matrice osseuse et, d'autre part, une action stimulatrice de la résorption (Hoebertz and Arnett, 2003). Il existe néanmoins de nombreux débats à ce sujet au sein de la communauté scientifique. L'un des impacts les plus étudiés concerne la perte de Ca, puisque 1 g de protéine en excès/j conduit à un supplément d'excrétion de Ca de l'ordre de 1,75 mg/j (Barzel and Massey, 1998). En pratique, un certain nombre d'études fait état d'une corrélation positive entre la consommation de protéines et l'incidence des fractures d'origine ostéoporotique chez la femme (Cao et al., 2011; Feskanich et al., 1996; Macdonald et al., 2005; Sellmeyer et al., 2001). A l'inverse, d'autres travaux ne montrent pas d'effet délétère (Devine et al., 2005; Mardon, 2007; Mardon et al., 2008), voire un effet protecteur des protéines pour le squelette humain (Bonjour, 2005; Hannan et al., 2000; Kerstetter et al., 2005).

1.1.5.3 AML et fonte protéique

Les états d'acidose sont susceptibles d'interférer avec le métabolisme normal des protéines plasmatiques et musculaires (May et al., 1986). L'acidose métabolique stimule la dégradation des AA essentiels et des protéines ; ainsi, les pertes en AA ramifiés (leucine, isoleucine, valine) sont dues à une induction de l'enzyme-clé de leur catabolisme, la déshydrogénase spécifique aux cétoacides ramifiés (Rodríguez-Bayona and Peragón, 1998). On conçoit qu'une élévation du catabolisme des AA ramifiés puisse limiter la protéosynthèse dans les tissus (Demigné, 2008). Parallèlement, l'acidose induit des mécanismes qui stimulent la dégradation des protéines musculaires à deux niveaux : l'activation de la 3-caspase qui clive la structure complexe des protéines musculaires en actine, myosine et autres fragments de protéine et leur décomposition ultérieure par l'activation du système ubiquitine-protéasome (Alpern, 1995; Mitch, 2008; Mitch and Goldberg, 1996). La dégradation du muscle a été montrée chez

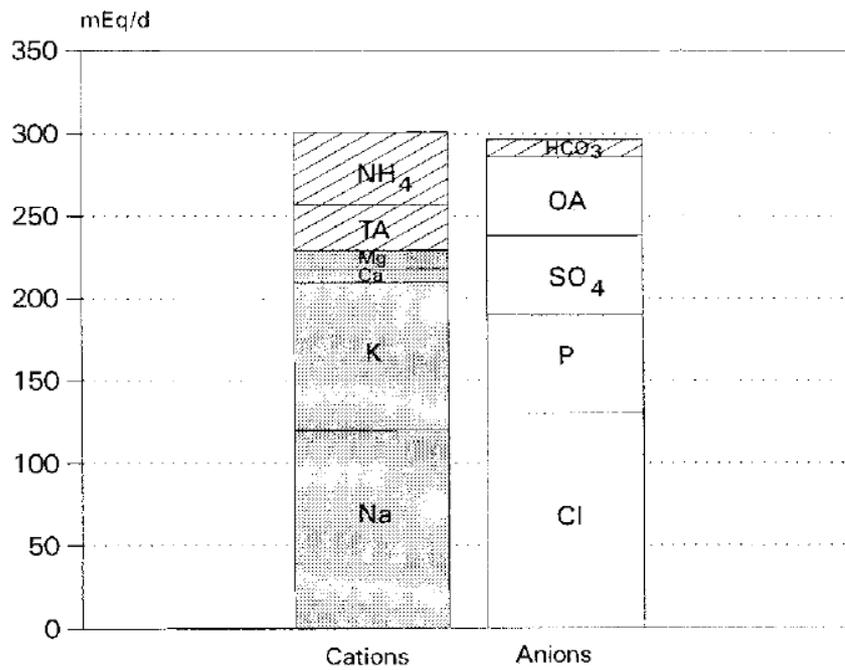


Figure 3. Ionogramme de l'urine (montrant tous les anions et les cations urinaires quantitativement importants) d'un adulte ayant un régime alimentaire mixte riche en protéines (Remer and Manz, 1995)

$$NAE_{\text{direct}} \approx NEAP_{\text{estimée}} = TA + NH_4 - HCO_3$$

$$NAE_{\text{indirecte}} \approx NAE_{\text{estimée}} = (Cl + P + SO_4 + AO^-) - (Na + K + Ca + Mg)$$

Abréviations utilisées : NH₄, ammonium ; TA, acidité titrable ; Mg, magnésium ; Ca, calcium ; K, potassium ; Na, sodium ; HCO₃, bicarbonate ; OA, acides organiques ; SO₄, sulfate ; P, phosphore ; Cl, chlorure.

le rat (May et al., 1986; Price et al., 1996; Williams et al., 1991) et chez l'homme (Ballmer et al., 1995; Reaich et al., 1992).

Les causes potentielles du développement d'une AML sont multiples : les maladies respiratoires, le vieillissement, la ménopause, l'exercice physique anaérobie excessif, le diabète, l'hypoxie, l'inflammation et un **régime alimentaire acidifiant**.

1.1.6 Estimation de la charge acide générée par les aliments

L'estimation de la charge acide générée par les régimes alimentaires a fait l'objet du développement de différents algorithmes. Idéalement, cette évaluation devrait se faire au travers de bilans urinaires, dans des conditions aussi rigoureuses que possible, par la mesure de la **NAE (Net Acid Excretion)** (Remer and Manz, 1994) :

- $NAE (\approx NEAP_{\text{estimée}}^3) = NH_4 + AT + HCO_3^-$, où AT = acidité titrable.

Théoriquement, d'après l'ionogramme (**figure 3**), la NAE rénale peut aussi être établie de la façon suivante :

$NAE = \Sigma \text{anions inorganiques acidifiants} + AO - \Sigma \text{cations alcalinisants excrétés par les reins}$

ce qui revient à la formulation suivante :

- $NAE_{\text{estimée}} = (Cl + P + SO_4 + OA) - (Na + K + Ca + Mg)$

Les anions organiques (AO) excrétés dans l'urine sont représentés en grande partie par le citrate et dans une moindre mesure le 2-cétoglutarate et l'oxalate, mais cette catégorie comporte aussi un très grand nombre d'anions mineurs issus de nombreuses voies métaboliques. Si les AO principaux peuvent être quantifiés assez aisément (chromatographie ionique, méthodes enzymatiques), la composition exhaustive en AO est très difficile à réaliser en routine (Demigné, 2008). Cette difficulté peut être contournée grâce à l'observation que l'excrétion d'AO est assez bien corrélée à des critères anthropométriques, tels que la surface corporelle, selon une formule du type (Berkemeyer and Remer, 2006) :

$$AO_{\text{est}} (\text{mEq/j}) = \text{surface corporelle} (\text{m}^2) \times 41 (\text{mEq/j}) / 1,73 (\text{m}^2).$$

³ D'un point de vue terminologie, à la suite du 2nd International Acid-Base Symposium de Munich en 2006, un comité scientifique a préconisé l'emploi du terme **NEAP_{estimée} (Net Endogenous Acid Production)** plutôt que de NAE (Frassetto et al., 2007a).

Tableau 4. Absorption intestinale¹ des minéraux et des protéines ainsi que les éléments pris en compte à la construction des facteurs de conversion du PRAL (de l'apport en nutriments (mg/100 g) en milliéquivalents), qui estiment l'excrétion urinaire des électrolytes correspondants induite par l'alimentation (Remer and Manz, 1995)

Nutriment ²	Absorption intestinale %	Masse atomique	Note	Ions urinaires	Facteurs de conversion en mEq
Na	95	23,0		Na	0,0413
K	80	39,1		K	0,0205
Ca	25	40,1	II ³	Ca	0,0125
Mg	32	24,3	II ³	Mg	0,0263
Cl	95	35,5		Cl	0,0268
P	63	31,0	1,8 ⁴	PO ₄	0,0366
Protéines	75	121,2 149,2	Cys (2%) ⁵ Mét (2,4%) ⁵	SO ₄	0,4888 x 10 ⁻³

¹ Chez les adultes avec une alimentation mixte

² Na, sodium ; K, potassium ; Ca, calcium ; Mg, magnésium ; Cl, chlorure ; P, phosphore

³ Valence des ions ;

⁴ Degré d'ionisation

⁵ Teneur moyenne en cystéine (Cys) et méthionine (Mét)

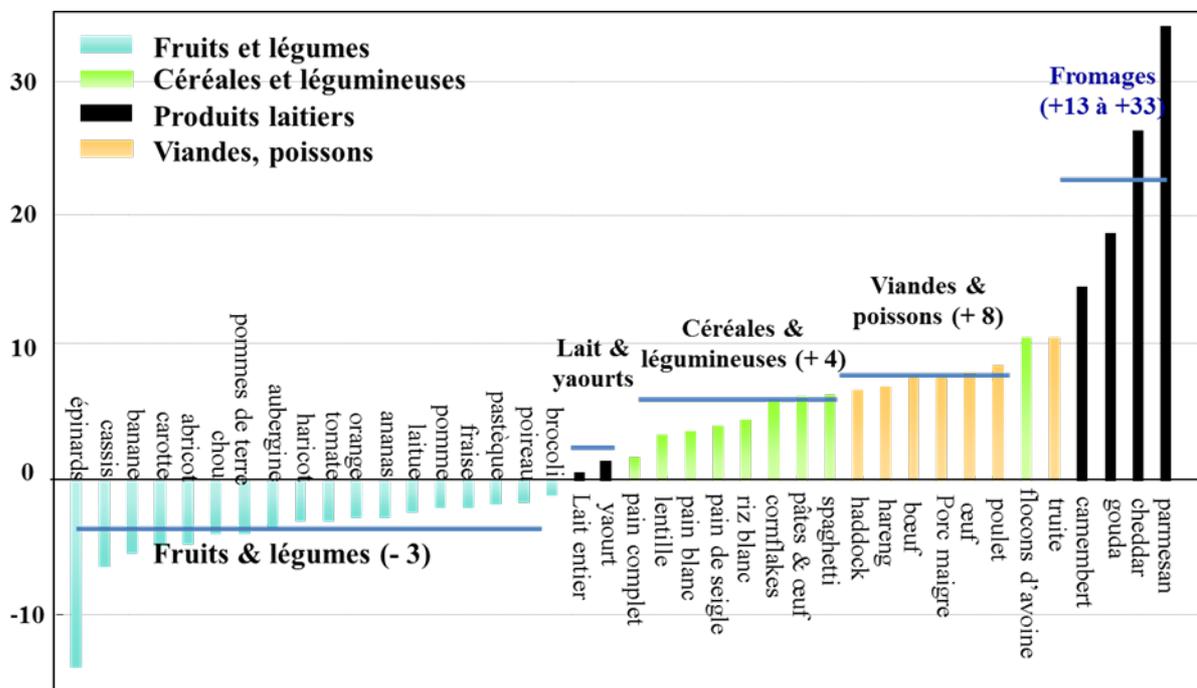


Figure 4. La charge acide rénale potentielle (PRAL) de certains aliments (pour 100 g de partie consommable) (d'après Remer and Manz, 1995)

Malgré tout, l'étude de la fonctionnalité acidifiante/alcalinisante d'un aliment ou d'un régime basée sur l'évaluation de la NAE nécessite des prélèvements sur sujets humains, généralement dans une structure médicalisée, ce qui reste lourd et coûteux. Par ailleurs, les mesures de NAE portent en général sur l'effet global d'un régime défini (typiquement sur 24 h), auquel on ajoute ou retranche un aliment donné, plutôt que sur l'effet spécifique de cet aliment donné isolément (Demigné, 2008).

Pour une plus grande praticité, l'équipe de Remer (1995) a proposé la formule du **PRAL (Potential Renal Acid Load, charge acide rénale potentielle)** qui estime l'excrétion urinaire des électrolytes parvenus par l'alimentation. Cette formule est basée sur la composition des aliments ingérés et peut être appliquée à la fois pour évaluer la charge acide rénale potentielle d'un régime alimentaire (mEq/j) ou d'un aliment donné (mEq/100 g):

- $$\text{PRAL (mEq/100 g)} = 0,49 \times \text{protéines (g/100 g)} + 0,037 \times \text{P (mg/100 g)} + 0,027 \times \text{Cl (mg/100 g)} - 0,04 \times \text{Na (mg/100 g)} - 0,021 \times \text{K (mg/100 g)} - 0,026 \times \text{Mg (mg/100 g)} - 0,013 \times \text{Ca (mg/100 g)}$$

La formule du PRAL repose sur la composition minérale et protéique (AAS) des aliments ingérés. La charge acide générée peut être déterminée via l'addition des teneurs en anions et la soustraction des teneurs en cations dans l'(les) aliment(s).

Néanmoins, ces électrolytes présentent des charges et des propriétés de dissociation différentes (**tableau 4**). Pour intégrer ces différences de façon adéquate, des facteurs de conversion ont été calculés. Pour cela, l'absorption intestinale (déterminée à partir des données de la littérature) a été divisée par la masse atomique des nutriments respectifs (Na = 23,0 ; K = 39,1 ; Ca = 40,1 ; Mg = 24,3 ; Cl = 35,5 ; P = 31,0) et par 100, permettant ainsi l'estimation de l'excrétion urinaire des nutriments en mmoles. Pour le Ca et le Mg, la valence ionique a été prise en compte (x 2). Pour le P, le degré d'ionisation au pH sanguin (pH = 7,4) (x 1,8) a été intégré afin de convertir les teneurs en nutriments en mEq. Pour la teneur en protéines totales, la teneur en AAS a été considérée, soit une moyenne de 2,4% pour la méthionine et 2,0% pour la cystéine. Les masses atomiques de la méthionine (149,2) et de la cystéine (121,2) ont été utilisées pour estimer la quantité de SO₄ métabolisé, en mEq (= mmoles SO₄ x 2) (Remer and Manz, 1995).

Cette formule a été utilisée pour calculer l'indice PRAL de divers produits alimentaires. Sur la base de ces calculs il est établi qu'un **PRAL positif** est caractéristique d'**aliments acidifiants** alors qu'un **PRAL négatif** désigne les **aliments alcalinisants** (**figure 4**).

Les tables de valeur du PRAL font clairement apparaître des groupes d'aliments très acidifiants: les viandes (9,5 mEq/100 g), les poissons (7,9 mEq/100 g), les fromages à teneur réduite en protéines (8,0 mEq/100 g) et les fromages à teneur élevée en protéines (23,6 mEq/100 g) (Remer and Manz, 1995). Les légumineuses présentent des PRAL faiblement positifs (0,5 mEq/100 g), les produits céréaliers présentent aussi des PRAL positifs (4 mEq/100 g). Le lait et les yaourts ont un impact neutre, avec un PRAL proche de zéro. Les PRAL négatifs, reflet d'un impact alcalinisant, sont retrouvés uniquement pour les fruits et les légumes. En dépit de la diversité de composition de ces aliments et des pertes éventuelles dues aux procédés culinaires, qui affectent en particulier les légumes (Demigné, 2008), les valeurs de PRAL sont relativement homogènes (- 3 à - 6 mEq/100 g) pour de nombreux produits végétaux, avec cependant quelques valeurs extrêmes (épinard - 14 mEq/100 g, raisin - 21 mEq/100 g).

Dans le cas de l'estimation de la charge acide d'un régime alimentaire sur la base de tables de composition, une formule simplifiée du PRAL a été proposée en 2003 dans laquelle les éléments Na et Cl ont été éliminés (Remer, 2003; Frassetto et al., 2007a). Cette simplification repose sur le fait que les deux nutriments se compensent complètement quand la différence « anion - cation » est calculée comme indice de la NAE (Remer and Manz (1994). Ceci a été expliqué par des absorptions intestinales équivalentes du Na et du Cl (**tableau 4**), en posant l'hypothèse que ces éléments sont majoritairement apportés par l'alimentation sous forme de **sel (NaCl)** et qu'ils s'annulent dans le calcul du PRAL et peuvent donc être omis. Cette simplification est très utile dans la mesure où, contrairement à la composition en Na des aliments de base qui est assez bien connue, celle des aliments transformés comme le pain, les charcuteries et les fromages est rarement mentionnée de façon exploitable, avec des valeurs de Na et surtout de Cl insuffisamment fiables (Demigné, 2008; Remer and Manz, 1994). Or, une incertitude de quelques pourcents sur les teneurs respectives en Na et Cl d'un produit suffit à déséquilibrer la valeur du PRAL et à le rendre ininterprétable en raison du poids du Na et du Cl dans le profil ionique des aliments. Néanmoins, cette simplification de formule conduit à trouver un PRAL identique pour un produit présenté sous une forme peu salée et une autre très salée. En réalité, ces deux aliments imposeront une charge ionique très différente au niveau du rein et nous verrons que le Na et le Cl présentent, à forte dose, des impacts potentiels sur le seuil d'excrétion rénal de certains cations et du bicarbonate (Demigné, 2008).

1.1.7 Le sel, facteur aggravant de l'acidose métabolique latente

Les effets néfastes d'un excès de sel dans l'alimentation sur l'hypertension artérielle (Blaustein et al., 2012), facteur de risque avéré des maladies cardiovasculaires (He et al., 2011),

sont largement démontrés. Mais d'autres conséquences délétères de la consommation excessive de sel sur l'AML (Frassetto et al., 2007b) ou encore sur le métabolisme osseux (Duff and Whiting, 1998; Schmidlin et al., 1999) sont également rapportées dans la littérature.

En ce qui concerne le métabolisme osseux, les études à long terme ne donnent pas de réponse univoque en raison des difficultés à contrôler la consommation effective de sel et des différences individuelles dans la sensibilité à un apport élevé de sel. Cependant, une relation entre l'apport en Na et la calciurie a pu être établie, selon laquelle une millimole de Ca serait perdue pour 100 millimoles de Na ingéré (Demigné, 2008). Le mécanisme le plus classiquement mis en cause est le fait que, lorsque l'apport de NaCl augmente, la réabsorption fractionnaire de Na diminue, conduisant en parallèle à une moindre réabsorption de Ca (Matkovic et al., 1995; Shortt et al., 1988). Plusieurs auteurs ont finalement montré qu'un apport excessif de NaCl alimentaire était susceptible de favoriser un état d'AML, vraisemblablement en affectant le seuil de réabsorption rénal du bicarbonate (Cogan et al., 1990; Morris et al., 2006). A ce titre, un apport en sel important est considéré comme un facteur aggravant de l'AML (Demigné, 2008; Frassetto et al., 2007b).

Cette première partie a mis en évidence les conséquences physiopathologiques de l'état d'AML, associé à une atteinte de la fonction rénale et probablement des tissus osseux et musculaires. Une telle situation peut être provoquée par une alimentation acidifiante quasi permanente, comme c'est le cas dans les régimes occidentaux.

Une méthode simple pour estimer la charge acide générée par un aliment est l'application de la formule du PRAL, indice établi à partir de la composition protéique et minérale de l'aliment considéré. Les travaux précurseurs de l'équipe de Remer (Remer & Manz, 1995) ont permis d'établir l'indice PRAL d'un certain nombre d'aliments. Il ressort nettement de ces calculs que les fromages constituent le groupe d'aliments le plus acidifiant. Depuis, très peu d'études se sont intéressées à cette caractéristique nutritionnelle des aliments. Les quelques travaux rapportés ont été menés sur le potentiel alcalinisant de certains produits végétaux (Sabbah et al., 2007; Narcy et al., 2006). Aucune étude n'a été menée sur le potentiel acidifiant des fromages, malgré leur caractère acidogène marqué.

Tableau 5. Teneurs en principaux nutriments pour certains fromages et propriétés associées (d'après ANSES, 2013; Gaucheron, 2013)

Fromage	Nutriments	Teneurs			Fonctions dans l'organisme	Bienfaits pour la santé
		Min.	Moy.	Max.		
Cheddar	Protéines (g)	24,9	25,5		Source d'acides aminés essentiels à la synthèse des protéines des parois cellulaires, fibres musculaires, enzymes et hormones.	Prévention contre les retards de croissance. Résistance et défense contre les infections.
Camembert		20	20,4	20,9		
Comté			28,1			
Feta (brebis)		14,4	15,2	15,8		
F. d'Ambert			19,8			
Parmesan		33	39,4			
Roquefort		16,9	19,1	21,5		
Cheddar		Calcium (mg)		720		
Camembert			245			
Comté	830		909	988		
Feta (brebis)	240		318	360		
F. d'Ambert	404		443	476		
Parmesan	1070		1200	1340		
Roquefort	490		601	771		
Cheddar	Phosphore (mg)			490	545	Métabolisme énergétique (ATP). Coenzyme NADP. Phospholipides des membranes cellulaires.
Camembert			261			
Comté		573	641	710		
Feta (brebis)		207	244	280		
F. d'Ambert		1030	1040			
Parmesan		680	810	1180		
Roquefort		392	572	912		
Cheddar		Magnésium (mg)		25	28	
Camembert			21,3			
Comté	36,5		43,7	51		
Feta (brebis)	16,5		20			
F. d'Ambert			16			
Parmesan	33		45			
Roquefort	24,2		29,5	33		
Cheddar	Potassium (mg)			77	120	Contrôle de la contraction musculaire. Equilibre des échanges cellulaires (avec Na).
Camembert			91,2			
Comté		112	116	120		
Feta (brebis)			95			
F. d'Ambert			111			
Parmesan		68	110	160		
Roquefort		78,3	110	151		
Cheddar		Sodium (mg)	610	670		
Camembert			670			
Comté	300		567	834		
Feta (brebis)	1030		1240	1440		
F. d'Ambert	837		921	1010		
Parmesan	446		1090	1710		
Roquefort	1140		1560	1840		

Abréviations utilisée : F. d'Ambert, Fourme d'Ambert ; Min., minimum ; Moy., moyenne ; Max. maximum ;

1.2 Fonctionnalités nutritionnelles des fromages

D'un point de vue nutritionnel, les fromages sont généralement des sources importantes en protéines, lipides et minéraux, même si leur composition est différente d'un type de fromage à l'autre (**tableau 5**), en fonction des technologies fromagères appliquées (Lucas et al., 2006c; Wijesinha-Bettoni and Burlingame, 2013).

1.2.1 Contribution des fromages aux apports nutritionnels

Les fromages sont d'excellentes sources de **protéines**, avec des teneurs variant de 4% à 40% en fonction du type de fromage (Fox and Guinee, 2013). Les matières protéiques laitières présentent un intérêt nutritionnel remarquable, de par leur teneur élevée en acides aminés essentiels et leur digestibilité de plus de 95%. Au cours de la phase d'affinage du fromage, la protéolyse partielle de la matière première (essentiellement la caséine insoluble) libère un ensemble de produits de dégradation azotés solubles (oligopeptides, acides aminés et amines de l'ammoniac). Selon les techniques de fabrication, chaque fromage possède des métabolites azotés à des concentrations propres (**tableau 5**), qui augmentent au fur et à mesure que l'affinage progresse. Le taux des acides aminés libres varie de 0,6 à 1,2%, les plus abondants étant la leucine et l'acide glutamique. Comme pour le lait, les acides aminés limitants des fromages sont les composés soufrés, surtout dans certains fromages à pâte molle (Ramet, 1985). Dans la littérature, la consommation de protéines laitières a été associée à la prévention de pathologies diverses, dont l'hypertension artérielle, les caries dentaires et même le cancer (Fox and Guinee, 2013; Jones et al., 2013; Josse et al., 2012).

Le fromage est souvent montré du doigt en raison de sa teneur relativement importante en **lipides** (de 6,8% pour le fromage blanc jusqu'à 38% pour Danish Blue, voire 41% pour les pâtes fraîches aux fines herbes) (Fox and Guinee, 2013). Cette matière grasse est majoritairement composée de triglycérides comportant jusqu'à 62% d'acides gras saturés (AGS). La littérature suggère qu'une consommation excessive d'AGS constituerait un facteur de risque des maladies cardiovasculaires (Gordon, 2013; Guenther et al., 2013; De Souza et al., 2015). Cependant, ces AGS sont nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme humain, étant utilisés comme source d'énergie, par exemple dans l'activité musculaire ou la synthèse de tissus (Fox and Guinee, 2013).

Le **lactose** est un élément nutritionnel important du lait, qui se retrouve en moindre quantité dans les fromages (environ 1% dans le fromage égoutté) (Fox and Guinee, 2013). Pour les êtres humains, il est la seule source de galactose, qui est un constituant des tissus nerveux.

Le lactose favorise par ailleurs la croissance des bactéries lactiques bénéfiques (du genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*) et l'apparition d'acide lactique dans le côlon, inhibant le développement d'une flore indésirable (Amiot et al., 2002).

Les concentrations en **vitamines liposolubles** dépendent principalement de la teneur en matière grasse des fromages. La plupart des vitamines liposolubles du lait est transférée dans le fromage au cours de sa transformation (Graulet et al., 2013). Des pertes de l'ordre de 15 à 35% pour la vitamine A et d'environ 65% pour la vitamine E ont été rapportées durant la fabrication et le stockage, résultant d'une dégradation oxydative par l'oxygène et par la lumière (Lucas et al., 2006c; Renner, 1993). En revanche, les teneurs en **vitamines hydrosolubles** dépendent de la teneur en humidité des fromages, une grande proportion d'entre elles étant perdue dans le lactosérum. Les propriétés des principales vitamines sont présentées dans le **tableau 5**. Les matières grasses laitières sont relativement riches en **acide linoléique conjugué**, reconnu pour ses propriétés antioxydantes et suggéré comme facteur anti cancérigène (Fox and Guinee, 2013).

Les **minéraux** majoritaires des produits laitiers, le **Ca**, le **P** et le **Mg** sont aussi les trois principaux constituants minéraux des os, où se concentrent, respectivement, 99%, 85% et 50% du total de ces éléments dans l'organisme (Gaucheron, 2013). Ces trois minéraux, en plus d'être requis pour la croissance et le maintien d'un squelette en bonne santé, permettraient de diminuer l'hypertension artérielle (Miller et al., 2000; Ruidavets et al., 2006). Le **Ca** extra-osseux intervient au niveau des muscles (excitabilité et contraction), dans la coagulation sanguine et la perméabilité membranaire (Gaucheron, 2013). Les fromages contribuent de manière significative (plus de 50%) à l'apport en Ca des populations occidentales (Fox and Guinee, 2013). Le **P** est un constituant fondamental des cellules et intervient dans tous les processus vitaux. Son apport par les produits laitiers est cependant moins primordial que celui du Ca, car notre alimentation courante en fournit déjà des quantités supérieures aux apports nutritionnels recommandés (Amiot et al., 2002). A cet égard, le **rapport Ca/P** du lait de vache (voisin de 1,2), est de loin supérieur à celui des autres denrées alimentaires (pain 0,28 ; pâtes 0,15 ; pommes de terre 0,25 ; viande 0,05 ; œufs 0,27), faisant du lait une excellente source de Ca et un bon correctif des rations pauvres en Ca (FAO, 1995; Randoin and Jourdan, 1952a). Ce rapport est encore bien plus élevé dans les fromages (1,33 à 2), pouvant atteindre des valeurs maximales de 2,23 pour le fromage Hollande et de 2,4 pour le Livarot (Randoin and Jourdan, 1952b). Les fromages sont donc des aliments intéressants pour parvenir au niveau du rapport Ca/P recommandé par l'ANSES, compris entre 1 et 1,5 (ANSES, 2014).

Réduire le potentiel acidifiant des fromages pour améliorer leurs fonctionnalités nutritionnelles

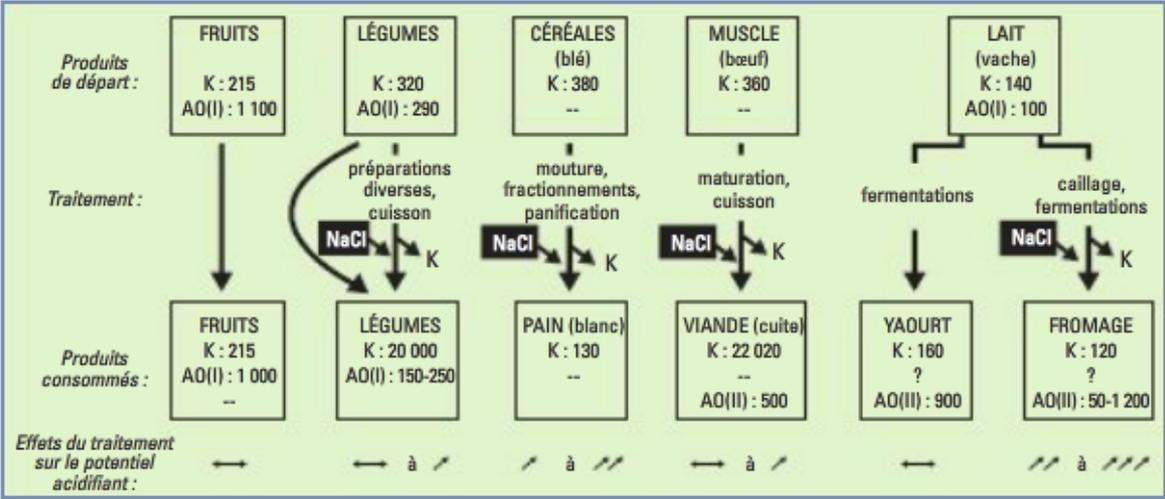


Figure 5. Effets des traitements subis par les aliments sur leur potentiel acidifiant. AO, anions organique (Demigné et al., 2004b)

Le **Mg** est aussi impliqué dans un grand nombre de fonctions cellulaires, comme le métabolisme énergétique, la réplication de l'ADN, l'activation des certaines enzymes (Gaucheron, 2013).

Parmi les éléments du lait, les minéraux sont bien absorbés et retenus. Le Ca est absorbé par transport actif et diffusion passive par la muqueuse intestinale. Un des principaux facteurs de l'absorption du Ca est la vitamine D, qui opère principalement par son métabolite le plus actif la 1,25-dihydroxy-vitamine D (calcitriol) et son récepteur intestinal (Gaucheron, 2013). Les protéines, les caseinophosphopeptides, le lactose et l'acidité améliorent l'absorption du Ca (Bennett et al., 2000; Mora-Gutierrez et al., 2007). Le Ca du fromage est reconnu comme très biodisponible (Buchowski and Miller, 1990), du fait de la présence de caseinophosphopeptides produits lors de la protéolyse.

En outre, les fromages sont identifiés sur les listes des principaux aliments vecteurs de **sel**, après les soupes, les sauces, la charcuterie, les produits céréaliers (Chekri et al., 2012; Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt, 2013). A titre d'exemple, une consommation de 40 g de fromage (avec une teneur en sel de 2%) par jour équivaut à 16% de la consommation recommandée de sel pour un adulte (OMS, 2014). D'après l'enquête INCA2, les fromages apportent 206 mg de **Na** par jour et par personne en moyenne, ce qui représente 10 % de l'apport quotidien recommandé.

1.2.2 Le potentiel acidifiant des fromages

De la composition en protéines et en minéraux du fromage peut être déduit son indice PRAL. Comme détaillé précédemment, les fromages représentent la catégorie d'aliments la plus acidifiante. Remer et Manz (1995) ont constaté que les fromages à teneur réduite en protéines présentaient un PRAL moyen de 8,0 mEq/100 g (avec 4,3 mEq/100 g pour le fromage tartinable et 11,1 mEq/100 g pour le fromage Quark). Par contre, les fromages à haute teneur en protéines présentaient un PRAL moyen de 23,6 mEq/100 g, avec un maximum de 34,2 mEq/100 g pour le Parmesan. Cependant, le lait, qui est la principale matière première des fromages, est considéré comme un aliment relativement neutre, ayant un indice PRAL proche de zéro (0,7 mEq/100 g). Le yaourt nature, qui n'est autre que du lait caillé à l'aide de ferments et qui ne subit que peu ou pas d'égouttage, présente lui aussi un PRAL proche de zéro (1,5 mEq/100 g). Le potentiel acidifiant des fromages dépendrait donc vraisemblablement des technologies fromagères appliquées.

Il a bien été suggéré dans la littérature que le caractère acidifiant des fromages était révélé au cours de la transformation (figure 5) et résulterait très probablement des modifications

Réduire le potentiel acidifiant des fromages pour améliorer leurs fonctionnalités nutritionnelles

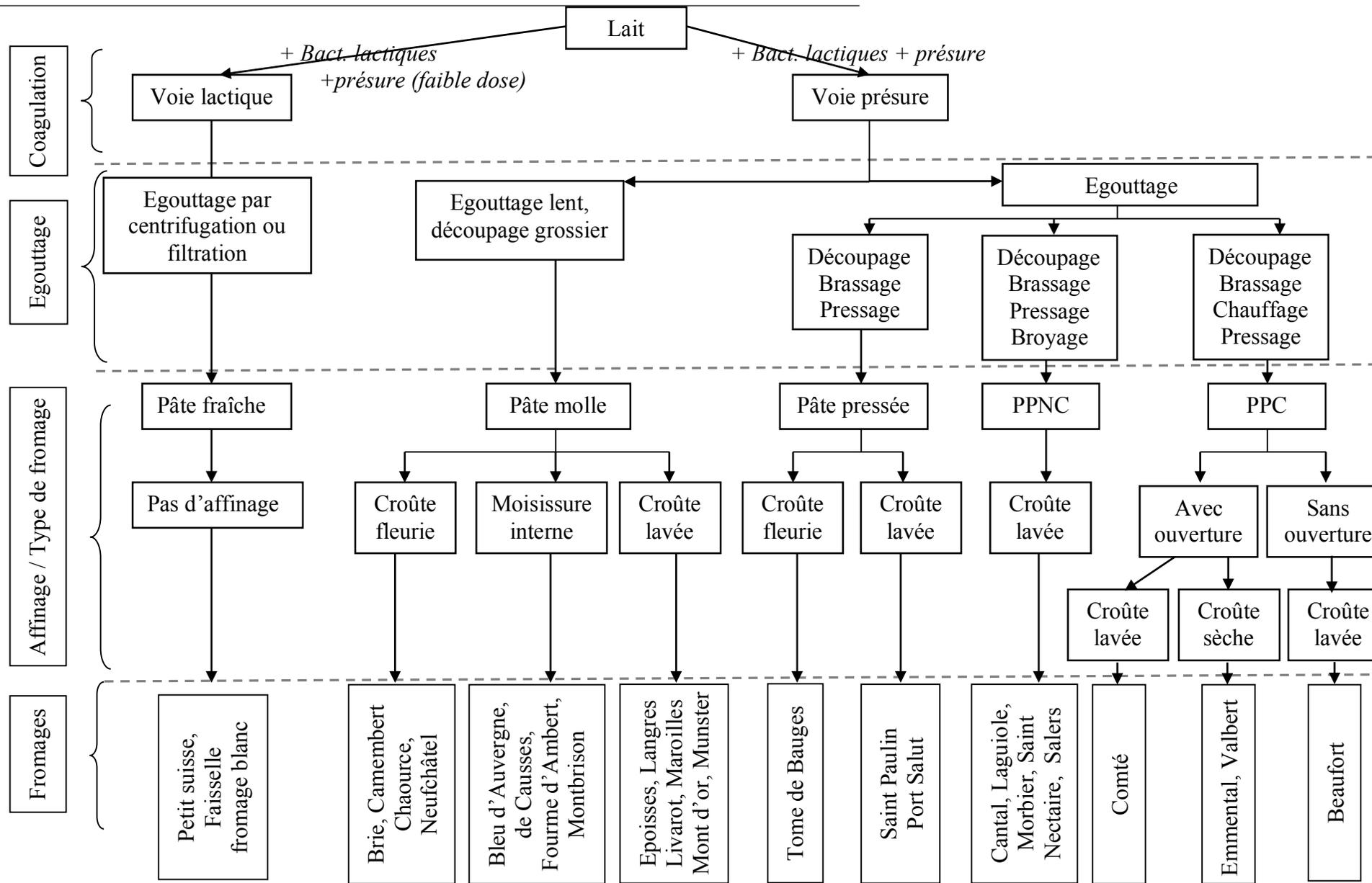


Figure 6. Classification des fromages (d'après St-Gelais and Tirard-Collet, 2002)

affectant la composition en protéines, en cations et en anions du produit (Demigné et al., 2004b). Néanmoins à l'heure actuelle, aucune étude n'a été menée pour caractériser précisément ce phénomène, comprendre ses déterminants et son évolution.

1.3 Conception du fromage

Parmi les 400 variétés de fromages⁴ obtenues à partir du lait de vache, de chèvre, de brebis et de bufflonne, peuvent être distinguées huit familles de fromages : les pâtes fraîches, les pâtes molles à croûte fleurie, les pâtes molles à croûte lavée, les pâtes persillées, les pâtes pressées cuites (PPC), les pâtes pressées non cuites (PPNC), les fromages fondus et les pâtes filées. En France, sept fromages bénéficient du signe de qualité Label Rouge (LR), quatre d'une Indication Géographique Protégée (IGP) et quarante-six autres d'une Appellation d'Origine Protégée (AOP) ou Appellation d'Origine Contrôlée (AOC) (INAO, 2015). En particulier, les fromages AOP du Massif-Central représentent 34% de la fabrication française totale des fromages AOP.

Cette grande diversité de fromages est obtenue grâce à la source et la composition du lait et ainsi qu'aux variations de certains paramètres de fabrication (**figure 6**).

1.3.1 *Processus de fabrication des fromages*

Le lait, matière première du fromage, est un système complexe dans lequel 3 phases distinctes coexistent :

- la phase aqueuse, qui contient l'eau (87%) et les produits solubles (lactose, minéraux, protéines solubles) (6,2%) qui forment le lactosérum ;
- la suspension colloïdale micellaire (2,6%) qui est transformée par coagulation des caséines en caillé ;
- l'émulsion (4,2%), qui est transformée en crème par effet de gravité, suite à la remontée à la surface des globules gras (Jensen et al., 1995).

La fabrication fromagère consiste donc à retirer l'eau du lait ce qui a pour conséquence de concentrer 6 à 12 fois une partie des protéines, lipides, minéraux et vitamines.

⁴ Selon la norme *Codex alimentarius*, le **fromage** est défini comme le produit affiné, de consistance molle ou semi-dure, dure ou extra-dure qui peut être enrobé et dans lequel le rapport protéines de lactosérum/caséines ne dépasse pas celui du lait. Le fromage est obtenu par coagulation complète ou partielle du lait grâce à l'action de la présure ou d'autres agents coagulants appropriés et par égouttage partiel du lactosérum résultant de cette coagulation.

Réduire le potentiel acidifiant des fromages pour améliorer leurs fonctionnalités nutritionnelles

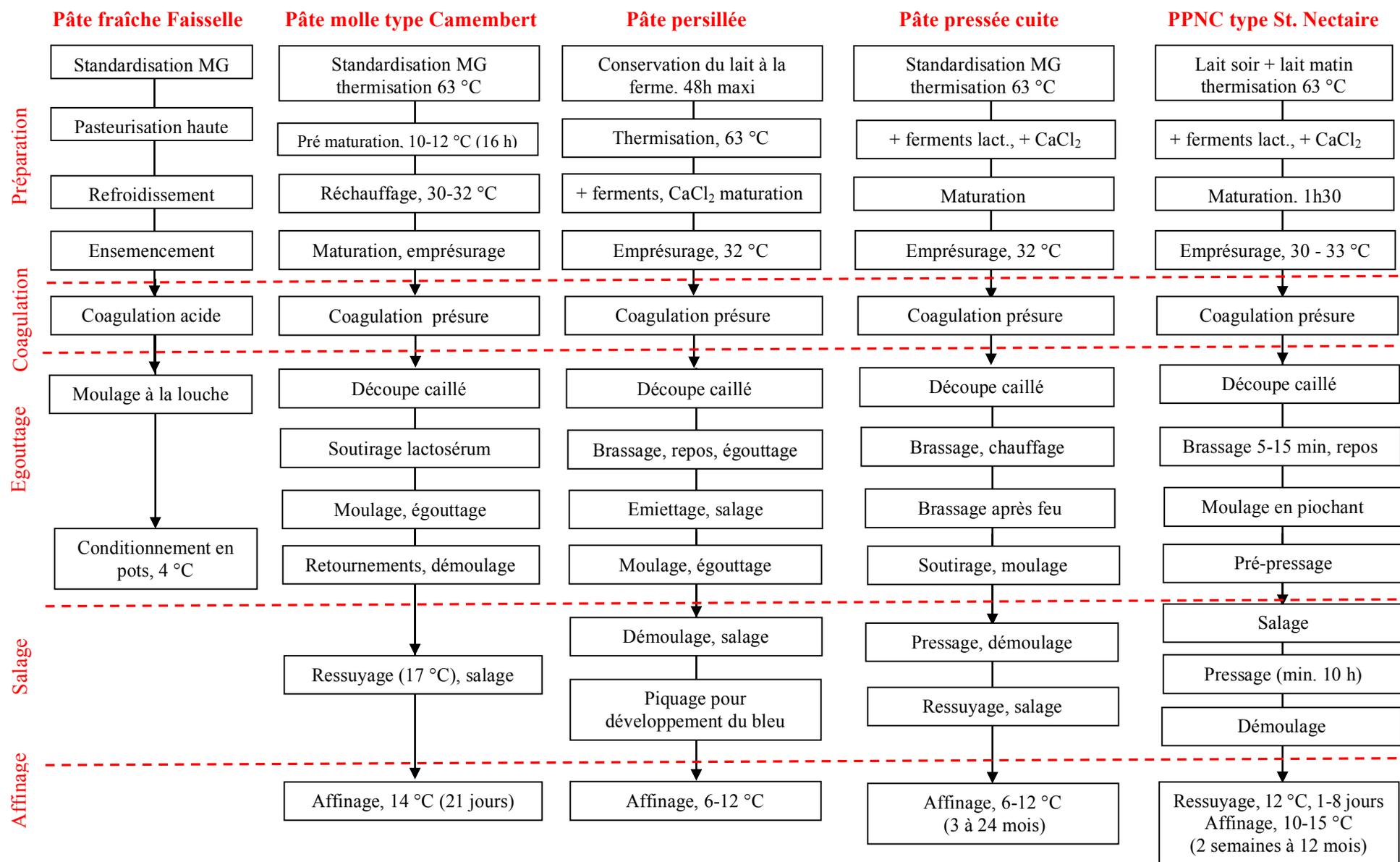


Figure 7. Technologies de fabrication de cinq types de fromage (extrait des cahiers des charges)

Les processus impliqués dans la fabrication fromagère sont : la préparation du lait, la coagulation, l'égouttage, le salage et l'affinage (**figure 7**).

1.3.1.1 Composition de la matière première – le lait

La concentration moyenne en **protéines** du lait de vache est de 3,2%. Parmi les protéines laitières on distingue les caséines (80%) et les protéines du lactosérum (20%). Les caséines se regroupent sous forme sphérique appelée micelle, dont l'unité de base est la sous-micelle composée de 4 caséines principales α (s_1 , s_2), β et κ reliées par des ponts phosphocalciques (**figure 8**) (Walstra et al., 2005). Dans des conditions normales, plusieurs constituants sont échangés entre la phase micellaire et la phase aqueuse. C'est le cas des minéraux ou de la caséine β qui peuvent se solubiliser à froid et réintégrer la micelle lorsque la température remonte. Lorsque les conditions physico-chimiques du milieu (température, pH) changent, ou lorsque des modifications biologiques (enzymes), chimiques (acidification, addition de minéraux) ou encore technologiques (traitement thermique, refroidissement) ont lieu, ces échanges peuvent varier de manière qualitative et quantitative (Gaucheron, 2005).

Les **minéraux** du lait (**tableau 6**) se distribuent entre la phase soluble et la phase micellaire :

- La **fraction aqueuse** contient la quasi-totalité des ions monovalents (K, Na, Cl) (Gaucheron et al., 2004). Ainsi, le Na, le K et le Cl existent principalement sous forme d'ions libres alors que les éléments Ca et Mg sont préférentiellement présents sous forme de sels tels que le citrate de Ca ou le citrate de Mg. Le phosphate est majoritairement sous forme libre et son état d'ionisation dépend du pH du milieu ($H_2PO_4^-$ ou HPO_4^{2-}). Il est également associé au Ca ($CaHPO_4$), sel très peu soluble.
- Dans la **fraction micellaire**, on trouvera majoritairement les ions à valence multiple : Ca, phosphate et Mg (Gaucheron, 2004). Le Ca est l'élément le plus abondant dans le lait, très majoritairement présent dans la fraction écrémée (99%). Deux-tiers du Ca laitier est présent sous forme de phosphate de Ca dans la phase colloïdale, par exemple, lié aux micelles de caséines, ou sous forme d'ions Ca^{2+} liés aux phosphosérines. Le tiers restant peut-être trouvé dans la phase soluble du lait, dont 10% se trouve sous forme ionique (Ca^{2+}) et le reste sous forme de citrate de Ca (Zamberlin et al., 2012). Le P est aussi un élément majeur du lait, présent à hauteur de 20% sous forme de

Tableau 6. Répartition des minéraux entre la fraction aqueuse et la fraction micellaire du lait (d'après Gaucheron et al., 2004)

Minéraux	Total (mg/kg)	Fraction (mg/kg)	
		micellaire	soluble
Ca	1250	900 (72%)	350 (28%)
P	Total	530 (56%)	420 (44%)
	dont inorganique	420 (58%)	300 (42%)
Mg	115	45 (39%)	70 (61%)
Na	425	25 (6%)	400 (94%)
K	1600	100 (6%)	1500 (94%)
Cl	1100	0	1100 (100%)

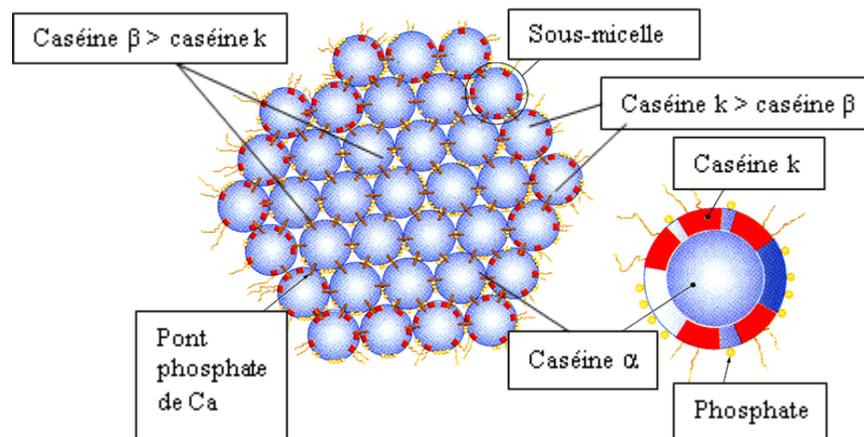


Figure 8. Micelle et sous-micelle de caséine ((Walstra, 1990)

phosphate organique lié aux caséines et à 80% sous forme de phosphate inorganique (44% lié aux micelles de caséine et 56% dans la phase soluble, majoritairement sous forme d'ions phosphate). Dans le lait de vache, 98 à 100% du Mg se trouve dans la phase écrémée, dont 63% dans la phase soluble (40% citrate de Mg, 7% comme phosphate de Mg et 16% d'ions libres). Le Mg restant dans la phase écrémée est lié aux micelles de caséine (50% au phosphate de Ca et 50% aux phosphosérines dans les caséines) (Zamberlin et al., 2012).

Les différentes formes minérales de la phase soluble et de la phase colloïdale sont en équilibre les unes avec les autres et peuvent évoluer selon les modifications du milieu (pH, température, acidification, addition de minéraux, etc.).

La teneur en lipides du lait de vache varie entre 3 et 5%. Les lipides du lait se composent principalement de triglycérides, de phospholipides et d'une fraction insaponifiable constituée en grande partie de cholestérol et de β -carotène (Gordon, 2013). Le lactose est le principal glucide du lait, il représente entre 4,2 et 5,2% du lait (Crisà, 2013).

1.3.1.2 Aptitude du lait à la transformation fromagère

L'aptitude fromagère du lait s'exprime à travers son rendement fromager, la composition du produit final, qui doit respecter des normes précises et la qualité organoleptique du fromage obtenu. La composition du lait et particulièrement ses teneurs en caséines et MG déterminent principalement son aptitude fromagère (Piacere and Elsen, 1992).

L'eau qui est éliminée en proportions variables en fonction de la variété de fromage entraîne avec elle une partie des éléments solubles et les protéines du sérum (Brulé et al., 2006). Elle a une incidence directe sur la fermeté du fromage, donc sur la texture. Contribuant au rendement fromager, l'eau est indispensable aux microorganismes en influençant leur croissance et ainsi la vitesse de fermentation et d'affinage du fromage. Une teneur plus importante en eau induit une hydrolyse plus rapide des caséines, de la MG et du lactose par les enzymes microbiennes (St-Gelais and Tirard-Collet, 2002).

La matière grasse joue un rôle important dans la formation de la structure du fromage. En effet, le fromage consiste en une matrice composée de caséines et de minéraux dans laquelle la MG est emprisonnée. Elle contribue au rendement fromager. Ainsi, il faut adapter les procédés de transformation pour retenir au maximum la MG et diminuer les pertes dans le lactosérum. Une augmentation du rapport caséine/MG induirait un égouttage problématique,

avec des pertes trop importantes de MG dans le lactosérum, ainsi que des changements de la saveur et de la texture du produit final (Eck and Gillis, 1997).

Les caséines constituent la pièce maîtresse de la fabrication fromagère, ce sont elles qui créent la matrice du fromage, en formant des micelles de caséine stables qui sont en équilibre avec la phase soluble du lait (Brulé, 1991). Lorsque les bactéries lactiques (flore naturelle ou ajout de levain) transforment le lactose du lait en acide lactique, le pH du lait diminue (McSweeney and Fox, 2004). Au fur et à mesure de l'abaissement du pH, les résidus acides libres des caséines fixent des protons et de ce fait augmentent la solubilité du phosphate de Ca micellaire. La neutralisation des charges négatives en surface entraîne une agrégation des micelles. Lorsque le point isoélectrique des caséines est atteint (pH = 4,65) (Walstra et al., 2005) le phosphate de Ca est dissout et les micelles sont totalement déstructurées.

Le caillé lactique est obtenu par des liaisons hydrophobes, hydrogènes et électrostatiques. Cependant, en présence d'une enzyme, comme la chymosine, la k-caséine est hydrolysée. Dès lors, les micelles deviennent instables, puis forment en présence des minéraux un réseau de caséines qui se gélifie progressivement, pour former un caillé de type présure, plus ou moins ferme (Brulé et al., 2006).

Selon le type de caillé, la caséine, retient plus ou moins de MG, de minéraux, d'eau et d'éléments solubles, ce qui a une incidence directe sur le rendement fromager (St-Gelais and Tirard-Collet, 2002).

En ce qui concerne les minéraux, l'état d'équilibre des formes calciques influence les caractères physicochimiques du lait, les dimensions des micelles de caséine, la stabilité et d'une façon plus générale le comportement technologique du lait. En particulier, les teneurs en ions libres et en phosphate de Ca colloïdal influencent l'aptitude à la coagulation par la présure. Dans les fromages de type présure, plus de la moitié du P et des cations divalents (Ca et Mg) sont retenus dans le caillé. En revanche, une bonne partie des cations monovalents (Na et K) est éliminée dans le lactosérum (Gaucheron, 2004; Mietton et al., 2004).

1.3.1.3 Préparation du lait à la transformation fromagère

Avant d'être transformé en fromage le lait doit subir une préparation qui vise :

- La **standardisation biologique** qui a pour objectif de détruire par traitement thermique la flore banale et pathogène tout en conservant au mieux les qualités sensorielles du lait, en créant des conditions favorables aux étapes technologiques qui suivront (Hermier and Cerf, 2006).

- La **standardisation de la composition** par retrait ou ajout de MG (Maubois, 1997).
- La **correction technologique de l'état de minéralisation** final du caillé. Certains traitements technologiques comme le refroidissement et le chauffage peuvent être à l'origine de modifications comme le déplacement du Ca lié aux caséines vers le Ca libre, entraînant des difficultés de coagulation. Les industriels ajoutent 0,1 à 0,2 g/L de CaCl_2 pour améliorer l'aptitude à la coagulation du lait (Lenoir and Remeuf, 2006).
- La **maturation du lait** a pour objectif de rétablir les équilibres physico-chimiques du lait donnant une meilleure aptitude à la coagulation et de permettre le développement d'une flore dominante de bactéries lactiques au détriment des germes nuisibles (Jeanson, 2000). Selon les types de fromage fabriqués, différentes techniques de maturation du lait sont appliquées : maturation biologique chaude ou froide, par addition de levain lactique avant ou après traitement thermique (Desmazeaud, 1997).

1.3.1.4 Mécanisme de coagulation du lait

La coagulation du lait, qui se traduit par la formation d'un gel, résulte des modifications physicochimiques intervenant au niveau des micelles de caséines. Les mécanismes proposés dans la formation du coagulum diffèrent totalement selon que ces modifications sont induites par acidification ou par action d'enzymes coagulantes.

1.3.1.4.1 Coagulation par acidification

La coagulation par voie acide est provoquée par le ferment lactique qui transforme le lactose en acide lactique. L'acidification doit être lente et progressive. En effet, une acidification rapide et brutale (par un acide minéral ou organique) du lait entraîne la formation d'un précipité. Une acidification lente et progressive peut être obtenue par des ferments lactiques et conduit à la formation d'un gel lisse homogène, qui occupe entièrement le volume initial du lait (Brulé et al., 2006). L'abaissement du pH a pour effet de protoner les groupements acides libres des caséines (résidus aspartiques, glutamiques, phosphosériques). Cette protonation provoque une réduction du potentiel de surface conduisant à la formation du gel lactique et a pour conséquence de diminuer le pouvoir séquestrant des caséines α et β et d'augmenter la solubilité du phosphate de Ca micellaire (Le Graet and Brulé, 1993). Même une légère acidification modifie suffisamment la structure micellaire pour que les caséines deviennent instables à la chaleur. Ainsi, lorsque le pH passe de 6,7 à 5,5, les charges négatives

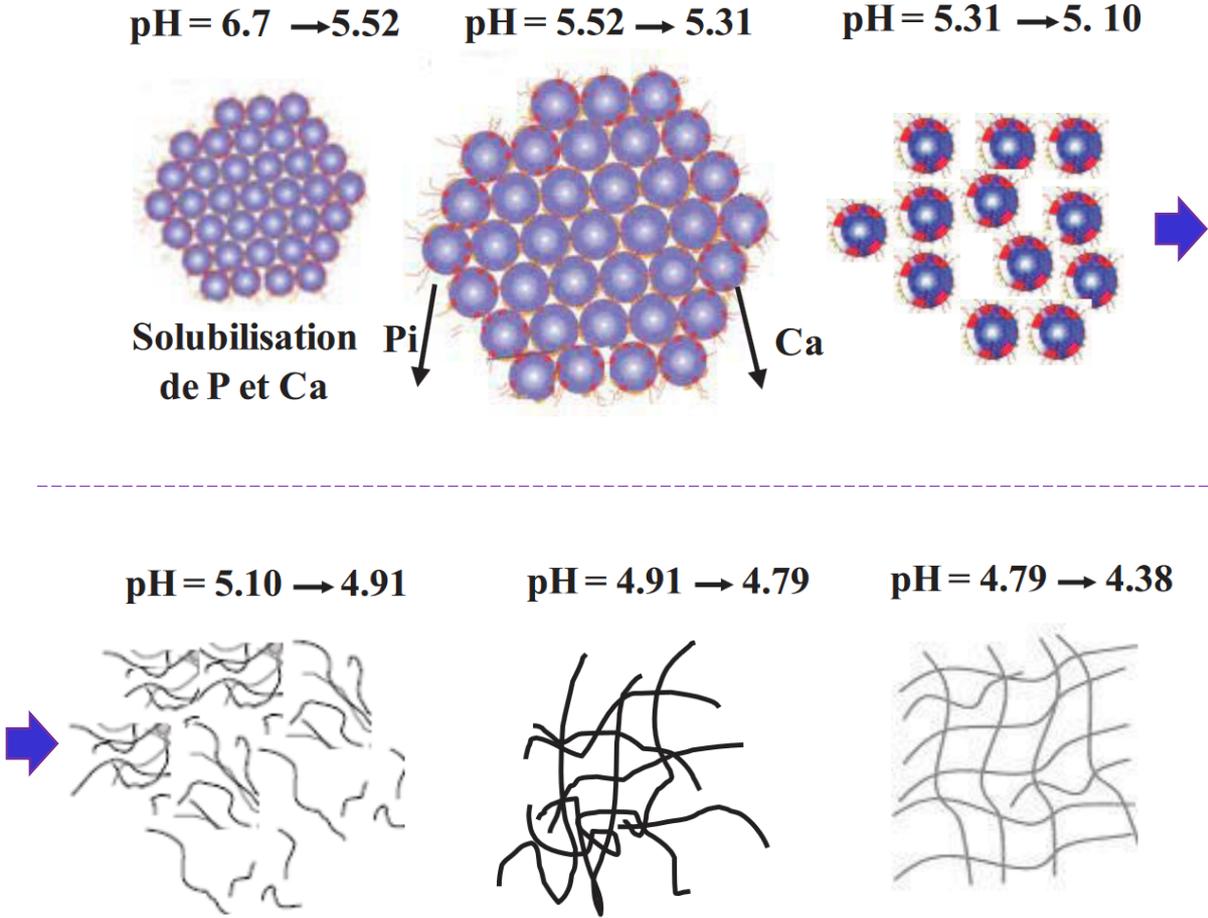


Figure 9. Evolution de la structure des caséines au cours de la coagulation acide (30 °C)
(d'après Walstra, 1990)

présentes à la surface des micelles de caséines sont neutralisées, ce qui produit une augmentation du diamètre moyen des micelles (de 180 à 1300 nm) causée par l'agglomération des petites micelles aux plus grosses (**figure 9**). L'acidification se poursuit jusqu'au point isoélectrique des caséines, soit au pH de 4,65. Les micelles perdent complètement leurs structures par dissolution du calcium micellaire.

Dès lors, les caséines sont dénaturées et perdent leur propriété de suspension colloïdale (Le Graet and Brulé, 1993). Les protéines subissent alors des étirements, peuvent s'enchevêtrer et former un gel. Le coagulum obtenu est le résultat de la formation d'un réseau protéique insoluble englobant dans ses mailles la totalité de la phase aqueuse. Ce type de gel est ferme, extrêmement friable et ne présente qu'un très faible pouvoir de synérèse et donc une aptitude à l'égouttage extrêmement limitée.

1.3.1.4.2 *Coagulation par voie enzymatique*

Plusieurs enzymes protéolytiques d'origine animale (présure, pepsine), végétales (broméline, ficine, chardon) ou microbiennes (enzymes de certaines moisissures ou de bactéries) ont la propriété de coaguler les caséines du lait. Cependant, en France, seule la présure est utilisée dans l'industrie fromagère (Ramet, 1985). La présure, sécrétée dans la caillette de veau non sevré, est un mélange de chymosine (80%) et de pepsine (20%).

L'addition de la présure au lait provoque la coagulation par hydrolyse de la caséine k située en périphérie de la micelle. Cette hydrolyse scinde la liaison peptidique 105-106 et libère le glycomacropéptide qui est la partie hydrophile de la caséine k chargée négativement et responsable des répulsions électrostatiques. La partie restante de la micelle est la paracaséine-k qui est plus hydrophobe et peut se lier avec d'autres paracaséines par des liaisons hydrophobes pour créer un coagulum. Cette coagulation commence par une agrégation des petites micelles, puis se complète par l'agrégation des plus grosses micelles pour former un gel de paracaséine (St-Gelais and Tirard-Collet, 2002). Ce type de gel structuré possède une bonne élasticité, une friabilité réduite et un fort pouvoir de contraction, lui conférant ainsi une bonne aptitude à l'égouttage.

En pratique fromagère, la coagulation est toujours obtenue par l'action conjointe d'une préparation enzymatique coagulante et de l'acidification. L'importance de chacun de ces deux modes de coagulation induit des propriétés particulières du coagulum qui conditionnent l'aptitude à l'égouttage et les caractéristiques finales du fromage.

