



**HAL**  
open science

# Hiérarchisation des facteurs contribuant à la croissance des bulles dans des fromages à pâte pressée non cuite par une approche multi-échelles

Delphine Huc-Mathis

► **To cite this version:**

Delphine Huc-Mathis. Hiérarchisation des facteurs contribuant à la croissance des bulles dans des fromages à pâte pressée non cuite par une approche multi-échelles. Alimentation et Nutrition. Université de Rennes, 2013. Français. NNT : 2013REN1S085 . tel-00931927

**HAL Id: tel-00931927**

**<https://theses.hal.science/tel-00931927>**

Submitted on 16 Jan 2014

**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.



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

pour le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*Mention : Physique*

**Ecole doctorale Vie-Agro-Santé**

présentée par

**Delphine Huc**

Préparée à l'unité de recherche  
Technologie des équipements agroalimentaires, Irstea

---

**Hiérarchisation des  
facteurs contribuant à  
la croissance des bulles  
dans des fromages à  
pâte pressée non cuite  
par une approche multi-  
échelles.**

**Thèse soutenue à Rennes le 04/10/13**

devant le jury composé de :

**Sylvie Marchesseau**

Professeur Université Montpellier 2 / *rapporteur*

**Eric Beuvier**

Ingénieur de Recherche INRA Poligny / *rapporteur*

**Marie Hélène Famelart**

Chargée de Recherche INRA STLO / *examineur*

**Valérie Guillard**

Maître de conférence Supagro / *examineur*

**François Mariette**

Directeur de recherche Irstea / *directeur de thèse*

**Camille Michon**

Professeur AgroParisTech / *co-directeur de thèse*



## Remerciements

Voilà peut être l'exercice de rédaction le plus difficile auquel j'ai été confronté jusqu'ici car je ne suis pas sûre de pouvoir exprimer pleinement ma reconnaissance à tous ceux ayant œuvré à mes côtés ces trois dernières années... je vais essayer.

Bien sûr, mes premiers remerciements vont à Camille Michon et à François Mariette, mes directeurs de thèse. Naviguer entre deux laboratoires, deux équipes et deux villes durant trois ans était un vrai défi que seuls votre soutien et votre disponibilité ont rendu possible. J'ai beaucoup appris grâce à notre collaboration et pas seulement sur le plan scientifique. Merci de votre confiance.

Je tiens à remercier Tiphaine Lucas pour ses conseils, ainsi que l'ensemble des membres du projet U2M-Chop pour tous ces échanges qui ont fait sans cesse évoluer mon travail. Merci également à Sylvie Marchesseau, Eric Beuvier, Marie Hélène Famelart et Valérie Guillard pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je ne saurais exprimer assez mes remerciements à tous les membres des équipes IRMFood et SP2. Vous m'avez tous et toutes si bien intégrée malgré les allers-retours ! Vous avez largement contribué à mon équilibre durant ces trois ans passés en votre compagnie. Je suis particulièrement redevable à Gabrielle, Stéphane, Sylvain et Marie-Christine pour m'avoir si bien épaulée. Je retiendrai deux traits fondamentalement communs aux deux laboratoires : l'ambiance amicale et les pauses viennoiseries ! Merci aux cordons bleus et à l'équipe boulangerie pour tous ces bons moments.

Un grand merci également aux anciens ou actuels doctorants de Rennes et Massy qui ont pu compatir ou se réjouir avec moi. Je me dois de citer Yannick et Clément qui ont subi mes récriminations sur la météo bretonne et le chauffage au maximum dans le bureau que nous avons partagé durant ma thèse. Mais un grand merci aussi à Cécile, Marine, Jean-Baptiste, Lucia, Cindy, Souad, Anne R., Anne M., Lucie, Julien et Guillaume pour les nombreuses conversations plus ou moins scientifiques, les pauses partagées ainsi que pour avoir soutenu mon flot de paroles ! Je vous souhaite le meilleur. Avec une pensée bien sûr pour les étudiants qui ont participé au projet. Larissa, Julien, Jeanne, merci pour votre implication, en espérant de pas avoir été une trop mauvaise encadrante !

Enfin, ma gratitude va à ceux qui restent : Pascal, Charles, Sarah, Laurie, Emma, Wissem, Florian, Guillaume, Loriane et les autres. Merci d'avoir tenu le coup malgré des rencontres parfois réduites à peau de chagrin et d'avoir compris mes absences. Je tiens enfin à adresser mes sincères remerciements à la famille Mathis pour m'avoir si bien accueillie et encouragée.

Et bien entendu, les dernières lignes sont pour mes piliers du quotidien. A mes grand-mères pour leur gentillesse sans faille. A ma battante de marraine (les leçons d'anglais ont porté leur fruit !) et à mon oncle pour leur entrain, leur soutien et m'avoir toujours ouvert leur porte. A Pauline, plus sœur que nature, pour les fous rires et les pleurs, et pour avoir soutenu les longues conversations téléphoniques. A mes parents enfin, bien sûr. Merci d'avoir fait bloc avec moi dans mon exil nordique quand j'ai annoncé mon envie de « faire une thèse », de m'avoir encouragée et accompagnée à chacun des cinq déménagements de ces dernières années et surtout, d'avoir toujours su trouver les mots. Je n'en serai pas là sans votre soutien

inconditionnel. A Hugues, enfin, pour n'avoir pas hésité et m'avoir fait confiance. Pour l'intensité des moments partagés envers et contre la distance et pour ta présence, toujours à mes côtés.

Décidément je suis longuement redevable et la liste est sûrement incomplète. Je voudrais donc remercier tous les oubliés involontaires des lignes précédentes, forcément non exhaustives. Je m'en excuse par avance.

Le dernier mot sera pour Celui qui n'a pas pu voir l'aboutissement de ce projet dont il était si fier. Je ne t'oublie pas.

*A mon Grand Père,*

# Sommaire

Remerciements .....	3
Introduction .....	8
Chapitre I - Etat de l'art.....	11
1.1 Nomenclature des fromages étudiés .....	12
1.2 Fabrication des fromages à pâte pressée non cuite.....	13
1.3 Eléments de structuration des fromages .....	13
1.3.1 Les grains de caillé .....	15
1.3.2 La matière grasse .....	17
1.3.3 Le réseau protéique.....	20
1.4 Facteurs d'influence sur l'ouverture des fromages.....	24
1.4.1 Nucléation .....	24
1.4.2 Flore microbienne.....	24
1.4.3 Répartition du CO <sub>2</sub> .....	28
1.4.4 Propriétés mécaniques .....	37
1.4.5 Les gradients dans les fromages .....	47
1.5 Caractérisation des ouvertures des fromages.....	52
1.6 Synthèse des connaissances sur la croissance de bulles .....	53
Références bibliographiques .....	59
Chapitre II - Résultats.....	67
2.1 Méthode de suivi de la croissance de bulles par IRM (A1).....	68
2.2 Observations microscopiques multi-échelles (A2).....	85
2.3 Propriétés rhéologiques de la pâte fromagère (A3).....	100
2.4 Facteurs d'influence sur la croissance de bulles.....	120
2.4.1 Etude de l'évolution de la microstructure dans le temps et dans les fromages (A4)...	120
2.4.2 Etude des gradients au sein des fromages PPNC (A5).....	135
2.4.3 Etude de l'influence du gradient de teneur en sel sur la croissance de bulles (A6).....	154
Chapitre III - Discussion et perspectives.....	175
Chapitre IV - Matériels et Méthodes .....	193
4.1 Production des fromages .....	194
4.2 Affinage des fromages.....	195
4.3 Suivi de la croissance de bulles par imagerie.....	195
4.3.1 IRM .....	195
4.3.2 Détermination de l'espace de tête des fromages .....	198

4.3.3	RX .....	199
4.3.4	Calcul du taux de déformation des bulles durant l'affinage .....	199
4.4	Découpe des zones d'intérêt dans les fromages .....	199
4.5	Rhéologie de la pâte fromagère.....	200
4.6	Observations de la microstructure des fromages.....	205
4.6.1	Microscopie optique .....	205
4.6.2	Microscopie confocale.....	206
4.6.3	Microscopie électronique .....	207
4.7	Mesure de la production de CO <sub>2</sub> par respirométrie .....	208
4.8	Composition chimique des fromages .....	208
	Valorisation de la thèse .....	210
	Table des figures .....	211
	Liste des tableaux .....	213
	Table des abréviations .....	214



## Introduction

La présence de bulles ou « yeux » est un paramètre important de la qualité des fromages de type pâte pressée non cuite. Leurs caractéristiques (nombre, taille et aspect des yeux) interviennent directement dans la dénomination légale de certains fromages, au même titre que les paramètres de composition comme la teneur en eau ou en matière grasse. Ainsi, les ouvertures contribuent pour 60% de la note de classement des meules par les professionnels, au sein d'une même typologie de fromages. De plus, des études établissent que l'acte d'achat par le consommateur est largement conditionné par l'aspect des ouvertures. L'ensemble des étapes de production sont reconnues comme ayant un rôle sur la qualité des ouvertures. De plus, des défauts peuvent apparaître, notamment des fissures (ou cracks ou lainures), ce qui nuit à l'aspect des tranches de fromages dans le commerce. Paradoxalement, les mécanismes de croissance de bulles sont globalement méconnus d'où une maîtrise de la production difficile, reposant essentiellement sur un savoir-faire empirique. Cette situation devient une forte contrainte pour les industriels face aux demandes du consommateur, toujours en quête d'une offre renouvelée. Or la mise en œuvre de ces innovations nécessite de nombreux essais pilote extrêmement coûteux et de longue durée en raison d'un manque de données rationnelles sur les mécanismes impliqués dans l'ouverture.

Pour faire face à ces enjeux, il est nécessaire de disposer d'une meilleure connaissance des mécanismes de croissance de bulles et de hiérarchiser les facteurs d'influence sur l'ouverture des fromages. Plusieurs études s'accordent pour définir les conditions nécessaires à la croissance des yeux dans les fromages que sont la présence de nuclei, une production gazeuse et une texture des fromages pouvant s'écouler et résister de façon appropriée. Ainsi, trois axes de travail sont particulièrement présents dans la littérature : tout d'abord, l'étude des bactéries à l'origine de la production gazeuse responsable des yeux dans les fromages, ainsi que des voies métaboliques correspondantes ; d'autre part, les événements biochimiques ayant lieu durant l'affinage, en particulier la protéolyse ainsi que la lipolyse dans une moindre mesure ; enfin, la texture des fromages et leurs propriétés rhéologiques ont été l'objet de nombreuses analyses, parfois en lien avec leurs caractéristiques sensorielles. Elles sont parfois complétées par des observations de la microstructure, réalisées à l'aide de différentes techniques de microscopie. Si ces approches expérimentales ont permis de réaliser des avancées, la détermination de la cinétique de croissance des bulles n'a jamais été quantifiée, ce qui a fortement limité la possibilité de hiérarchisation des facteurs.

L'application de techniques non destructives pour l'évaluation de l'ouverture des fromages représente donc un moyen de lever ce premier verrou. Dans ce contexte, le recours à l'IRM, scanner ou tomographie RX a notamment permis d'obtenir des images de fromages entiers et de quantifier des indicateurs d'ouverture sans avoir à les découper. Ces techniques ont apporté des résultats globaux dans des conditions reproductibles inaccessibles par un décompte « manuel » ou d'une notation de fromages par un jury, réalisé sur des tranches de fromage. De telles études restent cependant peu répandues et jusqu'à maintenant l'approche cinétique n'a été que rarement employée. En effet, les ouvertures sont souvent abordées de façon globale sans information sur la localisation spatiale ou sans cinétique individuelle de chaque bulle, permettant d'aborder les effets d'hétérogénéité spatiale. Or, seule une approche avec une double dimension spatiale et temporelle de la cinétique de croissance de bulles permettra d'intégrer dans les mécanismes l'évolution des gradients au sein des fromages, qui en sus des interactions entre paramètres, rajoutent un niveau de complexité dans l'interprétation des résultats.

En complément de la mise en place de techniques de suivi de la croissance des bulles, plusieurs auteurs ont souligné un second verrou dans la compréhension des mécanismes : l'interdépendance des facteurs. En effet, la plupart des études réalisées ne permettent pas de décorréler les facteurs d'influence, ce qui limite l'émergence de mécanismes clairement identifiés. L'objectif du présent projet de recherche est donc double : comprendre mais aussi hiérarchiser les mécanismes de croissance de bulles dans des fromages de type pâte pressée non cuite. Une méthodologie complète combinant diverses techniques a été mise au point, de façon à obtenir des éléments de caractérisation des fromages dans le temps, dans l'espace et à différentes échelles. Cette démarche repose sur un protocole de suivi de la croissance des yeux par IRM ou tomographie RX donnant accès à la quantification de tous les indicateurs d'ouverture souhaités (nombre et taille des yeux mais aussi localisation et cinétiques de croissance). Il permet ainsi d'identifier les temps caractéristiques de la croissance de bulles et l'influence des gradients intrinsèques aux fromages. Suite à cette première phase, des méthodes invasives ont alors été utilisées, comme 1) la mesure des propriétés rhéologiques des fromages, 2) la production de CO<sub>2</sub> et la mesure de traceurs métaboliques reliés au CO<sub>2</sub>, 3) la composition chimique des fromages et 4) des observations microscopiques pour appréhender les changements de structure à différentes échelles. Cette démarche expérimentale a été appliquée à l'étude de fromages produits industriellement.

La réalisation de cette thèse soutenue par l'ANRT (Association Nationale de la Recherche Technologique) s'est inscrite dans le projet de recherche U2M-Chop pour « Understanding, Managing and Modelling Cheese OPenings ». S'étendant sur quatre ans, il a regroupé quatre partenaires, privés et publics et a été financé par les Conseils Régionaux de Bretagne, Pays de Loire, Basse Normandie ainsi que labellisé par le Pôle de compétitivité Valorial. Chaque partenaire a apporté une expertise respectivement dans les domaines de la technologie fromagère, la microbiologie, l'IRM ou la rhéologie. Le projet a donc été mené de façon inter-sites avec un regroupement de résultats issus de nombreuses méthodes basées sur le savoir-faire de chacun. Cette logistique particulière a permis d'accéder à différents outils indispensables au rassemblement des connaissances sur les mécanismes de croissance de bulles dans les fromages à pâte pressée non cuite.

# **Chapitre I - Etat de l'art**

## 1.1 Nomenclature des fromages étudiés

Selon le Codex Alimentarius (CODEX STAN 283-1978) « *Norme générale pour le fromage* », le fromage est le produit affiné ou non affiné, de consistance molle, semi-dure, dure ou extradure dans lequel le rapport protéines de lactosérum/caséines ne dépasse pas celui du lait. Il est obtenu par coagulation complète ou partielle de matières d'origine exclusivement laitière (protéines du lait, du lait écrémé, du lait partiellement écrémé, de la crème de lactosérum ou du babeurre), seules ou en combinaison, grâce à l'action de la présure ou d'autres agents coagulants appropriés et par égouttage partiel du lactosérum résultant de cette coagulation. Le fromage affiné doit être maintenu pendant un certain temps à la température et dans les conditions nécessaires pour que s'opèrent les changements biochimiques et physiques caractéristiques du fromage et permettant sa consommation.

Outre ces spécifications technologiques, les fromages sont aussi différenciés par leur texture et leurs ouvertures, comme le montrent les exemples suivants :

- *L'Emmental* (CODEX STAN 269-1967) est un fromage affiné à pâte dure ayant une couleur allant du blanc au jaune et une texture élastique, tranchante mais pas collante. Il possède un nombre de trous de gaz réguliers, allant de rares à nombreux, de ternes à brillants, d'une taille variant entre celle d'une cerise et d'une noix (**diamètre entre 1 et 5cm**) mais la présence de quelques ouvertures et fissures est acceptable.
- *L'Edam* (CODEX STAN 265-1966) et *le Gouda* (CODEX STAN 266-1966) sont des fromages affinés à pâte ferme/semi-dure dont la couleur va du blanc au jaune, ayant une texture ferme, se prêtant à la coupe. L'Edam possède peu de trous de gaz, alors que le Gouda peut en compter beaucoup, mais ils tous sont décrits comme plus ou moins arrondis, de la taille d'un grain de riz/tête d'épingle à celle d'un petit pois (**diamètre jusqu'à 10mm**), dont la répartition est raisonnablement régulière à l'intérieur du fromage, mais la présence de quelques ouvertures et fissures est acceptable.
- *Le Cheddar* (CODEX STAN 263-1966) est un fromage affiné à pâte dure ayant une couleur de blanc cassé à jaune pâle ou orange et une texture ferme, lisse et cireuse. Les trous de gaz sont absents mais quelques ouvertures et fissures sont acceptables.

De plus le terme « Swiss-type » est employé pour caractériser des fromages de type dur ou semi-dur, ayant des yeux réguliers et une fermentation propionique en sus de ferments lactiques (Thierry et al., 2010). La distinction entre les pâtes extra-dure, dure, semi-dure et molle se fait par rapport à la teneur en eau dans le fromage dégraissé (TEFD) ou humidité sur fromage dégraissé (HFD), en tant qu'indicateur de fermeté. Les fromages à pâte semi-dure se situent dans une gamme de TEFD comprise entre 54 et 69%. Cependant, le terme « Swiss-type » n'est pas un consensus international, certains auteurs décrivant ces fromages comme des pâtes cuites proches de la technologie du plus connu d'entre eux, l'Emmental, tels que le Gruyère, le Comté et le Beaufort, le Bergkäse et l'Appenzeller (Mocquot, 1979). Au contraire, d'autres auteurs se réfèrent aux fromages « Swiss-type » pour décrire également des fromages semi-durs (à pâte <non cuite ou semi-cuite) tels que le Maasdammer, le Jarlsberg, le Grevéost ou le Samsøe (Steffen et al. 1993 ; Rage, 1993).

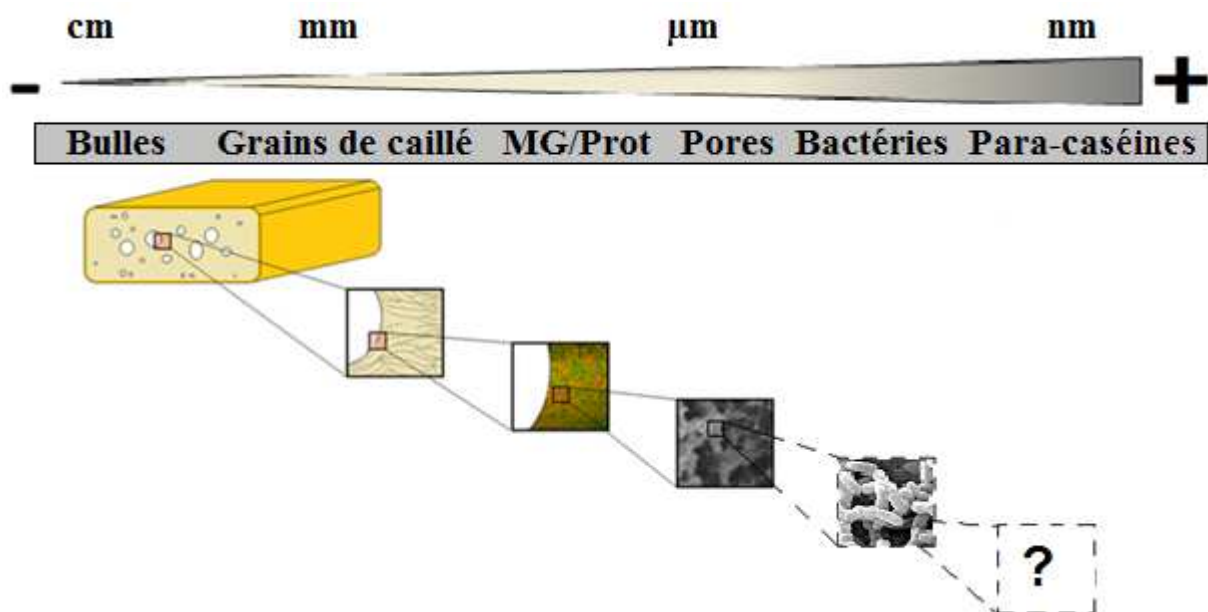
## **1.2 Fabrication des fromages à pâte pressée non cuite**

La fabrication des fromages à pâte pressée non cuite débute avec la préparation du lait entier, soumis à une standardisation en matière protéique/matière grasse et à une pasteurisation avant d'êtreensemencé en bactéries lactiques (LAB) et propioniques (PAB). Le lait est ensuite brassé avant que la présure soit ajoutée, entraînant la coagulation du lait et à la formation d'un gel souple après un temps de repos. Ce gel est ensuite tranché en grains dits grains de caillé, qui expulsent une phase liquide, le sérum. La séparation grains/sérum a lieu durant la phase de drainage, le sérum étant évacué alors que les grains de caillé sont moulés et pressés pour former des blocs. La phase d'acidification ayant démarré lors de l'ensemencement du lait en LAB consommant le lactose du lait se termine en fin de pressage. Enfin, les fromages sont saumurés par immersion dans une solution saturée ou très concentrée en NaCl. Ils peuvent ensuite être emballés ou non, selon la présence d'une croûte naturelle ou d'un enrobage par exemple. La dernière étape de production est la phase d'affinage, découpée en deux parties : cave froide et cave chaude, le saumurage pouvant être considéré comme le début de la cave froide. Les paramètres standards de la fabrication de différents types de fromages ainsi que les appareillages utilisés sont détaillés dans des ouvrages de référence tels que Benett & Johnston (2004) et Kloosterman (1991).

## **1.3 Eléments de structuration des fromages**

La composition des fromages est donc dépendante de celle du lait, que ce soit d'un point de vue microbiologique (souches bactériennes, facteurs de croissance potentiels, etc),

nutritionnel (protéines, matière grasse, etc) ou en lien avec la nucléation (présence de nucléi « naturels » et non technologiquement maîtrisés). Les principales souches bactériennes caractérisant les fromages « Swiss-type » sont décrites plus avant au chapitre 1.4.1. Cependant, le lait apporte également au fromage tous ses constituants, qui vont subir des traitements thermo-mécaniques lors des étapes de fabrication décrites précédemment (chapitre 1.2) et former la structure de la pâte fromagère. Le terme « structure » recouvre de nombreuses échelles, allant du micro au macro-domaine d'observation, comme le montre la Figure 1. Ainsi, la pâte fromagère peut être décrite comme une matrice composée d'un réseau protéique branché avec des agrégats plus ou moins gonflés (échelle du nm au  $\mu\text{m}$ ), au sein duquel sont dispersés des globules de matière grasse (de l'ordre de  $1\mu\text{m}$ ) agissant comme éléments de remplissage inertes (Rohm & Lederer, 1992). Cette matrice est en équilibre avec une phase liquide, siège du développement microbologique. Des colonies de diverses souches bactériennes (de l'ordre de 1 à  $10\mu\text{m}$ ) sont aussi présentes au sein des fromages. Enfin, à une échelle supérieure, ce réseau peut aussi être décrit comme un assemblage de grains de caillé (de l'ordre de 1mm), contenant des bulles de taille et de nombre variables (de l'ordre du cm).



**Figure 1 : Schématisation de la structure des fromages à différentes échelles, grossissement du moins (-) au plus (+) fin**

Par conséquent, de nombreuses études ont été menées dans la littérature avec pour but d'étudier l'évolution de la structure de la pâte fromagère au cours de l'affinage et/ou des étapes de fabrication précédentes. Trois techniques sont plus particulièrement développées à ces fins dans la littérature : microscopie optique/photographie, confocale et électronique,

comme le montre le tableau suivant. Cependant, toutes ne sont pas adaptées à l'observation des mêmes éléments de structure (Tableau 1).

**Tableau 1 : Récapitulatif des méthodes d'observation de la microstructure des fromages dans la littérature. Réseau prot = réseau protéique et MG = matière grasse (globules ou cristaux)**

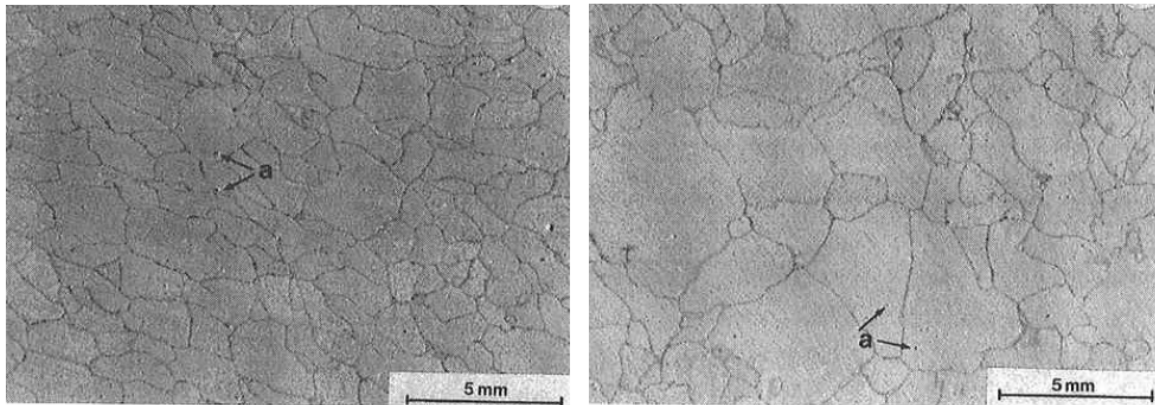
Produit	Technique	Echelle	Réseau prot	MG	Grains caillé	Bulles	Cracks	Références
Cheddar	Photographie	?			✓			Olson & Price, 1970
Cheddar	Photographie	10mm			✓	~		Kalab et al., 1981
Cheddar	Photographie	10mm			✓			Lowrie et al., 1981
Emmental, Gruyère...	Photographie	5mm			✓	✓	✓	Rüegg & Moor, 1987
Gouda	Photographie	1cm			✓		✓	Akkerman et al., 1996
Fromage fondu	Photographie	50µm	✓	✓				Bowland et al., 2001
Gouda	MCBL	25µm	~	✓				Blonk et al., 1993
Gouda	MCBL	50µm			✓			Akkerman et al., 1994
Cheddar et f. fondu	MCBL	50µm	~	✓	✓			Sutheerawattananonda et al., 1996
Lait, Cheddar	MCBL	25µm	✓	✓	✓			Auty et al., 2001
Emmental	MCBL	10µm	~	✓				Michalski et al., 2004
Cantal	MCBL	20µm	~	✓	✓			De Freitas et al., 2005
Emmental	MCBL	20µm	~	✓				Lopez et al., 2006
Emmental	MCBL	8 - 80µm	~	✓	✓	~		Lopez et al., 2007
Cheddar, pâte molle	MCBL	8 - 20µm	~	✓				Lopez et Briard-Bon, 2007
Mozzarella, Cheddar	MCBL	20µm	✓	✓				Everett & Auty, 2008
Emmental modèle	MCBL	40µm	~	✓				Richoux et al., 2008
Cheddar	MCBL	100µm	~	✓				Rogers et al., 2010
Matrices modèles	MBCL & MEB	20 & 1µm	~ et ✓	✓		✓		Floury et al., 2009
Gel et Cheddar	MCBL & MEB	10µm	~ et ✓	✓				Ong et al., 2011
Mozzarella	MCBL	10µm	✓	✓				Hussain et al., 2012
Fromage cottage	MEB	1 - 5µm	✓	~				Kalab et al., 1979
Emmental	MEB	5 - 50µm	✓	✓		✓		Rousseau et al., 1989
Pâte pressée modèle	MEB & optique	32µm	✓	✓	✓	✓		Riberolles et al., 1996
Fromage fondu	MEB	1µm	✓	✓				Marchesseau et al., 1997
Emmental	MEB	20µm	✓	✓	✓			Famelart et al., 2002
Cheddar	MEB	10µm	✓	~		✓		Pastorino et al., 2003
Queso Blanco	MEB	20µm	✓	✓		✓		Tunick et al., 2008
Fromage chèvre	MEB	8µm	✓	~				Rovira et al., 2011

### 1.3.1 Les grains de caillé

Les grains de caillé forment un élément de structure propre aux fromages de type pâte pressée : ils sont créés lors de l'étape de tranchage du gel formé après coagulation du lait emprésuré. La séparation grains/sérum et le pressage créent ensuite une structure de grains ovoïdes allongés observables à une échelle de l'ordre du millimètre, et séparés par des bordures distinctes. Le pressage conduit à une anisotropie dans l'organisation des grains, comme le montrent les observations photographiques réalisées sur différents types de fromages (Ruegg & Moor, 1987). Les grains de caillé forment des motifs différents dans les sections selon la direction de découpe, allongés perpendiculairement au pressage et plus ronds dans le sens parallèle au pressage (Kalab et al., 1982). Un exemple de grains de caillé



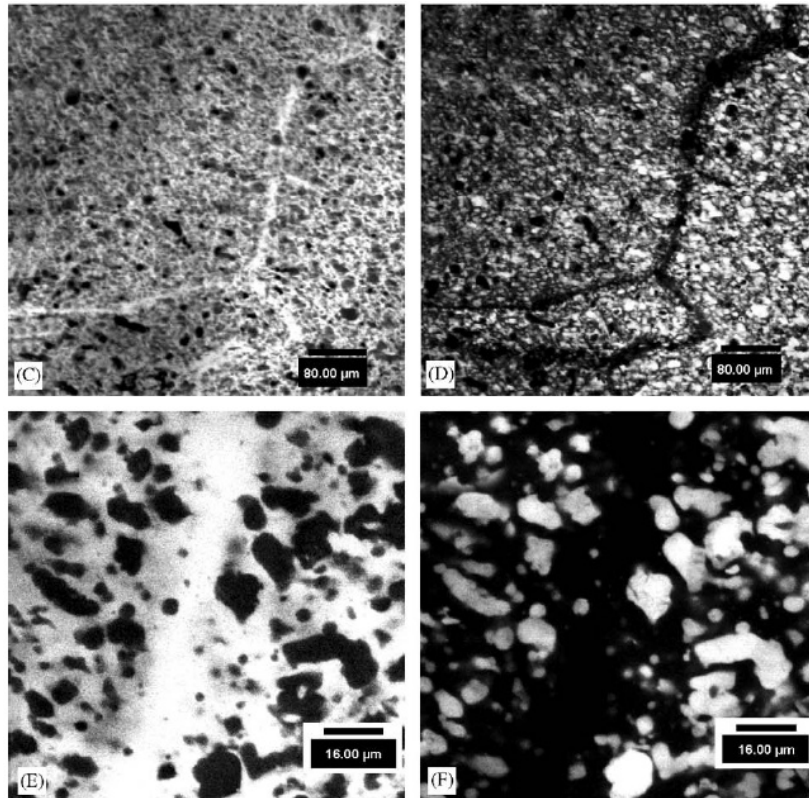
observés horizontalement ou verticalement dans du Sbrinz est présenté en Figure 2 (Ruegg & Moor, 1987).



**Figure 2 : Grains de caillé photographiés dans du Sbrinz. Gauche = axe horizontal ; Droite = axe vertical. D'après Ruegg & Moor, 1987.**

Certains auteurs ont montré que des grains de caillé découpés de façon mécanisée ou à la main ne formeraient pas les mêmes motifs suite au moulage et au pressage subséquents (Ruegg & Moor, 1987, Lowrie et al., 1982).

Les deux techniques principalement utilisées pour observer les grains de caillé dans les fromages sont la photographie d'échantillons fixés (Figure 2) ou la microscopie confocale à balayage laser (MCBL ou CLSM) (Figure 3), comme récapitulé dans le Tableau 1.



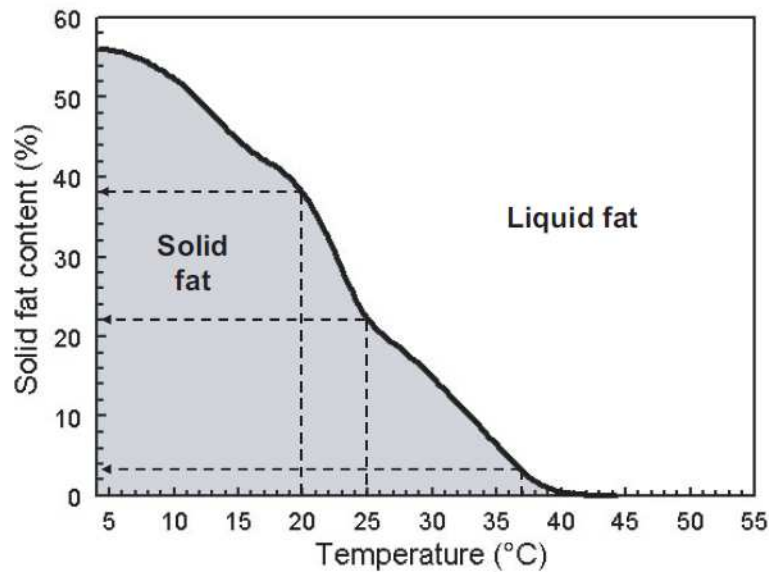
**Figure 3 : Observation de bordure de grains de caillé dans l'Emmental affiné pendant 52j en microscopie confocale à balayage laser : protéines seules (C,E) et matière grasse seule (D,F), d'après Lopez et al., 2007**

Cependant, la première technique donne un champ de vue beaucoup plus large allant jusqu'à 10mm alors que la seconde ne peut suivre les bordures de grains sur plus d'un millimètre au maximum.

### 1.3.2 La matière grasse

Dans le lait, la matière grasse forme une émulsion de globules gras d'un diamètre compris entre 1 et 5µm, dispersés dans la phase aqueuse. Elle est constituée très majoritairement de triglycérides (98% + 1% de stérols et 1% de phospholipides) entourés d'une double couche lipidique et protéique : la membrane. Celle-ci sert d'interface aux interactions entre la matière grasse et les autres constituants du lait et participe à la stabilisation des globules gras. Le fort polymorphisme de la matière grasse du lait implique une importante variabilité de cristallisation car les points de fusion varient dans un large intervalle. Il est ainsi possible de distinguer les LMP, MMP et HMP, pour Low, Middle ou High Melting Point. Cette complexité de composition de la matière grasse conduit à des changements d'état au cours de la fabrication des fromages, comme l'illustre la courbe

suivante (Figure 4) pour la phase d'affinage dans le cas de l'Emmental (Lopez & Briard-Bion, 2007).



**Figure 4 : Propriétés thermiques de l'Emmental déterminées par intégration des courbes de profils de fusion obtenus par DSC (d'après Lopez et al., 2007)**

Cette représentation donne l'exemple des fortes différences pouvant exister dans la cristallinité de la matière grasse de l'Emmental si la température passe de 20 à 25°C. Même dans le cas de fromages à pâte non cuite, le procédé de fabrication implique néanmoins de fréquents changements de température, durant la pasteurisation du lait, la coagulation, le saumurage, l'affinage et le stockage en particulier. De plus, étant donné le format des fromages, la transition d'une température à l'autre n'est ni instantanée ni homogène. La Figure 4 démontre donc la variabilité des états physiques de la matière grasse des fromages pouvant être observée à différents stade du procédé de fabrication. En sus de ces variations, le niveau de dégradation du globule gras natif peut aussi évoluer au cours de la fabrication (De Freitas et al., 2005; Lopez & Briard-Bion, 2007; Lopez, Camier, & Gassi, 2007) pour l'Emmental et le Cantal: globules gras natifs, globules homogénéisés, globules coalescés, agrégats de globules gras, agrégats/globules partiellement coalescés maintenus par des cristaux de matière grasse ou matière grasse complètement déstructurée en flaques de matière grasse libre (Figure 5)

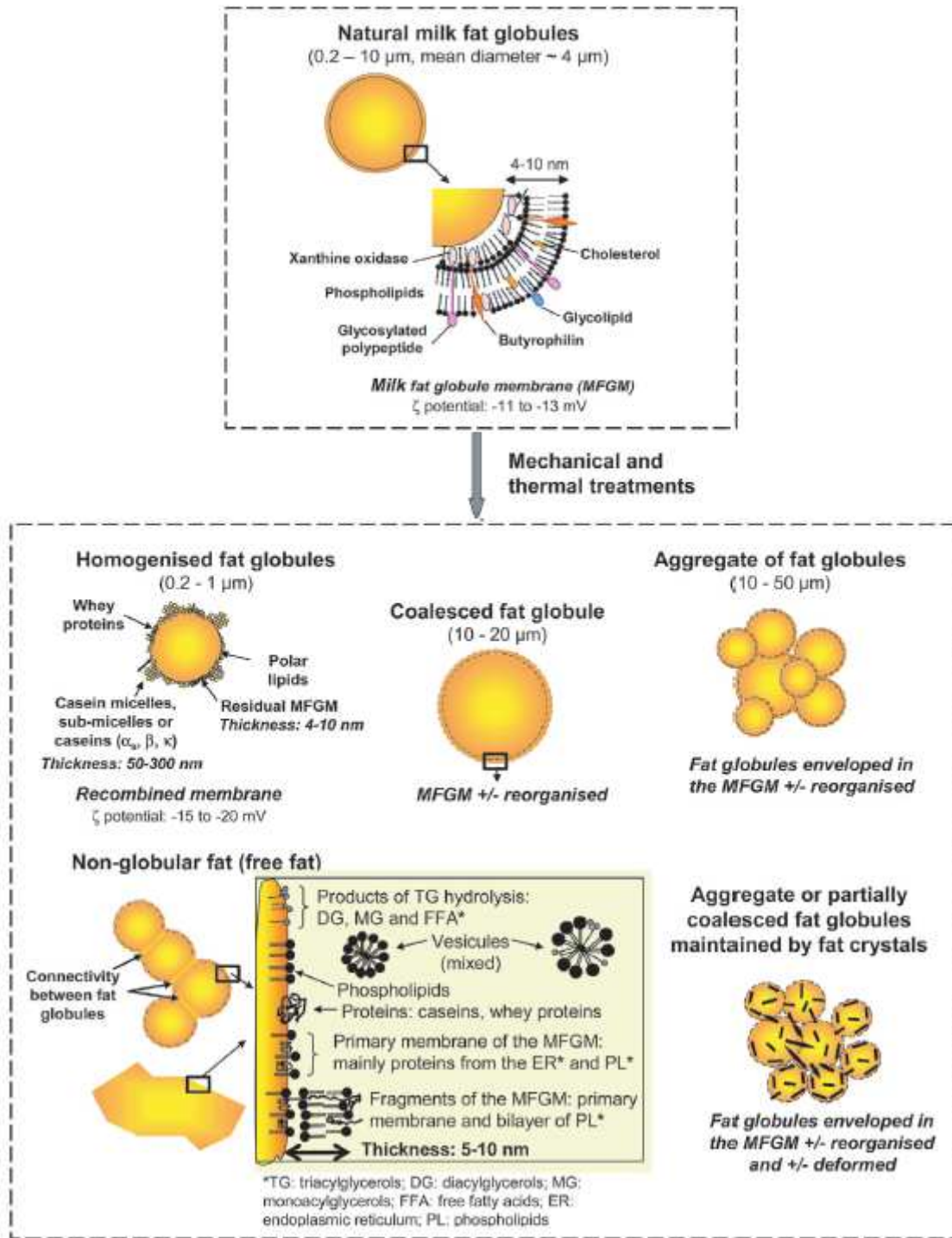


Figure 5 : Différents états de la matière grasse dans les fromages de type Emmental (d'après Lopez et al., 2007)

Enfin, la matière grasse des fromages est également soumise à l'action d'enzymes dégradant la membrane des globules pour former des acides gras libres (AGL). Il s'agit d'un phénomène de lipolyse. Elle contribue à l'aromatisation des fromages car les AGL et leurs produits (alcools, cétones, esters...) sont nécessaires à l'obtention du goût caractéristique de fromages comme l'Emmental (Collins et al., 2004) Elle repose sur l'action de deux enzymes principales : la lipase lipoprotéine du lait et les lipases bactériennes, notamment issues des

PAB (Chamba & Perreard, 2002). Elle est cependant de faible envergure dans des fromages tels que le Gouda, le Cheddar ou l'Emmental. La lipolyse peut néanmoins contribuer à la déstructuration de la matière grasse, surtout durant l'affinage.

La microscopie confocale à balayage laser représente un outil intéressant pour examiner la matière grasse des fromages, après un marquage spécifique par des sondes dédiées. Ainsi, d'après Lopez et al. (2007), la matière grasse de l'Emmental semble particulièrement déstabilisée par l'affinage (jusqu'à 52 jours) au cours duquel elle forme non plus des globules sphériques mais des flaques de matière grasse libre (cf Figure 7 partie (1)). Les traitements thermomécaniques subis au cours du procédé de fabrication de l'Emmental impactent également la taille des globules gras, avec une granulométrie moyenne supérieure entre l'emprésurage et le pressage, qui casse certains globules et forment des pools de matière grasse libre (Lopez et al., 2007). De Freitas et al. (2005) ont également observé une organisation de la matière grasse majoritairement sous forme de flaques, et non en globules sphériques, dans du Cantal après 4 mois d'affinage, sous croûte comme à cœur (cf Figure 7 partie (2)). Les auteurs soulignent que la présence de tels pools de matière grasse libre doit entraîner une extraction aisée de la matière grasse, ce qui pourrait expliquer l'aspect gras de ces fromages lorsqu'ils sont chauffés. Ainsi, lors de l'étape d'égouttage, la matière grasse s'exsuderait des grains de caillé et passerait dans le sérum. Des observations de MCBL révèlent également des bordures de grains de caillé dénuées de matière grasse (De Freitas et al., 2005 ; Lopez et al., 2007), pouvant être le résultat de cette déperdition, comme le montre la Figure 3 par exemple pour l'Emmental.

