L'amertume des fromages à pâte molle de type Camembert :

rôle de la présure et de *Penicillium caseicolum*,
moyens de la contrôler

par

L. VASSAL et J. C. GRIPON

Résumé

L'influence de la présure et de *Penicillium caseicolum* sur le développement de l'amertume des fromages à pâte molle à croûte fleurie a été étudiée.

Le pH du lait à l'emprésurage modifie la quantité de présure retenue dans le caillé dans une assez faible mesure (augmentation de 15 % de la rétention lorsque le pH du lait diminue de 6,50 à 6,05). La dose de présure exerce quant à elle une influence beaucoup plus nette, et à l'intérieur d'une gamme allant de 7,5 à 60 ml de présure liquide pour 100 l de lait, la quantité de présure retenue varie de façon pratiquement linéaire de 316 à 5 700 μ l de présure par kg de matière sèche (122 à 2195 μ l par kg de fromage). Après 4 semaines d'affinage aucune différence significative n'a pu être mise en évidence au niveau de l'amertume entre des fromages fabriqués avec 15 ou 60 ml de présure par 100 l de lait et dont la flore était composée uniquement de streptocoques lactiques et de *Penicillium*.

L'incubation des fromages entre le 3^e et le 10^e jour suivant la fabrication dans une atmosphère légèrement ammoniacale entraîne une remontée plus rapide du pH des zones externes. Une croissance moins dense du *Penicillium* est observée ainsi qu'une protéolyse moins intense et une diminution très nette de l'amertume.

La présence de *Geotrichum candidum* entraîne également un moindre développement du *Penicillium*, une diminution de l'amertume ainsi qu'une diminution de la protéolyse qualitativement analogue à celle qui est observée en présence d'une atmosphère ammoniacale.

Le *Penicillium* apparaît comme le principal responsable de l'amertume des fromages à pâte molle de type Camembert lorsque sa croissance n'est pas limitée. Dans la pratique, le contrôle du développement de ce micro-organisme devrait permettre de lutter efficacement contre l'amertume.

Mots clés :

Fromage de type Camembert - Amertume - Présure - *Penicillium caseicolum* - Ammoniac - *Geotrichum candidum*.

Summary

BITTERNESS OF CHEESES OF THE CAMEMBERT TYPE ROLE OF RENNET AND *PENICILLIUM CASEICOLUM* MEANS OF ITS CONTROL

The influence of rennet and Penicillium caseicolum on the development of bitterness of surface moulded soft cheeses (Camembert type) was investigated. The pH of the milk at renneting modifies the quantity of rennet retained in the curd only slightly (15 % increase of retention when the pH of the milk decreases from 6.5 to 6.05). The quantity of rennet has a much greater influence, in fact for 7.5 to 60 ml of rennet per 100 l of milk, the amount of retained rennet varies almost in a linear manner from 316 to 5700 µl of rennet per kg of dry matter (122 to 2200 µl per kg of cheese). After 4 weeks of ripening no difference in bitterness was observed for cheeses prepared with 15 or 60 ml of rennet for 100 l of milk and of which microflora was only composed of lactic streptococci and Penicillium.

Incubation of cheeses between the 3rd and 10th day following cheese making in a slightly ammoniacal atmosphere leads to a faster increase of the pH in the outer layer. The growth of Penicillium is less rapid, proteolysis is less intense and bitterness decreases.

The presence of Geotrichum candidum leads also to a lower growth of Penicillium, to a decrease of bitterness as well as to a lower proteolysis which is qualitatively similar to that observed in the presence of an ammoniacal atmosphere.

Penicillium appears to be the principal factor responsible for bitterness of soft body cheese such as Camembert, as long as its growth is not limited. From a practical point of view the control of the growth of this microorganism should permit one to fight efficiently against bitterness.

Key words:

Soft cheese Camembert - Bitterness - Rennet - *Penicillium caseicolum* - Ammonia - *Geotrichum candidum*.

INTRODUCTION

Les caractères organoleptiques des fromages résultent des modifications des composants du caillé au cours de l'affinage. La protéolyse contribue notamment à la flaveur des produits par la formation de peptides et d'acides aminés transformés à leur tour en composés aromatiques par des réactions enzymatiques et chimiques (Adda et coll., 1982). Des peptides ont été eux-mêmes reconnus responsables de l'amertume des fromages de Gouda (Raadsveld, 1953) et de Cheddar (Harwalker et Elliot, 1971 ; Richardson et Creamer, 1973 ; Hamilton et coll., 1974) sans qu'aucune règle spécifique pour les caractériser de façon complète n'ait pu être établie à ce jour (Edwards et Kosikowski, 1983). On sait seulement qu'il s'agit de peptides de faible poids moléculaire et de forte hydrophobicité (Ney, 1971 ; Pélissier et coll., 1974a).

L'amertume est généralement considérée comme un grave défaut des fromages. Aussi, le mécanisme de sa formation a été largement étudié en particulier dans les fromages de Cheddar et de Gouda et a donné lieu à plusieurs hypothèses (Czulak, 1959 ; Lowrie et Lawrence, 1972). Ces travaux ont fait l'objet de mises au point relativement récentes (Crawford et Zwaginga, 1977 ; Stadhouders, 1979). Ils mettent en évidence le rôle de l'agent coagulant, des levains lactiques dont le mode d'action a été discuté plus récemment (Mills et Thomas, 1981), des conditions de fabrication (pH du lait à l'emprésurage, température de cuisson) et des caractéristiques du fromage (pH, teneur en eau et en sel).