1.3.1.5 Egouttage du coagulum

Macroscopiquement, l'égouttage se traduit par une élimination importante de lactosérum et s'accompagne d'une rétraction et d'un durcissement du gel. L'égouttage spontané d'un **gel lactique** est lent et limité, il conduit à un caillé hétérogène, présentant des teneurs en matières sèches peu élevées et un faible niveau de minéralisation : le réseau peu réticulé ne subit qu'une faible contraction. Le **gel présure** présente une forte cohésion, élasticité et porosité mais une perméabilité faible, conduisant à un égouttage spontané limité (Walstra et al., 1999). Pour accélérer le phénomène d'égouttage, différentes actions mécaniques peuvent être appliquées (tranchage, brassage, chauffage, pressage), qui confèrent une composition chimique variable du caillé, selon le type de procédé (Fox and Guinee, 2013).

Bien que la plus grande partie de l'eau constitutive du lait soit éliminée lors de l'égouttage, ce dernier n'est pas une simple déshydratation; la plus grande partie des éléments solubles du lait (protéines hydrosoluble, citrate, lactose et sels minéraux) et quelques fractions insolubles mineures (azote et matière grasse) sont en effet expulsées du gel conjointement à l'eau (Fox and Guinee, 2013; Ramet, 1985). A l'opposé, la presque totalité de la caséine et de la matière grasse se retrouve dans le fromage sous forme plus ou moins concentrée en fonction de la teneur en lactosérum résiduel (Fox and Guinee, 2013). Quantitativement, la matière sèche du lait de vache (125 g/L) se trouve répartie pour moitié dans le fromage, l'autre moitié se retrouvant dans le lactosérum (Fox and Guinee, 2013; Ramet, 1985).

Malgré son apparente simplicité, l'égouttage est un phénomène complexe dont les mécanismes sont encore peu connus. Cette situation résulte principalement des difficultés de l'expérimentation liées au caractère très fragile du gel qui limite les possibilités de mesures répétitives (car souvent destructives) ainsi qu'à la multiplicité des facteurs et des interactions qui conditionnent la séparation du lactosérum (Fox and Guinee, 2013).

1.3.1.6 Etape de salage

Le salage est une étape indispensable dans la fabrication des fromages destinés à subir un affinage. Il consiste à enrichir la pâte en chlorure de sodium, au taux moyen de 2%. Le rôle principal du sel est d'agir comme agent de conservation en raison de sa capacité à réduire l'activité de l'eau qui empêche la croissance de la plupart des microorganismes indésirables.

Le rôle secondaire du sel est sa contribution à la saveur du fromage (El-Bakry, 2012). L'incorporation de 1 à 2% de NaCl relève la saveur du produit et peut masquer en même temps certaines composantes organoleptiques indésirables.

Le goût salé est très apprécié par les consommateurs, étant considéré comme l'une des saveurs de base, en raison de l'ion sodium, qui donne le goût caractéristique désiré au fromage (Floury et al., 2009).

En outre, le sel interagit avec les principaux composants du fromage et joue ainsi un rôle essentiel dans les propriétés fonctionnelles du fromage. Il complète l'égouttage sous l'effet de la pression osmotique, permet l'arrêt de l'acidification du caillé et prévient une déminéralisation excessive de la pâte. Le sel a une fonction essentielle dans l'hydratation des protéines et la modification de la capacité de liaison de l'eau des caséines à l'intérieur de la matrice et dans la viscosité du fromage, ce qui affecte la stabilité et les propriétés texturales (El-Bakry, 2012).

1.3.1.7 Modalités de salage des fromages

Divers procédés de salage des fromages ont été proposés : le salage par frottage du sel à la surface du fromage, par immersion en saumure ou par salage des grains de caillé avant la mise en moule (Bintsis, 2006; Guinee, 2004). Le mode de salage le plus employé est le salage en surface ; le salage dans la masse pratiqué soit au niveau du lait, soit avant moulage au niveau du grain de caillé, est limité à un nombre restreint de fromages caractérisés par une structure de pâte (Cheddar, Cantal, Fourme de Montbrison) ou par une absence de croûte (Guinee, 2004; Guinee et al., 2000; Ramet, 1985).

1.3.1.7.1 Salage à sec

Le salage à sec consiste à appliquer du sel sec à la surface du fromage encore humide. Dans un premier temps, le sel se dissout dans l'eau du fromage et forme un film de saumure superficiel ; l'échange tendant vers l'équilibre des concentrations en chlorure de sodium est alors initié (Guinee and Fox, 2004; Johnson et al., 2009).

La **quantité de sel** reçue par le fromage dépend de la masse de sel collée initialement à la surface (Guinee, 2004); son importance dépend étroitement de l'humidité de surface au moment du salage. Une surface très humide capte beaucoup de cristaux de sel ; mais ceux-ci se dissolvent rapidement et la saumure formée en excès est perdue par égouttage ; finalement, le fromage est insuffisamment salé. A l'inverse, une surface trop sèche retient peu de sel et un défaut de salage apparaît également. Le moment du salage à sec doit donc être fixé avec précision de manière à faire coïncider exactement la masse de sel retenue par l'humidité de surface avec celle correspondant à la teneur en sel désirée dans le fromage (Ramet, 1985).

La **taille des cristaux de sel** conditionne également l'importance de la masse de sel adhérent à la surface ; la quantité retenue augmente avec la taille des cristaux (Ramet, 1985); ainsi, les fromages peu salés ou de petit format seront salés à l'aide de sels fins ; pour les fromages à teneur en sel élevée ou de gros format, les sels à grains moyens et gros seront plus adaptés. Il faut donc ajuster, pour un fromage donné, la granulométrie du sel et assurer sa distribution régulière en surface.

En pratique, la mise en œuvre du salage à sec est assez fastidieuse lorsqu'elle est réalisée manuellement car elle implique plusieurs applications successives, notamment pour les fromages de gros format ou à teneur élevée en sel ; celles-ci se poursuivent alors à intervalles de temps réguliers pendant le début de la phase d'affinage et correspondent aux soins pratiqués pour diriger la maturation (Fox et al., 2004; Guinee, 2004). Au niveau industriel, le salage à sec est surtout utilisé pour les fromages à humidité moyenne et élevée ; il est peu pratiqué pour les fromages à humidité faible, en raison des lourdes charges en main d'œuvre qu'il implique. Des procédés mécanisés ont été développés pour alléger le travail et pour tenter de régulariser l'apport en sel. Cependant, les salages mécanique, semi-mécanique et manuel restent souvent associés à des teneurs en sel présentant des variations intra-lots significatives (Morris et al., 1985).

1.3.1.7.2 Salage par saumurage

Le saumurage consiste à immerger, dans des conditions définies, le fromage dans une solution de NaCl. Bien que simple en apparence, le saumurage a souvent été la cause d'accidents de fabrication (Ammar et al., 2013; Bintsis and Papademas, 2002; Jakob et al., 2005).

La **composition de la saumure** est soumise à des modifications constantes (Guinee, 2004; Jakob et al., 2005). L'absorption du sel par le fromage d'une part et le passage du lactosérum dans la saumure d'autre part, font que le taux de sel de la saumure diminue. De même, une partie de l'acide lactique, des protéines et des sels minéraux passent du fromage dans la saumure (Bintsis, 2006; Guinee, 2004), ce qui entraîne une modification du pH et des rapports du pouvoir tampon de la saumure. En outre, les substances organiques forment un milieu de croissance idéal pour les microorganismes (en particulier des levures, comme par exemple *Kluyveromyces marxianus* et *Candida valida*, des spores de moisissures et de levures, des staphylocoques, voire des listérias) présents dans la saumure (Bintsis, 2006; Jakob et al., 2005) qui, en dépit d'une concentration en sel élevée, peuvent atteindre des concentrations importantes et peuvent donc influencer les propriétés de la saumure par l'activité de leur métabolisme (Lacrampe et al., 1971).

Plusieurs facteurs propres à la saumure et au fromage influencent la quantité de sel prise par la pâte pendant l'immersion. Parmi les facteurs liés à la saumure, l'augmentation de la température et de l'agitation accentuent l'échange.

Le **saumurage dynamique** permet un gain de temps d'environ 30% par rapport à celui d'un saumurage statique et favorise par ailleurs l'homogénéité de la répartition du sel entre les différents fromages (Ramet, 1985). Une élévation de la température de la saumure accélère le phénomène de diffusion et accroît la prise de sel (Melilli et al., 2006).

1.3.1.7.3 Processus de diffusion du sel dans le fromage

Lorsqu'un fromage est plongé dans une solution saturée de sel, la différence de concentration entre la phase aqueuse du fromage et la saumure provoque une diffusion du sel dans la pâte et une migration inverse de la phase aqueuse vers la saumure (Guinee, 2004; Hardy, 1983; Jakob et al., 2005).

La salaison par immersion dans une saumure ou par application de sel sec en surface, conduit à un important gradient décroissant de sel depuis la surface vers le centre. En sens inverse, un gradient décroissant d'humidité se produit (Guinee, 2004). Même si ces gradients tendent à disparaître (depuis la croûte vers l'intérieur) du fait de la lente diffusion du sel, le processus est long et imparfait (Hardy, 1997; Morris et al., 1985). Cela peut s'expliquer par le fait que toute l'eau du fromage ne participe pas au processus de diffusion, une partie étant liée à l'extrait sec. L'eau du fromage se trouve répartie à l'intérieur d'une masse solide constituée d'un réseau protéique encombré de globules gras.

À la fin du salage, la quasi-totalité du sel se trouve concentrée en quelques millimètres sous la surface du produits (Hardy, 1983). La diffusion du sel ne s'opère donc pas en ligne droite, mais dépend d'un facteur dit de tortuosité qui sera lui-même fonction de sa teneur en eau, en matières sèches et en matières grasses. Puisque l'équilibre dans la composition du fromage est attendu entre 30 et 50 jours d'affinage (Morris et al., 1985), à la fin de l'affinage (au stade de commercialisation) pour la plupart des fromages, la répartition du sel est loin d'être homogène. Entrent en jeu à ce niveau des problèmes de structure anisotrope du produit liés aux techniques de fabrication elles-mêmes (Hardy, 1983).

1.3.1.8 Affinage des fromages

Après le salage, les fromages obtenus par voie enzymatique sont affinés pendant des périodes de 2 semaines (ex. Mozzarella) à quelques années (ex. Parmesan). La biochimie de

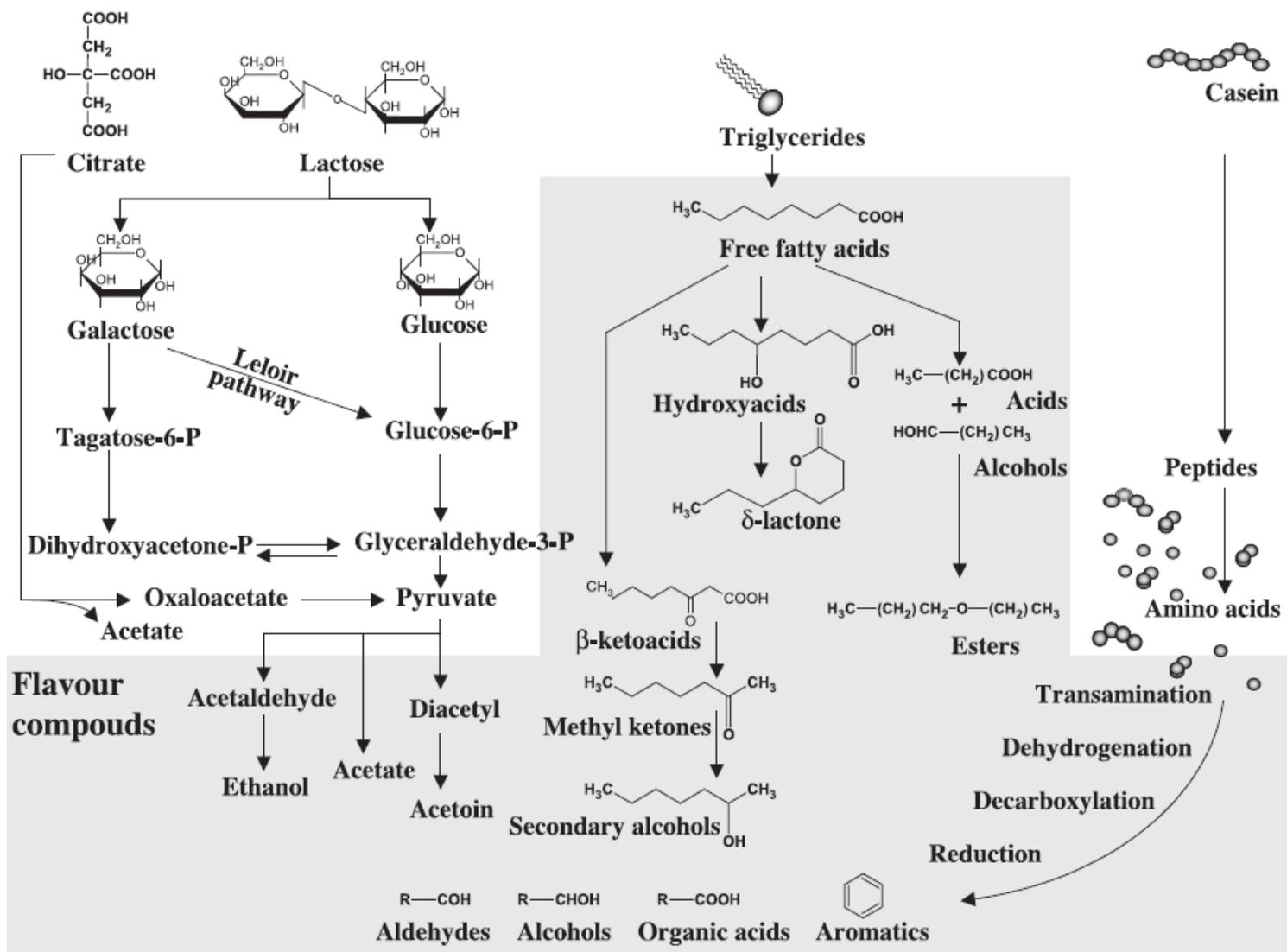


Figure 10. Schéma général des processus biochimiques intervenant au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages (Marilley and Casey, 2004)

l'affinage se distingue par une extrême complexité et par son caractère très spécifique pour chaque type de fromage. Cette complexité résulte de la grande diversité des agents d'affinage, de celle des constituants intéressés par les transformations et de l'existence de nombreuses interactions entre les phénomènes responsables.

Le processus d'affinage correspond à une phase de digestion enzymatique des composants du caillé. La coagulation et l'égouttage ont assuré la préparation d'un substrat, constitué de caséines, de matière grasse et de lactose, en partie converti en lactate. Les phénomènes microbiologiques impliquent la lyse des cellules des ferments lactiques, la croissance de la flore accidentelle (les bactéries lactiques non-levain) ou dans certaines variétés le développement d'une flore secondaire (*P. roqueforti* dans les fromages à pâte persillée) qui est souvent très importante dans le développement de la saveur du fromage. Les phénomènes biochimiques peuvent être classés en primaires (le métabolisme du lactose résiduel, du lactate et du citrate, la lipolyse et la protéolyse) et secondaires (métabolisme des acides gras et des acides aminés) (McSweeney, 2004).

1.3.1.8.1 Métabolisme du lactose résiduel

La transformation du lactose en acide lactique développée pendant la coagulation et l'égouttage se poursuit pendant l'affinage (**figure 10**). Le lactose disparaît en général dans les premiers jours de la maturation à la suite de fermentations variées, dues en particulier aux bactéries lactiques et coliformes, aux levures et moisissures. Cependant, des teneurs mineures, de l'ordre de 0,8 à 1% restent dans le caillé. Ce lactose résiduel est rapidement métabolisé en L-lactate en début d'affinage à un taux largement déterminé par la température, les teneurs en sel et en eau du caillé, mais aussi par l'action des ferments lactiques.

Comme le ratio sel/humidité augmente rapidement pendant le salage, l'activité des bactéries lactiques est très vite stoppée. Ainsi, le lactose non fermenté par les bactéries lactiques est probablement métabolisé par d'autres bactéries non starter (McSweeney and Fox, 2004). A des concentrations très importantes en bactéries lactiques, des teneurs importantes de D-lactate sont formées par racémisation du L-lactate. Ce phénomène a été étudié dans le cas du fromage Suisse (McSweeney, 2004) : le lactose résiduel, emprisonné dans le caillé après moulage, est rapidement métabolisé par les *Streptococcus thermophilus* pendant le refroidissement du caillé, en métabolisant le glucose avec la production de L-lactate (**tableau 7**).

1.3.1.8.2 Métabolisme du lactate

Le lactate, qui est produit à partir du lactose du lait par la croissance des bactéries lactiques, est un substrat important pour une série de réactions ayant lieu pendant l'affinage

Tableau 7. Genres des bactéries lactiques, leur type de fermentation et les produits de fermentation (McSweeney and Fox, 2004)

Genre (sousgenre)	Type de fermentation	Produit de la fermentation (ratio molaire)	Configuration du lactate
<i>Streptococcus</i>	Homofermentative	Lactate	L+
<i>Pediococcus</i>	Homofermentative	Lactate	DL, L+
<i>Lactobacillus</i>	Homofermentative	Lactate	
(<i>Thermobacterium</i>)	Homofermentative	Lactate	DL, L+, D-
(<i>Streptobacterium</i>)	Homofermentative	Lactate	DL, L+, D-
(<i>Betabacterium</i>)	Heterofermentative ¹	Lactate:acétate (1:1)	DL, L+, D-
	Heterofermentative	Lactate:acétate:CO ₂ (1:1:1)	DL
<i>Leuconostoc</i>	Heterofermentative	Lactate:acétate:CO ₂ (1:1:1)	D-
<i>Bifidobacterium</i>	Heterofermentative	Lactate:acétate (2:3)	L+

¹Voie des pentose-phosphates

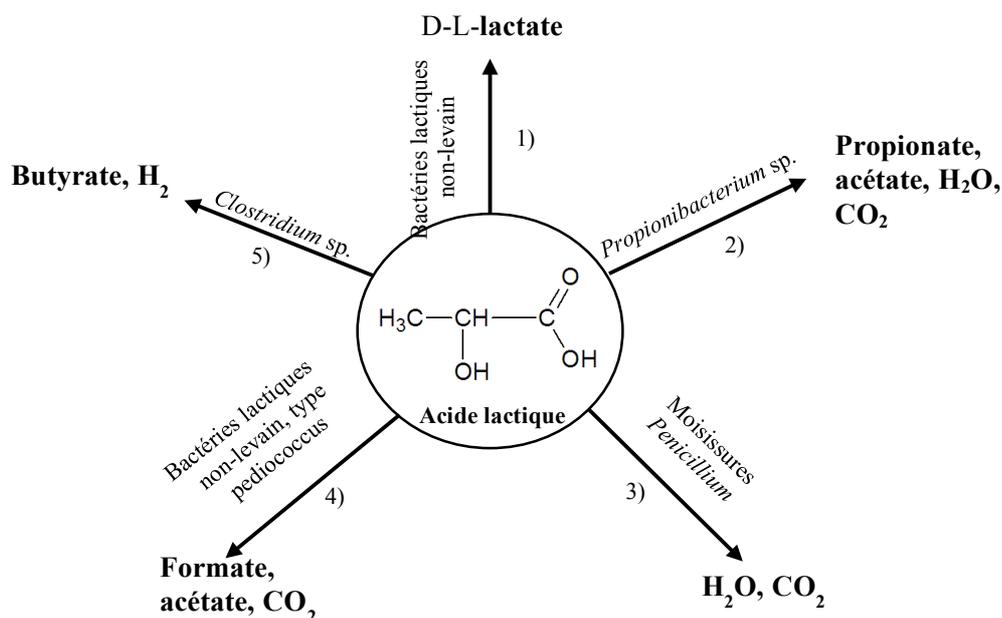


Figure 11. Voies de métabolisation du lactate (McSweeney and Fox, 2004)

1) racémisation, 2) métabolisme par *Propionibacterium freundenreichii* dans le fromage Suisse, 3) métabolisme oxydatif du lactate, 4) conversion en formate, éthanol et acétate et 5) métabolisme anaérobique du lactate en butyrate, H_2 , qui provoque le gonflement du fromage.

(**figure 11**). Le lactate peut-être oxydé par les bactéries lactiques en différents produits dont l'acétate, l'éthanol, le formate et le CO₂ (Desmazeaud, 1992). Cependant, l'ampleur avec laquelle ces voies se produisent dans le fromage dépendent des populations de bactéries lactiques non-levain et de la disponibilité de l'O₂, qui à son tour est déterminée par la taille du fromage et la perméabilité du matériel d'emballage (Choisy et al., 1997).

Le métabolisme du lactate est essentiel dans les fromages de type Emmental, caractérisés par le développement de grandes ouvertures pendant l'affinage. Il s'agit des *Pr.freundenreichii* ajoutés au lait, qui se développent pendant la période d'affinage à chaud, pour transformer le lactate en propionate, acétate, CO₂ et H₂O (McSweeney and Fox, 2004). Ce phénomène est aussi d'une très grande importance pour les fromages à croûte fleurie tels que le Camembert. Peu après sa fabrication, la surface est colonisée par des microorganismes secondaires, initialement par *Geotrichum candidum* et des levures, suivis assez vite par un développement dense du *Penicillium camemberti*. *G.candidum* et *P.camemberti* métabolisent rapidement le lactate en CO₂ et O₂, désacidifiant ainsi la surface du fromage. Cette désacidification s'accompagne d'un gradient de pH, développé du centre vers la croûte, provoquant ainsi la diffusion du lactate vers la croûte. Ce phénomène, observé dans les fromages très affinés, s'accompagne d'une production de NH₃ à la surface des protéines, qui va lui aussi migrer vers la surface du fromage (McSweeney, 2004). Sous l'effet de l'augmentation du pH de la surface, le Ca et les phosphates migrent de l'intérieur vers l'extérieur de façon irréversible (Le Graet and Brulé, 1988; Le Graet et al., 1983).

1.3.1.8.3 Métabolisme du citrate

Le lait contient environ 1750 mg/L de citrate, qui se trouve en majorité dans la phase soluble étant ainsi éliminé avec le lactosérum. Dans le caillé de Cheddar on peut trouver 0,2 à 0,5% de citrate, concentration qui diminue à l'état de traces dans les 6 premiers mois d'affinage. Les produits de son métabolisme sont le CO₂ (petits trous) et des composés d'arôme dans des fromages fabriqués avec des cultures lactiques mésophiles (**figure 10**). Le citrate est métabolisé par des souches citrate⁺ de lactocoques (*Streptococcus diacetylactis*, *Lactococcus lactis* ssp *lactis*) et des lactobacilles (*Leuconostoc mesenteroides* ssp *cremoris* et *Ln. lactis*), mais ne pourra pas être métabolisé par d'autres lactobacilles thermophiles (McSweeney, 2004).

1.3.1.8.4 Lipolyse

La lipolyse peut être due, pour une faible part, à l'action de la lipase naturelle du lait dans les fromages au lait cru. Plus généralement, elle est due à l'action des lipases microbiennes

ou à celle des enzymes ajoutées lors de la fabrication. Sous l'action des lipases, les triglycérides, insolubles dans l'eau, sont hydrolysés en glycérides partiels et en acides gras libres (**figure 10**). D'une manière générale, la lipolyse est plus marquée dans les fromages affinés à l'aide de moisissures : le plus souvent, son évolution suit étroitement la croissance du mycélium (Choisy et al., 1997). Pour les fromages à pâte persillée, la lipolyse marquée se poursuit par une transformation secondaire des acides gras en alcools, aldéhydes et cétones, responsables du goût et de l'arôme caractéristiques des produits affinés (Ramet, 1985). McSweeney (2004) a caractérisé les espèces *Penicillium* comme les organismes les plus lipolytiques dans les fromages.

1.3.1.8.5 Protéolyse

La protéolyse est le processus biochimique primaire le plus complexe et pour certains types, le plus important, qui a lieu dans la plupart des fromages pendant l'affinage. Elle se traduit par la libération successive de peptides, puis d'acides aminés; ces derniers peuvent dans certains cas être eux-mêmes dégradés en composants très variés contribuant à la saveur marquée de certains fromages très affinés (**figure 10**). Ce phénomène contribue au ramollissement de la texture du fromage grâce à l'hydrolyse de la matrice de caséines du caillé, mais aussi à travers la baisse de l'activité de l'eau du caillé dû aux changements de la capacité d'absorption d'eau par les groupes amines et les acides carboxyliques formés pendant l'hydrolyse (Fox and Guinee, 2013). D'une manière générale, les fromages affinés par l'intermédiaire de flores microbiennes (bactéries, moisissures de type *Penicillium* à fortes activités protéolytiques) implantées en surface ou dans la masse, sont plus profondément protéolysés que les fromages qui en sont dépourvus. De plus, la protéolyse étant étroitement tributaire du développement de ces flores, la solubilisation des protéines évolue dans le temps parallèlement à leur croissance et est plus marquée au voisinage du lieu d'implantation de ces flores (Choisy et al., 1997).

Plusieurs systèmes enzymatiques interviennent au cours de cette transformation. Il s'agit de protéinases et peptidases dont l'origine peut être très variée. Les caséines sont initialement hydrolysées par l'activité du coagulant résiduel piégé dans le caillé, par la plasmine et éventuellement par d'autres enzymes protéolytiques endogènes. Il en résulte un complexe de peptides de taille plus ou moins importante, qui sont ensuite hydrolysés par les protéinases et peptidases provenant des ferments lactiques, des cultures non-levain et des flores secondaires en peptides courtes et aminoacides (McSweeney, 2004). Des réactions successives ont ensuite

lieu, menant à la transformation des acides aminés libérés en composés divers : aldéhydes, alcools ou acides (Choisy et al., 1997).

Au cours de l'affinage, un ensemble de traitements variés, retournements, lavages, frottages, enrobages, sont appliqués de manière sélective selon le type de fromage pour former à la périphérie du produit une zone d'aspect caractéristique, soit sèche, soit favorable au développement de flores spécifiques. Ces soins régularisent également l'aspect extérieur et la forme du fromage.

Le procédé de transformation du fromage est donc complexe et variable en fonction de la technologie fromagère appliquée. En particulier, les fractions protéiques et minérales sont sujettes à des modifications importantes au cours de la fabrication. Les différents paramètres technologiques appliqués dans chacune des opérations unitaires sont autant d'éléments susceptibles d'influencer la composition du produit fini.

Dans une perspective d'amélioration des qualités nutritionnelles du fromage, il peut être opportun de moduler certains de ces paramètres. Une des stratégies d'optimisation explorée actuellement et celle de la réduction de la teneur en sel des fromages.

1.4 Stratégies de réduction de la teneur en sel des fromages et perceptions des consommateurs

1.4.1 Amélioration nutritionnelle des fromages et perceptions des consommateurs

Un des défis de l'industrie laitière est de proposer aux consommateurs des produits qui soient cohérents avec les enjeux de santé publique. Assurer une valeur nutritionnelle satisfaisante des fromages est donc une préoccupation grandissante des entreprises de la filière. Néanmoins, toute démarche d'optimisation des qualités nutritionnelles des fromages est susceptible de modifier leurs caractéristiques sensorielles (la texture, le goût) et peut donc représenter un risque de rejet de la part des consommateurs. De nombreuses études montrent le rôle déterminant du goût dans le choix des consommateurs (Grunert et al., 2000; Urala and Lähteenmäki, 2003). Ceci a notamment été démontré pour la diminution de la teneur en sel des fromages, qui affecte fortement la texture et les saveurs caractéristiques, qui sont à leur tour essentielles pour garantir l'acceptabilité du produit par les consommateurs (Doyle and Glass, 2010; Saint-Eve et al., 2009). En effet, les consommateurs ne sont pas prêts à accepter des aliments optimisés d'un point de vue nutritionnel ayant des qualités sensorielles amoindries par rapport aux produits conventionnels (Verbeke, 2006), un suivi conjoint de la perception sensorielle est indispensable, de façon à garantir leur acceptabilité par le consommateur.

1.4.2 Facteurs influençant la composition nutritionnelle des fromages

L'amélioration de la qualité nutritionnelle des fromages nécessite d'identifier les facteurs ayant un impact sur la composition du produit fini. Deux types de facteurs sont susceptibles d'influencer significativement cette composition : les différentes conditions de production du lait et les conditions de fabrication.

La composition chimique du lait est soumise à de grandes variations essentiellement dues à des facteurs zoologiques et d'élevage tels que l'espèce, la race, l'âge, l'alimentation, le stade et le nombre de lactation (Grappin et al., 2006). Les teneurs en matière grasse (MG) et en protéines diminuent pendant les mois d'hiver et de printemps pour atteindre des valeurs maximales durant les mois d'été (St-Gelais and Tirard-Collet, 2002). En tenant compte de ces facteurs, les laits présentent des caractéristiques différentes : la richesse et la composition en caséines, la teneur en lactose, la qualité sanitaire, le pH, le contenu en minéraux. Il a été rapporté que la variabilité de composition du fromage en acides gras, en β -carotène et en vitamine E dépendait principalement de la composition du lait d'origine, alors que les teneurs en vitamine A étaient à la fois influencées par la composition du lait d'origine et par la transformation fromagère (Lucas et al., 2006c).

Au cours de la transformation fromagère, certains paramètres technologiques sont susceptibles de modifier de façon plus ou moins importante les caractéristiques nutritionnelles du lait et donc d'influencer celle du fromage. En particulier, les travaux de Lucas ont permis de démontrer que la composition en minéraux du fromage était principalement influencée par le type de technologie fromagère mise en œuvre (Lucas et al., 2006c) et que notamment le niveau d'acidification du lait avant l'étape d'égouttage était déterminant (Lucas et al., 2006a; b).

1.4.3 Stratégies de réduction de la teneur en sel des fromages

Parmi les pistes d'amélioration nutritionnelle étudiées, celle de la réduction de la teneur en sel dans les fromages est sans doute l'une des plus explorées. Le phénomène déterminant à étudier dans cette approche est la transformation fromagère.

Dans un contexte où l'un des enjeux identifié est de réduire les apports en sel des populations (OMS, 2014) et où conjointement la consommation de fromages est en augmentation au niveau mondial (Fox and Guinee, 2013), de nombreux types de fromages réduits en sel ont été développés. Pour cela, plusieurs stratégies ont été étudiées dans l'industrie agroalimentaire : l'une repose sur la simple diminution du sel dans les produits, l'autre propose

une substitution partielle du NaCl par du KCl, du MgCl₂ et du CaCl₂ (Cruz et al., 2011; Le Minous, 2004). Ces démarches imposent néanmoins de faire face à de nombreux défis, tels que les effets négatifs sur la saveur, la stabilité microbiologique et les propriétés fonctionnelles du produit final. En effet, lorsque la teneur en sel est réduite, la protéolyse, l'activité de l'eau, l'acidité et l'amertume augmentent. En outre, des fermentations irrégulières peuvent se produire qui peuvent altérer le goût typique du fromage, en procurant une saveur amère, acide ou métallique (El-Bakry, 2012).

Concernant la **simple diminution du sel**, le Cheddar (1,6 à 1,8% de sel) a été très étudié du fait de sa forte consommation dans les pays anglo-saxons. Un panel de consommateurs n'a ressenti aucune différence entre les fromages de 7 mois d'affinage dont les teneurs en sel étaient comprises entre 0,88% et 1,75% (Schroeder, 1983), ainsi que pour le Cheddar de plus de 7 mois d'affinage, contenant 1,12 ou 1,44% de sel (Schroeder et al., 1988). Par contre, pour des teneurs inférieures à 0,75% (réduction de plus de 50% de la teneur en sel) sur ces mêmes fromages la saveur et la texture étaient acceptables mais l'appréciation globale diminuée. D'autres essais de réduction de la teneur en NaCl du Cheddar ont donné lieu au développement d'un arrière-goût désagréable et de l'amertume (Banks et al., 1993; Rulikowska et al., 2013). A des concentrations inférieures à 1,5%, l'amertume serait due à l'augmentation de la croissance des bactéries qui provoquent une protéolyse excessive. Ganesan et al. (2014) ont étudié les qualités sensorielles de la Mozzarella (trois semaines d'affinage) et du Cheddar (trois et six mois d'affinage) réduits en sel. Les fromages ont été fabriqués avec des teneurs en sel de 0,7 à 1,8%, réduisant ainsi de 25 à 60% la teneur en sel. Le panel de consommateurs a attribué des scores acceptables pour tous les fromages, mais l'amertume était moins prononcée pour les fromages plus riches en sel. Cette étude montre que les consommateurs peuvent déceler une réduction de 30% de la teneur en sel et qu'une réduction graduelle serait nécessaire pour améliorer l'acceptabilité des fromages réduits en sel par les consommateurs.

De nombreuses études ont été faites pour réduire la teneur en NaCl de différents types de fromages par **substitution partielle** avec du KCl, du MgCl₂ et du CaCl₂ (Ayyash and Shah, 2011; Ayyash et al., 2011; Cruz et al., 2011; Gimeno et al., 2001; Grummer et al., 2012; Kamleh et al., 2012; Katsiari and Voutsinas, 1998; Katsiari et al., 1997). Les travaux de Katsiari et son équipe ont montré qu'une substitution partielle du NaCl par du KCl (25% et 50%) dans un fromage à pâte pressée (Kefalograviera) était faisable sans effets adverses sur la qualité du produit (Katsiari and Voutsinas, 1998). Les mêmes résultats ont été observés dans le Cheddar, avec une substitution à 30% (Reddy and Marth, 1994). Dans certains fromages présentant des

substitutions de NaCl de l'ordre de 50% par du KCl, certains panelistes ont trouvé un goût légèrement métallique, ce qui est caractéristique du KCl et bien rapporté dans la littérature. Cela a aussi été attribué au fait que le NaCl, dans des concentrations plus importantes aurait un effet masquant du goût métallique (Katsiari and Voutsinas, 1998) et de l'amertume (Kamleh et al., 2012). Les travaux de Grummer et al. (2013) ont montré que le KCl pouvait être utilisé avec succès pour remplacer une partie du NaCl dans le Cheddar. Par contre, leurs essais de substitution par le CaCl₂ et le MgCl₂ ont aboutis à des fromages présentant des saveurs amers, métalliques et savonneuses (Grummer et al., 2013). Les tests s'avèrent plus compliqués en raison de la formation de savons par la combinaison ayant lieu avec les acides gras (Reykdal and Lee, 1993).

La substitution du sel avec du KCl, est considérée comme une approche alternative prometteuse pour réduire la teneur en Na dans les fromages, principalement en raison de la similitude entre les cations de ces deux sels (Kaur et al., 2011). Un mélange de NaCl et de KCl a été utilisé avec succès dans divers fromages, sans affecter considérablement les propriétés des fromages tels que le Cheddar, la Feta, la Kefalograviera, l'Halloumi, la Mozzarella (Ayyash, 2013; Grummer et al., 2012, 2013; Kamleh et al., 2012; Katsiari et al., 1997; Katsiari and Voutsinas, 1998). Toutefois, le degré de substitution du NaCl par du KCl est limité par le goût amer indésirable qui pourrait être produit par le KCl.

Un atout nutritionnel de cette approche est l'effet associé de diminution de la pression artérielle du K et, par conséquent, de réduction potentielle du risque de maladies cardiovasculaires (Doyle and Glass, 2010). Par contre, la consommation de ces fromages n'est pas recommandée chez les sujets insuffisants rénaux (Demigné, 2008; Pickering et al., 2002).

Il a été largement démontré qu'une consommation importante de sel était responsable de la survenue de nombreuses maladies. Compte-tenu de la forte contribution des fromages à l'apport en sel dans les pays occidentaux, la fabrication de fromages réduits en sel est un enjeu important au niveau nutritionnel. Les stratégies les plus utilisées actuellement mettent en œuvre des substitutions partielles, majoritairement par du KCl. Cependant, ces méthodes ne tiennent pas compte du potentiel acidifiant de ces substituts. En effet, outre l'altération des propriétés sensorielles des fromages, en particulier de la saveur, le KCl exerce un effet acidifiant. Cette approche n'est donc pas pleinement cohérente avec une démarche d'amélioration nutritionnelle du produit fini. Il semble donc nécessaire de proposer d'autres stratégies qui permettraient de réduire l'apport en sel tout en réduisant le potentiel acidifiant du fromage.

Chapitre 2.
OBJECTIFS ET DEMARCHE
EXPERIMENTALE

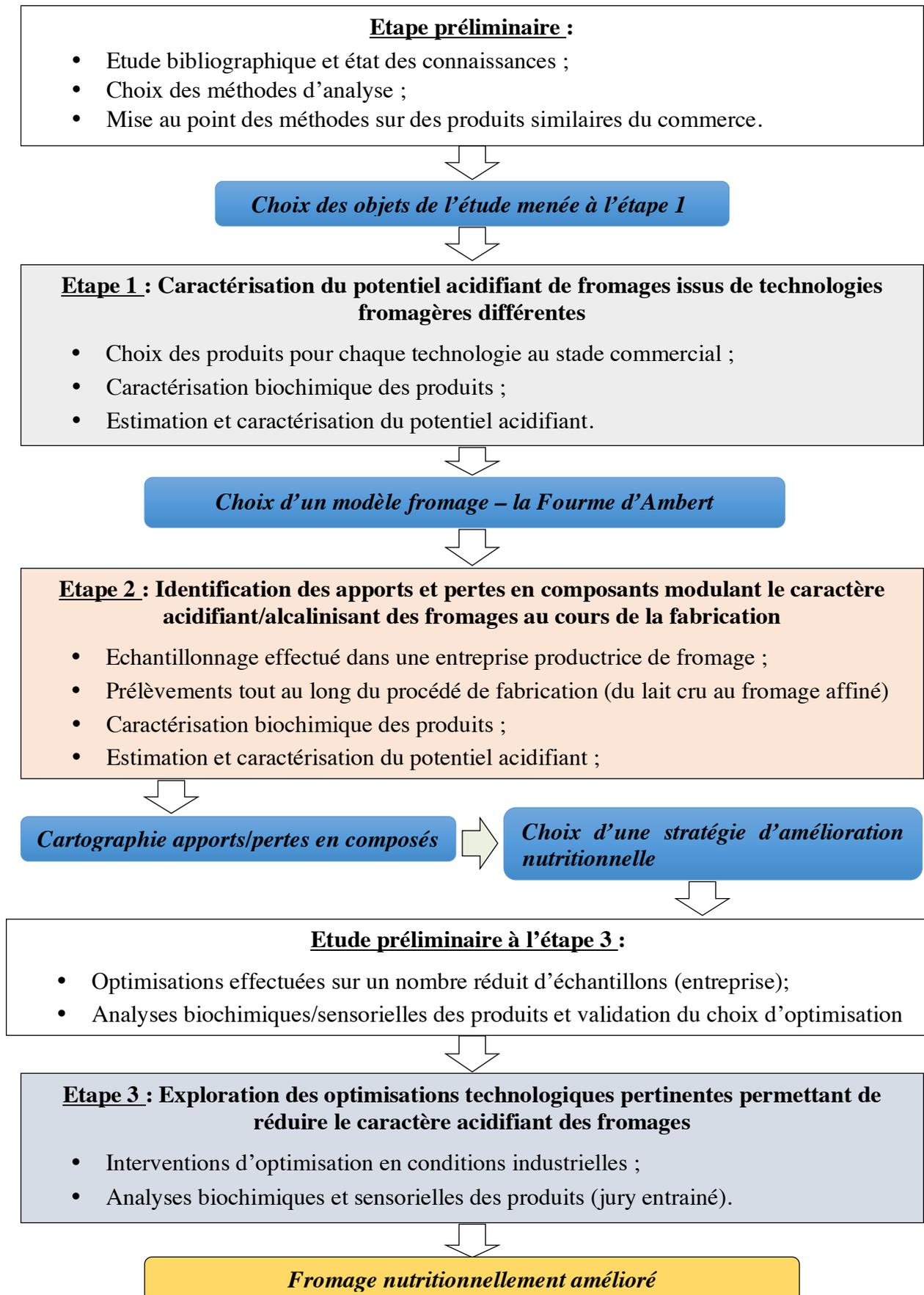


Figure 12. Démarche expérimentale de la thèse (synthèse)

2 Objectifs du travail de thèse et démarche expérimentale

2.1 Enjeux et objectifs

L'**enjeu scientifique** du projet est de participer à l'**amélioration nutritionnelle des fromages** en explorant une de leurs caractéristiques très peu étudiée dans la littérature scientifique: leur potentiel acidifiant. Plus précisément, le travail mené vise à **évaluer dans quelle mesure le potentiel acidifiant des fromages pourrait être réduit**.

L'**enjeu socio-économique** de la thèse est double. Le premier, d'ordre sociétal, est de proposer des stratégies pouvant **contribuer à diminuer la charge acide globale des régimes occidentaux** et ainsi limiter les effets délétères pour la santé auxquels elle est associée. Le second, d'ordre économique, est de **participer au développement des filières**, notamment par l'élaboration de **recommandations** et la proposition d'**innovations**.

Dans ce contexte, le travail de thèse vise à **mieux caractériser le potentiel acidifiant** des fromages et à **mieux comprendre sa génération** au cours de la transformation dans une **perspective de maîtrise voire de réduction**. L'approche originale proposée présente donc deux **objectifs** majeurs :

1. **Evaluer le potentiel acidifiant des fromages et identifier ses déterminants au cours de la fabrication ;**
2. **Explorer les optimisations technologiques permettant de réduire le potentiel acidifiant des fromages, tout en assurant leurs qualités sensorielles.**

2.2 Démarche expérimentale : une approche en trois étapes

Pour répondre aux objectifs de la thèse, trois étapes distinctes et successives ont été identifiées (**figure 12**).

2.2.1 1^{ère} étape : Caractérisation du potentiel acidifiant de fromages issus de technologies fromagères différentes

L'objectif de cette étape a été de caractériser et quantifier le potentiel acidifiant de fromages fabriqués selon des technologies fromagères différentes pour mettre en évidence le lien existant entre potentiel acidifiant et technologie.

Un travail bibliographique préliminaire a été mené de façon à sélectionner les produits à analyser pour chacune des technologies ciblées. Des mises au point méthodologiques et analytiques ont également été réalisées. Cinq fromages ont été choisis en fonction du type de pâte : pâte fraîche (fromage frais), pâte molle (Camembert), pâte persillée (Fourme d'Ambert), pâte pressée non-cuite (Cantal) et pâte pressée cuite (Comté). Deux types de lait (cru et pasteurisé) ont également été intégrés à l'étude. Tous les produits ont été prélevés au stade de la commercialisation. Les teneurs en protéines, cations et anions influençant le caractère acidifiant du produit ont été dosées à l'aide de techniques biochimiques appropriées.

A l'issue de cette étape, l'un des cinq fromages étudiés a été sélectionné comme modèle pour la poursuite des travaux : la Fourme d'Ambert.

2.2.2 2^{ème} étape : Identification des leviers technologiques déterminants dans la génération du potentiel acidifiant des fromages au cours de la transformation

L'objectif de la deuxième étape a été d'identifier les étapes technologiques responsables de la génération du potentiel acidifiant au cours de la fabrication du modèle fromage choisi, afin de pouvoir proposer des leviers d'action pertinents.

Un suivi de l'évolution de la composition des produits intermédiaires et des ingrédients a été mené au cours de la fabrication de la Fourme d'Ambert : depuis la réception du lait cru jusqu'à 56 jours d'affinage. Trois lots de fabrication ont été suivis à une semaine d'intervalle chacun, avec 21 points de prélèvements pour chaque lot. Cette phase du projet a été réalisée en collaboration avec une entreprise productrice de fromage.

Cette deuxième étude a permis de construire une cartographie des apports et pertes en nutriments d'intérêt et d'identifier les étapes du procédé de fabrication déterminantes dans le développement du potentiel acidifiant.

2.2.3 3^{ème} étape : Exploration des optimisations technologiques pertinentes permettant de réduire le caractère acidifiant des fromages

La troisième partie du travail a consisté à explorer une stratégie d'amélioration nutritionnelle visant à réduire le potentiel acidifiant des fromages, tout en s'assurant de l'acceptabilité sensorielle des produits. Plus précisément, une alternative au procédé de salage classique a été proposée visant à substituer une partie du NaCl utilisé à cette étape par des sels organiques de Ca : le citrate de Ca et le lactate de Ca.

Menée en milieu industriel sur la Fourme d'Ambert, une étude préliminaire a tout d'abord été réalisée pour s'assurer de l'absence de défauts sensoriels majeurs sur les produits et pour préciser certains points méthodologiques (modalités de salage, taux de substitution). L'objectif de cette étude préliminaire était donc de vérifier la faisabilité technologique, biochimique et sensorielle de l'approche. Suite au succès de l'étude de faisabilité, une étude plus large a été entreprise sur le même modèle fromage. L'objectif était d'évaluer le potentiel acidifiant et l'acceptabilité sensorielle de la Fourme d'Ambert obtenue par substitution partielle du NaCl au lactate et au citrate de Ca, le salage étant effectué au moment du salage à sec. La substitution à 75% du sel sec a été menée sur des fromages provenant d'un seul lot de fabrication. Un suivi biochimique des produits a été réalisé en cours de transformation et en fin d'affinage. Parallèlement, un profil sensoriel des produits finis a été effectué de façon à caractériser l'aspect, la texture, la saveur et l'arôme des produits obtenus.

Chapitre 3.
MATERIEL ET METHODES

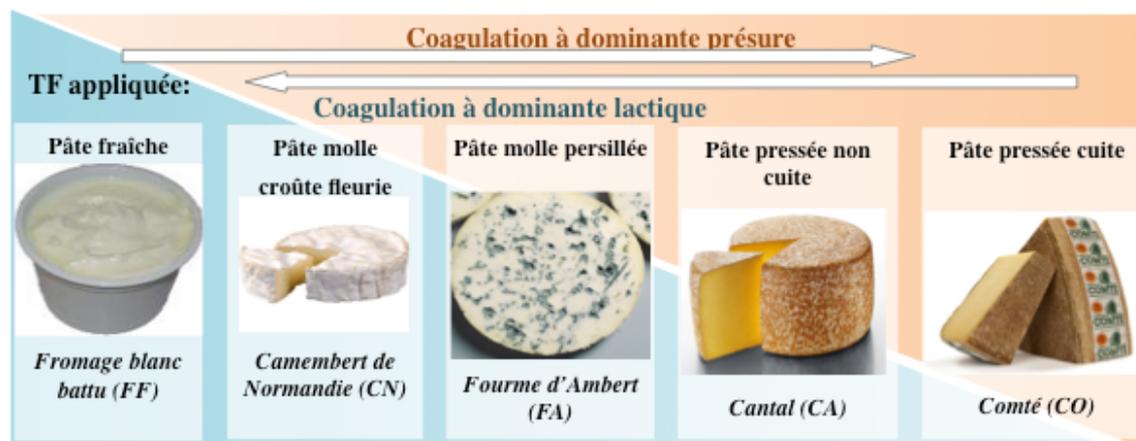


Figure 13. Choix des produits à l'étape 1

Tableau 8. Caractérisation des 5 types de fromages étudiés à l'étape 1

	Type				
	Pâte fraîche	Pâte molle	Pâte persillée	PPNC	PPC
Produit	Faisselle	Camembert de Normandie	Fourme d'Ambert	Cantal	Comté
Signe de qualité¹	-	AOP	AOP	AOP	AOP
Région de production	-	Normandie	Auvergne	Auvergne	Franche-Comté
Type de lait	vache	vache	vache	vache	vache
Traitement thermique	pasteurisé	cru	pasteurisé	pasteurisé	cru
Technologie de fabrication	coagulation lactique	pâte molle à croûte fleurie	pâte molle persillée	pâte pressée non cuite	pâte pressée cuite
Poids (kg)	1	0,25	2,2	35-45	35-45
Temps d'affinage (j)	0	21	63	150	150

¹AOP – Appellation d'Origine Protégé ; PPNC, pâte pressée non cuite ; PPC, pâte pressée cuite

3 MATERIEL ET METHODES

3.1 Protocoles expérimentaux et méthodes d'échantillonnage

3.1.1 Echantillonnage des produits dans le commerce (étape 1)

Un des objectifs de l'étape 1 était de faire le choix des fromages à analyser provenant de 5 technologies fromagères différentes : pâte fraîche, pâte molle, pâte persillée, pâte pressée cuite et pâte pressée non-cuite. Plusieurs critères de choix ont été pris en compte :

- a) Matière première : le lait de vache ;
- b) Signe de qualité (produits répondant à des cahiers de charges bien définis) : AOP ;
- c) Fabrication standardisée industrielle ;
- d) Produits du commerce disponibles aux consommateurs ;
- e) Composition des fromages en composés d'intérêt (protéines, minéraux etc.) ;
- f) Abondance des ressources bibliographiques disponibles sur ces fromages.

Parmi les 46 fromages bénéficiant d'un signe AOP (INAO, 2016), 29 fromages sont fabriqués à partir de lait de vache et ont servi de base de départ pour le choix des produits à analyser. Même si aucun fromage à pâte fraîche ne bénéficie de signe AOP il nous semblait pertinent de les inclure dans l'étude. Il nous semblait intéressant de regarder l'effet du type de coagulation, de salage, d'affinage dans les différentes technologies et d'observer leur l'impact général sur le caractère acidifiant des produits finis trouvés dans le commerce.

La **figure 13** présente les 5 fromages choisis, succinctement caractérisés dans le **tableau 8**. Deux types de **lait (cru et pasteurisé)**, représentant la matière première des fromages, ont été rajoutés à l'étude pour vérifier leur potentiel acidifiant. Tous les produits ont été achetés dans le même supermarché, situé à Lempdes (Auvergne, France). Le protocole d'échantillonnage a été établi en conformité avec la norme NF EN ISO 707:2009.

Conditions d'échantillonnage:

- **Personnel chargé de l'échantillonnage.** L'échantillonnage a été fait par une seule personne formée à la technique appropriée ;
- **Scellement et étiquetage des échantillons.** Les échantillons ont été scellés et pourvus d'une étiquette reprenant la date, le numéro de lot, l'identifiant intégral du produit, le fabricant, la quantité etc. ;
- Le **matériel d'échantillonnage** utilisé était en acier inoxydable ou en verre, propre et sec, sans influence sur la composition du produit.

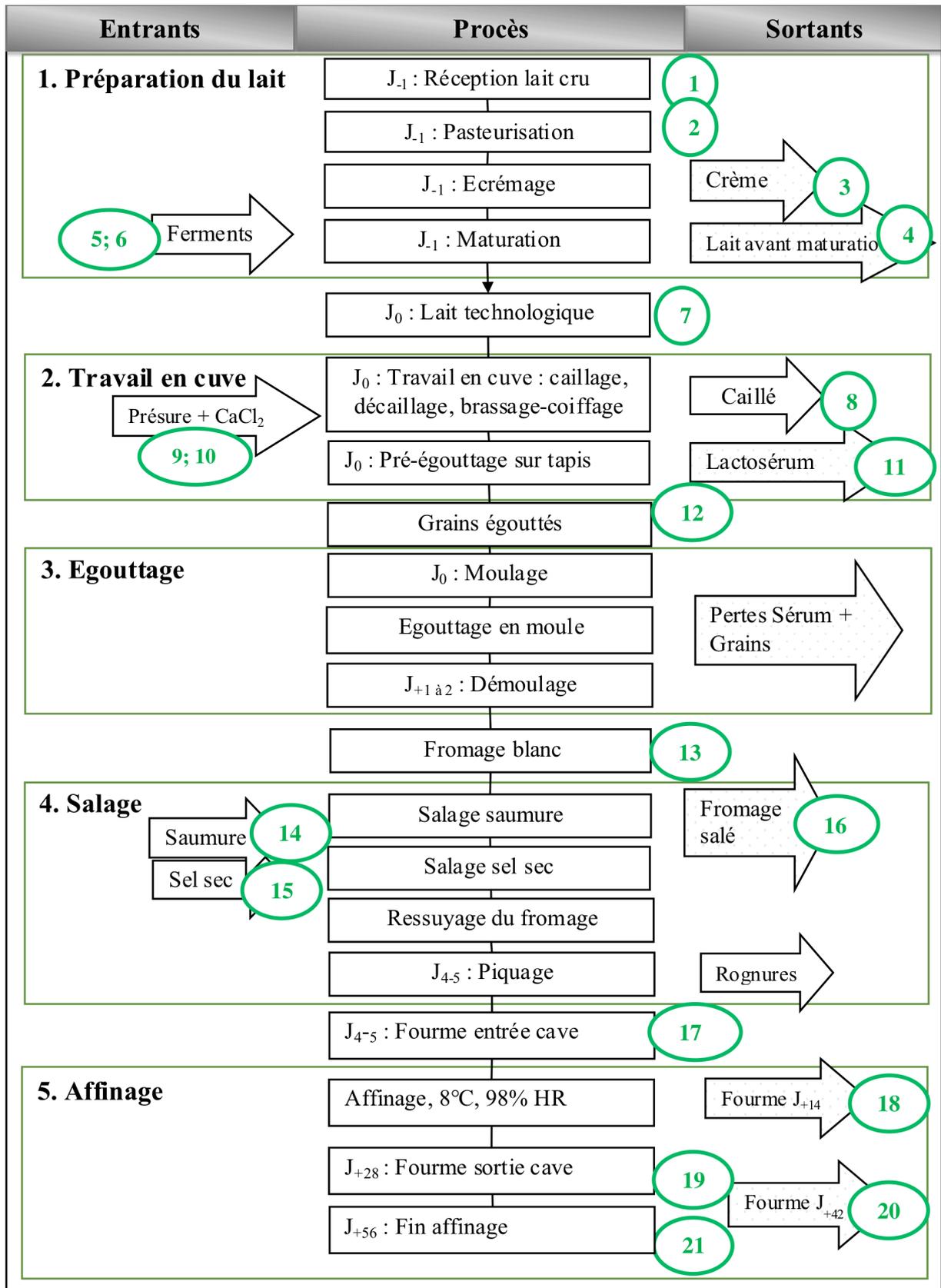


Figure 14. Diagramme de fabrication de la Fourme d'Ambert et prélèvements à l'étape 2

Pour chaque produit, 3 lots, obtenus à une semaine d'intervalle, ont été sélectionnés de façon à réduire les éventuelles variations inter-lots des produits commerciaux et s'affranchir des variations liées à la saisonnalité. Trois échantillons par lot (la même marque) ont été choisis de façon aléatoire pour constituer un pool : 1 L de lait par échantillon, 1 kg de fromage blanc battu (FF) par échantillon, 250 g pour le Camembert de Normandie (CN), 1 kg pour la Fourme d'Ambert (FA) et le Cantal (CA) par échantillon. Pour le Comté (CO), seulement 2 lots étaient disponibles pendant la période d'échantillonnage, avec 800 g de fromage par échantillon.

Les analyses ont été effectuées uniquement sur la partie consommable. Par conséquent, le CN a été analysé tel quel, étant largement consommé entier. Par contre, la croûte des FA, CA et CO a été enlevée. Le pool des laits et des FC a été effectué immédiatement après achat, les produits poolés ont été ensuite congelés en cellule de surgélation (Tecnox, France) et gardés à - 20 °C. Un jour avant l'analyse ces produits étaient transférés dans un frigo à 4 °C. Les autres fromages ont été congelés tels quels dans la même chambre de surgélation, gardés dans des congélateurs à - 20 °C, pour effectuer le pool le jour de l'analyse, en broyant les fromages congelés coupés en morceaux.

3.1.2 Echantillonnage des produits dans l'entreprise (étape 2)

Suite à l'étape 1, la Fourme d'Ambert a été sélectionnée comme fromage modèle pour les étapes suivantes 2 et 3.

3.1.2.1 Fabrication de la Fourme d'Ambert

Le processus de fabrication industriel a été suivi à partir de la réception du lait cru jusqu'à la fin de l'affinage (**Figure 14**). A l'arrivée, le lait cru (30 t) a été pasteurisé et standardisé à un taux de matière grasse (3,9 g/100 g), ensuite refroidi à 13 °C. Des quantités appropriées de CaCl₂ (15 mL/100 L) et un cocktail de ferments (ferments lactiques et *Penicillium roqueforti*) ont été rajoutés pour pré-maturer le lait pendant 12 h. Le lait mûré a été chauffé à 32 °C et la présure (30 mL/100 L) a été rajoutée. Après 30 minutes, le coagulum a été coupé horizontalement et verticalement et un processus de brassage d'une heure a été appliqué pour former la coiffe des grains de coagulum. L'égouttage sur tapis a été utilisé avant la mise en moule pour ne pas endommager la structure des grains. Pendant l'égouttage en moule plusieurs retournements par jour ont été faits. Les fromages ont été démoulés après 24 h. L'étape ultérieure - le salage, a eu lieu en deux temps : 1) saumurage (environ 9 h) et 2) salage par frottage du sel sec (gros sel) à la surface, pour favoriser la formation de la croûte.

A compter du 4^{ème} jour d'emprésurage a eu lieu le piquage des fromages. Cette procédure vise la création de cheminées à l'aide de grande aiguilles qui conduisent l'air jusqu'au cœur du fromage pour permettre le développement du *Penicillium*. La dernière étape de fabrication - l'affinage des fourmes a eu lieu en caves d'affinage, à 8 °C, 98% HR jusqu'au 28^{ème} jour. Les fromages ont été conditionnés et conservés à 0 °C jusqu'à 56 jours d'affinage.

3.1.2.2 Echantillonnage

Trois lots de fabrication ont été suivis à une semaine d'intervalle. L'échantillonnage a été fait sur 21 points, tout au long de la fabrication de la Fourme d'Ambert (**Figure 14**). Le lait cru (LC), représentant un lait de mélange provenant d'environ 20 producteurs locaux, a été échantillonné avant pasteurisation et standardisation. Le lait pasteurisé (LP) a été échantillonné avant l'ajout du CaCl₂ et des ferments, le lait mûré (LM) avant l'ajout de la présure. Un litre pour chaque type de lait, 1 L pour la crème et 0,5 L pour chacun des ingrédients, utilisés sous forme de solutions, ont été aliquotés et immédiatement congelés dans une cellule de surgélation (Tecnox, France). Au moment du caillage, pour chaque lot, 2 cuves sur 6 ont été suivies et échantillonnées de la façon suivante : 1 L de coagulum (C) par cuve avant la découpe du caillé et 1 L de grains de coagulum (GC) par cuve à la fin du tapis d'égouttage. Le lactosérum a été collecté dans le réservoir d'égouttage en bas du tapis. Les échantillons ont été aliquotés et immédiatement surgelés. Le fromage en blanc égoutté (FB) d'environ 2,3 kg a été récupéré juste avant salage. Les fourmes affinées (FA) d'environ 2,2 kg ont été collectées à différents temps d'affinage : 21 jours (FA21), 28 jours (FA28), 42 jours (FA42) et 56 jours (FA56). Les fromages entiers ont été transportés au laboratoire sous réfrigération. Ensuite la croûte des fromages affinés a été enlevée et les fromages ont été aliquotés et surgelés. Tous les échantillons ont été conservés à - 20 °C. Un jour avant l'analyse, les échantillons liquides ont été transférés dans le frigo (4 °C). Les échantillons solides ont été coupés en morceaux et broyés congelés afin d'obtenir un échantillon plus homogène et ensuite gardés à 4 °C jusqu'à l'analyse effectuée le même jour.

3.1.3 Protocole d'optimisation nutritionnelle de la Fourme d'Ambert – substitution partielle du NaCl par des sels de calcium (étape 3)

3.1.3.1 Nature des sels de substitution

Deux sels organiques de Ca ont été choisis pour leur pouvoir alcalinisant : le lactate de Ca (calcium L-lactate hydrate \geq 98%) et le citrate de Ca (calcium citrate tetrahydrate \geq 99%) et achetés chez le fournisseur marché (Sigma Aldrich, Allemagne).

