Etude biochimique de la fonte des fromages

III. Evolution des acides aminés libres et de la digestibilité *in vitro* des protéines

par

B. O. LEE et C. ALAIS*

1. INTRODUCTION

Dans la première communication [8] nous avons étudié l'évolution physico-chimique de la matière protéique au cours de la fonte du fromage et nous avons précisé le phénomène de « peptisation ». Nous nous sommes ensuite intéressés à une évolution plus biochimique, ayant des conséquences sur le plan de la nutrition.

Les études nutritionnelles sur le fromage fondu ne sont pas nombreuses et concernent plutôt les effets de l'administration orale des polyphosphates linéaires ; parmi celles-ci mentionnons les résultats de Ebel [6] qui montrent que ces sels sont scindés en orthophosphates et ne passent pas tels quels dans la circulation sanguine ; il n'exerceraient pas d'effet défavorable sur l'absorption du calcium et du fer. Selon Hall [7] les polyphosphates améliorent la digestibilité du lait et des produits laitiers pour enfants et convalescents. Plus récemment, Bijok [3, 4] a observé sur l'animal que la valeur nutritive des protéines des fromages fondus était supérieure à celle du fromage d'origine, bien qu'il ait noté des pertes en lysine libre au cours de la fonte à 120° C. La disponibilité de la lysine dans le fromage fondu a été également étudiée par Ney et Wirotama [11].

L'augmentation des acides aminés libres après la fonte a été observée par Clemens [5], Arnott *et al.* [2] et Prodanski [12].

Le travail présenté ici concerne les acides aminés libres après la fonte de fromages variés, dans diverses conditions de traitement et la libération des acides aminés par l'action d'un mélange de protéases.

* Laboratoire de Biochimie Appliquée, Université de Nancy I - F. 54037 Nancy Cedex.

2. MATERIEL ET METHODES

Nous avons analysé deux sortes de produits. Les fromages fondus industriels ont été obtenus à l'usine Rambol ; ils ont un extrait sec de 48 p.100 et contiennent 60 p.100 de matière grasse dans l'extrait sec ; la fonte est effectuée dans un pétrin « Stephan » de 80 kg avec des sels de fonte « Joha » constitués de polyphosphates. Les fromages fondus expérimentaux ont été obtenus au laboratoire dans un mixer « Sorvall ». Les températures et les doses de sels de fonte en p.100 de la masse totale sont indiquées dans chaque essai.

Le dosage des acides aminés libres a été fait après déprotéinisation d'une suspension de fromage par l'acide trichloracétique à 12 p.100 de concentration finale ; le réactif est éliminé par extraction à l'éther éthylique et les acides aminés (à l'exception du tryptophane) sont dosés dans un autoanalyseur « Technicon » NC-II-P avec un gradient discontinu de pH et réaction à la ninhydrine. Les quantités d'acides aminés seront données en g p.100 de protéine (16 g N) ; on indiquera aussi le taux d'hydrolyse enzymatique qui exprime le pourcentage des acides aminés par rapport à l'hydrolyse acide totale. Toutes les analyses ont été faites en double pour un même échantillon.

Les essais de digestion enzymatique *in vitro* ont été faits en utilisant la pepsine et la pancréatine selon Mauron *et al.* [9]. Après la double incubation, la réaction est stoppée par chauffage à 100° C ; la déprotéinisation et le dosage des acides aminés libérés sont faits comme ci-dessus. Ces essais ont porté sur trois préparations : a) la suspension totale du fromage à 5 p.100 dans une solution de citrate trisodique 0,5 M, suivie d'une délipidation par centrifugation à $1\,500 \times g$ et d'une dialyse ; b) la fraction non sédimentable de la suspension aqueuse à 5 p.100, soumise à un champ centrifuge de $300\,000 \times g$ durant 45 minutes à 20° C, qui renferme les substances non-caséiniques et la partie peptisée de la caséine ; c) le culot de l'ultracentrifugation, mis en suspension dans une solution à 2 p.100 de citrate trisodique.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Les acides aminés libres dans le fromage affiné et dans le fromage fondu