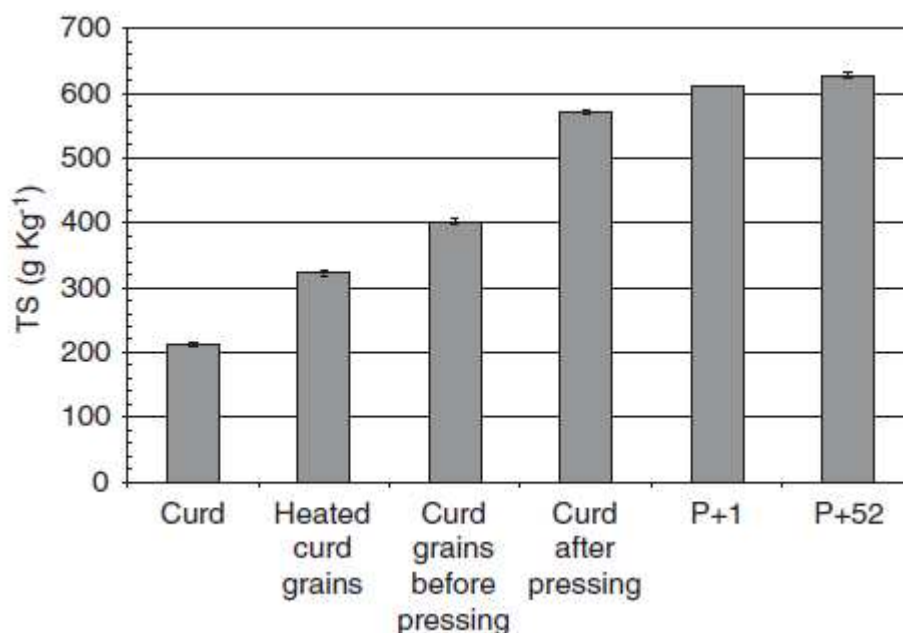
Contrairement à la MCBL, les globules gras sont plus difficilement observables par la technique de microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM) employée sans recours à la cryo-fixation (Famelart, Le Graet, Michel, Richoux, & Riaublanc, 2002; Rousseau & Legallo, 1990). En effet, de par les étapes de déshydratation et de fracturation des produits avant métallisation, la matière grasse peut être endommagée et relarguée. Seules les zones où les globules s'imbriquaient dans le réseau protéique restent parfois visibles de par leur aspect lisse caractéristique qui les différencie des pores du réseau protéique.

### 1.3.3 Le réseau protéique

La caséine est une molécule amphiphile représentant 80% du contenu protéique du lait. Les autres protéines minoritaires sont les lactosériques :  $\kappa$ -lactoglobuline,  $\alpha$ -lactalbumine, immunoglobulines, lactoferrine et lactoperoxydase notamment. La caséine est organisée dans le lait sous forme de suspension micellaire mais de nombreux modèles ont été proposés depuis les années 1980 quant à la structure des micelles : sub-micelles cimentées par des ponts calcium (Schmidt & Payens, 1972 ; Schmidt, 1982 ; Slaterry & Evard, 1973 ; Walstra, 1999), nano-clusters de phosphate de calcium (Holt, 2004) ou modèle Dual-Binding basé sur le précédent mais postulant la présence d'interactions entre les zones hydrophobes des caséines (Horne, 2006). Néanmoins, tous ces modèles sont décrits pour le lait et non pour les fromages issus de la coagulation, découpe et pressage du lait. Une distinction est donc couramment réalisée dans la littérature entre les caséines du lait, à l'aspect micellaire et les para-caséines du fromage, dont l'organisation n'est pas caractérisée de façon certaine.

Tout comme la matière grasse peut subir une déstructuration par lipolyse, les protéines peuvent être affectées par une autre réaction biochimique durant l'affinage : la protéolyse. Des enzymes de type protéinases et peptidases dégradent la matrice caséique des fromages, ce qui impacte la texture et la flaveur. Ces enzymes peuvent provenir du lait, de l'agent coagulant (présure) ou des bactéries (lactiques, propioniques ou NSLAB = Non Starter Lactic Acid Bacteria). Leur action principale peut être globalement décrite comme l'hydrolyse des protéines de la matrice fromagère en peptides de différentes tailles (protéolyse primaire) qui sont à leur tour hydrolysés en acides aminés (protéolyse secondaire) (Upadhyay et al., 2004).

En termes d'évolution du réseau protéique au cours des traitements thermomécaniques de la fabrication des fromages, Lopez et al. (2007) ont montré un fort impact du pressage sur le réseau protéique de l'Emmental en utilisant la Microscopie Confocale à Balayage Laser (MCBL) : le réseau protéique se densifie après pressage et devient lisse et compact (Figure 7). En revanche, après le pressage, la MCBL ne permet pas de décrire l'effet potentiel des étapes de procédé suivantes. En effet, le réseau protéique est trop dense, comme illustré dans les cas d'Emmental ou de Cantal présentés Figure 7 (Lopez et al., 2007, De Freitas et al., 2005). La résolution est alors insuffisante pour permettre de commenter l'évolution du réseau protéique. Cette densité protéique s'explique par les changements de composition apparaissant dans les fromages au cours de leur procédé de fabrication. Lopez et al. (2007) ont ainsi montré que l'extrait sec total dans l'Emmental était multiplié par 2,8 entre le stade caillé en cuve et la sortie du pressage comme le montre la Figure 6.



**Figure 6 : Evolution de l'extrait sec total dans un Emmental en cours de fabrication : caillé, grains de caillé chauffé, avant pressage, après pressage, en sortie de saumure (P+1) et à 52 jours d'affinage (P+52). D'après Lopez et al., 2007**

Il est possible d'extraire la phase aqueuse de fromages à différents stades de fabrication par pressage d'échantillons de meule. Celle-ci a été caractérisée par Thierry et al. (1998) en partant de l'hypothèse que toute l'eau présente dans les fromages est solvante, c'est-à-dire contenue dans la phase aqueuse. Les auteurs ont ainsi pu déterminer les extraits secs de la phase aqueuse seule et celle des fromages dans leur globalité. L'extrait sec de la phase aqueuse d'Emmental augmente également de 24% entre la sortie de presse et la sortie de saumurage (Thierry, Salvat-Brunaud, Madec, Michel, & Maubois, 1998). Dans cette étude, les auteurs sont parvenus à extraire un quart de la phase aqueuse totale des fromages. A noter que la dite « phase aqueuse » extraite de l'Emmental compte un extrait sec de 140g/kg à la sortie de cave chaude. En comparaison, l'Emmental dans sa globalité possède un extrait sec de 610 à 636g/kg.

En revanche, dans le cas d'un réseau moins dense, comme un fromage plus riche en eau, il est possible d'observer l'organisation du réseau protéique en MCBL, comme démontré pour des fromages de type Mozzarella (Hussain, Grandison, & Bell, 2012) (Figure 7, élément (3)). Les détails du réseau n'en restent pas moins difficiles à étudier avec précision pour cette technologie « pâte molle ».

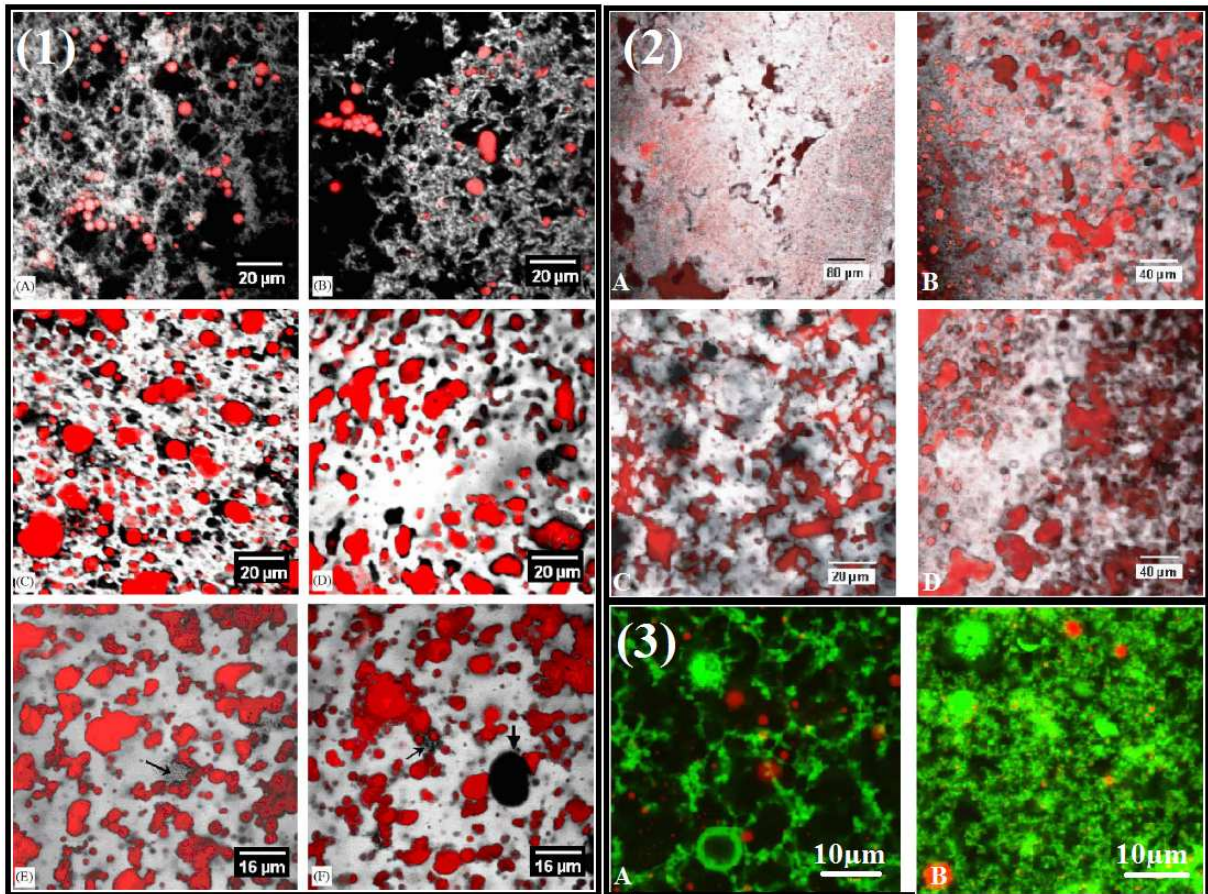


Figure 7 : Images MCBL d'Emmental (1) : A coagulation du lait, B après tranchage, C après pressage, D après saumurage, E,F affinage (d'après Lopez et al., 2007) ; Cantal affinés 4 mois (2) : A ,B,D centre et C sous croûte (d'après De Freitas et al., 2005) et Mozzarella (3) : A base lait de vache et B base lait de vache UF (d'après Hussain et al., 2012) – Matière grasse en rouge et Protéines en niveaux de gris ou vert.

C'est pourquoi une autre échelle d'observation est nécessaire dans le cas de fromages à pâte dure, pour déterminer si d'éventuels changements de structuration du réseau protéique sont à l'œuvre au cours des étapes ultérieures au pressage, notamment lors de l'affinage. Rousseau et al. (1989) ont aussi confirmé grâce à la Microscopie Electronique à Balayage (MEB) la perte de la structure lâche à l'aspect micellaire des caséines de l'Emmental après pressage, à la suite duquel le réseau protéique forme un ensemble compact et poreux. Il est cependant difficile de déterminer si la fusion micellaire est majoritairement due au pressage ou à l'acidification concomitante. Mais ils ont aussi pu établir qu'aucun changement significatif de la structure du réseau protéique n'apparaît après saumurage et jusqu'à 15 jours de cave chaude, où le réseau protéique est alors jugé d'aspect plus grumeleux. De plus, la MEB peut aussi être employée pour déterminer l'influence de paramètres de composition sur des matrices fromagères modèles : un extrait sec plus élevé augmenterait la densité du réseau protéique et son branchement alors qu'un ratio Gras/Sec (soit le rapport entre la teneur en matière grasse et l'extrait sec des fromages) supérieur entraînerait une plus faible taille de



globules gras mais n'aurait aucun effet significatif sur le réseau protéique (Floury et al., 2009). L'utilisation de la microscopie électronique est donc bien adaptée à l'étude du réseau protéique puisque ses pores sont visibles avec cette technique contrairement à la microscopie confocale. Sa plus forte résolution permet également de visualiser des bactéries (Rousseau et al., 1989) dispersées dans la matrice, peu visibles en microscopie confocale à moins de recourir à une sonde de viabilité (Lopez et al., 2006).

## **1.4 Facteurs d'influence sur l'ouverture des fromages**

### **1.4.1 Nucléation**

La présence de nucléi fait partie des conditions nécessaires à l'ouverture des fromages identifiées dans la littérature. L'importance de la nucléation dans la formation des yeux a été démontrée en s'appuyant sur l'équation de Laplace (Clark, 1917). Plus la bulle est petite, plus la pression à l'intérieur serait élevée, une ouverture ne peut donc pas se développer spontanément sans la présence d'un nucléus. Clark (1917) présente aussi l'hypothèse que de très petites bulles pourraient adhérer aux grains de caillé et une faible surpression serait alors suffisante pour engendrer la croissance des yeux. Les incorporations d'air piégées dans les jonctions de grains joueraient donc un rôle important dans la croissance des yeux, mais il existe d'autres possibilités de nucléation (Akkerman, Walstra, & Van Dick, 1989) liées aux particules en suspension dans le lait ou à un ajout de particules hydrophobes telles que de la poudre de téflon (Stadhouders & Hup) ou des grains de cumin (Riberolles et al., 1996). Il suffirait d'une micro-bulle par millilitre de lait pour expliquer le nombre d'yeux observés dans des fromages de type Gouda, soit une fraction volumique du lait inférieure à  $10^{-10}$ , ce qui expliquerait que de telles amorces passent inaperçues lors d'observations microscopiques (Akkerman et al., 1989).

### **1.4.2 Flore microbienne**

Les fromages à pâte pressée non cuite comptent deux types majoritaires de bactéries : les bactéries lactiques (LAB) et les bactéries propioniques (PAB). Les premières donnent lieu à une première fermentation débutant dès l'ensemencement des bactéries lactiques et conduisant à la dégradation du lactose en acide lactique selon l'équation métabolique suivante (Eq.1) :

**(Eq. 1)** 1mol lactose => 2mol acide lactique

La fermentation lactique est donc acidifiante et fournit son substrat à la seconde fermentation ayant lieu au cours de la fabrication des fromages : la fermentation propionique. Les bactéries propioniques représentent un élément caractéristique des fromages « Swiss-type » et donnent lieu à une production de CO<sub>2</sub> et d'acides gras volatils à l'origine des yeux et des propriétés aromatiques des fromages. Elles sont soumises aux trois voies métaboliques suivantes (Eq.2, Eq.3 et Eq.4) :

**(Eq.2)** 3mol lactate => 2mol propionate + 1mol acétate + 1mol gaz carbonique + 1mol eau

**(Eq.3)** 3mol lactate => (2-x)mol propionate + 1mol acétate + (x)mol succinate + (1-x)mol gaz carbonique

**(Eq.4)** 3mol lactate + 6mol aspartate => 6mol succinate + 3mol acetate + 3mol gaz carbonique + 6mol ammoniac

La réaction métabolique standard des PAB, dite voie classique ou voie de Fitz correspond à la dégradation d'acide lactique en acide propionique et CO<sub>2</sub> (Eq. 2). Cependant, deux autres voies métaboliques sont aussi à l'œuvre : la fixation du gaz carbonique conduisant à la production de succinate (Eq. 3) et la voie de désamination de l'aspartate produisant du CO<sub>2</sub> (Eq. 4). Il est intéressant de noter que le CO<sub>2</sub> est produit par les PAB de façon équimolaire à l'acide acétique, quelle que soit la voie métabolique considérée. La détermination des acides gras volatils tels que l'acide acétique est donc de première importance pour réaliser des bilans de matière sur le gaz carbonique. Le ratio Acide Propionique / Acide Acétique est aussi à considérer car il renseigne sur la voie préférentielle de production de CO<sub>2</sub> à l'œuvre dans les fromages. En effet, si ce rapport molaire est égal à 2, alors c'est la voie de Fitz qui domine.

La production de CO<sub>2</sub> responsable de la formation des trous des fromages « Swiss-type » est donc particulièrement influencée par cet équilibre métabolique. Une population minimale de bactéries de l'ordre de 10<sup>6</sup>cfu/g est nécessaire avant que l'ouverture puisse être induite par la production gazeuse (Martley & Crow, 1996). Or, de nombreux facteurs peuvent impacter le développement bactérien dans les fromages et par là même les ouvertures dépendant de la production gazeuse :

- *Le type de souche.* Si des bactéries Aspartase+ sont choisies, l'Equation 4 est activée, d'où une production de CO<sub>2</sub> plus forte que par la seule voie de Fitz (Fröhlich-Wyder, Bachmann, & Casey, 2002 ; Fröhlich-Wyder & Bachmann, 2004). Ainsi, le nombre et la taille des yeux tout comme la hauteur des meules d'Emmental est supérieure quand

une culture de PAB avec une forte activité aspartase est utilisée (Fröhlich-Wyder & Bachmann, 2004). Guggisberg et al. (2013) ont également montré que l'utilisation d'une souche *L. casei* conduit à une augmentation du nombre et du volume des yeux dans un fromage Tilsit dépourvu de fermentation propionique, via la dégradation complète du citrate (Fröhlich-Wyder et al.). Les aptitudes fermentaires d'une vingtaine de souches de PAB testée en mini-fabrications de type Emmental ont montré des résultats inégaux sur la production de propionate et l'augmentation du volume de fromage associée (Richoux & Kerjean, 1995). Cependant, la détermination du volume des fromages de cette étude reste seulement qualitative à cause de fuites de gaz et de diffusion à travers le film de paraffine, d'où l'impossibilité de corréler volume de fromage et métabolites des PAB. Un autre exemple a été présenté pour des fromages « Swiss-type » fabriqués avec *Propionibacteria shermanii subsp* et qui présentaient des trous plus volumineux (33% en moyenne) que ceux fabriqués avec *P. arabinosum* (Park, Reinbold, & Hammond, 1967). Cependant, les mécanismes d'action des différentes souches PAB sur l'ouverture ou les défauts d'ouvertures tels que les fissures n'ont pu être explicités.

- *La combinaison des souches.* L'utilisation simultanée de certaines LAB et PAB peut conduire à la formation de fractures (White, Broadbent, Oberg, & McMahon, 2003). Etant donné leur mode de cultures séquentielles, les PAB peuvent aussi être influencées par les LAB. Leur croissance pourrait être stimulée par des lactobacilles thermophiles, des streptocoques ou des microcoques (Hettinga, 1972a, 1972b) ou réprimée par des pédiocoques et lactobacilles hétérofermentaires facultatifs. Ces interactions dépendent du couple de souches associées et l'amplitude des variations reste généralement inférieure à 20-30% du temps de génération (Kerjean et al., 2000 ; Richoux, 2005). Des interactions antagonistes entre PAB et LAB (Jimeno, Lazaro, & Sollberger, 1995) ou NSLAB (Martley & Crow, 1993) ont également été mises en évidence.
- *La température.* Les conditions optimales pour la plupart des PAB se situent entre 25 et 35°C. Il est cependant admis qu'elles peuvent se développer entre 15 et 40°C, bien que la capacité de thermorésistance soit fondamentalement dépendante du type de souches propioniques considéré. Ainsi, leur temps de génération moyen est de 10 jours à 10-12°C, 4 jours à 16-18°C et 1,5 jour à 21-24°C (Richoux, 2005). La production de

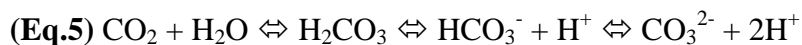
CO<sub>2</sub> est donc affectée par la température des fromages via son impact sur la croissance des microorganismes à l'origine de la fermentation gazeuse.

- *Le pH.* Le pH optimal des PAB se situe entre 6,0 et 7,5 (Noel, Boyaval, Thierry, Gagnaire, & Grappin, 1999). La valeur de pH critique se situerait en deçà de 5,0 pour la plupart des PAB même si certaines sont capables de se développer dans la gamme 4,5-10. Une étude réalisée sur 68 souches a confirmé une absence de croissance à pH 4,0 (Britz & Steyn, 1980). Une diminution de 0,1 à 0,15 unité pH dans des fromages « Swiss-type » à J+1 se traduirait par une augmentation de 50% de la durée de cave chaude nécessaire à l'obtention d'une même teneur en acides gras volatils dans une plage de pH comprise entre 5,05 et 5,45 (Richoux, 2005). Dans une technologie Emmental, un plus haut pH obtenu par délactosage durant le procédé de fabrication aurait provoqué un développement de PAB supérieur d'où une ouverture plus importante (Jaros, Ginzinger, Tschager, Mayer, & Rohm, 1997). De plus, l'ITFF a montré en 1985 que maîtriser le pH initial (à J+1) des fromages permettrait d'éviter toute influence du Gras/Sec (45, 47,5 ou 50%) sur la fermentation propionique. Cependant, aucune corrélation significative n'a été démontrée entre le pH de fromages « Swiss-type » mesuré après 1, 7 et 28 jours d'affinage et le nombre de fissures noté par un jury à partir de diapositives (White et al., 2003).
- *La teneur en sel.* Elle agit sur les bactéries via son action sur l'activité de l'eau  $a_w$ . Lorsque l'activité de l'eau est trop faible, la pression osmotique de la phase aqueuse des fromages augmente, ce qui conduit à la déshydratation des bactéries, à leur inhibition ou leur destruction. Ce lien entre sel et activité de l'eau a été formalisé par l'équation suivante appliquée à la zone centrale d'une meule d'Emmental :  $a_w = 0,997 - 0,664X_{NaCl}$  (avec  $X_{NaCl}$  teneur en sel ( $kg_{NaCl} \cdot kg_{water}^{-1}$ )), quantifiant l'effet dépresseur du sel sur l'activité de l'eau (Saurel, Pajonk, & Andrieu, 2004). L'halorésistance des PAB ou leur mécanisme d'osmo-protection dépendent également du type de souche (Carcano, Todesco, Lodi, & Brasca, 1995). De plus, des tests réalisés en milieu contrôle ou dans le lait ont montré un doublement du temps de génération en présence de 0,25 M de NaCl (Boyaval, Deborde, Corre, Blanco, & Bégué, 1999). Richoux et al. (1998) ont aussi montré que 70% des bactéries parmi 23 souches de PAB testées étaient inhibées en présence de 3% de Sel/Eau dans des mini-fromages de type Emmental (Richoux, Faivre, & Kerjean, 1998). Enfin, un lien plus direct entre sel et

ouvertures a pu être établi par un jury ayant jugé l'ouverture plus importante dans des fromages moins salés (Grappin, Lefier, Dasen, & Pochet, 1993) (Grappin et al., 1993). La mesure par immersion du volume de meules d'Emmental a également montré que l'augmentation de volume en fin d'affinage était divisée par 11,7 si le ratio Sel/Eau passait de 1 à 3% (Richoux et al., 1998).

#### 1.4.3 Répartition du CO<sub>2</sub>

Le gaz carbonique peut prendre plusieurs formes, gazeuse ou hydratée, selon l'équation d'équilibre (Eq.5) d'après Vivier et al. (1996).



D'après Yagi et Yoshida (1977), à pH inférieur à 8 comme c'est le cas pour les fromages, la forme CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> du gaz carbonique peut être négligée et seule la réaction d'hydratation doit être considérée. Le gaz carbonique est donc présent dans les fromages selon un équilibre entre la forme dissoute CO<sub>2</sub> et la forme solubilisée HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. La répartition du CO<sub>2</sub> dans les fromages étant un paramètre important pour la compréhension des mécanismes de croissance de bulles, il convient de prendre en compte ses différents « compartiments » potentiels dans les fromages, ce qui participe également à l'hétérogénéité de ces produits.

La solubilisation du gaz carbonique est effective dans divers composants de la pâte fromagère, en particulier l'eau et la matière grasse. En effet, en première approximation, Jakobsen et al. (2009) ont proposé de considérer le fromage comme un système diphasique eau/matière grasse, les protéines étant incluses dans la phase aqueuse en tant qu'éléments de remplissage inerte quant à la solubilisation du CO<sub>2</sub>. La phase eau+protéines aurait alors supposément les mêmes propriétés que l'eau pure, bien qu'il soit difficile de considérer que d'autres solutés de la phase aqueuse ne puissent pas modifier la solubilité du gaz carbonique. En effet, d'après Thierry et al. (1998), l'extrait sec de la phase aqueuse de l'Emmental en fin d'affinage atteindrait près de 14%, ce qui ne correspond pas à une solution d'eau pure. Il s'agit donc bien d'une simplification réalisée par les auteurs, au même titre que de considérer une production de CO<sub>2</sub> nulle dans les fromages alors que ce n'est pas le cas. En se basant sur cette dualité eau / matière grasse, la solubilité du CO<sub>2</sub> peut alors s'écrire selon l'équation 6.



Avec  $w_W$  et  $w_F$  les fractions massiques respectives de l'eau et de la matière grasse. Cette formalisation fait clairement apparaître les deux compartiments « eau » et « matière grasse » comme également impliqués dans la solubilisation du  $CO_2$  dans la pâte fromagère. Tous deux ont donc été étudiés séparément dans la littérature. La solubilité du  $CO_2$  dans la phase aqueuse à la température d'affinage a été estimée par Seuvre & Mathlouthi (1982) à 1,154 L( $CO_2$ )/L(eau). Pauchard et al. (1980) ont établi que la solubilité du  $CO_2$  dans l'eau pure s'étendait entre 3,7 mmol/100g et 6,12 mmol/100g entre 6 et 22°C. Jakobsen et al. (2009) ont quantifié la solubilité du  $CO_2$  dans la matière grasse entre 0,76 et 1,02 L( $CO_2$ )/kg(MG)/atm dans la matière grasse pure entre 3 et 19°C. A 22°C, l'eau et la matière grasse pourrait solubiliser une quantité de  $CO_2$  comparable, comme le montre l'histogramme suivant, issu des travaux de Pauchard et al. (1980) et présentant des résultats de solubilité du gaz carbonique dans divers produits (Figure 8).

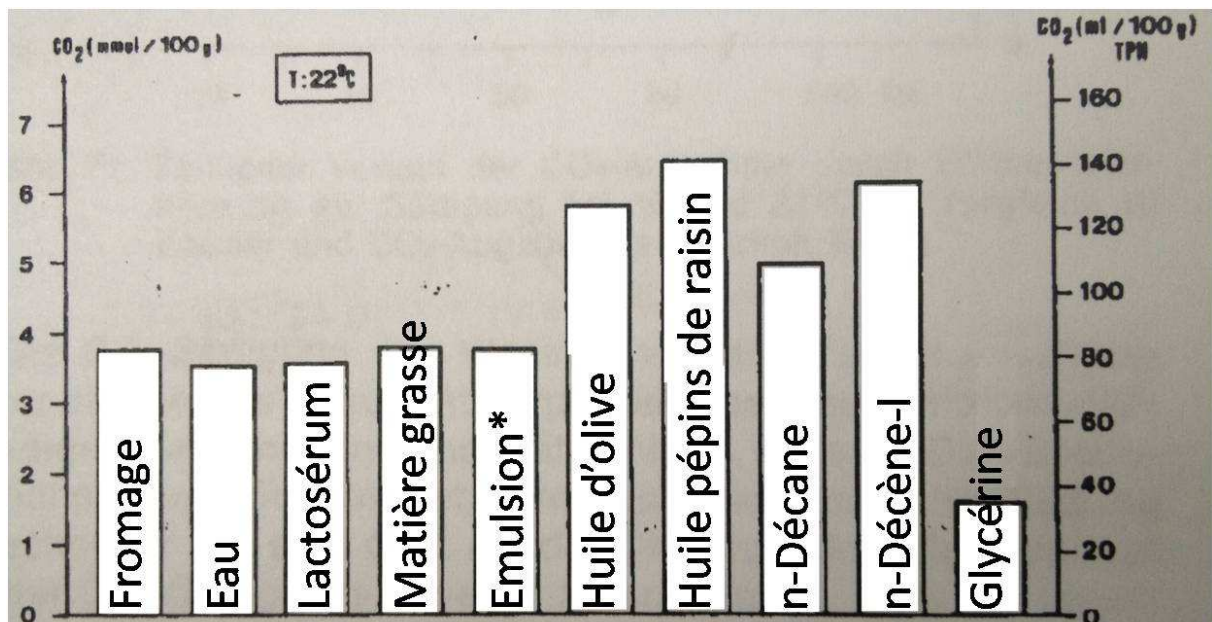


Figure 8 : Solubilité du  $CO_2$  dans différents matériaux à 22°C (\*Emulsion = Tampon phosphate + Caséine-LAB + Matière grasse), d'après Pauchard et al, 1980

La Figure 8 démontre bien une capacité comparable de solubilisation du gaz carbonique pour l'eau pure, la matière grasse pure et le fromage à 22°C, soit 3,5 à 3,8mmol/100g. Des résultats très similaires sont obtenus pour une émulsion de matière grasse stabilisée par des protéines dans une phase aqueuse destinée à mimer le fromage. Cependant, l'eau et la matière grasse formant la pâte fromagère ne sont pas les seuls compartiments accessibles au gaz carbonique, puisqu'il faut également prendre en compte sa forme gazeuse. Le bilan sur le gaz carbonique dans les fromages peut donc selon l'équation 7 :

$$(Eq.7) \text{CO}_2(\text{produit}) = \text{CO}_2(\text{yeux}) + \text{CO}_2(\text{p\^ate}) + \text{CO}_2(\text{atmosph\^ere}) + \text{CO}_2(\text{espace de t\^ete})$$

Le CO<sub>2</sub> est produit par diverses souches pr\^esentes dans les fromages, LAB et PAB. Durant la cave chaude au cours de laquelle se forment la majorit\^e des ouvertures, l'origine du CO<sub>2</sub> est majoritairement propionique dans les fromages « Swiss-type ». Notz et al. (1996) ont d\^etermin\^e qu'au cours de l'affinage, pour une meule de 75kg d'Emmental, 115,6L de gaz \^etaient produits, dont 42,8% attribu\^es \^a la d\^ecarboxylation des acides amin\^es, 37,3% \^a la fermentation propionique et 8% \^a la fermentation butyrique. Cependant, m\^eme si quantitativement la d\^ecarboxylation des acides amin\^es est la principale origine du CO<sub>2</sub> produit durant l'affinage, la fermentation propionique a une importance primordiale sur l'ouverture du fait de sa production exponentielle en cave chaude : elle repr\^esente 81,5% de la production journali\^ere de CO<sub>2</sub> \^a 40 jours de cave chaude (Etude ITFF-ITG SS/1984/5/C), comme le montre la Figure 9 suivante.

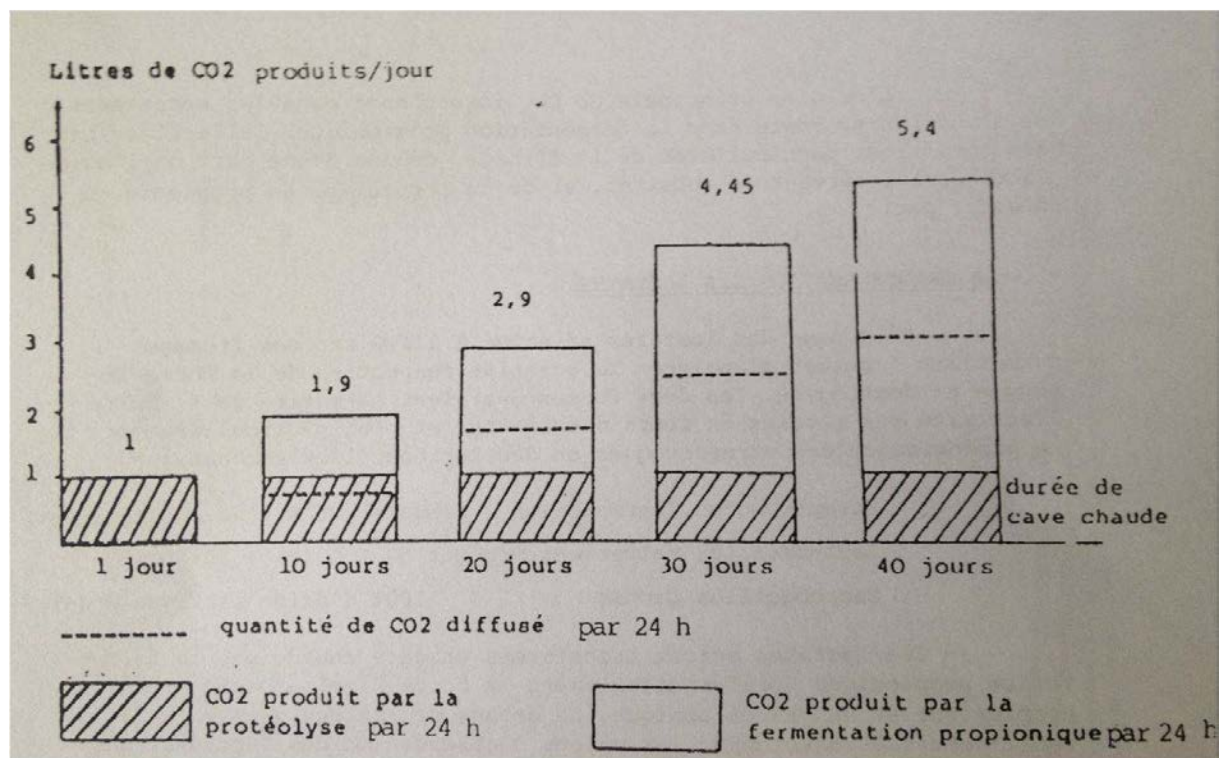


Figure 9 : Quantit\^e de CO<sub>2</sub> produite durant la cave chaude dans une meule d'Emmental de 75kg, d'apr\^es l'\^etude ITFF-ITG SS/1984/5/C

Les \^equations de production possibles pour le CO<sub>2</sub> d'origine propionique ont \^et\^e d\^ecrites pr\^ec\^edemment (Eq. 2 et Eq.4). Outre le CO<sub>2</sub> dissout dans la p\^ate, le CO<sub>2</sub> indic\^e « atmosph\^ere » repr\^esente le gaz ayant diffus\^e \^a la surface des fromages et qui s'\^echappe dans l'ambiance des caves. Si les fromages sont film\^es, alors le CO<sub>2</sub> peut cr\^eer un espace de t\^ete

entre le film d'emballage et le fromage, d'où le CO<sub>2</sub> indicé « espace de tête ». Enfin, du CO<sub>2</sub> sous forme gazeuse est aussi présent dans les yeux.

Ainsi, en complément des facteurs influençant la quantité totale de CO<sub>2</sub> produite (tels que décrits précédemment via l'influence de ces facteurs sur les souches bactériennes), il est nécessaire de tenir compte des paramètres qui vont influencer la répartition du CO<sub>2</sub> et par là même la formation de bulles. Certaines études se sont donc focalisées sur le dosage du CO<sub>2</sub> présent dans les divers compartiments potentiels dans les fromages, comme récapitulé dans le Tableau 2.



**Tableau 2 : Récapitulatif des méthodes de dosage du CO<sub>2</sub> et de l'influence de divers paramètres physico-chimiques sur sa répartition dans les fromages. Code couleur : bleu=production de CO<sub>2</sub> ; rouge=CO<sub>2</sub> dans les yeux ; jaune=CO<sub>2</sub> dans la pâte (solubilité) ; vert=CO<sub>2</sub> dans l'espace de tête gris=solubilité dans l'eau ou la matière grasse pure**

Code	Produit	Cible	Méthode	Précision	Facteur	Influence	Références
Semi-durs	CO <sub>2</sub> pâte		Titimétrique/précipitation	0,025 L(CO <sub>2</sub> )/kg(fro)	MG (5-25% w/w)	→	Jakobsen et al., 2009
					Température (0-20°C)	↘	
	CO <sub>2</sub> espace tête		Analyseur gaz		-	-	
Beurre	Solubilité CO <sub>2</sub>				Température (0-20°C)	↗	
Swiss-type	CO <sub>2</sub> pâte		Chromatographie gaz	?	Souche PAB	→	Park et al., 1966
Feta	CO <sub>2</sub> produit		Infra-rouge	±8,5μmol/h/kg	Température (4-10°C)	→	Vivier et al., 1996
					Solution saline vs eau pure	↘	
Eau	Solubilité CO <sub>2</sub>				pH (3,5-6)	→ jusqu'à 5 puis ↗	
					Température (0-20°C)	↘	
Emmental	CO <sub>2</sub> pâte		Chromatographie gaz	10 L(CO <sub>2</sub> )/100kg(fro)	-	-	Seuvre & Mathlouthi, 1982
	CO <sub>2</sub> yeux		Estimation par ↗ V(fro)	3,7 L(CO <sub>2</sub> )/100kg(fro)	-	-	
	CO <sub>2</sub> produit		Estimation via Acide Acét.	3,8 L(CO <sub>2</sub> )/meule	-	-	
	CO <sub>2</sub> produit		Estimation via Acide Prop.	3,2 L(CO <sub>2</sub> )/fromage	-	-	
Swiss-type	CO <sub>2</sub> produit		Immersion fromages/pesée	± 100g eau déplacée	Température (7-17°C)	↗	Fedio et al., 1994
Cheddar	CO <sub>2</sub> produit		Estimation via Lact. & Citr.	?	-	-	Mullan, 2000
Pâte molle	CO <sub>2</sub> produit		Analyseur gaz	±9mL/h/kg	Température (4-20°C)	↗	Rodriguez-Aguilera et al., 2009
Gruyère	CO <sub>2</sub> produit		Titimétrique/précipitation	±16mmol/24h/m <sup>2</sup>	Température (14-16°C)	↗	Blanc et al., 1982
Emmental	CO <sub>2</sub> produit		Infra-rouge	CV 2%	-	-	Bosset et al., 1980
Cheddar	CO <sub>2</sub> pâte		Enzymatique	±1,2mmol/kg	-	-	Crow & Martley, 1991
Emmental	CO <sub>2</sub> pâte		Infra-rouge		Alimentation (herbe/foin)	↗*	Frölich-Wyder et al., 2002
					PAB fort/faible aspartase	→	
					Avec/Sans <i>Lb Casei</i>	↗*	
					Avec/Sans <i>Lb Helveticus</i>	→	
Emmental	CO <sub>2</sub> pâte		Infra-rouge	?	Température (6-22°C)	↘↘	Pauchard et al., 1980
Eau				pH fin (3,5-6,5)	↗		
Eau				NaCl (0-10%) tampon	↘		
Emmental	CO <sub>2</sub> produit		Infra-rouge	?	Température (12-24°C)	↗	Flückiger, 1980
	CO <sub>2</sub> yeux		Estimation par ↗ V(fro)	?	-	-	
Caillé acide	CO <sub>2</sub> produit		Analyseur à infra-rouge	?	-	-	Jaros et al., 2007
Lait	CO <sub>2</sub> produit		Manométrique	?	-	-	Kihal et al., 2006

- CO<sub>2</sub> dans la pâte

Il existe diverses méthodes destinées au dosage du CO<sub>2</sub> dans la pâte fromagère : titrimétrique (acido-basique), enzymatique, volumétrique, manométrique, électrochimique, absorption infra-rouge ou chromatographique. Ainsi, à part avec les méthodes enzymatiques, le dosage du gaz carbonique ne s'effectue que par extraction du CO<sub>2</sub> dans un espace de tête. La méthode titrimétrique est la plus ancienne et donne les résultats les moins reproductibles, avec des coefficients de variation importants, de l'ordre de 10% contre 1 à 2% pour les autres techniques (Tableau 2). Enfin, il existe également une méthode de quantification du CO<sub>2</sub> indirecte, via les acides organiques en particulier l'acide acétique et propionique. Seuvre & Mathlouthi (1982) ont utilisé cette méthode indirecte en postulant que tout l'acide acétique dosé en cave chaude provenait des bactéries propionique dans une meule d'Emmental de 70kg, entre 0 et 10 semaines à 20°C après sortie de saumurage. Ils ont ainsi estimé une quantité de CO<sub>2</sub> totale de 165,5 L(CO<sub>2</sub>)/100kg<sub>fromage</sub> ou 6,88 mol/100kg<sub>fromage</sub> à partir de l'acide acétique. En tenant compte de l'acide acétique déjà présent lors du début de la fermentation propionique à 3 semaines d'affinage (c'est-à-dire non attribuable aux PAB), la quantité de CO<sub>2</sub> provenant de la fermentation propionique uniquement a été isolée et estimée à 76,1 L(CO<sub>2</sub>)/100kg<sub>fromage</sub> ou 3,17 mol/100kg<sub>fromage</sub>. Pour comparaison, la quantité de gaz carbonique estimé à partir de l'acide propionique était de 92,9 L(CO<sub>2</sub>)/100kg<sub>fromage</sub> ou 3,86 mol/100kg<sub>fromage</sub>. Enfin, suite à l'estimation de la quantité de CO<sub>2</sub> attribuable à la fermentation butyrique, un bilan théorique de production de gaz carbonique a été estimé à 180,8 L(CO<sub>2</sub>)/100kg<sub>fromage</sub> ou 7,52 mol/100kg<sub>fromage</sub>.