Une enquête effectuée en France (Pélissier et coll., 1975b) montrait que le défaut d'amertume est le plus fréquent dans le cas des fromages à pâte molle ou à pâte persillée. En outre, l'amertume de ces fromages peut atteindre des intensités très fortes. Il est admis, d'autre part, que les souches sauvages de *Penicillium caseicolum* dont sont issues les souches employées en fromagerie et qui sont encore utilisées pour les fromages de type Neufchâtel, confèrent à ceux-ci une amertume caractéristique (Moreau, 1983). Ces souches d'origine Neufchâtel forment une population qui se distingue des autres souches par des propriétés protéolytiques et lipolytiques plus marquées (Tourneur, 1982). Les souches de *P. caseicolum* utilisées en fabrication de Camembert pourraient donc être en grande partie responsables de l'amertume de ce fromage par la formation directe de peptides amers ou par la production de précurseurs non amers.

L'activité protéolytique de ce micro-organisme dans les fromages résulte essentiellement de la synthèse d'un système exocellulaire assez complexe comprenant une métalloprotéase (Lenoir et Auberger, 1977), une aspartyle-protéase (Lenoir et coll., 1979) et plusieurs peptidases dont une carboxypeptidase acide et une aminopeptidase alcaline (Au-

berger et coll., 1982). L'activité des deux endopeptidases a été caractérisée sur la caséine *in vitro* (Trieu-Cuot et coll. 1982 a et b) et aussi *in situ* dans les fromages (Trieu-Cuot et Gripon, 1982 a et b). Un travail récent a montré que la présence de *Geotrichum candidum* à la surface du Camembert remonte rapidement le pH de surface, limite la croissance de *P. caseicolum* et diminue fortement l'amertume (Mourgues et coll., 1983).

Dans le cas du Camembert, les protéases des streptocoques lactiques peuvent également contribuer à la formation d'amertume (Martley, 1975). Même lorsque le levain est composé d'une souche réputée non amère en fabrication de Cheddar, les Camemberts deviennent amers lorsque l'acidification n'est pas limitée par les conditions de fabrication ou les bactériophages. Un résultat identique a été constamment retrouvé dans des fabrications expérimentales à flore contrôlée composée uniquement d'un streptocoque mésophile (souche rapide) se développant en l'absence de bactériophages et d'un *Penicillium* croissant abondamment à la surface du fromage (Vassal, résultats non publiés).

De telles conditions de fabrication tendent à devenir la règle des fabrications industrielles dans les ateliers de grande taille. Le but de ce travail était de préciser le rôle de la présure et de la moisissure de surface dans l'apparition de l'amertume des fromages à pâte molle à croûte fleurie et d'essayer de diminuer la fréquence et/ou l'intensité de cette amertume par l'emploi de moyens appropriés.

I. MATERIEL ET METHODES

Fabrication des fromages

Les Camemberts étaient fabriqués à la Laiterie Expérimentale du C.N.R.Z. (Jouy-en-Josas) à partir du lait d'un troupeau de race française frisonne pie noire. La teneur en matière grasse du lait était ajustée de façon à obtenir un rapport matière grasse/matière sèche voisin de 48 % dans les fromages affinés. Le lait était pasteurisé à 72° pendant 15 secondes, refroidi à 35° C et inoculé immédiatement à 2 % avec une culture sur lait autoclavé d'une souche pure de streptocoques lactiques. Les souches de *Streptococcus cremoris* CNRZ 112 (E8), CNRZ 115 et CNRZ 158 ont été utilisées au cours de différents essais. Une suspension de spores de *Penicillium caseicolum* (préparation commerciale) était ajoutée au lait avant l'empresurage à raison de 8 000 spores/ml environ.

Pour certains essais, le lait était également ensemencé au moyen d'une culture sur bouillon (extrait de levure 5 g, glucose 20 g, eau 1 000 ml, pH 7,0) incubée 4 jours à 30° C, d'une souche de *Geotrichum candidum* au taux de 0,25 % (souche 2, Mourgues et coll., 1983). Le développement d'autres micro-organismes de contamination était li-

mité au maximum par des précautions d'hygiène au cours de la fabrication et par le maintien en surpression d'air filtré des salles d'affinage avant l'emballage des fromages. Dans ces conditions, le nombre de levures contaminantes restait inférieur à 10^4 par gramme dans la couche externe du fromage.

Avant l'addition de présure, une acidification préalable était effectuée par maturation du laitensemencé avec les levains pendant 2 h 30 à $34 \pm 2^\circ \text{C}$ de façon à obtenir un pH de 6,25 à l'emprésurage. Dans certains essais, le pH à l'emprésurage a été modifié soit par addition d'acide lactique au lait (pH 6,05 - 6,20), soit en écourtant le temps de maturation (pH 6,35 - 6,50).

L'emprésurage était réalisé avec de la présure Boll contenant 484 mg de chymosine et 344 mg de pepsine bovines par litre. Les doses utilisées étaient de 7,5 - 15 - 30 et 60 ml pour 100 litres de lait.

Un dispositif Cartier comportant un système automatique de moulage du caillé par retournement des bassines permettait de conduire les opérations de fabrication de façon reproductible. La température de la salle de fabrication était maintenue constante à 30°C pendant les six premières heures suivant l'emprésurage puis à 22°C pendant la nuit suivante.

Après salage en saumure saturée pendant 40 min à 15°C , les fromages, dont la teneur moyenne en matière sèche était de 40 % et la teneur moyenne en sel de 2 %, étaient maintenus pendant 1 jour à 15°C et 85 % d'humidité relative puis affinés à 12°C et 95-98 % d'humidité relative. Ils étaient emballés à l'âge de 12 jours après 48 h de séjour à 12°C et 85 % d'HR et conservés ensuite dans les mêmes conditions.