On considère ici le fromage fondu dans des conditions que l'on peut appeler standards : 100-105° C et 2,0-2,5 p.100 de polyphosphates. Les résultats apparaissent dans les colonnes b et e du tableau 1, pour l'essai de fonte expérimentale, et dans le tableau 2 pour la partie industrielle. Dans le premier cas, le total des acides

TABLEAU 1

Acides aminés libres (g/100 g protéines) dans le fromage fondu à différentes températures et avec différentes concentrations de sels de fonte (polyphosphates)

Température de fonte Sel de fonte	Fromage affiné	Fonte expérimentale							Fonte industrielle (*)		
		80	100				120	140	105		
		2	1	2	3	4	2	2	0,85	1,37	3,33
(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)	(j)	(k)	(l)
Asp	0,09	0,19	0,28	0,25	0,42	0,12	0,14	0,175	0,04	0,105	0,04
Thr	0,25	0,10	0,13	0,13	0,38	0,11	0,28	0,23	0,36	0,29	0,16
Ser	0,24	0,01	0,05	0,015	0,36	0,01	0,21	0,12	0,32	0,275	0,18
Glu	0,73	0,71	0,89	0,83	1,71	0,57	0,92	0,79	0,885	1,07	0,775
Pro	0,45	0,345	0,41	0,43	traces	0,25	0,49	0,47	0,55	0,64	0,43
Gly	0,10	0,12	0,12	0,13	0,07	0,12	0,12	0,12	0,11	0,12	0,09
Ala	0,14	0,06	0,11	0,13	0,245	0,06	0,14	0,14	0,17	0,19	0,14
Cys 1/2	0,015	0,005	0,02	0,005	traces	0,01	0,02	0,005	0,01	0,01	0,01
Val	0,29	0,32	0,31	0,33	0,48	0,30	0,34	0,32	0,385	0,44	0,315
Met	0,08	0,07	0,06	0,09	0,30	0,07	0,09	0,08	0,11	0,11	0,10
Ile	0,18	0,17	0,19	0,19	0,22	0,17	0,20	0,19	0,27	0,33	0,22
Leu	0,48	0,52	0,54	0,57	1,43	0,52	0,60	0,60	0,54	0,64	0,45
Tyr	0,11	0,075	0,09	0,09	0,88	0,08	0,10	0,09	0,07	0,06	0,03
Phe	0,21	0,23	0,23	0,25	0,70	0,21	0,25	0,245	0,32	0,22	0,22
Lys	0,47	0,54	0,54	0,57	0,68	0,52	0,58	0,55	0,59	0,70	0,47
His	0,16	0,11	0,06	0,125	0,26	0,08	0,18	0,17	0,18	0,19	0,19
Arg	0,015	traces	0,09	traces	0,08	traces	traces	traces	0,01	0,03	0,01
Totaux	4,10	3,57	4,12	4,13	8,24	3,21	4,67	4,28	4,92	5,41	3,84

(*) Fonte à partir d'une matière première complexe non analysée.

TABLEAU 2

Acides aminés libres (g p. 100 de protéines) dans différents fromages affinés et dans le fromage fondu correspondant (fonte industrielle à 105° avec 2,5 p. 100 de sels)

	Cheddar		Emmental		Mélange *	
	affiné	fondu	affiné	fondu	affiné	fondu
Asp	0,02	0,055	0,005	0,085	0,01	0,06
Thr	0,33	0,12	0,36	0,48	n.d.	0,21
Ser	0,24	0,165	0,45	0,56	n.d.	0,28
Glu	0,20	0,545	0,36	1,41	0,26	0,81
Pro	0,14	0,34	0,13	1,01	0,115	0,62
Gly	0,04	0,07	0,04	0,05	0,035	0,11
Ala	0,105	0,16	0,07	0,28	0,07	0,19
Cys 1/2	0,01	0,005	0,005	0,015	0,005	0,015
Val	0,21	0,23	0,16	0,07	0,15	0,31
Met	0,07	0,07	0,05	0,25	0,05	0,14
Ile	0,10	0,12	0,12	0,05	0,09	0,22
Leu	0,35	0,33	0,21	0,97	0,22	0,59
Tyr	0,06	0,06	0,06	0,21	0,05	0,125
Phe	0,20	0,33	0,16	0,50	0,15	0,22
Lys	0,28	0,95	0,24	0,94	0,22	0,85
His	0,06	0,06	0,02	0,26	0,03	0,17
Arg	0,07	0,07	0,02	0,03	0,02	0,03
Totaux	2,50	3,69	2,44	7,17	— (1,47)	4,95 (4,43)