D'autres travaux ont estimé la solubilité du gaz carbonique dans les fromages « Swiss-type », quantifiée dans une plage allant de 0,5 à 0,8 L(CO<sub>2</sub>)/kg<sub>fromage</sub> entre 0 et 22°C ( Fava & Piergiovanni, 1992 ; Jakobsen, Jensen, & Risbo, 2009; Park et al., 1967; Pauchard, Fluckiger, Bosset, & Blanc, 1980). La teneur en CO<sub>2</sub> dans l'Emmental a été estimée à 37 mmol/kg (Pauchard et al., 1980) et à 36 mmol/kg dans le Gouda (Akkerman et al., 1989) et entre 24 et 31mmol/kg dans un fromage « Swiss-type » (Girard & Boyaval, 1994).

- CO<sub>2</sub> dans les yeux

Quelques études font état d'une quantification du CO<sub>2</sub> dans les yeux (Fluckiger, 1980; Seuvre & Mathlouthi, 1982). Pour y parvenir, la méthode privilégiée est l'estimation de l'augmentation du volume du fromage lors du développement des bulles, par immersion dans l'eau. Seuvre et Mathlouthi ont ainsi estimé la quantité de gaz carbonique présente dans les

yeux de meules d’Emmental à  $33 \pm 3,7$  L(CO<sub>2</sub>)/100kg, soit  $1,37 \pm 0,15$  mol(CO<sub>2</sub>)/100kg. D’autres méthodes d’imagerie ont également été mises en place pour accéder plus précisément au volume de gaz contenu dans les yeux des fromages, mais seules l’IRM et la tomographie RX permettent de bien séparer les bulles pour calculer leur volume. Les études ayant développé ces techniques sont présentées dans le chapitre 1.5 et en particulier dans le Tableau 7. Une autre méthode basée sur un traitement d’images de photographies de tranches de fromages a également été testée (Caccamo et al., 2004). Cependant, même si le volume des bulles peut être approximé ainsi, cette méthode est d’une précision bien moindre en comparaison de l’imagerie qui est non destructive et offre des résultats en 3D permettant l’appréciation des volumes.

- CO<sub>2</sub> dans l’espace de tête

Bien que les fromages étudiés dans la littérature soient globalement dépourvus d’emballage donc d’espace de tête, Jakobsen et al. (2009, 2009) se sont notamment intéressés aux atmosphères modifiées et ont suivi la composition des espaces de tête des fromages à l’aide d’un analyseur de gaz. La mesure de CO<sub>2</sub> est alors convertie en pression partielle de CO<sub>2</sub> avec l’hypothèse que le gaz retenu dans l’espace de tête par un film flexible est donc soumis à une pression totale de 1 atm. Deux cas ont été étudiés : une concentration en CO<sub>2</sub> initialement nulle et une concentration en CO<sub>2</sub> initiale de 0,6 L/kg dans le fromage. L’espace de tête va alors soit s’affaisser par diffusion du CO<sub>2</sub> dans le fromage, soit au contraire augmenter de volume avec une diffusion du fromage vers l’espace de tête, comme le montre la Figure 10.

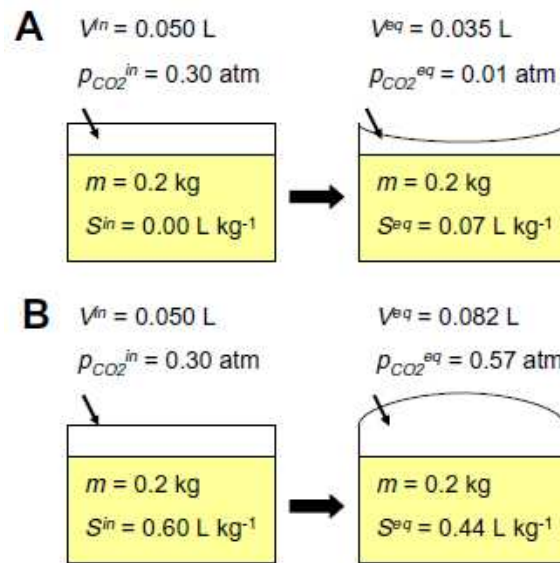


Figure 10 : Evolution du CO<sub>2</sub> entre fromage « semi-hard » et espace de tête dans deux cas : (A) concentration initiale en CO<sub>2</sub> dans le fromage nulle et (B) concentration initiale de 0,6L/kg. (m=0,2Kg), d'après Jakobsen et al., 2009

- Répartition du CO<sub>2</sub> dans les fromages

Enfin, à l'issue de ces travaux, une répartition théorique du CO<sub>2</sub> dans les fromages a été proposée par différents auteurs autour des trois compartiments : les yeux, la pâte (CO<sub>2</sub> dissout) et l'atmosphère (pertes par diffusion hors du fromage). Une quantification par compartiment a été effectuée par Flückiger et al. (1980), qui ont obtenu les résultats présentés dans le Tableau 3 pour des fromages de type Emmental.

Tableau 3 : Répartition du CO<sub>2</sub> dans des fromages Emmental après 5mois d'affinage (Litres CO<sub>2</sub>), d'après Flückiger et al., 1980

Répartition CO <sub>2</sub>	Pâte	Yeux	Atmosphère	Total	
Numéro fromage	CO <sub>2</sub> dissout	CO <sub>2</sub> yeux	CO <sub>2</sub> relargué	CO <sub>2</sub> tot	CO <sub>2</sub> tot/kg fromage
1	66,6	20,5	34,7	121,8	1,52
2	68,1	20,2	41,3	129,6	1,58
3	56	14	47,2	117,2	1,31
4	49,7	8,7	38,6	97	1,48
5	54	12,4	45,1	111,5	1,48
6	52,8	20,4	34,2	107,4	1,46
7	65,2	13,7	33	111,9	1,88
8	73,9	26,8	44,8	145,5	1,51
9	68,7	22,2	32,5	123,4	1,43
10	65,8	18,5	35,3	119,6	
Moyenne (LCO <sub>2</sub> )	62,1	17,7	38,7	118,5	1,5
Ecart type	8,2	5,4	5,5	13,2	0,2
Répartition (%)	52,4	15,0	32,6	100,0	-

Pour une meule d'Emmental (non emballée), la production totale de CO<sub>2</sub> a ainsi été quantifiée à 1,53 L(CO<sub>2</sub>)/kg<sub>fromage</sub>, dont 15% se retrouve dans les yeux, 52% est dissout dans la pâte et 33% est perdu par diffusion hors du fromage. Ces résultats sont cohérents avec les travaux de Seuvre et Mathlouthi (1982), ayant obtenu une production totale de 1,89 L(CO<sub>2</sub>)/kg<sub>fromage</sub> et une répartition de 42% dans la pâte (55,1 L(CO<sub>2</sub>)), 17% dans les yeux (23,1 L(CO<sub>2</sub>)) et 41% perdus par diffusion (54,1 L(CO<sub>2</sub>)) dans des meules d'Emmental de 70kg après 9 semaines à 20°C (5 répliqués). A noter, la précision de ces études, en particulier pour la détermination du CO<sub>2</sub> dans les yeux (maximale par rapport aux autres estimations, avec un écart type égal à 30% de la valeur moyenne), est de plusieurs litres.

- Facteurs d'influence sur la répartition du CO<sub>2</sub> dans les fromages

- Le *pH*. Dans la gamme de pH des fromages, entre 5 et 7, 70 à 98% du dioxyde de carbone dissout existe sous la forme de CO<sub>2</sub> (Vivier, Compan, Moulin, & Galzy, 1996) et peut donc diffuser librement. Une partie du gaz carbonique n'est donc pas sous forme de CO<sub>2</sub> mais sous forme de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, avec un pK<sub>a</sub> de 6,35 (Akkerman et al., 1989). Une variation de pH peut donc influencer la solubilité du CO<sub>2</sub> dans les fromages. La valeur pH=5 semble avoir une importance particulière pour la solubilité du CO<sub>2</sub> dans l'eau pure, car pour des pH plus élevés, la solubilité augmente alors qu'en 3,5 et 5 elle n'était pas affectée (Jakobsen et al., 2009).
- La température. Ce facteur a deux effets distincts, à ne pas confondre pour les résultats présentés dans le Tableau 2. D'une part, la solubilité du CO<sub>2</sub> dans l'eau diminue quand la température augmente (Vivier et al., 1996 ; Jakobsen et al., 2009) alors que celle du CO<sub>2</sub> dans la matière grasse augmente (Jakobsen et al., 2009). De plus, le coefficient de solubilité du CO<sub>2</sub> dans la pâte de fromages semi-durs chute de 32% en augmentant la température de 0 à 20°C (Jakobsen et al., 2009). Au contraire, la quantité de CO<sub>2</sub> produit évaluée dans les études présentées dans la littérature augmente avec une plus forte température.
- La *teneur en matière grasse*. Aucune tendance globale n'a pu être démontrée dans l'évolution de la solubilité du CO<sub>2</sub> dans la pâte de fromages semi-durs ayant un ratio Gras/Sec allant de 10 à 45% (Jakobsen et al., 2009). Il faut néanmoins noter que les fromages ayant un Gras/Sec de 10% possédaient aussi une teneur en eau supérieure aux autres, soit 53,6% contre une teneur en eau 46,1%, et 46,7% de teneur en eau pour

les fromages ayant des Gras/Sec entre 20 et 45%. De même, la teneur en protéines des fromages à 45% de Gras/Sec était inférieure aux autres avec 24,3% contre 30,6 à 36,4%.

- *La teneur en sel.* Pauchard et al. (1980) ont croisé l'influence de la teneur en sel et de la température sur la solubilité du CO<sub>2</sub> dans des solutions aqueuses allant de 0 à 10% de teneur en NaCl et entre 6 et 22°C. La teneur en sel semble impacter négativement la solubilité du CO<sub>2</sub>, mais ce phénomène est moindre à 6°C qu'à 22°C, comme le montre la Figure 11.

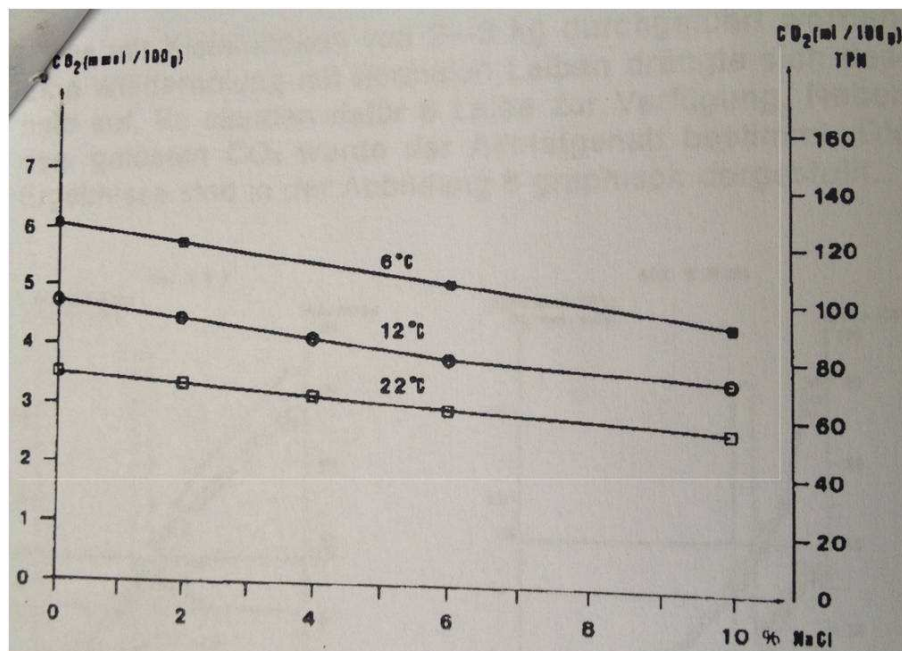


Figure 11 : Evolution de la solubilité du CO<sub>2</sub> dans l'eau en fonction de la température et de la teneur en sel, d'après Pauchard et al., 1980

La production et la répartition du CO<sub>2</sub> dans la pâte peuvent donc être influencées par divers paramètres physico-chimiques qui modifient l'équilibre du gaz carbonique dans les fromages. Cependant, ces paramètres peuvent aussi impacter l'ouverture via la résistance de la pâte envers la croissance des bulles. Il est donc important de caractériser les propriétés rhéologiques de la pâte fromagère durant l'affinage.

#### 1.4.4 Propriétés mécaniques

- Types de test et viscoélasticité

La rhéologie des fromages est étudiée dans la littérature comme un paramètre d'influence potentiel sur l'ouverture via les propriétés de résistance de la pâte fromagère à la contrainte.

La croissance de bulles pourrait être facilitée ou ralentie en fonction de la texture des fromages (Daly, McSweeney, & Sheehan, 2010). En cas de rupture de la pâte fromagère, c'est une fissure ou « crack » qui peut se former au lieu d'une bulle. Ainsi, Noël et al. (1996) ont montré que la rigidité et la résistance de fromages de type Comté affinés présentant des fissures étaient supérieures à celles de fromages ayant des yeux bien formés ou étant aveugles, c'est-à-dire ne présentant aucune ouvertures. Pour garantir un bon développement des ouvertures, Walstra (1991) a établi deux conditions devant être remplies : 1) une haute résistance à la fracture et 2) une aptitude suffisante à l'écoulement. En effet, le fromage est un liquide viscoélastique, c'est-à-dire que la réponse en déformation lorsqu'il est soumis à une contrainte présente une composante élastique aux temps courts et la manifestation d'un caractère visqueux aux temps longs avec un écoulement possible de la pâte fromagère si ses propriétés ne changent pas entre temps (Guinee & Fox, 2004; Lucey, Johnson, & Horne, 2003). L'origine de la dépendance des propriétés rhéologiques des fromages en fonction du temps proviendrait de leur structure, au sein de laquelle les liaisons entre éléments ont un temps de vie fini, ce qui leur permet de se former et de se rompre au cours du temps. Cela aboutit à des réarrangements de la structure mais aussi une réaction différente à des sollicitations selon qu'elles sont réalisées rapidement ou plus lentement (Lucey et al., 2003).

Les propriétés rhéologiques des fromages ont été très étudiées dans la littérature. Aux petites déformations, ce sont des tests harmoniques permettant de rester dans le domaine linéaire réversible qui sont utilisés ; ou des tests de compression-relaxation pour déterminer les composantes à la fois élastiques (pic de compression) et visqueuses (temps de relaxation) des fromages. Des tests sont également réalisés aux grandes déformations, le plus communément employé pour les pâtes fromagères (semi-)dures (Emmental, Gouda, Cheddar, Comté, Gruyère, ...) étant la compression uniaxiale réalisée à l'aide d'un texturomètre, (Tableau 4). Ce test consiste à comprimer un cylindre de fromage entre deux plans avec une vitesse de descente verticale du plateau constante. Il est employé pour étudier la réponse d'un échantillon dans une gamme de déformation allant jusqu'à la fracture. Dans la toute première partie du test, lorsque la déformation est très petite, la rigidité du fromage est évaluée à travers le module d'Young correspondant au rapport entre contrainte et déformation uniaxiale. La déformation et la contrainte à la fracture sont quant à elles déterminées aux grandes déformations. Enfin, le test dit de « Texture Profile Analysis » ou TPA est également répandu dans les études de la littérature (Brickley, Auty, Piraino, & McSweeney, 2007; Dimitreli & Thomareis, 2008; Floury et al., 2009; Pastorino, Hansen, & McMahan, 2003 ; Tunick et al.,

1998). Proposé par Bourne (1996) sur la base d'une étude de corrélation des propriétés rhéologiques de produits semi-solides et solides et de leurs propriétés sensorielles mesurées lors de la mastication, il consiste à réaliser deux compressions successives sur le même produit. Ce test présente deux inconvénients majeurs (Estellé et al., 2011). Les auteurs utilisent en général sans aucune vérification les corrélations sensorielles/instrumentales proposées par Bourne (1966) pour des produits très différents. Des termes sensoriels sont donc « plaqués » pour décrire des propriétés de fromages, souvent sans lien avec la perception sensorielle effective. Par ailleurs, le test TPA est mis en œuvre sans mise au point spécifique pour adapter le test au produit considéré, et les courbes analysées automatiquement par des logiciels fournissent des données chiffrées des paramètres de Bourne sans affichage de la courbe brute. Les résultats de telles études sont donc à considérer avec précaution.

Cependant, il est difficile d'étudier les propriétés rhéologiques d'une pâte fromagère dans des conditions pertinentes avec celles subies par la pâte lorsqu'elle est étirée autour des yeux en train de croître. Seules les propriétés des parties aveugles de la pâte fromagère peuvent donc être étudiées (Thierry et al., 2010). C'est pourquoi, bien que la compression uniaxiale standard permette d'étudier le comportement des fromages à la fracture, elle ne s'applique pas idéalement à l'étude des fromages à trous. Dans ce cas, les conditions réelles de croissance de bulles sont : une vitesse de déformation très lente (vitesse estimée à  $10^{-5} - 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  par Walstra, 1991) et un fort niveau de déformation de la pâte fromagère (Luyten, 1988).



**Tableau 4 : Récapitulatif des tests rhéologiques réalisés aux grandes déformations sur des fromages à pâte dure et d'extension biaxiale de la littérature. Conditions expérimentales (V=vitesse de traverse, =vitesse de déformation) et indicateurs rhéologiques obtenus (E=mode d'Young,  $\sigma_{\text{fracture}}$ =contrainte à la fracture,  $\epsilon_{\text{fracture}}$ =déformation à la fracture).**

Produit étudié	Test réalisé	Température	Dimensions	V ou $\dot{\epsilon}_b$	Lubrification	E (kPa)	$\sigma_{\text{fracture}}$ (kPa)	$\epsilon_{\text{fracture}}$	Indice rhéo-fluidifiant n	Références
Emmental	Compression uniaxiale	20°C	$h_0=d_0=2\text{cm}$	$30\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$	Oui	300 - 700	120 - 200	0,8 - 1,2	N/A	Famelart et al., 2002
Emmental	Compression uniaxiale	15°C	$h_0=17,5\text{mm}$ , $d_0=16,4\text{mm}$	5, 20 ou $80\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$	Oui	140 - 230	80 - 120	1,1	0,18	Rohm et al., 1992, 1992
Emmental	Compression uniaxiale	15°C	$h_0=15\text{mm}$ , $d_0=12\text{mm}$	$50\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$	?	N/A	310 - 510	46 - 69%	N/A	Bachmann et al., 1999
Emmental	Compression uniaxiale	15°C	$h_0=20\text{mm}$ , $d_0=16,5\text{mm}$	$20\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$	Oui	N/A	160 - 320	1 - 1,6	N/A	Jaros et al., 1997
Emmental	Compression uniaxiale	20°C	$h_0=d_0=20\text{mm}$	$30\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$	Oui	N/A	135 - 235	0,7 - 1,1	N/A	Michalski et al., 2004
Swiss cheese	Compression uniaxiale	19-23°C	Cubes $1,25\text{cm}^3$	0,11 et $6,75\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$	?	300 - 1000	N/A	N/A	N/A	Schneider et al., 1969
Gouda	Compression uniaxiale	20°C	$h_0=20\text{mm}$ , $d_0=14\text{mm}$	$3\cdot 10^{-4}$ - $3\cdot 10^{-1}\text{s}^{-1}$	Oui	N/A	200 - 300	0,3 - 1,5	0,17	Luyten et al., 1991
Gouda	Compression uniaxiale	20°C	$h_0=20\text{mm}$ , $d_0=14\text{mm}$	$5\cdot 10^{-4}$ - $5\cdot 10^{-1}\text{s}^{-1}$	Oui	100 - 2400	30 - 200	0,3 - 1,1	0,15 - 0,20	Luyten, 1988
Gouda	Compression uniaxiale	20°C	Cylindres Luyten 1991	$5\cdot 10^{-4}$ - $5\cdot 10^{-1}\text{s}^{-1}$	Oui	80 - 3000	0,6	0,2 - 1,5	N/A	Luyten & van Vliet, 1996
Gouda	Compression uniaxiale	10, 15, 20°C	$h_0=20\text{mm}$ , $d_0=20\text{mm}$	5 et $50\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$	?	N/A	2500 - 15000g	40 - 55%	N/A	Culioli & Sherman, 1976
Comté	Compression uniaxiale	18°C	$h_0=d_0=20\text{mm}$ PR ou PL	$30\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$	?	360 - 430	180 - 140	38 - 43	N/A	Grappin et al., 1993
Cheddar	Compression uniaxiale	8°C	$h_0=29\text{mm}$ , $d_0=30\text{mm}$	$50\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$	?	300 - >1000N	300 - >1000	N/A	N/A	Guinee et al., 2000
Cheddar	Compression uniaxiale	20°C	$h_0=25\text{mm}$ , $d_0=20\text{mm}$	$0,0332\text{s}^{-1}$	?	880 - 1200	140	0,6	N/A	Watkinson, 1999
Cheddar	Compression uniaxiale	22°C	$h_0=20, 30, 40\text{mm}$ , $d_0=57\text{mm}$	$0,5\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$	Oui et Non	N/A	30 - 40	0,4	N/A	Casiraghi & Bagley, 1985
Cheddar	Compression uniaxiale	20°C	$h_0=26\text{mm}$ , $d_0=19\text{mm}$	$50\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$	?	100 - 1700	2 - 120	0,007 - 0,850	N/A	Hort et al., 1997
Cheddar	Compression uniaxiale	8°C	$h_0=29\text{mm}$ , $d_0=60\text{mm}$	$50\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$	?	300 - 700	200 - >900	30 - >50%	N/A	Fenelon et al., 2000
Cheddar	Compression uniaxiale	?	cubes $2\text{cm}^3$	$5\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$	?	N/A	13 - 45N	20 - 70%	N/A	Creamer & Olson, 1982
Cheddar	Compression uniaxiale	22°C	$h_0=19, 29\text{mm}$ , $d_0=19\text{mm}$	0,25 à $12,7\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$	Oui et Non	210 - 300	50 - 100	50 - 65%	0,15	Ak & Gunasekaran, 1992
Gruyere	Compression uniaxiale	15°C	Cylindres Van Vliet 1991	$0,833\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$	?	470 - 480	900 - 1340	0,73 - 0,75	N/A	Pesenti et al., 1998
PPNC semi-dure	Compression uniaxiale	20°C	Cubes $1\text{cm}^3$	$80\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$	Oui	N/A	50 - 200	0,2 - 1,1	N/A	Juan et al., 2006
Tilsit (non pressé)	Compression uniaxiale	15°C	$h_0=d_0=20\text{mm}$ PR ou PL	$10\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$	Oui	N/A	61 - 82	0,6 - 0,7	N/A	Weinrihter et al., 2000
Mozzarella	Compression uniaxiale	22°C	$h_0=20\text{mm}$ , $d_0=22,5\text{mm}$	$50\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$	Oui	N/A	N/A	N/A	N/A	Brandsma et al., 2001
Monterey Jack	Torsion	?	$h_0=28,7\text{mm}$ , $d_0=19\text{mm}$	$5\cdot 10^{-3}$ - $5\cdot 10^{-1}\text{s}^{-1}$	?	N/A	7,0 - 25	1,2 - 2	N/A	Brown, 2002
Pâte de farine	LSF	Tamb	$h_0=7\text{mm}$ , $d_0=46\text{mm}$	$0,2$ à $3\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$	Oui	N/A	N/A	N/A	0,17 - 0,28	Lassoued et al., 2003, 2005
Pâte de farine	LSF	18-20°C	$h_0=1,2\text{mm}$ , $d_0=18\text{mm}$	$0,05$ à $1,5\text{s}^{-1}$	Oui	N/A	N/A	N/A	0 - 0,25	Kouassi-Koffi et al., 2009
Pâte de farine	Extension biaxiale	?	$h_0=6\text{mm}$ , $d_0=?$	$0,001$ à $0,2\text{s}^{-1}$	Oui	N/A	N/A	0,7 - 2,0	0,29	Dobraszczyk et al., 1994
Mozzarella	LSF	22°C	$h_0=20\text{mm}$ , $d_0=36,7\text{mm}$	$5\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$	Oui	N/A	Pas de fracture	Pas de fracture	N/A	Brandsma et al., 2001
Mozzarella	LSF & Fonte	40 et 60°C	$h_0=7\text{mm}$ , $d_0=30\text{mm}$	0,5 et $2,5\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$	Oui	N/A	N/A	N/A	Rheo-fluidifiant (asympt.)	Wang et al., 1997
Ricotta	LSF	25°C	$h_0=7-8\text{mm}$ , $d_0=64$ ou $100\text{mm}$	0,1 et $0,2\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$	Oui	N/A	2,0 - 15	N/A	N/A	Suwonsichon et al., 1998
Fromage fondu	LSF	7 et 22°C	$h_0=20, 30, 40\text{mm}$ , $d_0=57\text{mm}$	$10^{-4}$ à $10^{-1}\text{s}^{-1}$	Oui	N/A	Pas de fracture	Pas de fracture	0,15	Casiraghi & Bagley, 1985

Un autre type de test basé sur la compression uniaxiale a été développé dans différents domaines dont l'agro-alimentaire notamment lors de la formation de mousses où les bordures de bulles s'étendent de façon biaxiale (Engmann, Servais, & Burbidge, 2005). Il s'agit de la compression en conditions lubrifiées ou Lubricated Squeezing Flow (LSF). Elle consiste à comprimer entre deux plateaux parallèles un matériau lubrifié pour éviter tout frottement. Lorsque la lubrification est parfaite, le matériau s'étend radialement lors de la compression. Souvent utilisé pour la caractérisation de pâtes à pain dans lesquelles croissent des bulles au cours de la fermentation et de la cuisson (Launay & Michon, 2008), le test de LSF a également été mis en œuvre sur des fromages, mais il s'agissait à notre connaissance, de fromages à pâte très peu rigide (Brandsma et al., 2001; Casiraghi & Bagley, 1985; Suwonsichon et al., 1998; Wang et al., 1997) (Tableau 4).

- Facteurs d'influence sur les propriétés rhéologiques des fromages

La plupart des paramètres rhéologiques des fromages dépendent de la vitesse de déformation, ce qui est un comportement typique des matériaux viscoélastiques comme explicités précédemment (Luyten, 1988; O'Callaghan & Guinee, 2004). La composition des fromages a également été identifiée dans la littérature comme un paramètre d'influence important sur la rhéologie des fromages (Creamer & Olson, 1982; Eberhard, 1985; Fox et al., 2000; Guinee, 2004; Lucey et al., 2003; Luyten, 1988; Sherman et al., 1969). Elle est généralement associée à la protéolyse. La teneur en sel souvent liée à la teneur en eau dans la littérature ainsi que la teneur en matière grasse et le pH seraient les facteurs les plus impactants sur les propriétés rhéologiques des fromages, comme le montre le tableau récapitulatif des effets sur la rhéologie des fromages (Tableau 5).

**Tableau 5 : Récapitulatif de l'influence de divers paramètres physico-chimiques sur la rhéologie des fromages. Code couleur : bleu=composition ; rouge=température ; vert=indicateurs de protéolyse ; jaune=anisotropie ; noir=temps d'affinage et violet=vitesse de déformation ; blanc=autre paramètre.**

Code	Fromage	Paramètre testé	Module d'Young	$\sigma_{\text{fracture}}$	$\epsilon_{\text{fracture}}$	Références
	Emmental	MG, EST, G/S, HFD, pH, Ca, Cl	f(EST, [Prop], -pH, MAS, [Cl])	f(-HFD, -[Lact]) idpt MAT,MAS	f(-MAS, -[Glu], pH, -[Ca])	Rohm et al., 1992
		Lact, MAT, Plasmine, MAS...				
		Vitesse de déformation >	↗	↗↗	→	Rohm et al., 1992
	Emmental	H <sub>2</sub> O, MG, Lactate, pH, MAT	f(MAT, -[H <sub>2</sub> O])	f(MAT, -[H <sub>2</sub> O], -[Lact], pH)	f(-[Lact])	Steffen et al., 1974
	Emmental	Taille globules gras >	-	↗	↗	Michalski et al., 2004
	Emmental	Temps d'affinage >	-	-	↘	Eberhard, 1976
	Appelzenzer	NPN (%MAS) >	-	-	↘	
	Emmental	Température >	-	-	↘	
	Gruyère, Tilsit	Température >	-	↘	-	Eberhard, 1985
		Anisotropie	PR = PL	PR = PL	PR = PL	
	& Appelzenzer	Temps d'affinage >	?	↘	-	
	Emmental	Temps d'affinage >	?	↘	↘	Bachmann et al., 1999
		AA libres >	↘	↘	↘	
		MAS, Proline & Peptidase >	-	↘	-	
	PPNC semi-dur	Traitement haute pression >	→ puis ↗	↗ jusqu'à 300MPa puis ↘	↗↗	Juan et al., 2006
	Gouda	Teneur en eau >	↘↘	↘	→ ou ↗	Visser et al., IDF 268
		Âge du fromage >	→	↘	↘	
		Température > MG 10%	↘	↘	↗	
		Température > MG 60%	↘↘	↘↘	→	
		pH >	↘ jusqu'à 5,3 puis ↗	↘ jusqu'à 5,3 puis ↗↗	↗ jusqu'à 5,3 puis ↘	
		G/S >	↘	↘↘	→ ou ↘ (selon T°C)	
		Sel/Eau >	↗	→ ou ↗	↗ jusqu'à 4% puis ↘↘	
		Temps d'affinage >	↗↗	↗	↘	
	Gouda	Gradient cœur<int<croûte	↗	↗	→	Culioli et al., 1976
		Temps d'affinage >	↗↗	↗	↘	
		Température >	↘	↘↘	→ ou faible ↘	
	Gouda	Temps d'affinage >	↘	-	↘	Luyten et al., 1996
		Teneur en eau >	↘	-	-	
		Vitesse de déformation >	-	↗	→ ou ↘	
	Cheddar	Vitesse de déformation >	→	↗↗	→	Ak et al., 1992

	Cheddar	Teneur en MG >	↘↘	↘↘	↘↘	Fenelon et al., 2000
		Temps d'affinage >	→ ou faible ↘	↘	↘↘	
	Cheddar	Concentration caséine >	↗	↗	-	Guinne, 2002
		G/S >	↘	↘	-	
		Température >	↘	↘	-	
		Teneur en eau >	↘	↘	faible ↗	
	Gouda	Sel/Eau >	↗	↗	↗ jusqu'à 4% puis ↘↘	
	Cheddar & Gouda	pH >	↘ jusqu'à 5,2 puis ↗	↘ jusqu'à 5,2 puis ↗↗	↗ jusqu'à 5,2 puis ↘	
		Temps d'affinage >	↘	↘	-	
	Cheddar	Sel/Eau >	↗	↗	-	Guinne & Fox, 2004
	Cheddar	Temps d'affinage >	↗↗	↘↘	↘↘	Creamer & Olson, 1982
		Vitesse de déformation >	-	↗	→	
		Teneur en sel >	-	→	→	
		Teneur en sel & eau >	-	↘	→	
		pH >	-	↘	↘	
	Comté	Anisotropie	PR > PL	PR < PL	PR > PL	Grappin et al., 1993
	Tilsit	Anisotropie	PR = PL	PR > PL	PR = PL	Weinrichter et al., 2000
	Fromage fondu	Température >	↘↘	↘↘	→	Casiraghi et al., 1985

- *La teneur en eau.* Le Tableau 5 montre le consensus obtenu à partir des travaux de la littérature : un fromage avec une teneur en eau élevée tout en maintenant les autres paramètres de composition constants a un plus faible module d'Young et une plus faible contrainte à la fracture. En revanche, la déformation à la fracture augmente légèrement avec la teneur en eau dans des proportions dépendantes du pH (Guinee, 2002). A faible teneur en eau, la déformabilité ainsi que le ratio des propriétés visqueuses versus élastiques seraient plus faibles (Luyten, 1988; Visser, 1991). Une plus forte teneur en caséines augmenterait la rigidité des fromages (Famelart et al., 2002) et le nombre de liaisons entre protéines d'où un module d'Young supérieur (Visser, 1991). L'HFD ou Humidité sur Fromage Dégraissé, aussi appelée « Water-Solids Non Fat » (WSNF) ou encore « Moisture on Fat Free Substance » (MFFS) est également apparue comme le paramètre d'influence principal sur le module d'Young et surtout la contrainte à la fracture de l'Emmental (Rohm & Lederer, 1992).
- *La teneur en matière grasse.* Un taux de matière grasse plus élevé à température ambiante en conservant une teneur en eau constante rend le fromage moins ferme et

moins résistant (Luyten, 1988). L'interaction « teneur en matière » grasse versus « température » est souvent présente dans la littérature. Cela s'explique par l'état de cristallisation de la matière grasse, sous forme majoritairement solide ou liquide qui est fortement impacté par la température. L'augmentation du Gras/Sec en maintenant les autres paramètres constants entraîne une diminution de la contrainte à la fracture avec un écart d'autant plus prononcé que la température diminue (Guinee, 2002). Enfin, une taille supérieure des globules gras conduirait à une augmentation de la résistance des fromages avec une contrainte et une déformation à la fracture plus élevées (Michalski et al., 2004).

- La *température*. La température d'affinage est en interaction directe avec les autres facteurs : elle peut provoquer une augmentation du pourcentage de matière grasse liquide et accélérer les pertes en eau ou la protéolyse (Luyten, 1988; Visser, 1991). En effet, pour une température inférieure à 5°C la matière grasse laitière est majoritairement sous forme solide, ce qui augmente l'élasticité de la matrice caséique (Guinee, 2002). Cependant, la contribution de la matière grasse à l'élasticité des fromages décroît rapidement, comme le ratio matière grasse solide/liquide diminue fortement avec la température jusqu'à 40°C où toute la matière grasse laitière se trouve sous forme liquide. Dans ce cas, la matière grasse peut renforcer les propriétés visqueuses des fromages en agissant comme un lubrifiant, ce qui limiterait la contrainte à la fracture (Guinee, 2002).
- Le *pH*. Le pH aurait une influence sur l'ouverture des fromages via la texture de la pâte fromagère, qui doit pouvoir s'adapter aux contraintes exercées par la croissance de bulles (Lawrence, Creamer, & Gilles, 1987). D'après le Tableau 5, quand le pH augmente, le module d'Young et les paramètres à la fracture de la pâte fromagère diminuent globalement. Cependant, les résultats obtenus sont très dépendants de la gamme de pH étudiée, avec des variations contraires selon la valeur de pH considérée. En effet, avant un pH de 5,2-5,3, le module d'Young et la contrainte à la fracture diminuent avant d'augmenter une fois ce seuil passé dans du Gouda et du Cheddar (Guinee, 2002; Visser, 1991) alors que la déformation à la fracture augmente jusqu'à pH = 5,2 puis diminue. Cependant, l'effet pH dans ces études est couplé à un effet teneur en eau, comme le montre la suivante.

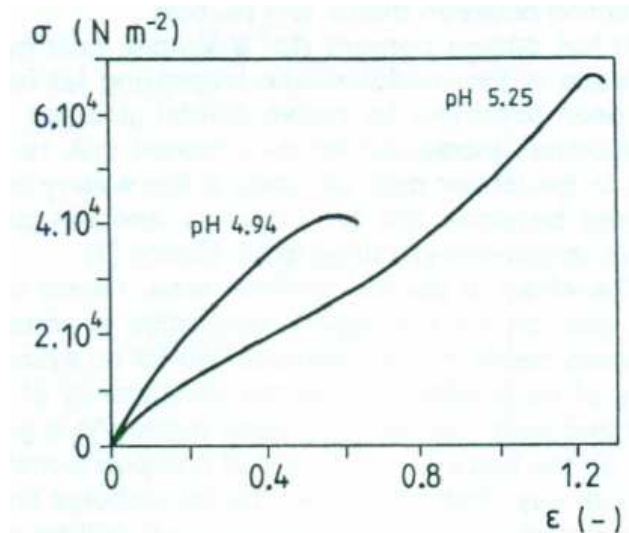


Figure 12 : Courbe de compression contrainte=f(déformation) pour du Gouda affiné durant 1 semaine à 20°C ;  $\dot{\epsilon}_c = 0,028s^{-1}$  ; pH = 4,94 et teneur en eau 49,7% ou pH = 5,25 et teneur en eau 43,3% (d'après Visser et al., 1991)

L'effet du pH sur la rhéologie des fromages serait lié à trois actions principales : (1) sur le degré d'hydratation des caséines, les liaisons entre protéines et les groupements ioniques exposés, (2) sur la protéolyse et (3) sur la solubilité des sels tels que le phosphate de calcium (ratio calcium soluble/colloïdal). Un lien entre bas pH et défauts d'ouverture aurait aussi été mis en évidence, ainsi qu'une détermination d'un intervalle de pH optimal pour l'ouverture, compris entre 5.15 et 5.35 (Luyten, 1988). Guinne (2002) résume l'effet pH en attribuant généralement de faibles valeurs de contrainte et déformation à la fracture aux fromages à bas pH (exemple Cheshire ou Feta) qui s'effritent lors de la fracture, alors que pour des produits à plus haut pH comme l'Emmental ou le Gouda, les valeurs de contrainte et déformation à la fracture sont supérieures et ces fromages se fracturent en plus gros morceaux. Il souligne aussi le lien entre pH et degré de protéolyse des caséines, qui ne peuvent être départagés.

- La *teneur en sel*. Augmenter le rapport Sel/Eau dans l'intervalle 0-12% tout en maintenant les autres paramètres de composition constants dans l'Emmental entraîne une augmentation du module d'Young et de la contrainte à la fracture (Guine, 2002; Visser, 1991), qui présente un plateau entre 3 et 7% de Sel/Eau. La déformation à la fracture est également affectée mais l'effet dépend fortement de la gamme de teneur en sel concernée :  $\epsilon_f$  augmente faiblement jusqu'à un ratio Sel/Eau de 4% puis diminue fortement (jusqu'à atteindre la moitié de sa valeur maximale) avant de se maintenir dans la gamme 5-12% de Sel/Eau. Une déformation à la fracture maximale est donc obtenue dans la gamme de Sel/Eau de 4-5% pour l'Emmental et le Gouda. La question d'un effet pH-dépendant lié à l'effet sel est cependant posée par les auteurs.

En effet, plus le pH se rapproche du point isoélectrique 4,5 plus l'effet « salting-out » domine les interactions d'où un comportement plus fragile et moins visqueux des fromages. Visser (1991) a remarqué le même effet lors de l'affinage des fromages lorsque le Gouda perd de l'eau et que le Sel/Eau a donc tendance à augmenter. Enfin, le sel aurait également une action sur l'équilibre ionique impactant les protéines et leur solvation.

- La *protéolyse*. Ce paramètre n'est pas un élément de composition mais il regroupe un ensemble d'indicateurs régulièrement mesurés dans la littérature tels que la matière azotée totale (MAT), matière azotée soluble (MAS), acides aminés libres (AA) ou encore la présence de plasmine ou d'enzymes de type peptidases. Steffen et al. (1974) et Rohm et al. (1992) ont ainsi montré un module d'Young et une contrainte à la fracture supérieurs avec une plus forte MAT. Cependant, le coefficient de corrélation entre MAS et extrait sec des fromages était de -0,31. La MAS serait globalement anti-corrélée aux indicateurs rhéologiques présentés dans le Tableau 5.
- Le *temps d'affinage*. Plusieurs études de la littérature semblent montrer une influence du temps d'affinage sur les indicateurs rhéologiques, mais une plus fine analyse révèle que c'est en réalité un effet « perte d'eau » et/ou « pH » qui est constaté car les produits étudiés ne sont pas emballés durant l'affinage (Luyten, 1988; Luyten & vanVliet, 1996; Notz, 1996; Visser, 1991). La question de la protéolyse étant donnée les durées d'affinage allant parfois jusqu'à plusieurs mois peut également se poser dans les interactions de facteurs parfois attribués au « temps d'affinage ».
- La *direction de prélèvement*. Une anisotropie est observée dans les fromages Gruyère, Comté et Tilsit (Eberhard, 1985; Grappin et al., 1993; Weinrichter, Rohm, & Jaros, 2000) et peut parfois impacter les propriétés rhéologiques mesurées aux grandes déformations. Cependant, l'intensité de cette influence de l'anisotropie et son existence même varient d'une étude à l'autre : Grappin et al., (1993) et Weinrichter et al. (2000) obtiennent des effets contradictoires sur le Comté et le Tilsit avec un module d'Young et une déformation à la fracture parfois impactés et parfois non impactés ainsi qu'une contrainte à la fracture parfois supérieure et parfois inférieure selon les axes PR et PL. De plus, d'autres études menées sur l'Emmental ne montrent aucune influence de la direction de prélèvement sur les propriétés rhéologiques présentées dans le Tableau 5 (Eberhard, 1985).