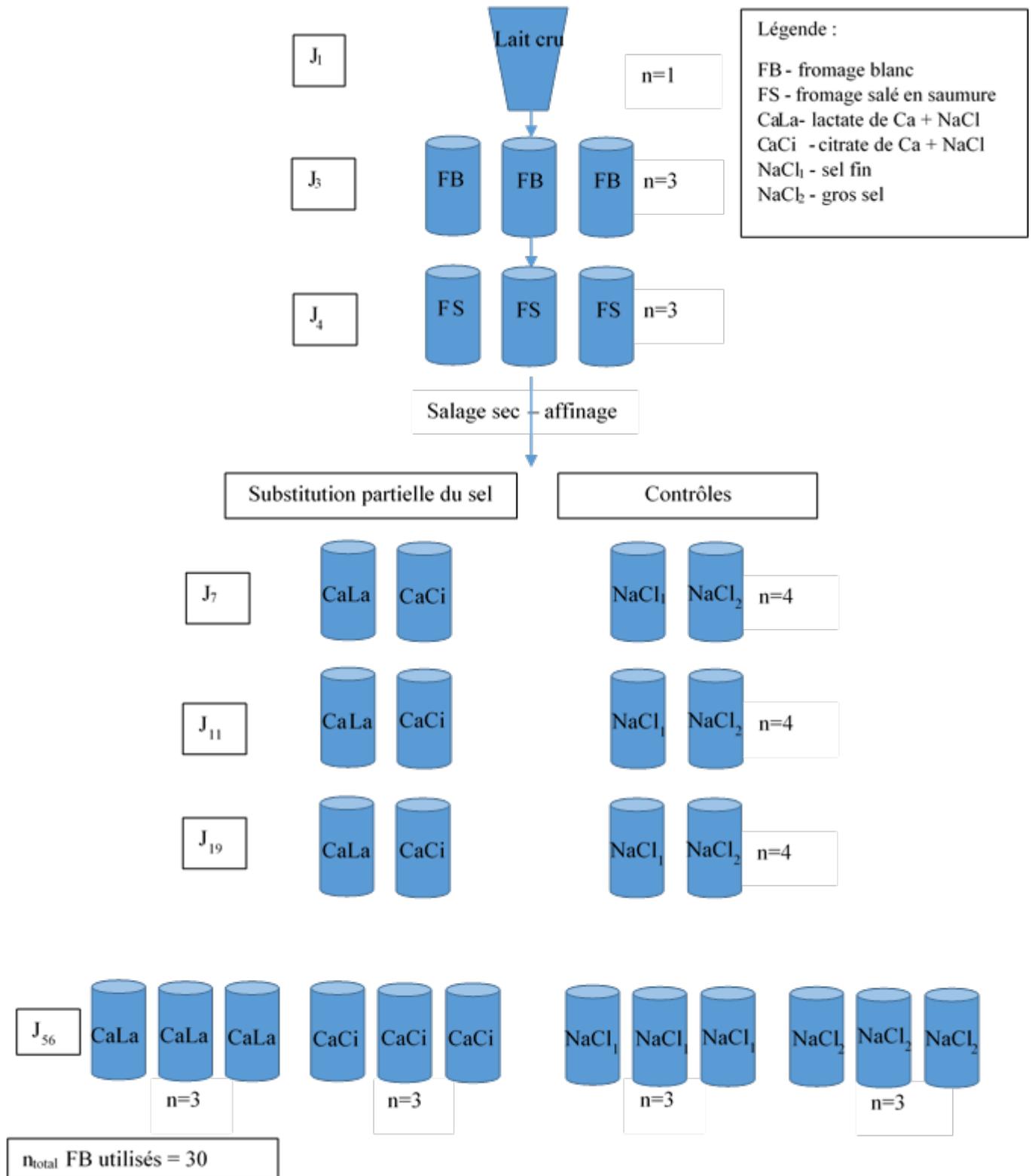


Figure 15. Plan d'expériences étude finale (étape 3)

3.1.3.2 Granulométrie

Les mélanges « sel de Ca – NaCl » ont été effectués avec du sel fin pour obtenir des particules de granulométrie relativement homogène (0 – 0,2 mm). Une fourme a été salée avec du sel fin uniquement (NaCl100) et un fromage a été salé avec du gros sel (0,9 – 3,15 mm), tel que réalisé classiquement dans l'entreprise (Contrôle).

3.1.3.3 Intervention étude préliminaire

Pour vérifier la faisabilité de la démarche, dix fourmes d'Ambert issues d'un même lot de fabrication, ayant suivi une même transformation jusqu'à l'étape de salage (**Figure 13**) ont été choisies. La différence de traitement appliquée aux produits repose uniquement sur la composition du sel sec utilisé pour le frottage (**Tableau 9**). Les proportions de substitution du sel sec par rapport au sels de Ca (30%, 50%, 70%, 100% (p/p frais)), ont été choisies en fonction de la littérature (Katsiari and Voutsinas, 1998; Reddy and Marth, 1994). Après le salage en saumure les fourmes ont été frottées avec les mélanges de sel, dans les mêmes conditions que dans l'entreprise, après formation auprès des opérateurs de salage.

3.1.3.4 Intervention étude finale

Pour l'étude finale les deux types de sel (citrate et lactate de Ca) ont été conservés. Les résultats de l'étude préliminaire ont servi aux choix des proportions de substitution pour la suite de l'étude. Une seule proportion de substitution du sel sec (75% p/p sec) a été établie pour que la diminution de la teneur en Na soit de minimum 25% (**Tableau 10**). Pour chaque traitement, 6 fourmes ont été salées dans les mêmes conditions. Pour uniformiser les mélanges de sel, le lactate et le citrate de Ca ont été séchés pendant 24 h à 102 ± 2 °C pour obtenir des sels anhydres. Le plan d'expériences de l'étude finale est présenté dans la **figure 15**. Le salage à sec des fourmes a été effectué selon les conditions de salages suivants :

- a) 100% NaCl (gros sel) = Contrôle
- b) 100% NaCl (sel fin) = NaCl100
- c) 25% NaCl + 75% lactate de calcium anhydre = CaLa75
- d) 25% NaCl + 75% citrate de calcium anhydre = CaCi75

Le lait cru (1 L), 3 FB (2,3 kg) et 3 FS (2,3 kg) ont été prélevés pendant la fabrication, pour connaître leur composition. Un fromage par sel a été prélevé à J₇, J₁₁ et J₁₉ pour une analyse partielle et trois fromages par traitement à J₅₆ ont été prélevés pour connaître leur composition complète.

Tableau 9. Composition des sels de mélange utilisés pour le salage à sec des Fourmes d'Ambert à l'étude préliminaire, étape 3 (pour 100 g de sel de mélange)

Traite- ment	Rapport sels de Ca/NaCl, %/ % p. frais	Rapport sels de Ca/NaCl, %/ % p. sec	Quantité de Na* (g/100 g)	Quantité de Cl* (g/100 g)	Quantité de Ca* (g/100 g)	Quantité de lactate* (g/100 g)	Quantité de citrate* (g/100 g)
Contrôle	0/100	0/100	39,3	60,7	-	-	-
NaCl100	0/100	0/100	39,3	60,7	-	-	-
CaLa23	30/70	23/70	27,5	42,5	4,2	18,8	-
CaLa38	50/50	38/50	19,7	30,4	7	31	-
CaLa53	70/30	53/30	11,8	18,2	9,7	43,3	-
CaLa76	100/0	76/0	0	0	13,9	62,1	-
CaCi27	30/70	27/70	27,5	42,5	6,5	-	20,5
CaCi45	50/50	45/50	19,7	30,4	10,8	-	34,2
CaCi62	70/30	62/30	11,8	18,2	14,9	-	47,1
CaCi89	100/0	89/0	0	0	21,4	-	67,6

*Quantité du composé pour 100 g de sel de mélange (poids frais)

Tableau 10. Composition des sels de mélange utilisés pour le salage à sec des Fourmes d'Ambert, étape 3 (pour 100 g de sel de mélange anhydre)

Traitement	Proportions sels de Ca/NaCl, %/ % poids sec	Quantité de Na* (g/100 g)	Quantité de Cl* (g/100 g)	Quantité de Ca* (g/100 g)	Quantité de lactate* (g/100 g)	Quantité de citrate* (g/100 g)
Contrôle	0/100	39,3	60,7	-	-	-
NaCl100	0/100	39,3	60,7	-	-	-
CaLa75	75/25	9,8	15,2	13,7	63	-
CaCi75	75/25	9,8	15,2	18	-	57

*pour 100 g de sel de mélange anhydre

3.1.3.5 Affinage

L'affinage en cave a été réalisé à 8 °C, 98% HR, jusqu'au 28^{ème} jour après emprésurage suivi par un affinage à froid (0 °C) dans les locaux de VetAgro Sup durant 27 jours. Un suivi hebdomadaire a été fait, avec des observations sur l'aspect des fromages.

3.1.3.6 Echantillonnage

Pour l'étude préliminaire, une moitié des fromages a été utilisée pour les analyses biochimiques et l'autre moitié pour des observations sensorielles avec du personnel de l'entreprise et de VetAgro Sup. Pour l'étude finale, environ 500 g pour chaque fromage a été prélevé pour les analyses biochimiques et le reste (1,7 kg) pour les tests sensoriels avec un jury entraîné. Pour les analyses sensorielles les fromages ont été gardés à 0 °C jusqu'aux tests effectués les jours suivants. Pour les analyses biochimiques, la croûte a été séparée et les fromages et la croûte (étude finale) ont été aliquotés et surgelés (Tecnox, France) à - 20 °C.

3.2 Méthodes d'analyse biochimique

La totalité des produits ont subi une caractérisation globale : pH, matière sèche, matière grasse, cendres, azote total (N total). Il a été nécessaire d'évaluer les macro et les microéléments nécessaires à l'évaluation du potentiel acidifiant/alcalinisant par le calcul de l'index PRAL (protéines, P, Cl, Na, K, Ca, Mg). Ensuite nous nous sommes intéressés aux teneurs en anions organiques, comme éléments alcalinisants pouvant influencer le potentiel acidifiant des fromages. De cette manière, le citrate et le lactate, les anions les plus abondants dans le lait et le fromage, ont été analysés. Toutes les analyses ont été effectuées en triple.

3.2.1 Préparation des échantillons

Les produits liquides (lait, faisselle battue, lactosérum, ingrédients de la fabrication du fromage : CaCl₂, ferments, présure, saumure) ont été transférés dans le frigo (4 °C) un jour avant l'analyse pour permettre une décongélation lente. Le pool des 2 échantillons par lot, obtenus à l'étape 2, a été effectué après décongélation. Avant chaque prise d'essai les flacons ont été secoués. Les fromages écroutés et congelés, ainsi que les croûtes obtenus à l'étape 3 (étude finale), ont été coupés en morceaux et broyés avec un moulin à légumes muni d'une grille fine, pour obtenir un échantillon homogène. Les pools des 3 échantillons par lot, obtenus à l'étape 1, ainsi que les 2 fromages par lot obtenus à l'étape 2, ont été effectués après le broyage. Le broyat a été soigneusement mélangé et stocké dans des récipients étanches à 4 °C jusqu'à l'analyse effectuée le même jour.

3.2.2 Caractérisation globale des produits

3.2.2.1 Détermination du pH

Selon la norme FD V04-035:2009, 10 g de broyat ont été pesés dans un bécher et 50 mL d'eau déminéralisée ont été rajoutés. Le pH-mètre CG 840 (Schott, Mainz, Allemagne) ou l'électrode pH gel Sentix 41 (WTW, Weilhem, Allemagne) ont été calibrés à l'aide des solutions tampons de référence. Le pH de la solution contenant le fromage dispersé, a été mesuré sous agitation. Le pH des produits liquides a été mesuré directement sur le produit.

3.2.2.2 Teneur de la matière sèche

Le principe de la méthode consiste à sécher une prise d'essai pesée, mélangée avec du sable, par chauffage dans une étuve réglée à 102 ± 2 °C. La pesée de la prise d'essai séchée permet de déterminer la perte de masse (NF EN ISO 5534:2004).

La capsule en aluminium avec 20 g de sable et la baguette en verre ont été pesées après séchage à 102 ± 2 °C dans une étuve, pendant au moins 3 h. La masse a été enregistrée avec quatre décimales. Trois grammes d'échantillon ont été placés et 3 mL d'eau rajoutés pour saturer le sable et faciliter le mélange. Le contenu a été mélangé pour répartir le mélange de manière homogène sur le fond de la capsule. La capsule a été chauffée dans l'étuve à 102 ± 2 °C pendant 24 h, jusqu'à dessiccation complète de l'échantillon. Après refroidissement, la capsule a été pesée à 1 mg près.

3.2.2.3 Teneur de la matière grasse

Le principe de la méthode acido-butyrométrique repose sur la mesure du volume de graisses qui apparaît à la surface d'un butyromètre gradué, après la dégradation des protéines par l'acide sulfurique, l'ajout d'alcool isoamylique (pour une meilleure séparation des couches) et la centrifugation (NF V04-208:1989).

Dans un butyromètre, 3 g de fromage ont été pesés et 15 mL H₂SO₄ (62%) ont été rajoutés. Les butyromètres ont été placés dans le bain-marie (65 °C) et agités à plusieurs reprises jusqu'à la dissolution complète du fromage. Un millilitre d'alcool isoamylique a été rajouté. Après mélange à plusieurs reprises, repos au bain-marie (5 minutes) et centrifugation (5 minutes) (Funke-Gerber, Allemagne) les butyromètres ont été replacés au bain-marie pendant 5 minutes. La colonne des lipides a été réglée à zéro et la lecture du taux de lipides a été faite à l'extrémité inférieure du ménisque, à plusieurs reprises.

3.2.2.4 Détermination de la teneur en cendres

Un gramme d'échantillon a été pesé dans un creuset de silice séché auparavant dans une étuve à 102 ± 2 °C, pendant 24 h. Le creuset a été placé dans un four à moufle programmable (Nagat, Montoir de Bretagne, France). Un programme de chauffage a été lancé : 1) pendant le séchage et la pré-incinération la température augmente de 50 °C/h jusqu'à 550 °C et 2) la température est maintenue pendant 6 h. Après la descente à température ambiante, les creusets ont été pesés à 4 chiffres après la virgule. Les résidus de cendres ont été dissouts avec 1 mL de solution d'acide nitrique à 25% et ont été complétés avec de l'eau déminéralisée dans une fiole de 250 mL. Après la mise en solution des flacons de 20 mL ont été congelés (- 20 °C), pour effectuer ensuite le dosage des minéraux.

3.2.2.5 Dosage de l'azote total

Le dosage de l'azote total s'effectue en trois étapes : la minéralisation (digestion), la distillation et la titration :

- a) La minéralisation d'une prise d'essai a lieu en présence de l'acide sulfurique concentré. Le sulfate de cuivre (II) est utilisé comme catalyseur pour convertir l'azote présent dans l'échantillon en sulfate d'ammonium ;
- b) La deuxième étape commence par l'addition de l'eau et de l'hydroxyde de sodium excédentaire au minéralisât refroidi pour libérer de l'ammoniac. La distillation de l'ammoniac libéré se fait à l'aide d'un appareil de distillation à la vapeur, dans un excédent de solution d'acide borique ;
- c) Le titrage se fait avec de l'acide sulfurique 0,1N. Le calcul de la teneur en azote se fait à partir de la quantité d'ammoniac produite.

Le dosage de N total a été déterminé selon la norme ISO 8968-1:2013. L'échantillon a été pesé sur du papier exempt d'azote. Deux pastilles de catalyseur et 20 mL d'H₂SO₄, d = 1,83 ont été rajoutés. La première étape a été réalisée sur le minéralisateur K-438 (Buchi, Rungis, France) couplé à un Scrubber B-414 (Buchi, Rungis, France) pendant 270 minutes (195 °C pendant 30 minutes, puis 410 °C pendant 140 minutes). Le minéralisât refroidi a été ensuite distillé avec un mélange d'eau et de soude (32%) et a été ensuite titré avec du H₂SO₄ (0,1N) à l'aide d'une unité de distillation K-370 (Buchi, Rungis, France). Chaque dosage a été accompagné d'un contrôle de la minéralisation et de la distillation, en déterminant la teneur en N du tryptophane et du NH₄(SO₄)₂, respectivement. La teneur en **protéines** a été calculée à partir de la teneur en N total en multipliant le résultat avec le facteur 6,38.

3.2.3 Détermination de la teneur en minéraux

3.2.3.1 Dosage du K, Na, Ca, Mg par spectrométrie d'absorption atomique

Dans son principe, la spectrométrie d'absorption atomique (SAA) consiste à vaporiser l'échantillon liquide et à le chauffer à l'aide d'une flamme. La flamme est dirigée vers une lumière émise par une lampe appropriée émettant les longueurs d'onde caractéristiques de l'élément recherché. En traversant la flamme, les ondes lumineuses - dont les longueurs d'onde correspondent à l'élément dosé - sont absorbées par les ions excités présents dans la flamme. L'absorption est mesurée à l'aide d'un prisme dispersif et d'une cellule photoélectrique : elle est directement proportionnelle à la concentration de l'élément. Lorsque les atomes d'un élément ont été excités, leur retour à l'état fondamental s'accompagne de l'émission de lumière d'une fréquence bien définie et propre à cet élément. Le même élément dispersé dans une flamme possède la propriété d'absorber tout rayonnement de même fréquence. Il en résulte une absorption du rayonnement incident lié à la concentration de l'élément considéré.

Les cendres mises en solution (Chapitre 3.2.2.4) ont été décongelées (4 °C), 24 h avant l'analyse. Après dilutions appropriées, les solutions d'essais ont été vaporisées dans la flamme aéroacétylénique d'un spectromètre à absorption atomique de flamme AA 240 FS (Varian, Les Ulis, France) en conformité avec la norme ISO 8070:2007. Les valeurs d'absorbance des solutions des cendres ont été mesurées à des longueurs d'onde différentes selon l'élément à doser ($\lambda_K = 766,5 \text{ nm}$; $\lambda_{Na} = 589,6 \text{ nm}$; $\lambda_{Ca} = 422,7 \text{ nm}$; $\lambda_{Mg} = 285,2 \text{ nm}$).

3.2.3.2 Dosage du phosphore par colorimétrie

La méthode nitro-vanado-molibdique consiste à rajouter à une solution contenant du phosphore du monovanadate et du heptamolybdate d'ammonium, avec l'obtention d'une coloration jaune de phospho-vanado-molybdate d'ammonium. Les valeurs d'absorbance des solutions obtenues sont mesurées avec un spectromètre à 436 nm.

Le dosage du P a été déterminé par spectrométrie UV-visible à partir de la même solution de cendres décrite précédemment (Chapitre 3.2.2.4). Deux millilitres de cette solution ont été mélangés avec 2 mL de réactif nitrovanadomolybdite. Après 30 minutes, la densité optique a été mesurée avec le Spectromètre UV-visible Anthelie Advanced (Secoman, Alès, France) à 436 nm.

Tableau 11. Grille de notation pour la Fourme d'Ambert à l'étape préliminaire (1/2)

Aspect extérieur (la notation se fait à partir d'un demi fromage)

Forme : (observer la hauteur du fromage et le diamètre du fromage) :

Longueur :

1	2	3	4	5	6
---	---	---	---	---	---

Note 1 : inférieure à 17 cm

Note 3 : 17 à 20 cm

Note 6 : supérieure à 20 cm

Diamètre :

1	2	3	4	5	6
---	---	---	---	---	---

Note 1 : sans déformations ni sur la surface ni sur le talon

Note 3 : légèrement écornée

Note 6 : déformée ovale

Croûtage : (toucher les deux faces et le talon)

Etat du croûtage :

1	2	3	4	5	6
---	---	---	---	---	---

Note 1 : sec

Note 3 : tendance à être humide

Note 6 : très humide, noisieux

Couleur du croûtage :

1	2	3	4	5	6
---	---	---	---	---	---

Note 1 : moisissures grises à ocre clair

Note 3 : tendance croûtage vert

Note 6 : croûte toute bleue, noire ou blanche

Aspect pâte (observer la répartition du bleu sur toute la coupe du fromage)

Persillage :

Quantité de bleu :

1	2	3	4	5	6
---	---	---	---	---	---

Note 1 : manque de bleu

Note 3 : normal

Note 6 : excessif, chargé

Répartition du bleu :

1	2	3	4	5	6
---	---	---	---	---	---

Note 1 : régulier

Note 3 : moyen

Note 6 : irrégulier

Taille des ouvertures :

1	2	3	4	5	6
---	---	---	---	---	---

Note 1 : petites

Note 3 : grosseur grain de blé à grain de maïs

Note 6 : nombreuses cavernes

3.2.4 Analyse des anions (chlorure, citrate et lactate)

3.2.4.1 Dosage des chlorures par potentiométrie

Le principe du dosage potentiométrique consiste à mesurer la différence de potentiel entre l'électrode de référence (AgCl/Ag^+) et l'électrode ionique sélective (comportant une membrane perméable au seul composé à analyser) plongées dans la solution de fromage, titrée avec de l' AgNO_3 . Au voisinage du point d'équivalence (la quantité d'ions Cl est égale à la quantité d'ions d' Ag), un saut de potentiel important a lieu, mettant fin à la titration.

Le dosage des chlorures des produits laitiers liquides et des suspensions de fromage se réfère à la norme NF EN ISO 5943:2007. Les prises d'essai solides ont été mélangées avec 70 mL d'eau distillée à 55 °C, puis stomachées entre 2 à 10 minutes, en fonction du type de produit. Le mélange a été transvasé dans un bécher de 100 mL et 3 mL d'acide nitrique à 4 mol/L (travailler en milieu acide permet d'empêcher l'hydrolyse des cations et la précipitation d'hydroxydes) ont été rajoutées. La titration a été faite avec une solution d' AgNO_3 à 0,1 mol/L en utilisant le titrateur Titroline Easy (Schott, Mainz, Allemagne).

3.2.4.2 Dosage enzymatique du citrate et lactate

En présence de la nicotinamide-adénine-dinucléotide, les acides D- et L-lactiques (D-, L-lactates) sont oxydés en pyruvate et en nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit (NADH) par les D- et L-lactate-déshydrogénases. Ensuite, en présence de L-glutamate, le pyruvate est transformé en L-alanine grâce à la glutamate-pyruvate-transaminase. La formation de NADH est proportionnelle à la quantité de D- et L-lactate. La teneur en NADH oxydée est déterminée par l'augmentation de l'absorbance à la longueur d'onde de 340 nm.

Pendant le dosage enzymatique, l'acide citrique est transformé en oxaloacétate et acétate dans une réaction catalysée par la citrate-lyase. En présence de la malate-déshydrogénase (MDH) et de la lactate-déshydrogénase (LDH), l'oxaloacétate et son dérivé de décarboxylation, le pyruvate, sont réduits en L-malate et en L-lactate par le NADH. La quantité de NADH oxydé en NAD^+ dans ces réactions est proportionnelle au citrate présent. L'oxydation du NADH est mesurée par la diminution de son absorbance à 340 nm.

Le citrate et lactate ont été mesurés avec des kits enzymatiques (Enzytec Citric acid, Enzytec Lactic acid, R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany). Dans un premier temps une déprotéinisation a été nécessaire. Ainsi, le produit (5 g) a été homogénéisé dans 50 mL d'acide perchlorique (1M) en utilisant un Ultra-Turax (16 000 tours/minute, 1 minute).

Tableau 11. Grille de notation pour la Fourme d'Ambert à l'étape préliminaire (2/2)

Couleur de la pâte :

1	2	3	4	5	6
---	---	---	---	---	---

Note 1 : très blanche avec bicoloration
Note 3 : uniforme, blanc crème avec persillage bleu vert
Note 6 : uniforme. iaune intense (nôte tvne Monthbrison)

Texture pâte

Onctuosité (*dont l'aspect rappelle celui d'un corps gras. A évaluer en bouche*)

1	2	3	4	5	6
---	---	---	---	---	---

Note 1 : crayeuse – sèche – granuleux – sableux
Note 3 : manque d'onctuosité
Note 6 : très onctueuse. crémeuse

Protéolyse (*à évaluer de visu – aspect coulant ou non*)

1	2	3	4	5	6
---	---	---	---	---	---

Note 1 : jeune, friable, acide
Note 3 : souple, non coulante
Note 6 : très protéolysée (limite du coulant)

Goût

Sel (*ne pas confondre avec le piquant du Pénicillium*)

1	2	3	4	5	6
---	---	---	---	---	---

Note 1 : sel imperceptible
Note 2 : manque de sel
Note 3 : normal, recherché
Note 4 : pointe de sel
Note 5 : très salée
Note 6 : beaucoup trop salé

Amertume

1	2	3	4	5	6
---	---	---	---	---	---

Note 1 : pas d'amertume
Note 3 : pointe d'amertume
Note 6 : très amère

Goût – impression générale (*signaler les éventuels défauts : rance, saponifié, acide, ammoniacal, moisi*)

1	2	3	4	5	6
---	---	---	---	---	---

Note 1 : fade (manque de saveurs)
Note 3 : acceptable
Note 6 : franc, plutôt typé, savoureux

L'homogénat a été centrifugé à 18 000 x g pendant 10 min, ensuite 20 mL de supernatant ont été récupérés dans un bécher et ajustés à un pH 8 - 10 avec environ 4 mL KOH (5M). Les béchers ont été refroidis pendant 15 min (4 °C) pour précipiter le perchlorate de K et ensuite filtrés. Après dilutions appropriées et réactions avec les enzymes nécessaires fournies avec les kits, des mesures de densité optique ont été effectuées à l'aide du spectromètre UV-visible Anthelie Advanced (Secoman, Alès, France) à 340 nm.

3.3 Protocole expérimental pour la caractérisation sensorielle des Fourmes d'Ambert salées avec différents types de sel

3.3.1 Observations sensorielles à l'étape préliminaire

Pour vérifier la présence ou l'absence de défauts majeurs sur les produits obtenus à l'étape 3 préliminaire, des observations sensorielles ont été effectuées dans le laboratoire d'analyse sensorielle de VetAgro Sup. Le jury a été formé de 6 personnes (non entraînées, mais familiarisées avec l'analyse sensorielle) provenant de l'entreprise partenaire et de VetAgro Sup. Une grille de notation proche de la grille de l'entreprise a été construite pour évaluer l'aspect extérieur, l'aspect de la pâte, la texture et le goût des fromages obtenus avec substitution partielle du sel par des sels organiques (citrate et lactate de Ca) par rapport au Contrôle (**Tableau 11**).

3.3.2 Caractérisation sensorielle par un jury entraîné à l'étape finale

3.3.2.1 Jury qualifié

Un panel de 10 sujets, familier avec les fromages à pâte persillée, a été sélectionné parmi le panel qualifié de VetAgro Sup. Le panel a été entraîné à la génération de descripteurs ainsi qu'à l'utilisation d'échelles de perception selon la norme ISO 8586:2012. Les profils sensoriels des différents fromages ont été élaborés selon la norme NF EN ISO:13299.

3.3.2.2 Nature des échantillons à tester

Les fourmes d'Ambert ont été fabriquées à partir de lait pasteurisé (13 cm de diamètre et 19 cm de hauteur, poids d'environ 2,2 kg). Quatre types de fabrication (4 échantillons) ont été testés à plus de 56 jours d'affinage. Pour chaque type de fabrication, 3 fourmes ont été prélevées provenant du même lot. Les fromages ont été stockés en chambre froide à 0 °C jusqu'aux séances d'évaluation.

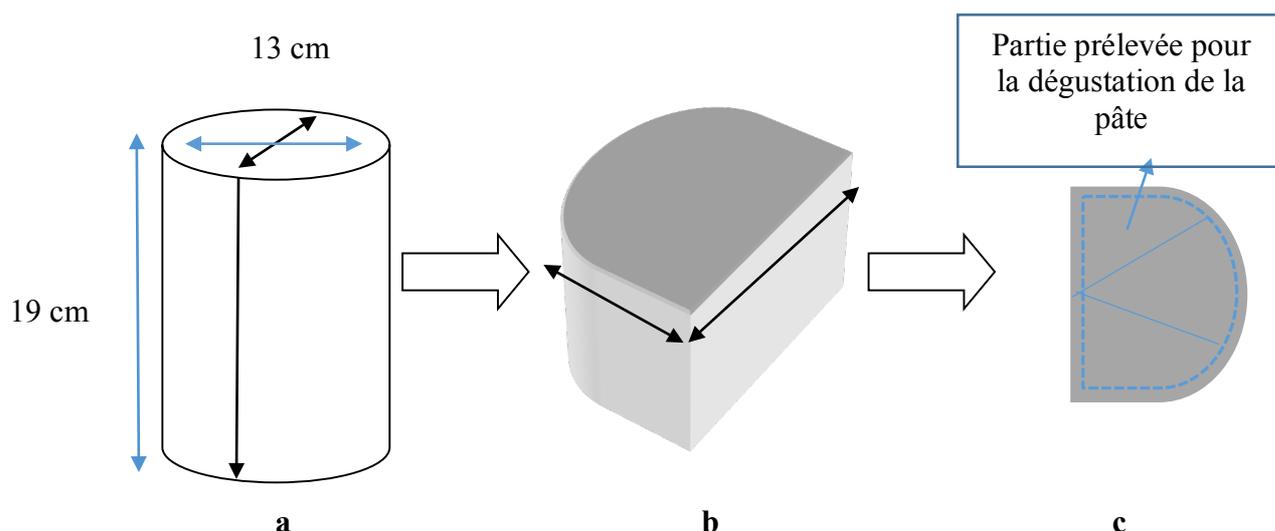


Figure 16. Découpe des fromages pour le test sensoriel

Tableau 12. Gamme de concentrations réalisée sur les différents sels pour les seuils de détection

Concentration (g/L de sel)	C ₁ = 0,34	C ₂ = 0,48	C ₃ = 0,69	C ₄ = 0,98	C ₅ = 1,40
NaCl ^a	0,34	0,48	0,69	0,98	1,40
Lactate de calcium ^a	1,36	1,92	2,76	3,92	5,6
Citrate de calcium ^a	1,36	1,92	2,76	3,92	5,6

^a Quantité de sel à prélever pour obtenir la concentration C

Tableau 13. Solutions testées pour les différents tests triangulaires

Mélange testé	Support aqueux	Support semi-solide (fromage blanc)
CaLa75	2,76 g/L	2,76 g/kg
CaCi75	2,76 g/L	2,76 g/kg

Tableau 14. Gamme de concentrations citrate de Ca + NaCl réalisée pour le test de classement

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
CaCi + NaCl, g/L de sel	0 g/L	1,36 g/L	1,92 g/L	2,76 g/L	3,92 g/L	5,6 g/L

3.3.2.3 Découpe des fromages

Les 3 fromages ont d'abord été coupés en deux dans le sens de la hauteur (**Figure 16a**). Puis une tranche dans le sens de la longueur a été coupée (**Figure 16b**). Dans chacune de ces tranches, des portions triangulaires d'environ 20 g ont été découpés (**Figure 16c**). Les morceaux issus des 3 fromages du même traitement ont été poolés pour l'analyse des profils. Les fromages ont été écroutés, mais la croûte a été conservée pour être évaluée.

3.3.2.4 Déroulement des différentes étapes de l'étude sensorielle

Etape 1 : Remise à niveau et contrôle des performances du panel sur la grille sensorielle « Fourme d'Ambert » : 3 séances d'entraînement ;

Etape 2 : Réalisation des profils sensoriels pour évaluer et quantifier les différents critères sensoriels des fromages « Fourme d'Ambert » : 3 séances d'évaluation.

3.3.2.4.1 Etape 1 : Séances d'entraînement

Entraînement sur la capacité à discriminer :

Afin de se familiariser avec les différents sels, le panel a été entraîné à la reconnaissance et à la discrimination des sels utilisés au salage. Pour cela, différents tests (test de détection, test triangulaire, test de classement) ont été réalisés :

- *Seuil de détection*

Trois tests pour identifier le seuil de détection du panel ont été réalisés d'après la norme ISO 3972:2012 (ISO, 2012). Un test a été réalisé sur chaque type de sel : NaCl, lactate de Ca et citrate de Ca, en 5 concentrations différentes (**Tableau 12**).

- *Test triangulaire*

Quatre tests triangulaires ont été réalisés sur différents supports (solution aqueuse = eau déminéralisée ; support semi-solide = fromage blanc) afin d'identifier le pouvoir discriminant du panel. L'objectif a été de savoir si le panel était capable de percevoir une différence (la plus petite) entre deux échantillons (**Tableau 13**).

- *Test de classement*

Un test de classement a été réalisé avec l'objectif de mesurer la capacité du panel à classer différentes solutions aqueuses selon un ordre prédéterminé (**Tableau 14**).

Tableau 15. Grille d'évaluation du profil sensoriel et lexique utilisé (1/3)

Evaluation de la croûte (morceau entier) :

Descripteur	Définition	Borne inférieure	Borne moyenne	Borne supérieure
Couleur de la croûte	Intensité de la couleur de la croûte	Blanche 		Grise 
Hétérogénéité de la couleur de la croûte	Présence de couleurs diverses et discriminantes	Pas hétérogène : 1 seule couleur dominante		Hétérogène : plusieurs couleurs dominantes avec moisissures apparentes 
Collant de la croûte	Qui qualifie une croûte qui adhère au doigt avec une sensation d'humidité	Fourme de Montbrison	Fourme d'Ambert La Mémée 72 jours d'affinage	Bleu des Causses
Rugueux au toucher	Sensation d'une surface qui présente des aspérités	Fourme d'Ambert La Mémée 72 jours d'affinage	Fourme d'Ambert Garmy (FA1)	
Odeur globale	Intensité de l'odeur qui se dégage du produit	Bleu des Causses		Fourme de Montbrison
Arôme ammoniac	Arôme souvent caractéristique du brie ou du Camembert (fromage affiné)			Fourme de Montbrison
Arôme de cave/moisi	Arôme souvent caractéristique de celui d'une cave humide mal aérée			
Salé	Saveur représentative du chlorure de sodium	Borne 2 : 1 g/L NaCl	Borne 5 : 2,5 g/L NaCl	Borne 8 : 3 g/L NaCl Bleu des Causses
Sableux en bouche	Qualifie une croûte qui se désagrège en formant des « grains » de petite taille lors de la mastication. Qui crisse sous la dent	Fourme d'Ambert Patrimoine Gourmand		Fourme d'Ambert La Mémée 72 jours d'affinage

Entraînement du panel sur la grille sensorielle :

- *Nature des échantillons pour l'entraînement*

Cinq fromages ont été présentés au cours de ces séances dont les 4 types de fabrication fabriqués avec les différents sels (700 g de fromages pour les 3 séances d'entraînement) et une Fourme d'Ambert achetée dans le commerce.

- *Grille sensorielle*

Une grille sensorielle existante, associée à l'espace produit « Fourme », a été utilisée par le panel. Les 3 séances ont ainsi permis d'adapter la grille sensorielle au nouvel « espace produit Fourme » et de valider les descripteurs à conserver ou à ajouter (**Tableau 15**). Des descripteurs en lien avec la croûte ont été générés. Par ailleurs, de nouveaux référents, pour illustrer chaque descripteur, ont été validés par l'ensemble du panel. Un protocole de dégustation a également été établi pour chaque morceau (fromage entier, pâte et croûte).

3.3.2.4.2 Etape 2: Séances d'évaluation

Déroulement des séances :

L'évaluation finale des produits s'est déroulée en 3 séances d'une heure. Quatre échantillons ont été testés à chaque séance ; 3 répétitions ont été réalisées par échantillon soit 30 réponses par échantillon (10 sujets * 3 répétitions), (1 échantillon = 1 type de fabrication).

Service et dégustation :

Les morceaux d'échantillon (pâte) ont été déposés dans des petites assiettes en plastique codées à 3 chiffres. Un morceau de croûte a également été associé à la pâte pour être évalué. Le panel a d'abord évalué l'aspect de la pâte et de la croûte sur des morceaux entiers. Par la suite, le panel a évalué (en bouche) la croûte suivie d'un morceau de pâte. Les sujets ont évalués les échantillons de fromages dans des cabines standardisées, en lumière blanche, la température de la salle a été contrôlée à 21 ± 1 °C (ISO, 2010). Les fromages ont été servis à 20 ± 1 °C et présentés en monadique séquentiel (un produit après l'autre) suivant un ordre basé sur un design de carré latin de Williams (ordre différent d'un juge à l'autre, pour équilibrer l'effet d'ordre). Chaque descripteur a été évalué sur une échelle non structurée de 10 cm bornée de « 0 = pas intense » à « 10 = très intense » pour noter l'intensité des descripteurs. Les réponses ont été collectées avec le logiciel Tastel® (version 2013, ABT Informatique, Rouvroy-sur-Marne, France).

Tableau 15. Grille d'évaluation du profil sensoriel et lexique utilisé (2/3)

Evaluation de la pâte

Aspect et texture sur morceau entier :

Descripteur	Définition	Borne inférieure	Borne moyenne	Borne supérieure
Couleur de la pâte	Intensité de la couleur écrue/ivoire de la pâte. <i>Evaluer ce descripteur sur le morceau entier.</i>	Couleur blanche 	/	Couleur jaune 
Quantité persillage	Présence de moisissures à la surface du fromage. <i>Evaluer ce descripteur sur le morceau entier.</i>	Borne 1 – peu de persillage 	Borne 5	Borne 10 
Répartition du persillage	Répartition homogène du persillage sur le fromage. <i>Evaluer ce descripteur sur le morceau entier.</i>	Borne 3 – répartition peu homogène	Borne 6 – répartition moyennement homogène	Borne 10 – très bonne répartition 
Humidité de la pâte	Présence d'eau sur la tranche. <i>Evaluer ce descripteur sur la tranche donnée</i>	Fourme de Montbrison	/	Bleu des Causses

Texture au doigt :

Descripteur	Définition	Borne inférieure	Borne moyenne	Borne supérieure
Ferme	Force nécessaire pour déformer le produit	Bresse Bleu	Carré d'Aurillac	Fourme de Montbrison

Flaveur (sur pâte) :

Descripteur	Définition	Borne inférieure	Borne moyenne	Borne supérieure
Intensité Globale	Intensité de l'odeur qui se dégage du produit	Tomme fraîche	Boursault®	Bleu des Causses
Odeur Ammoniacque	Odeur souvent caractéristique du brie ou du Camembert (piquant)	Carré d'Aurillac	Boursault®	Camembert Lanquetot®
Odeur Bleu	Odeur caractéristique de moisissures de type <i>Penicillium</i>	Carré d'Aurillac		Bleu des Causses

3.4 Méthodes statistiques

3.4.1.1 Analyses biochimiques (étape 1 - 3)

Les données biochimiques ont été analysées à l'aide du logiciel XLSTAT (Addinsoft, Paris, France). Les résultats sont présentés sous forme : moyenne \pm écart type. Le test Shapiro-Wilk ($P < 0,05$) a été effectué avec le but de vérifier la normalité des données. En fonction des résultats de normalité, des ANOVA à un facteur (avec test post-hoc de comparaison multiple de Tukey) ainsi que des tests Kruskal-Wallis (non-paramétriques) avec des tests post-hoc de comparaison multiple (procédure Conover-Iman et Dunn) ont été adoptées pour comparer les moyennes des concentrations en éléments étudiés. Les différences entre les valeurs moyennes étaient considérées significatives à $P < 0,05$.

3.4.1.2 Validation des performances du panel sensoriel (étape 3)

Lors des entraînements, la performance du panel a été validée. Trois paramètres ont été vérifiés :

- **La discrimination** : le pouvoir discriminant correspond à la capacité à détecter une différence d'intensité entre deux ou plusieurs produits pour un descripteur donné ;
- **La répétabilité** : correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats donnés par un même sujet pour un même descripteur effectué sur le même produit dans un court intervalle de temps (si répétition) ;
- **L'accord ou consensus**: l'accord correspond au degré de ressemblance qui existe entre les notations des sujets pour différents produits.

Pour mesurer ces 3 paramètres, une ANOVA à 3 facteurs (produits (P), sujets (S) et répétition (R)) avec interaction a été réalisée selon le modèle suivant :

$$\text{Note} = P + R + S + (P * S) + (R * S) + (P * R)$$

3.4.1.3 Analyse du profil sensoriel (étape 3)

Une ANOVA à deux facteurs (Sujets, Produits) avec interaction a été réalisée sur les données issues du profil sensoriel pour chaque descripteur. Un modèle mixte a été réalisé en prenant les produits comme effet fixe et les sujets comme effet aléatoire. Un test de comparaison de moyenne a été réalisé en utilisant le test de Tukey avec un niveau d'erreur de 5% lorsque l'ANOVA était significative.

Tableau 15. Grille d'évaluation du profil sensoriel et lexique utilisé (3/3)**Flaveur (sur pâte) :**

Descripteur	Définition	Borne inférieure	Borne moyenne	Borne supérieure
Salée	Molécule de référence : NaCl dans l'eau	Borne 2 : 1 g/L NaCl Bresse Bleu Cora	Borne 5 : 2,5 g/L NaCl	Borne 8 : 3 g/L NaCl Bleu des Causses Patrimoine Gourmand
Acide	Molécule de référence : acide lactique dans l'eau	Borne 3 : 0,84 g/L acide lactique Carré d'Aurillac		Borne 7 : 1,23 g/L acide lactique Fourme d'Ambert Garmy
Amère	Molécule de référence : leucine dans l'eau	Borne 2 : 1,8 g/L leucine Bresse Bleu Cora	Borne 6 : 3 g/L leucine	Borne 8 : 5 g/L leucine Bleu d'Auvergne La Mémée
Piquant	Perception irritante qui est perçue sur les muqueuses	Borne 2 : 2 g moutarde dans 100 g fromage blanc	Borne 5 : 5 g moutarde dans 100 g fromage blanc	Borne 7 : 7 g moutarde dans 100 g fromage blanc Bleu des Causses Patrimoine Gourmand
Intensité de l'arôme globale	Intensité de l'arôme dégagé par le produit	Carré d'Aurillac		Bleu des Causses Patrimoine Gourmand
Arôme Ammoniac	Arôme caractéristique du brie ou du camembert	Carré d'Aurillac	Bleu d'Auvergne La Mémée	Camembert Lanquetot®
Arôme Bleu	Arôme caractéristique de moisissures de type <i>Penicillium</i>	Bresse Bleu	Bleu d'Auvergne La Mémée	Bleu des Causses Patrimoine Gourmand
Persistance	Arôme qui persiste en bouche après avoir avalé le produit (durée)	Carré d'Aurillac		Bleu d'Auvergne La Mémée

Texture en bouche :

Descripteur	Définition	Borne inférieure	Borne moyenne	Borne supérieure
Ferme	Force nécessaire pour déformer le fromage	Bresse Bleu	Fourme de Montbrison	Cantal jeune
Onctueuse	Texture onctueuse, perception de gras en bouche	Fourme de Montbrison	Bleu des Causses	Bresse Bleu Cora
Crayeuse	Texture sèche avec la présence de petites particules en bouche	Boursault	Buche de chèvre 1 ^{re} prix	Camembert (cœur)
Collante	Qui adhère au palais lors de la mastication		Bresse Bleu Cora	Bleu d'Auvergne La Mémée

Une Analyse en Composantes Principales (ACP) a été réalisée sur les moyennes de chaque descripteur sur l'ensemble des quatre types de fabrication. Les descripteurs significatifs ont été projetés en variables actives tandis que les autres descripteurs (non significatifs) ont été projetés en variables supplémentaires.

Une Classification Hiérarchique Ascendante (CHA) a été réalisée sur les données issues du profil sensoriel afin de classer les différentes fabrications dans des groupes homogènes. La méthode de Ward's et la distance euclidienne ont été appliquées pour réaliser cette classification, réalisée uniquement sur les descripteurs significatifs.

Chapitre 4.

RESULTATS ET DISCUSSION

4. Résultats et discussion

4.1 Etape 1 : Caractérisation du potentiel acidifiant de fromages issus de technologies fromagères différentes

4.1.1 Contexte de l'étude

Les fromages sont clairement identifiés comme des produits induisant une charge acide importante au niveau de l'organisme (Demigné, 2008; Remer and Manz, 1995), étant consommés en grande quantité dans les pays occidentaux, avec plus de 20 kg de fromage consommés par habitant et par an en France, en Allemagne, en Suisse et en Italie (Fox and Guinee, 2013). Néanmoins, il semble qu'en fonction du type de pâte, les fromages présentent un potentiel acidifiant plus ou moins important (Remer & Manz, 1995).

Une caractérisation du potentiel acidifiant de fromages issus de technologies différentes nous semblait une première étape essentielle. Suite à des recherches bibliographiques, le calcul d'un indice PRAL fiable est vite apparu difficile à partir des données de la littérature. Jusqu'ici, la majorité des études portant sur la composition des fromages s'était concentrée sur certains composés comme les minéraux (Gursoy et al., 2014; Lante et al., 2006; Moreno-Rojas et al., 1994) et fournissaient très rarement une caractérisation suffisante pour effectuer le calcul du PRAL. D'autre part, les tables de composition nutritionnelle sont apparues incomplètes, la plupart des sources étant non-identifiables et présentant des méthodes et indices de confiance différents (ANSES, 2013).

Une première étude a donc été mise en œuvre pour pallier ce manque de données.

4.1.2 Objectifs

L'**objectif** de cette première étape était de caractériser et quantifier le potentiel acidifiant de fromages fabriqués selon des technologies fromagères différentes (pâte fraîche, pâte molle, pâte persillée, pâte pressée cuite et pâte pressée non-cuite) pour observer l'effet global des technologies de fabrication.

Cette étape constituait, donc, une réponse à un manque d'éléments dans la littérature nécessaires au calcul d'un indice PRAL fiable et à l'évaluation du potentiel acidifiant/alcalinisant de différents types de fromage.

4.1.3 Principaux résultats et discussion

L'étude a permis la caractérisation de la composition et du potentiel acidifiant (basé sur le calcul de l'indice PRAL (protéines, P, Cl, Na, K, Mg, Ca) et sur la teneur en anions organiques) de sept produits laitiers commerciaux : deux laits (cru et pasteurisé) et cinq fromages (fromage frais, Camembert de Normandie AOP, Fourme d'Ambert AOP, Cantal AOP et Comté AOP), choisis en fonction du type de technologie mis en œuvre.

Les deux types de lait ont été caractérisés par un PRAL quasi-neutre, avec des index proches de zéro (0,6 et 0,7 mEq/100 g, respectivement), ce qui est en accord avec les données de Remer et Manz (1995).

Un lien fort entre le type de fromage et le potentiel acidifiant a été mis en évidence. Ainsi, le fromage frais a été le seul fromage caractérisé par un PRAL légèrement alcalinisant (- 0,8 mEq/100 g), tandis que les fromages affinés ont présenté des indices PRAL situés entre 16,5 mEq/100 g pour CN et 28 mEq/100 g pour FA. Les indices PRAL des deux pâtes molles, CN et FA, ont montré de larges variations inter-lots (entre 14,7 et 20,0 mEq/100 g pour CN et 21,7 et 37,5 mEq/100 g pour FA). Ces fluctuations sont dues aux variations des teneurs en minéraux, que l'on prend en compte dans le calcul du PRAL. Des situations similaires ont déjà été rapportées dans des pâtes molles (Abbas et al., 2012; Bord et al., 2015; Jacquot et al., 2015; Jaoude et al., 2010; Moreno-Rojas et al., 2012) et peuvent être attribuées aux matrices hétérogènes de ces fromages. Par ailleurs, cette hétérogénéité peut être attribuée au développement des flores microbiennes d'affinage : *Geotrichum candidum*, *P. camemberti* et *P. roqueforti* (Abbas, 2012; Prieto et al., 2000) et aux migrations des minéraux qu'elles peuvent induire (Le Graet et al., 1983; McSweeney and Fox, 2004; McSweeney and Sousa, 2000).

Les valeurs élevées du PRAL de la Fourme d'Ambert ($28,0 \pm 8,1$ mEq/100 g) s'expliquent par des teneurs importantes en Cl, et plus précisément par des teneurs plus importantes en Cl qu'en Na. De telles relations non-stœchiométriques ont été rapportées sur de nombreuses matrices fromagères comme le Parmesan (Remer and Manz, 1995), le fromage bleu Picón Bejes-Tresviso (Prieto et al., 2002, 2000), le Camembert (Boutrou et al., 1999) et le Cantal (De Freitas et al., 2007). Les résultats obtenus à cette étape mettent en évidence le rôle de ces deux ions (Cl⁻ et Na⁺) dans le potentiel acidifiant des fromages. L'étude démontre donc l'intérêt de considérer ces deux éléments dans la formule du PRAL pour ce type de produit et

de ne pas se réduire à l'usage de la formule simplifiée⁵ proposée par Remer en 2003 (Remer, 2003; Frassetto et al., 2007a).

Les pâtes pressées cuites (CO) et non-cuites (CA) ont également montré des PRAL élevés (25,3 mEq/100 g et 22,3 mEq/100 g, respectivement) et sont en accord avec les indices rapportés dans des types de fromages similaires (Remer and Manz, 1995). Les valeurs obtenues révèlent un impact majeur des éléments acidifiants (Cl, P et protéines) par rapport aux éléments alcalinisants (Ca et Na). Le K et le Mg exercent un impact négligeable du fait de leurs faibles concentrations dans ces fromages. Outre l'effet acidogène bien connu des protéines (Alexy et al., 2005; Barzel and Massey, 1998; Frassetto et al., 1998; Sellmeyer et al., 2001), un des apports remarquables de cette étude est la contribution majeure des éléments Cl et P au potentiel acidifiant des fromages, notamment des fromages à pâte pressée.

Le citrate et le lactate, présentent un effet alcalinisant du fait de la libération de molécules de bicarbonate (système tampon de l'organisme) lors de leur métabolisme (Lemann et al., 2003; Oh, 2000; Poupin et al., 2012). Dans ce sens, les anions organiques apportés par l'alimentation compensent une partie de l'acidité fixe qui se forme dans l'organisme (Demigné et al., 2004a; Sabboh et al., 2007).

Les deux types de lait ont été les produits les plus riches en citrate (entre 82,1 et 94,0 mg/100 g), tandis les cinq fromages étudiés ont montré des teneurs en citrate situées entre 1,0 et 49,5 mg/100 g, pour le fromage frais et le Comté, respectivement. Ces valeurs, rapportées à une portion (entre 30 et 40 g), représentent, sans doute, un apport faible et par conséquent un effet alcalinisant négligeable. Une situation inverse a été remarquée pour la teneur en lactate, qui était négligeable dans les deux types de lait (environ 3 mg/100 g) et très importante pour les cinq fromages (entre 105,2 et 1204,2 mg/100 g), en particulier pour le fromage frais et les deux pâtes pressées, le Cantal et le Comté. Ce résultat suggère donc que les fortes valeurs de PRAL du Cantal, du Comté et de la Fourme d'Ambert sont sans doute à nuancer compte-tenu des fortes teneurs en lactate, que comportent ces fromages, anion non considéré dans le calcul du PRAL.

⁵ La formule simplifiée du PRAL repose sur l'hypothèse que l'apport de Na se fait essentiellement sous forme de NaCl et que les termes Na et Cl s'annulent et peuvent donc être omis. L'usage de la formule simplifiée s'applique lors de l'évaluation du PRAL de régimes alimentaires à l'aide de tables de compositions.

4.1.4 Conclusions et perspectives

La première étape de la thèse a permis de mettre en évidence un lien fort entre le type de fromage et le potentiel acidifiant. Ainsi, le fromage frais a été caractérisé par un potentiel légèrement alcalinisant, avec un PRAL en dessous de zéro (- 0,8 mEq/100 g), tandis que les fromages affinés ont présenté des potentiels acidifiants différents, d'un type de fromage à l'autre. Le fromage à pâte molle CN a montré un potentiel acidifiant modéré (PRAL = 16,5 mEq/100 g), alors que les pâtes pressées et persillée ont présenté les potentiels acidifiants les plus forts (entre 22,3 et 28,0 mEq/100 g).

L'étude de la construction du PRAL et notamment de l'importance relative des éléments qui le composent démontre un important déséquilibre entre les éléments acidifiants (Cl, P, protéines) et les éléments alcalinisants majeurs (Na et Ca). Alors que la littérature souligne essentiellement le caractère acidogène des protéines, les résultats de cette étude soulignent que les éléments Cl et P sont finalement tout aussi importants dans le cas des fromages. Ce travail montre également que le PRAL est soumis à des variations inter-lots, résultant de variations de composition relativement importantes rencontrées à l'échelle industrielle. Cette étude originale fait ressortir un autre résultat remarquable : la teneur importante en lactate des fromages à pâte pressée aurait sans doute un impact alcalinisant qui permettrait de nuancer le fort indice PRAL de ces produits.

Les résultats obtenus à cette étape pourraient être utilisés pour compléter les tables de composition Ciqual, par exemple les teneurs en Cl, lactate et citrate du lait pasteurisé et des fromages Camembert de Normandie, Fourme d'Ambert et Comté ; de corriger, voire expliquer la teneur en P pour la Fourme d'Ambert ; et de créer des fiches nutritionnelles pour le lait cru, et le Cantal.

D'un point de vue clinique, cette étude pourrait également être utile pour affiner davantage l'évaluation de la charge acide générée par l'alimentation au système métabolique.

Cette étude exploratoire a été poursuivie par une seconde étude visant à déterminer l'évolution du potentiel acidifiant tout au long de la fabrication d'un fromage modèle, pour mieux comprendre sa génération. La Fourme d'Ambert, a été choisie pour la suite de l'étude, compte-tenu de son indice PRAL important. Il s'agissait également d'un bon candidat au regard de différentes contraintes : faisabilité technique (temps d'affinage moyen de 56 jours jusqu'à la consommation), aspects logistiques.

Les résultats obtenus à l'étape 1 ont fait l'objet d'un premier article « **Exploratory study of acid-forming potential of commercial cheeses: impact of cheese type** » publié dans « **International Journal of Food Science and Nutrition** », soumis le 16 décembre 2015, accepté le 11 mars 2016 et publié en ligne le 5 avril 2016, disponible sur le lien suivant : <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/09637486.2016.1166188> et d'un poster (**Annexe 1**).

4.1.5 Article 1. « Exploratory study of acid-forming potential of commercial cheeses: impact of cheese type »

Ecaterina Gore; Julie Mardon; Delphine Guerinon; Annick Lebecque

Clermont Université, VetAgro Sup, UPSP n°2011-03-100, UR CALITYSS, 89 avenue de l'Europe, F-63370 Lempdes, France

Mots-clés :

Potential Renal Acid Load (PRAL)
Composition minérale
Anions organiques
Fromages AOP
Lait

Résumé :

En raison de leur composition, les fromages sont susceptibles d'induire une charge acide au niveau de l'organisme. Pour mieux comprendre cet aspect nutritionnel, le potentiel acidifiant de cinq fromages provenant de différentes technologies de fabrication et de deux types de lait a été évalué sur la base du calcul de leur indice PRAL (Potential Renal Acid Load), qui prend en compte les teneurs en protéines, P, Cl, Na, K, Mg, Ca) et sur leurs teneurs en anions organiques (citrate et lactate). L'indice PRAL le plus faible était celui du fromage frais avec - 0,8 mEq/100 g, les indices les plus élevés atteignant 25,3 mEq/100 g pour le fromage à pâte pressée non-cuite (Cantal) et même 28,0 mEq/100 g pour le fromage à pâte persillée (Fourme d'Ambert). Les valeurs du PRAL ont fait l'objet de variations inter-lots assez importantes. Cette étude démontre un déséquilibre important parmi les éléments acidifiants (Cl, P, protéines) et les éléments alcalinisants majeurs (Na et Ca). En particulier, les Cl suivis par le P, ont exercé un très fort impact sur les valeurs du PRAL. En raison de leur composition riche en lactate, les fromages à pâte pressée pourraient être moins acidifiants que suspecté uniquement par leur valeur du PRAL.

Exploratory study of acid-forming potential of commercial cheeses: impact of cheese type

Ecaterina Gore, Julie Mardon, Delphine Guerinon & Annick Lebecque

To cite this article: Ecaterina Gore, Julie Mardon, Delphine Guerinon & Annick Lebecque (2016): Exploratory study of acid-forming potential of commercial cheeses: impact of cheese type, International Journal of Food Sciences and Nutrition

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.3109/09637486.2016.1166188>



Published online: 05 Apr 2016.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

RESEARCH ARTICLE

Exploratory study of acid-forming potential of commercial cheeses: impact of cheese type

Ecaterina Gore, Julie Mardon, Delphine Guerinon and Annick Lebecque

VetAgro Sup – Campus agronomique de Clermont, CALITYSS, Europe Avenue, BP-35, Lempdes, France

ABSTRACT

Due to their composition, cheeses are suspected to induce an acid load to the body. To better understand this nutritional feature, the acid-forming potential of five cheeses from different cheese-making technologies and two milk was evaluated on the basis of their potential renal acid load (PRAL) index (considering protein, P, Cl, Na, K, Mg and Ca contents) and organic anions contents. PRAL index ranged from -0.8 mEq/100 g edible portion for fresh cheese to 25.3 mEq/100 g for hard cheese Cantal and 28 mEq/100 g for blue-veined cheese Fourme d'Ambert. PRAL values were greatly subjected to interbatch fluctuations. This work emphasized a great imbalance between acidifying elements of PRAL calculation (Cl, P and proteins elements) and alkalinizing ones (Na and Ca). Particularly, Cl followed by P elements had a strong impact on the PRAL value. Hard cheeses were rich in lactate, thus, might be less acidifying than suspected by their PRAL values only.

ARTICLE HISTORY

Received 16 December 2015
Revised 10 March 2016
Accepted 11 March 2016
Published online 4 April 2016

KEYWORDS

Milk; mineral composition; organic anions; PDO cheeses; potential renal acid load (PRAL)

Introduction

Cheese is consumed in significant quantities in western countries, with annual consumptions of 25.7 kg, 22.2 kg, 22.2 kg, 20.5 kg, 16 kg per capita for France, Germany, Switzerland, Italy and USA, respectively (Fox & Guinee 2013). Although its composition varies, cheese is recognized as a substantial source of general nutrients (McGill et al. 2008). Numerous works demonstrated the beneficial effect of dairy products for bone health, mainly attributed to their content in Ca, vitamin D and proteins (Josse et al. 2012; Demmer et al. 2014; Rizzoli 2014). Besides, cheese has been identified as one of the main food vectors of salt (40 g of cheese account for 10% of the recommended daily salt intake) (Saint-Eve et al. 2009; Chekri et al. 2012) and it has been clearly demonstrated that a high-salt diet leads to health issues, such as hypertension (Blaustein et al. 2012), a risk factor for cardiovascular diseases (He et al. 2011).

A nutritional aspect less-studied till now is the acid-forming potential of cheeses. Indeed, cheeses are classified as the most acidifying food group (Remer & Manz 1995). It means that their consumption and metabolism lead to the production of fixed acids resulting from sulfate (generated from sulfur-containing amino acids), phosphate (generated from phosphoproteins) and chloride, generated from salt (Oh 2000; Poupin et al. 2012). When the acid load generated by the diet exceeds the neutralization capacity of the homeostatic

systems of the body, the solicitation of bone minerals or muscular amino acids would occur (Cordain et al. 2005). In the long term, this low-grade metabolic acidosis might result in deleterious health consequences like renal stones (Frassetto et al. 2008, 2007), osteoporosis (Lemann et al. 2003; Mardon et al. 2008; Pedone et al. 2010) or loss of muscle mass (Frassetto et al. 2008).

The method proposed for estimating the acid-forming potential of food products is based on the calculation of the PRAL (potential renal acid load) index (Remer & Manz 1995). The PRAL takes into account the protein and mineral composition of a foodstuff, the intestinal absorption of these nutrients, the valence or ionic charge of the minerals, as well as the amount of sulfate produced from metabolized proteins according to the equation:

$$\begin{aligned} \text{PRAL (mEq/100 g edible portion)} \\ = & 0.49 \times \text{protein (g/100 g)} + 0.037 \times \text{P (mg/100 g)} \\ & + 0.027 \times \text{Cl (mg/100 g)} - 0.041 \times \text{Na (mg/100 g)} \\ & - 0.021 \times \text{K (mg/100 g)} - 0.026 \times \text{Mg (mg/100 g)} \\ & - 0.013 \times \text{Ca (mg/100 g)} \end{aligned} \quad (1)$$

According to this calculation model, negative PRAL values indicate an excess of the base-forming potential

of foods, whereas positive PRAL values indicate an excess of the acid-forming potential of foods.

Organic anions content of food products may also impact the acid-base balance of the organism (Oh 2000; Demigné et al. 2004). Certainly, the most important organic sources of alkalis in the diet are organic anions associated with cations, coming mostly from fruits and vegetables (citrate, malate...). In cheeses, organic anions are the result of biochemical changes during processing and ripening (metabolism of residual lactose and of lactate and citrate) by selected cultures of lactic acid bacteria (Fox 2004; McSweeney 2004). Citrate is the most abundant organic acid present in raw milk (1233 mg/100 g dry matter) and lactate is the most abundant in yoghurt (14,509 mg/100 g dry matter) and cheese (14,601 mg/100 g dry matter) (Tormo & Izco 2004). Given the high level of consumption of dairy products in Western Europe (Fox & Guinee 2013), their impact could be significant in the acid-base balance of the diet. Indeed, ingested lactate and citrate salts lead to the production of bicarbonate during their metabolism, a strong alkalinizing component in the body (Oh 2000; Poupin et al. 2012). Thus, despite organic anions are not taken into account in PRAL calculation, it would be more accurate to consider these compounds when evaluating the acid-forming potential of dairy products.