* Mélange de Cheddar et d'Emmental (différents des précédents), n.d. non déterminé.

aminés libres est presque le même et les variations pour chaque acide aminé sont faibles, sauf pour Asp, Thr et Ser. Dans le cas de la fonte industrielle les variations sont beaucoup plus fortes ; le total des acides aminés libres est multiplié par 1,5 ou 3,0 après la fonte ; la plupart des acides aminés sont libres en plus forte proportion, en particulier la lysine dont l'accroissement va de 3 à 4. Ces résultats s'opposent à ceux de Bijok [4] qui concluait à une baisse de la lysine libre, ils vont par contre dans le même sens que ceux de Clemens [5], Arnott *et al.* [2] et Prodanski [12] ; la fonte industrielle provoque un enrichissement de la partie protidique du fromage fondu en acides aminés directement assimilables.

Il faut noter que la fonte en général n'accroît pas significativement les proportions d'azote non protéique, ni d'azote non-caséinique, et que les valeurs varient peu, dans le fromage fondu, lorsque les conditions techniques changent [8].

3.2. Influence de la température de fonte et de la concentration en sels de fonte sur les acides aminés libres

L'influence de ces deux paramètres technologiques importants apparaît dans le tableau 1. Lorsque la température est accrue, dans la fonte expérimentale avec une même dose de polyphosphates (2 p. 100), la quantité totale d'acides aminés libres augmente de 80 à 120° C ; au-delà, il se produit une chute (colonnes c, e, h, i). A 80° C il y a sensiblement moins d'acides aminés libres que dans le fromage affiné, ce qui est difficile à expliquer ; cependant, la quantité de lysine est accrue de 20 p. 100. L'augmentation observée à 120° C peut être due à un accroissement brusque de l'activité des protéases, avant leur inactivation (certaines protéases microbiennes des produits laitiers sont très thermorésistantes) [1]. La chute des valeurs à 140° C correspond à un début de dégradation. En dépit de ces variations, on remarque que le taux de lysine libre est presque constant.

Il est curieux de constater une analogie entre l'effet des fortes doses de polyphosphates et des températures élevées. La fonte à 3 p. 100 provoque une augmentation notable de tous les acides aminés, mais une dose excessive semble accélérer leur dégradation thermique.

3.3. Digestion enzymatique « in vitro »

La quantité d'acides aminés libérés par la pepsine et la pancréatine dans la suspension totale des fromages ainsi que le taux d'hydrolyse sont plus grands après la fonte qu'avant comme le montre le tableau 3, sauf pour Tyr et surtout pour Phe (Asp, Ser et Thr n'ont pu être déterminés exactement par suite de l'interférence de peptides). On remarque des différences importantes dans le taux d'hydrolyse ; Glu et Gly sont faiblement libérés ; Ala, Ile et Val, le sont plus fortement ; pour les autres acides aminés le taux est supérieur à 20 p. 100, après la fonte.

Etant donné que l'étape capitale du processus de fonte des fromages est la « peptisation » qui amène à l'état non sédimentable une partie plus ou moins importante du paracaséinate [8], nous avons cherché à savoir si les protéines non sédimentées après centrifugation se comportaient comme les protéines formant le culot, aussi bien dans le fromage affiné que dans le fromage fondu. Le tableau 3 révèle qu'il n'y a pas de différences régulières ni entre les deux types de protéines, ni entre le fromage affiné et le fromage fondu. Pour le fromage affiné, il y a plus d'acides aminés mieux libérés dans le culot (Phe, Tyr, Leu, Gly, Lys, His) que dans le surnageant ; pour le fromage fondu correspondant, les différences sont moins marquées ; 8 acides aminés sont libérés à deux taux voisins dans le culot et dans le surnageant (Glu, Val, Met, Leu, Lys, Phe, Tyr et Ala) ; la différence la plus importante concerne Ile (respectivement