#### 1.4.5 Les gradients dans les fromages

De nombreux facteurs physico-chimiques peuvent impacter la flore microbienne et les propriétés rhéologiques des fromages et par conséquent l'ouverture des fromages. Cependant, il existe une autre dimension à prendre en compte : les gradients. En effet, la plupart des paramètres physico-chimiques sont soumis à un gradient induit par le procédé de fabrication et les phénomènes de diffusion dans les fromages. Il existe donc des zones plus influencées que d'autres par le pH, la température et autres facteurs. Le Tableau 6 récapitule les études menées dans la littérature pour évaluer ces gradients ainsi que leur évolution au cours de différentes étapes de procédé.



**Tableau 6 : Récapitulatif des études et résultats mettant en évidence l'existence de gradients de paramètres physico-chimiques entre le cœur et la périphérie de fromages à pâte dure ou semi-dure au cours de différentes étapes du procédé de fabrication. Code couleur : bleu=composition ; rouge=température ; vert=indicateurs de protéolyse ; jaune=microbiologie ; et blanc=microstructure**

Code	Fromage	Gradient étudié	Ecart cœur/périphérie		Evolution	Etape fabrication	Références
			Début étape fabr.	Fin étape fabr.			
	Emmental	Température	x1,06 cœur (≠ 3°C)	x1,23 cœur (≠ 8°C)	↗	PRESSAGE 20h	Steffen et al., 1978
	Gruyère	LAB <i>S. Thermophilus</i>	-	x15,1 périph	↗	PRESSAGE de 1 à 20h Tamb = 24°C	Accolas et al., 1978
		LAB <i>L. Helveticus</i>	-	x11,7 périph	↗		
		Température	-	x1,37 cœur (≠ 10°C)	↗		
	Gouda	Sel/Eau	-	x18 périph (≠ 18%)	-	SAUMURAGE 4j 20°C 20% w/w NaCl	Guinne et al., 2004
		Teneur en eau	-	x1,2 cœur (≠ 7,5%)	-		
	Swiss-type	PAB	> x1000 cœur	x50 cœur	↘↘	AFFINAGE début = 1mois Fin = 16mois	Reinbold et al., 1958
		Teneur en eau	x1,57 cœur (≠ 14%)	x1,33 cœur (≠ 9,6%)	↘		
		Sel	x6,6 périph (≠ 1,7%)	x1,2 cœur (≠ 0,15%)	↘↘		
		Sel/Eau	x10,2 périph (≠ 7,4%)	x1,1 cœur (≠ 0,22%)	↘↘		
	Emmental	[Lactate]	-	x1,23 cœur (≠ 8°C)	-	AFFINAGE	Steffen et al., 1974
	Gouda	Force (g) ≡ σ <sub>f</sub>	x1,6 périph (≠ 2000g)	x2 périph (≠ 5000g)	↗	AFFINAGE (2-3) & (5-6) mois	Culioli et al., 1976
		Compression (%) ≡ ε <sub>f</sub>	x1,18 cœur (≠ 7%)	x1,16 cœur (≠ 5%)	→		
	Swiss-type	Sel	x15 périph (≠ 3%)	x2,5 (≠ 1,5%)	↘↘	AFFINAGE 24 j 20°C puis stockage 8°C	Hollywood et al., 1984
		Matière grasse	≠ 1%	≠ 1%	→		
		Teneur en eau	x1,09 (≠ 3,5%)	x1,11 (≠ 3%)	→		
		pH	≠ 0,1	≠ 0,2	→		
		Sel/Eau	x16 périph (≠ 8%)	x2,8périph (≠ 4%)	↘↘		
		HFD	x1,07 cœur (≠ 4%)	x1,08 cœur (≠ 4%)	→		
		PAB	x4 cœur	x12 cœur	↗↗		
		[Lactate L+]	x1,1 cœur (≠ 2,5%)	x2,4 cœur (≠ 13%)	↗↗		
		[Acétate]	-	x2 cœur	↗		
		[Propionate]	-	x2 cœur	↗		
		MAS	-	x1,2 cœur	↗ / →		
	Cheddar	Dureté (firmness)	-	x2 cœur	-	Fin AFFINAGE	Prentice et al., 1987
	Emmental	Sel	x22,5 périph	x2,5 périph	↘↘	AFFINAGE durant 7j 14°C puis 20j 13°C et 30j 23°C	Saurel et al., 2004
		Teneur en eau	x1,3 cœur	x2,26 cœur	↗		
	Cantal	Microstructure MCBL	-	~	-	AFFINAGE	De Freitas et al., 2005

- Paramètres de composition

De nombreux paramètres de composition des fromages ont été quantifiés en fonction de la localisation du prélèvement des échantillons. L'écart le plus important se trouve sur la teneur en sel, qui s'explique par l'opération de saumurage des fromages. En fin de saumurage, le gradient est maximal entre la périphérie riche en sel et le cœur dont la concentration en NaCl est nulle. Par diffusion, ce gradient va ensuite diminuer avec le temps et un équilibre peut être atteint en fin d'affinage. Ainsi, dans l'Emmental la teneur en sel varie d'un facteur allant de 7 à 22 en début d'affinage (Reinbold, Hussong, & Stine, 1958; Saurel et al., 2004), le ratio Sel/eau subissant alors un facteur de 10 à 16 d'écart entre cœur et périphérie (Hollywood & Doelle, 1984; Reinbold et al., 1958). Le phénomène d'équilibration du gradient de sel est démontré par Guinee et al. (2004), ayant quantifié une périphérie de Gouda 18 fois plus salée que le cœur après 4 jours de saumurage à 20°C.

Autres paramètres de composition touchés par un gradient, bien que dans une moindre mesure : la teneur en eau, avec un facteur d'écart allant de 1,3 à 2,2 entre cœur et périphérie. Hollywood et al. (1984) ont par contre montré l'absence de gradient, négligeable devant la précision des mesures, pour des paramètres tels que la matière grasse, l'HFD et le pH durant l'affinage de fromages « Swiss-type ». Une étude a montré un gradient de protéolyse entre centre et périphérie de fromages « Swiss-type », soumise à une protéolyse légèrement supérieure (Hollwood et al., 1984).

- Métabolites et dénombrements

Les substrats et les produits du métabolisme des PAB présentent également un gradient, avec un cœur de fromages de type Emmental 1,2 à 2,2 fois plus concentré en acétate et en lactate en fin d'affinage dans l'Emmental (Hollywood & Doelle, 1984; Steffen & Rentsch, 1974). Ce gradient de métabolites va en augmentant puisqu'en début d'affinage, peu ou pas de production ou consommation de métabolites de PAB peuvent être quantifiés. Parallèlement, le dénombrement des bactéries propioniques montre un plus fort développement microbien à cœur qu'en périphérie avec un gradient croissant au cours de l'affinage (Reinbold et al., 1958 ; Hollywood et al., 1984). Au contraire, les LAB semblent mieux se développer en périphérie durant le pressage de Gruyère (Accolas, Veaux, Vassal, & Mocquot, 1978).

- Le CO<sub>2</sub>

La quantité de CO<sub>2</sub> dissoute dans la pâte en périphérie des fromages est moindre que celle au centre (Pauchard et al., 1980), comme le montre la Figure 13, pour deux fromages de type Emmental.

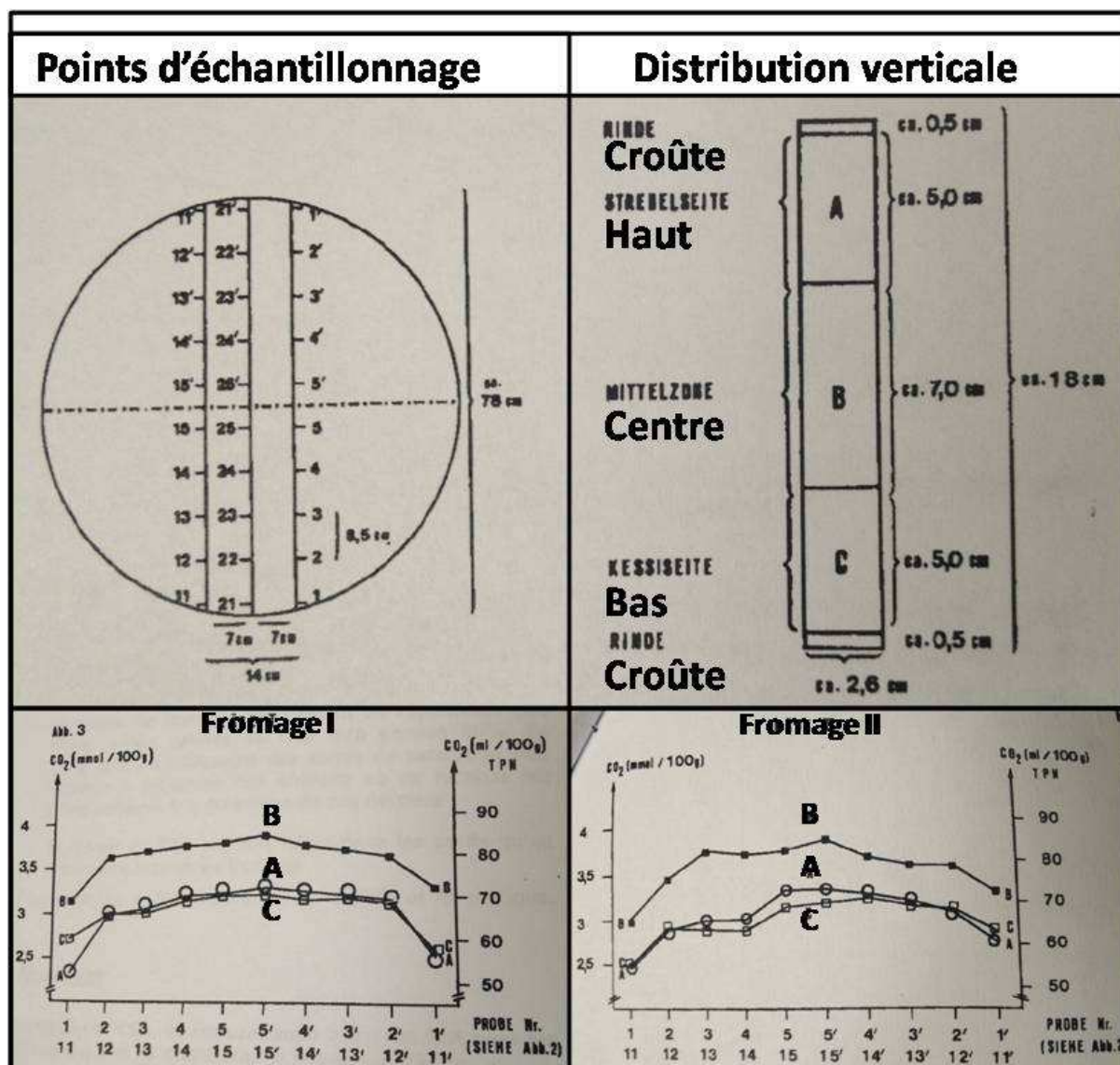


Figure 13 : Gradient de CO<sub>2</sub> dans des meules d'Emmental selon la localisation des échantillons dans le plan horizontal avec prise en compte de la symétrie (exemple 1 ≡ 11) ou selon l'axe vertical, d'après Flückiger et al., 1980

La Figure 13 présente la quantité de CO<sub>2</sub> obtenue dans deux fromages de type Emmental selon la localisation des échantillons prélevés pour les tests. Une double cartographie est réalisée par Flückiger et al. (1980) dans le plan vertical et horizontal avec prise en compte de la symétrie des meules. Trois zones sont particulièrement étudiées selon l'axe z : le centre (B), le Haut (A) et le Bas (C). De plus, chaque prélèvement horizontal est espacé de 8,5cm (entre 1 et 2, 2 et 3, etc) et large de 7cm. Ce balayage des zones du fromage a été mis en œuvre pour deux fromages différents, appelés I et II. Il apparaît que la zone centrale selon l'axe z (zone B) présente toujours des valeurs de CO<sub>2</sub> supérieures, comprises entre 3 et 4mmol/100g. Au

contraire, il n'y a pas de différence entre les zones périphériques A et C selon z, dont la quantité de CO<sub>2</sub> est comprise entre 2,5 et 3 mmol/100g. L'échantillonnage dans le plan horizontal présente également des disparités bords/centre. En effet, les échantillons des zones 1-2 et 2'-1' ont une quantité de CO<sub>2</sub> moindre que celles des échantillons plus au centre dans le plan horizontal des meules. La différence est d'environ 0,5 mmol/100g en faveur du centre des fromages. Pour le fromage I, les zones sont parfaitement symétriques entre les deux côtés de la meule comme selon z. Pour le II en revanche, si l'axe vertical z est bien symétrique, les échantillons dans le plan présentent un palier intermédiaire de CO<sub>2</sub> entre les zones 2 et 4 alors que de l'autre côté, la chute est brutale, à partir de 2' comme pour le fromage I. La reproductibilité est donc plus consistante au centre (vertical et horizontal) des meules, possédant toujours une quantité de CO<sub>2</sub> supérieure aux bords.

- Paramètres rhéologiques

Deux études présentent une dureté et une contrainte à la fracture supérieure en périphérie qu'à cœur dans du Gouda (Culioli & Sherman, 1976) et du Cheddar (Prentice et al., 1987) durant l'affinage. Cet écart semble augmenter légèrement entre le début et la fin de l'affinage. En revanche, la déformation à la fracture ne semble pas être impactée par la localisation des échantillons.

- Température

Des profils de température ont été étudiés dans des meules d'Emmental et de Gruyère durant un pressage de 20h. Il apparaît que la température diminue plus vite en périphérie qu'à cœur, d'où un gradient qui s'accroît au cours du pressage (Accolas et al., 1978 ; Steffen et al., 1978). Le centre des fromages passe de 48 à 35°C entre le début et la fin du pressage alors que la périphérie passe de 48 à 27°C dans le même laps de temps, avec une température ambiante de 24°C durant cette étape de procédé. Cet écart est peut être particulièrement prononcé dans le cas de ces technologies de type pâte cuite où le caillé est chauffé jusqu'à 53°C en cuve ?

En conclusion, de nombreux paramètres physico-chimiques peuvent influencer la microbiologie et la rhéologie des fromages, et ce à divers moments du procédé. Mais la plupart sont soumis à un gradient qui rend leur influence d'autant plus sensible selon les zones du fromage, le tout évoluant plus ou moins fortement durant l'affinage (équilibre ou au contraire accentuation des gradients dans le temps).

## 1.5 Caractérisation des ouvertures des fromages

Les méthodes de caractérisation des bulles mises en place dans la littérature se distinguent cependant selon le niveau de destruction des produits et l'objectif visé (détection d'ouvertures, de défauts...). Il est nécessaire de distinguer les méthodes destructives des non-destructives, comme le montre le Tableau 7 suivant :

Tableau 7 : Méthodes d'observation des ouvertures (yeux et défauts) dans la littérature

Fromage	Technique d'observation	Objet d'étude	Références
Swiss-type	Appréciation visuelle jury	Défauts (fissures)	White et al., 2003
Emmental	Appréciation visuelle	Ouvertures	Seuvre & Mathlouthi, 1982
Emmental	Appréciation visuelle	Ouvertures	Fröhlich-Wyder et al., 2001
Gruyère de Comté	Appréciation visuelle jury	Ouvertures/défauts	Grappin et al., 1993
Comté	Appréciation visuelle jury	Ouvertures/défauts	Berdagué & Grappin, 1989
Emmental, Ragusano, Cheddar	Photographie + analyse image	Ouvertures	Caccamo et al., 2004
Swiss-type	Microphotographie	Ouvertures/défauts	Rüegg & Moor, 1987
Manchego	Ultra-sons	Ouvertures/défauts	Conde et al., 2008
Comté	Ultra-sons	Ouvertures/défauts	Nassar et al., 2004
Emmental	Ultra-sons	Ouvertures/défauts	Eskelinen et al., 2007
Swiss-type	IRM	Ouvertures/défauts	Rosenberg et al., 1991
Swiss-type	IRM	Ouvertures/défauts	Rosenberg et al., 1992
Cheddar fondu, Brie, Harvati...	IRM	Ouvertures/défauts	Duce et al., 1994
Emmental	IRM	Bordures grains caillé	Mahdjoub et al., 2003
Emmental	RX	Ouvertures	Fröhlich-Wyder et al., 2002
Gouda	RX	Ouvertures	Akkerman et al., 1989
Norvégien semi-dur	RX	Ouvertures	Kraggerud et al., 2009
Emmental	RX et tomographie RX	Ouvertures/défauts	Schuetz et al., 2013
Gruyère & Emmental	Tomographie RX	Croissance yeux	Blanc & Hättenschwiler, 1973
Gouda	Tomographie RX	Croissance yeux	Lee et al., 2012
Tilsit (non pressé)	Tomographie RX	Ouvertures	Guggisberg et al., 2013
Emmental	MEB	Ouvertures	Rousseau & Le Gallo, 1990

- *Méthodes destructives.* Elles nécessitent la découpe de fromages, généralement réalisée en fin d'affinage. Des photographies sont prises et montrées sous forme de diapositives à un jury entraîné qui a pour objectif d'évaluer la qualité de l'ouverture. Les limitations d'une telle démarche sont la représentativité d'une part, qui ne peut être garantie à partir d'une tranche par rapport à la prise en compte du produit global, et d'autre part le point de vue en seule surface 2D et non en volume 3D, qui peut biaiser l'interprétation d'une taille de bulles par exemple. Enfin, la découpe des fromages empêche logiquement tout suivi cinétique durant l'affinage.
- *Méthodes non destructives.* Elles sont de trois sortes : ultra-sons (US), rayons X (RX) ou imagerie par résonance magnétique (IRM). Elles se caractérisent par l'absence de découpe des produits, bien que des fromages entiers soient rarement

utilisés en US qui atteint ses limites comme le scanner RX pour des fromages à forte ouverture, contrairement à la tomographie RX ou l'IRM. De plus, ces techniques non invasives associées à un traitement d'images ont été systématiquement utilisées dans le but d'un contrôle qualité des produits, c'est-à-dire la détection de défauts d'ouverture tels que les fissures, sans application à l'étude de la croissance de bulles. L'autre application pour la tomographie RX ou de l'IRM est le décompte de trous à un stade d'affinage donné. Récemment, la tomographie RX a été utilisée pour une étude cinétique permettant de suivre l'évolution de la porosité globale dans les fromages au cours de l'affinage (Lee et al., 2012; Marchesseau, Gastaldi, Lagaude, & Cuq, 1997).

Les méthodes non invasives associées à un traitement des images sont les seules permettant un suivi des ouvertures et l'obtention de cinétiques réelles, c'est-à-dire le suivi des bulles dans les mêmes produits au cours du temps. Elles limitent également le risque d'interférence avec les ouvertures que peut causer une découpe, comme le rebouchage des plus petites bulles par exemple ou la création artificielle de points de rupture par l'application d'une contrainte supplémentaire. Cependant, outre la détermination de la porosité qui reste un indicateur global puisqu'une même porosité peut être obtenue avec des distributions de tailles de bulles différentes, la réelle plus-value de méthodes comme la tomographie RX ou l'IRM serait la possibilité de localiser individuellement chaque bulle et d'avoir ainsi sa croissance spécifique, même si à notre connaissance, une telle démarche n'a jamais été entreprise. Ces méthodes permettent d'estimer la dépendance spatiale de la croissance des bulles, le fromage n'étant pas de composition uniforme.

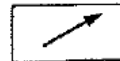
## **1.6 Synthèse des connaissances sur la croissance de bulles**

Les facteurs influençant la croissance des bulles décrits au chapitre 1.3 sont en étroite interaction les uns avec les autres. Or la plupart des études de facteurs sont confrontées à des variations simultanées de ces facteurs. Le récapitulatif de la variation des phénomènes survenant durant la cave chaude liée à des paramètres physico-chimiques effectué lors de l'étude ITFF-ITG SS/1984/07.08/C fait également état de ces variations simultanées (Tableau 8).

Tableau 8 : Synthèse des paramètres physico-chimiques pouvant influencer plusieurs phénomènes de l'affinage simultanément (d'après l'étude ITFF-ITG SS/1984/07.08/C)

		PHENOMENES DE L'AFFINAGE					
		protéolyse	ouverture (volume)	pertes de poids	forme	pâte et goût	autres
FACTEURS	température de cave ch.	* ↗	* ↗	* ↗	↗	↘	
	humidité relative	↗	* ↘	→	* ↘	→	augmentation de la moisissure
	préaffinage	↗	↗	→	↘	↗	
AUGMENTES	durée cave chaude	* ↗	* ↗	↗	↗		permet de choisir le volume de l'ouverture
	durée d'affinage	* ↗		↗		↗	
	concentration en NH <sub>3</sub>	→	↘ ↗	* ↘	↘ ↗		améliore la propreté du croûtage
	concentration en CO <sub>2</sub>	↗	* ↘	↗	↘	↗	

température de cave chaude : 20 à 25° C  
 humidité relative de cave chaude : 65, 78, 90 %  
 durée de préaffinage : 0,3, 6 semaines à 6° C  
 concentration en NH<sub>3</sub> : < 10, 60, 150 ppm  
 concentration en CO<sub>2</sub> : 0,3 - 0,6 - 1,2 %



tendance



phénomène significatif

		PHENOMENES DE L'AFFINAGE					
		protéolyse	ouverture (volume)	pertes de poids	forme	pâte et goût	autres
FACTEURS	température de cave chaude	* ↗	* ↗	↗	↗	↘	
	humidité relative	↗	↗	* ↘	* ↗	→	meilleur croûtage
	durée de préaffinage	↗	* ↗	↗	↘	→	
AUGMENTES	durée de cave chaude	* ↗	↗	↗			
	durée d'affinage	* ↗		↗		↗	
	concentration en NH <sub>3</sub>	↘ ↗	↘ ↗	* ↘	↘	→	bon croûtage à 60 ppm
	concentration en CO <sub>2</sub>	↘	↗	↘	→	→	

plages utilisées : température de cave chaude : 15, 18, 21° C  
 humidité relative : 84, 90, 96 %  
 préaffinage : 27 à 45 jours à 15° C  
 concentration en NH<sub>3</sub> : < 10, 60, 150 ppm  
 concentration en CO<sub>2</sub> : 0,25 - 1,5 - 3 %



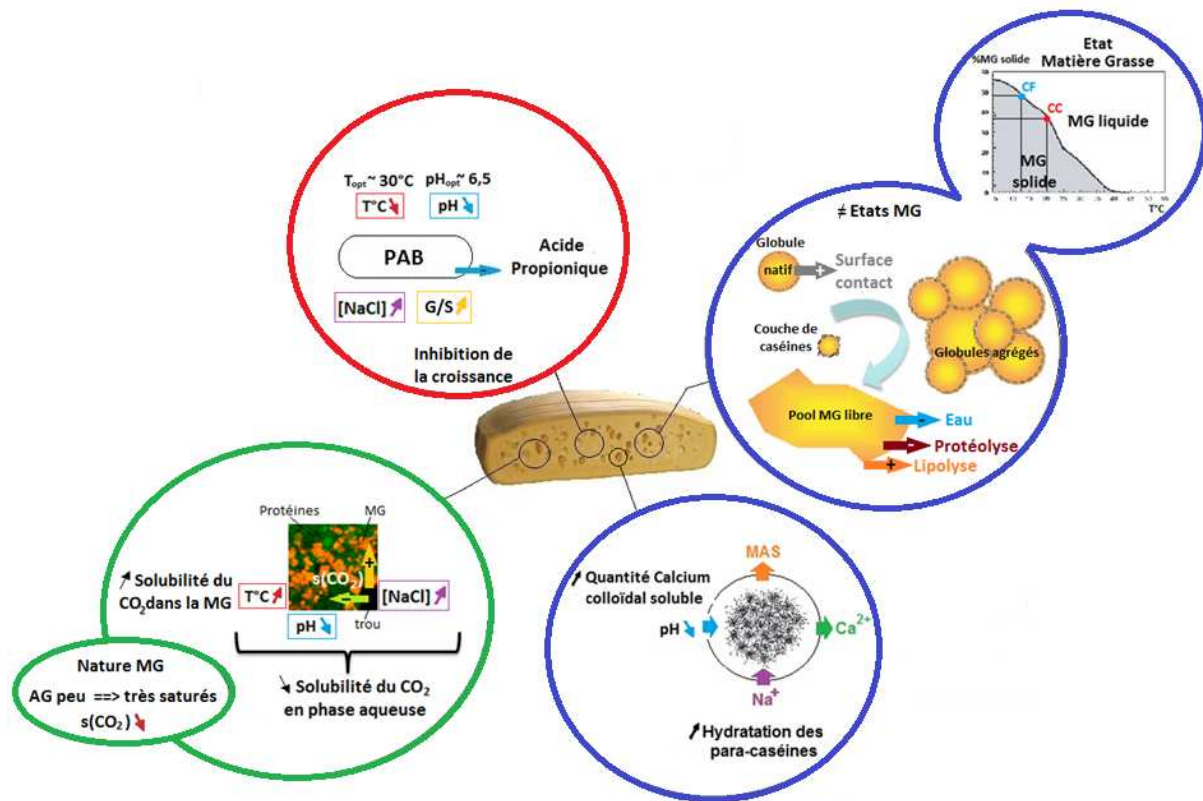
tendance



phénomène significatif

Ainsi, selon la plage de variation étudiée, les variations observées pour les divers phénomènes d'affinage divergent. De plus, chaque paramètre impacte différents phénomènes. Même si la croissance des bulles n'est pas citée dans les paramètres autrement que via le volume des yeux, il apparaît clairement que la compréhension de ses mécanismes sera

difficile dans ces conditions qui s'impactent mutuellement sans qu'un effet puisse être individualisé. Un résumé des facteurs d'influence potentiels sur l'ouverture des fromages réalisé à partir d'études bibliographiques est présenté en Figure 14.



**Figure 14 : Récapitulatif des différents facteurs d'influence sur l'ouverture et de leur mode d'action issu de la bibliographie. En rouge les facteurs liés à la production de CO<sub>2</sub> par les microorganismes tels que les PAB, en vert les aspects de diffusion et solubilité du CO<sub>2</sub> dans la pâte fromagère et en bleu les éléments de structure : protéines (cercle du bas) et matière grasse (cercles du haut)**

Les facteurs physico-chimiques étudiés impactent en priorité trois grands domaines d'intérêt pour la caractérisation des fromages : la croissance bactérienne et la production de CO<sub>2</sub> (flèche bleue dans le cercle rouge sur la Figure 14), l'équilibre de répartition/diffusion/solubilité du CO<sub>2</sub> dans les fromages (en vert sur la Figure 14) et la microstructure et rhéologie de la pâte fromagère (en bleu sur la Figure 14). Il est donc essentiel de développer des outils permettant d'évaluer l'impact de facteurs testés sur ces trois domaines et de les distinguer. En effet, il n'est jamais fait mention d'une hiérarchisation des facteurs d'influence sur la croissance des bulles dans la littérature. Les études sont ponctuelles et il est difficile d'en déduire quels facteurs sont dominants.

La première étape de notre démarche a été la caractérisation de produits industriels, sur les plans chimique, rhéologique et microbiologique, de façon à réaliser un état des lieux des conditions réelles de croissance de bulles et estimer les variations intra et inter batch. Une



telle démarche repose sur le développement d'une méthode fiable de suivi des ouvertures dans le temps comme dans l'espace, donc non destructive pour pouvoir disposer des cinétiques de croissance de bulles. Ce premier protocole a été complété par d'autres techniques de caractérisation des fromages à différentes échelles, de sa microstructure à sa composition. Une fois les divers protocoles d'analyse maîtrisés, les résultats ont été rassemblés pour pouvoir envisager une analyse hiérarchisée et globale des mécanismes de croissance de bulles.

Le premier objectif du présent projet de recherche fut donc la mise en place d'une combinaison de méthodes de caractérisation des fromages.

- Un protocole d'acquisitions et de traitement d'images IRM (cf Article 1 : « MRI method for investigation of eye growth in Swiss-type cheese ») a été développé. Les objectifs étaient multiples : optimiser le compromis entre temps de mesure et résolution, concevoir un traitement d'images permettant d'individualiser chaque bulle, d'obtenir leurs coordonnées à chaque temps d'affinage et par conséquent leur cinétique complète de croissance. Nous souhaitons être en mesure de détecter les bulles à un stade avancé, d'où le choix d'un voxel de  $1\text{mm}^3$  et de pouvoir isoler certaines populations de bulles en les séparant via le profil de croissance ou leur localisation (par exemple ne s'intéresser qu'aux bulles du centre). Enfin, une deuxième séquence IRM a été développée pour quantifier l'espace de tête pouvant se former sur les fromages, dans le but de participer à la localisation du  $\text{CO}_2$  dans les divers compartiments potentiels du fromage.
- Une méthode d'observation de la structure des fromages à différentes échelles (cf Article 2 : « Investigation of curd grains in Swiss-type cheese using light and confocal laser scanning microscopy ») a été développée pour caractériser leur microstructure. L'objectif attendu était la visualisation de l'organisation de divers éléments de structure identifiés dans la littérature : grains de caillé, matière grasse et réseau protéique. Pour cela, une combinaison de techniques dédiées chacune à un de ces éléments a été choisie pour optimiser la précision des observations et assurer une bonne complémentarité.
- Troisième méthodologie mise en place : la caractérisation de la résistance de la pâte fromagère mise sous contrainte (cf Article 3 : « Rheological characterization of semi-hard cheese using lubricated squeezing flow test ») dans des conditions aussi proches

que possible de celles réellement subies lors d'une croissance de bulles. Dans cet objectif, la technique de Lubricated Squeezing Flow (ou LSF) a été adaptée des pâtes de farine pour être appliquée aux fromages étudiés. Les échantillons sont ainsi placés en conditions d'extension biaxiale, situation de la pâte fromagère située entre deux bulles en train de croître. Les limitations physiques des appareillages ont été investiguées dans une large gamme de vitesse d'extension de façon à pouvoir projeter les résultats vers les plus faibles vitesses, cohérentes avec la croissance de bulles. Une fois ce nouveau test maîtrisé, des indicateurs rhéologiques dédiés ont été choisis pour pouvoir comparer le comportement rhéologique de tous les échantillons étudiés dans le projet.

- Dernier aspect de caractérisation des fromages, le métabolisme bactérien et la composition des fromages ont aussi été pris en compte. Le pH, la teneur en eau, en protéine, en sel, en matière azotée et en matière grasse des fromages ont été déterminés et les métabolites principaux des PAB ont également été suivis par HPLC dans les différentes parties du fromage.

A partir de ces méthodes d'analyse, les mécanismes de croissance des bulles dans les fromages à pâte pressée non cuite ont pu être étudiés. Dans un premier temps, l'évolution de la microstructure au cours de l'affinage et selon la localisation des échantillons dans les fromages a été étudiée à différentes échelles selon la méthode développée préalablement en microscopie optique, confocale mais aussi électronique à balayage. Cette combinaison de méthodes avait pour but de prendre en compte des variations pouvant apparaître au niveau des grains de caillé, des globules gras dispersés dans le réseau protéique ou dans la porosité du réseau protéique (cf Article 4 : « Multi-scale investigation of eyes in semi-hard cheese »). Dans un deuxième temps, le comportement des bulles dans les fromages a été étudié. Ainsi, l'ensemble des caractéristiques des bulles et leur cinétique de croissance ont été décrites de façon globale et plus localement au sein de fromages industriels à pâte pressée non cuite (cf Article 5 : « Spatially-resolved characterization of eyes growing kinetic in semi-hard cheeses »). La base de données obtenue grâce à la combinaison des techniques précédentes a permis de déterminer les principaux gradients à l'œuvre dans les fromages, dans des conditions réelles de croissance de bulles. La variabilité d'un produit à l'autre s'est révélée très faible, permettant de discuter les différents profils de croissance de bulles observés au sein du batch étudié. Une première hiérarchisation des facteurs d'influence sur l'ouverture a donc pu être établie. C'est ainsi que la teneur en sel est apparue comme un paramètre

d'influence important dans les fromages étudiés. Ce facteur a fait l'objet d'une campagne expérimentale dédiée, conçue en maintenant constant les autres paramètres de composition des fromages pour assurer une décorrélation des facteurs d'influence (cf Article 6 : « Study of the influence of salt content on eye growth in semi-hard cheeses by MRI and CO<sub>2</sub> production measurements »). L'absence de sel a révélé de forts écarts d'ouvertures avec des fromages saumurés de façon standard, en particulier quant à la taille des bulles obtenue en fin d'affinage. Cette campagne a permis de discuter des modes d'action du sel, en particulier via la production et la solubilité du CO<sub>2</sub>.

Les résultats du travail tant méthodologique que mécanistique seront donc présentés via les différentes publications rédigées et soumises. Afin de ne pas alourdir la lecture nous avons choisi de rassembler dans une partie « Matériels et Méthodes » les aspects généraux qui sont détaillés dans les publications tout en apportant au lecteur des détails et des adaptations qui souvent sont difficiles à décrire dans des publications. Pour ces raisons, la partie « Matériels et Méthodes » de la thèse sera présentée à la fin du manuscrit.

## Références bibliographiques

- Accolas, J. P., Veaux, M., Vassal, L., & Mocquot, G. (1978). Development of thermophilic lactic-acid bacteria of hard cheeses during pressing. *Lait*, 58, 118-132.
- Ak, M. M., & Gunasekaran, S. (1992). Stress-Strain Curve Analysis of Cheddar Cheese under Uniaxial Compression. *Journal of Food Science*, 57, 1078-1081.
- Akkerman, J. C., Walstra, P., & Van Dick, H. J. M. (1989). Holes in dutch-type cheese. . Conditions allowing eye formation. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 43, 453-476.
- Akkerman, J. C., Fox, F. H. J., & Walstra, P. (1994). Drainage of Curd Expression of Single Curd Grains. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 48, 1-17.
- Akkerman, J. C., Buijsse, C. A. P., Schenk, J., & Walstra, P. (1996). Drainage of curd: Role of drainage equipment in relation to curd properties. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 50, 371-406.
- Auty, M. A. E., Twomey, M., Guinee, T. P., & Mulvihill, D. M. (2001). Development and application of confocal scanning laser microscopy methods for studying the distribution of fat and protein in selected dairy products. *Journal of Dairy Research*, 68, 417-427.
- Bachmann, H. P., Butikofer, U., & Meyer, J. (1999). Prediction of flavour and texture development in Swiss-type cheeses. *Food Science and Technology Lebensmittel Wissenschaft & Technologie*, 32, 284-289.
- Bachmann, H. P., Butikofer, U., & Isolini, D. (2002). Swiss-type cheese. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. (pp. 363-374). Elsevier Academic Press.
- Bennett, R.J., & Johnston, K.A. (2004). General aspects of cheese technology. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol2: Major Cheese Groups*. (pp 23-50): Elsevier Academic Press.
- Blanc, B., Ruegg, M., Baer, A., Casey, M., & Lukesch, A. (1979). Comparative tests in Emmental cheese with and without late fermentation. IV. Biochemical and physico-chemical comparison. *Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung*, 8, 27-35.
- Blonk, J. C. G., & Vanaalst, H. (1993). Confocal Scanning Light Microscopy in Food Research. *Food Research International*, 26, 297-311.
- Bosset, J. O., Pauchard, J. P., Flueckiger, E., & Blanc, B. (1980). Nouvelle methode de dosage du gaz carbonique dans les produits alimentaires et application au fromage. *Analytica Chimica Acta*, 115, 315-321.
- Bourne, M.C. (1996). A classification of objective methods for measuring texture and consistency of foods. *Journal of Food Science*, 31, 1011-1015.
- Bowland, E. L., & Foegeding, E. A. (1999). Factors determining large-strain (fracture) rheological properties of model processed cheese. *Journal of Dairy Science*, 82, 1851-1859.
- Boyaval, P., Deborde, C., Corre, C., Blanco, C., & Bégué, É. (1999). Stress and osmoprotection in propionibacteria. *Lait*, 79, 59-69.
- Brandsma, R. L., & Rizvi, S. S. H. (2001). Effect of manufacturing treatments on the rheological character of Mozzarella cheese made from microfiltration retentate depleted of whey proteins. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 601-610.
- Brickley, C. A., Auty, M. A. E., Piraino, P., & McSweeney, P. L. H. (2007). The effect of natural cheddar cheese ripening on the functional and textural properties of the processed cheese manufactured therefrom. *Journal of Food Science*, 72, C483-C490.
- Britz, T.J., Steyn, P.L. (1980). Comparative studies on propionic acid bacteria. *Phytophylactica*, 12, 89-103.

- Brown, J. A. (2002). *Cheese Texture*. Graduate Faculty of North Carolina State University, Raleigh.
- Casiraghi, E. M., Bagley, E. B., & Christianson, D. D. (1985). Behavior of Mozzarella, Cheddar and processed cheese spread in lubricated and bonded uniaxial compression. *Journal of Texture Studies*, 16, 281-301.
- Caccamo, M., Melilli, C., Barbano, D. M., Portelli, G., Marino, G., & Licitra, G. (2004). Measurement of Gas Holes and Mechanical Openness in Cheese by Image Analysis. *Journal of Dairy Science*, 87, 739-748.
- Carcano, M., Todesco, R., Lodi, R., & Brasca, M. (1995). Propionibacteria in Italian hard cheeses. *Lait*, 75, 415-426.
- Chamba, J.-F., & Perreard, É. (2002). Contribution of propionic acid bacteria to lipolysis of Emmental cheese. *Lait*, 82, 33-44.
- Clark, W. M. (1917). On the Formation of "Eyes" in Emmental Cheese. *Journal of Dairy Science*, 1, 91-113.
- Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., & Wilkinson, M.G. (2004). Lypolysis and Catabolism of Fatty Acids in Cheese. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol.1 *General Aspects*. (pp373-389): Elsevier Academic Press.
- Conde, T., Mulet, A., Clemente, G., & Benedito, J. (2008). Detection of Internal Cracks in Manchego Cheese Using the Acoustic Impulse-Response Technique and Ultrasounds. *Journal of Dairy Science*, 91, 918-927.
- Creamer, L. K., & Olson, N. F. (1982). Rheological Evaluation of Maturing Cheddar Cheese. *Journal of Food Science*, 47, 631-636.
- Crow, V.L., & Turner, K.W. (1986). The effect of succinate production on other fermentation products in Swiss-type cheese. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 21, 217-227.
- Culioli, J., & Sherman, P. (1976). Evaluation of Gouda cheese firmness by compression tests. *Journal of Texture Studies*, 7, 353-372.
- Daly, D. F. M., McSweeney, P. L. H., & Sheehan, J. J. (2010). Split defect and secondary fermentation in Swiss-type cheeses - A review. *Dairy Science & Technology*, 90, 3-26.
- De Freitas, I., Pinon, N., Lopez, C., Thierry, A., Maubois, J. L., & Lortal, S. (2005). Microstructure, physicochemistry, microbial populations and aroma compounds of ripened Cantal cheeses. *Lait*, 85, 453-468.
- Dimitreli, G., & Thomareis, A. S. (2008). Effect of chemical composition on the linear viscoelastic properties of spreadable-type processed cheese. *Journal of Food Engineering*, 84, 368-374.
- Eberhard. (1985). *Rheologische Eigenschaften ausgewählter Käsesorten* ETH Zurich, Zurich.
- Engmann, J., Servais, C., & Burbidge, A. S. (2005). Squeeze flow theory and applications to rheometry: A review. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 132, 1-27.
- Eskelinen, J. J., Alavuotunki, A. P., Hæggström, E., & Alatossava, T. (2007). Preliminary Study of Ultrasonic Structural Quality Control of Swiss-Type Cheese. *Journal of Dairy Science*, 90, 4071-4077.
- Estellé, P., Michon, C., Lanos, C., & Grossiord, J.L. (2001). De l'intérêt d'une caractérisation rhéologique empirique et relative. *Rhéologie*, 21, 10-35.
- Everett, D. W., & Auty, M. A. E. (2008). Cheese structure and current methods of analysis. *International Dairy Journal*, 18, 759-773.
- Famelart, M. H., Le Graet, Y., Michel, F., Richoux, R., & Riaublanc, A. (2002). Evaluation of the methods of measurement for functional properties of Emmental cheeses from the west of France. *Lait*, 82, 225-245.
- Fava, P., & Piergionvanni, L. (1992). Carbon dioxide solubility in foods packaged with modified atmosphere II: Correlation with some chemical-physical characteristics and composition. *Industria Alimentari*, 31, 424-430.