Des essais préliminaires avaient montré l'effet d'une atmosphère ammoniacale sur l'amertume des fromages à croûte fleurie. Certains fromages étaient incubés en atmosphère ammoniacale du 3^e au 10^e jour suivant la fabrication. Cette incubation était effectuée dans une cellule étanche ($1 \times 1 \times 0,80 \text{ m}$) maintenue à 12°C . La teneur en ammoniac de l'air était réglée indirectement à l'aide d'un bac contenant 1 l d'une solution ammoniacquée obtenue par dilution au 1/100 d'ammoniaque à 20 % min., (d. 0,92 - Prolabo RP). Cette solution était soit renouvelée périodiquement, soit maintenue à pH 9,0 ou à pH 9,5 par un pHstat. Dans le premier cas, la teneur en ammoniac de l'atmosphère restait toujours inférieure à 5 ppm et avec la solution à pH 9,0 elle restait inférieure à 15 ppm. L'humidité relative à l'intérieur de la cellule était voisine de 98 %.

Dosage de la présure

La présure résiduelle était dosée dans les fromages âgés de 48 h selon la méthode de Stadhouders et coll., (1977) modifiée de la façon suivante : l'activité coagulante de l'extrait de fromage lyophilisé était

mesurée sur du lait « low-heat » (Nilac) mis en solution à raison de 1 g de poudre pour 5 ml de tampon cacodylate 0,2 M (pH 6,2) contenant 0,02 mole par litre de CaCl_2 . Le lyophilisat correspondant à 24 g de fromage était mis en solution dans 5 ml du même tampon puis ajouté à 5 ml de ce lait. Le temps de coagulation était mesuré à 30° C selon la technique de Berridge modifiée par Collin et coll. (1977).

Mesure de la protéolyse

L'évolution de la protéolyse au cours de l'affinage était suivie par la mesure de l'azote soluble à pH 4,6 (NS), de l'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 12 % (NPN) et de l'azote soluble après précipitation par l'acide phosphotungstique à 2,5 % (p/v) (NSAPT) ainsi qu'il a été précédemment décrit par Gripon et coll. (1975).

L'étude qualitative de la fraction insoluble à pH 4,6 était conduite par électrophorèse en gel d'acrylamide agarose selon les mêmes auteurs. Les échantillons étudiés étaient des prélèvements représentatifs de la partie externe des fromages (zone comprise entre la surface des faces et 8 mm de profondeur). L'identification des bandes correspondantes aux différents produits de dégradation a été effectuée selon les résultats obtenus antérieurement par Trieu-Cuot et Gripon (1982b).

Analyses physico-chimiques

Le pH des fromages était mesuré directement à l'aide d'une électrode de pénétration Ingold type 406. M3 en divers points situés à des profondeurs de 2 (zone externe) et 8 mm (zone intermédiaire) au-dessous de la surface sur une tranche de fromage découpée diamétralement (pour chaque fromage on effectuait six mesures par profondeur) ainsi qu'en zone centrale (3 mesures). Le pH de la surface des fromages était mesuré à l'aide d'une électrode de surface Ingold type 403-30 (5 mesures par face).

Analyse sensorielle

L'analyse sensorielle des fromages était effectuée par un jury de 15 membres dont la sensibilité à l'amertume avait été vérifiée au préalable et qui étaient entraînés à déguster régulièrement ce type de fromage.

Ce jury notait l'intensité du caractère amer de chaque échantillon sur une échelle structurée. Dans certains cas, il classait directement, en fonction de leur amertume, plusieurs échantillons présentés, soit par groupe de 3 ou 4 dans un dispositif en blocs incomplets équilibrés (Cochran et Cox, 1957), soit par paire (norme Afnor, NFV09-012-1975). La signification des résultats était évaluée par analyse de variance sur les notes ou sur les rangs (Tomassone et Flanzky, 1977).

II. RESULTATS

Influence de la présure

A 48 h, la quantité de présure retenue dans le caillé est d'autant plus grande que le pH à l'emprésurage est plus bas. Toutefois, l'amplitude des variations reste assez limitée puisque l'augmentation obtenue en abaissant le pH de 0,45 unité est de l'ordre de 15 % (fig. 1) lorsque le lait est emprésuré avec 15 ml de présure pour 100 l.

fig. 1

Influence du pH initial du lait sur la quantité de présure retenue dans le fromage. La quantité de présure est exprimée en μl de présure liquide par kg de matière sèche. Le lait était emprésuré à raison de 15 ml pour 100 l.

Influence of the initial pH of milk on the rennet content of the cheese. The amount of rennet is expressed as μl of liquid rennet per kg of dry matter. Milk was renneted with 15 ml per 100 l.

L'influence de la dose de présure utilisée pour coaguler le lait semble par contre beaucoup plus nette. A l'intérieur d'une gamme allant de 7,5 à 60 ml de présure pour 100 l de lait, la quantité de présure résiduelle varie de façon pratiquement linéaire de 316 à 5 700 μl par kg de matière sèche (fig. 2). Il faut noter que la droite ne passe pas par l'origine et que le pourcentage de présure retenue est sensiblement moins élevé pour la plus faible dose.

La protéolyse du fromage est nettement influencée par la dose de présure utilisée et par conséquent par la quantité de présure retenue.

fig. 2

Influence de la dose de présure ajoutée au lait sur la quantité de présure retenue dans le fromage. La quantité de présure est exprimée en μl de présure liquide par kg de matière sèche.

Influence of the rennet quantity added to cheese milk on the rennet content of the cheese. The amount of rennet is expressed as μl of liquid rennet per kg of dry matter.

Dès 48 h, la teneur en NS est nettement plus élevée dans les fromages fabriqués avec 60 ml de présure (NS/NT = 13,5 %) que dans ceux fabriqués avec 7,5 ml (NS/NT = 7,20 %) et cette différence se maintient jusqu'à 4 semaines.