Milk was reported to have a PRAL around zero (Remer & Manz 1995), thus inducing a negligible impact on the acid-base balance of the body. On the other hand, Camembert and Parmesan are two cheese types showing positive but very different PRAL values, namely 14.6 and 34.2 mEq/100 g, respectively (Remer & Manz 1995). As suggested by Demigné et al. (2004), it seems that cheese-making technologies would be responsible in the generation of the acid-forming potential of cheeses. The production of all types of cheese involves a generally similar process, including coagulation, stirring, salting and ripening; however, these various steps are modified to give products with the desired characteristics and different compositions

(Lucas et al. 2006b). It is thus hypothesized that different cheese types would have varying acidifying potentials.

To our knowledge, no work addressing the evaluation of the acidifying potential of different cheese types is reported in the literature. Yet it could be potentially clinically useful data for assessing the diet-dependent net acid load to the metabolic system or when studying the nutritional impact of dairy products. Existing studies, focusing on the mineral content of different dairy products (Moreno-Rojas et al. 1994; Lante et al. 2006; Gursoy et al. 2014) rarely allow to get enough information to calculate a PRAL index. Insufficient data were found from nutrition facts tables (ANSES and Santé Canada, 2007) as well to estimate valuable acid-forming potential (due to incomplete data and heterogeneities in sources, methods and confidence indexes) and often do not provide organic anions concentrations. We propose to contribute to the improvement of this aspect.

As an exploratory step to study the impact of processing on acid-forming potential of cheeses, the aim of this work was to characterize the acid-forming potential of different cheese types chosen from various cheese-making technologies. Various protected designation of origin (PDO) cheeses, answering for rigorous specifications were selected to conduct the study.

Materials and methods

Sampling

The study was carried out on commercial French cheeses selected for their different type: fresh cheese Faisselle (FC), soft mold ripened cheese Camembert de Normandie (CN), blue-veined cheese Fourme d'Ambert (FA), two hard cheeses Cantal (CA) and Comte (CO). The main characteristics of these cheeses are described in Table 1. Raw milk (RM) and pasteurized milk (PM) were studied as well. All products were purchased in a same local supermarket in Lempdes (Auvergne area, Center of France).

Table 1. Characteristics of the five cheese varieties studied.

	Cheese type				
	Fresh cheese	Soft cheeses		Hard cheeses	
Cheese name	Faisselle (FC)	Camembert de Normandie (CN)	Fourme d'Ambert (FA)	Cantal (CA)	Comte (CO)
Official quality sign ^a	–	PDO	PDO	PDO	PDO
Production area	–	Normandy	Auvergne	Auvergne	Franche-Comte
Milk nature	pasteurized	raw	pasteurized	pasteurized	raw
Species	cow	cow	cow	cow	cow
Cheese-making technology	lactic coagulation	surface mold ripened	blue-veined	pressed uncooked	pressed cooked
Weight (kg)	1	0.25	2.2	35–45	35–45
Ripening time (d)	0	21	63	150	150

^aPDO – protected designation of origin.

For each product, three batches, obtained at one-week interval, were selected in order to overcome the interbatch compositional variations of the commercial products. Three samples per batch (the same trademark) were chosen randomly to make a pool: 1 L of milk per sample, 1 kg of FC per sample, 250 g of CN per sample, 1 kg of FA per sample, 1 kg of CA per sample. For CO, only two batches and two samples (800 g) per batch were available. The analysis was done only on the edible part of the cheeses: the rind of CN was kept and the one of FA, CA, CO cheeses was removed. The products were then packed in plastic vials or vacuum bags and frozen in the cooling cell (Tecnox, France) till -20°C and kept in the freezer (-20°C). One day before analysis, the samples were transferred in a fridge (4°C).

Basic chemical analysis

Ground cheese samples were analyzed in triplicate for pH, dry matter, fat, ash, total nitrogen and protein according to the ISO standards (AFNOR 2013). The pH was measured at 20°C by using a pH meter (Schott, CG840, Paris, France) according to FD V04-035:2009. The dry matter content was obtained by drying 3 g of product at 105°C in an oven for 24 h (NF EN ISO 5534:2004). The fat content was assayed using a Gerber method (NF V04-210:2000) and the ash content using a dry ash method (NF V04-208:1989). The total N was determined by Kjeldahl nitrogen analysis, reference method for protein determination in dairy products (ISO 8968-1:2013). The analysis was made using a Kjeldahl Unit (Büchi, Switzerland). The amount of total N obtained was multiplied by a 6.38 factor to express the results in total protein.

Minerals determination (calcium, phosphorus, potassium, magnesium, sodium)

The mineralization phase of 1 g of product was realized in triplicate in a programmable oven (Fours Nagat 44550, France), at 550°C for six hours. The ashes obtained were dissolved in 1 mL nitric acid (25%) and then added to 250 mL with demineralized water. After appropriate dilution, the solution was injected in a Fast Sequential Atomic Absorption Spectrometer (Varian, AA240FS) according to ISO 8070:2007 to assay Ca, K, Mg and Na contents. The total P was assessed with the colorimetric nitro-vanado-molybdate method from the same ash solution on a Spectrophotometer (Secomam, Domont, France), at 430 nm wavelength.

Analysis of chloride, citrate and lactate

The Cl content in milk and cheese slurry was measured by potentiometric titration (Titroline Easy Potentiometer)

with silver nitrate 0.1 N (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France) according to NF EN ISO 5943:2007.

The citrate and lactate contents were measured by enzymatic bio analysis (Enzytec Citric acid, Enzytec Lactic acid, R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany). Cheese samples (5 g) were homogenized in 50 mL perchloric acid (1 M) using an Ultra-Turax homogenizer. The homogenate was then centrifuged at $18,000 \times g$ for 10 min. The supernatant (20 mL) was adjusted to pH 8–10 with approximately 4 mL KOH (5M) and placed for 15 min in the refrigerator for the quantitative precipitation of the formed potassium perchlorate and then filtered. The amount of NADH oxidized in the reactions of the filtrate with the different enzymes was determined by means of its light absorbance at 340 nm and was stoichiometric to the amount of citrate and lactate. For each product, the assay was performed in triplicate.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using XL STAT software package (Addinsoft, Paris, France). Results are reported as means \pm SD. The Shapiro-Wilk ($p < 0.05$) statistic was performed to check the normality of our data. A large segment of variables lacked normality and therefore nonparametric (Kruskal-Wallis) test and *post hoc* multiple comparison (Conover-Iman procedure) were adopted to compare the concentrations of the studied elements. Differences between mean values were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Gross composition

Average pH, dry matter, fat, ash, total N, protein composition of the products are summarized in Table 2. Both milk (RM and PM) did not differ significantly in pH, dry matter and protein content. Conversely, RM showed a higher fat content and a lower ash content than PM. The lactic-coagulated fresh cheese (FC) showed a slightly higher dry matter content than RM. It was also characterized by the most acidic pH. Among ripened cheeses, CA and CO had a lower pH than CN. FA showed the highest pH value. The dry matter was significantly higher in hard cheeses CO and CA than in soft cheeses FA and CN. Cheeses fat content ranged from 5.8 g/100 g for FC to 37.7 g/100 g for CO. The highest ash concentration was observed in FA and CA compared to CO, CN and FC. Ripened cheeses (CN, FA, CA, CO) had a higher protein content than milk and FC. Among them, the highest protein

concentration was observed in the hard cheese CO, followed by CA, CN and FA.

Mineral content

Table 3 shows the mineral content of the dairy products presently studied. The Ca content did not differ in milk (RM, PM) and FC. Conversely, FC showed a lower P content than RM and PM. The highest Ca and P concentrations were found in CO and CA cheeses, followed by FA and CN. Both milk exhibited the lowest Mg contents among the products. The highest Mg value was detected in CO cheese, followed by CA, then by soft cheeses (CN, FA) and lactic coagulated FC. Regarding K content, the soft cheese CN and both milk (PM and RM) contained the highest K levels compared to other products. Among milk and FC, the Na levels ranged from 39.2 g/100 g to 77.8 g/100 g. The average Na concentrations measured in blue-veined cheese FA and hard cheese CA were significantly higher than those found in bloomy-rind CN and hard cheese CO. It is noticeable that Na content widely varied among different batches of FC, FA, CA and CO with, for example, ranging from 681.1 mg/100 g to 791.9 mg/100 g for FA. The unsalted products (milk and FC) showed quasi-similar Cl contents (Table 3), while the salted cheeses ranged from 714.5 mg of Cl

per 100 g of edible portion to 1665.1 mg of Cl per 100 g.

Organic anions composition

In cheeses, the highest concentration in lactate was found in CA followed by CO, FC, FA and CN, ranging from 1204.2 mg/100 g to 105.2 mg/100 g (Table 3). Both milk did not differ in the lactate content, with about 3 mg/100 g. Conversely, milk was found to be the richest in citrate, with 94.0 mg/100 g for PM and 82.1 mg/100 g for RM. Among the five cheeses studied, CO cheese contained the highest amount of citrate (49.5 mg/100 g), followed by CN (28.7 mg/100 g) and FA (13.6 mg/100 g). CA and FC was found to be the poorest in citrate, with about 1 mg/100 g.

Potential renal acid load

PRAL values of the studied products ranged from a minimum of -0.8 mEq/100 g for FC to a maximum of 28 mEq/100 g for blue-veined cheese FA (Figure 1). There was no significant difference in the PRAL values of RM (0.6 mEq/100 g) and PM (0.7 mEq/100 g). The PRAL soft cheese CN-presented medium PRAL values of 16.5 mEq/100 g. By contrast, soft cheese FA and hard cheeses CA and CO showed the highest PRAL

Table 2. Basic chemical analysis (pH, dry matter content, fat, ash, protein and total nitrogen content) of milk and cheeses processed with different technologies (related to 100 g edible portion).

	Product type ^{h,i}							p Value
	RM	PM	FC	CN	FA	CA	CO	
pH	6.72 ± 0.00 ^c	6.72 ± 0.01 ^c	4.28 ± 0.03 ^a	6.77 ± 0.10 ^c	7.09 ± 0.03 ^d	5.70 ± 0.09 ^b	5.82 ± 0.02 ^b	<0.0001
Dry matter, g	12.7 ± 0.1 ^{ab}	12.6 ± 0.1 ^a	13.3 ± 1.5 ^b	47.2 ± 1.3 ^c	52.8 ± 2.6 ^d	59.9 ± 0.6 ^e	65.8 ± 0.3 ^e	<0.0001
Fat, g	4.0 ± 0.1 ^b	3.5 ± 0.0 ^a	5.8 ± 0.2 ^c	23.6 ± 0.8 ^d	28.7 ± 0.6 ^e	32.6 ± 2.1 ^f	37.7 ± 0.2 ^g	<0.0001
Ash, g	0.66 ± 0.03 ^a	0.81 ± 0.02 ^c	0.71 ± 0.02 ^b	2.42 ± 0.09 ^d	4.04 ± 0.24 ^f	4.10 ± 0.20 ^f	3.42 ± 0.39 ^e	<0.0001
Protein, g	3.3 ± 0.0 ^a	3.4 ± 0.0 ^a	3.9 ± 0.3 ^b	22.3 ± 0.9 ^d	20.3 ± 0.5 ^c	25.0 ± 0.2 ^e	25.6 ± 0.2 ^f	<0.0001
Total nitrogen, g	0.5 ± 0.0 ^a	0.5 ± 0.0 ^a	0.6 ± 0.0 ^b	3.5 ± 0.2 ^d	3.2 ± 0.1 ^c	3.9 ± 0.0 ^e	4.0 ± 0.0 ^f	<0.0001

^{a-g}Means in a row sharing common superscripts are similar as tested by Conover–Iman test ($p > 0.05$).

^hRM, raw milk; PM, pasteurized milk; FC, lactic coagulated fresh cheese; CN, soft mold-ripened Camembert de Normandie; FA, blue-veined cheese Fourme d'Ambert; CA, uncooked pressed cheese Cantal; CO, cooked pressed cheese Comte.

ⁱResults are presented by means of replicates ± SD; $n = 9$.

Table 3. Mineral and organic anions content of milks and cheeses processed with different technologies (related to 100 g edible portion).

	Nutrient contents ^{h,i} (mg/100g)							p Value
	RM	PM	FC	CN	FA	CA	CO	
Calcium	117.3 ± 15.0 ^a	113.8 ± 5.8 ^a	105.0 ± 12.3 ^a	222.5 ± 14.0 ^b	396.4 ± 78.9 ^c	668.0 ± 33.2 ^d	761.8 ± 23.7 ^d	<0.0001
Phosphorus	61.0 ± 4.3 ^b	65.0 ± 5.5 ^b	44.8 ± 9.4 ^a	250.4 ± 46.0 ^c	304.8 ± 78.0 ^c	508.7 ± 28.6 ^d	571.4 ± 8.1 ^d	<0.0001
Magnesium	7.8 ± 1.2 ^a	8.3 ± 0.7 ^a	11.5 ± 1.4 ^b	21.0 ± 5.3 ^c	20.6 ± 5.0 ^c	26.5 ± 1.9 ^d	31.1 ± 0.9 ^e	<0.0001
Potassium	114.6 ± 11.1 ^b	126.2 ± 9.3 ^c	94.1 ± 14.3 ^a	129.3 ± 12.3 ^c	93.3 ± 14.3 ^a	93.2 ± 8.0 ^a	83.8 ± 3.1 ^a	<0.0001
Sodium	46.6 ± 3.9 ^a	39.2 ± 4.2 ^a	77.6 ± 21.3 ^b	586.5 ± 67.6 ^c	743.9 ± 93.5 ^d	682.1 ± 62.9 ^d	443.3 ± 153.1 ^c	<0.0001
Chloride	104.0 ± 1.4 ^c	95.3 ± 3.0 ^b	90.2 ± 2.7 ^a	982.3 ± 43.3 ^e	1665.1 ± 240.2 ^g	1240.8 ± 113.7 ^f	714.5 ± 242.8 ^d	<0.0001
Lactate	3.3 ± 0.7 ^a	3.0 ± 0.6 ^a	682.7 ± 38.9 ^d	105.2 ± 25.7 ^b	399.9 ± 17.8 ^c	1204.2 ± 56.8 ^f	873.6 ± 38.5 ^e	<0.0001
Citrate	82.1 ± 2.4 ^d	94.0 ± 3.3 ^e	1.0 ± 0.3 ^a	28.7 ± 4.0 ^c	13.6 ± 1.6 ^b	1.5 ± 0.6 ^a	49.5 ± 19.5 ^c	<0.0001

^{a-g}Means in a row sharing common superscripts are similar as tested by Conover–Iman test ($p > 0.05$).

^hRM, raw milk; PM, pasteurized milk; FC, lactic coagulated fresh cheese; CN, soft mold-ripened Camembert de Normandie; FA, blue-veined cheese Fourme d'Ambert; CA, hard cheese Cantal; CO, hard cheese Comte.

ⁱMeans of replicates ± SD; $n = 9$.

values (28 mEq/100 g, 25.3 mEq/100 g and 22.3 mEq/100 g, respectively).

The values of the different elements (nutrient contents weighted with their conversion factors as defined by Remer and Manz (1995)) of the PRAL calculation are shown in Figure 2. For salted and ripened cheeses, Cl was the acidifying element having the strongest impact on the PRAL index, except for CO in which P element had a similar acidifying impact. For CA, the P

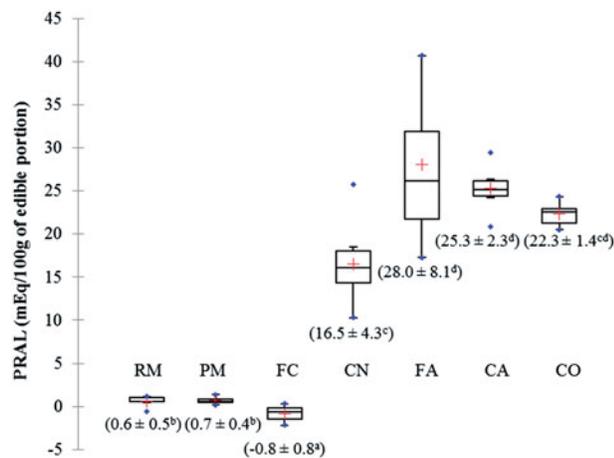


Figure 1. Box plots of the potential renal acid load (PRAL) index of the products studied. RM, raw milk; PM, pasteurized milk; FC, lactic-coagulated fresh cheese; CN, soft mold-ripened Camembert de Normandie; FA, blue-veined cheese Fourme d'Ambert; CA, hard cheese Cantal; CO, hard cheese Comte. The data represents the average \pm SD, expressed in mEq/100 g of edible portions; $n = 9$.

element also showed a high value but had a lower impact in soft cheeses PRAL indexes. In hard cheeses, protein element had the lowest impact among the acidifying elements, and an equivalent one to the P element in soft cheeses. Na element showed high absolute values in salted and ripened cheeses was by far the strongest alkalinizing element. The alkalinizing Ca element had a highest impact on PRAL indexes in hard cheeses than in soft cheeses. Mg and K elements had little impact on PRAL indexes in ripened cheeses given their low concentrations in these products.

All PRAL elements of milk and fresh cheese were globally low and exhibited a neutralization between acidic and alkalinizing elements.

Discussion

Cheeses were previously reported as the food group with the highest PRAL values (Remer & Manz 1995), meaning that their intake potentially induces an acid load to the body. This characteristic was suggested to be due to their composition, closely related to the cheese-making technology applied (Demigné et al. 2004). To better characterize the link between cheese type and their acid-forming potential, the present study investigated physicochemical and compositional properties of two milk and five cheeses. The research provides a detailed nutritional characterization of different dairy products. This work clearly demonstrates the

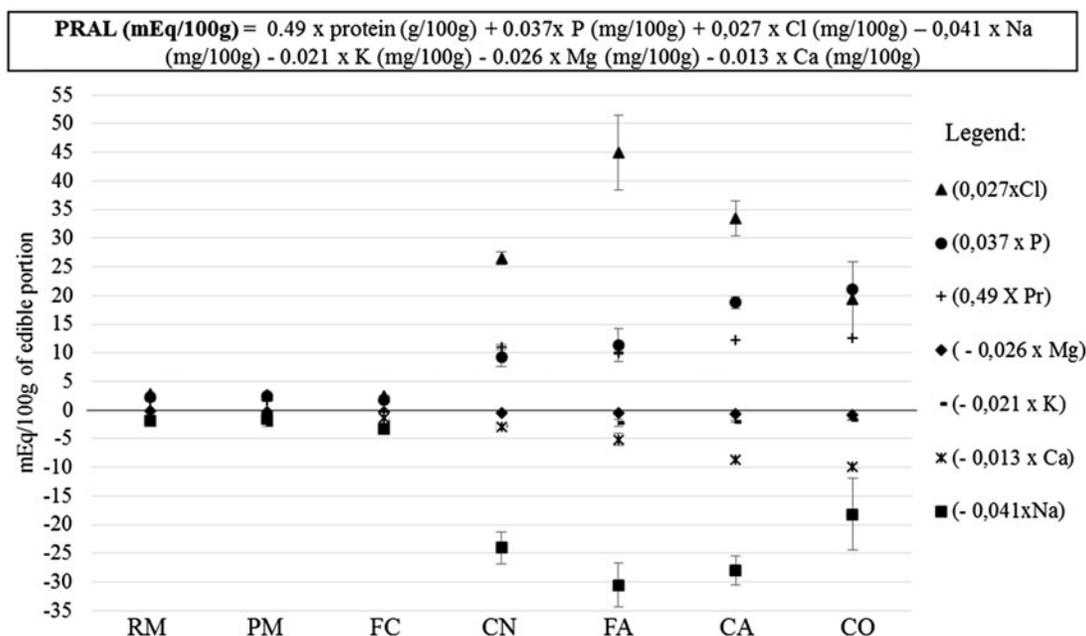


Figure 2. PRAL indexes and PRAL elements of the products studied weighted with their derived factors. RM, raw milk; PM, pasteurized milk; FC, lactic coagulated fresh cheese; CN, soft mold-ripened Camembert de Normandie; FA, blue-veined cheese Fourme d'Ambert; CA, hard cheese Cantal; CO, hard cheese Comte. The data represents the average \pm SD, expressed in mEq/100 g of edible portions; $n = 9$.

strong impact of cheese type on the acid-forming potential of end products. It particularly highlights the major impact of Cl followed by P on the high PRAL value of ripened cheeses. This acid load cannot be totally compensated by the main alkalizing elements of the PRAL in these products: Na and to a lesser extent Ca. Otherwise, the high lactate contents of hard cheeses, not taken into account in the PRAL index, might contribute to moderate their acidifying potential.

Composition of milk and cheeses

In the whole, basic biochemical characteristics reported in this work were in agreement with different data collected in the literature (Table 2) (Berdague et al. 1987; Le Graet & Brulé 1988; Heck et al. 2009; Abbas 2012; ANSES 2013; Chatelard-Chauvin et al. 2015). Regarding mineral compositions, the hard cheese CO was the richest in Ca, P and Mg, whereas the lactic-coagulated FC exhibited the poorest concentrations in these elements (Table 3). These differences are in agreement with the finding of Lucas et al. (2006b) who reported similar differences between hard cheese Abondance and lactic coagulated Rocamadour. Assayed Ca, P and Mg contents for all products were close to those reported in the nutritional facts database of ANSES (2013) except for RM, not listed in the database and for CO cheese that was characterized by lower contents in these elements. The same nutritional database declares a P content of FA cheese three times greater than ours. This discrepancy had already been highlighted by Abbas (2012) and Jacquot et al. (2015). Overall, Ca, P and Mg contents in cheeses were positively correlated to the dry matter content. Indeed, these minerals are largely captured in the curd and moisture content decreases as whey is drained out.

It is noteworthy that important interbatch variations were reported in Na and Cl contents of several ripened cheeses, and particularly CO cheese (Table 3). In fact, Na and Cl contents are dramatically linked to salting process which can widely vary among cheese types. Similar interbatch fluctuations were observed in Prato, CO, Cheddar and Beaufort cheeses and were attributed to the lack of standardization in salt application (Morris et al. 1985; Chamba et al. 1994; Cichoski et al. 2002).

Globally, cheeses composition clearly differed among cheese types. These variations might be attributed to two major determinants: conditions of milk production and cheese-making technology. The first one was reported to impact cheese composition in fatty acids, carotenoids, α -tocopherol (Lucas et al. 2006a). The second one was rather found to strongly impact

mineral and folate contents in cheeses (Lucas et al. 2006b). Indeed, differences in milk processing (acidification, curdling and dehydration), mainly influence the aqueous phase composition of curd, and thus impact the final mineral concentrations in cheese (Le Graet & Brulé 1993). Afterward, we assume that, in the present work, the differences reported in the studied compounds are mainly influenced by the cheese-making technology. Moreover, in the PDO products studied, milk used for manufacturing result in a mix of milk coming from different producers, thus smoothing differences due to conditions of milk production.

Impact of cheese type on PRAL values

The PRAL values were clearly different among cheese types (Figure 1). Milk (RM, PM) showed PRAL values around zero, as described by Remer and Manz (1995) in whole pasteurized milk. The FC showed the unique negative PRAL (-0.8 mEq/100 g) among the studied products. Mean PRAL values of ripened cheeses ranged from 16.5 mEq/100 g for CN to 28 mEq/100 g for FA. It confirmed the high acid-forming potential of ripened cheeses but in very different extent as a function of cheese type. It is noticeable that PRAL values of soft cheeses (bloomy-rind CN and blue-veined cheese FA) showed wide interbatch variations. The CN PRAL index ranged from 14.7 to 20.0 mEq/100 g among batches, whereas PRAL variations ranged from 21.7 to 37.5 mEq/100 g for FA. In both cases, these variations were mainly due to mineral content fluctuations, already reported in commercial soft cheeses, using similar analytical methods (Jaoude et al. 2010; Abbas et al. 2012; Moreno-Rojas et al. 2012; Bord et al. 2015; Jacquot et al. 2015). Such variations are common in cheeses involving mold growth and are probably due to their matrix heterogeneity. This heterogeneity would be assigned to the development of microbial flora *Geotrichum candidum*, *Penicillium camembert* and *P. roqueforti* (Prieto et al. 2000; Abbas 2012) and to the mineral migrations it may cause (Le Graet & Brulé 1983; McSweeney & Sousa 2000; McSweeney & Fox 2004). This result highlights the fact that PRAL values are strongly subjected to variations in interbatch mineral compositions.

The great mean PRAL value found for FA was attributed to high Cl contents and more precisely to much higher Cl concentrations than Na concentrations (Figure 2). Similar observations were made in Parmesan from the work of Remer and Manz (1995), in blue-veined cheeses (Prieto et al. 2000, 2002), in Camembert (Boutrou et al. 1999) and in Cantal cheese (De Freitas et al. 2007). This result emphasize that these two ions

play a major role in the acid-forming potential of cheeses. It is noticeable that, from 2003, Na and Cl were omitted from the PRAL formula when estimating a diet-dependent net acid load (Remer et al. 2003; Frassetto et al. 2007). Indeed, in several clinical studies, Na and Cl were found to fully compensate when the urinary cation-anion difference was calculated (Remer & Manz 1994). This changing allowed to overcome missing Cl data from food tables and assumed that in the case of processed salted foods Na and Cl would always have a stoichiometric relationship, with equal concentrations. However, in cheese-making technology, Cl ions in milk, and later in cheese whey, are accompanied by either Na or other cations. Salt is added during processing and a portion of Na and Cl ions are allowed to drain off into the whey. Therefore, Na and Cl concentrations changes are unlikely to be stoichiometric. This work demonstrates the interest of considering Na and Cl contents when calculating PRAL values of dairy products. In the literature, very few works addressed the distribution of Cl and Na in cheese matrix to understand this feature. The diffusion of salt was studied, but NaCl content was mainly considered from the Cl determination (Hardy 1983; Morris et al. 1985; Floury et al. 2009). This point would deserve further research. It is hypothesized that the applied technology would explain this difference. A following of ions concentrations throughout cheese processing would allow to address this issue. It is also possible that the addition of CaCl_2 , widely used in cheese-making technology to improve yields, might be involved in this phenomenon.

The hard cheeses CA and CO also showed high PRAL values, in agreement with Remer and Manz (1995) who reported similar PRAL in Cheddar-type cheese. These characteristics were the result of stronger acidifying elements than absolute values of alkalinizing ones: Cl, P and protein elements could not be compensated by Na and Ca elements, whereas K and Mg had little impact given their low concentrations in the ripened cheeses. A higher protein content in hard cheeses is a well-known consequence of the scalding/cooking and the pressing processes used in the manufacture of cheese (Fox & Guinee 2013). It was therefore an awaited result. The acidogenic effect of proteins for the human body (Barzel & Massey 1998; Frassetto et al. 1998; Alexy et al. 2005) and especially animal protein (Sellmeyer et al. 2001) has already been highlighted in several studies. Nevertheless, it is difficult to evaluate the bearing of protein hydrolysis occurring during ripening on the acidifying potential of cheeses. Proteolysis occurs in an extent heavily dependent on cheese manufacturing technology (McSweeney & Sousa 2000). The sulfur-containing amino acid concentration, which are

mainly responsible for the acidogenic impact of dietary protein, is not supposed to be modified and justifies the assay of total nitrogen. However, it is difficult to know whether the rate of these different fractions (intact/part hydrolyzed proteins, free amino acid) during digestion impact the acid-forming potential of cheese. Beyond the well-known acidogenic impact of protein, an original result of this work deserves to be highlighted as it shows that the Cl and P elements have a stronger impact on the PRAL value of ripened cheeses than proteins in hard cheeses. This point has never been reported before.

Impact of cheese type on organic anion contents

The most important organic sources of alkalis in the diet are organic acids that are ingested in the form of salts of organic anions (Demigné et al. 2004; Poupin et al. 2012). Despite PRAL calculation takes into account the cations contents (K, Na, Ca and Mg) of foodstuffs, organic anions associated with these cations might have a different impact on the acid-base balance whether they are metabolizable (for instance, citrate and lactate) or not (for instance, oxalate or tartrate) (Oh 2000; Demigné et al. 2004; Sabboh et al. 2007; Poupin et al. 2012). Those that are effectively absorbed in the small intestine and are metabolized, mostly in the liver, lead to the synthesis of HCO_3^- , a powerful buffer system in the organism (Poupin et al. 2012). In this sense, valuable contents in metabolizable organic anions are assumed to concur to the acid/alkaline potential of a food product (Demigné et al. 2004; Sabboh et al. 2007). The daily food supply of organic anions might range from 1 to 4 g/day as a function of dietary patterns. In subjects consuming a high-meat and high dairy products diet, organic anions ingested with animal foods was suggested to be greater than that from plant foods (Demigné et al. 2004).

In agreement with the literature, among the dairy products studied, milk was found as the richest product in citrate, whereas cheese was the richest in lactate (Table 3) (Tormo & Izco 2004; Upreti et al. 2006). The citrate content of milk (82.1–94.0 mg/100 g) was close to the average citrate content of vegetables (139 mg/100 g) but much lower than that of fruits, with more than 550 mg/100 g in average (Demigné 2008). FC was the poorest product in citrate. This may be due to the fact that citrate would be metabolized by cheese starters and nonstarter microflora (McSweeney 2004). By contrast, FC showed a high content in lactate, which is produced from lactose by the starter cultures (McSweeney & Fox 2004). Thus, FC might be

considered to show an alkalizing potential because of its lactate content.

All ripened cheeses exhibited low citrate contents. This was presumably due to nonstarter lactic acid bacteria action, as suggested by (McSweeney 2004) who reported a decline of citrate content to trace elements during ripening in cheddar cheese. Even if citrate theoretically has a threefold higher alkalizing effect than lactate in the body due to its three carboxyl groups, the low citrate content in ripened cheeses makes its base-forming potential negligible compared to the lactate's one. CN contained the lowest concentration in lactate. In fact, Camembert cheeses are known to have an extensive surface catabolism, resulting in a fast metabolization of lactate by *Geotrichum candidum* and *Penicillium camemberti* in CO₂ and H₂O (McSweeney & Fox 2004). Hard cheeses presently studied showed great amounts of lactate. The lactate content of CA (1204 mg/100 g) was similar to those found in farmer's cheese and Cheddar (Izco et al. 2002) but also in uncooked pressed (hard) cheese (Delbès-Paus et al. 2012). Given these lactate contents, we could hypothesize that hard cheeses CA and CO acid-forming potential might be less important than suspected from their PRAL values only.

The main limitation of this work is that the lack of knowledge regarding the respective weight of PRAL and organic anions contents in the effective acid-forming potential of cheeses unable to fully conclude. Despite we emphasize that lactate could impact the PRAL measurement for cheeses, the way to use anion contents in the formula cannot be suggested from this study only. This issue would deserve further research and certainly clinical investigations.

Conclusion

As demonstrated in this work, there is a strong link between the cheese type and the acid-forming potential of the cheese. Fresh cheese was characterized by a slightly negative PRAL and ripened cheeses exhibited different acid-forming potentials. The soft bloomy-rind Camembert cheese showed a moderate acid-forming potential, whereas hard cheeses and blue-veined cheese exhibited the strongest acidogenic characters. The study of the respective weight of PRAL elements emphasize a great imbalance between acidifying elements (Cl, P and proteins elements) and alkalizing ones (Na and Ca) to explain it. This work also demonstrates that PRAL values were greatly subjected to interbatch fluctuations encountered in cheese industry. This exploratory work deserves to be continued to determine the evolution of the acid-forming potential

during cheese manufacturing and to better understand its generation. It is suggested that key steps of the process might influence the acidogenic character of end-products, such as draining or salting.

Another noteworthy result is the high lactate content reported in hard cheeses that could suggest that these products could be less acidogenic than suspected from their PRAL value only.

At last, the present study focused on the acid-forming potential of cheeses as their level of consumption in western countries is suspected to impact the diet-dependent net acid load. However, dairy products deserve to be considered with broader nutritional perspectives, since they play several roles on human health and remain the first contributors to Ca intake.

Disclosure statement

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding information

The research was cofinanced by FEDER (European Regional Development Funds) in Auvergne (France).

References

- Abbas K. 2012. Effet de traitements thermiques sur les propriétés fonctionnelles de fromages traditionnels: le cas des pâtes persillées (These). Agricultural sciences. Clermont-Ferrand, France: Blaise Pascal University. p. 145.
- Abbas K, Karoui R, Ait-Kaddour A. 2012. Application of synchronous fluorescence spectroscopy for the determination of some chemical parameters in PDO French blue cheeses. *Eur Food Res Technol.* 234:457–465.
- AFNOR. 2013. Association française de normalisation. Chemical analysis [WWW Document]; [cited 2015 Nov 9]. Available from: <http://sagaweb.afnor.org/fr-FR/sw/Identification/AccueilAbonnement>.
- Alexy U, Remer T, Manz F, Neu CM, Schoenau E. 2005. Long-term protein intake and dietary potential renal acid load are associated with bone modeling and remodeling at the proximal radius in healthy children. *Am J Clin Nutr.* 82:1107–1114.
- ANSES. 2013. Table de composition nutritionnelle Ciqua [WWW Document]; [cited 2015 Nov 9]. Available from: <https://pro.anses.fr/TableCIQUAL/index.htm>.
- ANSES, Santé Canada. 2007. Web platform of nutritional analysis on Food Composition [WWW Document]. Compos. Aliments. [cited 2015 Oct 15]. Available from: <http://www.composition-des-aliments.fr/>.
- Barzel US, Massey LK. 1998. Excess dietary protein can adversely affect bone. *J Nutr.* 128:1051–1053.
- Berdague L, Jeunet R, Grappin R, Duboz G. 1987. Affinage et qualité du gruyère de Comté. III. Fermentation lactique

- et teneur en acides gras volatils des fromages de Comté. *Lait*. 67:249–263.
- Blaustein MP, Leenen FHH, Chen L, Golovina VA, Hamlyn JM, Pallone TL, Huysse JWV, Zhang J, Wier WG. 2012. How NaCl raises blood pressure: A new paradigm for the pathogenesis of salt-dependent hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 302:H1031–H1049.
- Bord C, Guerinon D, Lebecque A. 2015. Impact of heating on sensory properties of French protected designation of origin (PDO) blue cheeses. Relationships with physico-chemical parameters. *Food Sci Technol Int*. [Epub ahead of print]. doi: 10.1177/1082013215605201.
- Boutrou R, Gaucheron F, Piot M, Michel F, Maubois JL, Léonil J. 1999. Changes in the composition of juice expressed from Camembert cheese during ripening. *Lait*. 79:503–513.
- Chamba JF, Delacroix-Buchet A, Berdague JL, Clement JF. 1994. Une approche globale de la caractérisation des fromages: l'exemple du fromage de Beaufort, in: *Sciences Des Aliments*. Presented at the Journées Sciences des aliments, Paris, France: Lavoisier. p. 581–590.
- Chatelard-Chauvin C, Pelissier F, Hulin S, Montel MC. 2015. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in raw milk Cantal type cheeses during cheese making, ripening and storage in different packaging conditions. *Food Control*. 54:53–65.
- Chekri R, Noël L, Millour S, Vastel C, Kadar A, Sirot V, Leblanc JC, Guérin T. 2012. Calcium, magnesium, sodium and potassium levels in foodstuffs from the second French total diet study. *J Food Compos Anal*. 25:97–107.
- Cichoski AJ, Valduga E, Valduga AT, Tornadijo ME, Fresno JM. 2002. Characterization of Prato cheese, a Brazilian semi-hard cow variety: Evolution of physico-chemical parameters and mineral composition during ripening. *Food Control*. 13:329–336.
- Cordain L, Eaton SB, Sebastian A, Mann N, Lindeberg S, Watkins Ba, O'keefe JH, Brand-Miller J. 2005. Origins and evolution of the western diet: Health implications for the 21st century. *Am J Clin Nutr*. 81:341–354.
- De Freitas I, Pinon N, Thierry A, Lopez C. 2007. In depth dynamic characterisation of French PDO Cantal cheese made from raw milk. *Lait*. 87:97–117.
- Delbès-Paus C, Pochet S, Helinck S, Veisseire P, Bord C, Lebecque A, Coton M, Desmasures N, Coton E, Irlinger F, et al. 2012. Impact of Gram-negative bacteria in interaction with a complex microbial consortium on biogenic amine content and sensory characteristics of an uncooked pressed cheese. *Food Microbiol*. 30:74–82.
- Demigné C. 2008. Fonctionnalité alcalinisante. In: *Aliments fonctionnels*. 2nd ed. Paris, France: Lavoisier. p. 541–558.
- Demigné C, Sabboh H, Puel C, Rémésy C, Coxam V. 2004. Organic anions and potassium salts in nutrition and metabolism. *Nutr Res Rev*. 17:249–258.
- Demmer E, Gertz E, Rogers T, Hillgonds D, Garrod M, Loan MV. 2014. Effect of dairy foods vs. calcium and vitamin-D supplements on bone metabolism: Use of ⁴¹Ca tracer (1018.12). *FASEB J*. 28:1018.12.
- Floury J, Rouaud O, Le Poullennec M, Famelart MH. 2009. Reducing salt level in food: Part 2. Modelling salt diffusion in model cheese systems with regards to their composition. *LWT – Food Sci Technol*. 42:1621–1628.
- Fox PF. 2004. *Cheese: General aspects*. San Diego, CA: Elsevier Academic Press. 656 p.
- Fox PF, Guinee TP. 2013. *Cheese science and technology*. In: Park Young W, Haein George FW, editors. *Milk and dairy products in human nutrition*. Oxford: John Wiley & Sons. p. 357–389.
- Frassetto Lanham-New S, Macdonald HM, Remer T, Sebastian A, Tucker KL, Tyllavsky FA. 2007. Standardizing terminology for estimating the diet-dependent net acid load to the metabolic system. *J Nutr*. 137:1491–1492.
- Frassetto L, Todd KM, Morris RC, Sebastian A. 1998. Estimation of net endogenous noncarbonic acid production in humans from diet potassium and protein contents. *Am J Clin Nutr*. 68:576–583.
- Frassetto LA, Morris R, Sellmeyer D, Sebastian A. 2008. Adverse effects of sodium chloride on bone in the aging human population resulting from habitual consumption of typical American diets. *J Nutr*. 138:419S–422S.
- Gursoy O, Gokce R, Con AH, Kinik O. 2014. Survival of *Bifidobacterium longum* and its effect on physicochemical properties and sensorial attributes of white brined cheese. *Int J Food Sci Nutr*. 65:816–820.
- Hardy J. 1983. Diffusion et distribution du chlorure de sodium dans les fromages. Influence sur l'activité de l'eau et les propriétés de sorption de l'eau. (These). Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy. p. 175.
- Heck JML, Van Valenberg HJF, Dijkstra J, Van Hooijdonk ACM. 2009. Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. *J Dairy Sci*. 92:4745–4755.
- He FJ, Burnier M, MacGregor GA. 2011. Nutrition in cardiovascular disease: Salt in hypertension and heart failure. *Eur Heart J*. 32:3073–3080.
- Izco JM, Tormo M, Jiménez-Flores R. 2002. Rapid simultaneous determination of organic acids, free amino acids, and lactose in cheese by capillary electrophoresis. *J Dairy Sci*. 85:2122–2129.
- Jacquot S, Karoui R, Abbas K, Lebecque A, Bord C, Aït-Kaddour A. 2015. Potential of multispectral imager to characterize anisotropic French PDO cheeses: A feasibility study. *Int J Food Prop*. 18:213–230.
- Jaoude DA, Olabi A, Najm NEO, Malek A, Saadeh C, Baydoun E, Toufeili I. 2010. Chemical composition, mineral content and cholesterol levels of some regular and reduced-fat white brined cheeses and strained yogurt (Labneh). *Dairy Sci Technol*. 90:699–706.
- Josse AR, Atkinson SA, Tarnopolsky MA, Phillips SM. 2012. Diets higher in dairy foods and dietary protein support bone health during diet- and exercise-induced weight loss in overweight and obese premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 97:251–260.
- Lante A, Lomolino G, Cagnin M, Spettoli P. 2006. Content and characterisation of minerals in milk and in Crescenza and Squacquerone Italian fresh cheeses by ICP-OES. *Food Control*. 17:229–233.
- Le Graet Y, Brulé G. 1993. Effects of pH and ionic strength on mineral balance of milk. *Lait*. 73:51–60.
- Le Graet Y, Brulé G. 1988. Migration des macro et oligo-éléments dans un fromage à pâte molle de type Camembert. *Lait*. 68:219–234.
- Le Graet Y, Lepienne A, Brulé G, Ducruet P. 1983. Migration du calcium et des phosphates inorganiques dans les fromages à pâte molle de type Camembert au cours de l'affinage. *Lait*. 63:317–332.

- Lemann J, Bushinsky Da, Hamm LL. 2003. Bone buffering of acid and base in humans. *Am J Physiol Renal Physiol.* 285:F811–F832.
- Lucas A, Agabriel C, Martin B, Ferlay A, Verdier-Metz I, Coulon JB, Rock E. 2006a. Relationships between the conditions of cow's milk production and the contents of components of nutritional interest in raw milk farmhouse cheese. *Lait.* 86:177–202.
- Lucas A, Rock E, Chamba J, Verdier-Metz I, Brachet P, Coulon JB. 2006b. Respective effects of milk composition and the cheese-making process on cheese compositional variability in components of nutritional interest. *Lait.* 86:21–41.
- Mardon J, Habauzit V, Trzeciakiewicz A, Davicco MJ, Lebecque P, Mercier S, Tressol JC, Horcajada MN, Demigné C, Coxam V. 2008. Long-term intake of a high-protein diet with or without potassium citrate modulates acid-base metabolism, but not bone status, in male rats. *J Nutr.* 138:718–724.
- McGill CR, Fulgoni VL, DiRienzo D, Huth PJ, Kurilich AC, Miller GD. 2008. Contribution of dairy products to dietary potassium intake in the United States population. *J Am Coll Nutr.* 27:44–50.
- McSweeney PLH. 2004. Biochemistry of cheese ripening. *Int J Dairy Technol.* 57:127–144.
- McSweeney PLH, Fox PF. 2004. Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate. In: Fox PF, McSweeney PLH, Cogan TM, Guinee TP, editors. *Cheese: general aspects.* Amsterdam: Elsevier Academic Press. p. 361–371.
- McSweeney PLH, Sousa MJ. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait.* 80:293–324.
- Moreno-Rojas R, Cámara-Martos F, Sánchez-Segarra PJ, Amaro-López MÁ. 2012. Influence of manufacturing conditions and discrimination of Northern Spanish cheeses using multi-element analysis. *Int J Dairy Technol.* 65:594–602.
- Moreno-Rojas R, Zurera-Cosano G, Amaro-Lopez MA. 1994. Concentration and seasonal variation of calcium, magnesium, sodium and potassium in raw cow, ewe and goat milk. *Int J Food Sci Nutr.* 45:99–105.
- Morris HA, Guinee TP, Fox PF. 1985. Salt diffusion in cheddar cheese. *J Dairy Sci.* 68:1851–1858.
- Oh MS. 2000. Acid-base in renal failure: New perspectives on acid-base balance. *Semin Dial.* 13:212–219.
- Pedone C, Napoli N, Pozzilli P, Lauretani F, Bandinelli S, Ferrucci L, Antonelli-Incalzi R. 2010. Quality of diet and potential renal acid load as risk factors for reduced bone density in elderly women. *Bone.* 46:1063–1067.
- Poupin N, Calvez J, Lassale C, Chesneau C, Tomé D. 2012. Impact of the diet on net endogenous acid production and acid-base balance. *Clin Nutr Edinb Scotl.* 31:313–321.
- Prieto B, Franco I, Fresno JM, Bernardo A, Carballo J. 2000. Picón Bejes-Tresviso blue cheese: An overall biochemical survey throughout the ripening process. *Int Dairy J.* 10:159–167.
- Prieto B, Franco I, Prieto JG, Bernardo A, Carballo J. 2002. Compositional and physico-chemical modifications during the manufacture and ripening of León raw cow's milk cheese. *J Food Compos Anal.* 15:725–735.
- Remer T, Dimitriou T, Manz F. 2003. Dietary potential renal acid load and renal net acid excretion in healthy, free-living children and adolescents. *Am J Clin Nutr.* 77:1255–1260.
- Remer T, Manz F. 1994. Estimation of the renal net acid excretion by adults consuming diets containing variable amounts of protein. *Am J Clin Nutr.* 59:1356–1361.
- Remer T, Manz F. 1995. Potential Renal Acid Load of Foods and its Influence on Urine pH. *J Am Diet Assoc.* 95:791–797.
- Rizzoli R. 2014. Dairy products, yogurts, and bone health. *Am J Clin Nutr.* 99:1256S–1262S.
- Sabboh H, Coxam V, Horcajada MN, Rémésy C, Demigné C. 2007. Effects of plant food potassium salts (citrate, galacturonate or tartrate) on acid-base status and digestive fermentations in rats. *Br J Nutr.* 98:72–77.
- Saint-Eve A, Lauverjat C, Magnan C, Déléris I, Souchon I. 2009. Reducing salt and fat content: Impact of composition, texture and cognitive interactions on the perception of flavoured model cheeses. *Food Chem.* 116:167–175.
- Sellmeyer DE, Stone KL, Sebastian A, Cummings SR. 2001. A high ratio of dietary animal to vegetable protein increases the rate of bone loss and the risk of fracture in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 73:118–122.
- Tormo M, Izco JM. 2004. Alternative reversed-phase high-performance liquid chromatography method to analyse organic acids in dairy products. *J Chromatogr A.* 1033:305–310.
- Upreti P, McKay LL, Metzger LE. 2006. Influence of calcium and phosphorus, lactose, and salt-to-moisture ratio on Cheddar cheese quality: Changes in residual sugars and water-soluble organic acids during ripening. *J Dairy Sci.* 89:429–443.

4.2 Etape 2 : Identification des apports et pertes en composants modulant le caractère acidifiant/alcalinisant des fromages au cours de la transformation

4.2.1 Contexte de l'étude

Dans une perspective de préservation, voire d'amélioration, de la santé des consommateurs, la modulation des fonctionnalités nutritionnelles et notamment du potentiel acidifiant des fromages, semble une approche préventive pertinente. Pour ce faire, il est important de mieux caractériser et comprendre la génération de ce potentiel. La première étude a clairement mis en évidence que la technologie appliquée dans sa globalité avait un impact fort sur le potentiel acidifiant du produit fini. Ce sont donc les phénomènes intervenant au cours du procédé qui sont à l'origine de l'augmentation de cette caractéristique et plus spécifiquement les modifications affectant la composition en protéines, en cations et en anions du produit (Demigne et al., 2004). A notre connaissance, aucune étude n'a porté sur l'exploration du potentiel acidifiant au cours de la transformation fromagère. Certaines études ont suivi l'évolution des minéraux pendant le processus de fabrication (Cichoski et al., 2002; González-Martín et al., 2011; Moreno-Rojas et al., 1995), mais elles ne permettent pas l'évaluation du PRAL des produits intermédiaires, d'autant plus que le manque de données sur cet aspect est souvent critiqué (Hickey et al., 2015).

La 2^{ème} étape s'est donc focalisée sur l'évolution de la composition de la Fourme d'Ambert au cours de sa fabrication.

4.2.2 Objectifs

Il nous a semblé utile d'identifier et de mieux comprendre au cours de la fabrication du modèle fromage choisi, les étapes clés intervenant dans la génération du caractère acidifiant du produit.

Les **objectifs** de la deuxième étape étaient donc :

- d'aboutir à une cartographie des apports et pertes en éléments d'intérêt modulant le potentiel acidifiant du fromage au cours des différentes opérations unitaires du procédé ;
- d'identifier les étapes technologiques déterminantes dans le développement du potentiel acidifiant.

Cette phase du projet a été menée en collaboration avec une entreprise productrice de fromage.

4.2.3 Principaux résultats et discussion

Cette deuxième étape a permis d'obtenir l'évolution des teneurs en éléments d'intérêt (protéines ; minéraux : Ca, P, K, Na, Mg, Cl ; anions organiques : lactate et citrate) tout au long de la fabrication de la Fourme d'Ambert, ainsi que d'identifier les opérations technologiques ayant un fort impact sur les concentrations en ces nutriments.

La caractérisation complète a été réalisée à partir de la réception du lait cru dans l'entreprise jusqu'à 56 jours d'affinage. L'égouttage et le salage ont été déterminés comme les deux étapes technologiques critiques dans la génération du potentiel acidifiant.

L'**égouttage** est la première étape technologique ayant augmenté le PRAL de manière significative. Ceci s'explique tout d'abord par l'augmentation de l'extrait sec, qui se traduit par la concentration de la teneur en protéines, mais aussi par la perte d'éléments alcalinisants, qui se trouvent en majeure partie dans la phase soluble du lait, avec le lactosérum. Les pertes en minéraux alcalinisants dans le lactosérum ont été estimées à 86,5% pour le K, 63,4% pour le Mg et 34,0% pour le Ca. Ainsi, une augmentation du PRAL à 10,4 mEq/100 g a été obtenue dans les fromages en blanc égouttés (contre 1,2 mEq/100 g dans le lait cru).

Le **salage** s'effectue en deux étapes : par saumurage et par frottage au sel sec en surface. Cette étape a affecté considérablement le potentiel acidifiant de la Fourme d'Ambert.

- Le saumurage a induit l'augmentation du PRAL à 23,0 mEq/100 g. Cette augmentation s'explique majoritairement par le déséquilibre entre les teneurs en Cl et Na. L'étude de la **saumure** montre aussi une teneur en Cl (14716,5 mg/100 g) plus importante que celle en Na (5481,6 mg/100 g) et un rapport Na/Cl = 0,37 contre 0,65 pour une simple solution de sel. Ces chlorures proviennent sans doute du lactosérum résiduel (associés aux minéraux de la phase soluble du lait : Na, K, Mg) libéré par les fromages en blanc et s'accumulent dans la saumure (Hardy, 1997). On observe d'ailleurs sur les cartographies que l'élimination des Cl est beaucoup plus importante dans le lactosérum que l'élimination du Na. Lorsqu'un fromage est plongé dans une solution saturée de sel, la différence de concentration entre la phase aqueuse du fromage et la saumure provoque une diffusion du sel dans la pâte et une migration inverse de la phase aqueuse vers

la saumure (Hardy, 1983). De nombreux facteurs technologiques peuvent aussi affecter la composition intra-produit et intra-lot, comme l'exposition dans le bain de saumure, le type de bain de saumure : statique ou dynamique (absence d'agitation dans notre cas), l'âge de la saumure, l'exposition dans la cave d'affinage (influence sur le développement du bleu) etc.

- La deuxième étape de **salage**, réalisée par frottage de sel sec à la surface des produits, sert à faciliter la formation de la croûte des fromages. Elle permet également d'augmenter la teneur en sel, mais l'équilibre n'est atteint que vers J_{28} ce qui est en accord avec la littérature (Morris et al., 1985). Cela est valable aussi pour le PRAL, qui montre des valeurs moins fluctuantes après J_{28} ($20,3 \pm 5,2$ mEq/100 g à J_{56}).

En ce qui concerne les teneurs en anions organiques, une grande partie du citrate du lait (100,5 mg/100 g) est perdue pendant l'égouttage (McSweeney and Sousa, 2000). Seulement 6,8% de la concentration initiale se retrouve dans la Fourme d'Ambert en fin affinage, avec un effet négligeable sur le potentiel acidifiant, même si théoriquement le citrate est trois fois plus alcalinisant que le lactate. Quant à la teneur en lactate, celle-ci diminue de 27,5% à J_{21} et de 62,6% à J_{56} par rapport au fromage en blanc égoutté (1297,9 mg/100 g). On peut donc conclure que la Fourme d'Ambert consommée à un stade plus jeune aurait un impact moins acidifiant qu'un fromage plus affinée. A titre de comparaison, on peut noter qu'une portion de 40 g de Fourme d'Ambert à J_{28} serait même plus riche en anions organiques que 100 g de légumes (Demigné, 2008).

4.2.4 Conclusions et perspectives

Cette étude démontre l'effet acidifiant de la transformation fromagère. L'égouttage et le salage ont été identifiés comme les principales étapes technologiques responsables du potentiel acidifiant de la Fourme d'Ambert. L'affinage semble également avoir un impact non négligeable compte-tenu de la dégradation du lactate qu'il induit. Les résultats obtenus ouvrent de nouvelles perspectives de modulation des fonctionnalités nutritionnelles des fromages et peuvent être utiles aux fabricants pour innover sur le segment nutrition-santé.

Un levier d'action simple et pertinent à explorer pour réduire le potentiel acidifiant de la Fourme d'Ambert serait d'optimiser l'étape de salage.

Les résultats obtenus à cette étape ont fait l'objet d'un deuxième article « **Draining and salting as responsible key steps in the generation of acid-forming potential : application to a soft blue-veined cheese** » soumis au « Journal of Dairy Science » le 26 février 2016 (retour des reviewers le 15 avril et soumission des révisions le 22 avril) et d'un poster (**Annexe 2**).

4.2.5 Article 2. « Draining and salting as responsible key steps in the generation of the acid-forming potential of cheese : application to a soft blue-veined cheese »

Ecaterina Gore; Julie Mardon; Annick Lebecque

VetAgro Sup, UPSP n°2011-03-100, UR CALITYSS, 89 avenue de l'Europe, F-63370 Lempdes

Mots clés :	Résumé :
Potentiel acidifiant Potential Renal Acid Load (PRAL) Fabrication fromagère Egouttage Salage Fromage bleu	Une caractéristique nutritionnelle peu connue des fromages est leur potentiel acidifiant, qui se révèle au cours du métabolisme et, à long terme, est susceptible d'induire des effets délétères sur la santé du consommateur. L'objectif de l'étude était de caractériser la génération du potentiel acidifiant d'un fromage à pâte persillée pendant la fabrication pour identifier les étapes technologiques critiques impliquées dans ce phénomène. L'échantillonnage a été fait sur trois lots de fabrication, pendant dix étapes du procédé de transformation : la réception du lait cru, la pasteurisation, la maturation du lait, la coagulation, le brassage, l'égouttage et l'affinage des Fourmes d'Ambert salées à différents stades : 21, 28, 42 et 56 jours. Le potentiel acidifiant des produits intermédiaires a été évalué par 1) le calcul de l'indice PRAL (en tenant compte des teneurs en protéines, Cl, P, Na, K, Mg et Ca) et 2) les teneurs en anions organiques (lactate et citrate) comme éléments alcalinisants pouvant limiter le potentiel acidifiant du produit. L'égouttage et le salage ont été identifiés comme les principales étapes technologiques responsables de la génération du potentiel acidifiant du fromage. L'égouttage a induit une augmentation du PRAL de 1,2 mEq/100 g dans le lait à 10,4 mEq/100 g dans les fromages blanc égouttés, en raison de l'augmentation de l'extrait sec et de la perte de minéraux alcalinisants dans le lactosérum. L'augmentation du PRAL (20,3 mEq/100 g à J56), obtenue après l'opération de salage, résulte du déséquilibre entre les éléments acidifiants (Cl, P et protéines) et les principaux éléments alcalinisants (Na et Ca). En particulier, le Cl a exercé un impact majeur sur la valeur du PRAL. En ce qui concerne les anions organiques, l'égouttage a induit une perte de 93% du citrate trouvé dans le lait de départ. La teneur en lactate a augmenté suite à l'activité des ferments lactiques (1297,9 mEq/100 g dans le fromage égoutté), pour diminuer pendant l'affinage (519,3 mEq/100 g). Cette teneur en lactate pourrait modérer le potentiel acidifiant des produits finis. Des stratégies technologiques visant à limiter le potentiel acidifiant des fromages sont proposées et méritent d'être explorées afin d'évaluer leur pertinence nutritionnelle.



J. Dairy Sci. 99:1–10
<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11094>
 © American Dairy Science Association®, 2016.

Draining and salting as responsible key steps in the generation of the acid-forming potential of cheese: Application to a soft blue-veined cheese

Ecaterina Gore, Julie Mardon,¹ and Annick Lebecque

Clermont University, VetAgro Sup, UPSP n°2011-03-100, CALITYSS, 89 avenue Europe, F-63370 Lempdes, France

ABSTRACT

A disregarded nutritional feature of cheeses is their high acid-forming potential when ingested, associated with deleterious effects for consumers' health. This work aimed to characterize the generation of the acid-forming potential of a blue-veined cheese during manufacturing to identify the main key steps of the process involved in this phenomenon. Sampling was performed on 3 batches at 10 steps of the cheese-making process: reception of raw milk, pasteurization, maturation of milk, coagulation, stirring, draining of the curds and at 4 ripening stages: 21, 28, 42, and 56 d. Acid-forming potential of each sample was evaluated through (1) the calculation of the potential renal acid load (PRAL) index (considering protein, Cl, P, Na, K, Mg, and Ca contents) and (2) its organic anion content (lactate and citrate), considered as alkalinizing elements. Draining and salting were identified as the main key steps responsible for the generation of the acid-forming potential of cheese. The draining process induced an increase in the PRAL index from 1.2 mEq/100 g in milk to 10.4 mEq/100 g in drained curds due to the increase of the dry matter and the loss of alkaline minerals into the whey. The raise of PRAL value (20.3 mEq/100 g at d 56) following salting resulted from an imbalance between the strong acidogenic elements (Cl, P, and proteins) and the main alkalinizing ones (Na and Ca). Particularly, the Cl element had a major effect on the PRAL value. Regarding organic anions, draining induced a loss of 93% of the citrate content in initial milk. The lactate content increased as fermentation occurred (1,297.9 mg/100 g in drained curds), then decreased during ripening (519.3 mg/100 g at d 56). This lactate level probably contributes to moderate the acidifying potential of end products. Technological strategies aiming to limit the acid-forming potential of cheeses are proposed and would deserve further research to evaluate their nutritional relevance.

Key words: acid-forming potential, cheese-making process, draining, salting, blue-veined cheese

INTRODUCTION

A disregarded nutritional feature of cheeses is their high acid-forming potential. This means that their intake may potentially induce an acid load to the body (Remer and Manz, 1994). The substantial cheese consumption in Western diets (with more than 20 kg per year for France, Germany, Switzerland, and Italy) (Fox and Guinee, 2013) justifies the study of this characteristic. Two dimensions should be considered for an extensive overview of the acid-forming or base-forming potential of a food product: (1) its potential renal acid load (**PRAL**) index, and (2) its organic anion content (Demigné et al., 2004a; Demigné, 2008; Gore et al., 2016).

(1) The PRAL index was developed by Remer and Manz (1995) to evaluate the acid/alkaline load induced by foodstuffs when ingested. It is based on the nutrient composition of the product and is calculated as follows:

$$\begin{aligned} \text{PRAL (mEq/100 g)} &= 0.49 \times \text{protein (g/100 g)} \\ &+ 0.037 \times \text{P (mg/100 g)} + 0.027 \times \text{Cl (mg/100 g)} \\ &- 0.041 \times \text{Na (mg/100 g)} - 0.021 \times \text{K (mg/100 g)} \\ &- 0.026 \times \text{Mg (mg/100 g)} - 0.013 \times \text{Ca (mg/100 g)}. \end{aligned}$$

Diet influences the acid-base balance of the body. Fixed acids are produced as the result of (1) the oxidation of the absorbed sulfur-containing AA from dietary proteins, (2) the generation of phosphates from the metabolism of phosphoesters and phosphoproteins, and (3) the absorption of chloride (Oh, 2000; Poupin et al., 2012). On the contrary, ingested cations (Na, Mg, K, and Ca), commonly assumed to be associated with metabolizable anions, have alkalinizing properties (Remer, 2001; Poupin et al., 2012). According to the calculation model, foods with positive PRAL denote an excess of acid-forming potential, whereas negative PRAL indicate an excess of alkaline-forming potential.

Received February 26, 2016.

Accepted May 15, 2016.

¹Corresponding author: julie.mardon@vetagro-sup.fr

Given their high positive PRAL values, cheeses may contribute to the installation of low-grade metabolic acidosis (Remer and Manz, 1995; Cordain et al., 2005; Gore et al., 2016). In the long term, this state may induce deleterious effects on renal function (Frassetto et al., 2007b; Fenton et al., 2011; Bonjour, 2013; Wang et al., 2015). Even if it remains controversial because of the lack of well-designed clinical trials, bone and muscle tissues might be affected as well (New et al., 2004; Frassetto et al., 2008; Mardon et al., 2008; Pedone et al., 2010).