- Fedio, W. M., Ozimek, L., & Wolfe, F. H. (1994). Gas-production during the storage of Swiss-cheese. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, 49, 3-8.
- Fenelon, M. A., OConnor, P., & Guinee, T. P. (2000). The effect of fat content on the microbiology and proteolysis in cheddar cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*, 83, 2173-2183.
- Floury, J., Camier, B., Rousseau, F., Lopez, C., Tissier, J.-P., & 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 Science and Technology*, 42, 1611-1620.
- Fluckiger, E. (1980). Formation of CO<sub>2</sub> and eyes in Emmental cheese. *Schweizerische Milchzeitung*, 106, 473-474; 479-480.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., & McSweeney, P.L.H. (2000). *Fundamentals of Cheese Science*. Aspen Publishers.
- Fröhlich-Wyder, M.-T., Guggisberg, D., Badertscher, R., Wechsler, D., Wittwer, A., & Irmeler, S. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus parabuchneri* on the eye formation of semi-hard cheese. *International Dairy Journal*.
- Frohlich-Wyder, M. T., Bachmann, H. P., & Casey, M. G. (2002). Interaction between propionibacteria and starter/non-starter lactic acid bacteria in Swiss-type cheeses. *Lait*, 82, 1-15.
- Fröhlich-Wyder, M.T., & Bachmann, H.P. (2004). Cheese with Propionic Acid Fermentation. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol.2 Major Cheese Groups. (pp 141-156).
- Girard, F., & Boyaval, P. (1994). Carbon dioxide measurement in Swiss-type cheeses by coupling extraction and gas chromatography. *Lait*, 74, 389-398.
- Grappin, R., Lefier, D., Dasen, A., & Pochet, S. (1993). Characterizing ripening of Gruyere de Comte: influence of time \* temperature and salting conditions on eye and slit formation. In (Vol. 3, pp. 313-328).
- Guggisberg, D., Fröhlich-Wyder, M.T., Irmeler, F., Greco, M., Wechsler D., & Schuetz P. (2013). Eye formation in semi-hard cheese: X-ray computed tomography as a non-invasive tool for assessing the influence of adjunct lactic acid bacteria. *Dairy Science & Technology*, 93, 135-149.
- Guinee, T.P. (1986). Transport of Sodium Chloride and Water in Romano Cheese Slices During Brining. *Food Chemistry*, 19, 49-64.
- Guinee, T.P. (2002). Cheese Rheology. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (pp 341-349). Elsevier Academic Press
- Guinee, T. P. (2004). Salting and the role of salt in cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 99-109.
- Guinee, T. P., & Fox, P. F. (2004). Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. In P. L. H. M. T. M. C. Patrick F. Fox & P. G. Timothy (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (Vol. Volume 1, pp. 207-259): Academic Press.
- Hettinga, D.H., & Reinbold, G.W. (1972a). The propionibacteria a review. *Journal of Milk Food Technology*, 35(6), 436-437.
- Hettinga, D.H., & Reinbold, G.W. (1972b). The propionibacteria a review. *Journal of Milk Food Technology*, 35(6), 358-372.
- Hollywood, N. W., & Doelle, H. W. (1984). The effect of sampling position and age on levels of propionibacteria and flavor-related compounds in Swiss-type cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 39, 80-82.
- Holt, C. (2004). An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein micelles and its application to the calculation of the partition of salts in milk. *European Biophysics Journal*, 34, 33-421.

- Horne, D. S. (2006). Casein micelle structure: Models and muddles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11, 148-153.
- Hort, J., Grys, G., & Woodman, J. (1997). The relationships between the chemical, rheological and textural properties of Cheddar cheese. *Lait*, 77, 587-600.
- Hussain, I., Grandison, A. S., & Bell, A. E. (2012). Effects of gelation temperature on Mozzarella-type curd made from buffalo and cows' milk. 1: Rheology and microstructure. *Food Chemistry*, 134, 1500-1508.
- ITFF-ITG. (1985). Influence de l'augmentation du gras-sur-sec sur le rendement et la qualité de l'emmental. Etude ZS 1985/ZS/11/B.
- ITFF-ITG. (1984). Synthèse actuelle des connaissances sur l'affinage. Etude SS/1984/07.08/C.
- ITFF-ITG. (1984). Les origines du CO<sub>2</sub>. Etude SS/1984/5/C.
- Jakobsen, M., Jensen, P. N., & Risbo, J. (2009). Assessment of carbon dioxide solubility coefficients for semihard cheeses: the effect of temperature and fat content. *European Food Research and Technology*, 229, 287-294.
- Jaros, D., Ginzinger, W., Tschager, E., Mayer, H. K., & Rohm, H. (1997). Effets of water addition on composition and fracture properties of emmental cheese. *Lait*, 77, 467-471.
- Jimeno, J., Lazaro, M., J., & Sollberger, H. (1995). Antagonistic interactions between propionic acid bacteria and non-starter lactic acid bacteria. *Lait*, 75, 401-413.
- Juan, B., Trujillo, A. J., Guamis, V., Buffa, M., & Ferragut, V. (2007). Rheological, textural and sensory characteristics of high-pressure treated semi-hard ewes' milk cheese. *International Dairy Journal*, 17, 248-254.
- Kalab, M. (1979). Microstructure of Dairy Foods. 1. Milk Products Based on Protein. *Journal of Dairy Science*, 62, 1352-1364.
- Kalab, M., Lowrie, R. J., & Nichols, D. (1982). Detection of Curd Granule and Milled Curd Junctions in Cheddar Cheese. *Journal of Dairy Science*, 65, 1117-1121.
- Kerjean, J.R., Condon, S., Lodi, R., Kalantzopoulos, G., Chamba, J.F., Suomalainen, T., Cogan, T., & Moreau, D. (2000). Improving the quality of European hard-cheeses by controlling of interactions between lactic acid bacteria and propionibacteria. *Food Research International*, 33, 281-287.
- Kloosterman, J. (1993). The role of biotechnology in the manufacturing of wholesome natural ripened cheese. *Food Biotechnology*, Special Issue *Proceedings of the Symposium on Biotechnology for the Safe and Wholesome Foods*. 207-215
- Kraggerud, H., Wold, J.P., Hoy, M., Abrahamsen, R.K. (2009). X-rays images for the control of eye formation in cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 62, 147-153.
- Launay, B., & Michon, C. (2008). Biaxial extension of wheat flour doughs: lubricated squeezing flow and stress relaxation properties. *Journal of Texture Studies*, 39, 496-529.
- Lawrence, R. C., Creamer, L. K., & Gilles, J. (1987). Symposium : cheese ripening technology : texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 70, 1748-1760.
- Lee, K., Uegaki, K., Nishii, C., Nakamura, T., Kubota, A., Hirai, T., & Yamada, K. (2012). Computed tomographic evaluation of gas hole formation and structural quality in Gouda-type cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 65, 232-236.
- Lopez, C., Bourgaux, C., Lesieur, P., Riaublanc, A., & Ollivon, M. (2006). Milk fat and its primary fractions obtained by dry fractionation: Stearine and Olein. 1. Chemical composition and crystallisation properties. *Chemistry and Physics of Lipids*, 144, 17-33.

- Lopez, C., & Briard-Bion, V. (2007). The composition, supramolecular organisation and thermal properties of milk fat: a new challenge for the quality of food products. *Lait*, 87, 317-336.
- Lopez, C., Camier, B., & Gassi, J. Y. (2007). Development of the milk fat microstructure during the manufacture and ripening of Emmental cheese observed by confocal laser scanning microscopy. *International Dairy Journal*, 17, 235-247.
- Lowrie, R. J., Kalab, M., & Nichols, D. (1982). Curd granule and milled curd junction patterns in Cheddar cheese made by traditional and mechanized processes. *Journal of Dairy Science*, 65, 1122-1129.
- Lucey, J. A., Johnson, M. E., & Horne, D. S. (2003). Invited review: Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *Journal of Dairy Science*, 86, 2725-2743.
- Luyten, H. (1988). *The rheological and fracture properties of Gouda cheese*. Luyten, Wageningen.
- Luyten, H., & vanVliet, T. (1996). Effect of maturation on large deformation and fracture properties of (semi-)hard cheeses. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 50, 295-307.
- Marchesseau, S., Gastaldi, E., Lagaude, A., & Cuq, J. L. (1997). influence of pH on protein interactions and microstructure of process cheese. *Journal of Dairy Science*, 80, 1483-1489.
- Mariette, F. (2011). Nuclear Magnetic Resonance: Principles. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*. San Diego, USA: Academic Press, p. 153-168
- Martley, F. G., & Crow, V. L. (1993). Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. *International Dairy Journal*, 3, 461-483.
- Martley, F. G., & Crow, V. L. (1996). Open texture in cheese: The contributions of gas production by microorganisms and cheese manufacturing practices. *Journal of Dairy Research*, 63, 489-507.
- Michalski, M.-C., Camier, B., Briard, V., Leconte, N., Gassi, J.-Y., Goudédranche, H., Michel, F., & Fauquant, J. (2004). The size of native milk fat globules affects physico-chemical and functional properties of Emmental cheese. *Lait*, 84, 343-358.
- Mocquot, G. (1979). Swiss-type cheese. *Journal of Dairy Research*, 46, 133-160.
- Morris, H.A., Guine, T.P., Fox, P.F. (1985). Salt diffusion in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 68, 1851-1858.
- Nassar, G., Lefbvre, F., Skaf, A., Carlier, J., Nongillard, B., & Noël, Y. (2010). Ultrasonic and acoustic investigation of cheese matrix at the beginning and the end of ripening period. *Journal of Food Engineering*, 96, 1-13.
- Noel, Y., Boyaval, P., Thierry, A., Gagnaire, V., & Grappin, R. (1999). Eye formation and Swiss-type cheeses. *Technology of Cheesemaking, Sheffield Academic Press, Sheffield, UK*, 222-250.
- Noël Y., Achilleos, C. & Aliste, M.A. (1996) Application of stress relaxation to study openness of har cheese. *Bull. Int. Dairy Fed.* 317, 50.
- Notz, E., Noël, Y., Bérodiér, A., & Grappin, R. (1988). Influence of fat on texture and color of Comté cheese. Poster presented at the 25<sup>th</sup> International Dairy Congress, Aarhus, Denmark (1988).
- Notz, E. (1996). Ripening of scalded-curd cheeses. The key to control of a complex ecosystem. *Process (Rennes)*, 48-49.
- O'Callaghan, D. J., & Guinee, T. P. (2004). Rheology and Texture of Cheese. In P. L. H. M. T. M. C. Patrick F. Fox & P. G. Timothy (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (Vol. Volume 1, pp. 511-540): Academic Press.
- Ong, L., Dagastine, R. R., Kentish, S. E., & Gras, S. L. (2011). Microstructure of milk gel and cheese curd observed using cryo scanning electron microscopy and confocal microscopy. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1291-1302.



- Park, H. S., Reinbold, G. W., & Hammond, E. G. (1967). Role of propionibacteria in split defect of Swiss cheese. *J Dairy Sci*, 50, 820-823.
- Pastorino, A. J., Hansen, C. L., & McMahon, D. J. (2003). Effect of pH on the chemical composition and structure-function relationships of cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 86, 2751-2760.
- Pauchard, J. P., Fluckiger, E., Bosset, J. O., & Blanc, B. (1980). CO<sub>2</sub> solubility, concentration and distribution in relation to eye formation in Emmental cheese. *Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung*, 9, 69-73.
- Pesenti, V., & Luginbuhl, W. (1999). Assessment of cohesion in Gruyere-type cheese by rheological methods. *Journal of Texture Studies*, 30, 1-16.
- Prentice, J.H. (1987). Chees Rheology. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol.1 *General Aspects*. (pp299-344). Elsevier Applied Science.
- Prentice, J., Langley, K., & Marshall, R. (1993). Cheese rheology. In *Cheese: chemistry, physics and microbiology* (pp. 303-340): Springer.
- Rage, A. (1993). Norwegian cheese varieties. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol2: Major Cheese Groups*. (pp 257-260). Chapman & Hall.
- Reinbold, G. W., Hussong, B. V., & Stine, J. B. (1958). Distribution of Propionibacteria in Swiss Cheese. *Journal of Dairy Science*, 41, 606-610.
- Riberolles, A. (1996). Modélisation de l'ouverture des fromages à pâte pressée. Rapport ITG Intermédiaire Phase I et II.
- Richoux, R., & Kerjean, J. R. (1995). Technological properties of pure propionibacteria strains - Test in small-scale Swiss-type cheese. *Lait*, 75, 45-59.
- Richoux, R., Faivre, E., & Kerjean, J. R. (1998). Effect of NaCl content on lactate fermentation by Propionibacterium freudenreichii in small scale Swiss-type cheeses. *Lait*, 78, 319-331.
- Richoux, R. (2005). Livret PAL®. Bactéries Laitières propioniques, Standa Industrie.
- Rogers, N. R., McMahon, D. J., Daubert, C. R., Berry, T. K., & Foegeding, E. A. (2010). Rheological properties and microstructure of Cheddar cheese made with different fat contents. *Journal of Dairy Science*, 93, 4565-4576.
- Rohm, H., & Lederer, H. (1992). Uniaxial compression of Swiss-type cheese at different strain rates. *International Dairy Journal*, 2, 331-343.
- Rosenberg, M., McCarthy, M. J., & Kauten, R. (1991). Magnetic Resonance Imaging of Cheese Structure. *Food Structure*, 10, 185-192.
- Rosenberg, M., McCarthy, M. J., & Kauten, R. (1992). Evaluation of eye formation and structural quality of swiss type cheese by MRI. *Journal of Dairy Science*, 75, 2083-2091.
- Rousseau, M., & Legallo, C. (1990). Scanning electron-microscopic study of the structure of Emmentaler cheese during manufacture. *Lait*, 70, 55-66.
- Ruegg, M., & Moor, U. (1987). The size distribution and shape of curd granules in traditional Swiss hard and semi hard cheeses. *Food Microstructure*, 6, 35-46.
- Saurel, R., Pajonk, A., & Andrieu, J. (2004). Modelling of French Emmental cheese water activity during salting and ripening periods. *Journal of Food Engineering*, 63, 163-170.
- Schneider, S. A., Hammond, E. G., Reinbold, G. W., & Vedamuthu, E. R. (1970). One-Sided Defect of Swiss Cheese. *Journal of Dairy Science*, 53, 30-37.
- Schmidt, D.G., & Payens, T.A.J. (1972). Evaluation of positive and negative contributions to the second virial coefficient of some milk proteins. *Journal of Colloid and Interface Science*, 39, 655-662.
- Schmidt, D.G. (1982). Association of caseins and casein micelle structure. In *Developments in Dairy Chemistry, Vol.1 Proteins*. (pp 61-82): Applied Science Publishers.

- Schuetz, P., Guggisberg, D., Jerjen, I., Fröhlich-Wyder, M. T., Hofmann, J., Wechsler, D., Flisch, A., Bisig, W., Sennhauser, U., & Bachmann, H. P. (2013). Quantitative comparison of the eye formation in cheese using radiography and computed tomography data. *International Dairy Journal*, *31*, 150-155.
- Seuvre, A. M., & Mathlouthi, M. (1982). Contribution to the study of gas-release during the maturation of a French Emmental cheese. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, *15*, 258-262.
- Sherman, P. (1969). A texture profile of foodstuffs based upon well-defined rheological properties. *Journal of Food Science*, *43*, 458-462.
- Slaterry, C.W., & Evard, R. (1973). A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition. *Biochimica et Biophysica Acta*, *317*, 529-538.
- Stadhouders, J.J., & Hup, G., NIZO: personal communications.
- Steffen, C., & Rentsch, F. (1974). Temperature conditions and course of lactic acid fermentation in Sbrinz cheese. *Schweizerische Milchzeitung*, *100*, 357-358.
- Steffen, C., Eberhard, C., Bosset, J.O., & Rüeegg, M. (1993). Swiss-type varieties. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology Vol. 2 Major Cheese Groups* (pp. 83-110): Springer.
- Sutheerawattananonda, M., Fulcher, R. G., Martin, F. B., & Bastian, E. D. (1997). Fluorescence image analysis of process cheese manufactured with trisodium citrate and sodium chloride. *Journal of Dairy Science*, *80*, 620-627.
- Suwonsichon, T., & Peleg, M. (1999). Rheological characterization of ricotta cheeses by imperfect squeezing flow viscometry. *Journal of Texture Studies*, *30*, 89-103.
- Thierry, A., Salvat-Brunaud, D., Madec, M. N., Michel, F., & Maubois, J. L. (1998). Swiss cheese ripening: dynamics of bacterial populations and evolution of the aqueous phase composition for three industrial cheeses. *Lait*, *78*, 521-542.
- Thierry, A., Berthier, F., Gagnaire, V., Kerjean, J. R., Lopez, C., & Noël, Y. (2010). Eye Formation and Swiss-Type Cheeses. In *Technology of Cheesemaking* (pp. 360-383): Wiley-Blackwell.
- Tunick, M.H. (2000). Rheology of Dairy Foods that Gel, Stretch, and Fracture. Symposium: Dairy Products Rheology. *Journal of Dairy Science*, *83*, 1892- 1898.
- Upadhyay, V.K., McSweeney, P.L.H., Magboul, A.A.A, & Fox, P.F. (2004). Proteolysis in Cheese during Ripening. In *Cheese; Chemistry, Physics and Microbiology, Vol.1 General Aspects*. (pp391-433): Elsevier Academic Press.
- Visser, J. (1991). Factors affecting the rheological and fracture properties of hard and semi-hard cheese. *Federation Internationale de Laiterie; International Dairy Federation*.
- Vivier, D., Compan, D., Moulin, G., & Galzy, P. (1996). Study of carbon dioxide release from Feta cheese. *Food Research International*, *29*, 169-174.
- Walstra, P. (1991). Rheological foundation of eye or slit formation *Bulletin - FIL-IDF, n°268*, p 65-66.
- Walstra, P. (1999). Casein micelles: do they exist ? *International Dairy Journal*, *9*, 189-192.
- White, S.R., Broadbent, J.R., Oberg, C.J., McMahan, D.J. (2003). Effect of *Lactobacillus helveticus* and *Propionibacterium freudenrichii* ssp. *shermanii*. Combinations on Propensity for Split Defect in Swiss Cheese. *Journal of Dairy Science*, *86*, 719-727.
- Yagi, H., & Yoshida, F. (1977). Desorption of CO<sub>2</sub> from fermentation broth. *Biotechnology Bioengineering*, *19*, 801.



# **Chapitre II - Résultats**

## 2.1 Méthode de suivi de la croissance de bulles par IRM (A1)

Ce premier article a fait l'objet d'une soumission auprès de *Journal of Food Engineering* en Avril 2013, accepté en Juin 2013 sous réserve de modifications et renvoyé à *Journal of Food Engineering* en Juillet 2013.

### **MRI method for investigation of eye growth in Swiss-type cheese**

#### **Authors:**

M. Musse<sup>ab</sup>, S. Challos<sup>ab</sup>, D. Huc<sup>abcde</sup>, S. Quellec<sup>ab</sup>, F. Mariette<sup>ab\*</sup>

(a) IRSTEA, UR TERE, 17 Avenue de Cucillé, CS 64427, F-35044 Rennes, France

(b) Université Européenne de Bretagne, France

(c) AgroParisTech, UMR 1145 Ingénierie Procédés Aliments, F-91300 Massy, France

(d) INRA, UMR 1145 Ingénierie Procédés Aliments, F-91300 Massy, France

(e) CNAM, UMR 1145 Ingénierie Procédés Aliments, F-75003 Paris, France

#### **Abstract**

A non-destructive 3D MRI method combined with an image processing algorithm for characterization of individual eyes in Swiss-type cheeses is proposed. The impact of MRI acquisition parameters allowing shortening of measurement time was analyzed to determine the optimal protocol providing accurate estimation of eye volume. The MRI imaging protocol was validated by comparison with  $\mu$ CT measurements. The method was applied to study eye development and growth in cheese during ripening. It was successfully used to evaluate number, volume and spatial distribution of eyes. Investigation of individual eye characteristics during ripening allowed differentiation of eye behavior. The MRI method made it possible to highlight the effects of the spatial heterogeneity of the cheese on eye growth rate. The principal application of this method would be for research and development purposes.

**Key words:** MRI; cheese; image processing; eye growth

## 1. Introduction

Semi-hard cheeses are characterized by their eyes, and they are a very important quality parameter in terms of their number, size and shape. Evaluation of these factors is generally performed by listening to the sound made while tapping the cheese surface combined with examination after cutting the cheese (Kraggerud et al., 2009). However, this approach does not provide overall information about the product as it is limited to the section of the cheese analyzed. Moreover, the method is destructive, which means that repeated measurements cannot be carried out on the same individual products at consecutive times, thus making investigation of the kinetics of cheese parameters difficult.

Different imaging techniques can be applied in order to observe the distribution of eyes in semi-hard and hard cheese pastes in a non-destructive way. Studies involving conventional on-line X-ray and ultrasound techniques have been used as a quality control to measure global structural changes by detecting holes, without separation of individual eyes. Kraggerud et al. (2009) used an X-ray instrument to monitor eye formation in semi-hard cheese during ripening. Eskelinen et al. (2007) proposed a method for quality control of Swiss-type cheeses that used ultrasound, and recommended improvements in resolution and sensitivity before any scale-up applications could be considered. Nassar et al. (2010) and Conde et al. (2008) applied ultrasound to the study of cheese texture, viscoelastic properties and crack detection, but it is difficult to use this technique for mature cheeses with many eyes. The conventional techniques described above are useful for quality control purposes but cannot be applied for investigation of mechanisms involved in eye formation and growth. For such an approach it is important to characterize individual eyes in terms of position and the kinetics of eye parameters.

Advanced non-destructive imaging techniques providing three-dimensional (3D) images, such as X-ray computed tomography (CT) and Magnetic Resonance Imaging (MRI), have been used to study the internal structure of various food products (Lim and Barigou, 2004; Mariette et al., 2012). For example,  $\mu$ CT was used to evaluate the structural properties of coffee beans (Pittia et al., 2011) and to quantify pore space in apple tissues (Mendoza et al., 2007) and MRI was used to estimate bubble size in alveolar products such as bread dough during proving (De Guio et al., 2009). Lee et al. (2012) used CT to measure volume, shape and location of eyes during ripening to evaluate structural quality in Gouda-type cheeses under different ripening conditions. CT was also used by Guggisberg et al. (2013) to investigate the influence of different cultures on eye number, relative eye volume and the size distribution in semi-hard cheese. The structure of Swiss-type cheeses was first studied using MRI by Rosenberg et al. (1992). They demonstrated the potential use of this technique for monitoring eye formation and development during ripening and for identification of structural defects. In their study, the qualitative aspects were considered via two-dimensional (2D) images. In addition to the structure parameters, MRI technique can provide access to information about the chemical composition and

microstructure of the paste (Mariette et al., 2012) that necessitates comprehensive explanation of the mechanisms involved in changes in the MRI signal. For example, Ruan et al (Ruan et al., 1998) used MRI to measure water and fat content distribution in cheddar cheese blocks.

The aim of the study presented here was to develop a non-invasive 3D MRI method to monitor individual eye growth in semi-hard cheeses during ripening for research and development purposes. An image processing method was developed in order to evaluate changes in the characteristics of openings such as eye number, volume and spatial distribution. Separation of overlapping eyes and individual eye labeling without any prior assumption of eye shape were the important features of this method. The MRI protocol was optimized by evaluating the impact of acquisition parameters on estimation of eye volume and validated by comparison with  $\mu$ CT measurements.  $\mu$ CT was considered as the reference method, because of the high spatial resolution of the images. Furthermore,  $\mu$ CT is not sensitive to air-water interfaces as MRI can be because of the magnetic susceptibility effects. Finally, as both techniques are non-destructive, phenomena such as gas emission and mismatching of the examined planes associated with cheese cutting (Lee et al., 2012) were avoided and comparison between the same eyes was ensured. The method was finally tested on semi-hard cheeses studied during ripening. Global parameters such as cheese porosity and eye number were calculated and individual eye growth kinetics were obtained for each opening in the cheeses.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1 Cheeses*

The products studied were commercial semi-hard cheeses (fat/dry 47%, water content 42%) packed in plastic film. Industrial blocks of around 12 kg (24cm x 48cm x 7cm at the beginning of the experiment) were used in all experiments except for the test performed by both MRI and  $\mu$ CT. Due to the limitation of the  $\mu$ CT instrument, these experiments were performed on smaller parallelepiped cheeses of around 1 kg produced for this purpose.

Industrial cheese blocks were stored in a cold room under controlled conditions (12° C) for 11 days and then transferred to a hot room (20° C). The MRI imaging sequence was optimized by performing the first measurements a day after the cold-hot room transfer and then one week later, making it possible to analyze a wide range of eye sizes. In the application experiment, the MRI measurements were started four days after transfer (D-4) and repeated 3 times within a period of about 2 weeks on days D-7, D-12, and D-15.

### *2.2 MRI measurements*

MRI measurements were carried out using a 1.5 T scanner (Magnetom Avanto, Siemens, Erlangen, Germany) equipped with a combination of 6-element spine and body matrix receiver coils and a 4-channel head receiver coil for large and small cheeses, respectively.

In the application experiment, the cheese was carefully marked before the first test in order to ensure placement in the same position for subsequent experiments during the ripening process. The temperature of the thermally insulated Faraday cage was set at hot room temperature (20° C) and monitored throughout measurement (deviation was less than 1° C).

All MR images were acquired using a 3-dimensional (3D) Fast Spin Echo (FSE) sequence. In an FSE sequence multiple echoes are created following a single excitation pulse. Each echo is a spin echo refocused by a 180° pulse and distinctly encoded with a phase-encoding gradient. Thus multiple k-space lines are sampled following each excitation pulse. The number of echoes that follows an excitation pulse, i. e. echo train length (ETL), defines acceleration of image acquisition. For FSE sequences, a compromise has to be made between the gain in speed and the appearance of ringing and blurring artifacts caused by discontinuous T<sub>2</sub> weighting of k-space data.

The aim of this phase of the study was to determine the most accurate volume estimation for the minimum acquisition time from the 1x1x1 mm<sup>3</sup>-resolution 3D MRI image. The echo train length was first optimized by comparing eye volumes computed from the images acquired with ETL of 4, 6 and 8 to the volumes computed from the reference image acquired with an ETL of 2. The images were obtained with a time of repetition (TR) of 400 ms, bandwidth (BW) of 296 Hz/pixel, TE of 8.7 ms and 1 average. The field of view (FOV) was fixed at 256x136 mm<sup>2</sup> and the matrix size at 256x136. The effects of the voxel interpolation used for shortening the acquisition time were then evaluated by comparing eye volumes computed from the image acquired without any interpolation to the volumes computed from the image with 56% interpolation in the slice direction. ETL was set at 2. No attempt was made to discriminate between fat and water signal components.

### *2.3 $\mu$ CT measurements*

$\mu$ CT experiments were performed on six small parallelepiped cheeses also examined by MRI. The MRI experiments were performed before and after  $\mu$ CT measurements in order to exclude any inaccuracy due to cheese deformation that could occur during the three-day experiment and transportation.  $\mu$ CT measurements were carried out on a  $\mu$ CT system (Phoenix, V Tome X 240, General Electric, Wunstorf, Germany) operating at 120 kV and 83  $\mu$ A. The tomography reconstruction was performed using the Datos Xrec Software (Phoenix Xray). A stack of 600 2-D cross sections separated by 0.18 mm was used for reconstruction of the full 3-D structure with a pixel resolution of 0.18<sup>2</sup> mm<sup>2</sup>.



## 2.4 Image processing

An algorithm to estimate eye volume and their spatial distribution was developed in the Scilab environment (<http://www.scilab.org>). The main challenge in this study was to distinguish overlapping eyes without any prior assumption of the eye shape. The algorithm was developed and evaluated on artificial cheese images and then applied to 3D MRI images of cheese.

### 2.4.1 Algorithm

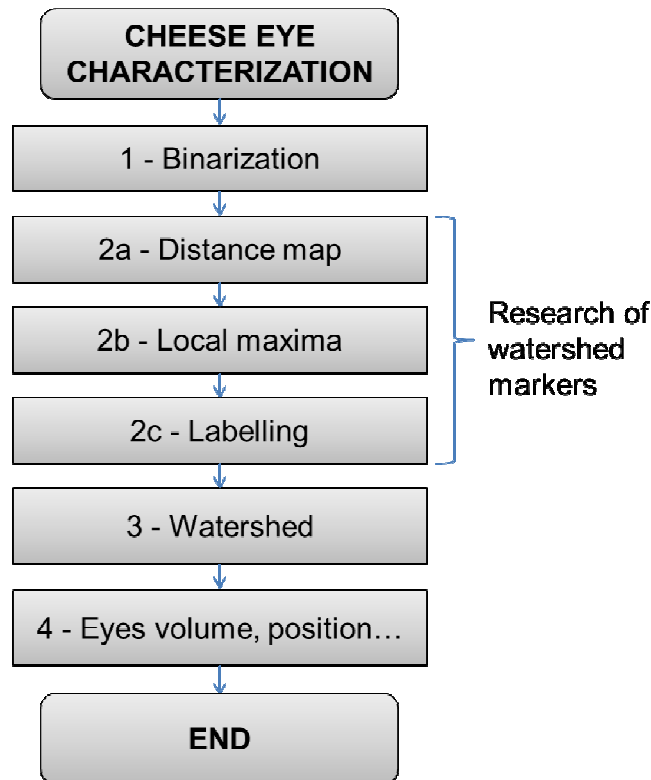


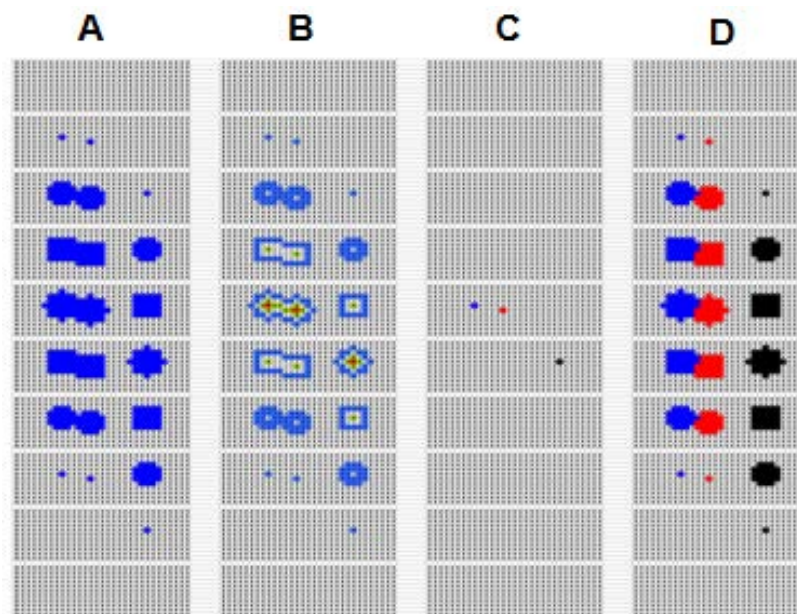
Fig. 1: Flow chart of the algorithm

The flowchart shown in Fig. 1 describes the algorithm steps for eye volume and distribution estimation. The first step consisted of the binarization (Fig. 1 - 1) of the gray scaled 3D images using the Otsu algorithm (Otsu, 1979). Voxels corresponding to the cheese paste were set at 1 and those corresponding to the background and eye at 0. The binary images were used for subsequent processing.

The algorithm consisted then of the separation of overlapping eyes. This was based on the watershed principle assuming that a gray scaled 2D image can be seen as a topographic surface where gray levels stand for the altitude. Catchment basins appeared after flooding this surface from the minimum altitudes, and preventing them merging together made it possible to draw watershed lines. This principle was extended to 3D images using watershed surface (lines in 2D) as artificial boundaries between cheese eyes. In order to prevent over-segmentation (creation of more openings

than in reality) due to signal noise in images, and because the boundaries between openings were not always visible, it was decided to use a marker-controlled watershed method (Beucher and Meyer, 1992) that starts the flooding process from a chosen set of voxels. The choice of the markers was crucial for the accuracy of the watershed segmentation. The targeted markers needed to be unique for each cheese opening, even when the openings were concatenated without visible boundaries. Prior to the choice of the markers, cheese eyes, considered as objects of interest, were set at 1, while background and cheese paste were set at 0. The choice of the markers began with the construction of a 3D distance map (Fig. 1 – 2a), that corresponded to a 3D image where the value of each voxel was the distance to the nearest boundary voxel, according to the algorithm described by Rosenfeld et al. (Rosenfeld and Pfaltz, 1966). The highest distance values were located with certainty in the center of the largest cheese eyes. In order to find the center of all cheese eyes independently of their size, local maxima (Fig. 1 – 2b) were computed on the distance map by finding voxels that had the maximum label value in the local neighborhood. This number of neighboring voxels was optimized for MRI images of cheese, see next paragraph. The markers labeled (Fig. 1 – 2c) with a single value were then used for the watershed segmentation (Fig. 1- 3). Finally, volume and position of separated and labeled cheese eyes were computed (Fig.1-4).

An example of the application of consecutive algorithm steps on an artificial image is depicted in Fig. 2.



**Fig. 2: Artificial images describing image processing method: binary image (A); distance map (B); labeled local maxima (C) and results of watershed segmentation (D). Different colors (see the web version of the article) correspond to distance (B) and individual objects (C and D). A, B, C and D result from the application of the algorithm steps depicted in Fig. 1-1, Fig. 1-2a, Fig. 1-2 b and c and Fig. 1-3, respectively.**

### 2.4.2 Parameter optimization

The choice of neighborhood parameters used for segmentation of the openings was important for the distance map computing (Fig. 1 – 2a), local maxima computing (Fig. 1 – 2b) and labeling (Fig. 1 – 2c) and watershed transform functions (Fig. 1 – 3). For each step, these parameters were chosen in order to limit over-segmentation. Considering three possible values of the 3D neighborhood (6, 18 or 26 voxels) applied in four different functions used for eye segmentation, there were 81 different sets of parameters. The 81 parameter sets were reduced to 10 sets by considering logical interactions between the four functions (i.e. the local maxima neighborhood should be higher or equal to the distance map neighborhood and the watershed neighborhood should be equal to local maxima neighborhood).

The algorithm allows detection of eyes above  $1\text{mm}^3$ . However, in order to exclude cracks from the analysis, eyes that did not reach at least  $50\text{mm}^3$  at the final ripening stage were not considered.

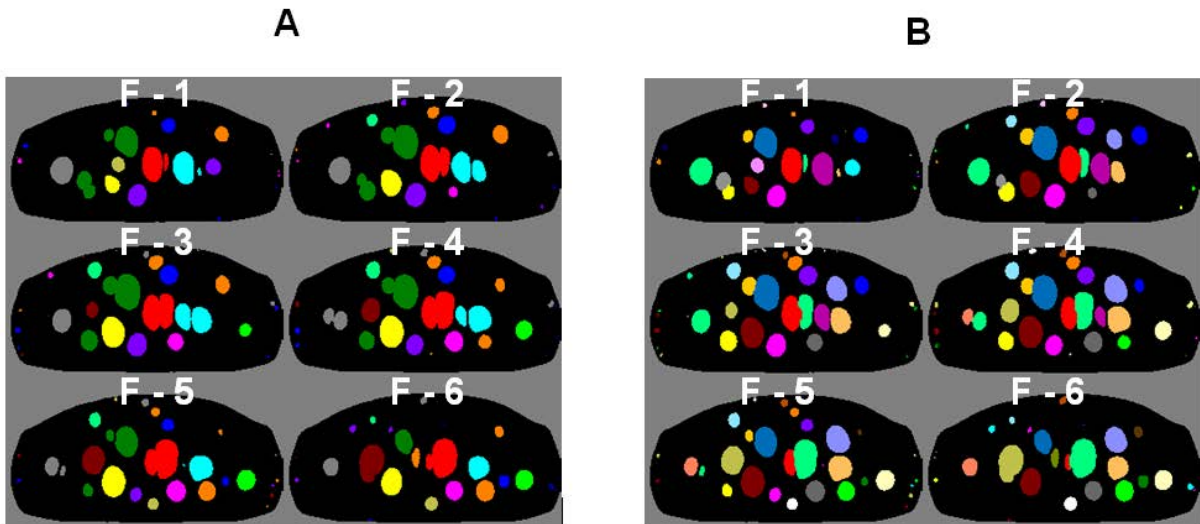
## 3. Results and Discussion

### 3.1 Application of the algorithm on MRI cheese images

The algorithm with different parameter sets was tested on several cheeses at different maturation stages and the results of the segmentation were compared. 3D distance map neighborhood was set at the minimum value 6, and neighborhood of other parameterizable functions (Fig. 1 - 2b, 2c and 3) were set at 26. The retained set was a compromise between minimization of the number of over-segmentations and maximization of the under-segmentations.

Since the major cause of the remaining over-segmentation was due the presence of small markers situated on the frontier between two connected openings, the watershed segmentation was first computed without size 1 markers. Segmentation was then performed with the small markers previously not included and not connected to eyes found by the first watershed segmentation. The number of remaining over-segmentations was significantly reduced using this approach.

The results of the standard Otsu's thresholding algorithm combined with labeling (A) were compared to the results of our algorithm (B) applied on 3D MRI images of a cheese at the end of the ripening process in Fig. 3. It can be observed that the algorithm developed in the present study made it possible to detect all individual eyes, while an important number of the large eyes overlapped when standard Otsu's thresholding combined with labeling algorithm was used. This accurate separation of eyes is a useful tool to study individual growth kinetics, even when two eyes coalesce at one point during ripening. It makes it possible to compute volume of each individual cheese eye and to follow eyes during the ripening process.



**Fig. 3: Six consecutive 1-mm frames (F-1 to F-6) with (A) and without (B) eye separation of the 3D FSE MRI images (TE=8.7 ms, TR=400 ms, ETL=6; BW= 296 Hz/pixel; 56% slice resolution and 1x1x1 mm<sup>3</sup> voxel) of a cheese at the end of the ripening process. Different colors correspond to each individual eye (see the web version of the article).**

**Overlapping eyes can be observed.**

### *3.2 MRI sequence*

MRI cheese images were artifact-free for ETL=2, 4 and 6 and revealed slight ringing artifacts for ETL=8 (images not shown). The results of individual eye volume measurements for the images acquired with ETL= 4, 6 and 8 were compared to the results obtained for the images with ETL=2. The relationships between the measurements were linear ( $x \approx y$ ) with  $r^2 > 0.997$ , showing that all the results entirely matched the reference in spite of the artifacts observed in the images. In order to obtain artifact-free images, ETL was fixed at 6 for the application experiments. However, if reduction in acquisition time is required, measurements could be accelerated by increasing the ETL to 8 without affecting the precision of estimation of eye volume.

The impact of the voxel interpolation in the slice direction was checked by comparing images obtained with 56% slice resolution to those obtained without interpolation. No differences in image quality were observed. The relationship obtained between eye volumes extracted from interpolated ( $V_{int}$ ) and full resolution images ( $V_{fr}$ ) was linear ( $V_{int} = 0.99 \times V_{fr}$ ) with  $r^2 > 0.999$ . Fifty-six percent interpolations were therefore used for the application experiment, thus making it possible to reduce the acquisition time by almost half.

In the application measurements, the geometric parameter of the images (FOV and matrix size) were slightly modified according to the increasing size of the cheese (image resolution of 1x1x1 mm<sup>3</sup> was unchanged). Thus, with a FOV of 256x108 mm<sup>2</sup> and a matrix size of 256x108, about 38 min was

required for the acquisition of a whole industrial cheese (24cm x 48cm x 7cm) at the beginning of the experiment (D-4). At the end of the experiment (D-15), FOV was 256x144 mm<sup>2</sup> and matrix size 256x144, and about 51 min was required for acquisition of the 24cm x 48cm x 10cm cheese. Other imaging parameters are given in the section 2.2.