En ce qui concerne l'amertume, les résultats des dégustations effectuées après 4 semaines d'affinage sur les fromages issus de 6 séries de fabrications différentes comportant chacune des fromages fabriqués avec 15 ou 60 ml de présure pour 100 l de lait, n'ont pas permis de mettre en évidence des différences significatives entre les deux doses de présure (tab. 1). En effet, que les fromages aient été ou non affinés en présence d' NH_3 et que le lait de fabrication ait été inoculé avec la souche de streptocoque CNRZ 115 ou la souche CNRZ 112, les sommes des rangs attribués aux fromages fabriqués avec l'une ou l'autre dose de présure sont le plus souvent très voisines. D'autre part, les épreuves de comparaison effectuées sur des fromages provenant d'autres essais et dégustés après 6 semaines d'affinage ne permettaient pas non plus de conclure à une influence significative de la dose de présure.

Influence de *P. caseicolum*

Les fromages témoins étaient recouverts d'un feutrage épais et dense de *P. caseicolum*. Le développement de ce dernier dans les fro-

TABLEAU 1 — TABLE 1

Intensité de l'amertume (a) de fromages âgés de 4 semaines en fonction de différents paramètres technologiques

Bitterness intensity (a) of for 4 weeks aged cheeses depending on different technological parameters

Essai n°	Levain utilisé (souche CNRZ)	Nombre de jugements (blocs)	Nombre d'échantillons par bloc	Sommes de rangs (b)				Rapport de variance F
				Affinage avec NH ₃		Affinage sans NH ₃		
				15 ml	Présure 60 ml	15 ml	Présure 60 ml	
1	115	12	3	12	14	26	20	15**
2	112	12	3	9	16,5	25,5	21	35,5**
3	115	28	4	34,5	29,5	51	31,5	11,05**
	112			21	24,5	37,5	50,5	
4	115	14	4	9	15	23	22	7,82**
	112			13	10	25	23	

(a) Chaque dégustateur attribuait le rang le plus faible au fromage le moins amer ; en cas d'égalité entre plusieurs échantillons, le juge affectait à chacun d'eux le même rang moyen.

(b) Sommes des rangs obtenus par les échantillons de même nature. Dans un même essai, ces sommes sont d'autant plus élevées que les fromages étaient jugés plus amers.

** Cette valeur de F conduit à rejeter l'hypothèse nulle au seuil $P = 0,01$.

(a) Each taster gave the lowest rank to the less bitter cheese. In case of equality between several samples, the judge gave the same average rank to each of them.

(b) Rank sums obtained from identical samples. In a same assay the higher the sums the more bitter the cheeses were judged.

** The F value leads to rejection of the zero hypothesis at the level $P = 0.01$.

mages essais a été limité par deux moyens, d'une part l'incubation des jeunes fromages en atmosphère ammoniacale pendant 7 j et d'autre part, par l'ensemencement du lait avec une souche de *G. candidum* qui se traduisait par un feutrage beaucoup moins dense en *Penicillium*.

Fromages incubés en atmosphère ammoniacale

Le pH de la surface des fromages incubés en présence d'ammoniac remonte plus rapidement que celui des fromages témoins (fig. 3).

fig. 3

pH de surface des fromages incubés ou non en présence d'ammoniac

- — ● : fromages témoins.
- — ○ : fromages incubés en présence d'une solution ammoniacale renouvelée 3 fois (▲).
- — □ : fromages incubés en présence d'une solution ammoniacale maintenue à pH 9,0.

pH of the cheese surface incubated in the presence or absence of ammonia

- — ● : control cheese.
- — ○ : cheese incubated in the presence of an ammonia solution renewed 3 times (▲).
- — □ : cheese incubated in the presence of an ammonia solution maintained at pH 9.0.

Cette influence de l'ammoniac sur le pH s'exerce de façon à peu près identique que la solution d'ammoniaque soit renouvelée périodiquement ou qu'elle soit maintenue à pH 9,0. Cinq jours après la fabrication, le pH de surface des fromages maintenus en atmosphère ammoniacale est supérieur d'environ une unité à celui des fromages témoins. Après 10 jours, le pH des fromages témoins ne diffère plus de celui des fromages traités que de 0,3 à 0,4 unité ; il est alors voisin de 7,4. Le pH de tous les fromages se stabilise ensuite jusqu'à la fin de l'affinage entre 7,7 et 8,2.

L'ammoniac entraîne également au début de l'affinage une remontée plus rapide du pH des zones externe et intermédiaire. A 12 jours, les différences de pH dans ces deux zones entre des fromages incubés en présence d'une solution d'ammoniaque maintenue à pH 9,5 et les fromages témoins sont respectivement de 0,22 et 0,12 unité pH. Après 30 j d'affinage, on observe encore une tendance analogue ; toutefois, la différence n'est plus significative (tab. 2).

L'incubation en présence d'ammoniac se traduit par une croissance plus lente et un moindre développement du *Penicillium*. Ce dernier produit un feutrage régulier, mais qui reste nettement moins dense que celui des fromages témoins même après 30 j d'affinage.

La protéolyse au cours de l'affinage est moins intense dans les fromages traités à l'ammoniac (tab. 3). La proportion de NPN déterminée sur des échantillons moyens est le plus souvent notablement inférieure à celle des témoins dès le 12^e jour de l'affinage. Après 21 j, elle représente en moyenne 75 % de celle des témoins. La formation de peptides de faible poids moléculaire est également plus lente dans les fromages traités. La proportion de NSAPT des fromages d'essais est égale en moyenne tout au long de l'affinage à 60 % (valeurs extrêmes 47 et 80 %) de celle des fromages témoins (tab. 4). Ces teneurs en NSAPT correspondent également à une dégradation moins prononcée de la fraction soluble à pH 4,6.