TABLEAU 3

Libération des acides aminés par le mélange pepsine-pancréatine dans un fromage affiné et dans un fromage fondu :
g p. 100 de protéine. (...) taux d'hydrolyse par rapport à l'hydrolyse acide totale

	Fromage affiné			Fromage fondu (100° - 2 p. 100)		
	tot.	Culot	Surnageant	tot.	Culot	Surnageant
Glu	0,15 (0,74)	0,11 (0,53)	0,8 (3,3)	0,175 (0,92)	0,25 (1,4)	0,4 (2,0)
Gly	0,02 (1,02)	0,03 (1,5)	0,015 (0,8)	0,025 (1,3)	0,02 (1,0)	—
Ala	0,12 (4,27)	0,14 (4,6)	0,1 (4,3)	0,18 (6,5)	0,26 (7,4)	0,26 (10,0)
Val	0,62 (9,8)	0,51 (8,3)	0,61 (9,2)	0,77 (12,0)	0,41 (6,4)	0,38 (5,6)
Met	0,44 (24,25)	0,43 (20,0)	0,49 (22,6)	0,71 (30,4)	0,47 (23,8)	0,53 (25,0)
Ile	0,20 (4,05)	0,22 (4,6)	0,37 (7,1)	0,28 (5,4)	0,42 (8,0)	0,19 (36,3)
Leu	3,03 (32,7)	2,81 (31,9)	2,04 (22,1)	3,48 (37,7)	2,91 (31,7)	2,64 (28,1)
Tyr	1,72 (29,6)	1,35 (21,9)	0,24 (9,2)	1,54 (27,3)	2,2 (33,0)	1,36 (28,0)
Phe	2,73 (50,4)	1,29 (24,5)	0,78 (13,3)	1,66 (36,5)	1,91 (40,8)	1,56 (36,4)
Lys	2,11 (30,7)	2,91 (32,3)	1,94 (24,4)	2,46 (29,4)	2,47 (29,0)	1,94 (26,9)
His	0,59 (18,9)	0,76 (27,5)	0,38 (12,3)	0,74 (20,6)	0,88 (29,8)	0,45 (14,6)
Arg	1,18 (32,8)	1,28 (33,2)	1,025 (57,2)	1,49 (35,5)	1,69 (36,9)	0,98 (30,7)
Totaux	12,9	11,15	8,8	13,5	13,9	10,7

tot. : fromage non fractionné ; suspension citratée dégraissée et dialysée.

TABLEAU 4

Quantité totale des acides aminés libérés par l'hydrolyse enzymatique (g p. 100 g protéine)

	Fromage à fondre	FROMAGE FONDU							
		à différentes températures (° C)				avec différentes conc. en sels (p. 100)			
		80	100	120	140	1	2	3	4
Suspension totale	12,9	—	13,5	—	—	—	—	—	—
Culot d'ultracentrifugation	11,15	8,7	13,9	15,5	16,1	10,5	13,9	13,75	14,1
Surnageant	8,8	11,5	10,7	11,5	11,7	10,0	10,7	10,7	11,4

8 et 36 p. 100). Le total des acides aminés libérés est toujours supérieur dans le fromage fondu et ses fractions par rapport à ce qu'il est dans le fromage à fondre.

L'influence de la température de fonte et de la concentration en sels a été également recherchée en mesurant le taux d'hydrolyse enzymatique des protéines du surnageant et du culot d'ultracentrifugation. Les résultats, qui ne sont pas rapportés ici, ne révèlent pas de variations systématiques en ce qui concerne les acides aminés pris isolément. Par contre, si l'on considère le total des acides aminés libérés (tableau 4), on relève une différence significative. Dans le cas des protéines du surnageant, les valeurs demeurent presque constantes, alors que les protéines du culot subissent une protéolyse qui s'accroît avec l'élévation de la température et de la dose de sels de fonte.

Résumé

La fonte des fromages en pétrin dans les conditions habituelles (température de l'ordre de 100 à 120° C, doses de polyphosphates voisines de 2 p. 100) s'accompagne d'une augmentation de la teneur en acides aminés libres dans les protides totaux. Dans des conditions plus drastiques (140° C, plus de 3 p. 100 de sels), il se produit un début de dégradation de certains acides aminés libres. La teneur en lysine libre est accrue dans toutes les conditions de fonte (80 à 140° C ; 1 à 4 p. 100 de sels).