### *3.3 Estimation of the accuracy of the MRI method for quantification of eye volume*

The MRI images used for estimation of accuracy were acquired using the same parameters as described in the previous section, except that TE that was fixed at 7.9 ms and ETL=4. No effect of slight TE variation (between 7.9 ms and 8.7 ms) on estimation of eye volume was demonstrated in our preliminary study. The geometric parameters of the images were FOV=192x150 mm<sup>2</sup> and matrix size=192x150 (image resolution of 1x1x1 mm<sup>3</sup>). The results of MRI eye volume measurements performed on six small cheeses before (M-1) and after  $\mu$ CT cheese scan (M-2) were almost identical, demonstrating that cheese did not change considerably during the measurement period. MRI measurements are compared to the  $\mu$ CT measurements in Fig. 4. The relationships between MRI (M-1 and M-2) and  $\mu$ CT were linear and described by:  $V_{\text{MRI}}=0.98 \times V_{\mu\text{X-ray}}$  ( $r^2>0.997$ ), showing that the results of the two techniques matched well. This demonstrated that the MRI images were not affected by any susceptibility artifacts that may have occurred at the interfaces between gas-filled eyes and the cheese paste. Moreover, spatial resolution of the MRI images was sufficiently high for accurate estimation of eye volume.

The error of MRI measurements was computed as a ratio between difference in eye volumes measured by MRI and  $\mu$ CT and the reference  $\mu$ CT eye volume. For the full range of hole size (2mm<sup>3</sup> to 5600 mm<sup>3</sup>), the mean error was 1.33%±7.43% and -0.12%±8.05%, for M-1 and M-2, respectively. The slight evolution of the error during the 3-day measurement period from positive to negative values was in agreement with the expected minor eye volume growth. The small errors and associated standard deviations demonstrated the accuracy of the MRI measurements. However, the error depended on the eye size; for few small holes (< 180 mm<sup>3</sup>) it could reach 15% at maximum.

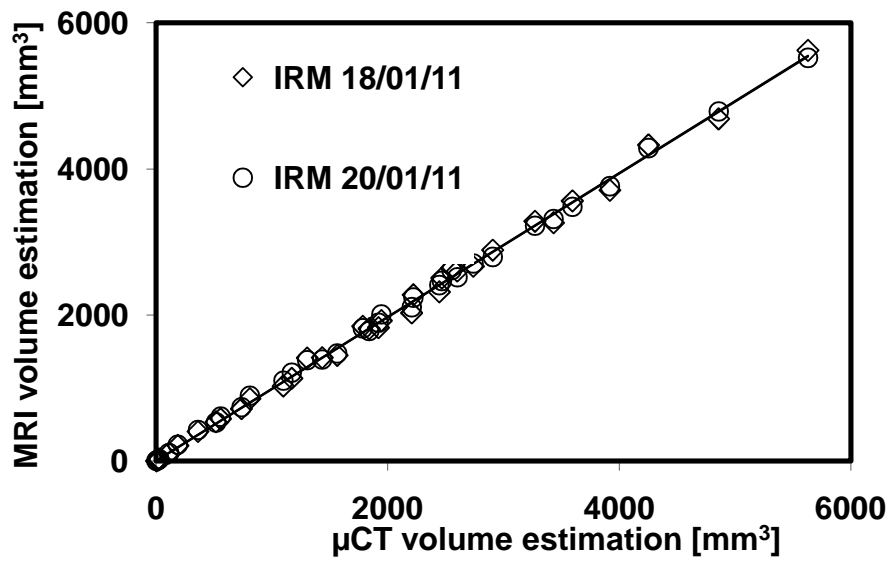


Fig. 4: Comparison between MRI estimation of cheese eye volumes obtained with 3D FSE sequence (TE=7.9 ms, TR=400 ms, ETL=4; BW= 296 Hz/pixel; 56% slice resolution and 1x1x1 mm<sup>3</sup> voxel) and μCT volume estimation (0.18<sup>3</sup> mm<sup>3</sup> voxel). Superimposed solid lines represent linear relationships between MRI eye volumes measured before (M-1) and after (M-2) the μCT experiment and μCT measurements, both described by:  $V_{\text{MRI}}=0.98 \times V_{\mu\text{CT}}$  ( $r^2 > 0.997$ ).

### 3.4 Monitoring of eye growth during cheese ripening

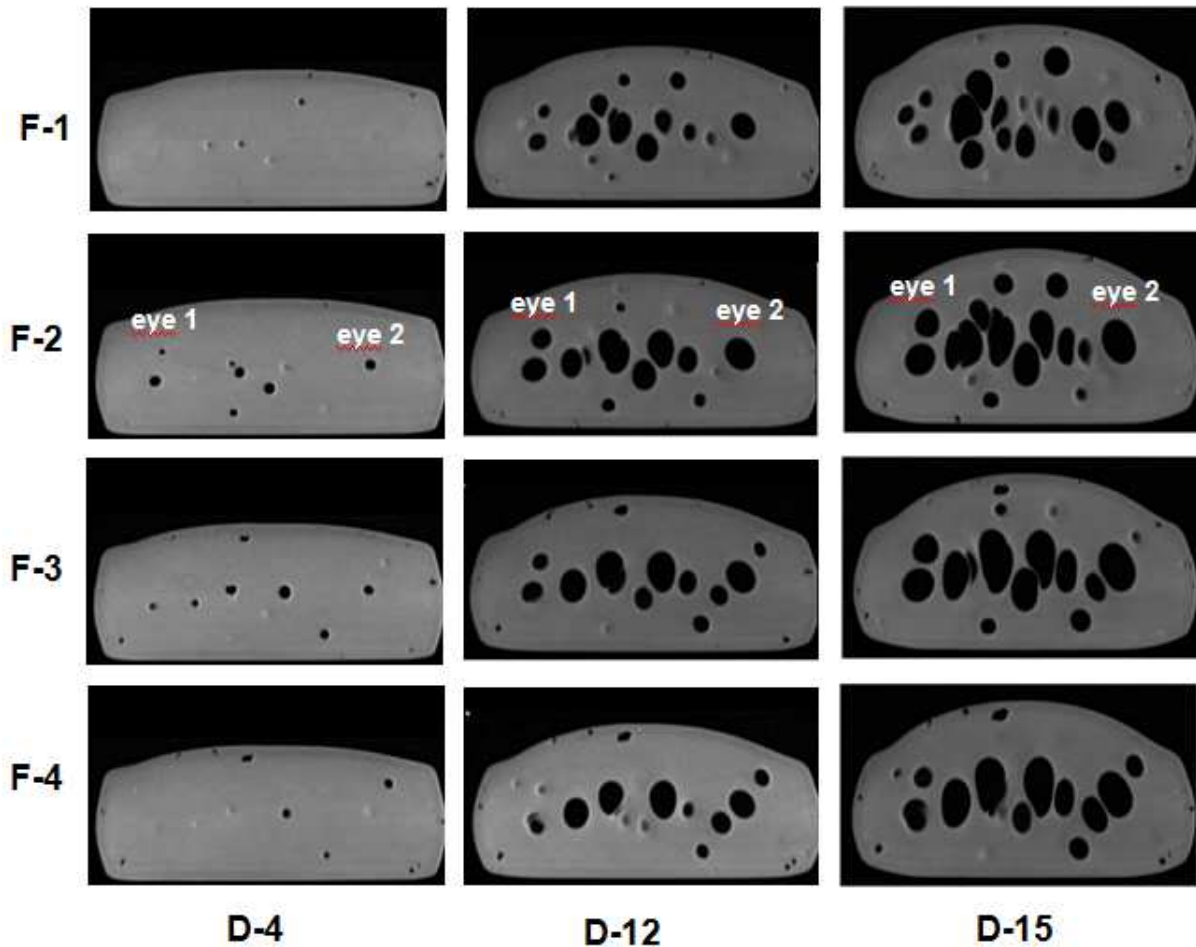
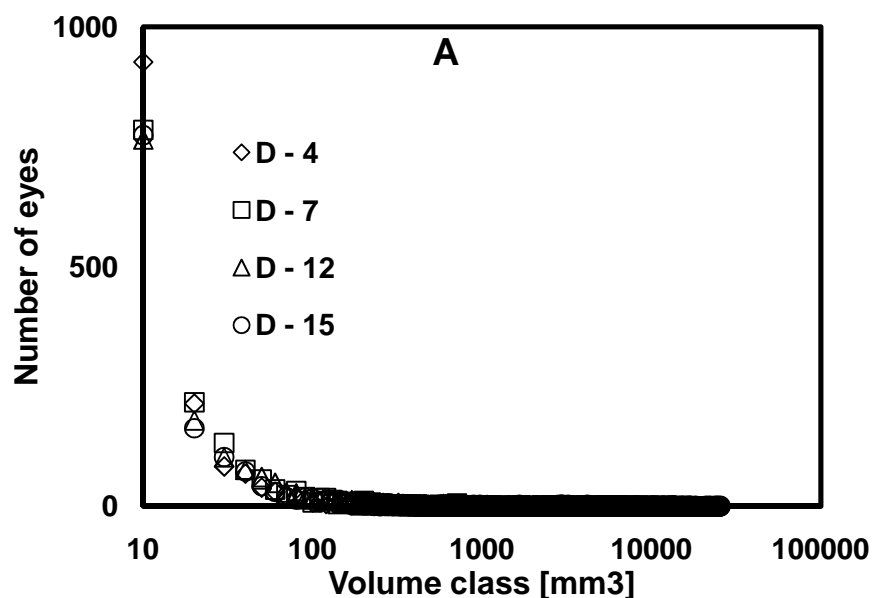


Fig. 5: 3D FSE MRI images (TE=8.7 ms, TR=400 ms, BW= 296 Hz/pixel; 56% slice resolution, ETL=6 and  $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$  voxel) of cheese at three ripening stages (horizontal axis; D-7, D-12 and D-15). 1-mm frames (vertical axis; F-1 to F-4) are separated by 5 mm. Growth of eyes 1 and 2 is described in Fig.7

Fig. 5 depicts the evolution of the cheese throughout the ripening process. Sequentially observing the images along the vertical axis reveals the three-dimensional cheese structure, frames F-1, F-2, F-3 and F-4 each being separated by 5 mm from the next. The horizontal axis corresponds to the ripening time, with D-4, D-12 and D-15. The overall cheese volume increased from 10.0 L at D-4 to 11.6 L at D-15, leading to a change in cheese shape during the ripening process. The cheese swelled, especially in the center of the top, while the edges remained unaffected, except for the lower corners which were lifted up by the packaging film (invisible on MRI). The size, shape and distribution of the eyes could also be observed on the images during ripening. At D-4, mean eye radius was 2.0 mm, and after one week in the hot room (D-7, not shown) it reached 2.5 mm. The eyes were round but small during the first week at 20°C. As reported in Gouda-type cheese (Lee et al., 2012), more eyes were observed in the core zone of the cheese than under the rind. The eyes grew faster during the second week in the hot room, mean radius increasing to 4.8 and 6.1 mm at D-12 and D-15, respectively. Moreover, they became more ovoid until D-15 when they displayed a main axis oriented vertically. Some unexpected

characteristics of the MRI images were the bright signal observed around eyes and in small spherical regions that become eyes in subsequent frames of the 3D MRI images. This was the opposite of the anticipated effects of partial volume that were expected to provide lower signal values in regions adjacent to eyes than in the cheese paste. These phenomena had the same origins and did not seem to be artifacts of the MRI technique. They may have been caused by locally different composition of the cheese paste from that in areas around the eyes. A pure fat layer was found at the periphery of eyes on confocal laser scanning microscopy (Huc et al., 2013) . The layer can be up to 200  $\mu\text{m}$  thick, which could be enough to change the local average signal of a voxel on MR images around eyes and lead to a brighter signal.

Fig.6 shows the evolution of some indicators of opening determined after MR image treatment. A histogram of gas distribution in different eye sizes is provided in Fig.6A. The evolution of the relative volume of gas in cheese, known as porosity, is displayed with the evolution of the total number of eyes during ripening in Fig.6 B. It can be seen that several eyes already existed in the cheese after 4 days in the hot room (total number 1600 eyes). However, the volume of 60% of these openings was less than  $10\text{ mm}^3$  and for only 11% volume was greater than  $100\text{ mm}^3$  according to the histogram distribution. At D-7, 100 new eyes were detected, 57% of which (1700) were very small and 16% were larger than  $100\text{ mm}^3$ . At D-12, 1765 openings were detected, including 49% smaller than  $10\text{ mm}^3$  and 24% larger than  $100\text{ mm}^3$ . Finally, at the end of ripening, the total number of eyes remained almost constant (1700 openings), of which 46% were smaller than  $10\text{ mm}^3$  and 27% larger than  $100\text{ mm}^3$ .





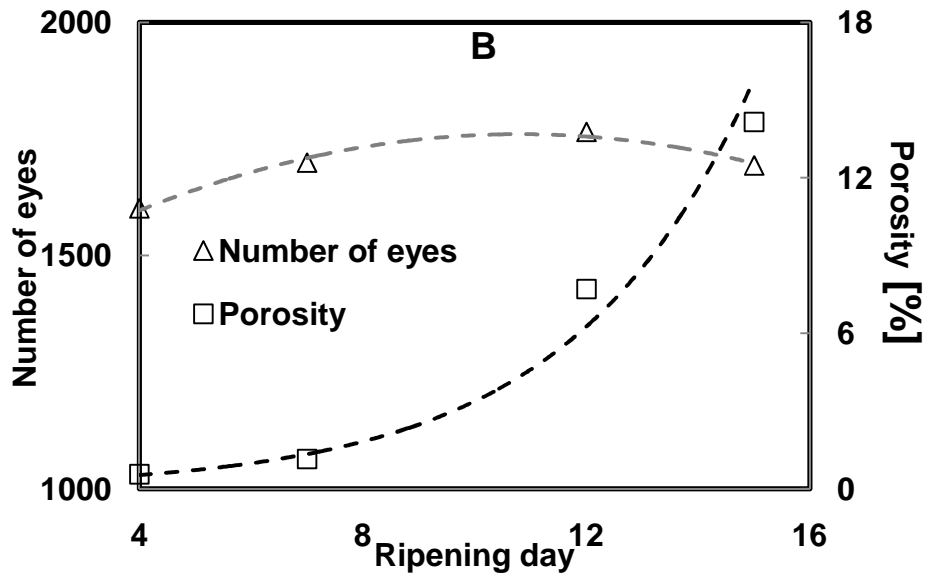


Fig. 6: Histogram of gas distribution in different eye sizes (A); evolution of number of eyes and cheese porosity during ripening (B)

Despite a small increase, the total number of eyes remained almost constant during hot room storage, whereas the distribution of gas shifted from small to larger eyes. This evolution can explain the porosity profile shown on Fig.6B, increasing from 0.6% at D-4 to 14.2% at the end of ripening (D-15). An exponential curve could be fitted to this evolution, showing that the most rapid porosity increase occurred at the end of the hot room period. A careful analysis of the porosity showed that large number of eyes having a volume smaller than  $10 \text{ mm}^3$  contributed to 5% of the porosity after 4 days in the hot room. During ripening, their contribution became negligible, and at the end of ripening 96% of the total porosity was explained by the eyes having a volume larger than  $500 \text{ mm}^3$ . This shows that the larger eyes play a role of sink for the  $\text{CO}_2$ .

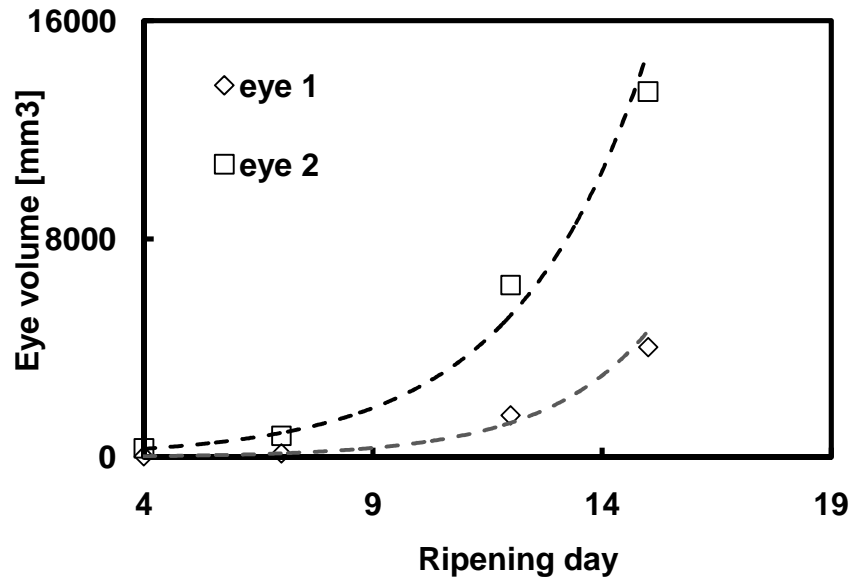


Fig. 7: Examples of growth of two eyes during ripening. Eyes 1 and 2 correspond to those shown in Fig. 6

Fig.7 depicts the growth curve for two individual eyes. Indeed, due to individual eye labeling, the information provided by MR imaging method allowed determination of both global and local parameters. Two openings, labeled “eye1” and “eye2”, are shown in Fig.5 to illustrate individual growth. Both openings displayed exponential growth, although the final volume was 3.5 times greater for eye2. Despite their size, shape and location in the cheese, these openings showed very similar growth profiles. The real difference was in the growth rate. This result shows that the growing rate can be significantly different according to the location of the eyes into the cheese. Individual monitoring of eye growth could thus be a powerful tool to improve understanding of its mechanisms, especially as eye coordinates provided by MR image processing could gather information about eye location in cheeses and the potential influence of gradient of composition, CO<sub>2</sub> production and mechanical properties on their growth profiles. Moreover, the ability to establish the growth starting point during ripening would allow differentiation of two phenomena: the detection of newly formed eyes and the growth of already detected eyes, i.e., eye formation and eye development. This differentiation is important to improve our understanding of the effect of nucleus into the eyes formation mechanisms.

The algorithm for estimating eye volume developed in this study did not require prior information regarding the eye shape. It therefore allowed for accurate segmentation, even for eyes of irregular shape. Moreover, eye segmentation was effective for images with high numbers of overlapping eyes acquired the end of the ripening period, that is difficult to obtain with less sophisticated algorithms (Kraggerud et al., 2009).

One additional major eye characteristic to be studied would be shape (Schuetz et al., 2013). Indeed, in addition to number and size, eye shape is an important quality indicator for semi-hard

cheeses. Cracks could be detected with a shape indicator, as they will diverge strongly from the typical spherical eye shape. The algorithm could also provide information about the preferential direction of deformation of eyes in cheese. Adding shape determination to the present algorithm would thus be an interesting perspective.

The MRI method evaluated in this study could be applied to the study of the influences of recipe or process changes on the internal cheese structure. For example, reduction of salt or fat content that might be desirable from a nutritional point of view may possibly alter eye formation and evolution during ripening. As eye characteristics represent one of the main quality indicators, any modifications could influence consumer appreciation. As MRI is non-invasive, testing recipe or process factors could be performed by studying the ripening kinetics without any manipulation or disruption of the cheese. Another potential application of the MRI technique for research and development purposes might be the investigation of aspects other than cheese structure, such as mapping of water and/or fat content. A single MRI examination with appropriate protocols could thus monitor changes in the major characteristics of a product during ripening, providing important information for recipe and process development.

#### **4. Conclusion**

A 3D MRI method, combined with a corresponding image processing algorithm allowing for separation of overlapping eyes and individual eye labeling, provided a means of non-invasively observing and following eye formation and development in semi-hard cheese. The accuracy of the MRI protocol was demonstrated by comparing estimation of the eye volume by MRI with the reference  $\mu$ CT measurements,

The potential of the MRI method for the evaluation of changes in individual opening characteristics during cheese ripening was demonstrated. It was revealed for example that eyes can have very similar growth profiles and different growth rates. The method may be a powerful tool to study the influence of recipe or process changes on internal cheese structure for research and development purposes.

#### **Acknowledgments**

The project was labeled by the French competitiveness cluster Valorial. The authors thank the Regional Councils of Bretagne, Basse Normandie and Pays de la Loire for their financial support. The MRI study was performed in the ISO 9001- 2008 certified research platform PRISM (Rennes, France).  $\mu$ CT measurements were carried out in the CRT facility (Morlaix, France).

#### **References**

- Beucher, S., Meyer, F., (1992). The Morphological Approach to Segmentation: The Watershed Transformation, in: Dougherty, E. (Ed.), *Mathematical morphology in image processing*, New York, pp. 433-481.
- Conde, T., Mulet, A., Clemente, G., Benedito, J., (2008). Detection of internal cracks in Manchego cheese using the acoustic impulse-response technique and ultrasounds. *Journal of Dairy Science* 91(3), 918-927.
- De Guio, F., Musse, M., Benoit-Cattin, H., Lucas, T., Davenel, A., (2009). Magnetic resonance imaging method based on magnetic susceptibility effects to estimate bubble size in alveolar products: application to bread dough during proving. *Magn Reson Imaging* 27(4), 577-585.
- Eskelinen, J.J., Alavuotunki, A.P., Hægström, E., Alatossava, T., (2007). Preliminary Study of Ultrasonic Structural Quality Control of Swiss-Type Cheese. *Journal of Dairy Science* 90(9), 4071-4077.
- Guggisberg, D., Froehlich-Wyder, M.-T., Irmeler, S., Greco, M., Wechsler, D., Schuetz, P., (2013). Eye formation in semi-hard cheese: X-ray computed tomography as a non-invasive tool for assessing the influence of adjunct lactic acid bacteria. *Dairy Science & Technology* 93(2), 135-149.
- Huc, D., Moulin, G., Michon, C., Mariette, F., (2013). Investigation of curd grains in Swiss-type cheese using light and confocal laser scanning microscopy. *International Dairy Journal*, *in press*.
- Kraggerud, H., Wold, J.P., Hoy, M., Abrahamsen, R.K., (2009). X-ray images for the control of eye formation in cheese. *International Journal of Dairy Technology* 62(2), 147-153.
- Lee, K., Uegaki, K., Nishii, C., Nakamura, T., Kubota, A., Hirai, T., Yamada, K., (2012). Computed tomographic evaluation of gas hole formation and structural quality in Gouda-type cheese. *International Journal of Dairy Technology* 65(2), 232-236.
- Lim, K.S., Barigou, M., (2004). X-ray micro-computed tomography of cellular food products. *Food Research International* 37(10), 1001-1012.
- Mariette, F., Collewet, G., Davenel, A., Lucas, T., Musse, M., (2012). *Quantitative MRI in Food Science & Food Engineering*. John Wiley & Sons, New Jersey, USA.
- Mendoza, F., Verboven, P., Mebatsion, H.K., Kerckhofs, G., Wevers, M., Nicolai, B., (2007). Three-dimensional pore space quantification of apple tissue using X-ray computed microtomography. *Planta* 226(3), 559-570.

- Nassar, G., Lefbvre, F., Skaf, A., Carlier, J., Nongaillard, B., Noël, Y., (2010). Ultrasonic and acoustic investigation of cheese matrix at the beginning and the end of ripening period. *Journal of Food Engineering* 96(1), 1-13.
- Otsu, N., (1979). Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *Ieee Transactions on Systems Man and Cybernetics* 9(1), 62-66.
- Pittia, P., Sacchetti, G., Mancini, L., Voltolini, M., Sodini, N., Tromba, G., Zanini, F., (2011). Evaluation of Microstructural Properties of Coffee Beans by Synchrotron X-Ray Microtomography: A Methodological Approach. *Journal of Food Science* 76(2), E222-E231.
- Rosenberg, M., McCarthy, M., Kauten, R., (1992). Evaluation of eye formation and structural quality of swiss-type cheese by Magnetic Resonance Imaging. *Journal of Dairy Science* 75(8), 2083-2091.
- Rosenfeld, A., Pfaltz, J.L., (1966). Sequential Operations in Digital Picture Processing. *J. ACM* 13(4), 471-494.
- Ruan, R., Chang, K., Chen, P.L., Fulcher, R.G., Bastian, E.D., (1998). A magnetic resonance imaging technique for quantitative mapping of moisture and fat in a cheese block. *Journal of Dairy Science* 80, 9-15.
- Schuetz, P., Guggisberg, D., Jerjen, I., Fröhlich-Wyder, M., Hofmann, J., Wechsler, D., Flisch, A., Bisig, W., Sennhauser, U., Bachmann, H., (2013). Quantitative comparison of the eye formation in cheese using radiography and computed tomography data. *International Dairy Journal* doi: 10.1016/j.idairyj.2012.12.007.

## 2.2 Observations microscopiques multi-échelles (A2)

La combinaison de techniques dédiées à l'étude de la microstructure de la pâte fromagère a été choisie afin d'obtenir des résultats à différentes échelles permettant d'assurer la visualisation de divers éléments d'organisation de la pâte fromagère (Figure 15).

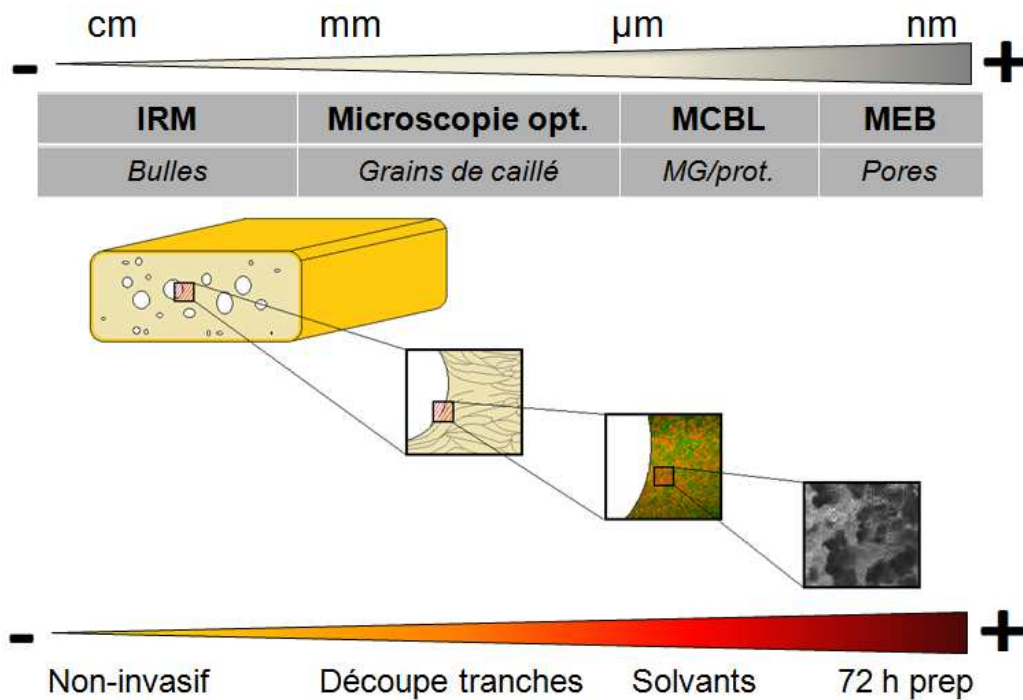


Figure 15 : Organisation des techniques d'observation multi-échelles de la structure des fromages

Ce second article a fait l'objet d'une soumission auprès d'*International Dairy Journal* en Janvier 2013 et a été accepté en Mai 2013 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.05.017>). Il est actuellement sous presse avec une publication prévue pour 2013.

# **Investigation of curd grains in Swiss-type cheese using light and confocal laser scanning microscopy**

## **Authors:**

D. Huc<sup>abcde</sup>, G. Moulin<sup>abc</sup>, F. Mariette<sup>de</sup>, C. Michon<sup>abc\*</sup>

(a) AgroParisTech, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments F-91300 MASSY

(b) INRA, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments Olympiades F-91300 MASSY

(c) CNAM, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments, F-75003 PARIS

(d) IRSTEA, UR TERE, 17 Avenue de Cucillé, CS 64427, F-35044 RENNES

(e) Université européenne de Bretagne, France

## **Abstract**

The mechanisms of eye growth in Swiss-type cheeses have mostly been explained empirically. Greater understanding may be needed in order to anticipate any structural changes that may lead to cracking instead of bubble formation. The microstructure of a Swiss-type cheese was therefore investigated using a multi-scale approach. Two microscopic techniques were used: light microscopy to study curd grain patterns, and confocal laser scanning microscopy (CLSM) to study the organization of the fat and protein network in the cheese matrix around eyes. Anisotropy was revealed according to the direction of examination, with a different organization of curd grains along or perpendicularly to the pressing axis of the cheese. The curd grains appeared to be highly stretched around the openings. CLSM revealed a difference in composition inside curd grains and at the surface of eyes. Moreover, holes were observed at the interfaces of the grains, which could correspond to small eyes or to the origin of cracks.

## 1. Introduction

Swiss-type cheeses are characterized by their bubbles, usually called “eyes”, which, through their number, size and shape, represent a very important quality parameter. However, the mechanisms of eye growth in Swiss-type cheeses are still largely not elucidated and some opening defects like cracks or slits can appear instead of a bubble, as reviewed by Daly et al. (2010). Moreover, the description of eye growth has mostly been explained empirically. Several mechanisms have to be considered. Firstly, eyes are formed in Swiss-type cheeses during the ripening stage by propionic acid bacteria producing CO<sub>2</sub>. Eyes grow in a cheese matrix composed of pressed curd grains, which are the other characteristic feature of pressed curd cheeses. Cheese processing starts with a renneting phase, during which the milk turns into a gel, which is cut to form solid grains. These are separated from the liquid phase, the serum, during the draining step. The curd grains are then pressed in order to form a continuous matrix, before entering the ripening stage, during which the cheese will develop its aroma and consistency.

Several studies have been undertaken in order to improve the understanding of curd grain structure and organization. For example, the organization of curd grains was investigated in photographic studies of several cheese varieties such as Raclette, Emmentaler (Ruegg & Moor, 1987), and Cheddar (Kalab, Lowrie, & Nichols, 1982; Lowrie, Kalab, & Nichols, 1982). Grain anisotropy was revealed according to the sampling direction, as well as an influence of processes such as pressing, molding and cheddaring stages on grain shape, size and junction patterns. However, the sampling procedure used in the previous studies required several solvents to defat and dehydrate samples, which required at least 48 h before any observation could be made. Questions also remain about the influence of these solvents upon the integrity of the observed product. This macroscopic approach was complemented by confocal laser scanning microscopy (CLSM), which provided images with a higher resolution (Akkerman, Fox, & Walstra, 1994; Rogers, McMahon, Daubert, Berry, & Foegeding, 2010). Moreover, CLSM is an effective technique for evaluating the dispersion of fat and proteins in the body of the cheese, because of the specific probes and the observation scale (between 20 and 100 µm), as reported for Mozzarella cheese (Auty, Twomey, Guinee, & Mulvihill, 2001).

The evolution of the morphology and dispersion of fat globules in the protein network during the process has been studied for Emmentaler (Lopez & Briard-Bion, 2007; Lopez, Camier, & Gassi, 2007) and Cheddar (Rogers et al., 2010). The influences of the recipe and the process on the microstructure have also been studied (Brickley, Auty, Piraino, & McSweeney, 2007; De Freitas et al., 2005; Flourey et al., 2009), showing the effects of the pH at renneting and fat/dry matter ratio on the size of protein aggregates and the different states of fat globules inside the cheese (described under three forms: globular, aggregates or non-globular). Curd grain interfaces, small cracks and microbubbles were also seen using this technique (Lopez et al., 2007; Rogers et al., 2010). Swiss-type cheeses have been characterized by significant heterogeneity but they also undergo gas production during eye formation.



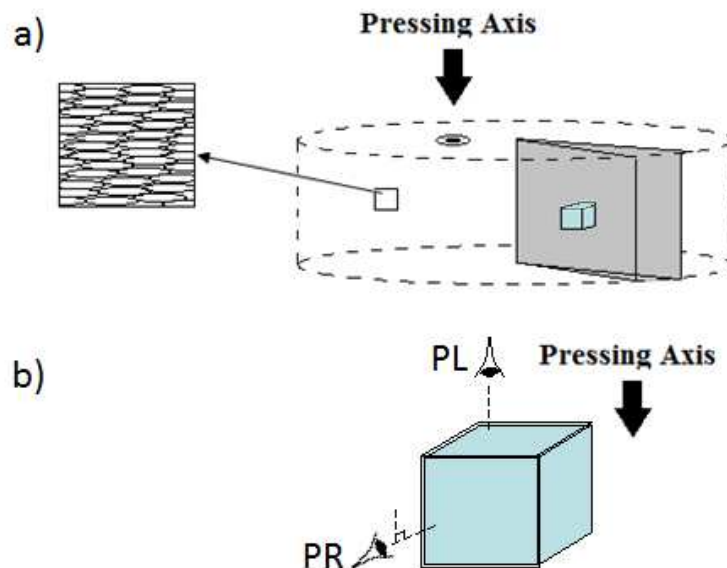
However, only Ruegg and Moor specifically observed the openings in their photographic study, demonstrating some differences between eyes and cracks, despite their invasive sampling and preparation protocol (Ruegg & Moor, 1987).

The aim of the current study was to investigate the organization of curd grains on two different scales. Light microscopy was used for the observation of curd grain patterns (1 mm scale), as the least invasive method for observing such cheese samples. Confocal laser scanning microscopy was used to observe the distribution of fat globules in the protein matrix around eyes (100  $\mu\text{m}$  scale) using specific double probing.

## 2. Materials & Methods

### 2.1 Materials

Thin sections of cheese (10 mm x 20 mm x 0.5 mm for light microscopy and 10 mm x 10 mm x 0.5 mm for CLSM) were cut at 4 °C from slices of Swiss-type cheese loafs at commercial age, which commonly corresponds to 5 weeks after the end of the production process (fat/dry 47%, water content 42%) using two razor blades. The sampling area was in the center of the slices, away from the rind, in order to avoid any compositional gradient. Sampling was performed in two directions in order to obtain two fields of view, parallel and perpendicular to the pressing axis of the cheese, annotated PL and PR, respectively (Fig. 1).



**Fig. 1:** Schematic plan of (a) the sampling zone in the commercial cheese slice (grey) taken in a cheese loaf (non-continuous line) and (b) the examining directions PL = parallel to the pressing axis and PR = perpendicular to the pressing axis

Some samples were observed directly using light microscopy, and the others were dyed using a double-labeling protocol.

### 2.2 Light microscopy

The samples were immediately placed between slides and cover slips and studied at room temperature using an Eclipse 80i microscope (Nikon, Tokyo, Japan) at an objective magnification of 4. The samples were less than 1 mm thick in order to allow light to penetrate through the sample. The resolution of the images was 1372 x 1024 pixels, i.e., 1.60  $\mu\text{m pixel}^{-1}$ . Between 5 and 20 adjacent images were acquired in order to obtain a larger field of view (around 5 x 3  $\text{cm}^2$ ). Images were assembled automatically with a “Grab Large Image” function available in the NIS-Elements imaging software package (Nikon, Tokyo, Japan).

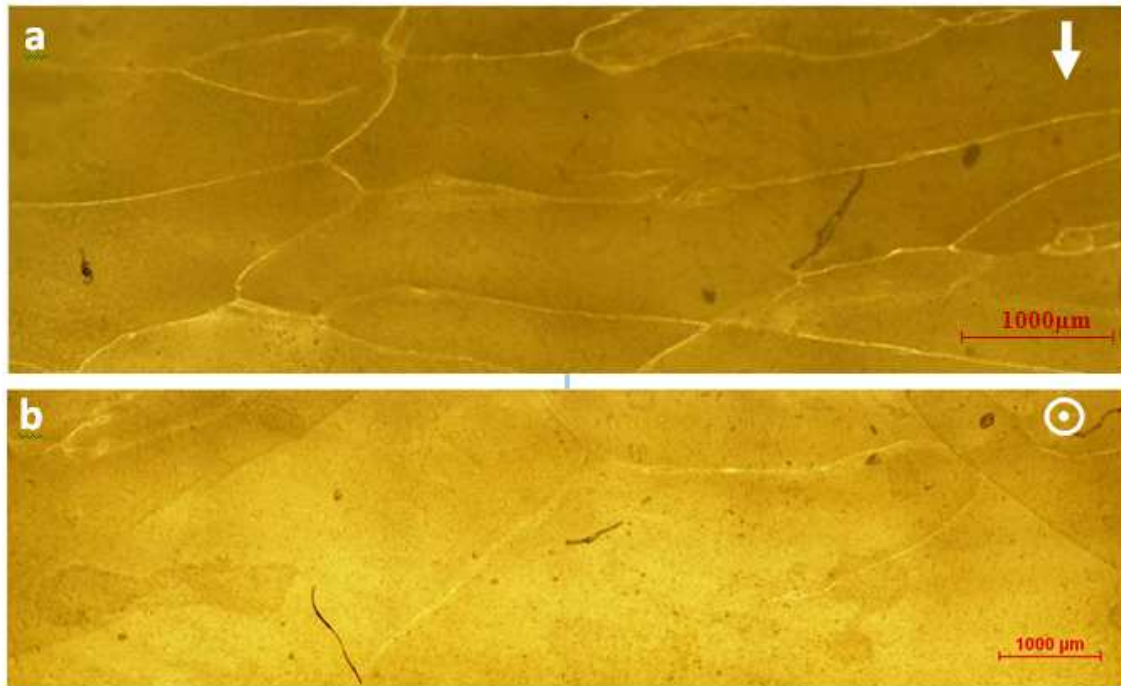
### *2.3 Confocal laser scanning microscopy*

A two-step labeling process was performed using a mixed solution of DyLight 549 nm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) and Bodipy 665/676 nm (Invitrogen, Carlsbad, New Mexico, USA) in order to label protein and fat phases, respectively. The fluorescent labeling solution was prepared mixing 2  $\mu\text{L}$  of a 2.5  $\text{mg mL}^{-1}$  solution of Bodipy in dimethylformamide (DMF) and 2  $\mu\text{L}$  of a 0.5  $\text{mg mL}^{-1}$  solution of DyLight in DMSO. Four microliters of the labeling solution were applied directly to the cheese samples and slides and cover slips were sealed with a self-adhesive layer (0.25 mm thick). Samples were left for at least two hours at 4  $^{\circ}\text{C}$  in the dark before observation in order to ensure good diffusion of the dyes. A TCS SP2 AOBS inverted confocal microscope (Leica, Solms, Germany) equipped with two Helium-Neon lasers with  $\lambda_{\text{ex}}=543$  nm and  $\lambda_{\text{ex}}=633$  nm was used. At least three observations were made at each magnification (x10 and x63) for each cheese sample. Three acquisitions were performed for each observation: for protein content only, dyed by DyLight and represented in green; for fat content, dyed by Bodipy and represented in red, and finally a superimposition of the two images, where the fat-protein co-localized areas appeared in yellow. The sample images presented in Fig. 3 were deemed representative by the authors. Image resolution was 512x512 pixels and the focal plane was taken at around 50  $\mu\text{m}$  inside the samples. Several images acquired in CLSM were assembled using Gimp 2.6.11 free software (<http://www.gimp.org>) in order to obtain a wider field of view more suitable for elements such as eye borders (Fig. 5).

## **3 Results & Discussion**

### *3.1 Anisotropic organization of the body of the cheese*

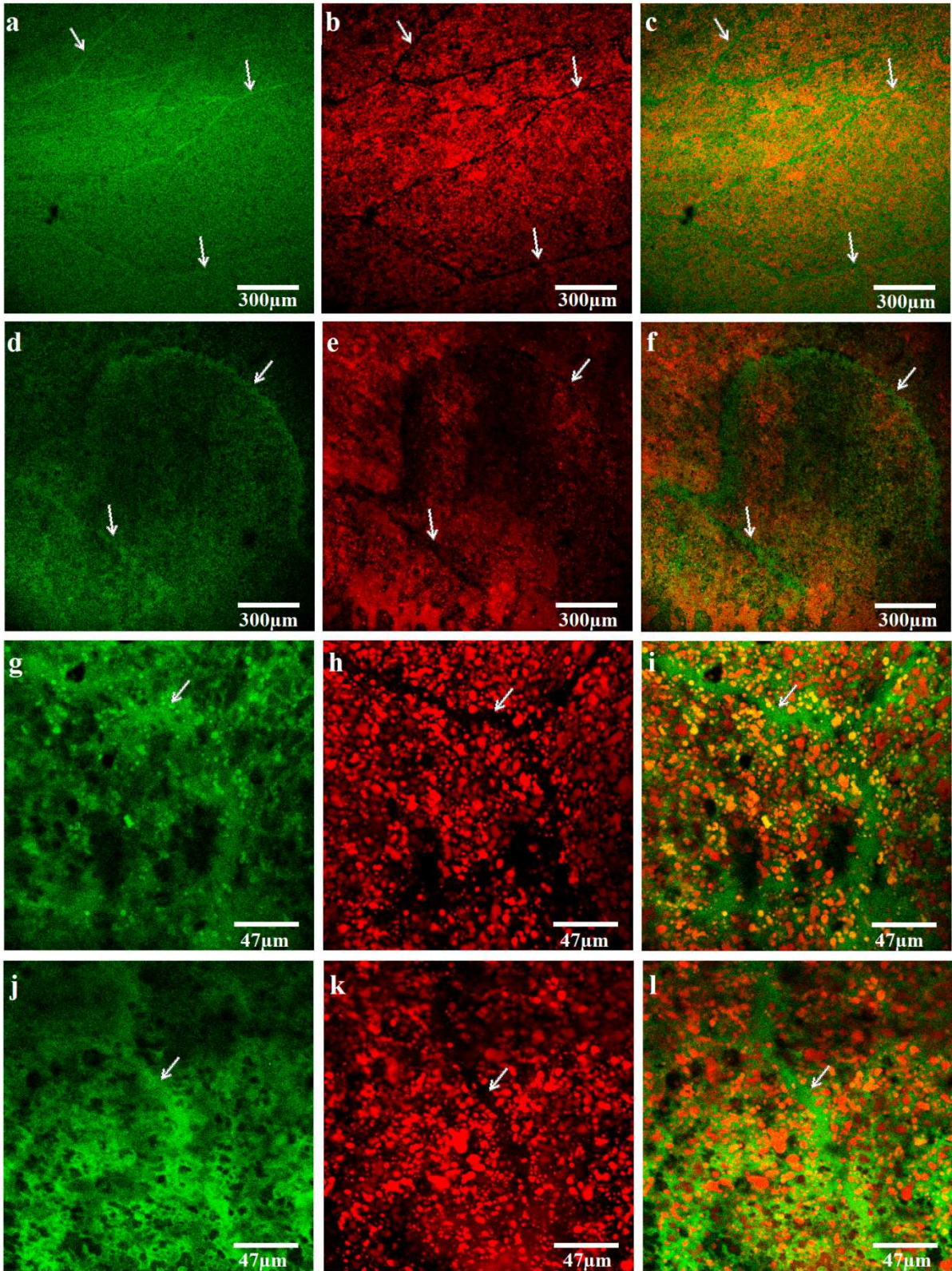
Light microscopy clearly revealed the curd grains (Fig. 2).