Les diagrammes d'électrophorèse révèlent des différences nettes entre les deux séries de fromages. Dans la couche externe (fig. 4), dès le 8^e jour, la bande β Pcapl apparaît dans le fromage témoin et son intensité augmente au cours de l'affinage. Cette bande résulte de l'hydrolyse de la caséine β par l'aspartyle protéase de *P. caseicolum* et représente un marqueur de l'activité de cette enzyme dans les fromages (Trieu-Cuot et Gripon, 1982b). A partir du 21^e jour, elle devient plus intense que la bande β Pcmpl qui est apparue dès le 8^e jour. Au contraire, dans le fromage incubé en présence d'ammoniac, son intensité reste très faible et toujours inférieure à celle de β Pcmpl qui est un marqueur de l'activité de la métalloprotéase (Trieu-Cuot et Gripon, 1982 b).

Par contre, les bandes β Pcmp1 et β Pcmp3 caractéristiques de l'action de la métalloprotéase de *P. caseicolum* sur la caséine β sont présentes avec une intensité voisine dans les deux types de fromages. Les

TABLEAU 2 — TABLE 2

pH des fromages incubés en présence ou en absence d'ammoniac

pH of cheese incubated in the presence or absence of ammonia

Age des fromages (jours)	Zone	pH des fromages		Différence (1) « NH ₃ -témoins »	Nombre de comparaisons
		Témoins	Incubés avec NH ₃		
12	externe	5,36	5,58	0,22**	12
	intermédiaire	5,27	5,39	0,12**	12
	centrale	5,30	5,36	0,06 ^{NS}	12
30	externe	7,03	7,16	0,13 ^{NS}	6
	intermédiaire	6,50	6,68	0,18 ^{NS}	6
	centrale	6,50	6,60	0,10 ^{NS}	6

(1) ** différence hautement significative ; NS différence non significative.

La signification des différences a été recherchée au moyen de tests de « t » sur les valeurs appariées.

(1) *The signification of the differences has been searched for by the t-test on paired values.**** highly significant difference ; NS non significant difference.*

TABLEAU 3 — TABLE 3

Evolution au cours de l'affinage des teneurs en azote non protéique des fromages incubés en présence ou en absence d'ammoniac (échantillon moyen)

Development during ripening of the non protein nitrogen in the presence or absence of ammonia (average sample)

Date de fabrication	NPN/N %					
	12 jours		21 jours		35 jours	
	Témoin	NH ₃	Témoin	NH ₃	Témoin	NH ₃
20. 1 (a)	—	—	27,5	22,7	40,7	31,2
3. 2 (a)	17,5	14,5	—	—	33,2	29,8
10. 2 (a)	14,4	16,5	24,0	18,2	27,6	22,3
17. 1 (a)	13,2	10,0	33,3	25,6	30,7	22,4
21. 9 (b)	11,3	7,0	32,3	21,5	42,2	30,9
5.10 (b)	24,1	13,0	28,2	22,7	42,1	31,1

(a) Incubation en présence d'une solution d'ammoniaque renouvelée deux fois.

(b) Incubation en présence d'une solution d'ammoniaque maintenue à pH 9,5.

(a) *Incubation in the presence of an ammonia solution renewed twice.*

(b) *Incubation in the presence of an ammonia solution maintained at pH 9.5.*

TABLEAU 4 — TABLE 4

Evolution au cours de l'affinage de la teneur en azote soluble dans l'acide phosphotungstique des fromages incubés en présence d'ammoniac (échantillon moyen)

Development during ripening of the phosphotungstic acid soluble fraction of cheese incubated in the presence or absence of ammonia (average sample)

Date de fabrication	NSAPT/N %					
	12 jours		21 jours		35 jours	
	Témoins	NH ₃	Témoins	NH ₃	Témoins	NH ₃
21.9	3,1	2,5	8,4	4,6	12,3	5,8
5.10	7,4	3,7	9,3	5,5	14,1	10,1

fig. 4

Comparaison par électrophorèse à pH alcalin, de l'évolution de la fraction azotée insoluble à pH 4,6 au cours de l'affinage de Camemberts incubés en présence de NH_3 (A) et témoins (T).

C : caséine entière ; 2, 6, 8, 11, 13, 21, 28, 35 : échantillons prélevés après 2, 6,... 35 jours d'affinage dans la couche externe des fromages.

Comparison by alkaline pH electrophoresis of the development of the pH 4.6 insoluble nitrogen fraction during ripening of Camembert cheese in the presence of ammonia (A) and control sample (T).

C : Total casein ; 2, 6, 8, 11, 13, 21, 28, 35 : samples taken after 2, 6,... 35 days in the outer layer of the cheese.

diagrammes électrophorétiques montrent bien la forte protéolyse de la caséine β , en surface dans tous les fromages à partir de la 1^{re} semaine. Mais l'hydrolyse est plus forte dans les fromages témoins où cette caséine a totalement disparu à 28 jours.

Dans nos conditions de fabrication, les fromages témoins deviennent toujours amers au cours de l'affinage et leur amertume atteint une forte intensité en fin d'affinage (tabl. 5). L'amertume des fromages incubés en présence d'ammoniac s'est toujours révélée moins forte que celle des fromages témoins quelles que soient les conditions expérimentales (tab. 1 et 5).

Fromagesensemencés en *G. candidum*

Comme il a déjà été démontré (Mourgues et coll., 1983), l'ensemencement en *Geotrichum* entraîne une élévation plus rapide du pH de surface des fromages, un développement moins dense du *Penicillium* et diminue considérablement l'amertume par rapport à des fromages témoins. Les examens électrophorétiques des zones externes des fromages révèlent des différences nettes entre les témoins et les essaisensemencés en *Geotrichum*. La dégradation des caséines α_{s1} et β se produit nettement plus rapidement dans les fromages témoins. Après 11 j d'affinage, les quantités de caséine β résiduelle sont faibles

TABLEAU 5 — TABLE 5

Evolution au cours de l'affinage de l'amertume des fromages incubés
en présence ou en absence d'ammoniac

*Development of bitterness during ripening of cheese incubated
in the presence or absence of ammonia*

Date de fabrication/traitement		Intensité de l'amertume (1) des fromages âgés de		
		21 jours	28 jours	35 jours
1.3	NH ₃	1,6x	3,1x	3,1x
	témoin	5,6y	5,2x	6,8y
8.3	NH ₃	0,6x	1,5x	2,9x
	témoin	3,8y	3,8y	5,0y

(1) Caractère noté sur une échelle structurée à 10 niveaux.