(2) Citrate and lactate salt intakes may have an alkalinizing effect on the acid-base balance of the body (Demigné, 2008). When completely oxidized in the course of the metabolism, they are considered as precursors of bicarbonate, an important alkalinizing component in the body (Oh, 2000; Poupin et al., 2012). Citrate is the most abundant organic anion in milk and lactate in cheese (Tormo and Izco, 2004). In cheeses, these organic anions result from biochemical changes during processing and ripening (Fox, 2004; McSweeney, 2004). Their contents depend on cheese type and on the existing microflora because lactate and citrate may follow different metabolic pathways (McSweeney and Sousa, 2000).

In their pioneering work, Remer and Manz (1995) found that milk and fresh cheeses were characterized by PRAL values around zero, whereas ripened cheeses exhibited high PRAL values. Demigné et al. (2004b) suggested that processing enhanced the acid-forming potential of cheese. This hypothesis was supported by Gore et al. (2016) who confirmed that different cheese-making technologies had strong effects on acid-forming potentials of end products. In particular, they reported that hard cheeses and blue-veined cheeses exhibited the strongest acidogenic characters. This was the result of a great imbalance between acidifying elements (Cl, P, and proteins) and alkalinizing ones (Na and Ca) of PRAL index.

Therefore, it would be interesting to study the evolution of the acid-forming potential of cheeses during manufacturing to determine the technological steps responsible for this acid-forming potential generation. This would allow to better understand this feature, even to potentially control it. Indeed, in cheese-making technology, different end products are obtained through the modulation of various technological steps: milk setting, coagulum cutting, stirring, heating, draining, pressing, curd salting, or cheese ripening (Fox et al., 2004). All of these steps more or less affect the final concentrations of various nutrients and thus influence the acid-forming potential of final products. To our knowledge, no work addressing this issue is reported in the literature. Some

studies have focused on the evolution of certain minerals during the cheese-making process (Moreno-Rojas et al., 1995; Cichoscki et al., 2002; González-Martín et al., 2011), but the lack of literature on this aspect is often criticized (Hickey et al., 2015) and these works do not allow evaluation of the PRAL index of intermediate and end products.

The aim of the present work was to determine the evolution of the acid-forming potential of cheese and its responsible key steps during the cheese-making process to characterize and better understand its generation. The study was based on the industrial cheese-making process (from raw milk to final stage of ripening) of a soft blue-veined cheese.

MATERIALS AND METHODS

Cheese Manufacture

Raw cow milk was pasteurized (72°C, 15 s) and standardized in fat content (3.8%), then cooled to 13°C (Figure 1). Calcium chloride (concentration = 520 g/L, volume = 15 mL/100 L) and fermented cocktail (starter culture and *Penicillium roqueforti*, volume = 0.6 L/100 L) were added for pre-maturation of milk for about 12 h. The milk was then heated to 32°C and moved to vats. Rennet extract (chymosine + pepsin, ≥ 160 international milk clotting units/mL, volume = 30 mL/100 L) was added. After 30 min of incubation, the coagulum was cut into cubes (1 × 2 × 2 cm) by an automated cutting grid and a stirring process for 1 h was applied to form grains of curd. A draining conveyor was used before molding so the grain structure was not damaged. The syneresis was carried out in molds, with periodic turnarounds, at a temperature between 19 and 20°C. The curds were salted manually by rubbing dry salt on the surface and then pricked to allow the growth of *Penicillium*. Ripening was carried out at 8°C, 98% RH until d 28 and then at 0°C until d 56.

Sampling

Three cheese-making batches were followed, each of them manufactured at a 1-wk interval. The sampling was made during different steps of the cheese-making process: reception of raw milk, pasteurization, maturation of milk, coagulation, stirring, draining, and ripening. The raw milk represented a mixed milk from about 20 local producers, sampled before standardization and pasteurization. Pasteurized milk was sampled before adding the CaCl₂ and the ferments and matured milk just before adding the rennet. One liter per each batch was aliquoted and immediately frozen (−20°C). The

milk (30 t) was distributed in 6 vats. Two vats were followed per batch: for each vat, 1 L of coagulum was sampled, by immersing a jar into the vat, just before cutting, and 1 L of stirred grains of curd (**SGC**) was collected at the end of the draining conveyor. Samples were aliquoted and immediately frozen. Drained curds (**DC**) were sampled just before salting. During ripening, one salted blue-veined cheese (**BC**) per vat (2.2 kg each) was collected at various aging times: 21 d (**BC21**), 28 d (**BC28**), 42 d (**BC42**), and 56 d (**BC56**). Cheese samples were transported to the laboratory under refrigeration (4°C), the rind of the ripened cheeses was removed and the cheeses were aliquoted and frozen (cooling cell, Tecnox, Strasbourg, France) until -20°C. All samples were kept in the freezer (-20°C). One day before analysis, liquid samples from the 2 vats per batch were unfrozen in a refrigerator (4°C) and pooled the day of analysis. Frozen solid samples were pooled and ground just before analysis to obtain a representative homogenized product and stored at 4°C until analysis.

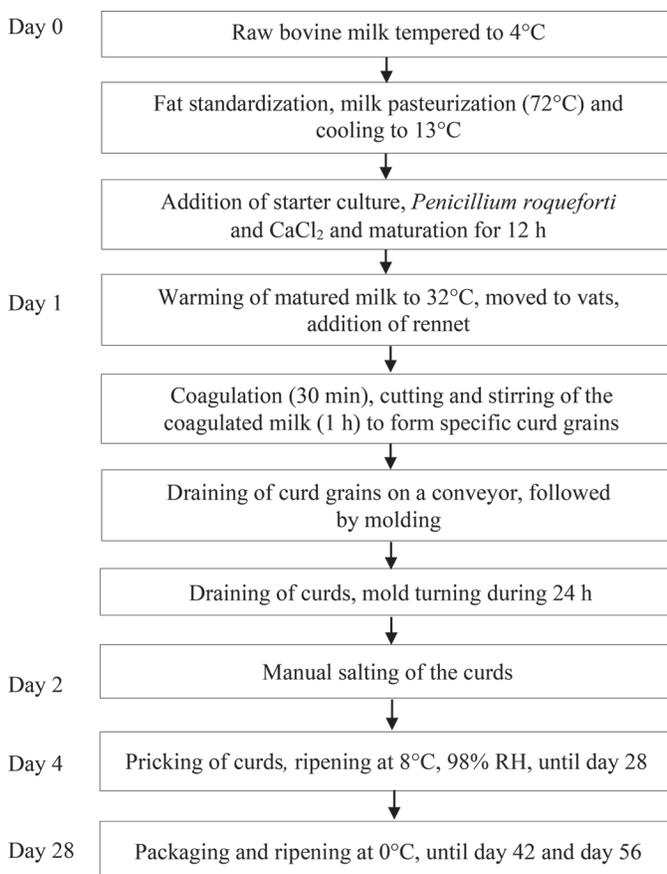


Figure 1. Manufacturing procedure for the studied blue-veined cheese.

Basic Chemical Analysis

Samples were analyzed in triplicate for pH, dry matter, fat, ash, and protein according to the ISO standards (AFNOR, 2013). The pH was measured at 20°C by using a food penetration pH measuring instrument (Testo 205, Testo, Alton, UK). The DM content was obtained by drying 3 g of product at 105°C in an oven for 24 h (ISO, 2004). The fat content was assayed using a Gerber method (ISO, 2000) and the ash content using a dry ash method (ISO, 1989). The total nitrogen was determined by Kjeldahl nitrogen analysis (ISO, 2013), using a Kjeldahl Unit (Büchi, Flawil, Switzerland). The amount of total N was multiplied by a 6.38 factor to express the results in total protein.

Mineral Determination (Calcium, Potassium, Magnesium, Sodium, and Phosphorus)

The mineralization phase of 1 g of product was carried out in triplicate in a programmable oven (Fours Nagat, Bretagne, France), at 550°C for 6 h. The ashes obtained were dissolved in 1 mL of nitric acid (25%; VWR International, Fontenay-sous-Bois, France) and then added to 250 mL with demineralized water. After appropriate dilution, the solution was injected in a Fast Sequential Atomic Absorption Spectrometer (Varian, AA240FS, Palo Alto, CA) according to ISO (2007a) to assay Ca, K, Mg, and Na contents. The total P was assessed with the colorimetric nitro-vanado-molybdate method from the same ash solution on a Spectrophotometer (Secomam, Domont, France), at 430 nm wavelength as described by Bord et al. (2015).

Analysis of Chloride, Citrate, and Lactate

The Cl content in milk and cheese slurry was measured by potentiometric titration (Titroline Easy Potentiometer) with silver nitrate 0.1 N (VWR International, France) according to ISO (2007b).

The citrate and lactate contents were measured by enzymatic bio analysis (Enzytec Citric acid, Enzytec Lactic acid, R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany), as described in the instructions supplied with the kit. Cheese samples (5 g) were homogenized in 50 mL of perchloric acid (1 M; VWR International, France) using an Ultra-Turrax homogenizer (IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau, Germany). The homogenate was then centrifuged at 18,000 × g for 10 min at 4°C. The supernatant (20 mL) was adjusted to pH 8 to 10 with approximately 4 mL of KOH (5 M; VWR International, Leuven, Belgium) and placed for 15 min at 4°C for the quantitative precipitation of potassium perchlorate,

and then filtered. The amount of NADH oxidized in the reactions of the filtrate with the different enzymes was determined by means of its light absorbance at 340 nm wavelength and was stoichiometric to the amount of citrate and lactate. For each product, the assay was performed in triplicate.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using XL STAT software package (Addinsoft, Paris, France). Results are reported as means (\pm SD). The Shapiro-Wilk ($P < 0.05$) statistic was performed to check the normality of our data. A large segment of variables lacked normality and therefore nonparametric (Kruskal-Wallis) test and post-hoc multiple comparison (Conover-Iman procedure) were adopted to compare the studied elements during the cheese-making process. Differences between mean values were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Changes in the Gross Composition

Average pH, DM, fat, ash, and protein contents of BC throughout cheese-making process are displayed in Table 1. The pH of milk did not vary after standardization and pasteurization. A slight decrease was initiated during milk maturation and was intensified after coagulation with a marked acidification reported in DC (pH = 4.9). This trend reversed during ripening with an increase of pH until 6.2 in BC56. Dry matter, ash, and protein contents of milk remained unchanged until coagulation. This also holds true for fat content, once adjusted to 3.8 g/100 g during standardization. As whey separation and evacuation (by cutting, stirring, and draining) occurred, all of these parameters significantly increased in curds to display at the end of ripening 54.1 g/100 g of DM, 3.8 g/100 g of ash, and 30.7 g/100 g of fat. Particularly, the average milk protein content (3.3 g/100 g) did not show any significant fluctuation until stirring (8 g/100 g) and continued increasing after draining (18.7 g/100 g) to reach a steady content of 20.6 g/100 g during ripening.

Evolution of Mineral Contents

Table 2 shows the mineral evolution of Ca, P, Mg, K, Na, and Cl contents of BC throughout cheese-making process. The Ca and P contents showed quite similar variations during the cheese-making process: no significant differences were observed until the coagulation of milk, then both minerals increased significantly after the stirring process. Once the draining finished, Ca

content remained unchanged until the end of ripening (459.3 mg/100 g). The P content reached a steady level during ripening as well (302.1 mg/100 g). Similar trends were observed for Mg during the preparation of the milk. The coagulation increased Mg content to 12.2 mg/100 g and the draining process to 19.5 mg/100 g, remaining constant until the end of ripening. K content remained relatively constant during the whole process, with 104.6 mg/100 g average until draining, showing a decreasing tendency after the stirring and draining processes. Ripened cheeses exhibited K contents similar to those reported in initial raw milk. Initially low in both milk and curds, Na and Cl contents increased due to the salting process and reached a steady level during ripening.

Lactate and Citrate Content Changes

The lactate content of milk slightly increased after maturation until the molding process, ranging from 2.6 mg/100 g for raw milk to 38.5 mg/100 g for SGC (Figure 2). The greater increase was observed in curds after the 24 h of draining (1,297.9 mg/100 g). During the ripening period, the lactate content decreased significantly to 519.3 mg/100 g. Inversely, the citrate content decreased significantly during the cheese-making process. The milk attested the highest citrate content (100.5 mg/100 g), which decreased considerably during the draining process (to 6.1 mg/100 g) and then remained constant.

Evolution of PRAL Index

Figure 3a shows the evolution of PRAL values during cheese-making process. During the first stages of manufacture, PRAL indexes of intermediate products were slightly over zero (1.3 mEq/100 g on average). A first increase of PRAL index was reported between SGC (3.4 mEq/100 g) and DC (10.4 mEq/100 g), thus after draining. Then, the PRAL value greatly raised with the salting step and the beginning of ripening (33.2 mEq/100 g at d 21). Finally, it reached a steady level in final stages of ripening (20.3 mEq/100 g). It is noticeable that the SD values obtained after the stirring process showed an important inter-batch variability, with ranges from 14.3 to 24.2 mEq/100 g for BC56.

The evolution of different PRAL elements (nutrient contents weighted with their conversion factors as defined by Remer and Manz, 1995) during the cheese-making process are shown in Figure 3b. Until coagulation, the acidic elements of PRAL (Cl, P, and protein) were well compensated with the alkaline elements (Na, Ca, K, and Mg). Then, the draining process induced an increase in protein, P, and Ca elements and to a lesser

Table 1. Average pH and gross composition of raw milk (RM), pasteurized milk (PM), matured milk (MM), coagulum (C), stirred grains of curd (SGC), drained curds (DC), and blue-veined cheeses at various aging times: 21 d (BC21), 28 d (BC28), 42 d (BC42), and 56 d (BC56) of ripening (related to 100 g edible portion)^{1,2}

Item	pH	DM (g)	Fat (g)	Ash (g)	Protein (g)
RM	6.8 ± 0.1 ^g	12.8 ± 0.1 ^{ab}	4.1 ± 0.1 ^b	0.7 ± 0.0 ^a	3.3 ± 0.0 ^a
PM	6.8 ± 0.1 ^g	12.5 ± 0.3 ^a	3.8 ± 0.1 ^a	0.7 ± 0.0 ^a	3.3 ± 0.1 ^a
MM	6.6 ± 0.1 ^{fg}	12.5 ± 0.2 ^a	3.8 ± 0.1 ^a	0.7 ± 0.0 ^{ab}	3.3 ± 0.1 ^a
C	6.6 ± 0.2 ^{fg}	13.5 ± 0.7 ^{bc}	3.2 ± 0.6 ^a	0.8 ± 0.1 ^{bc}	3.5 ± 0.3 ^a
SGC	6.5 ± 0.3 ^{ef}	24.4 ± 1.2 ^{cd}	14.4 ± 5.4 ^b	1.2 ± 0.0 ^{cd}	8.0 ± 0.5 ^b
DC	4.9 ± 0.4 ^a	49.7 ± 3.2 ^{de}	28.4 ± 1.2 ^c	2.3 ± 0.6 ^d	18.7 ± 0.6 ^b
BC21	5.4 ± 0.2 ^{ab}	53.7 ± 0.6 ^{ef}	29.5 ± 0.4 ^{cd}	3.7 ± 0.2 ^e	20.3 ± 0.4 ^c
BC28	5.8 ± 0.1 ^{bc}	54.7 ± 0.8 ^f	30.1 ± 0.2 ^d	3.9 ± 0.4 ^e	20.6 ± 0.4 ^c
BC42	6.0 ± 0.1 ^{cd}	54.0 ± 1.0 ^{ef}	30.0 ± 0.3 ^d	3.8 ± 0.3 ^e	20.6 ± 0.6 ^c
BC56	6.2 ± 0.2 ^{de}	54.1 ± 1.3 ^f	30.7 ± 0.7 ^e	3.8 ± 0.2 ^e	20.6 ± 0.7 ^c

^{a-g}Means in a column sharing common superscripts are similar as tested by Conover-Iman test ($P > 0.05$).

¹Means of replicates ± SD.

²Kruskal-Wallis P -value <0.0001 in all cases.

degree in the Mg element. Simultaneously, K, Cl, and Na elements remained quite constant. Yet, the strongest acidifying effect is observed just after the salting step, when Cl become the most acidic element of PRAL, due to its high concentrations. In BC56, Cl, P, and protein elements could not be counterbalanced by the Na and Ca elements, whereas K and Mg elements had little effect on the PRAL index, given their low concentrations.

DISCUSSION

This work, based on the study of a soft blue-veined cheese, investigated the generation of the acid-forming potential of cheese throughout processing. Indeed, this characteristic is known to be potentially associated with deleterious effects for consumers' health in the long term (Alexy et al., 2005; Frassetto et al., 2007b; Pedone et al., 2010). Thus, this study provides new data to better characterize and understand this nutri-

tional feature. A full biochemical characterization was carried out from milk to final cheese during 10 steps of the process. Very few studies reported a similar exhaustive work (Moreno-Rojas et al., 1994). Most of them only focused on major minerals found in cheese and mainly during ripening of hard cheeses (Moreno-Rojas et al., 1995; Cichoski et al., 2002). The results confirmed that cheese-making process was responsible for the high acid-forming potential of cheeses and allowed identification of draining and salting as the main key steps responsible for this characteristic.

Effect of Draining

Draining was the first step that significantly increased the PRAL index. First, the increase of DM as whey expelled necessarily affected the PRAL value because it is expressed per 100 g of fresh product. Then, the evolution of curds composition tightly depended on the

Table 2. Mineral composition of raw milk (RM), pasteurized milk (PM), matured milk (MM), coagulum (C), stirred grains of curd (SGC), drained curds (DC), and blue-veined cheeses at various aging times: 21 d (BC21), 28 d (BC28), 42 d (BC42), and 56 d (BC56) of ripening (related to 100 g edible portion)

Item	Mineral element ^{1,2} (mg/100 g)					
	Ca	P	Mg	K	Na	Cl
RM	96.3 ± 18.0 ^a	48.2 ± 30.7 ^a	8.0 ± 2.0 ^a	100.2 ± 19.3 ^{ab}	38.3 ± 8.8 ^a	109.0 ± 2.8 ^{bc}
PM	106.1 ± 7.6 ^a	63.4 ± 14.2 ^a	8.8 ± 1.0 ^{ab}	114.5 ± 12.1 ^b	38.6 ± 4.8 ^a	107.0 ± 2.1 ^{ab}
MM	100.8 ± 13.4 ^a	72.1 ± 24.2 ^a	8.2 ± 1.1 ^a	99.2 ± 15.9 ^{ab}	35.5 ± 6.5 ^a	113.4 ± 1.2 ^{cd}
C	120.5 ± 14.1 ^{ab}	76.1 ± 19.9 ^a	12.2 ± 2.0 ^{bc}	104.5 ± 15.9 ^b	72.6 ± 33.3 ^b	113.6 ± 2.4 ^d
SGC	222.8 ± 39.5 ^b	158.9 ± 27.9 ^b	14.8 ± 3.2 ^{cd}	96.3 ± 11.8 ^{ab}	93.0 ± 29.5 ^{bc}	101.7 ± 1.2 ^a
DC	401.3 ± 72.6 ^c	271.5 ± 75.7 ^{bc}	19.5 ± 4.1 ^{de}	72.2 ± 13.0 ^a	71.8 ± 33.1 ^b	79.5 ± 1.4 ^a
BC21	394.6 ± 126.9 ^c	322.3 ± 70.7 ^{cd}	20.8 ± 5.4 ^e	89.2 ± 36.1 ^{ab}	454.8 ± 52.6 ^c	1,389.5 ± 110.0 ^e
BC28	472.3 ± 51.5 ^c	396.6 ± 35.0 ^d	24.5 ± 3.7 ^e	107.2 ± 15.7 ^b	762.7 ± 140.3 ^d	1,478.8 ± 190.6 ^e
BC42	443.9 ± 48.9 ^c	375.1 ± 20.1 ^d	23.6 ± 2.6 ^e	104.3 ± 16.6 ^b	743.7 ± 117.3 ^d	1,459.6 ± 124.9 ^e
BC56	459.3 ± 24.3 ^c	302.1 ± 72.3 ^{cd}	23.2 ± 2.4 ^e	103.9 ± 13.3 ^{ab}	755.8 ± 82.7 ^d	1,436.9 ± 141.8 ^e

^{a-e}Means in a column sharing common superscripts are similar as tested by Conover-Iman test ($P > 0.05$).

¹Means of replicates ± SD.

²Kruskal-Wallis P -value <0.0001 in all cases.

phase in which components are located as syneresis and draining process occur. As a consequence of whey evacuation, casein micelles concentrated in curds resulting in an increase in the protein element of PRAL (Figure 3b). At the same time, a large proportion of PRAL alkaline elements initially present in raw milk and mainly located in the aqueous phase of milk (Zamberlin et al., 2012) were lost. These losses were estimated at about 85% for K, 60% for Mg, and 35% for Ca in the current work (data not shown). In DC, Ca and P concentrations increased in similar proportions as a consequence of their coexistence in casein micelles (Table 2). The level of remaining Ca and P bound in caseins is linked to coagulum acidification: the higher the coagulum acidification level before draining, the higher Ca and P are lost into the whey (Le Graet and Brule, 1993). In cow milk, the complete solubilization of inorganic P

is attained at pH 5.2, whereas Ca solubilize at pH 3.5 (Le Graet and Brule, 1993; Reykdal et al., 2011). In the current work, the slow draining (24 h) involved an acidification of the curds to a pH of 4.9, hence explaining the detected loss of minerals in DC. The resulting raise of PRAL index (10.4 mEq/100 g) was due to the imbalance between the important weight of acidogenic elements P and proteins and the main alkalizing one, Ca. Given its low concentration compared with Ca and P, Mg poorly affected PRAL values. Potassium contents remained constant, and thus had few consequences on PRAL variations.

Effect of Salting

Salting induced a dramatic increase in the acid-forming potential of cheese during processing, with a

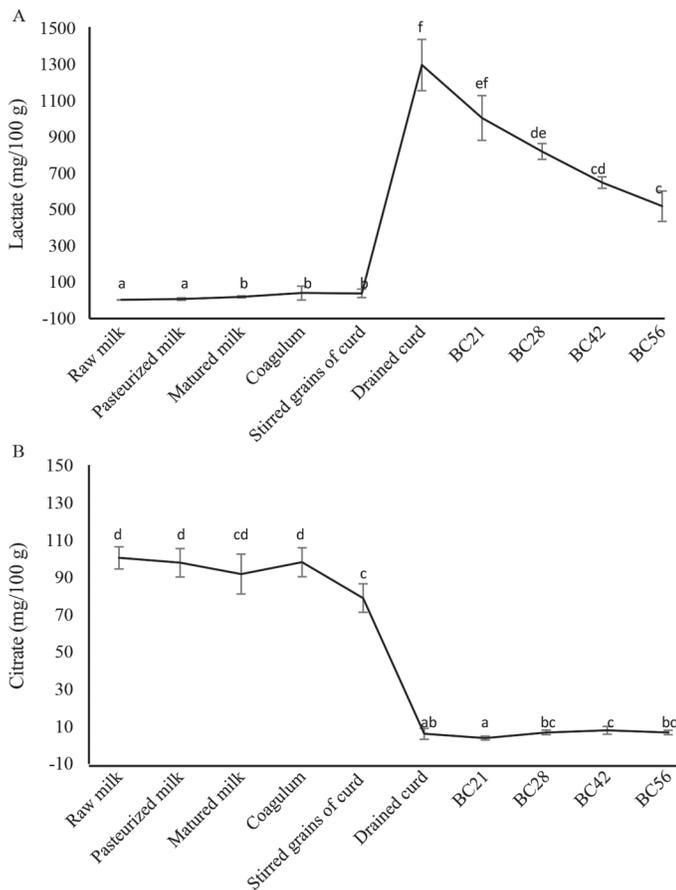


Figure 2. Evolution of lactate and citrate contents throughout cheese-making process of blue-veined cheese (related to 100 g of edible portion). The data represent means \pm SD; $n = 9$. Kruskal-Wallis P -value < 0.0001 . Means sharing common letters (a–f) are similar as tested by Conover-Iman test ($P > 0.05$). Blue-veined cheeses at various aging times: 21 d (BC21), 28 d (BC28), 42 d (BC42), and 56 d (BC56) of ripening.

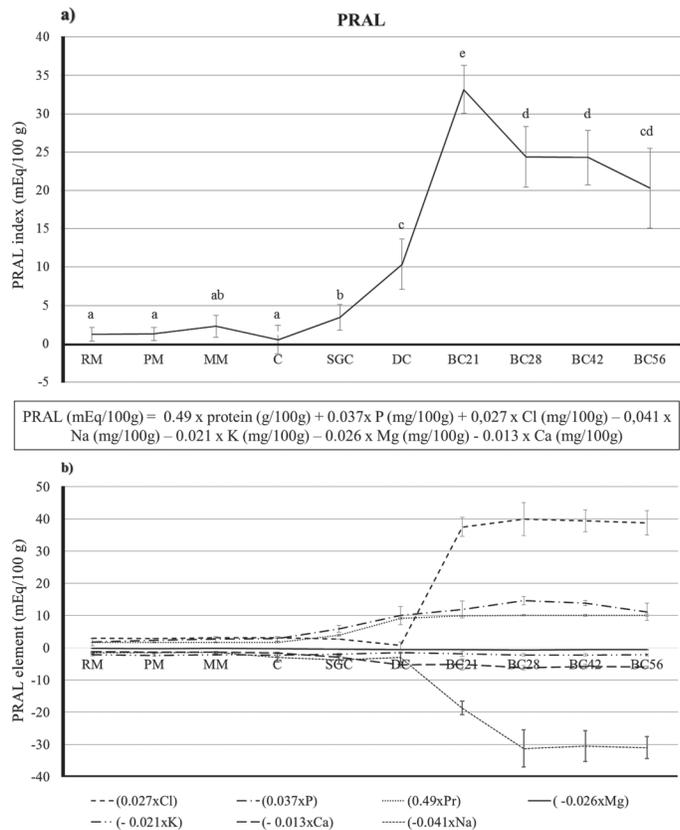


Figure 3. Evolution of potential renal acid load (PRAL) index (a) and PRAL elements weighted with their derived factors (b) during the manufacture of blue-veined cheese. The data represent means \pm SD, expressed in mEq/100 g edible portions; $n = 9$. Kruskal-Wallis P -value < 0.0001 in all cases. Means sharing common letters (a–d) are similar as tested by Conover-Iman test ($P > 0.05$). Raw milk (RM), pasteurized milk (PM), matured milk (MM), coagulum (C), stirred grains of curd (SGC), drained curds (DC), and blue-veined cheeses at various aging times: 21 d (BC21), 28 d (BC28), 42 d (BC42), and 56 d (BC56) of ripening; Pr, protein.

PRAL value tripled between DC and BC21 (Figure 3a). The study of PRAL element changes (Figure 3b) from salting revealed that Cl and Na elements had a strong effect on the PRAL value compared with others. Particularly, Cl element, given its high content (Table 2), had a strong acidogenic effect resulting in the increase of PRAL index. Similar situations were described by Remer and Manz (1995) in Cheddar-type cheese and Parmesan. This point highlighted the interest of considering Na and Cl in PRAL calculation for cheeses. Indeed, it is noteworthy that, from 2003, Na and Cl were omitted from the PRAL formula when estimating a diet-dependent net acid load (Remer, 2003; Frassetto et al., 2007a). Indeed, Na and Cl were found to fully compensate in several clinical studies when the urinary cation-anion difference was calculated (Remer and Manz, 1994). This change allowed to overcome missing Cl data from food tables and assumed that in the case of processed salted foods Na and Cl would always have a stoichiometric relationship, with equal concentrations. However, in cheese-making technology, Cl ions in milk, and later in cheese whey, are accompanied by either Na or other cations. Salt is added during processing and a portion of Na and Cl ions are allowed to drain off into the whey. Therefore, Na and Cl concentrations changes are unlikely to be stoichiometric and this is supported in the current work. In the literature, very few works addressed the distribution of Cl and Na in cheese matrix to understand this feature (Hardy, 1983, 1976; Boisard et al., 2013). The diffusion of salt was studied (Morris et al., 1985), but NaCl content is still mainly considered from the Cl determination (Floury et al., 2009; McMahon et al., 2009; Fucà et al., 2012).

Overall, the cumulated effects of main alkalizing elements (Na and Ca) could not compensate the strong acidogenic elements (Cl, P, and proteins) and resulted in a high mean PRAL index at d 56 (20.3 mEq/100 g). This value is in agreement with previous studies in blue cheese (Gore et al., 2016) and comparable with the PRAL calculated by Remer and Manz (1995) in hard cheeses. Contrary to what is often found in the literature (Remer and Manz, 1995; Alexy et al., 2005), the acidogenic character of dietary proteins needs to be moderated for cheeses, since this work highlights the fact that Cl is the strongest acidifying nutrients in the end products and that P is at least as acidifying as proteins.

Effect of Cheese-Making Process on Organic Anion Content

During the cheese-making process, biochemical changes due to metabolism of lactose, lactate, and citrate are likely to modulate the acid-forming potential

of cheese (Demigné et al., 2004a). In the body, metabolizable organic anions (lactate, citrate), in the form of salts, are effectively absorbed in the small intestine. They are metabolized mostly in the liver to lead to the synthesis of bicarbonate, a powerful buffer system in the organism (Oh, 2000; Poupin et al., 2012). Thus, food products with valuable contents in metabolizable organic anions are assumed to contribute to the neutralization of the fixed acidity of the body (Demigné et al., 2004a; Sabboh et al., 2007). The daily food supply of organic anions is recognized to be rather dependent on fruit and vegetable intake. Nevertheless, animal foods represent a nonnegligible source of organic anions. In subjects consuming a diet high in meat and dairy products, animal foods probably are the main contributors to organic anion intake (Demigné et al., 2004a).

During processing, the activity of the mesophilic starter bacteria resulted in a high increase in lactate (Figure 2), which may be further metabolized to various compounds (cheese flavor). This metabolization is particularly extensive in surface mold-ripened and blue-veined cheeses (McSweeney and Sousa, 2000), and would initially involve *Geotrichum candidum*, followed by *Penicillium roqueforti* (McSweeney, 2004). In BC, the decrease in lactate content by 27.5% in BC21 and by 62.6% in BC56 compared with the one in DC was consistent with this phenomenon. It is hypothesized that lactate rate might continue decreasing with a longer ripening time. Nevertheless, if consumed at 28 d of ripening, the BC, containing 820 mg of lactate per 100 g, can be considered as a lactate-rich food product, compared with semi-hard cheeses Comte and Emmental (Mullin and Emmons, 1997). At 28 d, one portion of 40 g of BC is even richer in organic anions than 100 g of vegetables (Demigné, 2008).

Milk contained about 100.5 mg/100 g of citrate. Most of it was lost in the whey during the cheese-making process (Figure 2), as described by McSweeney and Sousa (2000). A part of the remaining citrate was also reported to be possibly metabolized by nonstarter lactic acid bacteria (McSweeney, 2004). In the blue-veined cheese studied, only 6.8% of the initial citrate content remained in BC56 (6.8 ± 1.2 mg/100 g). Thus, even if citrate theoretically has a 3-fold higher alkalizing effect than lactate in the body due to its 3 carboxyl groups, the low citrate content in ripened cheese makes its base-forming potential negligible compared with lactate.

Implications

As a perspective, these results could be useful to develop strategies aiming to reduce the acid-forming potential of cheeses:

- An important track to investigate would be the modulation of the salting process. In agreement with the public health recommendation to decrease salt consumption, it would be relevant to apply partial replacement of NaCl. Salt substitution is a practice already widely experienced (Grummer et al., 2013, 2012; Lu and McMahon, 2015). However, most of these works explored the use of CaCl₂ or KCl as NaCl substitutes, which both induce an acid load to the body (Remer, 2001).
- Ca enrichment might be a relevant approach to consider. It could counterbalance the alkaline element loss occurring during draining, especially Ca (35% of initial Ca in raw milk is lost into the whey), and thus neutralize the acidogenic effect of P.
- The investigation of lactate content fluctuations suggests that a consumption of blue cheese with short ripening duration would better limit its acid-forming potential rather than products with longer ripening duration.

However, such interventions would require to better control PRAL variations. Indeed, this work highlights the fact that acid-forming potential of cheese is subjected to inter-batch variations in mineral composition, especially in Na and Cl contents. Similar wide fluctuations were previously reported in cheeses involving mold growth and were assigned to the development of *Penicillium* (Gaucheron et al., 1999; Prieto et al., 2000; Abbas, 2012). To clear out this limitation, further research would be needed on cheeses produced with different processes. Actually, it must be noticed that this work was carried out on a limited number of production and for one single cheese type. It must be highlighted that further investigations would be needed to extrapolate the results to other cheeses. In particular, hard cheeses would be an interesting product to investigate because they have high PRAL values (Remer and Manz, 1995; Gore et al., 2016) but also showed great lactate contents.

Another limitation of this work is that, the PRAL formula was developed to be used for every foodstuffs, not specifically for cheeses. Thus, we can wonder whether the mean intestinal absorption rate of Ca (25%) and P (63%) in particular are suitable. Indeed, depending on the cheese matrix, Ca and P chemical forms in cheeses can be different and might modulate their bioavailability (Buchowski and Miller, 1990; Cashman, 2002). On the other hand, despite we emphasize that lactate content might affect the acid-forming potential of cheeses, the way to use anion contents in the PRAL formula cannot be suggested from this study only. This

issue would deserve clinical investigations to determine the respective weight of PRAL and organic anion contents in the acid-forming potential of food products. More globally, clinical studies should also be driven to perform a direct measurement of the urinary acid excretion. This would allow a more reliable evaluation of the generated net acid load to the metabolic system.

CONCLUSIONS

The present study demonstrates the acidogenic character of the cheese-making process. The main key steps responsible for this characteristic were identified: the draining process, because of the loss of alkaline minerals (Ca, Mg, Na, K) in the whey as well as the concentration of casein micelles in curds, and the salting process, because of the imbalance between the strong acidifying effect of Cl, P, and proteins elements on the one hand, and Na and Ca elements on the other hand. However, the relatively high lactate content appearing in blue-veined cheese during fermentation could, therefore, partly counteract the PRAL value of the cheese. This paper opens new perspectives regarding strategies of nutritional optimization of cheeses. It provides new data on their nutritional functionalities and deserves further research, notably to evaluate the eventuality and nutritional consistency to limit the acid-forming potential of cheeses.

ACKNOWLEDGMENTS

The research was co-financed by FEDER (European Regional Development Funds) in Auvergne (France). The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, or publication of this article.

REFERENCES

- Abbas, K. 2012. Effet de traitements thermiques sur les propriétés fonctionnelles de fromages traditionnels : le cas des pâtes persillées (These). Agricultural Sciences. Blaise Pascal University, Clermont-Ferrand, France.
- AFNOR. 2013. Association française de normalisation. Chemical analysis. Accessed Nov. 9, 2015. <http://sagaweb.afnor.org/fr-FR/sw/Identification/AccueilAbonnement>.
- Alexy, U., T. Remer, F. Manz, C. M. Neu, and E. Schoenau. 2005. Long-term protein intake and dietary potential renal acid load are associated with bone modeling and remodeling at the proximal radius in healthy children. *Am. J. Clin. Nutr.* 82:1107–1114.
- Boisard, L., I. Andriot, C. Arnould, C. Achilleos, C. Salles, and E. Guichard. 2013. Structure and composition of model cheeses influence sodium NMR mobility, kinetics of sodium release and sodium partition coefficients. *Food Chem.* 136:1070–1077.
- Bonjour, J.-P. 2013. Nutritional disturbance in acid–base balance and osteoporosis: A hypothesis that disregards the essential homeostatic role of the kidney. *Br. J. Nutr.* 110:1168–1177.
- Bord, C., D. Guerinon, and A. Lebecque. 2015. Impact of heating on sensory properties of French Protected Designation of Origin (PDO)

- blue cheeses. Relationships with physicochemical parameters. *Food Sci. Technol. Int.* <http://dx.doi.org/10.1177/1082013215605201>.
- Buchowski, M. S., and D. D. Miller. 1990. Calcium bioavailability from ripening Cheddar cheese. *J. Food Sci.* 55:1293–1295.
- Cashman, K. D. 2002. Calcium intake, calcium bioavailability and bone health. *Br. J. Nutr.* 87:S169–S177.
- Cichoski, A. J., E. Valduga, A. T. Valduga, M. E. Tornadijo, and J. M. Fresno. 2002. Characterization of Prato cheese, a Brazilian semi-hard cow variety: Evolution of physico-chemical parameters and mineral composition during ripening. *Food Contr.* 13:329–336.
- Cordain, L., S. B. Eaton, A. Sebastian, N. Mann, S. Lindeberg, B. A. Watkins, J. H. O'Keefe, and J. Brand-Miller. 2005. Origins and evolution of the Western diet: Health implications for the 21st century. *Am. J. Clin. Nutr.* 81:341–354.
- Demigné, C. 2008. Fonctionnalité alcalinisante. Pages 541–558 in *Aliments Fonctionnels*. 2nd ed. Lavoisier, Paris, France.
- Demigné, C., H. Sabbah, C. Puel, C. Rémésy, and V. Coxam. 2004a. Organic anions and potassium salts in nutrition and metabolism. *Nutr. Res. Rev.* 17:249–258.
- Demigné, C., H. Sabbah, C. Rémésy, and P. Meneton. 2004b. Protective effects of high dietary potassium: Nutritional and metabolic aspects. *J. Nutr.* 134:2903–2906.
- Fenton, T. R., S. C. Tough, A. W. Lyon, M. Eliasziw, and D. A. Hanley. 2011. Causal assessment of dietary acid load and bone disease: A systematic review & meta-analysis applying Hill's epidemiologic criteria for causality. *Nutr. J.* 10:41.
- Floury, J., O. Rouaud, M. Le Poullennec, and M.-H. Famelart. 2009. Reducing salt level in food: Part 2. Modelling salt diffusion in model cheese systems with regards to their composition. *LWT Food Sci. Technol. (Campinas)* 42:1621–1628.
- Fox, P. F. 2004. *Cheese: General aspects*. Elsevier Academic Press, San Diego, CA.
- Fox, P. F., and T. P. Guinee. 2013. *Cheese Science and Technology*. Pages 357–389 in *Milk and Dairy Products in Human Nutrition*. Young Park and George Haenlein, ed. Oxford, UK.
- Fox, P. F., P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, and T. P. Guinee. 2004. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Major Cheese Groups*. Elsevier Academic Press, Oxford, UK.
- Frassetto, L. A., S. Lanham-New, H. M. Macdonald, T. Remer, A. Sebastian, K. L. Tucker, and F. A. Tyllavsky. 2007a. Standardizing terminology for estimating the diet-dependent net acid load to the metabolic system. *J. Nutr.* 137:1491–1492.
- Frassetto, L. A., C. Morris, and A. Sebastian. 2007b. Dietary sodium chloride intake independently predicts the degree of hyperchloremic metabolic acidosis in healthy humans consuming a net acid-producing diet. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 293:F521–F525.
- Frassetto, L. A., R. Morris, D. Sellmeyer, and A. Sebastian. 2008. Adverse effects of sodium chloride on bone in the aging human population resulting from habitual consumption of typical American diets. *J. Nutr.* 138:419S–422S.
- Fucà, N., D. J. McMahon, M. Caccamo, L. Tuminello, S. La Terra, M. Manenti, and G. Licitra. 2012. Effect of brine composition and brining temperature on cheese physical properties in Ragusano cheese. *J. Dairy Sci.* 95:460–470.
- Gaucheron, F., Y. Le Graët, F. Michel, V. Briard, and M. Piot. 1999. Evolution of various salt concentrations in the moisture and in the outer layer and centre of a model cheese during its brining and storage in an ammoniacal atmosphere. *Lait* 79:553–566.
- González-Martín, I., J. M. Hernández-Hierro, I. Revilla, A. Vivar-Quintana, and I. Lobos Ortega. 2011. The mineral composition (Ca, P, Mg, K, Na) in cheeses (cow's, ewe's and goat's) with different ripening times using near infrared spectroscopy with a fibre-optic probe. *Food Chem.* 127:147–152.
- Gore, E., J. Mardon, D. Guerinon, and A. Lebecque. 2016. Exploratory study of acid-forming potential of commercial cheeses: Impact of cheese type. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 67:412–421. <http://dx.doi.org/10.3109/09637486.2016.1166188>.
- Grummer, J., N. Bobowski, M. Karalus, Z. Vickers, and T. Schoenfuss. 2013. Use of potassium chloride and flavor enhancers in low sodium Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 96:1401–1418.
- Grummer, J., M. Karalus, K. Zhang, Z. Vickers, and T. C. Schoenfuss. 2012. Manufacture of reduced-sodium Cheddar-style cheese with mineral salt replacers. *J. Dairy Sci.* 95:2830–2839.
- Hardy, J. 1976. Etude de la diffusion du sel dans les fromages à pâte molle de type Camembert. Comparaison du salage à sec et du salage en saumure. Thesis. Université de Nancy, Nancy, France.
- Hardy, J. 1983. Diffusion et distribution du chlorure de sodium dans les fromages. Influence sur l'activité de l'eau et les propriétés de sorption de l'eau. Thesis. Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France.
- Hickey, C. D., M. A. E. Auty, M. G. Wilkinson, and J. J. Sheehan. 2015. The influence of cheese manufacture parameters on cheese microstructure, microbial localisation and their interactions during ripening: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 41:135–148.
- ISO. 2004. ISO 5530:2004. Determination of the total solids content. (Reference method). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO. 1989. ISO 208:1989. Determination of ash content. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO. 2007a. ISO 8070:2007. Determination of calcium, sodium, potassium and magnesium contents. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO. 2007b. ISO 5943:2007. Determination of chloride content. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO. 2000. ISO 210:2000. Milk—Determination of fat content—Acidobutyrometric (Gerber method). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO. 2013. ISO 8968-1:2013. Milk and milk products—Determination of nitrogen content—Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Le Graet, Y., and G. Brule. 1993. Effects of pH and ionic strength on distribution of mineral salts in milk. *Lait* 73:51–60.
- Lu, Y., and D. J. McMahon. 2015. Effects of sodium chloride salting and substitution with potassium chloride on whey expulsion of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 98:78–88.
- Mardon, J., V. Habauzit, A. Trzeciakiewicz, M.-J. Davicco, P. Lebecque, S. Mercier, J.-C. Tressol, M.-N. Horcajada, C. Demigné, and V. Coxam. 2008. Long-term intake of a high-protein diet with or without potassium citrate modulates acid-base metabolism, but not bone status, in male rats. *J. Nutr.* 138:718–724.
- McMahon, D. J., M. M. Motawee, and W. R. McManus. 2009. Influence of brine concentration and temperature on composition, microstructure, and yield of feta cheese. *J. Dairy Sci.* 92:4169–4179.
- McSweeney, P. L. H. 2004. Biochemistry of cheese ripening. *Int. J. Dairy Technol.* 57:127–144.
- McSweeney, P. L. H., and M. J. Sousa. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait* 80:293–324.
- Moreno-Rojas, R., M. A. Amaro-Lopez, R. H. Garcia-Gimeno, and G. Zurera-Cosano. 1995. Effects of Manchego-type cheese-making process on contents of mineral elements. *Food Chem.* 53:435–439.
- Moreno-Rojas, R., R. Pozo-Lora, G. Zurera-Cosano, and M. A. Amaro-Lopez. 1994. Calcium, magnesium, manganese, sodium and potassium variations in Manchego-type cheese during ripening. *Food Chem.* 50:373–378.
- Morris, H. A., T. P. Guinee, and P. F. Fox. 1985. Salt diffusion in Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 68:1851–1858.
- Mullin, W. J., and D. B. Emmons. 1997. Determination of organic acids and sugars in cheese, milk and whey by high performance liquid chromatography. *Food Res. Int.* 30:147–151.
- New, S. A., H. M. MacDonald, M. K. Campbell, J. C. Martin, M. J. Garton, S. P. Robins, and D. M. Reid. 2004. Lower estimates of net endogenous noncarbonic acid production are positively associated with indexes of bone health in premenopausal and perimenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 79:131–138.
- Oh, M. S. 2000. Acid-base in renal failure: New perspectives on acid-base balance. *Semin. Dial.* 13:212–219.
- Pedone, C., N. Napoli, P. Pozzilli, F. Lauretani, S. Bandinelli, L. Ferrucci, and R. Antonelli-Incalzi. 2010. Quality of diet and potential

- renal acid load as risk factors for reduced bone density in elderly women. *Bone* 46:1063–1067.
- Poupin, N., J. Calvez, C. Lassale, C. Chesneau, and D. Tomé. 2012. Impact of the diet on net endogenous acid production and acid-base balance. *Clin. Nutr.* 31:313–321.
- Prieto, B., I. Franco, J. M. Fresno, A. Bernardo, and J. Carballo. 2000. Picón Bejes-Tresviso blue cheese: An overall biochemical survey throughout the ripening process. *Int. Dairy J.* 10:159–167.
- Remer, T. 2001. Influence of nutrition on acid-base balance—metabolic aspects. *Eur. J. Nutr.* 40:214–220.
- Remer, T. 2003. High meat diet, acid-base status and calcium retention. *J. Nutr.* 133:3239.
- Remer, T., and F. Manz. 1994. Estimation of the renal net acid excretion by adults consuming diets containing variable amounts of protein. *Am. J. Clin. Nutr.* 59:1356–1361.
- Remer, T., and F. Manz. 1995. Potential renal acid load of foods and its influence on urine pH. *J. Am. Diet. Assoc.* 95:791–797.
- Reykjal, O., S. Rabieh, L. Steingrimsdottir, and H. Gunnlaugsdottir. 2011. Minerals and trace elements in Icelandic dairy products and meat. *J. Food Compos. Anal.* 24:980–986.
- Sabboh, H., V. Coxam, M.-N. Horcajada, C. Rémésy, and C. Demigné. 2007. Effects of plant food potassium salts (citrate, galacturonate or tartrate) on acid-base status and digestive fermentations in rats. *Br. J. Nutr.* 98:72–77.
- Tormo, M., and J. M. Izco. 2004. Alternative reversed-phase high-performance liquid chromatography method to analyse organic acids in dairy products. *J. Chromatogr. A* 1033:305–310.
- Wang, O., Y. Hu, S. Gong, Q. Xue, Z. Deng, L. Wang, H. Liu, H. Tang, X. Guo, J. Chen, X. Jia, Y. Xu, L. Lan, C. Lei, H. Dong, G. Yuan, Q. Fu, Y. Wei, W. Xia, and L. Xu. 2015. A survey of outcomes and management of patients post fragility fractures in China. *Osteoporos. Int.* 26:2631–2640.
- Zamberlin, S., N. Antunac, J. Havranek, and D. Samarzija. 2012. Mineral elements in milk and dairy products. *Mljekarstvo* 62:111–125.

4.3 Etape 3 : Exploration des optimisations technologiques pertinentes permettant de réduire le caractère acidifiant des fromages

4.3.1 Contexte de l'étude

Après avoir déterminé les étapes clés responsables du potentiel acidifiant de la Fourme d'Ambert, la troisième partie de ce travail consistait à explorer, en milieu industriel, une stratégie visant à le réduire. L'approche proposée est une **substitution partielle du sel sec** par des sels organiques de Ca.

Les travaux de recherche visant la réduction de la teneur en sel dans les aliments sont nombreux depuis quelques années et tentent de répondre à une demande grandissante des pouvoirs publics et des consommateurs. En effet, la consommation de sel est globalement excessive dans la population générale (OMS, 2014). Compte-tenu des risques d'hypertension artérielle associés (facteur de risque reconnu des maladies cardiovasculaires) (Blaustein et al., 2012; He et al., 2011), l'excès de sel est considéré comme un problème majeur de santé publique. Il est également identifié comme facteur aggravant de l'AML (Frassetto et al., 2007b), suggéré comme ayant des effets délétères sur le métabolisme osseux (Duff and Whiting, 1998; Schmidlin et al., 1999).

La substitution du sel est déjà pratiquée pour diminuer la teneur en sel des fromages (Cruz et al., 2011). De nombreuses études ont porté sur la substitution partielle du NaCl par du **KCl**, du **MgCl₂** et du **CaCl₂** (Ayyash et al., 2011; Gimeno et al., 2001; Grummer et al., 2012; Kamleh et al., 2012; Katsiari et al., 1997). Cependant, le degré de substitution du NaCl est limité par le goût amer indésirable de ces substituts (Cruz et al., 2011; Le Minous, 2004). Ces composés exercent par ailleurs un effet acidogène au niveau métabolique (Lewis et al., 1989; Remer, 2000), aspect qui n'a d'ailleurs jamais été évoqué dans les travaux les ayant testés. Pourtant, Lewis et ses collaborateurs ont étudié l'effet des suppléments de Ca sous forme de **CaCl₂** et de **carbonate de Ca** sur l'EAB (Lewis et al., 1989). Les régimes alimentaires de 8 volontaires en bonne santé (hommes) ont été enrichis avec les deux types de sel pour que l'apport en Ca soit d'environ 1580 mg/j. Ainsi, ils ont pu démontrer que les supplémentations en CaCl₂ administrées pendant 56 jours augmentaient l'excrétion rénale d'acides de 33%. Par contre, les supplémentations en carbonate de Ca diminuaient l'excrétion rénale d'acides de 29%. L'impact acidifiant du CaCl₂ s'explique par les absorptions intestinales différents des deux composés (25-40% pour le Ca et 95% pour le Cl), qui se retrouvent alors en concentrations différentes dans le sang (Remer, 2000). Le principe est le même pour le KCl et le MgCl₂.

Notre démarche de substitution partielle du NaCl par du lactate et du citrate de Ca est originale et par ailleurs cohérente avec les recommandations des autorités de réduire la teneur en sel (OMS, 2014). Elle permettrait de répondre à plusieurs exigences identifiées au cours de l'étape 2 pour contribuer à la réduction du potentiel acidifiant : 1) diminuer la teneur en sel dans le produit, 2) combler les pertes en Ca suite à l'égouttage et 3) apporter des anions organiques alcalinisants qui pourraient réduire le potentiel acidifiant des fromages.

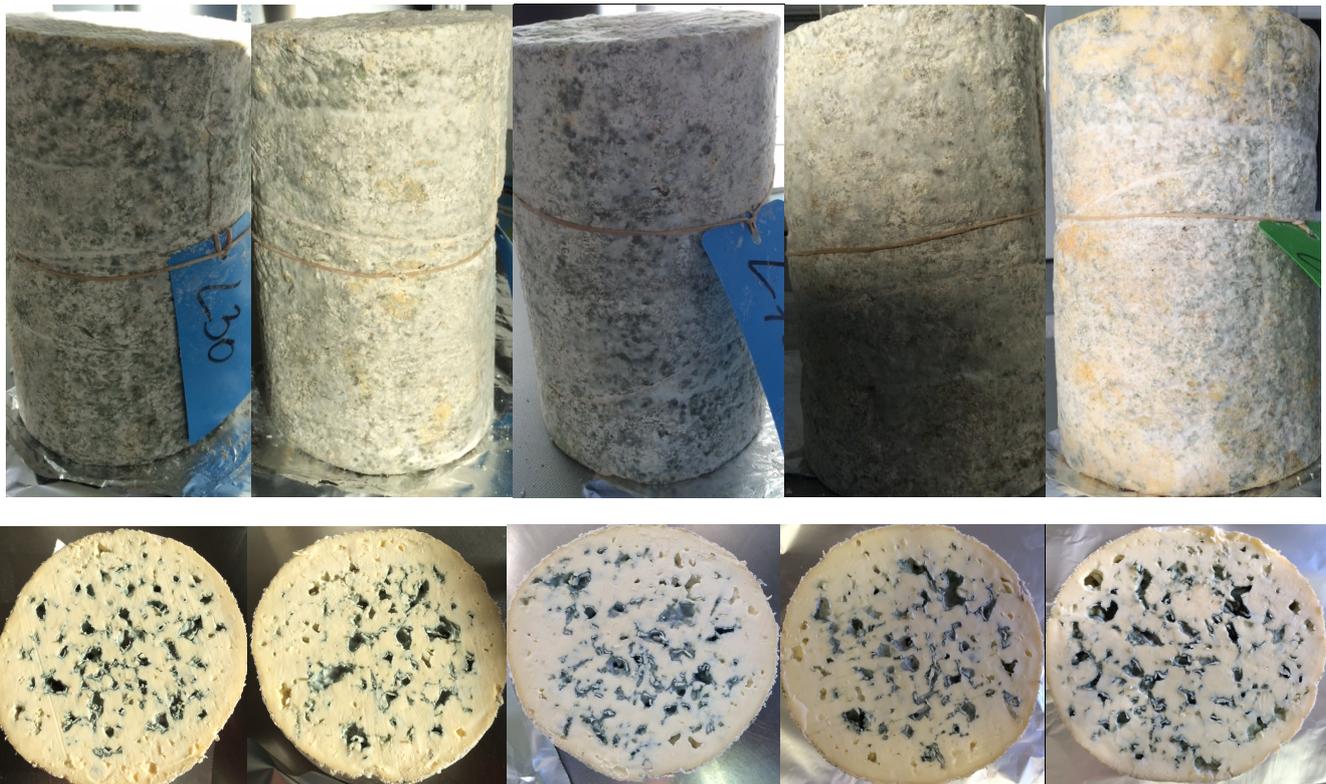
Cependant, la modulation de la fraction minérale des fromages peut s'accompagner de variations de la perception sensorielle du produit et possiblement de l'acceptabilité du consommateur (Doyle and Glass, 2010; Saint-Eve et al., 2009). Les consommateurs n'étant pas prêts à accepter des aliments optimisés d'un point de vue nutritionnel ayant des qualités sensorielles amoindries par rapport au produit conventionnel (Verbeke, 2006), un suivi conjoint de la perception sensorielle du produit semble indispensable. Ce constat est d'autant plus vrai dans le cas des produits AOP dont les caractéristiques sensorielles distinctives doivent impérativement être conservées, sous peine d'un report possible du consommateur sur d'autres produits, ce qui ferait perdre à cette démarche d'optimisation nutritionnelle tout son sens.

Certaines études ont montré que les sels organiques (**lactate de K**) pouvaient être utilisés en tant que substituants du NaCl dans les produits carnés, étant efficace dans l'inhibition de la flore pathogène, ayant un rôle d'exhausteur de goût, sans diminuer le goût salé (Astruc et al., 2008; Choi et al., 2014; Kamleh et al., 2012). Par contre, une substitution supérieure à 50% peut conférer un goût acide, amer et métallique (en raison de la présence du K) au produit. Dans les produits laitiers les sels organiques de Ca (**citrate** et **lactate de Ca**) sont utilisés dans le but d'enrichir en Ca des produits liquides comme le lait, les yaourts, les crèmes glacées, la crème. (Lacroix et al., 2013). L'analyse sensorielle des yaourts aux fruits enrichis en Ca avec du lactate de Ca (augmentation de 35,4 % de la teneur en Ca par rapport au contrôle) n'a pas entraîné d'effet indésirable ou de rejet de la part des consommateurs (Singh and Muthukumarappan, 2008). A notre connaissance, ces sels organiques de Ca n'ont jamais été utilisés sur des fromages et semblent donc intéressants pour réduire le potentiel acidifiant des produits.

4.3.2 Objectifs

L'**objectif** de cette troisième étape était d'explorer la pertinence d'une stratégie d'amélioration nutritionnelle pour réduire le potentiel acidifiant du fromage : la substitution partielle du NaCl par du citrate et du lactate de Ca. Cette étape visait à évaluer le potentiel acidifiant des produits obtenus et de garantir leur acceptabilité sensorielle.

Réduire le potentiel acidifiant des fromages pour améliorer leurs fonctionnalités nutritionnelles



a) Fromages substitués au CaLa de gauche à droite : CaLa23, CaLa38, CaLa53, CaLa76 et NaCl100



b) Fromages substitués au CaCi de gauche à droite : CaCi27, CaCi45, CaCi62, CaCi89 et Contrôle

Figure 17. Les fromages obtenus à l'étude préliminaire à 55 jours d'affinage

Abréviations utilisés : FB, fromage en blanc ; FS, fromage salé en saumure ; CaLa(n1), fromage obtenus par substitution partielle du sel (n1, %) par le lactate de calcium ; CaCi(n2), fromage obtenu par substitution partielle du sel (n2, %) par le citrate de calcium ; NaCl100, fromage obtenu par salage au sel fin ; Contrôle, fromage obtenu par salage au gros sel.

4.3.3 Principaux résultats et discussion

Cette phase a débuté par une étude préliminaire pour garantir l'absence de défauts majeurs sur les produits finis salés avec du lactate de Ca (CaLa) et du citrate de Ca (CaCi) et pour préciser certains points méthodologiques. Suite au succès de cette première approche, une seconde étude, plus large, a été menée.

4.3.3.1 Etude préliminaire : principaux résultats et discussions

Cette étude exploratoire visait à répondre aux 3 **objectifs** suivants :

- 1) Vérifier la faisabilité technologique de la modification proposée ;
- 2) Evaluer l'impact du salage à sec avec différents mélanges de sels organiques de Ca sur la composition biochimique du fromage ;
- 3) Vérifier l'acceptabilité sensorielle des fromages.

Les deux types de sels organiques de Ca (CaLa et CaCi hydratés) ont été utilisés à 4 concentrations différentes (30, 50, 70, 100% par rapport au NaCl). Un fromage a été salé au sel fin (NaCl100) et un autre au gros sel (Contrôle). Le salage à sec a été effectué par frottage des mélanges de sel (un fromage par traitement) à la surface des fromages salés dans la saumure¹.

D'un point de vue technologique, les différents salages testés ont donné des fromages présentant des croûtes sèches et non poisseuses (**figure 17**). Le développement d'un persillage uniforme et comparable au fromage contrôle a été relevé. Les modes de salages testés n'ont donc pas semblé présenter d'obstacle majeur et ont permis de valider la faisabilité technique de la proposition réalisée. **D'un point de vue sensoriel**, les analyses faites n'ont pas été discriminantes. A cette étape une grille d'évaluation a été utilisée pour évaluer l'aspect, la texture et le goût de la pâte et de la croûte des fromages (**tableau 11**, chapitre 3 matériel et méthodes). L'un des principaux résultats obtenus a été l'absence de défauts sensoriels majeurs des Fourmes d'Ambert salées avec les deux types de sels de Ca testés. La perception salée n'a pas semblé avoir été modifiée de façon importante. En revanche, il y avait de grandes divergences entre les juges sur la perception de l'amertume. Ces éléments demanderont donc à être plus approfondis. Cependant, il est nécessaire de préciser que le jury ayant réalisé l'analyse sensorielle présentait un nombre de juges réduit (n=6), parmi lesquelles des personnes non entraînées. Les résultats obtenus demandaient donc à être confirmés à l'aide d'un panel qualifié.

¹ Pour rappel, le fromage modèle choisi subit une double étape de salage : le saumurage et le salage à sec par frottage.