**Fig. 2: Light microscopy observations of samples observed (a) perpendicularly (PR) or (b) parallel (PL) to the pressing axis**

The slices cut perpendicularly to the pressing axis (PR) showed many curd grains in a wide variety of sizes, from 0.5 mm to more than 5 mm, and widths from 0.1 mm to 1-2 mm. The PR grain organization created a “brick” pattern, characterized by a main axis oriented horizontally. This was easily visible because the grains were separated by junctions of greater transparency than the inside of the grains (Fig. 2a). In contrast, the insides of the grains were an opaque yellow, and this difference in contrast may correspond to differences in their composition. Some organizational differences were found depending on the sampling direction. The PL samples cut following the pressing axis displayed very few and barely visible interfaces (Fig. 2b). Fig. 2b demonstrates an ovoid shape of curd grains flattened by pressing. This anisotropic organization is in agreement with results showing a flattening of curd grains in several hard cheeses, due to the pressing of the loaf and plastic deformation of the curd during ripening (Ruegg & Moor, 1987). Finally, curd grains could be clearly observed in these cheeses and, since they were completely ripened, it could also be deduced that the distinctiveness of the grains was not influenced by the ripening. Kalab et al. (1982) also suggested this, judging that it was unlikely that any change would take place in the rigid protein matrix forming the junctions.

CLSM permitted investigation of the distribution of proteins and fat globules on a smaller scale (scale bar = 300 μm for a magnification of 10 and 42 μm for a magnification of 63) (Fig. 3).



**Fig. 3: CLSM observations of samples cut perpendicularly (PR) or parallel (PL) to the pressing axis at two objective magnitudes: a, b, c-PRx10 (white line = 300 μm); d, e, f-PLx10; g, h, i-PRx63 (white line = 47.62 μm); j, k, l-PLx63**

The first column of pictures in Fig. 3 shows the protein phase of the samples, represented in green. Both PR and PL samples had a uniform protein network, as can be seen on the 10-fold magnification

pictures (Figs. 3a and 3d). However, when using the 63-fold magnification (Fig. 3g and 3j), the protein matrix revealed heterogeneity, such as black holes dispersed in the network. These could correspond to bacteria, very small eyes or calcium lactate/phosphate salts. Some recent Scanning Electron Microscopy (SEM) observations made on Swiss-type cheese confirmed the presence of pools of bacteria embedded in the protein network; however, no crystals could be seen (Huc et al., 2013), and the presence of mineral salts could not be confirmed. Another good way to validate the presence of bacteria would be the use of viability stain probes in CLSM.

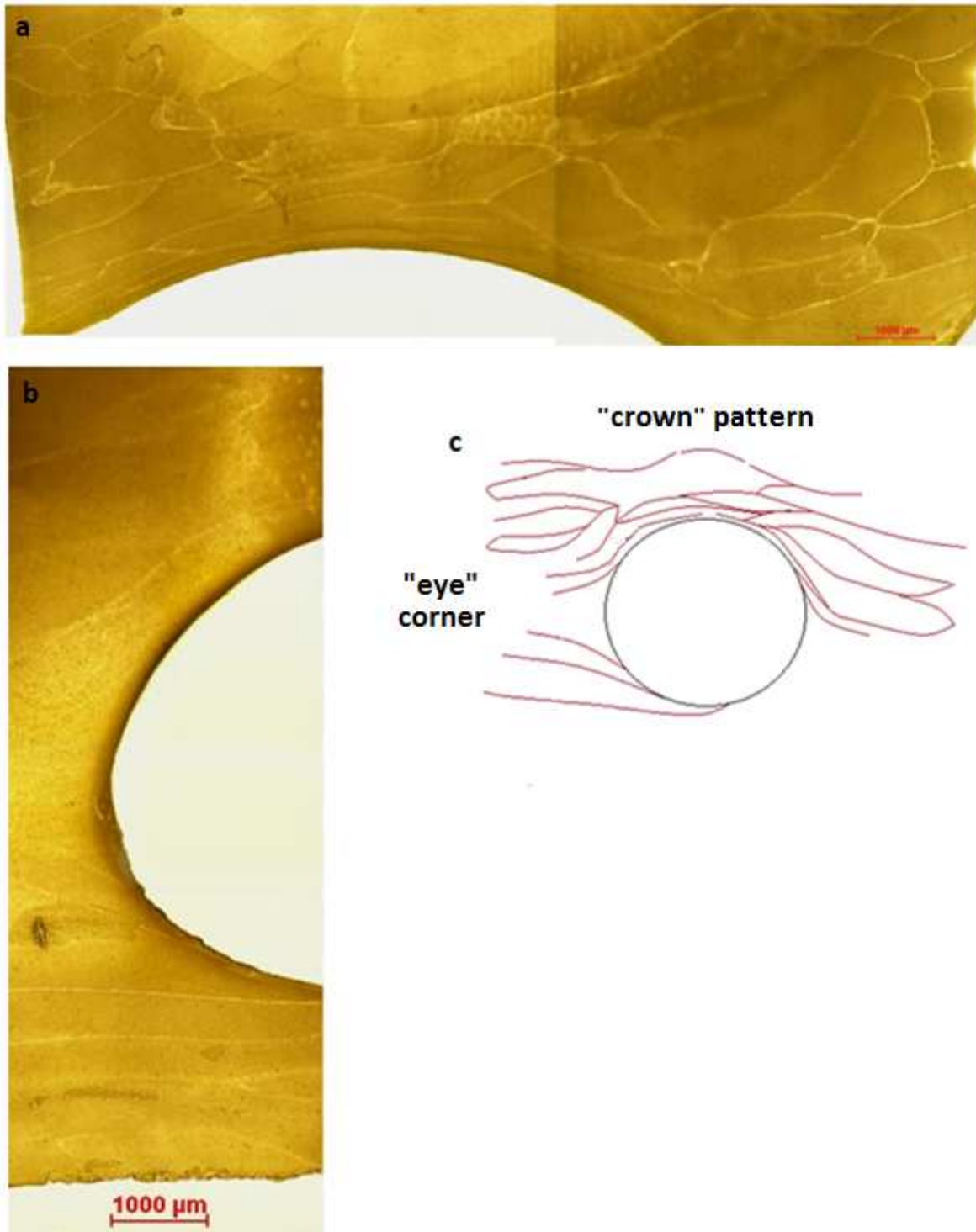
The second column of pictures shows the fat phase of the samples, represented in red. The fat dispersion in the protein matrix seemed entirely homogeneous in both PR and PL samples at 10-fold magnification (Fig. 3b and 3e), with the exception of small black lines without fat (see next paragraph). At 63-fold magnification (Fig. 3h and 3k), the fat globules became individually visible. They ranged from 1 to 10  $\mu\text{m}$  in diameter in both PR and PL samples and were not totally spherical but rather appeared mostly to be non-globular fat. A few black holes also disrupted the cheese matrix. There was thus no anisotropy found in the organization of fat inside the body of the cheese. The third column of pictures shows the superimposition of the two dyes previously described. All the yellow zones corresponded to the presence of both protein and fat globules. These were visible at 10-fold magnification (Fig. 3c and 3f), due to the homogeneous dispersion of the fat globules inside the protein matrix. The 63-fold magnification (Fig. 3i and 3l) also showed this same dispersion of fat globules embedded in the protein network.

However, green highlights on protein-phase images corresponding to black lines on fat phase images (all marked by white arrows) were clearly visible using CLSM on both observation scales. For the PR samples, these were clearly apparent at 10-fold magnification, whereas they were only discernible at the same magnification on the PL samples. These lines corresponded to grain junctions observed in light microscopy, and CLSM confirmed the hypothesized composition differences between junctions and the insides of curd grains. Indeed, due to their brighter green color with no red regions, the grain junctions were highly concentrated in protein and contained almost no fat compared to the inside of the grains. This higher protein content could also correspond to water loss at the grain interfaces. The 63-fold magnification allowed closer visualization of the grain junctions and confirmed the difference in composition between the grain interior and the border for both PR and PL examination directions. Moreover, the intensity of the green light was greater at the interfaces observed in the PR examination direction, and the junction was thinner. Conversely, the PL examination direction was a less bright but broader. The anisotropic organization of the curd grains was validated and remained visible at the end of ripening. Moreover, depletion of fat between grains was confirmed.

These findings are in good agreement with certain results obtained for several other types of cheese. The cheese microstructure of Cheddar, Emmental and model hard-cheeses showed a continuous protein network and the non-globular aspect of fat pools at the end of ripening (Auty, O'Kennedy, Allan-Wojtas, & Mulvihill, 2005; Brickley et al., 2007; Floury et al., 2009; Lopez & Briard-Bion, 2007; Lopez et al., 2007). Curd grains have also been studied, and fat depletion at their junctions reported inside Cantal cheese (De Freitas et al., 2005), and Emmental cheese (Lopez et al., 2007). It has been surmised that the fat-depleted grain interfaces came from the stirring process, which would expose fat globules on the surface of the cut curd (Kalab et al., 1982; Lowrie et al., 1982). This layer would then be washed away during stirring, leaving the grains with no fat on their surface. Fat-depletion would thus be a consequence of the hydrophilic surfaces of native fat globules which would be expelled in the serum during the cutting and pressing phases. However, the serum phase does not contain a lot of fat. Another explanation might thus be that, because of the low fat content of the aqueous phase, and if some serum were trapped between grains by a capillary phenomenon during stirring and draining, these junction zones might appear to be fat-depleted as the body of the cheese possesses a high fat content.

### *3.2 Microscopic study of curd grains around eyes*

Curd grain deformation due to eye growth was also examined under light and confocal microscopy, (Fig. 4 and Fig. 5). Samples cut perpendicularly to the pressing axis (PR) were chosen because of the higher visibility of the grains.

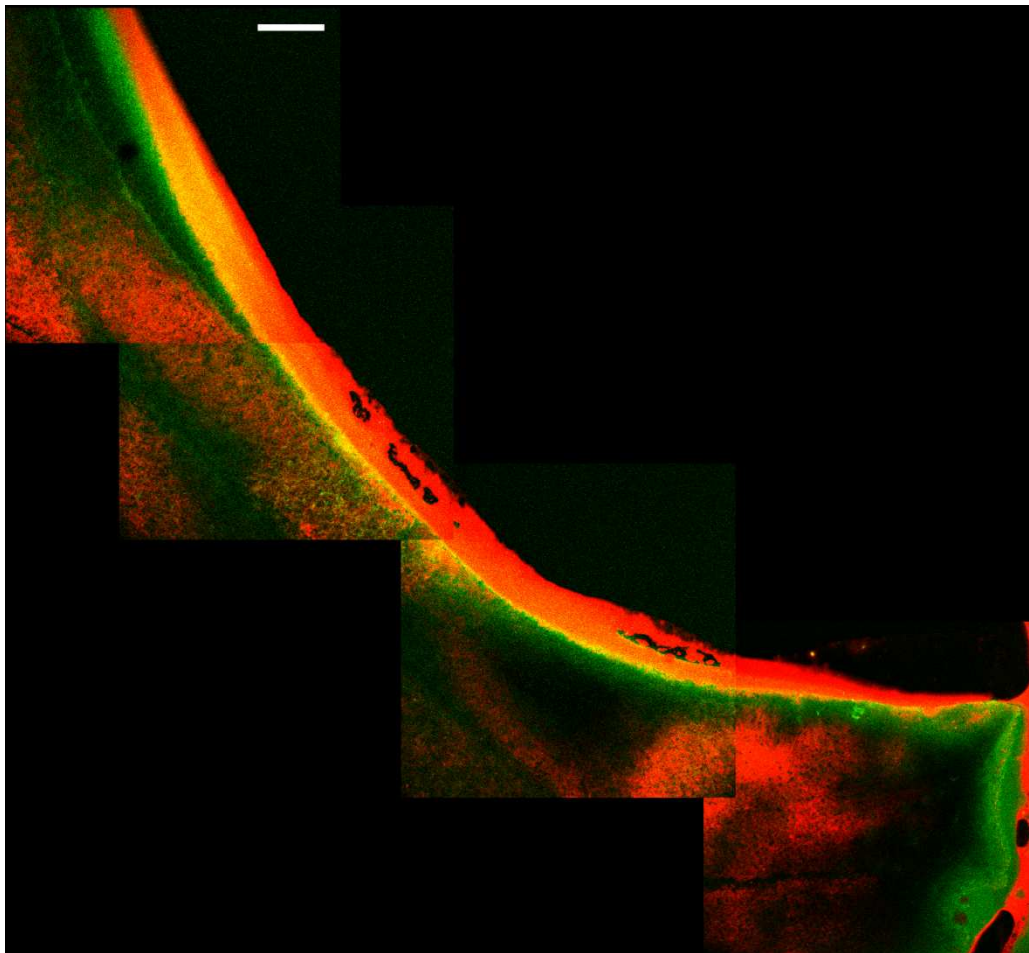


**Fig. 4: Observations of eyes in cheese: (a) upper half of an opening in light microscopy (x4), (b) left half of an opening in light microscopy (x4), (c) schematic organization of curd grains around eyes (crown and eye corner pattern)**

Light microscopy revealed that curd grains appeared to be highly stretched around the openings in the shape of long, thin arcs around the eyes (Fig. 4a and 4b). At the eye interfaces, curd grains lost the horizontal orientation previously shown in zones away from openings (Fig. 2). However, more than 1 mm away from the openings, curd grains regained their horizontal organization. The curd grain deformation was thus a local phenomenon, occurring only in zones very close to the eyes. When

looking at the upper half of the openings, the pattern was a crown shape (Fig. 2a), with grains following the shape of the eye. The left side of an eye (Fig. 2b) showed interfaces organized as an eye corner around the opening, stretched at the sides and joining a few millimeters away from the opening. These two patterns can be schematized as shown in Fig. 4c.

CLSM used with 10-fold magnification (Fig. 5) showed that the distribution of proteins and fat globules was also modified at the interface with the openings.



**Fig. 5: CLSM observations of eyes in cheese: quarter of an opening (x10). White line = 300  $\mu$ m**

Three different areas were identified, going from the center of the bubble toward the inside of the grain. The first one displayed a very dense red light on a 50 - 150  $\mu$ m layer, attributable to high fat content in this zone. In contrast, further into the body of the cheese in the second area, a ring of yellow superimposition followed by a dense green light was seen, corresponding to a fat content gradient. Finally, at around 300  $\mu$ m away from the eye border, a complete fat depletion was reached, as no red light could be found in that area, only composed by a dense protein content. Finally, a third area could be identified after these two rings, going further into the body of the cheese. This third zone showed fat dispersed in the protein network, with individual droplets being visible. It seemed that the fat contained in the body of the cheese close to the openings might migrate up to the eye borders. As the

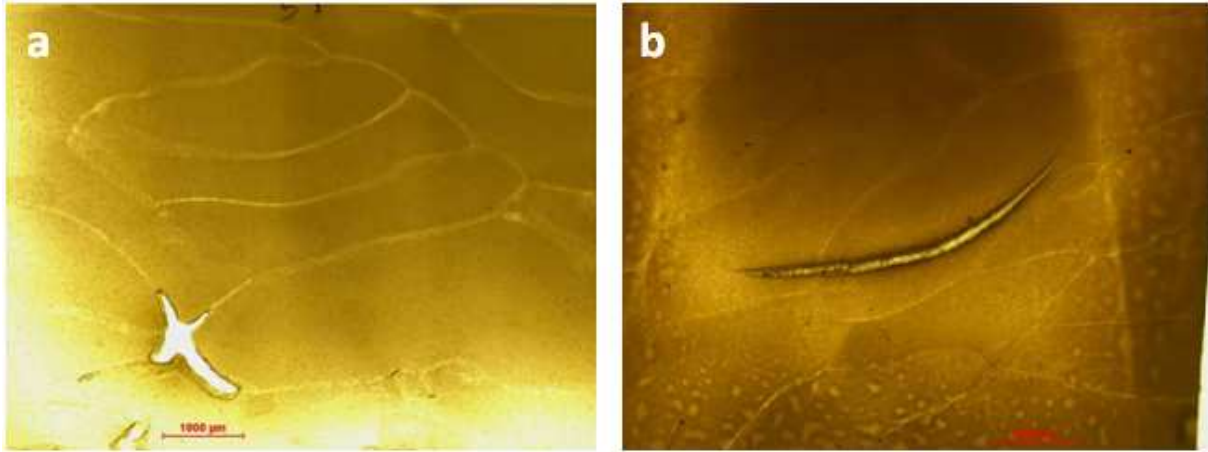


cutting, labeling and observation phases were performed at 4°C, the hypothesis of fat migration due to elevation of temperature during the observation procedure was discounted. This ring with high fat content would explain the shiny aspect on the surface of the openings that probably modified the behavior of the protein matrix near the surface of the eye, unless the cutting action could be responsible for some fat leaching that stopped at the eye surface and formed the layer observed, even at low temperature. Rüegg and Moor (1987) studied the deformation of the curd grains around eyes in Emmental cheese; however, the adjacent grains were not clearly visible on their image, perhaps because of the observation scale, which did not allow closer examination of the peripheral zone at the opening.

The combination of light and confocal microscopy provided complementary examinations of curd grains around eyes. Low magnification (x4) showed very elongated grains immediately around the eyes, whereas they retained their brick pattern 1 mm away from the border. Curd grains have to be plastic to elongate without breaking. However, the very slow deformation rate (eye growth takes several days) may explain this ability. A difference in the cheese composition was identified in CLSM between these cheese-bubble interfaces and the rest of the matrix away from the eyes. It revealed a high fat content zone at the interfaces between body of the cheese and gas, forming a thin layer that could explain the shiny appearance of Swiss-type cheese openings. The fat organization (perhaps intact globules or free fat) in that layer could not be formerly assessed by CLSM using the two available magnifications. Only a smooth and continuous layer could be seen. However, no green spots were visible on the protein content images, showing that no protein network could stabilize fat globules in this layer. Moreover, as the experimental temperature cannot explain the presence of this layer, a hypothesis of a fat leak due to eye growth can be made. When growing, the eye would stretch the cheese matrix around it, leading to an expulsion of fat globules outside the eye, so that this surface layer would be formed. However, in this case, it seems unlikely that the fat globules membrane could have been maintained during fat expulsion, and so the fat layer may be mostly composed of free fat with no intact globules in its organization.

### *3.3 Study of slits*

Some micro-cracks were also observed in the body of the cheese during this experiment. They were located in different zones such as between (Fig. 6a) and inside (Fig. 6b) certain curd grains.



**Fig. 6: Light microscopic observations of openings in grains junctions (a) and cracks (b) of PR samples**

The first type of micro-cracks was seen at the junctions of the curd grains. There were different patterns like crosses or round cracks, but most of them followed the grain interfaces, creating very small openings and slits of around 1 mm long and 100 µm wide. For example, Fig. 6a shows a case where the small hole observed had a cross shape, following the grain junctions. The second type of disruption was seen inside curd grains (Fig. 6b). The small crack formed was 3 mm in length and 10 µm wide, and the body of the cheese was not completely broken. This crack was observed with a horizontal main axis in a PR sample. However, other micro-cracks were also seen in some PL samples. It seemed that cracks inside grains may appear in all directions. These results are in agreement with those of Rüeegg and Moor (1987), who also reported cracks around holes or going through curd grains within Raclette cheese.

#### **4. Conclusion**

The combination of light and confocal microscopy revealed complementary information due to similar, fast and simple sampling protocols, with no structural modification of the product. Light microscopy allowed direct observation of curd grains junctions and showed an anisotropic curd grain organization, as they were visible only perpendicularly to the pressing axis of the cheese. Moreover, curd grains around eyes appeared highly stretched, whereas they maintained a “brick” pattern 1 mm away from eyes. CLSM showed local differences in composition between the insides of the grains and their interfaces, with fat-depleted junctions only composed of protein, which could act as a structuring element of the body of the cheese. However, it seems that protein interfaces can turn into zones of fragility inside the body of the cheese under certain stress conditions. This hypothesis was supported by the observation of micro-cracks located at the interfaces of curd grains. Finally, CLSM revealed a very thin layer of fat at the immediate periphery of the openings that could explain their “shiny” appearance.

## Acknowledgements

The authors thank Julien Mottet for investigating the first grains; Patrick Dabert and Christine Ziebal from UR GERE at Irstea Rennes for giving us full access to the light microscope; the Regional Council of Bretagne, Basse Normandie and Pays de la Loire, the General Council of Ille et Vilaine and the competitiveness cluster Valorial for their financial support.

## References

- Akkerman, J. C., Fox, F. H. J., & Walstra, P. (1994). Drainage of Curd Expression of Single Curd Grains. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, *48*, 1-17.
- Auty, M. A. E., Twomey, M., Guinee, T. P., & Mulvihill, D. M. (2001). Development and application of confocal scanning laser microscopy methods for studying the distribution of fat and protein in selected dairy products. *Journal of Dairy Research*, *68*, 417-427.
- Auty, M. A. E., O'Kennedy, B. T., Allan-Wojtas, P., & Mulvihill, D. M. (2005). The application of microscopy and rheology to study the effect of milk salt concentration on the structure of acidified micellar casein systems. *Food Hydrocolloids*, *19*, 101-109.
- Brickley, C. A., Auty, M. A. E., Piraino, P., & McSweeney, P. L. H. (2007). The effect of natural cheddar cheese ripening on the functional and textural properties of the processed cheese manufactured therefrom. *Journal of Food Science*, *72*, C483-C490.
- Daly, D.F.M., McSweeney, P.L.H., Sheenan, J.J. (2010). Split defect and secondary fermentation in Swiss-type cheeses - A review. *Dairy Science and Technology*, *90*, 3-26.
- De Freitas, I., Pinon, N., Lopez, C., Thierry, A., Maubois, J. L., & Lortal, S. (2005). Microstructure, physicochemistry, microbial populations and aroma compounds of ripened Cantal cheeses. *Lait*, *85*, 453-468.
- Floury, J., Camier, B., Rousseau, F., Lopez, C., Tissier, J.-P., & 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 Science and Technology*, *42*, 1611-1620.
- Huc, D., Mariette, F., Challos, S., Barreau, J., Moulin, G., Michon, C. (2013). Multi-scale investigation of eyes in Swiss-type cheese. Proceedings of an oral conference at *Inside Food Symposium*. Leuven, Belgium. 9<sup>th</sup> to 12<sup>th</sup> April 2013.
- Kalab, M., Lowrie, R. J., & Nichols, D. (1982). Detection of Curd Granule and Milled Curd Junctions in Cheddar Cheese. *Journal of Dairy Science*, *65*, 1117-1121.
- Lopez, C., & Briard-Bion, V. (2007). The composition, supramolecular organisation and thermal properties of milk fat: a new challenge for the quality of food products. *Lait*, *87*, 317-336.
- Lopez, C., Camier, B., & Gassi, J. Y. (2007). Development of the milk fat microstructure during the manufacture and ripening of Emmental cheese observed by confocal laser scanning microscopy. *International Dairy Journal*, *17*, 235-247.

- Lowrie, R. J., Kalab, M., & Nichols, D. (1982). Curd granule and milled curd junction patterns in Cheddar cheese made by traditional and mechanized processes. *Journal of Dairy Science*, *65*, 1122-1129.
- Rogers, N. R., McMahon, D. J., Daubert, C. R., Berry, T. K., & Foegeding, E. A. (2010). Rheological properties and microstructure of Cheddar cheese made with different fat contents. *Journal of Dairy Science*, *93*, 4565-4576.
- Ruegg, M., & Moor, U. (1987). The size distribution and shape of curd granules in traditional swiss hard and semihard cheeses. *Food Microstructure*, *6*, 35-46.

### 2.3 Propriétés rhéologiques de la pâte fromagère (A3)

Ce troisième article a fait l'objet d'une soumission auprès d'*International Dairy Journal* en Juillet 2013.

## **Rheological characterization of semi-hard cheese using lubricated squeezing flow test**

### **Authors:**

D. Huc<sup>abcde</sup>, F. Mariette<sup>de</sup>, C. Michon<sup>abc\*</sup>

(a) AgroParisTech, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments F-91300 MASSY

(b) INRA, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments Olympiades F-91300 MASSY

(c) CNAM, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments, F-75003 PARIS

(d) IRSTEA, UR TERE, 17 Avenue de Cucillé, CS 64427, F-35044 RENNES

(e) Université européenne de Bretagne, France

### **Abstract**

In some semi-hard cheeses, the presence of holes is a requirement. However, gas production responsible for eye growth induces a pressure uptake inside the cheese matrix, which is deformed. Even if the time scale of this process is very long (up to several weeks), there is a risk of fracture due to the high level of deformation, and a crack can be formed. Rheological properties of semi-hard cheeses were investigated using Lubricated Squeezing Flow (LSF), a test specifically chosen in order to place samples in conditions as close as possible to the real eye growth in cheese. Flow curves showed a power law profile, characteristic of a shear-thinning behavior. Moreover, stress/strain curves obtained at a constant biaxial extension rate showed a strain-hardening behavior. These strain-hardening properties reveal structural changes in the cheese matrix during eye growth, allowing a better resistance towards deformation. A schematization of microstructure evolution due to eye growth could be postulated. Some threshold values were also identified in cheeses during ripening as the biaxial yielding stress and strain. They were not impacted by cheese age or by the anisotropic organization of the matrix. However, the yielding strain and Young Modulus increased with an increasing biaxial extension rate.

## 1. Introduction

Semi-hard cheeses are characterized by their bubbles, usually called “eyes”, which represent a very important parameter of quality through their number, size and shape. However, the eye growth puts the surrounding cheese matrix under stress: it can break, leading to the apparition of a crack instead of a bubble. This is an important quality default for pressed and non-cooked curd cheeses. These are obtained after a fabrication process led in six main steps: milk preparation, stirring and cutting of coagulated milk, whey drainage, pressing, brining, and ripening. The obtained products are composed of assembled curd grains in which lactic and propionic bacteria are dispersed. During ripening, the propionic bacteria produce CO<sub>2</sub>, enabling the development of eyes starting from nuclei. This phenomenon occurs on a long time scale during ripening, which can last from weeks to months. Characterizing the resistance of the cheese matrix towards eye growth during ripening would allow a better understanding of its mechanisms and maybe an anticipation of the crack risk. Moreover, it can represent an interesting tool for formulation and improving product innovation. In order to better understand the importance of cheese matrix rheological behavior during eye growth, several effects can be studied. The influence of cheese age must be taken into account, as ripening can induce textural changes in cheeses (Culioli and Sherman 1976; Creamer and Olson 1982; Luyten 1988; Grappin et al. 1993; Luyten and vanVliet 1996; Bachmann et al. 1999; Fenelon and Guinee 2000; Brown 2002). The question of anisotropy is also a parameter of interest in this type of pressed and non-cooked curd cheeses, as curd grains formed by the cutting and pressing process steps can display an anisotropic organization (Eberhard 1985; Grappin et al. 1993; Huc et al. 2013; Weinrichter et al. 2000).

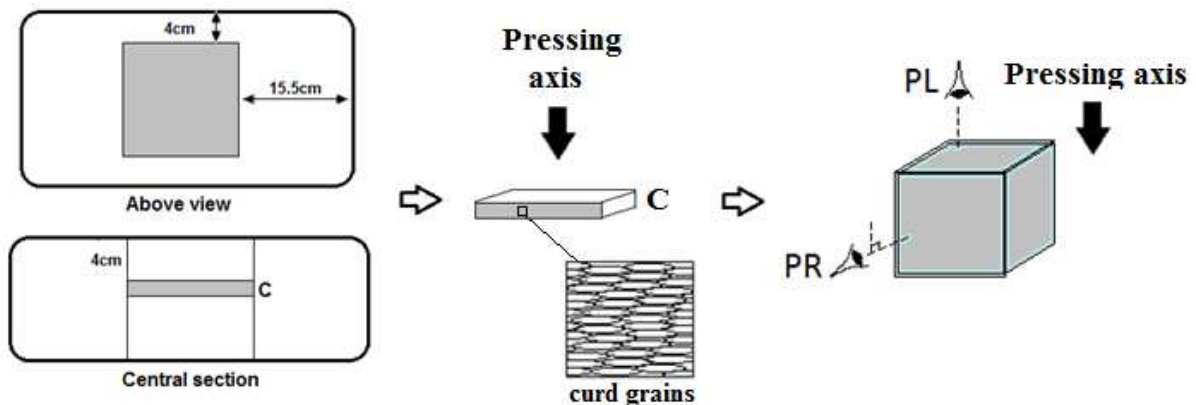
Functional properties of cheese like texture or melting properties can be determined using rheological tests. Several studies led on different types of cheeses at a high level of strain, mostly using uniaxial compression, revealed their fracture properties: Gouda (Luyten and vanVliet 1996), Cheddar (Creamer and Olson 1982; Ak and Gunasekaran 1992; Hort et al. 1997; Watkinson and Jackson 1999; Fenelon and Guinee 2000), Comté (Grappin et al. 1993), Emmental (Rohm and Lederer 1992; Famelart et al., 2002). Other studies led at a small level of strain were performed on Swiss-type cheeses, showing their viscoelasticity: their properties depend on time, strain rate and strain level (Culioli and Sherman 1976; Creamer and Olson 1982; Rohm and Lederer 1992; Luyten and vanVliet 1996). However, in order to study the possible outcomes of eye growth, it is interesting to perform a test at low rates and high levels of strain, in order to be as close as possible to the real process conditions. Indeed, light microscopy observations showed a high level of deformation for curd grains around eyes (Huc et al., 2013). It is also important to reproduce the extension occurring in the matrix around a growing eye. This is why uniaxial compression is less adapted than biaxial extension tests in lubricated conditions. Lubricated Squeezing Flow (LSF) allows performing biaxial extension and has been used to study several food products, including cheeses, even if to the best of our knowledge, it was mostly applied to

soft ones (Bars and Bergere 1976; Ak and Gunasekaran 1992; Wang et al. 1998; Suwonsichon and Peleg 1999; Brandsma and Rizvi 2001; Launay and Michon 2008, Venerus & Kompani, 2000).

The aim of the present work was to adapt LSF tests developed for bread dough and soft cheese to a semi-hard cheese in order to analyze the effect of the anisotropy at a microstructural level and of the ripening time on its rheological properties at both low and high strain levels, while remaining as close as possible to real eye growth conditions. Both strain-hardening and shear-thinning properties were examined.

## 2. Materials & Methods

The studied product was a pressed and non-cooked curd cheese (Fat/Dry 47wt%, water content 42wt%) packaged with an impermeable plastic film before entering ripening. Cheeses were followed during ripening, which was carried out in two steps: ten days at 12 °C (between Day1 and Day10), followed by two weeks at 20 °C (between Day11 and Day25). Samples were taken inside cheeses in a specific area of 16x16x1.5 cm<sup>3</sup> named “C” for “center”, in order to avoid any composition gradient. Their location is described on Fig. 1.



**Fig.1: Schematization of the sampling of cheese blocks – Location of center slice “C” – examination directions: perpendicular (PR) or parallel (PL) to the pressing axis**

Another cheese age was studied by cutting samples in the center of commercial slices of semi-hard cheeses, which commonly corresponds to a cheese age of 5 weeks after the end of the production process. All samples were cut with a cork-borer (diameter 7 mm) along two possible examination directions: parallel (PL) or perpendicular (PR) to the cheese pressing axis (Fig. 1). Then, some discs were cut in the core samples, with a diameter  $D$  twice higher than their height  $H$  ( $D = 2H$ ). The discs' ends were carefully cut as parallel as possible in order to avoid any trouble during contact between samples and the rheometer's main head. After cutting, the discs were placed in an oil bath at 20 °C in order to equilibrate during at least 45 min. At least 3 replicates were made for each sample (slice, sampling direction, ripening time).

All rheological tests were carried out using an MCR 301 rheometer (Anton Paar, Austria), fitted with a plane geometry and used as a texturometer, i.e. driving the main head vertically and measuring the normal force. The main head was driven at an exponentially decreasing speed ( $\frac{dH}{dt}$ ) in order to maintain a constant biaxial extension rate  $\dot{\epsilon}_b$  ( $s^{-1}$ ), according to Eq.1.

$$\dot{\epsilon}_b = \frac{1}{2} \cdot \left[ \frac{dH}{H \cdot dt} \right] = cst \quad (\text{Eq. 1})$$

A Peltier plane ensured the temperature remained at 20 °C during all experiments. Each disc was placed on the lubricated Peltier plane and covered with silicon oil before being compressed by the rheometer's main head. The lubrication and geometry  $D = 2H$  ensured that samples were put in elongation mode only, with no shearing or compression, unlike what occurs when performing uniaxial compression. These conditions were chosen in order to design a test that could be as close as possible to the real eye growth conditions in cheese, where the cheese matrix is elongated between two growing bubbles. However, the  $\dot{\epsilon}_b$  range [0.001; 0.1  $s^{-1}$ ] achievable with the rheometer remained higher than the real eye growth rate, which is very slow. In literature, a relative rate of deformation was determined from X-rays pictures, and found to be ranging between  $10^{-5}$  and  $10^{-6} s^{-1}$  (Luyten 1988; Akkerman et al. 1989; Walstra 1991).

During LSF tests, the rheometer was driven in a way the height of the discs ( $H$  in mm) was known at every moment; the normal force ( $F$  in kPa) was measured by the rheometer, allowing the calculation of the biaxial stress ( $\sigma_b$  in kPa), strain ( $\epsilon_b$ ) and viscosity ( $\eta_b$  in kPa.s), according to Eq.2, Eq.3 and Eq.4, respectively, chosen according to Chaterei et al. (1981), as reviewed by Launay & Michon (2008). The strain was computed with the Hencky strain.

$$\sigma_b = \frac{F \cdot H}{\pi \cdot \left(\frac{D_0}{2}\right)^2 \cdot H_0} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\epsilon_H = -\frac{1}{2} \cdot \ln \left( \frac{H(t)}{H_0} \right) \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\eta_b = \frac{\sigma_b}{\dot{\epsilon}_b} \quad (\text{Eq. 4})$$

Eq.2, Eq.3 and Eq.4 apply only if the cheese can be considered as incompressible. In order to verify this hypothesis, compression tests were carried out using a TaxT2i (Stable Micro System, UK) texturometer and cheese profiles were recorded using a CCD camera. To do so, cheese cylinders with a diameter  $D_0 = 45$  mm and a height  $H_0 = 16$  mm were cut using a cork-borer. LSF tests were performed on these samples with the main head of the TaxT2i driven at constant speed. Then, a webcam (ToUcam ProII, Philips, Netherlands) took a 10 seconds movie (30 images. $s^{-1}$ ) with a 640x480 resolution during the lubricated compression of the cheese samples. The image acquisition settings were controlled with the GPL video capture/processing software (VirtualDub,



<http://www.virtualdub.org/index.html>): image frequency 10Hz, image size 640x480, and movie format in “.avi”. The movie built with all the acquired images was analyzed using Image J free software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) frame per frame. The variation of the cylinders volume  $\Delta V$  could thus be calculated thanks to the determination of the diameter  $D(t)$  of the cheese samples during the compression, as the height  $H(t)$  was directly calculated by the TaxT2i. In this simple compression case along the z axis, the relation between stress and volume variation can be established according to Eq.5.

$$\sigma = -3 \cdot K \cdot \frac{\Delta V}{V} \text{ with } K = \text{cst} \quad (\text{Eq. 5})$$

The Poisson coefficient  $\nu$  was determined based on Eq.5 and on the Hencky strain equation (Eq.6).

$$\nu = -\frac{\Delta R_0}{R} \cdot \frac{H_0}{\Delta H} \quad (\text{Eq. 6})$$

The diameter  $D(t)$  was calculated using the “rectangular selections” function, to draw a rectangle enclosing the cylinder image. It allowed the determination of an average diameter on the total height of the cylinder. The obtained average Poisson coefficient value after 5% strain was  $0.45 \pm 0.05$ , which proved that the incompressibility of the studied cheese is a good approximation. Before 5% strain, the Poisson coefficient ranged between 0.2 and 0.35 for Hencky strain. This smaller Poisson coefficient observed for  $\epsilon_b < 0.05$  can be explained by an experimental bias during very short times, due to the elastic behavior of the product. This property of cheese may have induced a delay in the LSF test. Moreover, the sides of the cylinders can never be perfectly parallel, so complete contact between cheese sample and the main head of the texturometer could be delayed which would induce an underestimated Poisson coefficient.

### 3. Results & Discussion

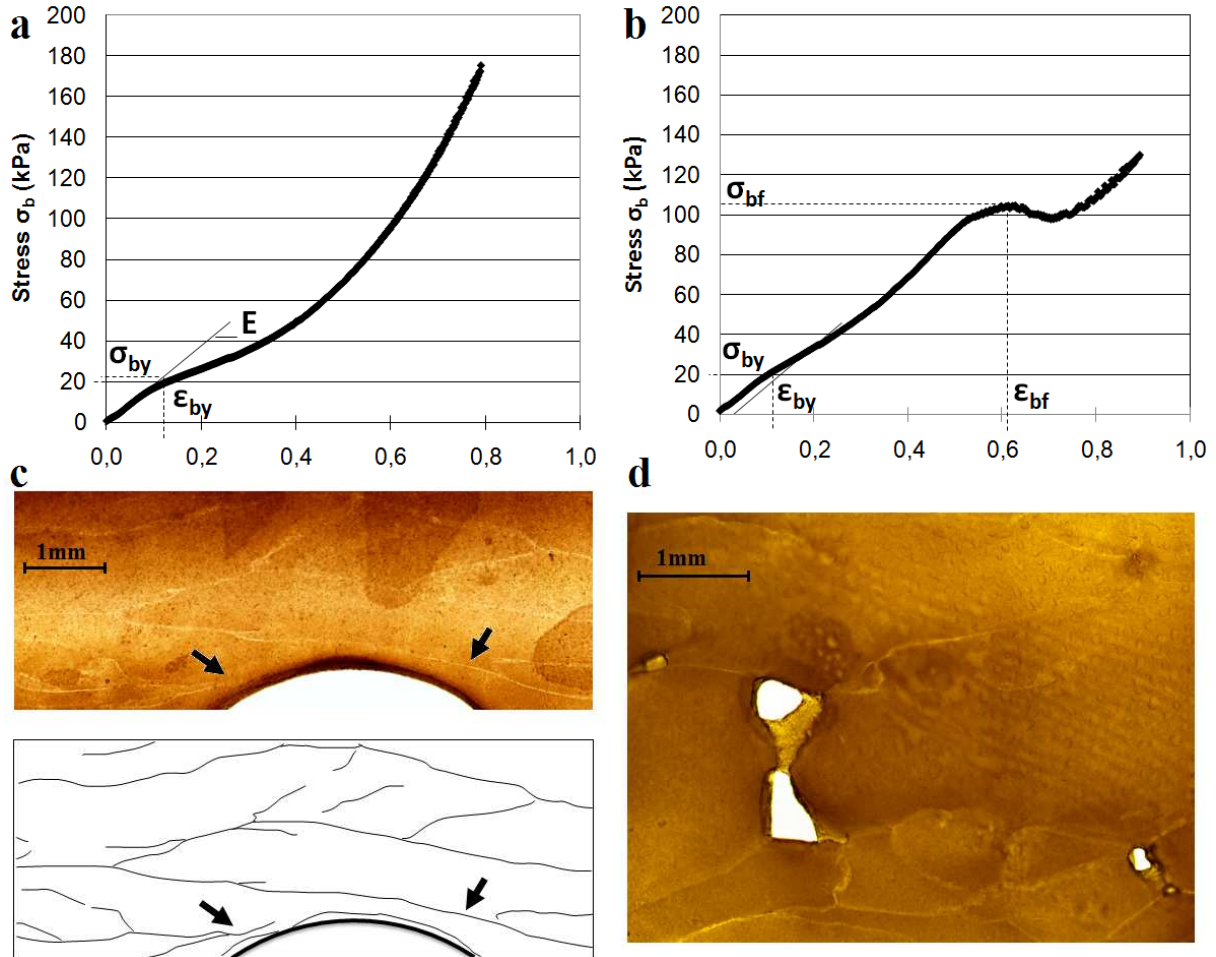
Cheese rheological properties can evolve as a function of both strain and biaxial extension rate, as it has already been demonstrated for other viscoelastic food materials like bread dough (Van Vliet et al. 1992; Launay&Michon 2008). This is why it is interesting to separate these effects along two different angles:

- constant biaxial strain conditions, to evaluate the influence of  $\dot{\epsilon}_b$  on flow curves.
- constant biaxial extension rate conditions to study the influence of  $\epsilon_b$  by performing LSF tests from low to high levels of strain.