Pour chaque comparaison, les moyennes d'une même colonne qui ne portent pas le même indice diffèrent de façon significative.

(1) *Characteristic noted on a structured scale of 10 steps.*

For each assay the averages of the same column which do not show the same index differ significantly.

alors qu'elles restent notables dans les fromages avec *Geotrichum* (fig. 5).

Dans les fromages témoins, l'action du *Penicillium* est visible dès 8 j (c'est-à-dire juste au moment du développement mycélien) par intensification nette de la bande β Pc_{mp1} qui est un marqueur de l'activité de la métalloprotéase. Cette bande est certes décelable avec une intensité plus faible dès les premiers jours de l'affinage mais elle correspond alors à des produits d'hydrolyse des caséines présents dans le lait de fabrication et sans rapport avec l'action du *Penicillium*. La bande β Pc_{ap1} apparaît plus lentement mais s'intensifie progressivement au cours de l'affinage au point de devenir la bande majeure de l'électrophorégramme après 28 jours d'affinage. Dans le cas des fromages essais, les produits de dégradation des protéases du *Penicillium* apparaissent plus lentement et la bande β Pc_{mp1} a toujours une intensité supérieure à la bande β Pc_{ap1} sauf après 28 j. date à laquelle l'intensité des deux bandes devient sensiblement équivalente.

Il est à noter que la présence de *Geotrichum* ne se traduit pas par l'apparition de nouvelles bandes électrophorétiques.

fig. 5

Comparaison par électrophorèse à pH alcalin, de l'évolution de la fraction azotée insoluble à pH 4,6 au cours de l'affinage de Camemberts ensemencés en *Geotrichum* (G) et témoins (T).

C : caséine entière ; 2, 6, 8, 11, 13, 21, 28 : échantillons prélevés après 2, 6,... 28 jours d'affinage dans la couche externe des fromages.

Comparison by alkaline pH electrophoresis of the development of the pH 4.6 insoluble nitrogen fraction during ripening of Camembert cheese inoculated with *Geotrichum* (G) and control sample (T).

C : total casein ; 2, 6, 8, 11, 13, 21, 28 : samples taken after 2, 6,... 28 days in the outer layer of the cheese.

III. DISCUSSION

Tous les fromages fabriqués sans limitation de la croissance de *P. caseicolum* se sont révélés amers 4 semaines après la fabrication. Par contre, en présence d'une atmosphère ammoniacale ou en présence de *G. candidum* le développement du *Penicillium* est limité et les fromages obtenus sont très peu amers.

Parallèlement, on peut noter que la protéolyse développée dans ces derniers est plus faible (la différence peut atteindre 11 % de l'azote total après 35 j d'affinage) et qu'elle est qualitativement différente. Le produit d'hydrolyse β Pcap1 qui permet d'apprécier l'action de la protéase acide apparaît beaucoup plus tardivement dans les fromages traités à l'ammoniac et reste toujours à une concentration beaucoup plus faible que celle observée dans les fromages témoins. Par contre, le produit résultant de l'action de la métalloprotéase β Pcmp1 semble être d'après les électrophorèses en concentration comparable. La protéase acide paraît donc moins active dans les fromages traités à l'ammoniac. Le même phénomène est décelable dans les fromages avec *Geotrichum* ; toutefois, après 28 j d'affinage, l'action de la protéase acide semble plus importante que dans les fromages traités à l'ammoniac.

La diminution d'amertume observée lorsque le développement du *Penicillium* est limité peut s'expliquer soit parce que l'intensité de la

protéolyse effectuée par le *Penicillium* est globalement plus faible, soit parce qu'elle est qualitativement différente. Dans ce cas, la protéase acide serait davantage génératrice d'amertume que la métalloprotéase puisque son activité semble réduite dans les fromages non amers alors que celle de la métalloprotéase se maintient à un niveau comparable à celui des fromages témoins.

Dans les fromages fabriqués avec une dose de présure normale (15 ml pour 100 l de lait), les quantités de présure retenues dans le caillé sont de l'ordre de $1\,300\ \mu\text{l.kg}^{-1}$ de matière sèche, soit environ $500\ \mu\text{l.kg}^{-1}$ de fromage. Ceci correspond à environ 50 % de la quantité de présure ajoutée au lait et cette valeur est en bon accord avec celles qui ont été observées sur des caillés modèles (Holmes et coll., 1977) et sur des fromages de type Camembert (Klostermeyer et coll., 1972). Les quantités observées dans le Gouda ($280\ \mu\text{l.kg}^{-1}$ de fromage) (Stadhouders et Hup, 1975) sont sensiblement inférieures à celles que nous avons trouvées.

Le pH du lait à l'emprésurage n'exerce qu'une influence assez limitée sur la rétention de présure dans les caillés. Plus il est bas, plus la quantité d'enzyme retenue est élevée. L'amplitude des variations reste cependant assez limitée et n'excède pas 15 % pour des pH d'emprésurage variant de 6,05 à 6,50. Cette amplitude est nettement plus élevée dans le cas des fromages de Gouda puisque la quantité résiduelle varie respectivement de 280 à $500\ \mu\text{l.kg}^{-1}$ de fromage pour des laits emprésurés à pH 6,65 et 6,25 respectivement (Stadhouders et Hup, 1975).

Par ailleurs, la quantité de présure retenue est très liée à la dose ajoutée au lait et les variations de cette dernière ont une influence beaucoup plus forte que le pH sur la quantité d'enzymes retenues dans le caillé.