Tableau 16. Extrait sec, composition en minéraux et anions organiques des Fourmes d'Ambert salées à sec avec différents mélanges de sels de Ca/NaCl (étude préliminaire)

Composition des fromages (mg/100 g poids frais)												
Eléments	FB	FS	CaLa23	CaLa38	CaLa53	CaLa72	CaCi27	CaCi45	CaCi62	CaCi89	NaCl 100	Contrôle
pH	4,0	4,1	6,8	6,7	6,6	6,9	6,3	6,4	6,2	6,2	6,6	6,3
ES (%)	50,7	52,7	55,2	53,2	53,3	55,1	54,3	54,2	53,5	55,3	53,8	55,5
P	268,4	410,6	377,3	352,3	279,0	252,1	307,4	349,4	350,2	385,0	300,3	388,1
K	109,7	110,2	125,5	119,0	102,0	89,1	96,9	117,7	117,4	109,8	100,8	112,6
Mg	23,6	22,3	24,2	25,3	22,3	15,9	18,9	25,4	22,6	23,6	19,2	24,0
Ca	496,4	503,3	496,5	459,3	364,1	332,4	400,4	439,8	456,6	457,2	387,8	485,4
Na	101,4	537,0	710,0	696,0	526,2	390,1	740,8	765,6	690,7	582,5	979,4	785,0
Lactate	1348,6	1358,2	571,4	616,9	704,3	702,7	500,2	586,7	536,4	522,7	514,6	603,1
Citrate	3,3	2,8	13,3	9,3	8,2	15,5	41,7	33,4	43,3	23,2	13,3	4,8
PRAL*	10,4	15,6	14,0	13,7	12,7	12,5	13,4	13,9	13,8	15,2	13,3	14,9

*, en mEq/100 g de poids frais

Abréviations utilisés : FB, fromage en blanc ; FS, fromage salé en saumure ; CaLa75, fromage obtenus par substitution partielle du sel (75%) par le lactate de calcium ; CaCi75, fromage obtenu par substitution partielle du sel (75%) par le citrate de calcium ; NaCl100, fromage obtenu par salage au sel fin ; Contrôle, fromage obtenu par salage au gros sel

NB : L'indice PRAL a été calculé de la façon suivante :

$$\text{PRAL (mEq/100 g)} = 0,49 \times \text{protéines (g/100 g)} + 0,037 \times \text{P (mg/100 g)} - 0,021 \times \text{K (mg/100 g)} - 0,026 \times \text{Mg (mg/100 g)} - 0,013 \times \text{Ca (mg/100 g)}$$

D'un **point de vue biochimique**, les teneurs en Na ont diminué dans le produit fini avec l'augmentation de la proportion de sels de Ca dans le mélange (**tableau 16**). Ceci était plus marqué avec la substitution au CaLa, puisque tous les fromages étaient caractérisés par une diminution d'au moins 25% de Na par rapport au NaCl100. Seuls les fromages CaLa53 et CaLa76 ont obtenu des teneurs en Na de 21% et 43% moins importantes que le Contrôle, respectivement. Les fromages CaCi27, CaCi62 et CaCi89 ont aussi été caractérisés par une diminution d'au moins 25% par rapport au NaCl100, mais seulement les CaCi62 et CaCi89 ont présenté une teneur en Na inférieure au contrôle. En effet, nous avons pu constater que la réduction de la granulométrie du NaCl nécessaire pour l'obtention d'un mélange homogène avec les sels de Ca semblait avoir entraîné une plus grande pénétration du Na dans le fromage (979,4 mg/100 g pour NaCl100 contre 785,0 mg/100 g pour le Contrôle), ce qui va à l'encontre de la modification souhaitée. Ce résultat est en contradiction avec les données de la littérature qui stipulent que la quantité de sel retenue au cours du salage à sec augmente avec la taille des cristaux (Ramet, 1985). En effet, dans notre étude nous avons noté que le sel fin adhérait mieux à la surface du fromage que le gros sel et se dissolvait plus rapidement pour former une couche de saumure qui enrobait le fromage (Guinee, 2004). A l'inverse, le gros sel nécessitait un temps plus long pour se dissoudre et certains cristaux tombaient pendant les manipulations manuelles des fromages (déplacement dans un autre atelier, piquage, rangement en salle d'affinage).

Les modifications des teneurs en Ca et P lors de l'ajout des sels de Ca étaient très différentes en fonction du type de sel. Lors d'une substitution au CaLa, plus la proportion de sels de Ca augmentait dans le mélange et moins les concentrations en Ca et en P dans le fromage étaient élevées (**tableau 16**). Nous avons émis l'hypothèse que ce résultat pouvait être dû à un phénomène comparable à celui rapporté dans le Camembert. Dans ce dernier, *G.candidum* et *P.camemberti* (*P. roqueforti* pour les pâtes persillées) métabolisent rapidement le lactate en CO₂ et O₂, désacidifiant ainsi la surface du fromage. La désacidification du fromage cause un gradient de pH du centre du fromage (pH ≈ 4,6) vers la croûte (pH ≈ 7). Comme le pH de la surface augmente, le phosphate de Ca précipite en couche sous forme de Ca₃(PO₄)₂, ce qui provoque la migration du phosphate de Ca, de façon irréversible, vers la croûte (Abraham et al., 2007; Le Graet and Brulé, 1988; Le Graet et al., 1983; McSweeney, 2004). Dans notre étude, la mise en place de ce gradient est sans doute accélérée par l'ajout de lactate en surface. La diminution de la teneur en Ca observée pourrait alors s'expliquer par l'élimination des croûtes lors de l'échantillonnage.

Ce résultat ne va pas dans le sens d'une amélioration nutritionnelle, puisque nous avons obtenu des produits plus pauvres en Ca. En revanche, les teneurs en Ca et en P de la Fourme d'Ambert semblaient légèrement augmenter avec l'ajout de CaCi en surface par rapport au NaCl100, sans atteindre pour autant des teneurs en Ca plus importantes que le Contrôle. Une des limites de cette étude préliminaire est que les proportions de substitutions ont été fixées à partir du poids humide des sels de Ca, ce qui ne correspond pas à des apports comparables en Ca.

Les teneurs en lactate des produits salés avec du CaLa ont été améliorées de 11% à 37% par rapport au NaCl100. Les fromages CaLa53 et CaLa72 ont enregistré des améliorations similaires de 14%, par rapport au Contrôle. Quant à la teneur en citrate de ces fromages, seul le CaLa76 présente une augmentation de 16% par rapport au NaCl100, ce qui correspond à une amélioration de 222% par rapport au Contrôle. Les teneurs en citrate des produits salés avec du CaCi ont augmenté de 74% à 225% par rapport au NaCl100 et de 384% à 805% par rapport au Contrôle. Les quantités en citrate sont tout de même restées faibles dans tous les produits, en particulier au regard des concentrations en citrate dans le lait cru (100 mg/100 g à l'étape 2). Aucun impact de la substitution au CaCi n'a été enregistré sur les teneurs en lactate, celles-ci restant inférieures au Contrôle.

Concernant l'évolution des indices PRAL, une légère diminution a été observée au niveau des produits salés avec du CaLa. Ainsi, une légère amélioration du PRAL de 0,6 à 0,8 mEq/100 g a été observée pour le CaLa53 et le CaLa72 par rapport au NaCl100 et de 2,2 à 2,4 mEq/100 g par rapport au Contrôle, ce qui représente une amélioration de 15 à 16%, par rapport au Contrôle. A l'inverse, pour les produits salés au CaCi, nous n'avons pu remarquer aucune amélioration du PRAL par rapport au NaCl100 (13,3 mEq/100 g), par contre elles sont toutes (sauf CaCi89) inférieures au Contrôle (14,9 mEq/100 g). La meilleure amélioration du PRAL (de 10%) a été enregistrée avec le niveau de substitution le plus bas (CaCi27). Le constat effectué ici est qu'il reste difficile de modifier cet indice.

L'étude préliminaire effectuée a laissé entrevoir un potentiel intéressant de l'utilisation des sels organiques de Ca lors du salage à sec de la Fourme d'Ambert, notamment pour substituer partiellement le NaCl. Suite à cette première approche, la faisabilité de la substitution ayant été validée, une étude plus large a été mise en place. Les principales mises au point méthodologiques ont été de conserver les deux produits salés au gros sel (Contrôle) et au sel fin (NaCl100) compte-tenu du rôle majeur joué par la granulométrie. Il a également été établi que les mélanges devaient être réalisés sur des sels

anhydres et devaient être formulés de façon à ce que l'apport en Na soit identique pour l'ensemble des mélanges de substitution testés. Enfin, il a semblé utile d'effectuer un échantillonnage distinct des croûtes et des pâtes de fromages pour tenter de comprendre les phénomènes de migration qui pourraient avoir lieu au cours de l'affinage.

Pour l'étude finale les deux types de sel de Ca ont été conservés. Nous avons ciblé une diminution de la teneur en Na de 25%, pour pouvoir appliquer au produit une éventuelle allégation nutritionnelle « réduit en sodium ». Une seule proportion de substitution a été testée. Cette proportion a été estimée à partir des résultats obtenus dans l'étude préliminaire.

4.3.3.2 Etude finale : principaux résultats et discussions

A cette étape nous nous sommes proposés de mieux caractériser la composition des fromages obtenus par une substitution à 75% du NaCl lors de l'étape de salage à sec, avec le CaLa et le CaCi anhydres, une approche qui n'est pas du tout présente dans la littérature à ce jour.

D'un point de vue biochimique, l'étude finale visait les 3 objectifs suivants :

- 1) Diminuer la teneur en Na d'au moins 25% (permettant l'obtention de l'allégation nutritionnelle « réduit en sodium ») par rapport au Contrôle ;
- 2) Augmenter les teneurs en Ca et en anions organiques (lactate, citrate) ;
- 3) Réduire le potentiel acidifiant de la Fourme d'Ambert.

4.3.3.2.1 Caractérisation biochimiques des produits

En ce qui concerne la composition globale des produits obtenus avec substitution partielle du NaCl par les sels organiques de Ca, les CaLa75 et CaCi75 ont présenté des teneurs en matière grasse légèrement plus hautes (30,4 et 31,1 g/100 g) que les NaCl100 et le Contrôle (29,5 et 29,8 g/100 g). Des variations de l'ES ont aussi été notées en fonction des fromages. CaCi75 était significativement différent, ayant un ES de 55,9 mg/100 g contre 53,8 mg/100 g (en moyenne) pour les trois autres fromages. A J₅₆, la teneur en protéines du CaCi75 était légèrement plus haute (22,3 g/100 g) que dans les autres fromages (environ 21 g/100 g), ce qui est en corrélation avec l'ES. Concernant la composition globale, le CaLa75 se rapproche davantage du Contrôle que le CaCi75.

Tableau 17. Teneurs et réductions en Na des pâtes des Fourmes d’Ambert salées avec différents sels (mélanges CaLa75, CaCi75, NaCl100, Contrôle) par rapport au Contrôle, à J₅₆

Mode de salage	J₂ (FB) mg/100 g	J₃ (FS) mg/100 g	J₅₆ mg/100 g	Na gagné par saumurage/FS, %	Diminution/Contrôle, %
CaLa75			502,4 ± 205,5	67,2	-19,2
CaCi75	45,3 ± 6,6	337,4 ± 100,3	616,0 ± 136,7	54,8	- 0,9
NaCl100			752,2 ± 156,6	44,9	+ 21,0
Contrôle			621,4 ± 206,2	54,3	/

Abréviations utilisés : FB, fromage en blanc ; FS, fromage salé en saumure ; CaLa75, fromage obtenu par substitution partielle du sel (75%) par le lactate de calcium ; CaCi75, fromage obtenu par substitution partielle du sel (75%) par le citrate de calcium ; NaCl100, fromage obtenu par salage au sel fin ; Contrôle, fromage obtenu par salage au gros sel.

Dans l'étude finale nous avons tenté de répondre à plusieurs questions:

4.3.3.2.2 La substitution de sel par du lactate et du citrate de Ca appliquée permet-elle de diminuer la teneur en Na ?

Le **tableau 17** présente les teneurs en Na dans les fromages. Dans l'étude finale, nous avons observé une augmentation de la quantité de Na (+21 %) dans NaCl100 par rapport au Contrôle à peu près équivalente à celle constatée dans l'étude préliminaire (+ 25%). Nous attribuons cette variation à la différence de granulométrie entre les deux sels utilisés. La substitution à 75% du sel sec par le citrate de Ca a induit une diminution de la teneur Na de seulement 1% par rapport au Contrôle. Il semble donc impossible d'atteindre notre premier objectif. Dans le cas de la substitution à 75% du sel sec avec du lactate de Ca, nous avons obtenu une réduction de 19,2% de la teneur en Na, par rapport au Contrôle. Ainsi, l'objectif fixé de réduire d'au moins 25% la teneur en Na, pour appliquer l'allégation nutritionnelle « réduit en sodium » est bien approché. Une façon d'atteindre la réduction de 25% serait de moduler l'étape de saumurage puisqu'il est important de préciser qu'à l'issue du salage en saumure, les fromages substitués contiennent déjà 76,2% du sel final pour CaLa75 et 69,6% pour CaCi75. Cet objectif semble donc tout à fait atteignable.

4.3.3.2.3 Comment expliquer l'évolution des teneurs en Ca dans le produit au cours de l'affinage ?

Les teneurs en Ca des fromages obtenus par substitution du NaCl par le lactate de Ca étaient de 255,0 mg/100 g dans la pâte (302,5 mg/100 g pour Contrôle) et de 827,6 mg/100 g dans la croûte (671,6 mg/100 g pour Contrôle), tandis que les fromages obtenus avec le citrate de Ca ont présenté des teneurs plus élevées dans la pâte (357,3 mg/100 g) et dans la croûte (1677,4 mg/100 g) (**figure 17b**).

Au cours de l'étude préliminaire, nous avons noté que plus la teneur en lactate de Ca augmentait dans le sel de mélange, moins la pâte du fromage contenait de Ca. Nous avons donc souhaité tester l'hypothèse d'une **migration du Ca** depuis la pâte vers la croûte du fromage sous l'effet du gradient de pH. Des prélèvements ont été effectués à différents temps d'affinage (J₇, J₁₁, J₁₉ et puis J₅₆), déterminés en fonction de la littérature (Abraham et al., 2007; Le Graet et al., 1983; Le Graet and Brule, 1993). La croûte et la pâte des produits ont été analysés séparément.

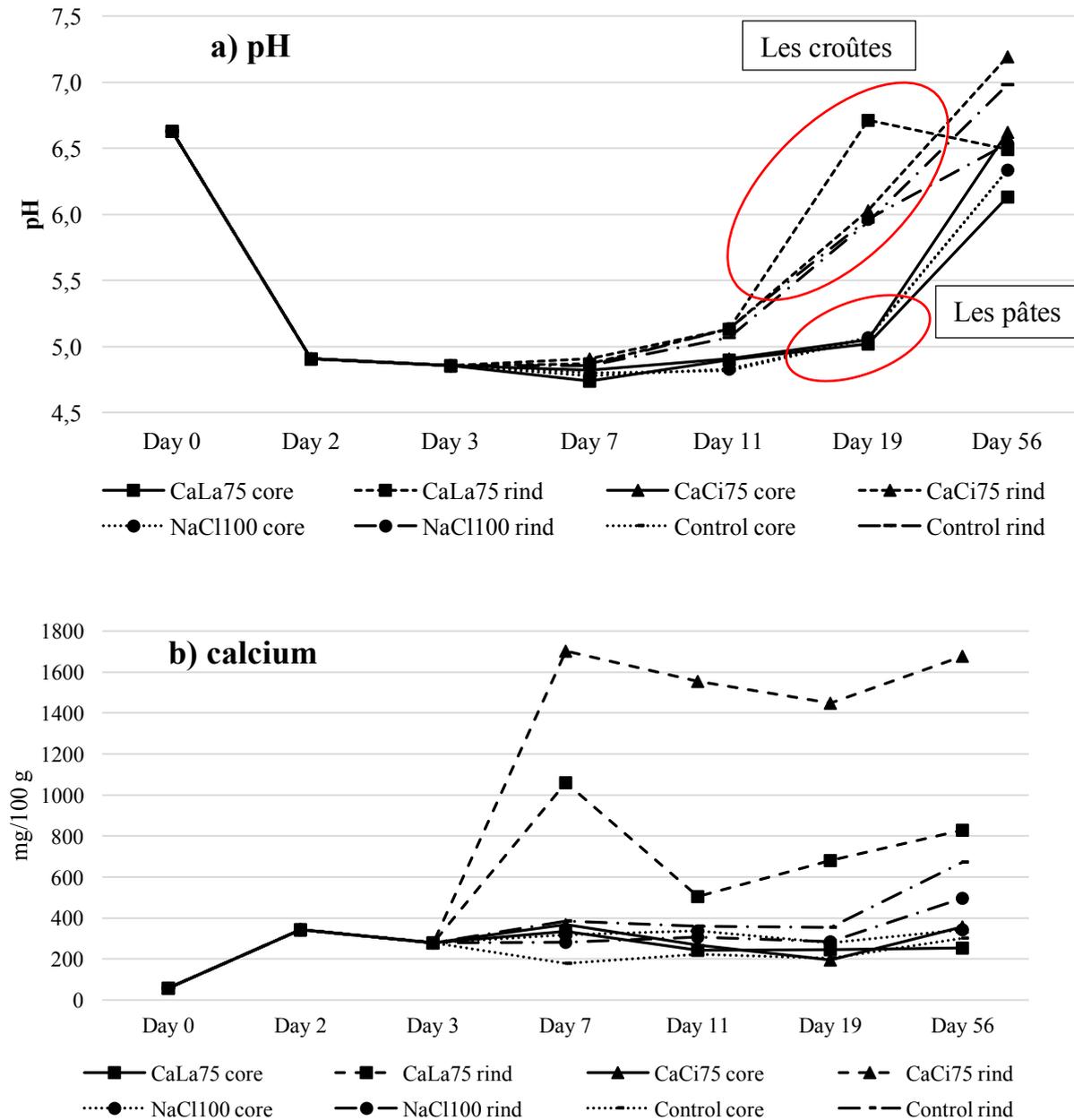


Figure 18. Evolution du pH (a) et de la teneur en Ca (b) dans la pâte et la croûte des 4 fromages étudiés

Abréviations utilisés : FB, fromage en blanc ; FS, fromage salé en saumure ; CaLa75, fromage obtenus par substitution partielle du sel (75%) par le lactate de calcium ; CaCi75, fromage obtenu par substitution partielle du sel (75%) par le citrate de calcium ; NaCl100, fromage obtenu par salage au sel fin ; Contrôle, fromage obtenu par salage au gros sel. Day 0 correspond au lait cru, day 2 FB, day 3 FS, day 7, 11, 19 et 56 les 4 fromages étudiés.

Comme nous l'avions supposé dans l'étude préliminaire, il existe bien un **gradient de pH** qui se forme entre la croûte et la pâte des fromages (**figure 18a**). Le gradient le plus important s'est formé entre J₁₁ et J₁₉, avec une différence de pH entre la pâte et la croûte de 0,8 unités pour le Contrôle, 0,9 unités pour NaCl100 et CaCi75. Le gradient le plus conséquent s'est formé sur le fromage CaLa75, avec 1,7 unités de différence, amplitude comparable à celle rapportée pour le Camembert (2,06 unités à 20 jours d'affinage d'après Le Graet et Brulé (1988) et 2,5 unités à J₁₅ d'après Abraham et al. (2007)). En fin d'affinage (J₅₆), le gradient diminue très légèrement pour le Contrôle et le CaCi75 avec 0,6 et 0,7 unités de différence, respectivement. Une diminution plus importante a été notée pour NaCl100 (0,2 unités de différence) et pour CaLa75, dont les différences de pH étaient de 0,4 unités, comparé à 0,7 dans le Camembert à J₃₅ (Abraham et al., 2007). Après J₁₉, l'écart de pH de la croûte et de la pâte du CaLa75 a diminué, une légère baisse du pH ayant été constatée dans la croûte et une hausse de près de 1,2 unités dans la pâte. Il est à noter que le comportement du fromage obtenu avec le citrate de Ca était très proche du NaCl100 et du Contrôle.

Le citrate de Ca qui était plus riche en Ca que le lactate de Ca, a apporté nettement plus de Ca à la croûte du fromage (**figure 18b**). Ainsi, la pâte du CaCi75 était plus riche en Ca d'environ 100 mg/100 g par rapport au CaLa75, soit légèrement plus que le Contrôle et autant que dans le NaCl100.

En ce qui concerne la migration du Ca sous l'effet du gradient de pH, nous avons pu observer que la teneur en Ca du CaLa75 augmentait à J₇ par rapport au FS, ce qui est logique du fait de l'ajout du lactate de Ca à J₃, puis redescendait après J₁₁, restant ensuite constante jusqu'en fin d'affinage (**figure 18b**). Cela peut sans doute s'expliquer par le fait que le Ca provenant du lactate de Ca, qui a pénétré dans le fromage au cours des premiers jours d'affinage (J₇), est probablement retourné de façon irréversible dans la croûte sous l'action du gradient de pH formé, comme cela a été démontré sur le Camembert (Le Graet et al., 1983; Le Graet and Brulé, 1988). Ainsi, la substitution au lactate de Ca a abouti à une teneur en Ca de 255,0 mg/100 g dans le fromage, ce qui représente 15,7% de Ca de moins par rapport au Contrôle (302,5 mg/100 g). Seule la substitution au citrate de Ca a permis d'améliorer significativement la teneur en Ca de la Fourme d'Ambert : une teneur en Ca de 357,3 mg/100 g a été rapportée dans le CaCi75, ce qui représente un enrichissement en Ca de 18,1%.

En conclusion, seule la substitution à 75% du sel sec par le citrate de Ca, a permis d'obtenir des produits plus riches en Ca par rapport au Contrôle.

Tableau 18. Valeurs et modulation (%) du PRAL (mEq/100 g) et des teneurs en lactate et en citrate (mg/100 g) des pâtes des Fourmes d'Ambert salées avec différents sels (mélanges CaLa75, CaCi75, NaCl100, Contrôle), par rapport au Contrôle, à J₅₆

Mode de salage	PRAL	%	Lactate	%	Citrate	%
CaLa75	49,5 ± 4,8	- 11,0	557,5 ± 53,4	+ 26,3	6,0 ± 2,4	- 9,1
CaCi75	56,2 ± 6,9	+ 1,1	379,2 ± 160,5	- 14,1	14,8 ± 5,1	+ 124,2
NaCl100	53,1 ± 5,0	- 4,5	436,8 ± 52,8	- 1,0	3,6 ± 1,3	- 45,5
Contrôle	55,6 ± 7,8	/	441,4 ± 80,6	/	6,6 ± 2,2	/

Abréviations utilisés : FB, fromage en blanc ; FS, fromage salé en saumure ; CaLa75, fromage obtenu par substitution partielle du sel (75%) par le lactate de calcium ; CaCi75, fromage obtenu par substitution partielle du sel (75%) par le citrate de calcium ; NaCl100, fromage obtenu par salage au sel fin ; Contrôle, fromage obtenu par salage au gros sel.

Tableau 19. Rapport Ca/P des produits obtenus à différentes étapes de la thèse

Étape	Saison	Date	Nb de lots	Composition Ca/P			
				Lait cru	FB	FS	FA J56
1.		Février 2013	3	117/61 = 1,9	-	-	396/305 = =1,3
2.	Automne-hiver	Octobre 2013	3	96/48 = 2,0	401/272 = 1,5	449/352 = 1,3	459/302 = 1,5
3. prélim.		Décembre 2014	1	-	496/268 = 1,9	503/411 = 1,2	485/388 = 1,3
3. finale	Printemps	Mai 2015	1	60/178 = 0,3	343/720 = 0,5	278/744 = 0,4	302/877 = 0,3

Abréviations utilisés : FB, fromage en blanc ; FS, fromage salé en saumure ; CaLa75, fromage obtenu par substitution partielle du sel (75%) par le lactate de calcium ; CaCi75, fromage obtenu par substitution partielle du sel (75%) par le citrate de calcium ; NaCl100, fromage obtenu par salage au sel fin ; Contrôle, fromage obtenu par salage au gros sel.

4.3.3.2.4 La substitution à 75% du sel sec par le lactate et le citrate de Ca permet-elle de limiter le potentiel acidifiant de la Fourme d'Ambert ?

Tout d'abord, les valeurs du PRAL des fromages de l'étude finale étaient très élevées avec des indices de 53,1 mE/100 g et 55,6 mEq/100 g pour les fromages Contrôle et NaCl100, respectivement (**tableau 18**). Ces résultats sont 2 fois supérieurs à ceux obtenus dans les étapes 1 et 2 de la thèse. Ceci est dû aux différences de teneurs en minéraux des laits transformés et plus spécifiquement à l'évolution du rapport Ca/P. Au cours des deux premières étapes de la thèse et de l'étude préliminaire de l'étape 3, des rapports Ca/P similaires (entre 1,2 et 2,0) ont été obtenus pour les laits, les FB, les FS et les Fourmes d'Ambert à J₅₆ (**tableau 19**). Les produits fabriqués au cours de ces différentes phases l'ont été durant les saisons automne-hiver, tandis que le lait utilisé lors de l'étape 3 finale est un lait de printemps très déséquilibré, trois fois plus riche en P et plus pauvre en Ca que les laits précédents². La littérature stipule effectivement que les teneurs en Ca et en P du lait de vache subissent des variations fortes à la mise à l'herbe au printemps (Guéguen, 1997). Notz (1997) a rapporté que le lait de printemps était plus riche en P et plus pauvre en Ca, ce qui induit un rapport Ca/P faible. Les résultats que nous avons obtenus sont cette fois cohérents avec les données Ciquel 2012 (qui nous semblaient initialement aberrantes en termes de composition en P pour la Fourme d'Ambert).

La substitution à 75% du sel sec par du lactate de Ca a induit un PRAL de $49,5 \pm 4,8$ mEq/100 g, ce qui représente une diminution de 11% par rapport au PRAL du fromage contrôle ($55,6 \pm 7,8$ mEq/100 g) (**tableau 18**). Par contre, comme pour l'étude préliminaire, les fromages salés au citrate de Ca ($56,2 \pm 6,9$ mEq/100 g) n'ont pas présenté de réduction du PRAL, celui-ci a même augmenté de 1% environ par rapport au Contrôle.

En ce qui concerne la modulation de la teneur en anions organiques, la teneur en lactate du CaLa75 (557,5 mg/100 g) a été améliorée de 26,3% par rapport au Contrôle (441,4 mg/100 g) (**tableau 18**). La teneur en citrate du CaCi75 (14,8 mg/100 g) a été améliorée d'environ 124% par rapport au Contrôle, mais reste néanmoins faible comparée à la teneur en lactate.

² La rétrospective de l'étude finale montre que le lait de départ a été produit fin avril ce qui correspond à la période de transition au pâturage. En région de montagne (Auvergne) la mise à l'herbe (qui est fonction des conditions climatiques, du cumul de températures depuis le 1^{er} février, de la portance des sols, de la hauteur de l'herbe etc.) des vaches laitières se fait à partir de mi-avril et consiste en une transition d'environ 3 semaines entre l'alimentation d'hiver et le pâturage proprement dit.



CaLa75



CaCi75



Contrôle



NaCl100

Figure 19. Les fromages obtenus à l'étude finale, à plus de 56 jours d'affinage

Abréviations utilisés : FB, fromage en blanc ; FS, fromage salé en saumure ; CaLa75, fromage obtenus par substitution partielle du sel (75%) par le lactate de calcium ; CaCi75, fromage obtenu par substitution partielle du sel (75%) par le citrate de calcium ; NaCl100, fromage obtenu par salage au sel fin ; Contrôle, fromage obtenu par salage au gros sel.

Les résultats obtenus à cette étape confirment l'évolution de la teneur en lactate observée dans l'étape 2 de la thèse. Tous les fromages présentaient des teneurs plus importantes en lactate à J₁₉ (1775,9 mg/100 g pour CaLa75, 1304,0 mg/100 g pour CaCi75 et 1174,4 mg/100 g pour Contrôle), par rapport à J₅₆, ce qui représente une perte de 69, 71 et 62%, respectivement. On suppose, donc, qu'une Fourme d'Ambert consommée à un stade moins avancé (J₂₈) présenterait un intérêt nutritionnel plus intéressant. La teneur en citrate n'évolue pas de façon significative pendant l'affinage, ce qui est en accord avec notre deuxième étude.

4.3.3.2.5 Caractérisation sensorielle des produits

L'objectif du test sensoriel était d'effectuer une caractérisation sensorielle des produits obtenus par substitution au lactate et au citrate de Ca et de comparer leurs qualités sensorielles avec le Contrôle.

- ***Validation des performances du panel.***

L'**analyse sensorielle** a été réalisée au laboratoire d'analyse sensorielle de VetAgro Sup avec un panel qualifié (10 sujets). Des séances d'entraînement du panel ont été nécessaires pour valider les performances du panel. Suite à ces tests, le jury a été jugé performant et consensuel et a présenté une bonne capacité à discriminer et une bonne répétabilité.

- ***Caractérisation sensorielle des échantillons***

Les fromages obtenus à l'étude finale sont présentés sur la **figure 19**. De la même façon que lors de l'étude préliminaire, des fromages présentant des croûtes sèches et non poisseuses ont été obtenus quel que soit le mode de salage appliqué. Tous les traitements ont permis le développement d'un persillage uniforme, comparable au fromage Contrôle.

Globalement, les fromages salés avec les sels de calcium, CaLa et CaCi, se sont distingués sur quelques descripteurs de croûte et de pâte (résultats article 3). Ainsi, les fromages obtenus par substitution au lactate de Ca présentaient une couleur de **croûte** (5,5) plus grise que celle des fabrications CaCi75 (4,2) et du Contrôle (4,6), ce qui peut être en lien avec l'activité microbienne plus accrue à la surface de ces fromages. En revanche, aucune différence significative n'a été observée sur la pâte, sur ce même critère. Les deux fromages, CaLa75 et CaCi75 se sont démarqués par des croûtes moins collantes (1,2 et 1,9) que celles des fromages salés au NaCl seulement (2,8). En bouche, leurs croûtes ont été perçues plus sableuses (6,0) par rapport au NaCl100 et au Contrôle (4,2), ce qui reflète sans doute l'accumulation des sels de Ca à la surface du fromage suite au salage par frottage.

Visuellement, les **pâtes** des fromages obtenus par substitution au citrate de Ca se sont démarquées par un persillage plus important en quantité (6,9) et réparti de manière plus homogène (7,0) que CaLa75 (6,3 et 6,0, respectivement). En revanche, il n'y avait pas de différences significatives avec les fabrications standards sur ces mêmes critères. La fabrication CaCi75 présentait une texture au doigt (4,4) et en bouche (3,6) plus ferme par rapport à CaLa75 (3,6 et 3,0). Aucune différence significative n'a été remarquée sur l'odeur (ammoniac, bleu et odeur globale) des 4 fromages. En bouche, le fromage salé uniquement au sel fin (NaCl100), présentait une saveur salée plus intense (7,5) par rapport aux CaLa75 (6,7), CaCi75 (6,9) et Contrôle (6,9). Cela veut dire que les fromages substitués par des sels de Ca présentent une perception salée équivalente au Contrôle. Il est également intéressant de noter que globalement la croûte présentait une saveur salée moins intense que celle perçue dans la pâte. Concernant l'arôme, CaLa75 présente un arôme de bleu moins intense (3,9) que le Contrôle (4,6) et moins piquant (2,4) que les fabrications standards NaCl100 et Contrôle (3,3). Il est également intéressant de souligner, que malgré une différence non significative avec les autres fabrications, la fabrication CaLa75 présentait une amertume plus intense (5,8) par rapport aux trois autres fromages (5,4 en moyenne).

4.3.4 Conclusions et perspectives

Cette étude originale a permis de valider l'intérêt d'utiliser le citrate et le lactate de Ca comme substituts partiels du NaCl lors du salage à sec des fromages. La substitution de l'ordre de 75% par rapport au sel sec par le lactate de Ca a permis de diminuer la teneur en Na de 19%, de réduire le PRAL de 11% et d'augmenter la teneur en lactate de 26% par rapport au Contrôle. En revanche, la teneur en Ca de la pâte a été réduite de près de 15%. La substitution de 75% du NaCl sec avec du citrate de Ca a permis d'augmenter la teneur en Ca de 18%, celle en citrate de 124% par rapport au Contrôle. Cependant, la diminution de la teneur en Na a été négligeable et l'impact sur l'indice PRAL faible.

Sur le plan sensoriel, les résultats obtenus ont montré qu'une réduction de 75% du NaCl substitués par le lactate de Ca et citrate de Ca dans les fromages à pâte persillée serait possible sans modifier l'intensité de la saveur salée et amère. De plus, ces substitutions ont permis d'obtenir des fromages d'un aspect, d'une texture, d'une saveur et odeur proches des fromages contrôles. Donc, l'usage de sels alcalinisants tels que le citrate de Ca et le lactate de Ca pourrait constituer une alternative nutritionnelle plus pertinente d'un point de vue nutritionnel que celui des sels acidifiants comme le KCl, le CaCl₂ et le MgCl₂ actuellement en développement.

Les résultats obtenus ouvrent de nouvelles perspectives d'amélioration nutritionnelle des fromages et peuvent être utiles aux producteurs pour développer des innovations intéressantes. En effet, la diminution de la teneur en Na de plus de 25% dans le produit fini semble tout à fait atteignable en envisageant une optimisation de l'étape de saumurage, qui apporte aujourd'hui à elle seule de l'ordre de 70% du sel du fromage. En termes de perspectives, l'utilisation de ces 2 sels (lactate et citrate de Ca) pour le salage dans la masse d'autres types de fromage permettrait probablement d'obtenir des résultats plus intéressants d'un point de vue nutritionnel. En effet, dans le cas du salage en surface, le passage des sels dans la pâte est très lent et quasi-imperceptible. Le salage dans la masse pourrait probablement éviter la métabolisation rapide des anions organiques alcalinisants par la flore de surface ainsi que la perte des sels avec l'élimination de la croûte au moment de la consommation.

L'utilisation du lactate de Ca comme sel de substitution, a induit une réduction de 11% du PRAL et de 19% de la teneur en Na, ainsi que l'augmentation de 26% de la teneur en lactate, par rapport au fromage contrôle. Cette étude montre ainsi qu'il est possible de diminuer le potentiel acidifiant de la Fourme d'Ambert tout en réduisant la teneur en Na. Par ailleurs, l'usage du citrate de Ca serait pertinente pour enrichir les fromages en Ca. Cette étude a également permis d'obtenir des résultats intéressants et de mettre en évidence l'importance du rapport Ca/P dans le lait de départ, qui s'avère déséquilibré au moment de mise à l'herbe des troupeaux. Ce déséquilibre induit une forte augmentation du PRAL, ce qui va à l'encontre de la modification souhaitée pour réduire le potentiel acidifiant de la Fourme d'Ambert. Les valeurs du PRAL (pour un seul lot étudié) sont sujettes à des variations situées entre 9,4% et 14%. Il s'agit de variations moins importantes que celles obtenues aux autres étapes de la thèse (29%), où trois lots de fabrications avaient été étudiés.

Les résultats obtenus à cette étape ont fait l'objet d'un troisième article « **Calcium lactate and calcium citrate as attractive compounds to substitute NaCl in blue-veined cheese** » qui n'a pas encore été soumis pour publication à l'heure actuelle compte-tenu de la convention de partenariat établie avec l'entreprise partenaire.

4.3.5 Article 3. « Calcium lactate and calcium citrate as attractive compounds to substitute NaCl in blue-veined cheese »

Ecaterina Gore; Julie Mardon; Cécile Bord; Annick Lebecque

Clermont Université, VetAgro Sup, UPSP n°2011-03-100, UR CALITYSS, 89 avenue de l'Europe, F-63370 Lempdes, France

Original Research Article

Calcium lactate and calcium citrate as attractive compounds to substitute NaCl in blue-veined cheese

Ecaterina Gore; Julie Mardon ; Cécile Bord; Annick Lebecque*

Clermont University, VetAgro Sup, UPSP n°2011-03-100, CALITYSS, 89 avenue Europe, F-63370 Lempdes, France

ARTICLE INFO

Running head: Improvement of nutritional quality of cheese

Keywords:

Calcium salts

Salt substitution

Cheese

Acid-forming potential

Potential Renal Acid Load (PRAL)

Sensory properties

Nutritional quality improvement

SUMMARY

Besides the high sodium content, cheeses are suspected to induce an acid load to the body, associated with deleterious effects for consumers' health. Our objective was to improve the quality of cheeses by optimizing its acid-forming potential and decreasing its Na content, without altering acceptability and sensory properties. Blue-veined cheeses were produced in industrial conditions, using brine salting and then a 4:1 (w/w) mixture of calcium lactate/NaCl and calcium citrate/NaCl was applied during dry salting. Salt-substituted cheeses were ripened during 56 days. Any major appearance defect wasn't observed during ripening. The Ca-lactate substitution improved the lactate content by 26% and the Potential Renal Acid Load (PRAL) index by 11%. The Ca-citrate substitution improved the Ca and citrate contents by 18 and 124%, respectively. The sensory profiles showed non-significant ($P > 0.05$) differences in bitter and salty perceptions of salt-substituted cheeses with Ca-lactate and Ca-citrate compared to Control cheeses, but contained about 22 and 15% lower salt, respectively. The use of organic Ca salts could be considered an alternative way to reduce the sodium content and to improve nutritional quality of cheeses while maintaining the sensory quality of the products. The alkalizing organic salts could replace the acidifying salts KCl or CaCl₂, currently used in salt replacement and strongly recommended not to use by renal insufficient consumers. This method deserve to be considered by the cheese-making producers to improve the nutritional quality of cheese.

INTRODUCTION

Cheese is consumed in large quantities worldwide, in direct consumption as table cheese and increasingly as an ingredient in gastronomical culinary preparations (Bord et al., 2015; Cruz et al., 2011). Besides its interesting nutritional properties (particularly as a strong contributor to calcium and protein supplies), cheese has been identified as one of the main food

vectors of sodium and salt. Actually, 40 g of cheese, containing 2% of salt, accounts for 16% of the recommended daily sodium and salt intakes (WHO, 2013). Scientific data suggest that the effect of sodium excess on hypertension development constitutes an important public health issue, since hypertension is a recognized risk factor of cardiovascular diseases (Blaustein et al., 2012; He et al., 2011). In addition, a disregarded nutritional feature of cheese is its high

* Corresponding author: Tel: (+3) 347-398-1339; fax: (+3) 347-398-1390
Email address: julie.mardon@vetagro-sup.fr

acid-forming potential, as shown by its high mean PRAL (Potential Renal Acid Load) index² (Gore et al., 2016). Indeed, its consumption and metabolism lead to the production of fixed acids that induce an acid load to the body (Remer and Manz, 1995). In the long-term, this state might induce deleterious effects on renal functions (Frassetto et al., 2008, 2007) as well as on bone and muscle tissues (Frassetto et al., 2008; Mardon et al., 2008; Pedone et al., 2010). As previously described, Na and Cl contents in cheese are strong contributors to cheese acid-forming potential (Gore et al., 2016). Moreover, a high NaCl intake is recognized as an exacerbating factor of metabolic acidosis (Frassetto et al., 2008, 2007b, Demigne et al., 2013).

In the current situation, public health organizations recommendation is to gradually decrease salt (sodium) intake of the population along the next years (WHO, 2013). Thus, one relevant approach with this goal is to reduce the salt content of foodstuffs widely contributing to salt intakes, including cheeses. In this frame, the main issue remains to decrease the NaCl content of cheese without altering its sensory properties and its acceptability by consumers.

The alternative could be the partial replacement of NaCl by another compound that enhance salty perception, without altering acceptability of the products. Salt substitution is an interesting practice widely experienced to contribute to the decrease of consumers' salt intake (Cruz et al., 2011; Grummer et al., 2013, 2012; Lu and McMahon, 2015). A lot of works investigating NaCl substitution have explored the use of CaCl₂, KCl or MgCl₂ during salting process. Descriptive sensory analysis demonstrated that both treatments NaCl + CaCl₂, with 45% Na reduction and NaCl + MgCl₂, with 53% Na reduction, produced considerable off-flavors (bitter, metallic and soapy) in the Cheddar-type cheese (Grummer et al., 2012). The use of KCl as a salt substitute showed not significant bitterness ratings at 54% and 60% Na reduction in Cheddar cheeses (Grummer et al., 2013, 2012). Kefalograviera hard cheeses were also obtained with 3:1 and 1:1 NaCl:KCl mixtures with no adverse effect on the quality of cheeses (Katsiari and Voutsinas, 1998). Conversely, after testing a salt substitution by KCl at 25, 50 and 75% on Minas cheeses, only the substitution of 25% were acceptable to consumers

because of the bitter-metallic aftertaste the KCl salt provides (Gomes et al., 2011).

Decreasing NaCl content in cheese would also contribute to reduce its acid-forming potential since salting process has been identified as one of the main key steps responsible for this characteristic (Gore et al., unpublished data). Nevertheless, CaCl₂, KCl and MgCl₂ are all acid-forming compounds (Remer, 2001). Thus the use of alternative compounds, targeting the decrease in both NaCl content and the acid-forming potential of cheese would be of great interest on a nutritional point of view.

In the present study, we propose to investigate the use of calcium organic salts, such as Ca-lactate and Ca-citrate as partial substitutes of salt. Their ingestion and metabolism lead to the production of bicarbonate, a strong alkalinizing component in the body (Oh, 2000; Poupin et al., 2012). The addition of calcium salt would also participate in counterbalancing the loss of alkaline minerals (Ca, Na, K) in the whey as draining occurs during cheese manufacture (Gore et al., unpublished). Up to date, Ca-lactate and Ca-citrate salts are used for Ca enrichment (Cáceres et al., 2006; Selgas et al., 2009) and partial salt replacement in meat products (Riera et al., 1996). Organic salts such as K-lactate were reported to effectively inhibit the pathogenic flora and to enhance the salty perception in meat products, when 30% substitution was applied (Astruc et al., 2008; Choi et al., 2014). Ca-lactate and Ca-citrate salts are used as Ca enrichment in milk and yogurt (Lacroix et al., 2013; Singh et al., 2007; Singh and Muthukumarappan, 2008), and to our knowledge, were never used in cheese.

The objective of this work was to investigate the relevance of using calcium citrate and calcium lactate as partial substitutes of salt to reduce both Na content and acid-forming potential of cheese. Nutritional and sensory implications of such substitutions were investigated in a soft blue-veined cheese.

MATERIALS AND METHODS

Cheese Manufacture

Raw cow milk was pasteurized (72°C, 15 sec) and standardized in fat content (3.8%), then cooled to 13°C. CaCl₂ (C = 520 g/L, V = 15 mL/100 L) and ferments

² The estimation of the acid-forming potential of food products is based on the calculation of the PRAL index, which takes into account the protein (the amount of sulfate produced from their metabolism) and mineral composition - their intestinal absorption, valence or ionic charges (Remer and Manz, 1995) :

$$\text{PRAL (mEq/100 g edible portion)} = 0.49 \times \text{protein (g/100 g)} + 0.037 \times \text{P (mg/100 g)} + 0.027 \times \text{Cl (mg/100 g)} - 0.041 \times \text{Na (mg/100 g)} - 0.021 \times \text{K (mg/100 g)} - 0.026 \times \text{Mg (mg/100 g)} - 0.013 \times \text{Ca (mg/100 g)}$$

cocktail (starter culture and *Penicillium roqueforti*, 0.6 L/100L) were added for pre-maturation of milk for about 12 hours. The milk was then heated to 32°C and moved to vats. Rennet extract (chymosine + pepsin, ≥ 160 IMCU/mL, V = 30 mL/100L) was added. After 30 min of incubation, the coagulum was cut into cubes (1 x 2 x 2 cm) by an automated cutting grid and a stirring process for 1h was applied to form grains of curd. A draining conveyor was used before moulding not to damage the grain structure. The syneresis was carried out in moulds, with periodical turnarounds, at a temperature between 19 and 20°C. The curds were salted manually by rubbing dry salt on the surface and then pricked to allow the growth of *Penicillium*. Ripening was carried out at 8°C, 98% RH until 28th day and then at 0°C until the 56th day.

Salting treatment

Six cheese curds per salt treatment were chosen randomly from one single batch of the industrial cheese-making process and submitted to one of the four different salting treatments (Table 1). One salt treatment consisted in the standard industrial dry salting process, using dry coarse salt (0.9 - 3.15 mm) (Control). As the used Ca salts are commercially available in powdered form (Sigma Aldrich, Germany) homogenous granulometry salt mixes were formulated with fine-grain NaCl salt (0 - 0.22 mm) and powdered anhydrous Ca-lactate (CaLa75) and Ca-citrate (CaCi75) to obtain a 75% substitution of dry NaCl salt with a nhydrous Ca salts.

Sampling

Samples of raw milk (1 L), unsalted drained curd (3 curds, 2.3 kg each) and brine salted curds (3 curds, 2.3 kg each) were taken, immediately aliquoted and frozen (- 20 °C). After dry salting, one cheese (2.2 kg) per treatment was sampled during ripening at 7, 11, 19

days and three cheeses per treatment at 56 days.

Compositional analysis was carried out on the rind of the cheeses and the cheese core, at each sampling date. The rind and the cheese core were aliquoted and frozen separately. At 56 days the rind from the three cheeses per treatment was pooled. Frozen solid samples were ground just before analysis, to obtain a representative homogenized product and stored at 4 °C until analysis.

Sensory analysis was carried out on end products after 56 days of ripening. For this purpose, 1.5 kg of cheese core per treatment was immediately stored at 0 °C. The remaining 500 g of each cheese was kept for biochemical analysis.

Cheese composition

Samples were analyzed in triplicate for pH (FD V04-035:2009), dry matter (NF EN ISO 5534:2004), fat (NF V04-210:2000), ash (NF V04-208:1989), total nitrogen (total N) and protein (ISO 8968-1:2013), minerals (Ca, K, Na, Mg, P) (ISO 8070:2007), chloride (NF EN ISO 5943:2007) citrate and lactate contents as described before (Gore et al., 2016).

Sensory analysis

Before descriptive analysis, the trained panel participated to three training sessions. Different tests (detection, triangle and ranking tests) were performed to train the panel to the recognition of different stimuli. In addition, the training sessions allowed to select attributes the most relevant to describe the blue-veined cheeses and to establish a tasting protocol (discussion to clarify attributes concepts: definition and references). After using statistical treatments and discussion with the panel, non-relevant attributes were deleted and 29 attributes were selected including: 11 attributes describing the rind of cheese and 18 for the cheese core (Table 2).

The quantitative descriptive analysis was performed on the cheeses (cheese core and rind) to study appearance, texture, taste, odor and aroma perceptions compared to the Control. A panel of ten trained assessors, having a sensory experience in the description analysis of blue-veined cheeses participated in the study. The subjects were recruited according to their motivation and their availability. Cheese slice samples were cut into portion of 30 grams and the removed rind were placed into plastic plates, coded with three-digit random numbers. Samples were tempered at 20 ± 1 °C and were served at this temperature, presented in a monadic way and distributed according to a Latin Square design. After

Table 1. Composition of salt mixes used for dry salting of blue-veined cheese (for 100 g dry weight)

Treatment	Ca salt/NaCl, %/% dw	Quantity (g/100 g dry weight)				
		Na	Cl	Ca	Lactate	Citrate
Control	0/100	39.3	60.7	-	-	-
NaCl100	0/100	39.3	60.7	-	-	-
CaLa75	75/25	9.8	15.2	13.7	61.3	-
CaCi75	75/25	9.8	15.2	18	-	57

Abbreviations used: dw, dry weight; CaLa75, cheese salted with a mix of Ca-lactate (75%) and NaCl (25%); CaCi75, cheese salted with a mix of Ca-citrate (75%) and NaCl (25%); NaCl100, cheese salted with fine-grain NaCl salt (100%); Control, cheese salted with coarse NaCl salt (100%).

Table 2. Sensory attributes and definition for the sensory profile of cheeses

Sensory properties	Attributes	Definition and references
Rind (texture, odour, aroma, taste)	Colour-R	Sensory attribute describing the prevailing colour of the rind
	Heterogeneity-R	Sensory attribute describing the presence of various and discriminatory colours in rind
	Sticky-R	Mechanical textural attribute related to the rind which adhere on finger, with a humidity feeling
	Rough-R	Mechanical textural attribute related to the feeling of roughness with fingers
	Global-Odour-R	Global odour intensity of rind
	Ammonia-Aroma-R	Aromatics associated with cheese like Brie or Camembert
	Mouldy-Aroma-R	Aromatics associated with mould growth
Cheese core appearance, texture	Salty-R	Basic taste which is illustrated by sodium chloride (NaCl 1-3 g/L in mineral water)
	Sandy-R	Sensory attribute describing the extent to which the rind structure breaks up in mouth
	Colour-C	Sensory attribute describing the prevailing colour of the cheese
	Moisture-C	Perceived moisture content of the cheese
	Blue-veined-quantity-C	Sensory attribute describing the presence of blue mould on whole cheese in section
	Blue-veined-distribution-C	Sensory attribute describing the homogenous distribution of blue mould on the cheese in section
	Firmness-C	Mechanical textural attribute related to the force required to achieve a given deformation with fingers
Cheese core odour	Overall-Odour-C	Overall odour intensity of cheese
	Ammonia-C	Odour associated with cheese like Brie or Camembert
	Blue-C	Odour associated with mould like <i>Penicillium</i>
Cheese core taste	Salty-C	Basic taste which is illustrated by sodium chloride (NaCl 1-3 g/L in mineral water)
	Sour-C	Basic taste which is illustrated by lactic acid (Lactic solutions 0.84 - 1.23 g/L in mineral water)
Cheese core aroma	Bitter-C	Basic taste which is illustrated by leucine (Leucine solution 1.8-5 g/L in mineral water)
	Pungent-C	Describes a product causing a sharp sensation of the buccal cavity
	Overall -Aroma-C	Overall aroma intensity of cheese
Cheese core texture in-mouth	Ammonia-C	Aroma associated with cheese like Brie or Camembert
	Blue-C	Aroma associated with mould like <i>Penicillium</i>
	Persistence-C	Aroma attribute related to the persistence of aroma in mouth after swallowing
	Firmness-C	Mechanical textural attribute related to the force required to achieve a given deformation of the cheese by teeth penetration
	Smooth-C	Term relating smooth velvet fullness in mouth
	Rough-C	Rough texture describing the presence of fine particles in mouth
	Sticky-C	Mechanical textural attribute related to the rind which adhere on oral mucosa and teeth

each serving, assessors provided with water and unsalted crackers were used for palate cleansing. Sensory evaluation was conducted in neutral environment: an air-conditioned room, under white light, in separate booths. Firstly they evaluated the appearance of one half of cheese, and then the cheese slice samples and the rind in the mouth using 10 cm linear scale, with «0» being very weak and «10» very intense to record the intensity of the sensory attributes. Each cheese was evaluated in triplicate by each assessor. Scores were directly recorded on a computer system using Tastel® software (version 2013, ABT Informatique, Rouvroy-sur-Marne, France).

Statistical Analysis

Statistical analysis of biochemical data was performed using XL STAT software package (Addinsoft, Paris, France). Results are reported as

means ± standard deviation. One way ANOVA test and post-hoc multiple comparison (Tukey's test) were adopted to compare the studied elements during the cheese-making process. Differences between mean values were considered significant at $P < 0.05$. Regarding the sensory profile or evaluation tests, a two-way mixed-model ANOVA (product and assessor) with interaction was performed, with products being the fixed effect and the assessors the random effect, at 95% of confidence level. Tukey's test was used for multiple comparison tests on the product means, for each attribute, when means were considered different ($P < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Cheeses were described as the food group reaching the highest PRAL values (Remer and Manz, 1995) and one of the main food vectors of Na intake (Boisard et

al., 2013; Chekri et al., 2012), hence contributing to the occurrence of deleterious effects for consumers' health (Frassetto et al., 2007). This work aimed to investigate the relevance of using alkalinizing Ca salts as partial substitutes of salt to reduce both Na content and acid-forming potential of a soft blue-veined cheese.

Effect of organic calcium salts substitution on the composition of cheeses

The mean values for pH, dry matter, ash, total N, fat, citrate and lactate contents of milk, unsalted drained curd, brine salted curd and blue-veined cheeses at 56 days of ripening are given in table 3. Dry matter content was higher in CaCi75 compared with three other treatments. Correspondingly, CaCi75 cheeses were higher in fat and total N because of less dilution from the moisture. CaLa75 cheeses showed comparable dry matter, total N and fat contents with Control and blue-veined cheeses from other studies reported in the literature (Bord et al., 2015; Gore et al., 2016; Jacquot et al., 2015). In all cheeses, a significantly higher ash content was reported in the rind than in the core. As described by Morris et al. (1985), a total mineral composition equilibrium between the rind and the cheese is not reached at day 56 of ripening. The ash content of the core of CaCi75, NaCl100 and Control cheeses was similar. CaLa75 showed a lower ash content than others. In the rind, CaLa75, NaCl100 and Control had similar ash content but lower than in the CaCi75 cheese.

In a preliminary study in which we tested 4 different dry-salt substitutions (from 25 to 100%), we observed that the increase of Ca-lactate in the salt mix induced a decrease of Ca and lactate contents in cheese core (data not shown). As we assumed in the

preliminary study (data not shown), a pH gradient was formed between the rind and the core of cheeses (Table 3; Figure 1a). The latter was observed at day 7 (0.1 - 0.2 pH units difference) and reached 0.2 - 0.3 pH units in 4 days. The largest pH gradient was formed between day 11 and 19, with a 0.8 pH difference for Control, 0.9 units for NaCl100 and CaCi75. As supposed, the most significant gradient was observed on CaLa75 cheese with 1.7 pH units, which is comparable with that of Camembert at 20 days of ripening (2.1 pH units) (Le Graet and Brulé, 1988) and 2.5 at day 15 (Abraham et al., 2007). It is also important to note that after day 19, the pH of CaLa75 rind and cheese core tended to get closer, with a slight decrease in the rind and an increase of 1.2 pH units in cheese core. At day 56, the gradient slightly decreased for Control and CaCi75 with 0.7 and 0.6 pH units, respectively. A higher decrease was observed for NaCl100 (0.2 pH units) and CaLa75, with 0.4 pH units compared to 0.7 in Camembert at day 35 (Abraham et al., 2007). We supposed that the phenomenon is probably comparable to that reported in Camembert cheese (McSweeney and Fox, 2004). *G.candidum* and *P.camemberti* (*P.roqueforti* for blue-veined cheese) rapidly metabolize lactate in CO₂ and O₂, thus deacidifying the cheese surface. Deacidification causes a pH gradient to develop from the center of cheese to its surface and lactate diffuses from the center towards the surface. As surface pH increases, the Ca-phosphate precipitates as a layer of Ca₃(PO₄)₂ which causes the migration of the Ca-phosphate, irreversibly, to the rind (Abraham et al., 2007; Le Graet et al., 1983; Le Graet and Brule, 1993; McSweeney and Fox, 2004). The establishment of this gradient in our preliminary study was probably accelerated by the addition of Ca-lactate on surface. As

Table 3. Composition of the raw milk, drained curds (DC), brine salted curds (BSC) and the cheeses (cheese core and rind) at 56 days of ripening, expressed for 100 g of fresh weight

Product	Elements ¹						
	pH	DM (g/100 g)	Ash (g/100 g)	Total N (g/100 g)	Fat (g/100 g)	Lactate (mg/100 g)	Citrate (mg/100 g)
Raw milk	6.6 ± 0.0 ^b	12.4 ± 0.1 ^c	0.7 ± 0.0 ^b	0.52 ± 0.0 ^c	4.1 ± 0.0 ^f	39.3 ± 8.9 ^c	89.6 ± 3.7 ^a
DC	4.9 ± 0.0 ^c	49.9 ± 0.6 ^d	1.9 ± 0.0 ^e	3.10 ± 0.1 ^d	27.2 ± 0.6 ^c	1264.1 ± 61.3 ^a	2.8 ± 0.4 ^{de}
BSC	4.9 ± 0.0 ^c	53.4 ± 0.7 ^c	3.1 ± 0.1 ^f	3.23 ± 0.1 ^c	28.5 ± 0.5 ^d	1373.6 ± 111.3 ^a	1.1 ± 0.2 ^e
CaLa75 core	6.1 ± 0.0 ^d	53.6 ± 0.5 ^{bc}	3.6 ± 0.1 ^e	3.33 ± 0.1 ^b	30.4 ± 0.6 ^{ab}	557.5 ± 53.4 ^{bc}	6.0 ± 2.4 ^d
CaLa75 rind	6.5 ± 0.0 ^{bc}	ND	5.7 ± 0.0 ^b	ND	ND	654.7 ± 8.8 ^b	5.3 ± 0.7 ^{de}
CaCi75 core	6.6 ± 0.3 ^b	55.9 ± 0.3 ^a	3.9 ± 0.2 ^d	3.50 ± 0.1 ^a	31.1 ± 0.6 ^a	379.2 ± 160.5 ^d	14.8 ± 5.1 ^c
CaCi75 rind	7.2 ± 0.0 ^a	ND	8.0 ± 0.3 ^a	ND	ND	32.8 ± 6.6 ^c	22.1 ± 3.0 ^b
NaCl100 core	6.3 ± 0.0 ^c	54.2 ± 0.2 ^b	4.1 ± 0.2 ^d	3.37 ± 0.0 ^b	29.5 ± 0.4 ^c	436.8 ± 52.8 ^{cd}	3.6 ± 1.3 ^{de}
NaCl100 rind	6.5 ± 0.0 ^{bc}	ND	5.3 ± 0.0 ^{bc}	ND	ND	Traces	3.9 ± 0.7 ^{de}
Control core	6.3 ± 0.0 ^c	53.7 ± 0.3 ^{bc}	4.1 ± 0.2 ^d	3.31 ± 0.1 ^b	29.8 ± 0.6 ^{bc}	441.4 ± 80.6 ^{cd}	6.6 ± 2.2 ^d
Control rind	7.0 ± 0.0 ^a	ND	5.2 ± 0.0 ^c	ND	ND	68.5 ± 11.3 ^c	4.1 ± 0.5 ^{de}

¹ Means of replicates ± Standard Deviation

^{a-d} Means in a column sharing common superscripts are similar as tested by Tukey's test (P > 0.05)

Abbreviations used: CaLa75, cheese salted with a mix of Ca-lactate (75%) and NaCl (25%); CaCi75, cheese salted with a mix of Ca-citrate (75%) and NaCl (25%); NaCl100, cheese salted with fine-grain NaCl salt (100%); Control, cheese salted with coarse NaCl salt (100%); DM, dry matter; Total N, total nitrogen; ND, non-determined

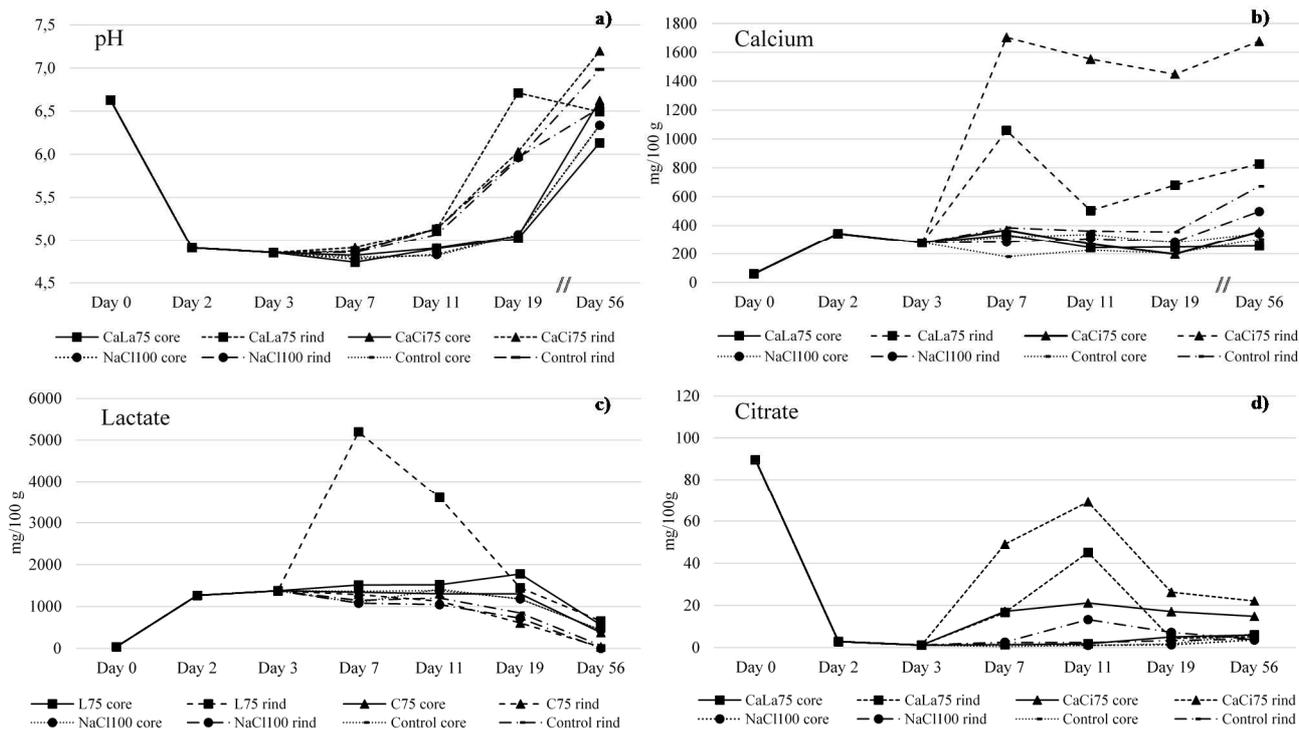


Figure 1. Evolution of pH (a), calcium (b), lactate (c) and citrate (d) content in 4 cheeses studied (cheese core and rind) during manufacturing.