La digestion *in vitro* par la pepsine et la pancréatine est améliorée par la fonte dans les conditions habituelles. Les essais de digestion enzymatique effectués sur les protéines sédimentées par ultracentrifugation et sur les protéines peptisées dans le surnageant ne permettent pas d'attribuer l'amélioration à l'une ou l'autre de ces deux fractions.

Remerciements

Nous remercions MM. Paquet et Humbert pour leur aide précieuse dans cette recherche. Nous sommes reconnaissants aux Ets Rambol de la fourniture d'échantillons de fromages.

Summary

BIOCHEMICAL STUDY OF THE CHEESE PROCESSING

III. EVOLUTION OF FREE AMINOACIDE AND «IN VITRO» DIGESTIBILITY OF THE PROTEINS

The cheese processing in a Kneading-throut at 100 to 120° C and about 2 p. 100 polyphosphate provokes an increase of free aminoacids in the protidic part. With more severe conditions (140° C, or more than 2 p. 100 salts) we observed some degradations of the amino-

acids. The percentage of free lysine is increased in all the processing conditions (80 to 140° C ; 1 to 4 p. 100 salts).

The *in vitro* digestion by pepsin and pancreatin is improved by the processing in the usual conditions. The enzymatic assays on the proteins sedimented by ultracentrifugation and on the «peptized» proteins in the supernatant do not allow us to attribute the improvement to one of both fractions.

Reçu pour publication en octobre 1980.

Bibliographie

- [1] ADAMS (D. M.), BARRACH (J. T.) and SPECK (M. L.). — Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. *J. Dairy Sci.*, 1975, 58, 828-834.
- [2] ARNOTT (D. R.), MORRIS (H. A.), COMBS (W. B.). — Effect of certain chemical factors on the melting quality of process cheese. *J. Dairy Sci.*, 1957, 40, 957-963.
- [3] BIJOK (F.). — Influence de la température de la fonte et du pH sur la valeur nutritive des fromages fondus. *XIX^e Congr. Inter. Lait.*, 1974, 1 F, 627-628.
- [4] BIJOK (F.). — Effet de certains procédés technologiques sur la teneur en composés soufrés et en lysine dans les fromages fondus. *XIX^e Congr. Inter. Lait.*, 1974, 1 F, 780-781.
- [5] CLEMENS (Von W.). — Papierchromatographische Untersuchungen an Kase. *Milchwissenschaft*, 1954, 9, 195-204.
- [6] EBEL (J. P.). — Action physiologique et toxicologique des phosphates condensés. *Ann. Nutr. Alim.*, 1958, 12, 58-97.
- [7] HALL (R. E.). — (Hall Laboratories, Inc.), U.S. Patent 2, 064.110, 1936.
- [8] LEE (B. O.), PAQUET (D.) et ALAIS (C.). — Etude biochimique de la fonte des fromages. I. Mesure de la peptisation. *Le Lait*, 1979, 59, 589-596.
- [9] MAURON (J.), MOTTU (F.), BUJARD (E.) and EGLI (R. H.). — The availability of lysine, methionine and tryptophane in condensed milk and milk powder. *In vitro* digestion studies. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1955, 59, 433-451.
- [10] MEYER (A.). — Processed cheese manufacture, 1973 Food Trade Press Publ., London, p. 20-22.
- [11] NEY (K. H.), WIROTAMA (I. P. G.). — Bestimmung des verwertbaren Lysins in Milch und Schmelzkase mit dem Reaktivfarbstoff Remazolbrillant-blau R. *Zeit. Lebensm. Untersuch. Forsch.*, 1970, 144 (2), 92-95.
- [12] PRODANSKI (P.). — The changes of paracasein and the soluble nitrogen fraction in process cheese made from sheep and cow Kashkaval by using different emulsifying salts, *Nauchni. Tr. Vissh. Inst. Khrani. Vkus. Prom. Plovdiv.*, 1964, 11, 120-129.