Comme cela a été observé dans d'autres fromages (Visser, 1977 ; de Koning, 1981), la quantité de présure ajoutée au lait influe sur le degré de protéolyse. Ceci est décelable dès le début de l'affinage et se maintient pendant au moins 4 semaines puisqu'à cette date l'azote soluble de fromages fabriqués respectivement avec 7,5 et 60 ml de présure diffère d'environ 7 %.

La présure ne semble pas être le facteur principal de la production de composés amers dans les Camemberts affinés. Les dégustations n'ont pas permis de mettre en évidence des différences significatives entre les fromages fabriqués soit avec 15 ml, soit avec 60 ml de présure, ceci même dans le cas de fromages affinés en atmosphère ammoniacale dont le niveau d'amertume restait faible quelle que soit la dose de présure utilisée. Ces conclusions diffèrent sensiblement de celles qui résultent des travaux effectués avec le Gouda (Stadhouders et Hup, 1975), mais rejoignent celles qui ont été obtenues en fabrication de Cheddar avec des souches non amères (Lawrence et coll., 1972) et elles sont en accord avec les observations précédemment

effectuées par Martley (1975) sur le Camembert. Dans le cas de ce fromage, on peut penser que la forte remontée de pH du caillé provoquée par le *Penicillium* réduit l'activité de la présure diminuant ainsi la production de peptides amers. Il est à noter que le remplacement de la présure de veau par un agent coagulant extrait de *Cynara cardunculus* fortement générateur d'amertume (Barbosa et coll., 1976) conduit à l'obtention de fromages extrêmement amers dont le niveau d'amertume n'est que relativement peu réduit par une incubation en présence d'ammoniac. Cette observation suggère que si le rôle de la présure de veau comme producteur d'amertume est plus faible que celui du *Penicillium*, cette conclusion ne doit pas être généralisée sans précaution à toutes les enzymes coagulantes ni peut-être à d'autres laits que le lait de vache (Pelissier et Manchon, 1976).

En conclusion, le *Penicillium* semble bien être le principal responsable de l'amertume des fromages de type Camembert lorsque sa croissance n'est pas limitée par les caractères physico-chimiques du fromage frais, les conditions d'affinage ou l'implantation d'une flore de surface concurrente. Ce sont certainement des facteurs de cette nature qui limitent l'amertume des fromages industriels, en complément du rôle probable joué dans la dégradation des peptides amers par les aminopeptidases provenant du levain et de micro-organismes de contamination toujours présents dans les fromages conventionnels.

Dans la pratique, l'incubation des fromages dans une atmosphère légèrement ammoniacale constitue un moyen potentiel pour contrôler l'amertume des fromages à croûte fleurie. De même, l'ensemencement en *Geotrichum* permet d'atténuer très fortement l'amertume de ces fromages comme cela a été signalé par Mourgues et coll. (1983).

Remerciements

Les auteurs remercient très vivement Mme Elisabeth Perrot, MM. R. Le Gouar, G. Pitel et J. Uro pour leur collaboration ainsi que MM. P. E. du Verdier et C. Arend qui ont participé à ce travail en tant que stagiaires et MM. R. Mourgues et N. Deschamps qui se sont chargés de la partie microbiologique des essais.

Ils sont également reconnaissants à M. G. Mocquot pour ses suggestions au cours de la réalisation de ce travail.

Bibliographie

- ADDA (J.), GRIPON (J. C.) and VASSAL (L.) (1982). — The chemistry of flavor and texture generation in cheese. *Food chemistry*, 9, 115-129.
- AUBERGER (B.), MONTALS (M.) et LENOIR (J.) (1982). — Etude du système aminopeptidasique de *Penicillium caseicolum*. 21^e Cong. int. lait., vol. 1, Book 2, 276.