Abbreviations used: CaLa75, cheese substituted with Ca-lactate; CaCi75, cheese substituted with Ca-citrate; NaCl100, cheese salted with fine-grain salt; Control, cheese salted with coarse salt; Day 0, raw milk; Day 2, drained curd; Day 3, brine salted curd; Day 7, 11, 19, 56, cheeses at different ripening times

the rinds were removed for analysis, it could explain the observed decrease of Ca content in the cheese core. This hypothesis was tested here by keeping and analyzing the rinds as well. In summary, CaLa75 cheeses reported an important pH gradient and a different behavior compared to the three other treatments.

The lactate and citrate contents in milk, DC, BSC and cheeses obtained at day 56 are presented in table 3 and their evolution during ripening is given in figures 1 (c, d). Lactate determination in CaLa75 showed a very high lactate content in rind at day 7 (5195.1 ± 259.3 mg/100 g), which is logical, since it was added during the dry salting. Then the lactate content decreased gradually as the ripening progressed, probably reflecting the surface flora activity and the deacidification of rind emphasized before (McSweeney, 2004). The phenomenon of deacidification of the rind was observed after dry salting at day 3 until the metabolization of most of the lactate by the day 19 (1444.2 ± 55.8 mg/100 g of rind) and continued to decline until day 56 (557.5 mg/100 g of cheese core and 654.7 mg/100 g of rind). Conversely, the behavior of cheeses substituted with Ca-citrate was very similar to NaCl100 and Control

cheeses. Regarding the citrate content, no significant differences were observed between the drained curd, the brine salted curd and the ripened cheeses CaLa75, NaCl100 and Control cheese cores and rinds. Changes in the citrate contents were attested only on cheeses (core and rind) obtained with partial substitution of dry salt by Ca-citrate. Conversely, the citrate content did not achieve the amount of citrate found in raw milk (89.6 mg/100 g). The maximum level was reached at day 11 in the rind (69.1 mg/100 g). From that moment onward the citrate content significantly reduced in the rind and slightly increased in the cheese core.

In the present study, we also tested the hypothesis of Ca-phosphate migration to the rind under the effect of pH gradient (Table 4; Figure 1a, b). Firstly, Ca-citrate is naturally richer in Ca than Ca-lactate and provided much more Ca to the rind (370% more Ca in the rind besides the core at day 56 and 225%, respectively, for CaLa75) when salting, but also involved greater fluctuations in the Ca content of different salted cheeses, being probably due to manual salting and cheese heterogeneity (Abbas, 2012; Gore et al., 2016; Hardy, 1983). At all stages of ripening, more Ca was present in the rind of CaCi75, more Ca was found in cheese, hence demonstrating that Ca-citrate

Table 4. Protein, mineral and chloride contents and calculated PRAL indexes of the raw milk, drained curds (DC), brine salted curds (BSC) and the salt-substituted cheeses (cheese core and rind) at 56 days of ripening, expressed for 100 g of fresh weight

Product	Elements ¹							
	Pr (g/100 g)	Ca (mg/100 g)	K (mg/100 g)	Mg (mg/100 g)	P (mg/100 g)	Na (mg/100 g)	Cl (mg/100 g)	PRAL ²
Raw milk	3.3 ± 0.0 ^e	59.9 ± 7.1 ^d	101.5 ± 17.0 ^{ab}	8.2 ± 1.3 ^b	177.6 ± 34.1 ^c	32.9 ± 5.7 ^c	96.2 ± 3.1 ^e	6.3 ± 0.7 ^f
DC	19.8 ± 0.4 ^d	342.8 ± 35.6 ^c	89.6 ± 9.8 ^{ab}	22.6 ± 2.9 ^b	719.6 ± 109.6 ^d	45.3 ± 6.6 ^c	50.9 ± 21.5 ^e	28.9 ± 3.4 ^e
BSC	20.6 ± 0.4 ^c	278.1 ± 46.5 ^{cd}	71.0 ± 17.1 ^{ab}	17.0 ± 4.1 ^b	744.2 ± 74.0 ^{cd}	337.4 ± 100.3 ^{bc}	980.1 ± 90.3 ^d	44.7 ± 3.9 ^d
CaLa75 core	21.2 ± 0.3 ^b	255.0 ± 50.9 ^{cd}	105.2 ± 32.5 ^{ab}	37.3 ± 5.8 ^a	843.1 ± 316.5 ^{bcd}	502.4 ± 205.5 ^{abc}	1297.6 ± 67.0 ^c	49.5 ± 4.8 ^{cd}
CaLa75 rind	ND	827.6 ± 208.1 ^b	93.0 ± 25.9 ^{ab}	50.0 ± 5.6 ^a	1834.5 ± 290.1 ^a	432.6 ± 142.1 ^{abc}	1029.9 ± 2.4 ^d	74.5 ± 14.5 ^a
CaCi75 core	22.3 ± 0.4 ^a	357.3 ± 59.9 ^c	107.8 ± 21.0 ^{ab}	44.4 ± 7.6 ^a	1095.1 ± 132.5 ^{bc}	616.0 ± 136.7 ^{ab}	1409.7 ± 92.9 ^{bc}	56.2 ± 6.9 ^{bc}
CaCi75 rind	ND	1677.4 ± 547.9 ^a	102.2 ± 22.3 ^{ab}	51.1 ± 4.7 ^a	1658.9 ± 339.3 ^a	617.5 ± 17.0 ^{ab}	1533.5 ± 1.9 ^{ab}	63.1 ± 4.8 ^{abc}
NaCl100 core	21.5 ± 0.2 ^b	344.0 ± 51.7 ^c	112.6 ± 22.0 ^{ab}	43.3 ± 8.7 ^a	982.5 ± 169.5 ^{bcd}	752.2 ± 156.6 ^a	1666.9 ± 131.7 ^a	53.1 ± 5.0 ^{bcd}
NaCl100 rind	ND	497.9 ± 181.3 ^{bc}	98.6 ± 22.5 ^{ab}	45.8 ± 10.1 ^a	1316.1 ± 679.1 ^{ab}	481.2 ± 250.3 ^{abc}	1355.8 ± 1.9 ^{bc}	66.4 ± 11.8 ^{ab}
Control core	21.1 ± 0.4 ^b	302.5 ± 54.5 ^{cd}	92.9 ± 20.7 ^{ab}	38.4 ± 6.5 ^a	876.9 ± 207.3 ^{bcd}	621.4 ± 206.2 ^{ab}	1670.5 ± 150.0 ^a	55.6 ± 7.8 ^{bc}
Control rind	ND	671.6 ± 80.0 ^b	118.9 ± 21.2 ^a	50.3 ± 13.0 ^a	1905.3 ± 279.6 ^a	719.6 ± 101.0 ^{ab}	1377.3 ± 6.8 ^{bc}	76.1 ± 4.7 ^a

¹ Means of replicates ± Standard Deviation

² Potential Renal Acid Load, expressed in mEq/100 g of fresh weight

^{a-d} Means in a column sharing common superscripts are similar as tested by Tukey's test ($P > 0.05$)

Abbreviations used: CaLa75, cheese salted with a mix of Ca-lactate (75%) and NaCl (25%); CaCi75, cheese salted with a mix of Ca-citrate (75%) and NaCl (25%); NaCl100, cheese salted with fine-grain NaCl salt (100%); Control, cheese salted with coarse NaCl salt (100%). Pr, proteins; ND, non-determined

did not induced pH gradient and therefore, Ca migration. At least, this is not observable. Thus, the CaCi75 cheese was richer in Ca with about 100 mg/100 g compared to CaLa75, but no significant difference was found with NaCl100. On day 7, the Ca content of CaLa75 increased and then decreased after day 11, remaining relatively constant until late ripening (Figure 1b). Ca from Ca-lactate, migrated into the cheese in the first days of ripening, then probably returned irreversibly in the rind under the action of the pH gradient (Le Graet and Brulé, 1988). Adversely, no significant difference was observed between the Ca content of CaLa75 and Control cheese cores and brine salted curd. Regarding the P contents, they were non-significantly different in the four cheese cores and rinds, regarded separately (table 4). Conversely, significant differences were attested between the cheese core and rind of the same cheese, with higher contents in the rinds. Thus, a difference of almost 118% of P between the cheese core and rind was observed in CaLa75 and Control, whereas CaCi75 and NaCl100 presented a difference of 52 and 34%, respectively. We can conclude that in all four blue-veined cheese treatments existed a lower (CaCi75, NaCl100 and Control) or higher (CaLa75) pH gradient, that induced a lower Ca migration in CaCi75, NaCl100 and Control and lower P migrations in CaCi75 and NaCl100. Conversely, the pH gradient induced higher Ca and P migrations in CaLa75 and Control cheeses.

The change of salt granulometry necessary for obtaining homogeneous salt treatments induced an increase of almost 21% of Na in NaCl100 cheese core with respect to Control, reflecting a greater penetration

of Na in the cheese from the fine-grain salt than from the coarse salt (Table 4). Regarding the salt-substituted cheese cores, CaLa75 presented lower Na (502.4 mg/100 g) and Cl contents (1297.6 mg/100 g) compared with Control (621.4 and 1670.5 mg/100 g). Conversely, CaCi75 showed similar Na content (616.0 mg/100 g) and lower Cl content (1409.7 mg/100 g) besides the Control. Similar non-stoichiometric relation between Cl and Na were already reported in Camembert and Cantal cheeses (Boutrou et al., 1999; De Freitas et al., 2007, 2005; Gaucheron et al., 1999), with higher variations in blue-veined cheese (Gore et al., 2016; Prieto et al., 2002, 2000). In the literature, very few works addressed the distribution of Cl and Na in cheese matrix to understand this feature (Boisard et al., 2013; Hardy, 1983, 1976). The complex cheese matrix exerts a sieve effect on the diffusion of Na and Cl into cheese and water out of cheese, since it consists of fat globules and protein aggregates that acts as barrier in front of Na ions and water movements (Guinee, 2004). Thus, salt and water will take other tortuous paths to circumvent these barriers and thereby travel in lengthy paths (Ayyash, 2013; Hardy, 1983). Moreover, the brining and dry salting may result in uneven distribution of Na and Cl in cheese by creating zone variations in cheese mass (Ayyash, 2013; Guinee et al., 2000). Zonal variations in the levels of salt occur within a cheese loaf immediately after salting and can persist for varying lengths of time afterwards depending on salting equipment and conditions, cheese structure, cheese composition and storage conditions (Ayyash, 2013; Guinee, 2004).

Effect of organic calcium salts substitution on the acid-forming potential

The PRAL elements (protein, Ca, K, Mg, P, Na and Cl) and the calculated PRAL indexes of the products are shown in table 4. The protein content of CaLa75 was comparable with the one of NaCl100 and Control, whereas CaCi75 showed a higher protein content positively correlated to the dry matter content. K and Mg had little impact on the acid-forming potential given their low concentrations in the ripened cheeses (Gore et al., 2016) and the use of Ca-lactate and Ca-citrate did not affect their content in end products whatever the treatment applied.

In the present study, the obtained PRAL indexes were almost doubled (55.6 mEq/100 g) in comparison with the PRAL obtained in the same cheese in previous studies (28.0 mEq/100 g) (Gore et al., 2016). These results are related to the mineral content of raw milk and more specifically to its Ca/P ratio. In fact, this milk was obtained in spring, at the moment the herd was turned out to green grass pasture. The milk reported a highly unbalanced Ca/P ratio (0.3), being three times greater in P and impoverished in Ca than in other periods (ANSES, 2013), which affected the final composition of cheeses and therefore their PRAL. The literature argue that relatively little impact on the mineral composition of milk is due to the cow's diet and it's more determined by the cheese-making process (Guéguen, 1997; Lucas et al., 2006a, 2006b). However, some variations can be observed for Ca and P levels in cow's milk while turning out to green grass pasture in spring (Guéguen, 1997). As stipulated by Notz (1997), this milk is greater in P and reduced in Ca, resulting a low Ca/P ratio. The results for Ca and P obtained in the blue-veined cheese studied were also validated by the nutritional databases CIQUAL (ANSES, 2013).

The lowest PRAL index was obtained with the Ca-lactate substitution (cheese core), with no significant difference with respect to the brine salted curd (Table 4). Higher PRAL values were obtained for CaCi75 and the standard cheeses (NaCl100 and Control), where no significant differences were observed on cheese cores. With reference to the nutritional optimization, the Ca-lactate substitution improved the lactate content by 26.3% and the PRAL index by 11%, the salt content decreased by 22.2%, whereas Ca content decreased by 15.7%, probably reflecting the Ca migration to the rind, induced by the pH gradient. Cheeses with the Ca-citrate substitution were characterized by 18.1% and 124.2% optimization of the Ca and citrate contents, respectively, while salt content decreased by 14.8%. Moreover, the partial salt substitution by Ca-lactate

and Ca-citrate resulted in 19.2% and 15.6% reduction of Na and in 22.3% of Cl contents (for CaLa75), compared to Control. These nutritional modulations of cheeses could contribute to reduce the related risks of metabolic acidosis and hypertension on human's health.

One limitation of this work is that the studied blue-veined cheese is a quite heterogeneous matrix exposed to intra-product variations (Abbas, 2012; Gore et al. 2016; Morris et al., 1985). This characteristic was previously assigned by several authors to the development of microbial flora *Geotrichum candidum*, *Penicillium camembert* and *P. roqueforti* (Abbas, 2012; Prieto et al., 2000) and to the mineral migrations it may cause (Le Graet et al., 1983; McSweeney and Fox, 2004; McSweeney and Sousa, 2000).

Effect of organic calcium salts substitution on sensory properties

Two-way ANOVA (product, assessor) with interaction was applied to the sensory attributes (Table 5). The analysis showed a significant ($P < 0.05$) product effect for 13 sensory attributes from 29 total attributes (45%). The interaction « product x assessor » were significant ($P < 0.05$) only for one sensory attribute. These results about panel performances are fundamental for subsequent analyses and interpretations, as they demonstrate high reliability of the panel by showing that the products were consistently evaluated by different assessors.

The salt-substituted cheeses were analyzed for the significant sensory differences with the Control ones (Table 5). The rind of the salt-substituted cheeses differentiated in colour, texture (slightly sticky and sandy) and salty perception. CaLa75 was characterized by greyer colour of rind (5.5) than CaCi75 and NaCl100, which is probably due to the metabolism of lactate by surface flora *G.candidum* and *P.roqueforti*, since lactate is a good substrate for these microorganisms (McSweeney, 2004; McSweeney and Fox, 2004). The sandy texture of the rind could be explained by the dry-salting on surface of cheeses and by the nature of the Ca salts (white powdered and partly soluble salts). No significant ($P < 0.05$) differences between the 4 cheeses were observed on the heterogeneity, rough, global odour, ammonia and mouldy aromas.

Cheese cores differentiated on the blue-veined quantity and distribution and firmness, while the moisture and the colour were similar to the standard cheeses. The CaCi75 cheese was characterized by greater blue quantity (6.9) and a better blue-veined

Table 5. Mean and standard deviation of sensory attributes intensity scores for blue-veined cheeses (cheese and rind) salted with different salt mixes

Sensory properties	Attributes	Treatment				Significance	
		CaLa75	CaCi75	NaCl100	Control	p-value _{product}	p-value _{product x assessor}
Rind (texture, odour, aroma, taste)	Colour-R	5.5 ± 0.3 ^a	4.2 ± 0.7 ^b	4.7 ± 1.1 ^{ab}	4.6 ± 1.0 ^b	0.009***	0.127
	Heterogeneity-R	5.8 ± 0.4	6.1 ± 0.6	5.4 ± 0.8	5.9 ± 0.2	0.159	0.356
	Sticky-R	1.2 ± 0.5 ^b	1.9 ± 0.6 ^b	2.8 ± 0.6 ^a	2.8 ± 0.6 ^a	<0.001***	0.980
	Rough-R	5.2 ± 0.2	5.2 ± 0.3	5.4 ± 0.5	4.9 ± 0.6	0.198	0.516
	Global-Odour-R	6.1 ± 0.2	6.0 ± 0.3	6.0 ± 0.6	5.7 ± 0.2	0.057	0.996
	Ammonia-Aroma-R	3.1 ± 0.3	2.8 ± 0.3	3.3 ± 0.5	2.4 ± 0.2	0.053	0.899
	Mouldy-Aroma-R	3.3 ± 0.4	3.1 ± 1.0	3.1 ± 0.8	3.5 ± 0.5	0.443	0.873
	Salty-R	4.8 ± 0.2 ^b	4.5 ± 0.6 ^b	5.4 ± 0.3 ^a	4.9 ± 0.3 ^{ab}	0.001***	0.899
Sandy-R	6.0 ± 0.4 ^a	6.0 ± 0.4 ^a	4.2 ± 0.5 ^b	4.2 ± 0.2 ^b	<0.001***	0.006**	
Cheese core appearance	Colour-C	4.9 ± 0.8	5.4 ± 0.2	5.0 ± 0.2	5.1 ± 0.4	0.040*	0.986
	Moisture-C	2.7 ± 0.3	2.7 ± 0.7	2.5 ± 0.3	2.7 ± 0.1	0.569	0.996
	Blue-Quantity-C	6.3 ± 0.4 ^b	6.9 ± 0.4 ^a	6.7 ± 0.4 ^{ab}	6.8 ± 0.1 ^{ab}	0.008**	0.896
	Blue-Distribution-C	6.0 ± 0.4 ^b	7.0 ± 0.8 ^a	6.3 ± 0.7 ^b	7.0 ± 0.6 ^a	<0.001***	0.721
	Firmness-C	3.6 ± 0.6 ^b	4.4 ± 0.2 ^a	4.1 ± 0.4 ^{ab}	4.4 ± 0.5 ^a	0.002**	0.928
Cheese core odour	Overall-Odour-C	5.3 ± 0.6	5.3 ± 0.4	5.4 ± 0.3	5.4 ± 0.1	0.773	1.000
	Ammonia-C	2.8 ± 0.6	2.8 ± 0.2	2.6 ± 0.6	2.9 ± 0.6	0.758	0.991
	Blue-C	3.4 ± 0.6	3.7 ± 0.2	3.8 ± 0.1	3.9 ± 0.1	0.367	0.512
Cheese core taste	Salty-C	6.7 ± 0.4 ^b	6.9 ± 0.6 ^b	7.5 ± 0.3 ^a	6.9 ± 0.2 ^b	0.004**	0.594
	Sour-C	2.6 ± 0.0 ^b	2.8 ± 0.5 ^b	3.2 ± 0.3 ^a	2.9 ± 0.2 ^b	0.010*	0.997
	Bitter-C	5.8 ± 0.2	5.2 ± 0.1	5.5 ± 0.2	5.4 ± 0.4	0.398	0.447
	Pungent-C	2.4 ± 0.4 ^b	3.3 ± 0.4 ^{ab}	3.4 ± 0.3 ^a	3.3 ± 0.5 ^a	0.006**	0.776
Cheese core aroma	Overall-Aroma-C	6.2 ± 0.2	6.0 ± 0.5	6.3 ± 0.2	6.3 ± 0.0	0.460	0.850
	Ammonia-C	3.4 ± 0.2	3.5 ± 0.7	4.0 ± 0.4	3.6 ± 0.3	0.081	0.979
	Blue-C	3.9 ± 0.4 ^b	4.2 ± 0.6 ^{ab}	4.3 ± 0.0 ^{ab}	4.6 ± 0.2 ^a	0.012*	0.926
	Persistence-C	5.4 ± 0.6	5.5 ± 0.4	5.8 ± 0.4	5.5 ± 0.1	0.580	0.314
Cheese core texture in-mouth	Firmness-C	3.0 ± 0.3 ^b	3.6 ± 0.6 ^a	3.5 ± 0.3 ^{ab}	3.6 ± 0.3 ^{ab}	0.033*	0.635
	Smooth-C	5.3 ± 0.1	5.1 ± 0.3	5.0 ± 0.1	5.1 ± 0.3	0.399	0.887
	Rough-C	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.328	0.743
	Sticky-C	5.6 ± 0.3	5.2 ± 0.5	5.2 ± 0.5	5.3 ± 0.5	0.322	0.508

^{a,b} Means in a line sharing common superscripts are not significantly different at 5% (Tukey's test);

Abbreviations used: CaLa75, cheese salted with a mix of Ca-lactate (75%) and NaCl (25%); CaCi75, cheese salted with a mix of Ca-citrate (75%) and NaCl (25%); NaCl100, cheese salted with fine-grain NaCl salt (100%); Control, cheese salted with coarse NaCl salt (100%). * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 ; R, rind; C, cheese

distribution (7.0) than CaLa75, but no significant differences with NaCl100 were detected on these attributes. CaLa75 was judged as less firm (3.6) than the three other treatments (4.3 average). No significant differences were observed on the cheese odour (overall, ammonia and blue).

In the mouth, differences in the pungent and blue aroma perceptions were detected. CaLa75 presented a blue aroma less intense (3.9) than Control and less pungent (2.4) than NaCl100 and Control. In addition, no significant differences in the salty perceptions between the salt-substituted cheeses (6.7 and 6.9) and Control (6.9) were detected, demonstrating their roles in enhancing the salty perception of products (Astruc et al., 2008; Choi et al., 2014). No significant effect on the bitter taste was detected on both salt-substituted cheeses. In agreement with the biochemical results, CaCi75 presented a rind texture and texture-in-mouth firmer than CaLa75, being correlated to the highest dry matter content.

Globally, the sensory tests showed that the 75% reduction of dry-salt by Ca-lactate and Ca-citrate is

possible, without affecting the salty and the bitter intensity taste. The salt-substituted cheeses presented an appearance, a texture and aroma comparable with control cheeses.

Implications

The present study provides interesting data to contribute to the nutritional optimization of cheeses. Indeed, Ca-lactate and Ca-citrate are attractive compounds that could be used to reduce the Na content in cheese with no acidifying impact. Moreover, the salt-substituted cheeses presented improved PRAL, organic anions and Ca ratings. This original work deserves further researches, notably to investigate whether the replacement of the brining process by a direct addition of the organic salts to the milled curd before moulding would be relevant. The use of these salts in the milled curd of cheese would be more appropriate, it might allow to obtain more homogenous matrix and more interesting results on a nutritional point of view. In this way, the rapid metabolism of organic anions by the surface flora would be avoided.

CONCLUSION

This paper opens new perspectives regarding strategies of nutritional optimization of cheeses. It proposes a new method to reduce Na content by applying a partial substitution of NaCl with alkalizing organic Ca salts. Indeed, the blue-veined cheeses obtained using a 75% substitution of NaCl with Ca-lactate contained about 19% lower Na. The Ca-lactate substitution increased the lactate content by 26.3% and improved the PRAL index by 11.0%. The Ca-citrate substitution improved the Ca and citrate contents by 18.1% and 124.2%, respectively. The obtained products did not differ significantly in bitter and salty perceptions from the Control cheese and could be considered of highly acceptable quality. As a result, this approach improves the targeted nutritional properties of cheeses without altering their sensory properties and therefore would deserve to be considered by cheese-making producers.

DISCLOSURE STATEMENT

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

ACKNOWLEDGEMENTS

The research was co-financed FEDER (European Regional Development Funds) in Auvergne (France).

REFERENCES

- Abbas, K., 2012. Effet de traitements thermiques sur les propriétés fonctionnelles de fromages traditionnels: le cas des pâtes persillées (These). Blaise Pascal University, Clermont-Ferrand, France. 145 p.
- Abraham, S., Cachon, R., Colas, B., Feron, G., De Coninck, J., 2007. Eh and pH gradients in Camembert cheese during ripening: Measurements using microelectrodes and correlations with texture. *Int. Dairy J.* 17:954–960.
- ANSES, 2013. Table de composition nutritionnelle Ciqua [WWW Document]. URL <https://pro.anses.fr/TableCIQUAL/index.htm> (accessed 11.9.15).
- Astruc, T., Labas, R., Vendeuvre, J.L., Martin, J.L., Taylor, R.G., 2008. Beef sausage structure affected by sodium chloride and potassium lactate. *Meat Sci.* 80:1092–1099.
- Ayyash, M.M., 2013. The effect of sodium chloride substitution with potassium chloride on chemical, physical and microbiological characteristics of Mediterranean cheeses (phd). Victoria University. 190 p.
- Blaustein, M.P., Leenen, F.H.H., Chen, L., Golovina, V.A., Hamlyn, J.M., Pallone, T.L., Huyse, J.W.V., Zhang, J., Wier, W.G., 2012. How NaCl raises blood pressure: a new paradigm for the pathogenesis of salt-dependent hypertension. *Am. J. Physiol.* 302:H1031–H1049.
- Boisard, L., Andriot, I., Arnould, C., Achilleos, C., Salles, C., Guichard, E., 2013. Structure and composition of model cheeses influence sodium NMR mobility, kinetics of sodium release and sodium partition coefficients. *Food Chem.* 136:1070–7.
- Bord, C., Guerinon, D., Lebecque, A., 2015. Impact of heating on sensory properties of French Protected Designation of Origin (PDO) blue cheeses. Relationships with physicochemical parameters. *Food Sci. Technol. Int.* [Epub ahead of print]. DOI: 10.1177/1082013215605201.
- Boutrou, R., Gaucheron, F., Piot, M., Michel, F., Maubois, J.-L., Léonil, J., 1999. Changes in the composition of juice expressed from Camembert cheese during ripening. *Lait* 79:503–513.
- Boutrou, R., Guéguen, M., 2005. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *Int. J. Food Microbiol.* 102:1–20.
- Cáceres, E., García, M.L., Selgas, M.D., 2006. Design of a new cooked meat sausage enriched with calcium. *Meat Sci.* 73:368–377.
- Chekri, R., Noël, L., Millour, S., Vastel, C., Kadar, A., Sirot, V., Leblanc, J.-C., Guérin, T., 2012. Calcium, magnesium, sodium and potassium levels in foodstuffs from the second French Total Diet Study. *J. Food Compos. Anal.* 25:97–107.
- Choi, Y.M., Jung, K.C., Jo, H.M., Nam, K.W., Choe, J.H., Rhee, M.S., Kim, B.C., 2014. Combined effects of potassium lactate and calcium ascorbate as sodium chloride substitutes on the physicochemical and sensory characteristics of low-sodium frankfurter sausage. *Meat Sci.* 96:21–25.
- Cruz, A.G., Faria, J.A.F., Pollonio, M.A.R., Bolini, H.M.A., Celeghini, R.M.S., Granato, D., Shah, N.P., 2011. Cheeses with reduced sodium content: Effects on functionality,

- public health benefits and sensory properties. *Trends Food Sci. Technol.* 22:276–291.
- De Freitas, I., Pinon, N., Lopez, C., Thierry, A., 2005. Microstructure, physicochemistry, microbial populations and aroma compounds of ripened Cantal cheeses. *Lait* 85:453–468.
- De Freitas, I., Pinon, N., Thierry, A., Lopez, C., 2007. In depth dynamic characterisation of French PDO Cantal cheese made from raw milk. *Lait* 87:97–117.
- Frassetto, Lanham-New, S., Macdonald, H.M., Remer, T., Sebastian, A., Tucker, K.L., Tyllavsky, F.A., 2007. Standardizing Terminology for Estimating the Diet-Dependent Net Acid Load to the Metabolic System. *J. Nutr.* 137:1491–1492.
- Frassetto, Morris, R., Sellmeyer, D., Sebastian, A., 2008. Adverse effects of sodium chloride on bone in the aging human population resulting from habitual consumption of typical American diets. *J. Nutr.* 138:419S–422S.
- Gaucheron, F., Le Graët, Y., Michel, F., Briard, V., Piot, M., 1999. Evolution of various salt concentrations in the moisture and in the outer layer and centre of a model cheese during its brining and storage in an ammoniacal atmosphere. *Lait* 79:553–566.
- Gomes, A.P., Cruz, A.G., Cadena, R.S., Celeghini, R.M.S., Faria, J.A.F., Bolini, H.M.A., Pollonio, M.A.R., Granato, D., 2011. Manufacture of low-sodium Minas fresh cheese: Effect of the partial replacement of sodium chloride with potassium chloride. *J. Dairy Sci.* 94:2701–2706.
- Gore, E., Mardon, J., Guerinon, D., Lebecque, A., 2016. Exploratory study of acid-forming potential of commercial cheeses: impact of cheese type. *Int. J. Food Sci. Nutr.* [Epub ahead of print]. DOI: 10.3109/09637486.2016.1166188
- Grummer, J., Bobowski, N., Karalus, M., Vickers, Z., Schoenfuss, T., 2013. Use of potassium chloride and flavor enhancers in low sodium Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 96:1401–1418.
- Grummer, J., Karalus, M., Zhang, K., Vickers, Z., Schoenfuss, T.C., 2012. Manufacture of reduced-sodium Cheddar-style cheese with mineral salt replacers. *J. Dairy Sci.* 95:2830–2839.
- Guéguen, L., 1997. La valeur nutritionnelle minérale du lait de chèvre. In: Intérêts nutritionnel et diététique du lait de chèvre. Editions Quae, Niort (France), pp. 67–80.
- Guinee, T.P., 2004. Salting and the role of salt in cheese. *Int. J. Dairy Technol.* 57:99–109.
- Guinee, T.P., Mulholland, E.O., Mullins, C., Corcoran, M.O., 2000. Effect of salting method on the composition, yield and functionality of low moisture Mozzarella cheese. *Milchwissenschaft* 55:135–138.
- Hardy, J., 1976. Etude de la diffusion du sel dans les fromages à pâte molle de type Camembert. Comparaison du salage à sec et du salage en saumure. (These). Université de Nancy, Nancy. 137 p.
- Hardy, J., 1983. Diffusion et distribution du chlorure de sodium dans les fromages. Influence sur l'activité de l'eau et les propriétés de sorption de l'eau. (These). Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy. 175 p.
- He, F.J., Burnier, M., MacGregor, G.A., 2011. Nutrition in cardiovascular disease: salt in hypertension and heart failure. *Eur. Heart J.* 32:3073–3080.
- Jacquot, S., Karoui, R., Abbas, K., Lebecque, A., Bord, C., Aït-Kaddour, A., 2015. Potential of Multispectral Imager to Characterize Anisotropic French PDO Cheeses: A Feasibility Study. *Int. J. Food Prop.* 18:213–230.
- Katsiari, M., Voutsinas, L.P., 1998. Manufacture of Kefalograviera cheese with less sodium by partial replacement of NaCl with KCl. *Food Chem.* 61:63–70.
- Lacroix, M., Han, J., Britten, M., Champagne, C.P., Fustier, P., 2013. Cheese Fortification. In: Preedy, V.R., Srirajakanthan, R., Patel, V.B. (Eds.), Handbook of Food Fortification and Health, Nutrition and Health. Springer New York, pp. 71–86.
- Le Graët, Y., Brulé, G., 1988. Migration des macro et oligo-éléments dans un fromage à pâte molle de type Camembert. *Lait* 68:219–234.
- Le Graët, Y., Brulé, G., 1993. Effects of pH and ionic strength on distribution of mineral salts in milk. *Lait* 73:51–60.
- Le Graët, Y., Lepienne, A., Brulé, G., Ducruet, P., 1983. Migration du calcium et des phosphates inorganiques dans les fromages à pâte molle de type Camembert au cours de l'affinage. *Lait* 63:317–332.
- Lucas, A., Hulin, S., Michel, V., Agabriel, C., Chamba, J.-F., Rock, E., Coulon, J.B., 2006a. Relations entre les conditions de production du lait et les teneurs en composés d'intérêt nutritionnel

- dans le fromage : étude en conditions réelles de production. *INRA Prod. Anim.* 19:15–28.
- Lucas, A., Rock, E., Chamba, J., Verdier-Metz, I., Brachet, P., Coulon, J.B., 2006b. Respective effects of milk composition and the cheese-making process on cheese compositional variability in components of nutritional interest. *Lait* 86:21–41.
- Lu, Y., McMahon, D.J., 2015. Effects of sodium chloride salting and substitution with potassium chloride on whey expulsion of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 98:78–88.
- Mardon, J., Habauzit, V., Trzeciakiewicz, A., Davicco, M.-J., Lebecque, P., Mercier, S., Tressol, J.-C., Horcajada, M.-N., Demigné, C., Coxam, V., 2008. Long-Term Intake of a High-Protein Diet with or without Potassium Citrate Modulates Acid-Base Metabolism, but Not Bone Status, in Male Rats. *J. Nutr.* 138:718–724.
- McSweeney, P.L.H., 2004. Biochemistry of cheese ripening. *Int. J. Dairy Technol.* 57:127–144.
- McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., 2004. Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate. In: Fox, P.F., McSweeney, P., Cogan, T., Guinee, T. (Eds.), *Cheese: General Aspects*. Elsevier Academic Press, pp. 361–371.
- McSweeney, P.L.H., Sousa, M.J., 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait* 80:293–324.
- Morris, H.A., Guinee, T.P., Fox, P.F., 1985. Salt Diffusion in Cheddar Cheese. *J. Dairy Sci.* 68:1851–1858.
- Notz, E., 1997. Etat des connaissances concernant l'affinage et la maîtrise de la qualité des fromages à pâte pressée cuite. Tome 1. Les facteurs intervenant sur les aptitudes à la conservation des fromages avant l'affinage. ITG, Poligny, France. 97 p.
- Oh, M.S., 2000. ACID-BASE IN RENAL FAILURE: New Perspectives on Acid-Base Balance. *Semin. Dial.* 13:212–219.
- Pedone, C., Napoli, N., Pozzilli, P., Lauretani, F., Bandinelli, S., Ferrucci, L., Antonelli-Incalzi, R., 2010. Quality of diet and potential renal acid load as risk factors for reduced bone density in elderly women. *Bone* 46:1063–7.
- Poupin, N., Calvez, J., Lassale, C., Chesneau, C., Tomé, D., 2012. Impact of the diet on net endogenous acid production and acid-base balance. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* 31:313–21.
- Prieto, B., Franco, I., Fresno, J.M., Bernardo, A., Carballo, J., 2000. Picón Bejes-Tresviso blue cheese: an overall biochemical survey throughout the ripening process. *Int. Dairy J.* 10:159–167.
- Prieto, B., Franco, I., Prieto, J.G., Bernardo, A., Carballo, J., 2002. Compositional and Physico-chemical Modifications during the Manufacture and Ripening of León Raw Cow's Milk Cheese. *J. Food Compos. Anal.* 15:725–735.
- Remer, T., 2001. Influence of nutrition on acid-base balance—metabolic aspects. *Eur. J. Nutr.* 40:214–20.
- Remer, T., Manz, F., 1995. Potential Renal Acid Load of Foods and its Influence on Urine pH. *J. Am. Diet. Assoc.* 95:791–797.
- Riera, J.B., Martinez, M.R., R.C. Salcedo, Juncosa, G.M., Sellart, J.C., 1996. Process for producing a low sodium meat product. US Patent N°5534279.
- Selgas, M.D., Salazar, P., García, M.L., 2009. Usefulness of calcium lactate, citrate and gluconate for calcium enrichment of dry fermented sausages. *Meat Sci.* 82:478–480.
- Singh, G., Arora, S., Sharma, G.S., Sindhu, J.S., Kansal, V.K., Sangwan, R.B., 2007. Heat stability and calcium bioavailability of calcium-fortified milk. *LWT - Food Sci. Technol.* 40:625–631.
- Singh, G., Muthukumarappan, K., 2008. Influence of calcium fortification on sensory, physical and rheological characteristics of fruit yogurt. *LWT - Food Sci. Technol.* 41:1145–1152.
- WHO, 2013. Salt reduction and iodine fortification strategies in public health (Report No. 978 92 4 150669 4).
- WHO, 2016. The salt reduction [WWW Document]. WHO. URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs393/fr/> (accessed 4.27.16).

Chapitre 5.
CONCLUSIONS GENERALES ET
PERSPECTIVES

5. Conclusions générales et perspectives

5.1 Apports scientifiques, technologiques et socio-économiques de la thèse

Les objectifs scientifiques de la thèse ont été pleinement atteints. Cette étude a permis une meilleure compréhension du potentiel acidifiant des fromages. L'impact du procédé sur la génération de ce caractère acidifiant a été évalué au cours de la transformation, de façon à identifier les étapes clés influençant ce phénomène et sur lesquelles il semblait opportun d'agir dans un souci d'optimisation. Enfin, nous avons pu proposer des solutions technologiques visant à limiter le potentiel acidifiant de la Fourme d'Ambert en conditions industrielles, tout en s'assurant de la préservation des qualités sensorielles des produits.

Pour rappel, les **résultats marquants de ces travaux sont résumés ci-après** :

- a) Il existe un lien fort entre le type d'un fromage et son potentiel acidifiant : 1) un potentiel légèrement alcalinisant caractérise le fromage frais ; 2) un potentiel acidifiant modéré est rapporté pour les pâtes molles (Camembert) et 3) un fort potentiel acidifiant caractérise les pâtes pressées (Cantal et Comté) ainsi que les pâtes persillées (Fourme d'Ambert).
- b) L'égouttage (associé aux étapes de découpe du caillé, de brassage, de synérèse, d'égouttage sur tapis et d'égouttage en moule) et le salage ont été identifiés comme les deux étapes technologiques déterminantes dans la génération du potentiel acidifiant des fromages.
- c) L'étude des éléments pondérés du PRAL montre que les indices élevés rapportés dans les fromages affinés résultent d'un important déséquilibre entre les éléments acidifiants (Cl, P, protéines) et les éléments alcalinisants majeurs (Na et Ca). Si le caractère acidogène des protéines est bien rapporté dans la littérature (Alexy et al., 2005; Barzel and Massey, 1998; Sellmeyer et al., 2001) nos travaux mettent en évidence que, dans le cas des fromages, l'effet acidifiant des chlorures et du phosphore est plus important. Les éléments K et Mg exercent un effet négligeable sur le potentiel alcalinisant des fromages du fait de leurs faibles concentrations.
- d) La teneur importante en lactate des fromages à pâte pressée suggère que leur fort potentiel acidifiant, évalué par la simple mesure de leur indice PRAL, mériterait sans doute d'être nuancé. Cette teneur en lactate peut être optimisée pour réduire

le potentiel acidifiant des produits en privilégiant des durées d'affinage courtes, puisque le lactate est progressivement métabolisé pendant cette phase dans la Fourme d'Ambert.

- e) Le lactate de Ca présente un réel intérêt pour substituer partiellement le sel des fromages, sans affecter les propriétés sensorielles des fromages et notamment les saveurs salée et amère. Une telle substitution permettrait de réduire le potentiel acidifiant des fromages, en diminuant le PRAL et la teneur en Na et en augmentant la teneur en lactate.
- f) La substitution au citrate de Ca serait plutôt indiquée dans le cadre d'un enrichissement en Ca du fromage.

De précieuses données **biochimiques** ont été obtenues sur la composition des fromages et pendant le suivi de la fabrication de la Fourme d'Ambert. Ces analyses, sont faites dans la littérature mais sur des fromages modèles obtenus au niveau du laboratoire ou à l'échelle pilote et très rarement en conditions industrielles. De telles données, tenant compte d'autant d'éléments biochimiques et intégrant autant de points de prélèvement, sont très rares dans la littérature.

Les résultats biochimiques obtenus dans ce projet ont permis de mieux caractériser la composition en anions (chlorure, lactate et citrate) des fromages qui reste mal connue aujourd'hui et très peu renseignée dans les tables de composition des aliments disponibles. Il s'agit donc d'apports utiles qui viendront combler ces manques de la littérature. Ces données pourraient permettre de compléter les tables de composition du CIQUAL et contribuer à la création de nouvelles fiches nutritionnelles, par exemple, pour le lait cru, le fromage frais et le Cantal (fiche qui est actuellement présente sous la forme « Cantal, Salers ou Laguiole »).

Un résultat à valoriser d'un point de vue **nutritionnel** est le fait que la teneur en lactate, qui présente un potentiel alcalinisant, est importante dans les fromages à pâte persillée et les fromages à pâte pressée. Il est également intéressant de tenir compte de la diminution de cette concentration en lactate au cours de l'affinage et donc de privilégier la consommation de produits affinés sur de courtes durées pour limiter l'impact acidifiant du fromage.

Il est important de noter que le rapport Ca/P du lait cru, qui s'avère très faible au moment de mise à l'herbe des troupeaux a un impact très fort sur le potentiel acidifiant des produits finis en doublant l'indice PRAL des fromages qui en sont issus.

Nous avons pu montrer que l'amélioration nutritionnelle des fromages était possible par l'utilisation de sels organiques alcalinisants, comme le lactate et le citrate de Ca, en tant que substituts partiels du NaCl lors de l'étape de salage à sec. La substitution au lactate de Ca s'est avérée plus efficace pour diminuer la teneur en Na, réduire le PRAL et l'apport en lactate, tandis que le citrate de Ca s'est avéré plus approprié pour enrichir la teneur en Ca de la Fourme d'Ambert. Ces sels alcalinisants pourraient constituer une bonne alternative à l'usage des substituts acidifiants classiquement utilisés (KCl, CaCl₂, MgCl₂).

Enfin, d'un point de vue **clinique**, cette étude pourrait être utile dans l'évaluation de la charge acide générée par l'alimentation au niveau métabolique.

D'un point de vue **technologique**, ce travail montre que le PRAL est soumis à des variations inter-lots importantes, dues aux variations de composition rencontrées dans l'industrie fromagère. La maîtrise de cet indice est donc complexe. Ceci est particulièrement notable pour les fromages à pâte molle (Camembert et Fourme d'Ambert). Ce résultat pourrait intéresser les professionnels de la filière fromagère et devrait être pris en compte pour essayer de mieux homogénéiser la qualité nutritionnelle de leur production.

De précieuses données technologiques ont été obtenues pendant le suivi de la fabrication de la Fourme d'Ambert. La connaissance approfondie des étapes technologiques permet d'envisager de nombreuses perspectives d'amélioration du produit ou du procédé par les industriels. La cartographie des apports et des pertes est un élément clé proposé à l'entreprise partenaire.

Nous avons pu montrer que la substitution partielle du NaCl par le lactate et le citrate de Ca, au moment du salage à sec par frottage, est possible d'un point de vue technologique. Cependant, si ces techniques de salage étaient retenues par les fabricants et devaient être appliquées en conditions industrielles, une mise au point et une appropriation de la technique seraient nécessaires pour obtenir des salages plus homogènes. Dans un souci d'homogénéité et compte-tenu des variations actuellement rencontrées, le salage automatique serait peut-être plus adapté à ce type de mélange de sels et pourrait potentiellement donner des résultats plus satisfaisants.

D'un point de vue **socio-économique**, la thèse visait la participation au développement des filières, par l'élaboration de recommandations et la proposition d'innovations. Cet objectif a aussi été atteint.

Ce projet apporte des solutions cohérentes avec le besoin identifié des professionnels des filières fromagères d'assurer une meilleure maîtrise des qualités de leurs produits et de répondre aux enjeux nutritionnels actuels. Il contribue à l'émergence d'innovations (innovations produits et procédés) et ouvre ainsi de nouvelles perspectives de valorisation de la Fourme d'Ambert, en garantissant une préservation de ses qualités sensorielles.

5.2 Retour sur la démarche

5.2.1 Pertinence nutritionnelle de l'approche

Cette étude a permis de démontrer que l'usage de la formule simplifiée du PRAL (c'est-à-dire n'intégrant pas les éléments Na et Cl du fait de leur neutralisation), telle que proposée par Remer en 2001 (Frassetto et al., 2007a; Remer, 2001) pour les aliments transformés n'était pas valable dans le cas des fromages.

Au début de notre démarche, nous avons envisagé d'estimer le potentiel acidifiant des fromages en utilisant la formule simplifiée du PRAL, la teneur en sel étant évaluée indépendamment compte-tenu de son caractère aggravant en situation d'acidose (Demigné, 2008; Frassetto et al., 2007b). Lors de l'analyse des premiers résultats biochimiques, nous nous sommes rendus compte que les teneurs en Na et Cl dans les fromages ne présentaient pas de proportions stœchiométriques. A la vue de ces résultats nous avons pris la décision d'intégrer les éléments Na et Cl dans la formule du PRAL, pour utiliser la formule initialement établie en 1995 (Remer and Manz, 1995). Cet écart entre les proportions de Na et de Cl s'explique sans doute par la complexité des phénomènes ayant lieu au cours de l'égouttage et du salage (saumurage) et mériterait davantage d'approfondissement.

5.2.2 Pertinence de l'utilisation du PRAL

Actuellement, le seul indice qui permet l'estimation de la charge acide d'un aliment est le PRAL. Il a été conçu pour s'appliquer à tous les produits alimentaires. Néanmoins, son mode de calcul et son utilisation peuvent être critiquables en fonction de l'aliment considéré. C'est le cas pour les fromages. En effet, la formule du PRAL prend en compte une absorption intestinale moyenne de 25% pour le Ca et 63% pour le P (Remer and Manz, 1995), tandis que l'absorption intestinale du Ca peut être comprise entre 25 et 40% (Remer, 2001) et 60 à 80% pour le P, en fonction de la matrice alimentaire (Gaucheron, 2013). On peut se demander si ces valeurs moyennes suffisent pour les fromages ou si la forme sous laquelle ces éléments se trouvent dans le fromage influence leur biodisponibilité. Dans la littérature, les constats sont assez contrastés

à ce sujet. Buchowski et Miller (1990) ont montré que la biodisponibilité du Ca des fromages n'était pas affectée par le temps d'affinage et n'était pas significativement différente de celle du lait. Au niveau de l'organisme, la solubilité des sels de Ca augmente dans le milieu acide de l'estomac, mais le Ca dissout va se réassocier et précipiter dans le jéjunum et l'iléon, où le pH est proche de la neutralité (Buchowski, 2015; Charles, 1992). Il a été suggéré qu'à ce niveau le Ca pourrait s'associer au P pour former des sels très peu solubles (phosphates de Ca) et pourrait ainsi inhiber l'absorption du Ca et d'autres minéraux comme le Mg (Gaucheron, 2013; Vavrusova and Skibsted, 2014). D'autre part, d'autres composés du lait comme les phosphopeptides, dérivés de la digestion métabolique de la caséine, ont été suggérés comme améliorant la biodisponibilité du Ca (Cashman, 2002; Cochrane and Reynolds, 2012; Vavrusova and Skibsted, 2014), en chélatant le Ca et en prévenant sa précipitation sous forme de phosphate de Ca (Berrocal et al., 1989; Cashman, 2002; Gaucheron, 2013; Vavrusova and Skibsted, 2014).

Il est donc probable que le potentiel acidifiant soit influencé par les formes chimiques du Ca et du P, mais certainement d'une façon très limitée. La biodisponibilité du Ca est sans doute également influencée par les autres nutriments présents dans le bol alimentaire (le lactose, les fibres alimentaire, les phytates, les oxalates) (Buchowski, 2015) mais aussi par la santé des consommateurs. Il serait difficile de prendre en compte tous ces éléments dans la formule du PRAL.

Un autre aspect à aborder serait la teneur en acides aminés soufrés, vu la diversité des fromages, leur composition protéique est susceptible de varier d'un fromage à un autre. De la même manière, la formulation du PRAL prend en compte la teneur moyenne en méthionine (2,4%) et en cystéine (2,0%) provenant des protéines. Par exemple, les teneurs en méthionine des fromages varient entre 2,3% pour la Mozzarella à 2,9% pour le Parmesan, avec 2,7% pour le fromage bleu (USDA Food and Nutrient Database, 2016). La moyenne utilisée par Remer et Manz (1995) semble donc être correcte.

5.2.3 Pertinence de l'approche pluridisciplinaire

Un des atouts marquants du projet repose également sur l'approche pluridisciplinaire pratiquée. L'articulation entre les volets nutritionnel, technologique et sensoriel et la prise en compte de ces données dans l'établissement de compromis raisonnables sont rarement rencontrées dans la littérature.

5.2.4 Limites de l'étude

Une des limites de cette étude a été le choix de la Fourme d'Ambert comme modèle pour les étapes 2 et 3. Ce fromage présente une matrice hétérogène du fait de l'action de la flore microbienne complexe d'affinage qui induit des variations de composition intra- et inter-lots relativement importantes (Abbas, 2012; Gore et al., 2016; McSweeney and Fox, 2004; McSweeney and Sousa, 2000; Prieto et al., 2000). Malgré la complexité de la matrice, nous avons obtenu des résultats intéressants et nous avons atteint nos objectifs de recherche.

Lors du suivi de la fabrication de la Fourme d'Ambert nous avons intégré dans l'étude un maximum de facteurs et d'étapes technologiques susceptibles d'apporter des éléments de réponse sur la survenue du potentiel acidifiant. Cependant, il a été impossible de collecter en conditions industrielles tout le lactosérum. En effet, nous n'avons pas pu collecter le lactosérum au moment de l'égouttage en moule. Le lactosérum que nous avons analysé représentait le lactosérum majoritaire récupéré au niveau du tapis d'égouttage (lors de l'arrivée du mélange de grains de caillé et de lactosérum soutirés à partir de la cuve de caillage).

Un résultat inattendu de ce travail a été l'indice PRAL des produits obtenus dans l'étude finale, lors de la substitution du NaCl par le lactate et le citrate de Ca. Compte-tenu de la période de collecte du lait utilisé, qui a coïncidé avec le moment de mise à l'herbe des troupeaux, les indices PRAL ont presque doublé par rapport aux mêmes fromages étudiés dans les étapes précédentes. Ceci a été expliqué par un faible rapport Ca/P du lait cru. La période choisie n'était donc pas optimale pour la réalisation de cette dernière étude. Cela nous a néanmoins permis de mettre en évidence que la composition du lait cru, pouvait dans ce cas fortement influencer le PRAL des fromages, du fait du poids important de ces éléments dans la formule. Ces résultats seraient à prendre en considération par les industriels pour essayer d'équilibrer le rapport Ca/P.

Dans la dernière étape, nous n'avons pas pu atteindre notre objectif de diminuer la teneur en Na pour appliquer l'allégation nutritionnelle « réduit en sodium ». Néanmoins, il était difficile d'espérer une diminution plus importante sachant qu'après le seul passage en saumure, les fourmes contenaient plus de 70% de leur teneur finale en Na. Il serait donc intéressant de diminuer le temps de saumurage de la Fourme d'Ambert pour pouvoir atteindre l'objectif fixé.

Cette étude s'est focalisée sur le potentiel acidifiant des fromages puisque le niveau de consommation élevé des fromages dans les pays occidentaux est susceptible d'induire une charge acide importante au niveau de l'organisme. Cependant, les produits laitiers méritent

d'être étudiés avec des perspectives nutritionnelles plus larges, d'autant qu'ils jouent un rôle important pour la santé humaine et représentent les premiers contributeurs aux apports en Ca.

5.3 Retombées de la thèse

D'un point de vue scientifique, la réalisation de ce projet a été l'occasion de développer des connaissances et des savoir-faire sur une thématique originale qui est la modulation du potentiel acidifiant/alcalinisant des aliments. En effet, aussi bien à l'échelle nationale qu'internationale, très peu de travaux ont proposé une telle approche. Un intérêt notable de cette étude est le fait d'avoir initié le transfert d'un concept nutritionnel (le concept de potentiel acidifiant et d'indice PRAL des aliments) du domaine de la nutrition au domaine des sciences des aliments. En effet, il s'agit d'une thématique méconnue en technologie alimentaire qui mérite d'être explorée pour participer à l'effort de recherche consistant à améliorer les qualités nutritionnelles des aliments. Les publications issues de cette thèse permettront de partager cette approche originale avec la communauté scientifique.

A l'échelle régionale, ce projet contribue également aux efforts de recherche menés dans les domaines de la nutrition humaine et des sciences des aliments, deux disciplines fortes et reconnues dans les activités de recherche développées en Auvergne.

En termes de valorisation, la réalisation de ce projet représente un atout évident pour l'UR Consommateur ALiment TYpique Sécurité Santé. Les principaux objectifs de l'unité sont d'étudier les caractéristiques sanitaires, sensorielles et nutritionnelles des produits alimentaires typiques en lien avec le comportement du consommateur vis-à-vis de ces produits. Ainsi, la thèse s'inscrit pleinement dans le projet global de l'UR. D'un point de vue scientifique, il s'agit d'un projet précurseur au développement de projets collaboratifs plus vastes. Sur le plan méthodologique, les développements techniques et technologiques seront structurants pour les travaux de recherches qui suivront. Les résultats de ce projet viendront donc directement nourrir le programme de recherches de l'unité.

Sur le plan collaboratif, ce travail contribue également à renforcer les liens étroits que VetAgro Sup entretient avec les entreprises régionales de la filière fromagère.

Au niveau économique, les résultats issus de ce travail constituent une base scientifique solide pour l'innovation technologique du secteur. Ce projet a abouti à l'établissement de recommandations destinées aux filières fromagères visant à mieux maîtriser la qualité nutritionnelle des fromages tout en garantissant l'authenticité sensorielle des produits. Dans un

contexte régional où le poids de la filière fromagère est important, la valorisation de tels travaux peut sembler porteuse. Ceci est d'autant plus opportun que les industriels auvergnats fabriquant des fromages AOP rencontrent des difficultés. En effet, la production de fromages AOP issus de l'industrie connaît une diminution ces dernières années (CNAOL, 2013). Les résultats obtenus pendant ce projet, pourront ainsi contribuer à l'émergence d'innovations et ouvrir de nouvelles perspectives de valorisation des fromages régionaux, pour la redynamisation de la filière. Un levier d'action pertinent identifié dans cette thèse serait la substitution partielle du sel par des sels organiques alcalinisants (lactate de K, lactate de Ca, citrate de Ca), avec une double cible, diminuer la teneur en sodium et réduire le potentiel acidifiant des fromages. Cette approche est en plus cohérente avec les recommandations des autorités de santé publique en termes de diminution de la consommation de sel.

5.4 Perspectives de recherche

Plusieurs études réalisées dans le cadre de la thèse ont été appliquées à une pâte persillée. Afin de pouvoir extrapoler les résultats obtenus à d'autres produits il faudrait élargir cette étude et mener une approche équivalente sur d'autres types de fromages. En particulier, il serait, intéressant d'étudier les fromages à pâte pressée, qui présentent aussi des PRAL élevés, mais sans doute à nuancer compte tenu leur teneur en lactate. Enfin, l'étude d'un fromage salé sans passage en saumure permettrait d'éviter les décalages entre les teneurs en Cl et en Na probablement procurés par le saumurage. La substitution du sel par des sels organiques de Ca (lactate et citrate de Ca) devrait également être testée sur d'autres types de fromages. En particulier, il serait intéressant d'appliquer la substitution par le lactate de Ca aux fromages qui subissent un salage dans la masse. On suppose que cette approche permettrait d'obtenir des résultats plus intéressants du point de vue nutritionnel. En effet, plusieurs phénomènes pourraient sans doute être évités, comme par exemple 1) l'accumulation des sels à la surface du fromage et 2) leur perte lorsque le consommateur enlève la croûte lors de la consommation, 3) le passage lent des éléments (Ca, anions organiques) dans la pâte, ainsi que 4) la métabolisation rapide des anions organiques alcalinisants par la flore de surface.

Pour aller plus loin au niveau nutritionnel, une étude de modélisation mathématique serait intéressante pour essayer d'inclure les anions organiques apportés par l'alimentation dans la formule du PRAL. Une étude clinique serait sans doute nécessaire pour préciser l'absorption intestinale des anions si les données de la littérature sont insuffisantes. D'autre part, Il serait aussi intéressant de compléter l'étude et de vérifier la présence d'autres anions présents dans les fromages, susceptibles de contribuer au potentiel alcalinisant (formate, acétate, propionate,

Tableau 20. Formations, participations et diplômes obtenues au cours de mon doctorat

N	Intitulé	Lieu	Année(s)
Formations			
1.	Utilisation des logiciels de bibliographie Mendeley, Zotero	VetAgro Sup	2012
2.	Diplôme d'Université – Enseigner dans le supérieur : <ul style="list-style-type: none"> • Evolutions et enjeux de l'enseignement supérieur en France et à l'étranger • Approche psychologique des pratiques de l'enseignement • Analyse du travail enseignant : procédure et effets • Evaluation des étudiants et de l'enseignement • Intégration des technologies de l'information et de la communication pour enseigner : préparation du C2I2O ; veille scientifique • Valorisation professionnelle : votre portfolio (eportfolio – Mahara) Maitriser le discours professoral : oral et écrit	Université Blaise Pascal et ESPE Chamalières	2012-2014
3.	Anglais (communication orale)	VetAgro Sup	2013-2015
4.	Communication (orale, écrite, avec la presse)	ED SVSAE	2013
5.	La propriété intellectuelle (Propriété industrielle : brevets, dessins, marques ; Droits d'auteurs etc.)	ED SVSAE	2013
6.	Gestion de projet	ED SVSAE	2014
7.	Optimisez vos recherches sur Google : entre distance critique et mode de recherche avancé	URFIST Lyon	2014
8.	La thèse : documentation, rédaction et dépôt	ED SVSAE	2014
9.	Statistiques « Utilisation XLStat »	VetAgro Sup	2014
10.	Préparer son projet de publication dans une revue scientifique	URFIST Lyon	2015
11.	Publier mieux et vite : aide à la rédaction scientifique en sciences de la vie	URFIST Lyon	2015
12.	Formation « Stat Learning », initiation au logiciel R (basic R expressions)	Formation à distance, Université de Stanford	2015
Organisation événements			
13.	Comité d'organisation des Journées de l'Ecole Doctorale SVSAE	Faculté de droit, Clermont-Ferrand	12 et 13 juin 2014
14.	Comité d'organisation des Journées Clermontoises de la Pédagogie Universitaire	ESPE Chamalières	3 et 4 juillet 2014

Abréviations utilisées : ED SVSAE, Ecole Doctorale Sciences de la Vie, Santé, Agronomie et Environnement ; ESPE, Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education ; URFIST, Unité Régionale de Formation à l'Information Scientifique et Technique.

butyrate, carbonate, bicarbonate) par des mesures chromatographiques (HPIC ou HPLC). En effet, chaque fromage présente un profil anionique différent. Néanmoins, une prise en compte de ces composés dans le calcul du PRAL nécessiterait de cibler les anions organiques majeurs.

5.5 Apports personnels de la thèse de doctorat

Après l'obtention d'un Diplôme d'Ingénieur en « Sciences et Technologies Agro-alimentaires », j'ai choisi de poursuivre l'expérience de recherche que j'avais eue au cours de mes études. J'ai donc effectué un Master 2 (2011-2012), spécialisation « recherche » en « Sciences des aliments et Nutrition humaine » à l'Université de Nantes, en vue de continuer ensuite avec une thèse de doctorat dans le même domaine. Ainsi, depuis août 2012, je suis doctorante à VetAgro Sup, au sein de l'UR CALITYSS, sous la direction d'Annick Lebecque et le co-encadrement de Julie Mardon.

Un de mes objectifs premiers était d'effectuer des recherches dans un domaine appliqué tel que la technologie fromagère, pour ne pas perdre de vue la finalité de mes travaux. Il a donc été très **motivant** pour moi de voir que mes recherches ont pu aboutir, finalement, à la création d'un produit optimisé d'un point de vue nutritionnel et encore expérimenté à l'échelle industrielle. D'autre part, le fait de traiter un sujet nutritionnel (le potentiel acidifiant) peu connu et non développé dans l'équipe et dans l'entreprise partenaire a constitué pour moi d'une part une **difficulté**, mais aussi un **atout**, puisque cela m'a permis d'orienter moi-même mes travaux, me laissant une plus grande **liberté** et l'opportunité d'une certaine **créativité**. J'ai pu ainsi me former moi-même et ainsi surpasser mes capacités. L'**autonomie** que l'on m'a accordée m'a été particulièrement profitable.

La réalisation des études bibliographiques et des veilles scientifiques, des protocoles d'échantillonnage et d'analyse, la réalisation des échantillonnages, la mise au point des protocoles d'analyses biochimiques et analytiques, la réalisation de toutes les analyses ainsi que le suivi de nombreuses formations m'ont permis d'ancrer mes aptitudes d'**organisation** et de mieux **gérer le temps**.