- BARBOSA (M.), VALLES (E.), VASSAL (L.) et MOCQUOT (G.) (1976). — L'utilisation d'extrait de *Cynara cardunculus* L. comme agent coagulant en fabrication de fromages à pâte molle et à pâte cuite. *Le Lait*, 56, 1-17.
- COCHRAN (W.G.) and COX (G.M.) (1957). — Balanced and partially balanced incomplete block designs. In « Experimental designs ». John Wiley and Sons, Inc., New York.
- COLLIN (J.C.), GRAPPIN (R.) et LEGRAET (Y.) (1977). — Etude de la méthode de mesure, selon Berridge, du temps de coagulation de lait additionné d'une solution enzymatique. *Rev. Lait. Fr.*, 355, 389-394.
- CRAWFORD (R.J.M.) et ZWAGINGA (P.) (1977). — L'amertume dans les fromages. *Bull. Annuel F.I.L.*, doc. n° 97.
- CZULAK (J.) (1959). — Bitter flavour in cheese. *Austr. J. Dairy Tech.*, 14, 177-179.
- EDWARDS (J.) and KOSIKOWSKI (F.V.) (1983). — Bitter compounds from Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, 66, 727-734.
- GRIPON (J.C.), DESMAZEAUD (M.J.), LE BARS (D.) et BERGÈRE (J.L.) (1975). — Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II. Influence de la présure commerciale. *Le Lait*, 55, 502-516.
- HAMILTON (J.S.), HILL (R.D.) and LEEUVEN (H. Van) (1974). — A bitter peptide from Cheddar cheese. *Agric. Biol. Chem.*, 38, 375-379.
- HARWALKER (V.R.) and ELLIOT (J.A.) (1971). — Isolation of bitter and astringent fractions from Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, 54, 8-11.
- HOLMES (D.G.), DUERSCH (J.W.) and ERNSTROM (C.A.) (1977). — Distribution of milk clotting enzymes between curd and whey and their survival during Cheddar cheese making. *J. Dairy Sci.*, 60, 862-869.
- KLOSTERMEYER (H.), THOMASOW (J.) und WIECHEN (A.) (1972). — Eine Methode zur Untersuchung der Labverteilung zwischen Molke und Bruch mit J-131 markierten Renin. *Milchwissenschaft*, 27, 102-106.
- KONING (P.J. de), BOER (R. de), BOTH (P.) and NOOY (P.F.C.) (1981). — Comparison of proteolysis in a low-fat semihard type of cheese manufactured by standard and by ultrafiltration techniques. *Neth. Milk Dairy J.*, 35, 35-46.
- LAWRENCE (R.C.), CREAMER (L.K.), GILLES (J.) and MARTLEY (F.G.) (1972). — Cheddar cheese flavour. I. The role of starters and rennets. *N.Z. J. Dairy Sci. Tech.*, 7, 32-37.
- LENOIR (J.) et AUBERGER (B.) (1977). — Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. II. Caractérisation d'une protéase neutre. *Le Lait*, 57, 471-491.
- LENOIR (J.), AUBERGER (B.) et GRIPON (J.C.) (1979). — Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. III. Caractérisation d'une protéase acide. *Le Lait*, 59, 244-268.
- LOWRIE (R.J.) and LAWRENCE (R.C.) (1972). — Cheddar cheese flavour. IV. A new hypothesis to account for the development of bitterness. *N.Z.J. Dairy Sci. Tech.*, 7, 51-53.
- MARTLEY (F.G.) (1975). — Comportement et rôle des streptocoques lactiques du levain en fabrication de Camembert. *Le Lait*, 55, 310-323.
- MILLS (O.E.) and THOMAS (T.D.) (1980). — Bitterness development in Cheddar cheese: Effect of the level of starter proteinase. *N.Z. J. Dairy Sci. Tech.*, 15, 131-141.
- MOREAU (C.) (1983). — Quelques problèmes posés par les moisissures dans les industries laitières. *Tech. Lait.*, 975, 37-43.
- MOURGUES (R.), BERGÈRE (J.L.) et VASSAL (L.) (1983). — Possibilité d'améliorer les qualités organoleptiques des fromages de Camembert grâce à l'utilisation de *Geotrichum candidum*. *Tech. Lait.*, 978, 11-15.

- NEY (K. H.) (1971). — Voraussage der Bitterkeit von Peptiden aus deren Aminosäurezusammensetzung. *Z. Lebensmittel-unt. U. Forsch.*, 147, 64-68.
- PÉLISSIER (J. P.) and MANCHON (P.) (1976). — Comparative study of the bitter taste of enzymic hydrolysates from cow, ewe and goat caseins. *J. Food Sci.*, 41, 231-233.
- PÉLISSIER (J. P.), MERCIER (J. C.) et RIBADEAU-DUMAS (B.) (1974 a). — Etude de la protéolyse des caséines α_1 et β -bovines par la présure. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 14, 343-362.
- PÉLISSIER (J. P.), MERCIER (J. C.) et RIBADEAU-DUMAS (B.) (1974 b). — Problème de l'amertume dans les fromages. Résultats d'une enquête. *Rev. Lait. Fr.*, 325, 817, 820-821.
- RAADSVELD (C. W.) (1953). — Bitter compounds from cheese. 13^e Cong. int lait., 2, 676-680.
- RICHARDSON (B. C.) and CREAMER (L. K.) (1973). — Casein proteolysis and bitter peptides in Cheddar cheese. *N.Z. J. Dairy Sci. Tech.*, 13, 45-61.
- STADHOUDERS (J.) and HUP (G.) (1975). — Factors affecting bitter flavour in Gouda cheese. *Neth. Milk Dairy J.*, 29, 335-353.
- STADHOUDERS (J.), HUP (G.) and WAALS (C. B. van der) (1977). — Determination of calf rennet in cheese. *Neth. Milk Dairy J.*, 31, 3-15.
- STADHOUDERS (J.) (1979). — Mécanismes de la formation de l'amertume dans le fromage. *Rev. Lait. Fr.*, 376, 9-21.
- TOMASSONE (R.) et FLANZY (C.) (1977). — Présentation synthétique de diverses méthodes d'analyse de données fournies par un jury de dégustateurs. *Ann. Tech. Agri.*, 26, 373-418.
- TOURNEUR (C.) (1982). — Etude comparée des aptitudes biochimiques de *Penicillium caseicolum* sur caillés de fromagerie et par mesure « in vitro ». 21^e Congr. int. lait., vol. 1, Book 2, 380.
- TRIEU-CUOT (P.), ARCHIERI-HAZE (M. J.) and GRIPON (J. C.) (1982 a). — Effect of aspartyl proteinases of *Penicillium caseicolum* and *Penicillium roqueforti* on caseins. *J. Dairy Res.*, 49, 487-500.
- TRIEU-CUOT (P.), ARCHIERI-HAZE (M. J.) et GRIPON (J. C.) (1982 b). — Etude comparative de l'action des métalloprotéases de *Penicillium caseicolum* et de *Penicillium roqueforti* sur les caséines α_1 et β . *Le Lait*, 62, 234-249.
- TRIEU-CUOT (P.) and GRIPON (J. C.) (1982 a). — A study of proteolysis during Camembert cheese ripening using isoelectric focusing and two-dimensional electrophoresis. *J. Dairy Res.*, 49, 501-510.
- TRIEU-CUOT (P.) et GRIPON (J. C.) (1982 b). — Caractérisation de l'activité des protéases au cours de l'affinage des fromages à croûte fleurie. In « Utilisation des enzymes en technologie alimentaire ». Ed. Dupuy P., Tech. et Doc. Lavoisier, 293-297.
- VISSER (F. M. W.) (1977). — Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 3. Protein breakdown : analysis of the soluble nitrogen and amino acid nitrogen fractions. *Neth. Milk Dairy J.*, 31, 210-239.
-