Pendant ma thèse, j'ai pu bénéficier de diverses **formations** qui répondaient à des besoins et à certaines de mes curiosités (**tableau 20**). J'ai aussi choisi de participer à l'**organisation** de deux colloques, où j'ai pu découvrir les étapes de préparation d'un congrès en termes de gestion, de communication et de logistique. Etant toujours très intéressée par l'enseignement je n'ai pas manqué l'opportunité qui s'ouvrait aux doctorants de l'ED SVSAE

en 2012 de suivre un **diplôme universitaire** (DU) unique en France qui s'intitule « **ENSEIGNER A L'UNIVERSITE** ». J'ai suivi ce diplôme avec l'objectif d'approfondir mes connaissances et acquérir des compétences en enseignement. Pour valider ce diplôme j'ai suivi 8 modules d'enseignement, pendant 2 ans. Chaque module a été validé par des dissertations du type : conception d'un cours, conception d'un syllabus (descriptif du cours), présentation et analyse des cours ; utilisation des TIC (classe virtuelle, veille informationnelle avec MOT+, veille numérique netvibes) dans l'enseignement ; construction d'un EPortfolio (sur la plateforme Mahara) etc., où j'ai pu appliquer les connaissances théoriques apprises. Mon grand regret pendant ma thèse est de ne pas avoir eu la possibilité d'exercer ce rôle d'enseignant (monitorat, vacations).

Pendant ma thèse j'ai beaucoup apprécié l'expérience d'**encadrement** et de **formation** des stagiaires (niveau collège 3^{ème} et M1) aux techniques de caractérisation biochimique des produits alimentaires.

Cette thèse de doctorat a constitué pour moi une **expérience professionnelle** très riche de par sa pluridisciplinarité. Elle m'a permis de développer des compétences scientifiques, méthodologiques, pédagogiques (dans une moindre mesure dans le cadre du DU et lors de l'encadrement des stagiaires) et d'acquérir des qualités personnelles.

Compétences techniques et scientifiques :

- Nutrition humaine, santé publique, équilibre acido-basique, potentiel acidifiant/alcalinisant, PRAL ;
- Qualités nutritionnelles des aliments ;
- Technologie des fromages ;
- Biochimie des aliments ;
- Analyses sensorielles
- Statistiques.

Compétences méthodologiques et de communication :

- Coordination et animation d'un projet de recherche (animations d'équipe, comités de thèse, en entreprise etc.)
- Communications orales et écrites (français et anglais) en conférences nationales et internationales
- Gestion du temps (mise en place d'échéances, constitution des plannings) ;

- Veille scientifique ;
- Développement d'une problématique et détermination des limites du projet ;
- Elaboration d'une démarche expérimentale et développement d'un « Aliment Santé » visant à prévenir des pathologies chroniques ;
- Développement d'un aliment (fromage) à l'échelle industrielle avec suivi de ses qualités sensorielles (profil sensoriel).
- Interprétation des données, synthèse et présentation des résultats.

En terme de **perspectives** après le doctorat, je suis particulièrement intéressée par la recherche privée, notamment par le secteur recherche et développement. Je vise donc des postes d'ingénieur de recherche et de chef de projet dans des entreprises agro-alimentaires. Puisque je me suis rendue compte que la majorité des entreprises ont besoin de spécialistes comme moi, mais avec plus d'expérience, je vais essayer aussi de postuler sur les postes de post-doctorat pour retourner ensuite vers le secteur privé. Je pourrai acquérir une telle expérience en intégrant aussi des postes ATER. Si mes intérêts pour l'enseignement se confirment lors d'une telle expérience, elle fera un bon lien entre mon doctorat et un poste d'enseignant-chercheur.

Annexe 1. Présentation par poster, Journées de l'Ecole Doctorale SVSAE (2014)

(Note. Pour le calcul du PRAL la formule simplifiée a été utilisée (Remer, 2003))



VetAgro Sup
Europe
Clermont Université

Caractérisation du potentiel acidifiant de fromages issus de différentes technologies fromagères

GORE E., MARDON J., GUERINON D., ZOURANE F., GARDANES A., LEBECQUE A.
Clermont Université, VetAgro Sup, UPSP n°2011-03-100, CALITYSS, Clermont-Ferrand, France
ecaterina.gore@vetagro-sup.fr

Introduction

Les fromages sont classés parmi les aliments les plus acidifiants, c'est-à-dire que leur consommation dans le cadre d'une alimentation déséquilibrée peut contribuer à la génération d'une charge acide au niveau de l'organisme. A long terme, ce déséquilibre acido-basique peut induire une situation dite d'**acidose métabolique latente (AML)**, susceptible d'altérer plusieurs fonctions physiologiques (altération de la fonction rénale, déminéralisation osseuse,...). La charge acide d'un aliment dépend notamment de sa composition en protéines et minéraux. Elle peut s'évaluer à l'aide du PRAL (Potential Renal Acid Load). Cet indice est positif pour les aliments dits « acidifiants » et négatif pour ceux dits « alcalinisants » (Remer & Manz, 1995).

$$PRAL (mEq/100g) = 0.49 \times \text{protéine (g/100g)} + 0.037 \times \text{phosphore (mg/100g)} - 0.021 \times \text{potassium (mg/100g)} - 0.026 \times \text{magnésium (mg/100g)} - 0.013 \times \text{calcium (mg/100g)}$$

Malgré les conséquences délétères évidentes de l'AML sur la santé du consommateur, très peu d'investigations ont été entreprises pour mieux comprendre et caractériser le PRAL des aliments dans un but d'optimisation.

Dans le cas des fromages, l'origine du fort potentiel acidifiant semble résider dans l'étape de transformation, le lait ayant un PRAL quasi-neutre. Ainsi, le PRAL du produit fini serait étroitement lié au procédé appliqué.

Objectif: déterminer le PRAL de fromages issus de technologies fromagères (TF) différentes afin d'établir l'impact global de la transformation sur le potentiel acidifiant des produits finis.

Matériels

- Critères de sélection produits:
- Couvrir les 5 TF
- Matière première : lait de vache
- Produits AOP

Méthodes de dosage

- Protéines : méthode de Kjeldhal
- Minéraux (Ca, Mg, K) : Spectrométrie d'absorption atomique
- Phosphore : spectroscopie UV visible
- pH, extrait sec, matière grasse, cendres : Normes AFNOR

Echantillonnage : pour chacun des 7 produits (5 fromages et 2 laits : cru (LC) et pasteurisé (LP)) les analyses ont été effectuées en triple sur un pool constitué de trois produits issus d'une même production, ceci sur 3 productions différentes.



Figure 1. Fromages choisis pour l'étude

Résultats

Tableau 1. Valeurs du pH, de l'extrait sec (ES), des teneurs en matière grasse (MG) et des cendres des 7 produits étudiés¹

Composition	LC	LP	FF	CN	FA	CA	CO
pH	6,72 ± 0,00 ^d	6,72 ± 0,01 ^d	4,28 ± 0,03 ^a	6,77 ± 0,12 ^a	7,09 ± 0,03 ^f	5,70 ± 0,10 ^b	5,82 ± 0,02 ^b
ES, g/100g	12,71 ± 0,07 ^a	12,55 ± 0,08 ^a	13,30 ± 0,98 ^a	47,24 ± 1,51 ^b	52,82 ± 0,23 ^c	59,85 ± 0,47 ^d	65,76 ± 0,33 ^d
MG, g/100g	4,00 ± 0,10 ^a	3,50 ± 0,04 ^a	5,83 ± 0,22 ^b	23,56 ± 0,92 ^b	28,67 ± 0,60 ^d	32,61 ± 2,36 ^e	37,71 ± 0,10 ^f
Cendres, g/100g	0,64 ± 0,01 ^a	0,71 ± 0,01 ^a	0,70 ± 0,02 ^a	2,41 ± 0,10 ^b	4,04 ± 0,37 ^d	4,03 ± 0,23 ^d	3,42 ± 0,50 ^d

L'ACP couplée à la CHA permet de distinguer 3 groupes de produits rassemblant LC, LP, FF (classe 1), CN et FA (classe 2) et CA et CO (classe 3).

¹Résultats exprimés en Moyenne ± Ecart-type, les moyennes sur une même ligne ayant le même exposant sont similaires (P>0,05)

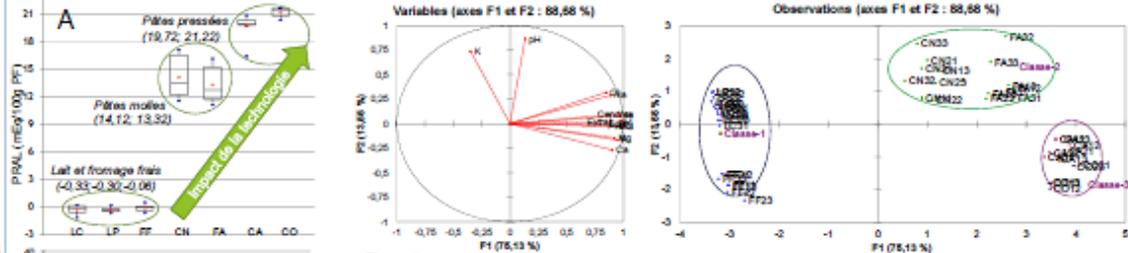


Figure 2. Analyse en Composantes Principales (couplée à une Classification Hiérarchique Ascendante) des données

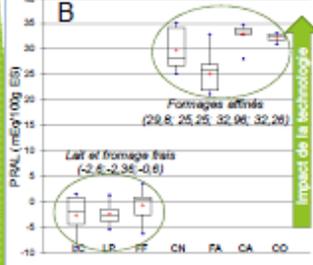
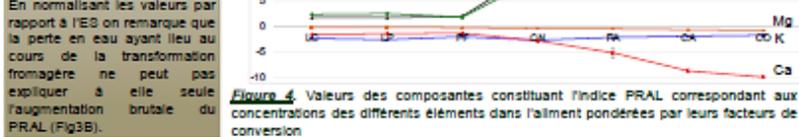


Figure 3. Charge acide potentielle (PRAL) des produits, en mEq/100g produit frais (A) et mEq/100g ES (B)

Les technologies associées aux fabrications des pâtes molles (CN, FA) et pâtes pressées (CA, CO) ont un fort impact sur le caractère acidifiant des produits finis (Fig.3A). En normalisant les valeurs par rapport à l'ES on remarque que la perte en eau ayant lieu au cours de la transformation fromagère ne peut pas expliquer à elle seule l'augmentation brutale du PRAL (Fig.3B).



Pour les pâtes molles et pressées on observe une influence importante sur le PRAL des teneurs en protéines et phosphore pour les éléments acidifiants et du calcium pour les éléments alcalinisants. En revanche les concentrations en magnésium et potassium ont peu d'impact (Fig. 4).

Conclusion et perspectives

L'étude montre que la TF appliquée a un impact direct sur la génération du potentiel acidifiant des fromages. Il semblerait intéressant de comprendre l'évolution de l'indice PRAL au cours de la transformation, afin d'identifier les leviers d'action pertinents qui permettraient de limiter ce caractère acidifiant. Ceci sera étudié dans un second temps sur le modèle Fougère d'Ambert.

Références bibliographiques : Remer T. & Manz F., 1995. J Am Diet Assoc, 96, 791-7.



Annexe 2. Présentation par poster, International Conference and Exhibition on Nutrition & Food Sciences, Valencia, Spain (2014)

(Note. Pour le calcul du PRAL la formule simplifiée a été utilisée (Remer, 2003))



VetAgro Sup

Evolution of Potential Renal Acid Load (PRAL) during the cheese-making process of Fourme d'Ambert

GORE E*, MARDON J., GUERINON D., GARDANES A., LEBECQUE A.

Clermont University, VetAgroSup, UPSP n°2011-03-100, CALITYSS, Clermont-Ferrand, France

e.caterina.gore@vetagro-sup.fr



Background

Among food groups cheeses exhibit the highest Potential Renal Acid Load (PRAL). The high level consumption of cheeses within a westernized diet (poor in fruits and vegetables) is suspected to induce acid-base disorders which in the long-term can contribute to the establishment of pathologic diseases like kidney stones and bone demineralization. PRAL is an index estimated from protein (Pr), phosphorus (P), calcium (Ca), potassium (K) and magnesium (Mg) contents per 100g of product (Remer & Manz, 1995):

$$\text{PRAL (mEq/100g)} = 0.49 \times \text{Protein (g/100g)} + 0.037 \times \text{Phosphorus (mg/100g)} - 0.021 \times \text{Potassium (mg/100g)} - 0.026 \times \text{Magnesium (mg/100g)} - 0.013 \times \text{Calcium (mg/100g)}$$

The high cheese's acid load, due to their composition, seems to have the origin in the cheese-making process, because of the neutrality of milk's PRAL (Figure 1).

The aim of the study was to determine the key steps in the evolution of PRAL to better understand its origin. The study was applied during the cheese-making process of Fourme d'Ambert (FA), a French PDO blue veined cheese (Figure 2).

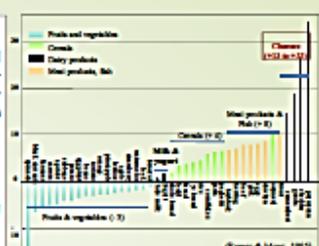


Figure 1. Potential renal acid load (PRAL) of frequently consumed foods (Remer & Manz, 1995)

Materials

Sampling. Three batches of FA were manufactured at one week interval. For each batch 3 samples of raw (RM), pasteurized (PM), matured milk (MM), curd (C), brewed (BC) and drained curd (DC), brine salted curd (SC) and cheeses at various aging times: 21 (FA21), 28 (FA28) and 42 days (FA42) were collected (Figures 2, 3).

Methods (according AFNOR Standards)

- Proteins : Kjeldhal method (EN ISO 8968-1: 2013)
- Minerals (Ca, Mg, K) : Atomic Absorption Spectrometry (NF ISO 8070: 2007)
- Phosphorus : UV-visible Spectroscopy (NF ISO 5943: 2007)
- pH (FD V04-035), total solids (TS) NF V04-207, fat (NF V04-210), ash (NF V04-208)

Statistical analysis : Analysis of variance (one-way ANOVA) were carried out using XLSTAT software.



Figure 2. Main processing steps in the production of Fourme d'Ambert cheese

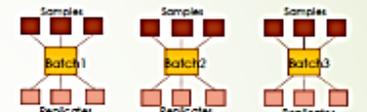


Figure 3. Sampling

	RM	PM	MM	C	BC	DC	SC	FA21	FA28	FA42
pH	6.81 ± 0.13 ^a	6.8 ± 0.11 ^a	6.62 ± 0.19 ^{ab}	6.64 ± 0.12 ^{ab}	6.49 ± 0.27 ^a	4.94 ± 0.14 ^a	4.83 ± 0.14 ^a	5.36 ± 0.18 ^b	5.76 ± 0.4 ^c	6.00 ± 0.4 ^d
TS, g	12.74 ± 0.58 ^a	12.47 ± 0.99 ^a	12.48 ± 0.75 ^a	13.50 ± 2.27 ^a	24.38 ± 3.23 ^b	49.72 ± 1.22 ^c	50.56 ± 0.66 ^c	53.70 ± 0.15 ^c	54.66 ± 0.12 ^c	54.02 ± 0.28 ^d
Fat, g	4.11 ± 0.51 ^a	3.84 ± 0.40 ^a	3.83 ± 0.17 ^a	3.23 ± 0.27 ^a	14.36 ± 1.23 ^b	28.44 ± 5.37 ^c	29.35 ± 0.63 ^c	29.53 ± 0.09 ^c	30.05 ± 0.06 ^c	29.97 ± 0.11 ^c
Ash, g	0.71 ± 0.29 ^a	0.72 ± 0.35 ^a	0.74 ± 0.23 ^a	0.84 ± 0.75 ^{ab}	1.17 ± 0.62 ^b	2.29 ± 0.04 ^c	2.84 ± 0.08 ^d	3.74 ± 0.04 ^e	3.86 ± 0.03 ^e	3.79 ± 0.02 ^e

The data represents the average of 3 batches (± SD). **Means in a row with a common superscripts do not differ (p > 0.05)

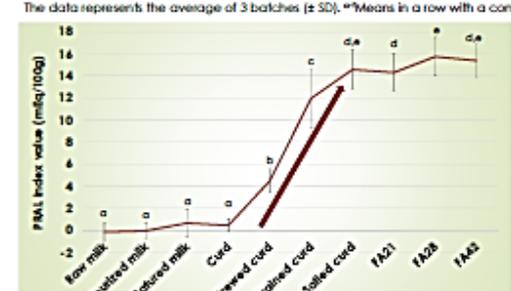


Figure 4. Evolution of PRAL during the cheese-making process. The data represents the average of 3 batches, expressed in mEq/100g edible portions (±SD). ** Means sharing common superscripts do not differ p > 0.05

No evolution of PRAL is observed during the preparation of the milk (Figure 4). It increases once the curd is cut, the separation (by cutting, brewing, draining) of the solid part of the milk from the whey is the major key factor in the evolution of FA's PRAL. This can be explained by the loss of alkaline elements, such as K and Mg in the whey. The results related to DM shows that the occurring water loss doesn't explain by itself the sudden increase in the PRAL (data not shown).

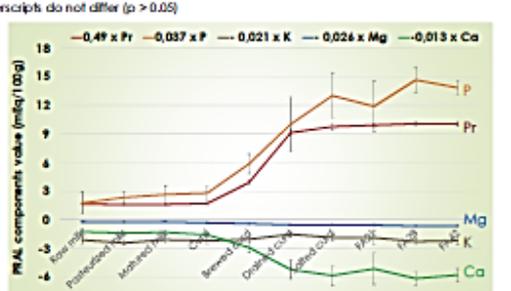


Figure 5. Evolution of PRAL components during the cheese-making process. The data represents the average of 3 batches, expressed in mEq/100g edible portions (±SD).

The major impact on the PRAL is provided especially by P and then by the Pr, as acidifying agents, Ca, due to its concentration is the most alkaline agent, while K and Mg had little impact on the FA's acid load (Figure 5). The K and Mg contents seems to not evolve during the process, this is due to the conversion from mg to mEq per 100g of edible product. In fact about 85% of K and about 65% Mg of the milk are lost during the FA cheese-making process.

Conclusion and perspectives

This study highlights the evolution of the PRAL and the responsible key steps of the FA's PRAL during the cheese-making process. The draining is an important processing-step in the evolution of the PRAL and the P the most acidifying element. The salting and ripening steps are also involved in the acid-base balance of the cheese by providing NaCl and organic acids, which are known to affect the received acid load but not the PRAL. This study should be completed with the organic acids contents. Different technological optimizations will be applied to limit the FA's PRAL. The modulation of the P and Pr contents are technologically difficult to apply but the modulation of Ca content seems to present good perspectives in improving the FA's acid load.

Remer T. & Manz F., 1995. J Am Diet Assoc, 95, 791-7.

3rd International Conference and Exhibition on Nutrition & Food Sciences September 23-25, 2014 Valencia, Spain

6. Références bibliographiques

A

- Abbas K. 2012. Effet de traitements thermiques sur les propriétés fonctionnelles de fromages traditionnels : le cas des pâtes persillées. Thèse : Blaise Pascal University, Clermont-Ferrand. 245 pp.
- Abbas K., Karoui R. and Aït-Kaddour A. 2012. Application of synchronous fluorescence spectroscopy for the determination of some chemical parameters in PDO French blue cheeses. *Eur. Food Res. Technol.* 234:457–465.
- Abraham S., Cachon R., Colas B., Feron G. and De Coninck J. 2007. Eh and pH gradients in Camembert cheese during ripening: Measurements using microelectrodes and correlations with texture. *Int. Dairy J.* 17:954–960.
- Alexy U., Remer T., Manz F., Neu C.M. and Schoenau E. 2005. Long-term protein intake and dietary potential renal acid load are associated with bone modeling and remodeling at the proximal radius in healthy children. *Am. J. Clin. Nutr.* 82:1107–1114.
- Alpern R.J. 1995. Kidney International - Abstract of article: Trade-offs in the adaptation to acidosis. *Kidney Int.* 47:1205–1215.
- Amiot J., Fournier S., Lebeuf Y., Pauqin P. and Simpson R. 2002. Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et technique d'analyse du lait. *In : Science et technologie du lait : transformation du lait.* Vignola, Carole L. Editeur. Presses internationales Polytechnique, Montréal. 1–73 pp.
- Ammar, E.-T.M.A., Abd El-Kader Y.I., Abo-Srea M.M. and Metwally M. M.M.E. 2013. Effect of salting method on the quality of Muenster - type cheese. *J. Food Dairy Sci.* 4:247–257.
- ANSES. 2013. Table de composition nutritionnelle Ciqual. [cited 2015 Nov 9]. Available from: <https://pro.anses.fr/TableCIQUAL/index.htm>
- ANSES. 2014. Le calcium. Présentation, sources alimentaires et besoins nutritionnels. [cited 2015 March 13]. Available from: <https://www.anses.fr/fr/content/le-calcium>
- Astruc T., Labas R., Vendevre J.L., Martin J.L. and Taylor R.G. 2008. Beef sausage structure affected by sodium chloride and potassium lactate. *Meat Sci.* 80:1092–1099.
- Atherton J.C. 2009. Acid–base balance: maintenance of plasma pH. *Anaesth. Intensive Care Med.* 10:557–561.
- Ayyash M.M. 2013. The effect of sodium chloride substitution with potassium chloride on chemical, physical and microbiological characteristics of Mediterranean cheeses. Thèse: Victoria University, Melbourne. 190 pp.

Ayyash M.M. and Shah N.P. 2011. The effect of substitution of NaCl with KCl on chemical composition and functional properties of low-moisture Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.* 94:3761–3768.

Ayyash M.M., Sherkat F., Francis P., Williams R.P.W. and Shah N.P. 2011. The effect of sodium chloride substitution with potassium chloride on texture profile and microstructure of Halloumi cheese. *J. Dairy Sci.* 94:37–42.

B

Ballmer P.E., McNurlan M.A., Hulter H.N., Anderson S.E., Garlick P.J. and Krapf R. 1995. Chronic metabolic acidosis decreases albumin synthesis and induces negative nitrogen balance in humans. *J. Clin. Invest.* 95:39–45.

Banks J.M., Hunter E.A. and Muir D.D. 1993. Sensory properties of low fat cheddar cheese: effect of salt content and adjunct culture. *Int. J. Dairy Technol.* 46:119–123.

Barzel U.S. 1995. The skeleton as an ion exchange system: Implications for the role of acid-base imbalance in the genesis of osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* 10:1431–1436.

Barzel U.S. and Massey L.K. 1998. Excess Dietary Protein Can Adversely Affect Bone. *J. Nutr.* 128:1051–1053.

Bennett T., Desmond A., Harrington M., McDonagh D., FitzGerald R., Flynn A. and Cashman K.D. 2000. The effect of high intakes of casein and casein phosphopeptide on calcium absorption in the rat. *Br. J. Nutr.* 83:673–680.

Berkemeyer S. and Remer T. 2006. Anthropometrics Provide a Better Estimate of Urinary Organic Acid Anion Excretion than a Dietary Mineral Intake-Based Estimate in Children, Adolescents, and Young Adults. *J. Nutr.* 136:1203–1208.

Bernard C. 1985. *An Introduction to the Study of Experimental Medicine*. Dover Publications, Mineola. 272 pp.

Berrocal R., Chanton S., Juillerat M.A., Pavillard B., Scherz J.C. and Jost R. 1989. Tryptic phosphopeptides from whole casein. II. Physicochemical properties related to the solubilization of calcium. *J. Dairy Res.* 56:335–341.

Bettice J.A. 1984. Skeletal carbon dioxide stores during metabolic acidosis. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 247:F326–F330.

Bintsis T. 2006. Quality of brine. In : *Brined cheeses*. Y. Tamime editor. John Wiley and Sons Ltd, Oxford. 344-354 pp.

Bintsis T., and Papademas P. 2002. Microbiological quality of white-brined cheeses: a review. *Int. J. Dairy Technol.* 55:113–120.

Blaustein M.P., Leenen F.H.H., Chen L., Golovina V.A., Hamlyn J.M., Pallone T.L., Huysse J.W.V., Zhang J. and Wier W.G. 2012. How NaCl raises blood pressure: a new paradigm for the pathogenesis of salt-dependent hypertension. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 302:H1031–H1049.

- Bonjour J.-P. 2005. Dietary Protein: An Essential Nutrient For Bone Health. *J. Am. Coll. Nutr.* 24:526S–536S.
- Bonjour J.-P. 2013. Nutritional disturbance in acid–base balance and osteoporosis: a hypothesis that disregards the essential homeostatic role of the kidney. *Br. J. Nutr.* 110:1168–1177.
- Bord C., Guerinon D. and Lebecque A. 2015. Impact of heating on sensory properties of French Protected Designation of Origin (PDO) blue cheeses. Relationships with physicochemical parameters. *Food Sci. Technol. Int.* [Epub ahead of print]. doi:10.1177/1082013215605201.
- Boutrou R., Gaucheron F., Piot M., Michel F., Maubois J.-L. and Léonil J. 1999. Changes in the composition of juice expressed from Camembert cheese during ripening. *Lait* 79(5): 503-513.
- Brulé G. 1991. Caractéristiques physico-chimiques des protéines du lait: aptitude à la coagulation. Journée sur la qualité des laits à la production et aptitude fromagère. *In* Collo. INRA-ENSA Rennes. 23–24 janvier.
- Brulé G., Lenoir J. and Remeuf F. 2006. La micelle de caséine et la coagulation du lait. *In* Le fromage. A. Eck and J.C. Gillis, editors. Paris, France: Lavoisier Tec & Doc. 7–41 pp.
- Buchowski M.S. 2015. Calcium in the Context of Dietary Sources and Metabolism. *In* V.R. Preedy, editor. Food and Nutritional Components *in* Focus. Royal Society of Chemistry, Cambridge. 3–20.
- Buchowski M.S., and Miller D.D. 1990. Calcium Bioavailability from Ripening Cheddar Cheese. *J. Food Sci.* 55:1293–1295.

C

- Cao J.J., Johnson L.K. and Hunt J.R. 2011. A Diet High in Meat Protein and Potential Renal Acid Load Increases Fractional Calcium Absorption and Urinary Calcium Excretion without Affecting Markers of Bone Resorption or Formation in Postmenopausal Women. *J. Nutr.* 141(3):391–397.
- Cashman K.D. 2002. Calcium intake, calcium bioavailability and bone health. *Br. J. Nutr.* 87:S169–S177.
- Charles P. 1992. Calcium absorption and calcium bioavailability. *J. Intern. Med.* 231:161–168.
- Chekri R., Noël L., Millour S., Vastel C., Kadar A., Sirot V., Leblanc J.-C. and Guérin T. 2012. Calcium, magnesium, sodium and potassium levels in foodstuffs from the second French Total Diet Study. *J. Food Compos. Anal.* 25:97–107.
- Choisy C., Desmazeaud M., Gripon J., Lamberet G. and Lenoir J. 1997. La biochimie de l'affinage. *In* Le fromage. A. Eck and J.C. Gillis, editors. Paris, France: Lavoisier Tec & Doc. 86–164 pp.

- Choi Y.M., Jung K.C., Jo H.M., Nam K.W., Choe J.H., Rhee M.S. and Kim B.C. 2014. Combined effects of potassium lactate and calcium ascorbate as sodium chloride substitutes on the physicochemical and sensory characteristics of low-sodium frankfurter sausage. *Meat Sci.* 96:21–25.
- Cichoscki A.J., Valduga E., Valduga A.T., Tornadijo M.E. and Fresno J.M. 2002. Characterization of Prato cheese, a Brazilian semi-hard cow variety: evolution of physico-chemical parameters and mineral composition during ripening. *Food Control.* 13:329–336.
- Clancy J. and McVicar A. 2007. Short-term regulation of acid-base homeostasis of body fluids. *Br. J. Nurs.* 16: 1016–1021.
- Cochrane N.J. and Reynolds E.C. 2012. Calcium Phosphopeptides — Mechanisms of Action and Evidence for Clinical Efficacy. *Adv. Dent. Res.* 24:41–47.
- Cogan M.G., Carneiro A.V., Tatsuno J., Colman J., Krapf R., Morris R.C. and Sebastian A. 1990. Normal diet NaCl variation can affect the renal set-point for plasma pH-(HCO₃⁻) maintenance. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 1:193–9.
- Cohen R., Feldman G. and Fernandez C. 1997. The balance of acid, base and charge in health and disease. *Kidney Int.* 52:287–293.
- Cordain L., Eaton S.B., Sebastian A., Mann N., Lindeberg S., Watkins B., O’Keefe J.H. and Brand-Miller J. 2005. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am. J. Clin. Nutr.* 81:341–54.
- Crisà A. 2013. Milk Carbohydrates and Oligosaccharides. *In Milk and Dairy Products in Human Nutrition.* Park Y.W. & Haenlein G.F.W. editors. John Wiley & Sons, Oxford. 129–147.
- Cruz A.G., Faria J.A.F., Pollonio M.A.R., Bolini H.M.A., Celeghini R.M.S., Granato D. and Shah N.P. 2011. Cheeses with reduced sodium content: Effects on functionality, public health benefits and sensory properties. *Trends Food Sci. Technol.* 22:276–291.
- D**
- De Freitas I., Pinon N., Thierry A. and Lopez C. 2007. In depth dynamic characterisation of French PDO Cantal cheese made from raw milk. *Lait.* 87:97–117.
- Demigné C. 2008. Fonctionnalité alcalinisante. *In Aliments fonctionnels (2e ed).* Roberfroid M., Coxam V. & Delzenne N. Editeurs. Lavoisier, Paris, France. 541–558.
- Demigné C., Davicco M. and Coxam V. 2013. Etats des lieux : Alimentation et équilibre acido-basique. *Fonds Fr. Aliment. Santé.* 8 pp.
- Demigné C., Sabboh H., Puel C., Rémésy C. and Coxam V. 2004a. Organic anions and potassium salts in nutrition and metabolism. *Nutr. Res. Rev.* 17:249–58.
- Demigné C., Sabboh H., Rémésy C. and Meneton P. 2004b. Protective Effects of High Dietary Potassium: Nutritional and Metabolic Aspects. *J. Nutr.* 134:2903–2906.

- Desmazeaud M., 1992. Les bacteries lactiques. In : Les groupes microbiens d'intérêt laitier. J. Hermier , J. Lenoir , F. Weber , CEPIL, Centre de formation permanente et de perfectionnement des cadres des industries du lait. Ed. CEPIL, Paris. 9-60 pp.
- Desmazeaud M. 1997. La maturation du lait, les apports de facteurs de croissance et les effets des systèmes antibactériens. *In* Le fromage. A. Eck and J.C. Gillis, editors. Lavoisier Tec & Doc, Paris. 270–280 pp.
- De Souza R.J., Mente A., Maroleanu A., Cozma A.I., Ha V., Kishibe T., Uleryk E., Budyłowski P., Schönemann H., Beyene J. and Anand S.S. 2015. Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ*. 351:h3978.
- Devine A., Dick I.M., Islam A.F., Dhaliwal S.S. and Prince R.L. 2005. Protein consumption is an important predictor of lower limb bone mass in elderly women. *Am. J. Clin. Nutr.* 81:1423–1428.
- Doyle M.E. and Glass K.A. 2010. Sodium Reduction and Its Effect on Food Safety, Food Quality, and Human Health. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9:44–56.
- Duff T.L. and Whiting S.J. 1998. Calciuric effects of short-term dietary loading of protein, sodium chloride and potassium citrate in prepubescent girls. *J. Am. Coll. Nutr.* 17:148–154.

E

- Eck A. and Gillis J.C., 1997. Le fromage. Lavoisier Tec & Doc, Paris. 889 pp.
- El-Bakry M. 2012. Salt in Cheese: A Review. *Curr. Res. Dairy Sci.* 4:1–5.

F

- FAO. 1995. Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Ed. FAO, Rome. 271 pp.
- Feskanich D., Willett W.C., Stampfer M.J. and Colditz G.A. 1996. Protein consumption and bone fractures in women. *Am. J. Epidemiol.* 143:472–479.
- Floury J., Camier B., Rousseau F., Lopez C., Tissier J.-P. and Famelart M.-H. 2009. Reducing salt level in food: Part 1. Factors affecting the manufacture of model cheese systems and their structure–texture relationships. *LWT - Food Sci. Technol.* 42:1611–1620.
- Fox P.F. and Guinee T.P. 2013. Cheese Science and Technology. *In* Milk and Dairy Products in Human Nutrition. Park Y.W. and Haenlein G.F.W. editors. John Wiley & Sons, Oxford. 357–389 pp.
- Fox P.F., McSweeney P.L.H., Cogan T.M. and Guinee T.P. 2004. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: General Aspects. Academic Press, Oxford. 646 pp.

- Frassetto L., Lanham-New S., Macdonald H.M., Remer T., Sebastian A., Tucker K.L. and Tyllavsky F.A. 2007a. Standardizing Terminology for Estimating the Diet-Dependent Net Acid Load to the Metabolic System. *J. Nutr.* 137:1491–1492.
- Frassetto L., Morris R.C., Sellmeyer D.E., Todd K. and Sebastian A. 2001. Diet, evolution and aging. *Eur. J. Nutr.* 40:200–213.
- Frassetto L., Todd K.M., Morris R.C. and Sebastian A. 1998. Estimation of net endogenous noncarbonic acid production in humans from diet potassium and protein contents. *Am. J. Clin. Nutr.* 68:576–583.
- Frassetto L., Morris C. and Sebastian A. 2007b. Dietary sodium chloride intake independently predicts the degree of hyperchloremic metabolic acidosis in healthy humans consuming a net acid-producing diet. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 293:F521–F525.

G

- Ganesan B., Brown K., Irish D.A., Brothersen C. and McMahon D.J. 2014. Manufacture and sensory analysis of reduced- and low-sodium Cheddar and Mozzarella cheeses. *J. Dairy Sci.* 97:1970–1982.
- Gaucheron F. 2004. Minéraux et produits laitiers. Tec&Doc. 922 pp.
- Gaucheron F. 2005. The minerals of milk. *Reprod Nutr Dev.* 45:473–483.
- Gaucheron F. 2013. Milk Minerals, Trace Elements, and Macroelements. *In Milk and Dairy Products in Human Nutrition.* Park Y.W. and Haenlein G.F.W. editors. John Wiley & Sons, Oxford. 172–199 pp.
- Gaucheron F., Graet Y.L. and Schuck P. 2004. Equilibres minéraux et conditions physicochimiques. *In Minéraux et produits laitiers.* Gaucheron F. editor. Lavoisier Tec & Doc, Paris. 219–280.
- Gimeno O., Astiasarán I. and Bello J. 2001. Influence of partial replacement of NaCl with KCl and CaCl₂ on microbiological evolution of dry fermented sausages. *Food Microbiol.* 18:329–334.
- Ginty F. 2003. Dietary protein and bone health. *Proc. Nutr. Soc.* 62:867–876.
- Gluck S.L. 1998. Acid-base. *The Lancet.* 352:474–479.
- González-Martín I., Hernández-Hierro J.M., Revilla I., Vivar-Quintana A. and Lobos Ortega I. 2011. The mineral composition (Ca, P, Mg, K, Na) in cheeses (cow's, ewe's and goat's) with different ripening times using near infrared spectroscopy with a fibre-optic probe. *Food Chem.* 127:147–152.
- Gordon M.H. 2013. Milk Lipids. *In Milk and Dairy Products in Human Nutrition.* Park Y.W. and Haenlein G.F.W. editors. John Wiley & Sons, Oxford. 65–79 pp.

- Gore E., Mardon J., Guerinon D. and Lebecque A. 2016. Exploratory study of acid-forming potential of commercial cheeses: impact of cheese type. *Int. J. Food Sci. Nutr.* [Epub ahead of print]. Doi:10.3109/09637486.2016.1166188.
- Grappin R., Lefier D. and Mazerolles G. 2006. Analyse du lait et des produits laitiers. *In* La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques. Lavoisier Tec & Doc, Paris 349–583 pp.
- Graulet B., Martin B., Agabriel C. and Girard C.L. 2013. Vitamins in Milks. *In* Milk and Dairy Products in Human Nutrition. Park Y.W. and Haenlein G.F.W. editors. John Wiley & Sons, Oxford. 200–219 pp.
- Green J. and Kleeman C.R. 1991. Role of bone in regulation of systemic acid-base balance. *Kidney Int.* 39:9–26.
- Grummer J., Bobowski N., Karalus M., Vickers Z. and Schoenfuss T. 2013. Use of potassium chloride and flavor enhancers in low sodium Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 96:1401–1418.
- Grummer J., Karalus M., Zhang K., Vickers Z. and Schoenfuss T.C. 2012. Manufacture of reduced-sodium Cheddar-style cheese with mineral salt replacers. *J. Dairy Sci.* 95:2830–2839.
- Grunert K.G., Bech-Larsen T. and Bredahl L. 2000. Three issues in consumer quality perception and acceptance of dairy products. *Int. Dairy J.* 10:575–584.
- Guéguen L. 1997. La valeur nutritionnelle minérale du lait de chèvre. *In* Intérêts nutritionnel et diététique du lait de chèvre. Editions Quae, Niort (France). 67–80 pp.
- Guenther P.M., Casavale K.O., Reedy J., Kirkpatrick S.I., Hiza H.A.B., Kuczynski K.J., Kahle L.L. and Krebs-Smith S.M. 2013. Update of the Healthy Eating Index: HEI-2010. *J. Acad. Nutr. Diet.* 113:569–580.
- Guinee T.P. 2004. Salting and the role of salt in cheese. *Int. J. Dairy Technol.* 57:99–109.
- Guinee T.P. and Fox P.F. 2004. Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. *In* Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Fox P.F., McSweeney P.L.H., Cogan T.M. and Guinee T.P. editors. Elsevier Academic Press, San Diego, CA. 207–259 pp.
- Guinee T.P., Mulholland E.O., Mullins C. and Corcoran M.O. 2000. Effect of salting method on the composition, yield and functionality of low moisture Mozzarella cheese. *Milchwissenschaft.* 55:135–138.
- Gursoy O., Gokce R., Con A.H. and Kinik O. 2014. Survival of Bifidobacterium longum and its effect on physicochemical properties and sensorial attributes of white brined cheese. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 65:816–820.

H

- Hannan M.T., Tucker K.L., Dawson-Hughes B., Cupples L.A., Felson D.T. and Kiel D.P. 2000. Effect of dietary protein on bone loss in elderly men and women: the Framingham Osteoporosis Study. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 15:2504–2512.

- Hardy J. 1983. Diffusion et distribution du chlorure de sodium dans les fromages. Influence sur l'activité de l'eau et les propriétés de sorption de l'eau. Thèse : Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy. 175 pp.
- Hardy J. 1997. L'activité de l'eau et le salage des fromages. *In* Le fromage. Eck A. & Gillis J.C, editors. Lavoisier Tec & Doc, Paris. 63–83 pp.
- He F.J., Burnier M. and MacGregor G.A. 2011. Nutrition in cardiovascular disease: salt in hypertension and heart failure. *Eur. Heart J.* 32:3073–3080.
- Hermier J. and Cerf O. 2006. Les traitements thermiques. *In* Le fromage. Eck A. & Gillis J.C, editors. Lavoisier Tec & Doc, Paris. 257–260 pp.
- Hickey C.D., Auty M.A.E., Wilkinson M.G. and Sheehan J.J. 2015. The influence of cheese manufacture parameters on cheese microstructure, microbial localisation and their interactions during ripening: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 41:135–148.
- Hoebertz A. and Arnett T.R. 2003. Isolated osteoclast cultures. *Methods Mol. Med.* 80:53–64.

I

- INAO. 2015. Institut national de l'origine et de la qualité. [cited 2016 March 26]. Available from: <http://www.inao.gouv.fr/>
- INAO. 2016. Appellation d'origine protégée - Appellation d'origine contrôlée. *INAO*. [cited 2016 April 26]. Available from: <http://www.inao.gouv.fr/Les-signes-officiels-de-la-qualite-et-de-l-origine-SIQQ/Appellation-d-origine-protgee-Appellation-d-origine-controlee>
- ISO. 2010. Analyse sensorielle - Directives générales pour la conception de locaux destinés à l'analyse. (NF EN ISO 8589). International Standard Organization, Geneva. 25 pp.
- ISO. 2012. Analyse sensorielle - Méthodologie - Méthode d'éveil à la sensibilité gustative. (NF ISO 3972). International Standard Organization, Geneva. 17 pp.

J

- Jacquot S., Karoui R., Abbas K., Lebecque A., Bord C. and Aït-Kaddour A. 2015. Potential of Multispectral Imager to Characterize Anisotropic French PDO Cheeses: A Feasibility Study. *Int. J. Food Prop.* 18:213–230.
- Jakob E., Amrein R. and Winkler H. 2005. Influence de la saumure sur la qualité du fromage. Département Fédéral de l'économie, Suisse. 16 pp.
- Jaoude D.A., Olabi A., Najm N.E.O., Malek A., Saadeh C., Baydoun E. and Toufeili I. 2010. Chemical composition, mineral content and cholesterol levels of some regular and reduced-fat white brined cheeses and strained yogurt (Labneh). *Dairy Sci. Technol.* 90:699–706.

- Jeanson S. 2000. La maturation du lait dans la fabrication de fromages à pâte pressée cuite : le rôle des lactocoques. Thèse : Université de Bourgogne, Dijon. 243 pp.
- Jensen R., Blanc B. and Patton S. 1995. Particulate Constituents in Human and Bovine Milk. *In Handbook of Milk Composition*. Jensen R. editor. Elsevier Academic Press, San Diego, CA. 50–62 pp.
- Johnson M.E., Kapoor R., McMahon D.J., McCoy D.R. and Narasimmon R.G. 2009. Reduction of Sodium and Fat Levels in Natural and Processed Cheeses: Scientific and Technological Aspects. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 8:252–268.
- Jones K.W., Eller L.K., Parnell J.A., Doyle-Baker P.K., Edwards A.L. and Reimer R.A. 2013. Effect of a dairy- and calcium-rich diet on weight loss and appetite during energy restriction in overweight and obese adults: a randomized trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* 67:371–376.
- Josse A.R., Atkinson S.A., Tarnopolsky M.A. and Phillips S.M. 2012. Diets Higher in Dairy Foods and Dietary Protein Support Bone Health during Diet- and Exercise-Induced Weight Loss in Overweight and Obese Premenopausal Women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97:251–260.

K

- Kamleh R., Olabi A., Toufeili I., Najm N.E.O., Younis T. and Ajib R. 2012. The effect of substitution of sodium chloride with potassium chloride on the physicochemical, microbiological, and sensory properties of Halloumi cheese. *J. Dairy Sci.* 95:1140–1151.
- Katsiari M.C., Voutsinas L.P., Alichanidis E. and Roussis I.G. 1997. Reduction of Sodium Content in Feta Cheese by Partial Substitution of NaCl by KCl. *Int Dairy J.* 7:465–472.
- Katsiari M. and Voutsinas L.P. 1998. Manufacture of Kefalograviera cheese with less sodium by partial replacement of NaCl with KCl. *Food Chem.* 61:63–70.
- Kaur, A., Bala R., Singh B. and Rehal J. 2011. Effect of Replacement of Sodium Chloride with Mineral Salts on Rheological Characteristics of Wheat Flour. *Am. J. Food Technol.* 6:674–684.
- Kerstetter J.E., O'Brien K.O., Caseria D.M., Wall D.E. and Insogna K.L. 2005. The impact of dietary protein on calcium absorption and kinetic measures of bone turnover in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90:26–31.

L

- Lacrampe J.L., Hardy J., Ramet J.P. and Weber F. 1971. Contribution à l'étude de l'évolution chimique et du traitement des saumures de fromagerie. *Lait.* 51:158–175.
- Lacroix M., Han J., Britten M., Champagne C.P. and Fustier P. 2013. Cheese Fortification. *In Handbook of Food Fortification and Health*. Preedy V.R., Srirajaskanthan R. and Patel V.B. editors. Springer New York. 71–86 pp.

- Lante A., Lomolino G., Cagnin M. and Spettoli P. 2006. Content and characterisation of minerals in milk and in Crescenza and Squacquerone Italian fresh cheeses by ICP-OES. *Food Control*. 17:229–233.
- Le Graet Y. and Brulé G. 1988. Migration des macro et oligo-éléments dans un fromage à pâte molle de type Camembert. *Lait*. 68:219–234.
- Le Graet Y. and Brulé G. 1993. Effects of pH and ionic strength on distribution of mineral salts in milk. *Lait*. 73:51–60.
- Le Graet Y., Lepienne A., Brulé G. and Ducruet P. 1983. Migration du calcium et des phosphates inorganiques dans les fromages à pâte molle de type Camembert au cours de l'affinage. *Lait*. 63:317–332.
- Lemann J., Bushinsky D.A. and Hamm L.L. 2003. Bone buffering of acid and base in humans. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 285:F811–32.
- Le Minous A.-E. 2004. Réduction et substitution du sel dans les produits transformés. Guide : Programme Nutrition Santé, Bretagne. 109 pp.
- Lenoir J. and Remeuf F. 2006. L'ajoutement du pH et des équilibres salins. *In* Le fromage. Eck A. & Gillis J.C, editors. Lavoisier Tec & Doc, Paris. 280–286.
- Lewis N.M., Marcus M.S., Behling A.R. and Greger J.L. 1989. Calcium supplements and milk: effects on acid-base balance and on retention of calcium, magnesium, and phosphorus. *Am. J. Clin. Nutr*. 49:527–533.
- Lucas A., Agabriel C., Martin B., Ferlay A., Verdier-Metz I., Coulon J.-B. and Rock E. 2006a. Relationships between the conditions of cow's milk production and the contents of components of nutritional interest in raw milk farmhouse cheese. *Lait*. 86:177–202.
- Lucas A., Hulin S., Michel V., Agabriel C., Chamba J.-F., Rock E. and Coulon J.B. 2006b. Relations entre les conditions de production du lait et les teneurs en composés d'intérêt nutritionnel dans le fromage : étude en conditions réelles de production. *INRA Prod. Anim*. 19:15–28.
- Lucas A., Rock E., Chamba J., Verdier-Metz I., Brachet P. and Coulon J.B. 2006c. Respective effects of milk composition and the cheese-making process on cheese compositional variability in components of nutritional interest. *Lait*. 86:21–41.

M

- Macdonald H.M., New S.A., Fraser W.D., Campbell M.K. and Reid D.M. 2005. Low dietary potassium intakes and high dietary estimates of net endogenous acid production are associated with low bone mineral density in premenopausal women and increased markers of bone resorption in postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr*. 81:923–33.
- Mardon J. 2007. Contribution des apports protéiques à l'acquisition et au maintien du capital osseux - approche in vivo. Thèse : Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand. 143 pp.

- Mardon J., Habauzit V., Trzeciakiewicz A., Davicco M.-J., Lebecque P., Mercier S., Tressol J.-C., Horcajada M.-N., Demigné C. and Coxam V. 2008. Long-Term Intake of a High-Protein Diet with or without Potassium Citrate Modulates Acid-Base Metabolism, but Not Bone Status, in Male Rats. *J. Nutr.* 138:718–724.
- Marilley L. and Casey M.G. 2004. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int. J. Food Microbiol.* 90:139–159.
- Matkovic V., Ilich J.Z., Andon M.B., Hsieh L.C., Tzagournis M.A., Lagger B.J. and Goel P.K. 1995. Urinary calcium, sodium, and bone mass of young females. *Am. J. Clin. Nutr.* 62:417–425.
- Maubois J.L. 1997. La standardisation de la teneur en protéines des laits. In *Le fromage*. Eck A. & Gillis J.C, editors. Lavoisier Tec & Doc, Paris. 274–280.
- May R.C., Kelly R.A. and Mitch W.E. 1986. Metabolic acidosis stimulates protein degradation in rat muscle by a glucocorticoid-dependent mechanism. *J. Clin. Invest.* 77:614–621.
- McSweeney P.L.H. 2004. Biochemistry of cheese ripening. *Int. J. Dairy Technol.* 57:127–144.
- McSweeney P.L.H. and Fox P.F. 2004. Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate. In *Cheese: General aspects*. Fox P.F., McSweeney P., Cogan T., and Guinee T., editors. Elsevier Academic Press. 361–371.
- McSweeney P.L.H. and Sousa M.J. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait.* 80:293–324.
- Melilli C., Barbano D.M., Caccamo M., Tuminello L., Carpino S. and Licitra G. 2006. Interaction of Brine Concentration, Brine Temperature, and Presalting on Salt Penetration in Ragusano Cheese1. *J. Dairy Sci.* 89:1420–1438.
- Mietton B., Gaucheron F. and Salaun-Michel F. 2004. Minéraux et transformations fromagères. In *Minéraux et produits laitiers*. Gaucheron F. editor. Lavoisier Tec & Doc, Paris. 472–563.
- Miller G.D., DiRienzo D.D., Reusser M.E. and McCarron D.A. 2000. Benefits of dairy product consumption on blood pressure in humans: a summary of the biomedical literature. *J. Am. Coll. Nutr.* 19:147S–164S.
- Ministère de l’agriculture, de l’agroalimentaire et de la forêt. 2013. Rapport du groupe PNNS/PNA sur le sel. 63 pp.
- Mitch W. 2008. Metabolic Acidosis: Metabolic and Clinical Consequences. *Davitas Clin. J. Nephrol.* 21–24.
- Mitch W.E. and Goldberg A.L. 1996. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *N. Engl. J. Med.* 335:1897–905.
- Mora-Gutierrez A., Farrell H.M., Attaie R., McWhinney V.J. and Wang C. 2007. Influence of bovine and caprine casein phosphopeptides differing in alphas1-casein content in determining the absorption of calcium from bovine and caprine calcium-fortified milks in rats. *J. Dairy Res.* 74:356–366.

- Moreno-Rojas R., Amaro-Lopez M.A., Garcia-Gimeno R.H. and Zurera-Cosano G. 1995. Effects of Manchego-type cheese-making process on contents of mineral elements. *Food Chem.* 53:435–439.
- Moreno-Rojas R., Cámara-Martos F., Sánchez-Segarra P.J. and Amaro-López M.Á. 2012. Influence of manufacturing conditions and discrimination of Northern Spanish cheeses using multi-element analysis. *Int. J. Dairy Technol.* 65:594–602.
- Moreno-Rojas R., Zurera-Cosano G. and Amaro-Lopez M.A. 1994. Concentration and seasonal variation of calcium, magnesium, sodium and potassium in raw cow, ewe and goat milk. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 45:99–105.
- Morris H.A., Guinee T.P. and Fox P.F. 1985. Salt Diffusion in Cheddar Cheese. *J. Dairy Sci.* 68:1851–1858.
- Morris R.C., Schmidlin O., Frassetto L.A. and Sebastian A. 2006. Relationship and interaction between sodium and potassium. *J. Am. Coll. Nutr.* 25:262S–270S.

N

- Narcy A., Robert L., Mazur A., Demigné C. and Rémésy C. 2006. Effect of potato on acid–base and mineral homeostasis in rats fed a high-sodium chloride diet. *Br. J. Nutr.* 95:925–932.
- Neel J.V. 1999. When Some Fine Old Genes Meet a New Environment. *In World Review of Nutrition and Dietetics.* Simopoulos A.P., editor. KARGER, Basel. 1–18.
- Notz E. 1997. Etat des connaissances concernant l’affinage et la maîtrise de la qualité des fromages à pâte pressée cuite. Tome 1. Les facteurs intervenant sur les aptitudes à la conservation des fromages avant l’affinage. ITG, Poligny, France. 97 pp.

O

- Oh M.S. 2000. ACID-BASE IN RENAL FAILURE: New Perspectives on Acid-Base Balance. *Semin. Dial.* 13:212–219.
- OMS. 2014. Réduction du sel. *WHO.* [cited 2015 April 11]. Available from : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs393/fr/>
- Osther P.J. 2006. Effect of acute acid loading on acid-base and calcium metabolism. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 40:35–44.

P

- Pedone C., Napoli N., Pozzilli P., Lauretani F., Bandinelli S., Ferrucci L. and Antonelli-Incalzi R. 2010. Quality of diet and potential renal acid load as risk factors for reduced bone density in elderly women. *Bone.* 46:1063–7.

- Piacere A. and Elsen J.M. 1992. Aptitude fromagere du lait et polymorphisme des proteines. *INRA Prod. Anim.* 123–128.
- Pickering W.P., Price S.R., Bircher G., Marinovic A.C., Mitch W.E. and Walls J. 2002. Nutrition in CAPD: serum bicarbonate and the ubiquitin-proteasome system in muscle. *Kidney Int.* 61:1286–1292.
- Poupin N., Calvez J., Lassale C., Chesneau C. and Tomé D. 2012. Impact of the diet on net endogenous acid production and acid-base balance. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* 31:313–21.
- Price S.R., Bailey J.L., Wang X., Jurkovitz C., England B.K., Ding X., Phillips L.S. and Mitch W.E. 1996. Muscle wasting in insulinopenic rats results from activation of the ATP-dependent, ubiquitin-proteasome proteolytic pathway by a mechanism including gene transcription. *J. Clin. Invest.* 98:1703–1708.
- Prieto B., Franco I., Fresno J.M., Bernardo A. and Carballo J. 2000. Picón Bejes-Tresviso blue cheese: an overall biochemical survey throughout the ripening process. *Int. Dairy J.* 10:159–167.
- Prieto B., Franco I., Prieto J.G., Bernardo A. and Carballo J. 2002. Compositional and Physico-chemical Modifications during the Manufacture and Ripening of León Raw Cow's Milk Cheese. *J. Food Compos. Anal.* 15:725–735.
- R**
- Ramet J.P. 1985. La fromagerie et les variétés de fromages du bassin Méditerranéen. Organisation des nations unies pour L'Alimentation et L'Agriculture, Rome. 187 pp.
- Randoin L. and Jourdan C. 1952a. Détermination des teneurs en eau et matière sèche, en calcium et en phosphore de deux variétés de fromages à pâte demi-dure et à moisissures internes. *Lait.* 481–485.
- Randoin L. and Jourdan C. 1952b. Vue d'ensemble sur les valauers calcio-phosphoriques de 23 variétés de fromages (frais, à pâte molle, demi-dure ou ferme, fondus). Relations entre ces valeurs et les techniques de fabrication des différents fromages. *Lait.* 32:607–616.
- Reaich D., Channon S.M., Scrimgeour C.M. and Goodship T.H. 1992. Ammonium chloride-induced acidosis increases protein breakdown and amino acid oxidation in humans. *Am. J. Physiol.* 263:E735–739.
- Reddy K.A. and Marth E.H. 1994. Sensory Evaluation of Cheddar Cheese Made with Sodium Chloride or Mixtures of Sodium and Potassium Chloride. *J. Sens. Stud.* 9:187–204.
- Remer T. 2000. Influence of diet on acid-base balance. *Semin. Dial.* 13:221–6.
- Remer T. 2001. Influence of nutrition on acid-base balance–metabolic aspects. *Eur. J. Nutr.* 40:214–20.
- Remer T. 2003. High Meat Diet, Acid-Base Status and Calcium Retention. *Am. Soc. Nutr. Sci. J Nutr.* 133:3239.

- Remer T., Dimitriou T. and Manz F. 2003. Dietary potential renal acid load and renal net acid excretion in healthy, free-living children and adolescents. *Am. J. Clin. Nutr.* 77:1255–60.
- Remer T. and Manz F. 1994. Estimation of the renal net acid excretion by adults consuming diets containing variable amounts of protein. *Am. J. Clin. Nutr.* 59:1356–61.
- Remer T. and Manz F. 1995. Potential Renal Acid Load of Foods and its Influence on Urine pH. *J. Am. Diet. Assoc.* 95:791–797.
- Renner E. 1993. Nutritional aspects of cheese. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 2nd edn. Fox P.F., editor. Chapman & Hall, London. 557–579 pp.
- Reykdal O. and Lee K. 1993. Validation of chemical measures of calcium with bioassay of calcium-fortified cottage cheese. *Food Chem.* 47:195–200.
- Rodríguez-Bayona B. and Peragón J. 1998. Stimulation of rat-liver branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase activity by chronic metabolic acidosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30:529–534.
- Ruidavets J.-B., Bongard V., Simon C., Dallongeville J., Ducimetière P., Arveiler D., Amouyel P., Bingham A. and Ferrières J. 2006. Independent contribution of dairy products and calcium intake to blood pressure variations at a population level. *J. Hypertens.* 24:671–681.
- Rulikowska A., Kilcawley K., Doolan I., Alonso-Gomez M., Nongonierma A., Hannon J. and Wilkinson M. 2013. The impact of reduced sodium chloride content on Cheddar cheese quality. *Int. Dairy J.* 28:45–55.
- Rylander R., Remer T., Berkemeyer S. and Vormann J. 2006. Acid-base status affects renal magnesium losses in healthy, elderly persons. *J. Nutr.* 136:2374–7.

S

- Sabboh H., Coxam V., Horcajada M.-N., Rémésy C. and Demigné C. 2007. Effects of plant food potassium salts (citrate, galacturonate or tartrate) on acid-base status and digestive fermentations in rats. *Br. J. Nutr.* 98:72–7.
- Saint-Eve A., Laverjat C., Magnan C., Déléris I. and Souchon I. 2009. Reducing salt and fat content: Impact of composition, texture and cognitive interactions on the perception of flavoured model cheeses. *Food Chem.* 116:167–175.
- Schmidlin O., Forman A., Tanaka M., Sebastian A. and Morris R.C. 1999. NaCl-induced renal vasoconstriction in salt-sensitive African Americans: antipressor and hemodynamic effects of potassium bicarbonate. *Hypertension.* 33:633–639.
- Schroeder, C.L. 1983. Sensory, microbiological, chemical, and rheological properties of reduced sodium Cheddar cheese. Thèse : Oregon State university, Corvallis. 198 pp.

- Schroeder C.L., Bodyfelt F.W., Wyatt C.J. and McDaniel M.R. 1988. Reduction of Sodium Chloride in Cheddar Cheese: Effect on Sensory, Microbiological, and Chemical Properties. *J. Dairy Sci.* 71:2010–2020.
- Sellmeyer D.E., Stone K.L., Sebastian A. and Cummings S.R. 2001. A high ratio of dietary animal to vegetable protein increases the rate of bone loss and the risk of fracture in postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 73:118–122.
- Shaw J.C. 1989. Nonmetabolizable base balance: effect of diet composition on plasma pH. *J. Nutr.* 119:1789–1798.
- Shortt C., Madden A., Flynn A. and Morrissey P.A. 1988. Influence of dietary sodium intake on urinary calcium excretion in selected Irish individuals. *Eur. J. Clin. Nutr.* 42:595–603.
- Singh G. and Muthukumarappan K. 2008. Influence of calcium fortification on sensory, physical and rheological characteristics of fruit yogurt. *LWT - Food Sci. Technol.* 41:1145–1152.
- St-Gelais D. and Tirard-Collet P. 2002. Fromage. *In Science et technologie du lait : transformation du lait.* Presses internationales Polytechnique, Montréal. 349–415 pp.

U

- Urala N. and Lähteenmäki L. 2003. Reasons behind consumers' functional food choices. *Nutr. Food Sci.* 33:148–158.
- USDA Food and Nutrient Database. 2016. Teneur en méthionine des aliments. U.S. and International Nutrient Databases. [cited 2015 April 25]. Available from : <http://dietgrail.com/teneur-en-methionine-des-aliments/>

V

- Vavrusova M. and Skibsted L.H. 2014. Calcium nutrition. Bioavailability and fortification. *LWT - Food Sci. Technol.* 59:1198–1204.

W

- Walstra P. 1990. On the Stability of Casein Micelles. *J. Dairy Sci.* 73:1965–1979.
- Walstra P., Geurts J., Noomen A., Jellema A. and van Boekel M.A.J.S. 1999. Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes. Marcel Dekker Inc., New York. 752 pp.
- Walstra P., Wouters T.J. and Guerts J.T.M. 2005. Dairy Science and technology. Taylor & Francis Group, Boca Raton (Florida). 808 pp.
- Wiederkehr M. and Krapf R. 2001. Metabolic and endocrine effects of metabolic acidosis in humans. *Swiss Med. Wkly.* 131:127–132.

Wijesinha-Bettoni R. and Burlingame B. 2013. Milk and dairy product composition. *In Milk and Dairy Products in Human Nutrition*. Park Y.W. and Haenlein G.F.W. editors. John Wiley & Sons, Oxford. 41–103 pp.

Williams B., Layward E. and Walls J. 1991. Skeletal muscle degradation and nitrogen wasting in rats with chronic metabolic acidosis. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979. 80:457–462.

Z

Zamberlin S., Antunac N., Havranek J. and Samarzija D. 2012. Mineral elements in milk and dairy products. *Mljekarstvo*. 62:111–125.