Using this approach, both shear-thinning and strain-hardening properties of the cheese matrix could be determined independently.

### 3.1 Constant $\dot{\epsilon}_b$ : large deformation behavior

Eq. 2 and Eq. 3 were used to calculate the biaxial strain and stress. Representative examples of a typical curves observed in these LSF experiments on cheese samples are represented on Fig. 2.



**Fig.2:** Typical stress=f(strain) curves obtained in LSF test for semi-hard cheese (a) during ripening and (b) at a commercial stage. Light microscopy images of (c) curd grains around an eye during ripening and (d) micro-eyes and micro-cracks at curd grain junctions at a commercial stage in semi-hard cheeses

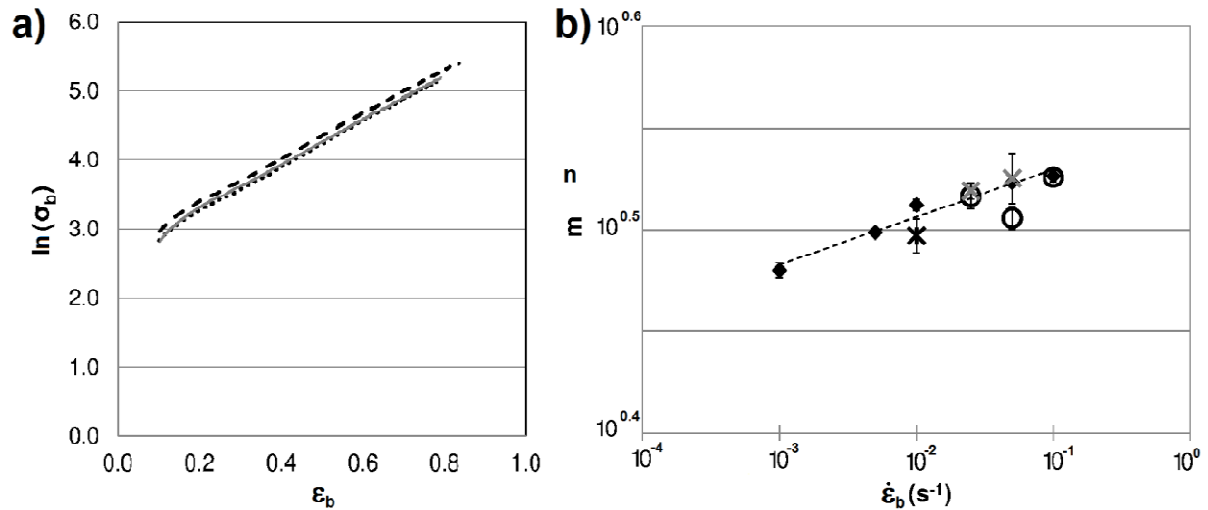
Two different behaviors could be observed according to the cheese age. During ripening, the cheese matrix never broke in the studied strain range (Fig. 2a). On the contrary, after ripening, storage and distribution, commercial slices all presented a fracture point (Fig. 2b). During ripening, the evolution of the rheological properties was investigated as regards to the eye growth, as very elongated curd grains were observed in light microscopy (Huc et al., 2013). As can be seen on Fig. 2c, curd grains were locally stretched around the eye, as marked by the black arrows. However, 1 mm away from the eye border, curd grains seemed unaffected, apparently undisturbed by the eye growth. At a commercial age, the cheese rheological properties were investigated as regards to slits and cracks. Indeed, some micro-cracks were observed in semi-hard cheeses, especially at the curd grain junctions (Fig. 2d) which is in good accordance with our previous observations (Huc et al., 2013). The response of the

cheese matrix to a high level of deformation at these two different ages could thus help to better understand both eye growth mechanisms and cracks' apparition. On the curve presented in Fig. 2a, a fourth-order polynomial equation could be fitted on the typical  $\sigma_b=f(\varepsilon_b)$  curves on the [0; 0.8] strain range. This polynomial equation did not have a specific physical meaning but was helpful to extract specific points in a reproducible way. A particular point was found in all cases, marked by a change of slope always appearing for a biaxial strain around  $\varepsilon_b \approx 0.06$ . It was analyzed as a yielding point and the yield stress  $\sigma_{by}$  and strain  $\varepsilon_{by}$  could be retrieved as rheological indicators of the matrix behavior at the end of the linear domain obtained in small deformations conditions. They were computed using the fourth-order polynomial equations fitted on the stress-strain data. The Young Modulus E (kPa) was also calculated as the initial slope of the curve. Another change in slope could be seen on the curves for  $\varepsilon_b \approx 0.30-0.40$ , which could correspond to a structural change in the samples or a lubrication problem. However, it was always present on the  $\sigma_b=f(\varepsilon_b)$  curves, which is why a structure modification was the privileged hypothesis as regards the lubrication issue. In the case of commercial samples, the yield stress and strain were calculated using this same method, but the fracture stress  $\sigma_{bf}$  and strain  $\varepsilon_{bf}$  could also be retrieved, as a local maximum value.

The yielding point is usually not a common indicator in literature, as there is always a macroscopic fracture occurring. In the present study, as samples did not fracture during ripening, the yield stress and strain were chosen with the Young Modulus, to discuss cheese rheological properties as regards to eye growth. However, even if the fracture stress and strain are commonly used as rheological indicators in literature, the yielding point can also be mentioned for some cheeses like Cheddar (Hort et al. 1997). Moreover, Pollak and Peleg (1980) showed that for Agar gels, apple flesh and potato tissues, the fracture point marked as the maximal stress on the stress-strain curves was in reality occurring over a region and not instantly at a specific point of compression. Other authors also presented an early change in slope in the typical large deformation stress-strain curve for Cheddar, enhancing the possible explanation that the lower slope after this point may be caused by microcracks (O'Callaghan and Guinee 2004; Guinee 2011; Ak and Gunasekaran 1992). Some stress could be dissipated after the change in slope, even if cracks were not seen spreading inside the samples. The present  $\sigma_{by}$  and  $\varepsilon_{by}$  indicators could correspond to these early changes in slope observed for other cheeses way before the fracture point. Finally, the fracture stress and strain will be discussed in a chapter dedicated to the slits phenomenon.

Aiming for a better understanding of the cheese matrix behavior when undergoing large deformations, as what is going on during eye growth, LSF tests were performed on samples taken along the pressing axis direction (PL) at the end of a 12 °C ripening period. Four experimental campaigns based on 3 to 10 replicates were realized at a constant biaxial extension rate. According to previous LSF works carried out on bread dough, an interesting angle to study the evolution of biaxial stress towards biaxial strain is to plot the evolution of  $\ln(\sigma_b)=f(\varepsilon_b)$  (Launay & Michon, 2008). The strain range was chosen

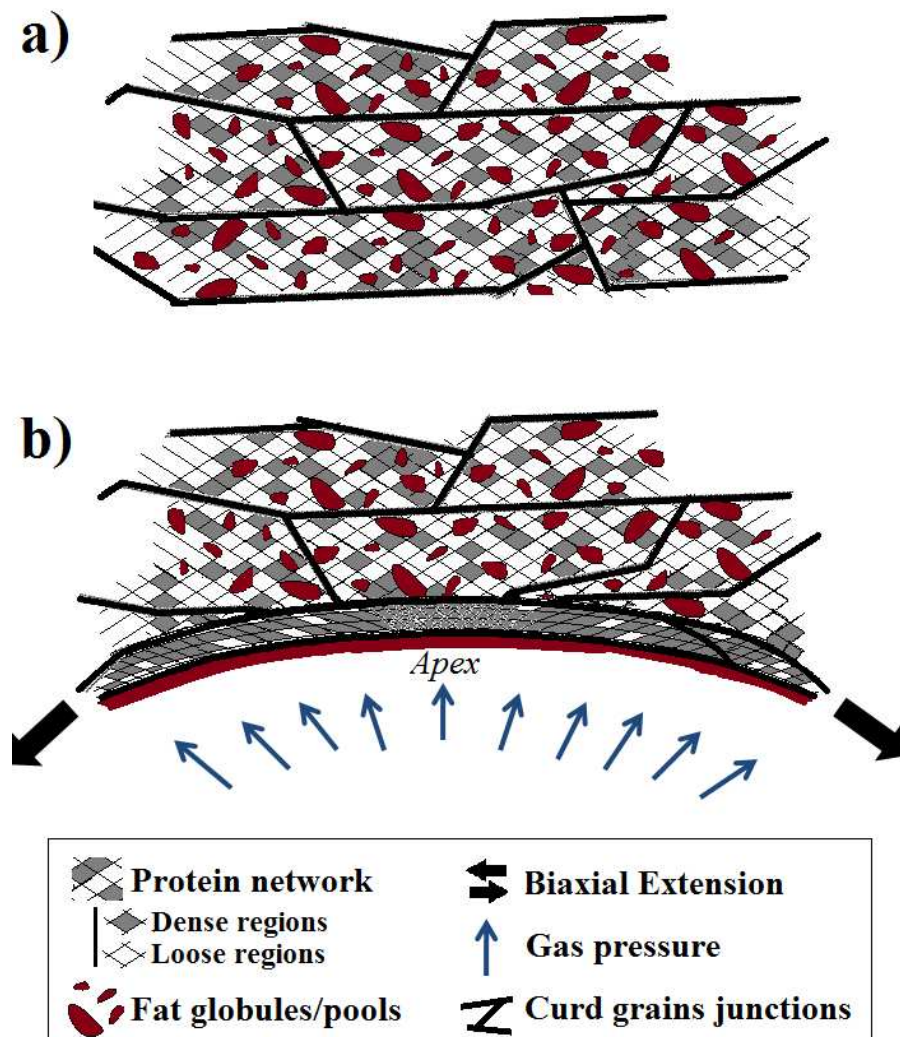
between 0.10 and 0.80 in order to study the samples after the linear domain. The curves were found to be linear and an “m” coefficient was determined as the slope of the  $\ln(\sigma_b)=f(\epsilon_b)$  curves (Fig. 3a). It was determined for different biaxial extension rates: 0.001, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05 and  $0.1\text{s}^{-1}$ . All “m” values ranged from 3 to 3.5 which correspond to 0.47 to 0.53 on the logarithm scale, in the studied strain level [0.10 – 0.80] and for four different cheese productions, as can be seen on Fig. 3b.



**Fig.3:** Comparison of (a)  $\log(\sigma_b)=f(\epsilon_b)$  linear curves for semi-hard cheeses during ripening (12 °C period), example at  $\dot{\epsilon}_b = 0.01\text{s}^{-1}$  with 3 repetitions in April 2012 and (b) several "m" coefficients obtained in the strain range [0.10 - 0.80] for different biaxial extension rates (log/log representation) during different campaigns (×Batch1; ○ June 2011; × January 2012; ◆ April 2012)

The four experiments led during two consecutive years possessed a good reproducibility and showed that “m” values shortly increased with biaxial extension rate. As  $m > 2$ , the cheese matrix displays some strain-hardening properties, which imply some structural changes in the cheese body. The exact organization of cheese microstructure is not well known in literature to the best of our knowledge. Indeed, the protein network is composed of caseins that were subjected to numerous thermo-mechanical treatments during cheese making. Some studies showed that the original micelle organization of caseins in milk is lost during cheese making and replaced by a continuous network when entering ripening (Kalab et al. 1978, Rousseau et al. 1989, Lopez et al. 2007). The presently demonstrated strain-hardening properties could correspond to rearrangements inside this protein network, which is highly deformed around eyes during their growth (Fig. 2c). This elongation of curd grains could induce a reduction in the mesh size of the casein network. Moreover, some experiments carried out on native caseins showed that concentrated solutions of caseins can be extensively compressed, due to their composition based on denser regions separated by a continuous phase (Bouchoux, Cayemite et al. 2009, Bouchoux, Debbou et al. 2009). During compression, the dense parts of the casein network would be stacked together and could form new bonds, acting like a solid. Even if this work and the present study were carried out in very different conditions (no water loss for

example), this hypothesis of denser zones being brought together by compression of caseins can inspire the idea of potential rearrangements in the protein network forming curd grains and surrounding an eye during its growth, as can be schematized on Fig. 4.



**Fig.4: Schematization of curd grains behavior around a growing eye picturing the local deformation during biaxial extension and the expulsion of fat towards eye border**

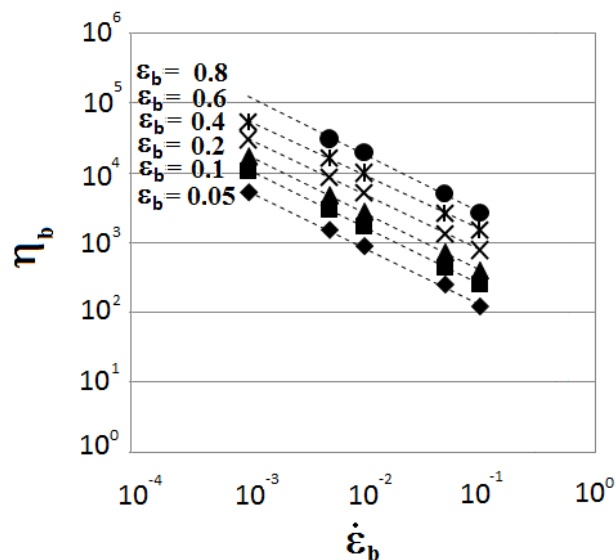
The grid represents the protein network, with some voids in white and some dense parts in grey. The black lines stand for fat-depleted curd grain junctions, based on light microscopy, CLSM and SEM observations carried out on Swiss-type cheese (Kalab et al. 1978, Kalab et al. 1982, Famelart et al. 2001, Lopez et al. 2007, Huc et al. 2013). It can be seen that curd grains can be extensively deformed because of eye growth until one curd grain becomes completely extended around an eye in an arc shape. However, further from the eye, curd grains kept their original “brick” form, which means that the deformation must be a very local phenomenon. The fat content was also represented on Fig. 4 as globules and aggregates, as was described by Lopez et al. (Lopez et al. 2007, Lopez & Briard-Bon 2007). Using the previous hypothesis of a mesh size reduction due to protein network compression around a growing eye, dense parts (grey squares on Fig. 4) of the network should be brought closer to

one another. This could impact the fat content by expelling fat pools and/or globules outside the eye. It would fit the observation of a pure-fat layer from 20 to 200 $\mu\text{m}$  found at the eye external border in Swiss-type cheese in CLSM (Huc et al. submitted). This result is also in good agreement with CLSM observations carried out on Cantal cheese, underlining the fact that fat cannot be trapped in the protein network due to its disruption during cheese making, which is why it is easily extracted from the cheese body (De Freitas et al. 2005).

Finally, the “m” coefficient’s increase along with  $\dot{\epsilon}_b$  can be explained by a higher elastic contribution when the biaxial extension rate increases, which is a characteristic property of viscoelastic materials (Fig. 3b). As the log/log plot of  $m=f(\dot{\epsilon}_b)$  can be linearized, the “m” values can be extrapolated towards lower biaxial extension rates, closer to the real conditions in cheese. In a  $10^{-5} - 10^{-6} \text{ s}^{-1}$   $\dot{\epsilon}_b$  range, “m” values ranged from 2.7 to 2.6. As a consequence, the cheese strain-hardening behavior is also expressed in real eye growth conditions, confirming the hypothesis previously made on microstructure changes during ripening.

### 3.2 Constant $\epsilon_b$ : Flow curves

Cheese viscosity was calculated on cheese samples cut parallel to the pressing axis (PL) at the end of a cold room, for several strain levels: 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 and 0.8. The evolution of the flow curves  $\eta_b=f(\dot{\epsilon}_b)$  is presented on Fig. 5 as a function of the biaxial extension rate.



**Fig.5: Flow curves of cheese samples submitted to constant biaxial extension rate at different strain levels**

The biaxial viscosity decreases when the biaxial extension rate increases, along a power law curve  $\eta_b = A \cdot \dot{\epsilon}_b^{n-1}$  with  $A = \text{cst}$  and a  $(n-1)$  slope. The “n” coefficient was constant for  $\epsilon_b \in [0.05; 0.80]$ , with an average value of  $0.19 \pm 0.02$ . As  $n < 1$ , the cheese matrix displays shear-thinning properties, with strain between 0.05 and 0.8. These results are in good agreement with the shear-thinning behavior

enlightened in literature for several cheeses using uniaxial compression: Cheddar (Ak and Gunasekaran 1992) and Swiss-type cheese (Rohm and Lederer 1992), as can be seen on Table 1.

**Table 9: Comparison of shear-thinning behavior of several cheeses**

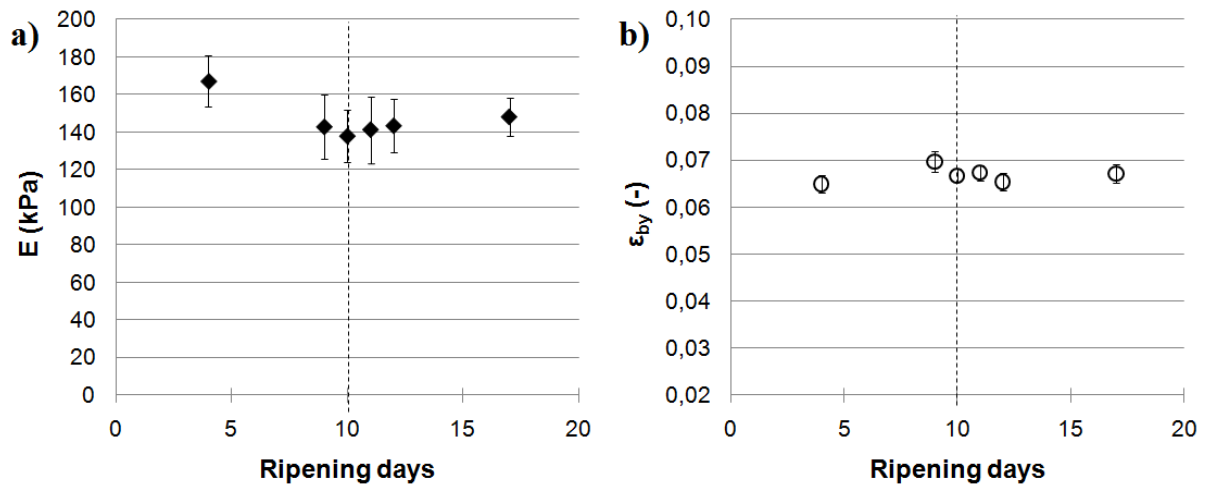
References	Cheese	“n” slope $\eta=f(\dot{\epsilon})$
Luyten et al., 1988	Cheddar cheese	[0.15 – 0.20]
Ak et al., 1992	Cheddar cheese	0.15
Rohm et al., 1992	Swiss-type cheese	0.18

All values of “n” obtained in literature were found between 0.15 and 0.20 which is in very good agreement with the present one of 0.19.

### 3.3 Influence of process and of protocol parameters

#### - Evolution during ripening (time & temperature)

A batch of cheeses was followed during their three-week ripening, some of them being cut at different ages in order to determine the Young Modulus, the yield stress and the yield strain. LSF tests were carried out with a biaxial extension rate  $\dot{\epsilon}_b = 0.01s^{-1}$ . The change from cold room to hot room appeared at Day 10, as can be seen on Fig. 6.



**Fig.6: Evolution of the Young Modulus (a) and yield strain (b) during ripening – dotted line represents the temperature change from 12 to 20°C**

During cold room, the Young Modulus (Fig. 6a) seems to decrease, but this difference is not significant (P-value = 0.21). Moreover, E remains constant during hot room. Therefore, ripening time does not seem to significantly affect the Young Modulus. Even the temperature switch from cold to hot room occurring at Day 10 does not seem to impact the Young Modulus, maybe because all measurements were carried out at 20°C. The average value of Young Modulus for the studied cheese during its ripening is  $150 \pm 10$  kPa. As E is strongly correlated to the yield stress, the same results are

obtained for  $\sigma_{by}$  which is not influenced by ripening time or temperature switch. As for the yield strain, according to Fig. 6b, this indicator is not influenced by either the ripening time or the temperature switch. It remains constant during the whole ripening with an average value of  $0.067 \pm 0.001$ . These rheological properties that do not depend on cheese age represent an unusual fact, according to other studies led on different cheeses. For Gouda cheese, cheese maturation affected the compression modulus which increased during ripening (Culioli and Sherman 1976; Luyten 1988; Luyten and vanVliet 1996). However, this maturation effect was explained by a water loss during a long ripening, so the modulus did not depend on the cheese age but rather on the water content (for a given pH and salt content). As the present cheeses were packed in impermeable films, there was no water loss during ripening, which could explain the independence of Young Modulus towards cheese age. Other studies found a decreasing firmness of Cheddar during ripening that could be explained by proteolysis inducing a reduction of intact caseins in the cheese matrix (Fenelon and Guinee 2000). The fracture properties of cheese were also found to be time-dependent: they usually decreased during ripening because of proteolysis and casein hydration, which imply a protein breakdown and a loss of matrix elasticity. The fracture stress of Cheddar, Comté, Gouda, Emmental and Pizza Cheese cheese would be influenced by the content in intact  $\alpha_{s1}$ -casein, and the fracture strain would be related to the content in NPN (Creamer and Olson 1982; Luyten 1988; Grappin et al. 1993; Luyten and vanVliet 1996; Bachmann et al. 1999; Brown 2002; Fox et al. 1996; Guinee 2011). In the present case, the rheological indicators being independent on cheese age may be due to a too short ripening time-scale.

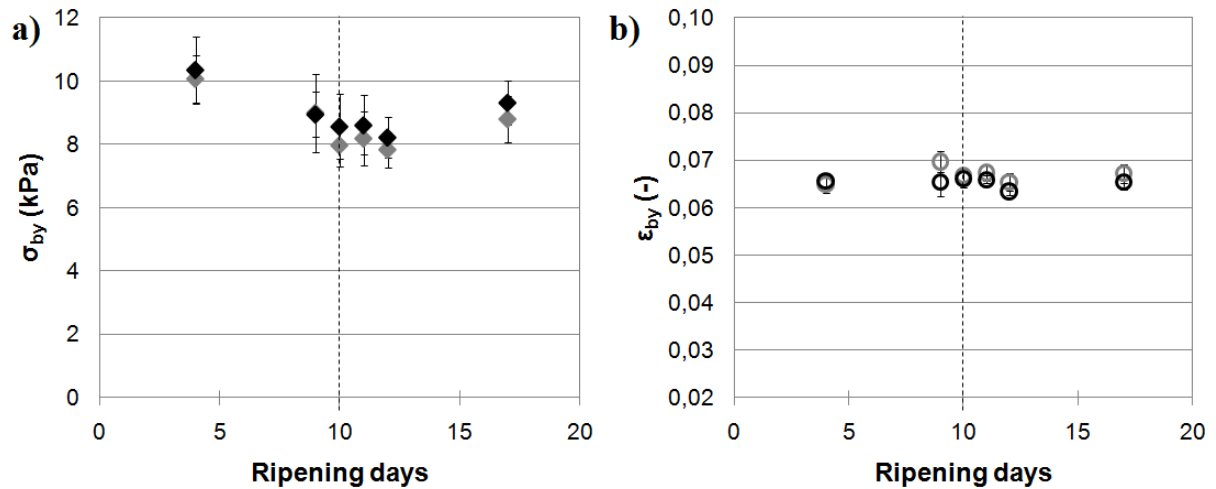
As for the influence of temperature, the resistance force of cheeses like Gouda, Cheddar or processed cheeses decreased with increasing ripening temperature (Culioli and Sherman 1976; Casiraghi et al. 1985; Lawrence et al. 1987). It was mostly explained by a higher proteolysis due to higher temperatures. However, Akkerman et al. (1993) judged less clear the influence of temperature on the fracture stress of curd grains, as it can be counterbalanced by a lower strength of bonds between curd grains. In the present study, the ripening temperature gradient may not be high enough, or the ripening time long enough to induce any change in proteolysis that would have an impact on the rheological properties.

#### - Anisotropy

Several cheeses, including pressed and non-cooked curd cheeses, possess curd grains organized along a horizontal main axis: Emmental and Raclette (Ruegg and Moor 1987), Swiss-type cheese (Huc et al. submitted), Cheddar (Lowrie et al. 1982). This organization induced by the pressing step is anisotropic, as the grains can be clearly seen only perpendicularly to the pressing axis. Therefore, the occurrence of a rheological anisotropy had to be tested in order to check if this anisotropic macroscopic structure of the grains may influence the properties of the matrix. LSF tests were



performed on cheeses samples taken from a direction perpendicular or parallel to the pressing axis during ripening, with a biaxial extension rate of  $0.01\text{s}^{-1}$ , as presented on Fig. 7.

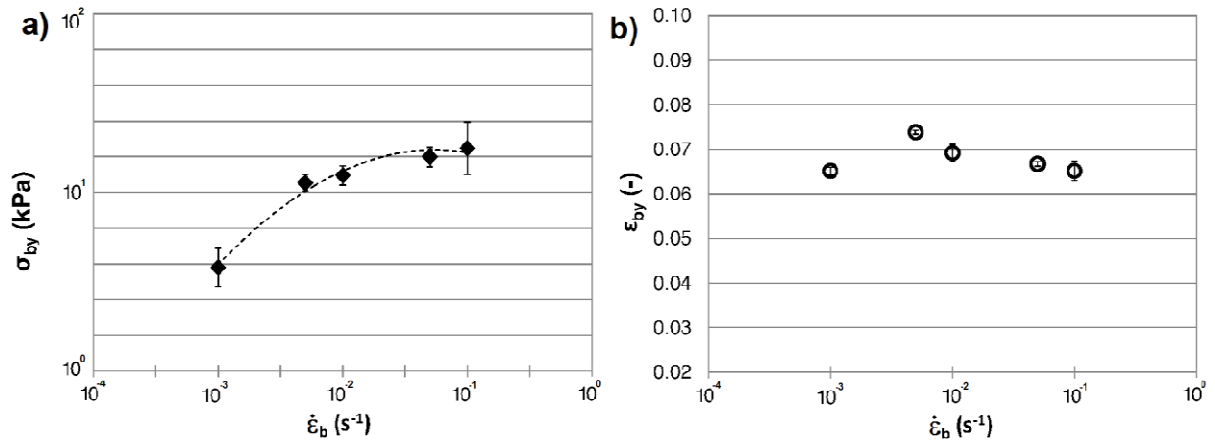


**Fig.7: Evolution of yield stress (a) and yield strain (b) during ripening on samples cut perpendicular (PR in black) or parallel (PL in grey) to the pressing axis – dotted line represents the temperature change from 12 to 20°C – Each point represents the average value taken out of 10 replicates**

Even if PR  $\sigma_{by}$  points are systematically seen above PL ones, there is no significant difference between PR and PL samples on the yield stress values (Fig. 7a). Moreover, the yield strain is even less influenced by the sampling direction, as PR and PL points are almost all superimposed on Fig. 7b. The anisotropic organization of the curd grains does not seem to influence the yield parameters of this cheese matrix. This result is in good agreement with the isotropic behavior found for Swiss-type cheeses like Emmental, Gruyère or Appelenzer by Eberhard et al. (Eberhard 1985). However, other cheeses displayed an anisotropic behavior, like Comté (Grappin et al. 1993) or Tilsit (Weinrichter et al. 2000). For Comté cheese, the fracture strain and stress of axial samples were higher than the ones of perpendicular samples. For Tilsit cheese, only Young Modulus and fracture stress were impacted by the sampling direction, whereas the fracture strain was not significantly affected. Therefore, structure anisotropy can impact the rheological properties of cheese. However, even if these cheeses relied on fabrication processes very different from those of Swiss-type cheeses, it is commonly known that cracks spread only horizontally in cheese, which means perpendicularly to the pressing axis (Grappin et al. 1993). However, no macroscopic fracture could ever be produced in the present samples, which means that they were never put in crack-appearing conditions. The present results may thus be insufficient to exhaustively describe curd grains anisotropy influence on rheological properties. A complementary study led at other cheese ages and temperatures could be interesting, especially as cracks often occur during the cheese storage step, usually carried out at a lower temperature (lower than 10°C).

- Influence of biaxial extension rate

The experimental biaxial extension rate should be as low as possible in order to better approximate the real eye growth rate in cheese during ripening. However, the rheometer cannot perform all rates, especially very slow ones, because of measurement sensitivity. A wide range of biaxial extension rates going from 0.001 to 0.1s<sup>-1</sup> was tested in order to determine whether or not it could impact the stress and strain at the yielding point and, if possible, extrapolate towards lower biaxial rates down to 10<sup>-5</sup> to 10<sup>-6</sup> s<sup>-1</sup> which is realistic in comparison to biaxial extension in eyes. The evolution of  $\sigma_{by}$  and  $\epsilon_{by}$  as a function of the biaxial extension rate is presented on Fig. 8.



**Fig.8: Evolution of yield stress (a) and yield strain (b) with the biaxial extension rate – each point represents the average value taken out of 3 replicates**

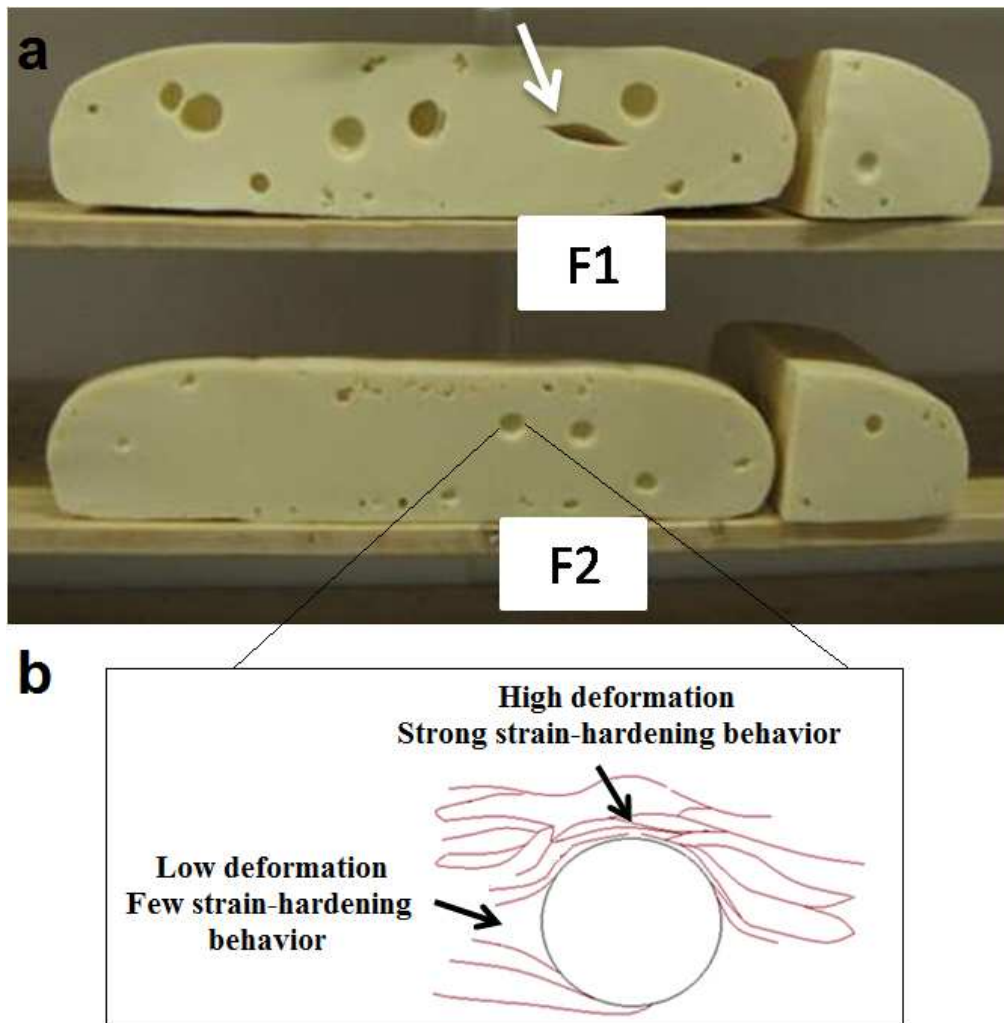
The biaxial yield stress values increase with the biaxial extension rate (Fig. 8a), forming a second-degree polynomial curve ( $R^2=0.98$ ). Based on this polynomial equation, it is possible to extrapolate the biaxial yield strain at lower biaxial rates, closer to real eye growth conditions. For a more realistic biaxial rate of 5.10<sup>-6</sup>s<sup>-1</sup>,  $\sigma_{by}$  would be lower, which is equal to 5.8Pa. Because it is highly correlated with  $\sigma_{by}$ , the Young Modulus is also decreasing with a decreasing biaxial extension rate. On the contrary, the biaxial yield strain is not influenced by the biaxial extension rate and remains constant (Fig. 8b). Its threshold value is  $\epsilon_{by}=0.068\pm 0.003$  for  $\dot{\epsilon}_b \in [10^{-3}; 10^{-1} \text{ s}^{-1}]$  and should remain constant if extrapolated to real eye growth conditions when  $\dot{\epsilon}_b \in [10^{-5} - 10^{-6} \text{ s}^{-1}]$ . The dependence of macroscopic fracture stress (and Young Modulus) on time scale was also highlighted in literature and explained by the viscoelastic behavior of cheese: Swiss-type cheeses (Rohm and Lederer 1992), Cheddar (Creamer and Olson 1982), Monterey Jack (Brown 2002; Foegeding and Drake 2007) and Gouda (Luyten and vanVliet 1996). On the contrary, the fracture strain is often found to be uninfluenced by the strain rate, as for Cheddar (Creamer and Olson 1982; Ak and Gunasekaran 1992) or “type 1” Gouda (Luyten 1988; Luyten et al. 1991). However, other authors found a decreasing  $\epsilon_f$ , increasing  $\epsilon_f$ , or both (Luyten 1988; Rohm and Lederer 1992; Luyten and vanVliet 1996) with an increasing strain rate range.

In the present study, for small biaxial extension rates or long time scales, the resistance of the cheese matrix would be easily overcome. The apparent yielding stress would tend to zero so the cheese would always flow, which is in good agreement with a very viscous liquid behavior (as shown by very long relaxation experiments (Laridon et al submitted)). It could explain the apparent increase in biaxial yield stress with biaxial extension rate found on Fig. 8a, if the dissipated energy can be neglected during the experiment. During cheese making, eyes could thus start growing very easily in a non-resistant cheese matrix, because of the long time scale. However, curd grains would be strongly deformed during ripening, as can be seen using light microscopy (Huc et al. 2013).

### *3.4 Fracture behavior*

For commercial slices, a fracture stress was found between 60 and 145 kPa for a biaxial extension rate comprised between  $4 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  and  $3 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ , whereas the fracture strain was always found around 0.53. Therefore, at this commercial stage, whatever the extension rate applied, the cheese matrix will fracture if a 0.53 deformation level is reached.

According to its postulated organization (Fig. 4), the final microstructure of the semi-hard cheese matrix submitted to eye growth would be a distorted protein network directly around the eye, with maybe a highest deformation at the apex of the arc, due to biaxial extension (black arrows on Fig. 4). Because of the cheese strain-hardening properties, this zone of highest deformation would also become the most resistant, which could explain why cracks are never seen in the vertical pressing direction but only horizontally in cheese. For example, a crack was observed during a storage period at 6 °C, after ripening, as presented in Fig. 9



**Fig.9: (a) Example of a crack in a semi-hard cheese block stored at 4°C; (b) schematic organization of curd grains around an eye showing highest and lowest zones of deformation**

Fig. 9 showed a crack spreading in the center of a semi-hard cheese (number F1), as marked by the white arrow, according to a horizontal main axis. It was 5.2 cm long and 1.3 cm wide. However, no crack could be found in other cheeses, as can be seen for F2. This propagation of cracks could match not only the phenomenon of strain-hardening properties of cheese, but also the observations made by Huc et al. (2013) showing that curd grains on the sides of an opening formed an “eye” pattern (a triangle shape), as schematized on Fig. 9b. On the contrary, they formed a “crown” pattern around the upper half of an opening. Therefore, maybe the cracks display a preferential horizontal propagation because of the strain-hardening properties that are minimal on the sides of the eyes and/or because the adjacent curd grains expose more junctions, where several micro-cracks have been spotted in semi-hard cheeses (Huc et al. 2013).

## 4. Conclusion

LSF tests were successfully applied to a hard cheese. Its rheological properties were investigated at constant level of strain and constant biaxial extension rate. Flow curves enlightened some shear-thinning properties.  $\ln(\sigma_b)=f(\epsilon_b)$  curves were characteristic of a strain-hardening behavior, increasing with the biaxial extension rate, due to the viscoelastic properties of cheese. This property may be linked to light and confocal laser scanning microscopy observations showing that curd grains are highly deformed without being fractured at the apex of eyes, with a fat layer coating the outside of the eyes. The strong deformation of the protein network inside curd grains occurring during eye growth could cause an expulsion of fat pools out of the cheese body towards eye periphery. Moreover, the strain-hardening properties could also explain why cracks always spread horizontally, as the resistance of the paste should be maximal at the apex of an eye due to the strain-hardening behavior.

Finally, it appeared that neither cheese age nor sampling direction affected the rheological properties of the studied cheese. The absence of influence of ripening time on the rheological properties may be explained by the cheeses' packaging, which prevented any water loss. The biaxial extension rate was found to influence only  $\sigma_{by}$  and  $E$  whereas  $\epsilon_{by}$  remained unchanged in a  $10^{-3}$ - $10^{-1}$  s<sup>-1</sup> range. This dependence of some rheological indicators on the extension rate is due to the viscoelastic behavior of cheese, and it underlined the importance of investigating both viscous and elastic properties of these products.

## Acknowledgements

The authors thank Gabrielle Moulin, Julien Mottet, Antony Huttin and Larissa Bertollo for performing the LSF tests; the Regional Council of Bretagne, Basse Normandie and Pays de la Loire, the General Council of Ille et Vilaine and the competitiveness cluster Valorial for their financial support.

## References

- Ak, M.M., & Gunasekaran, S. (1992). Stress-Strain Curve Analysis of Cheddar Cheese under Uniaxial Compression. *Journal of Food Science*, 57 (5):1078-1081. doi:10.1111/j.1365-2621.1992.tb11268.x
- Akkerman, J.C., Walstra, P., & Vandijk, H.J.M. (1989). Holes in Dutch-type cheese 1. Conditions allowing eye formation. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 43 (4):453-476
- Akkerlan, J.C., Lewis, R.O., & Walstra P. (1993). Fusion of curd grains. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 47: 137-144
- Bachmann, H.P., Butikofer, U., & Meyer, J. (1999). Prediction of flavour and texture development in Swiss-type cheeses. *Food Science and Technology Lebensmittel Wissenschaft & Technologie*, 32 (5):284-289
- Bars, D.I., & Bergere, J.L. (1976). Measurement of cheese texture with a simple instrument. *Lait*, 56 (558):485-494

- Bouchoux, A., Cayemite, P.E., Jardin, J., Gésan-Guiziou, G., & Cabane, B. (2009). Casein Micelle Dispersions under Osmotic Stress. *Biophysical. Journal*, 96:693-706
- Bouchoux, A., Debbou, B., Gésan-Guiziou, G., Famelart, M.H., Doublier, J.L., & Cabane, B. (2009). Rheology and phase behavior of dense casein micelle dispersions. *The Journal of Chemical Physics*, doi:10.1063/1.3245956
- Brandsma, R.L., & Rizvi, S.S.H. (2001). Effect of manufacturing treatments on the rheological character of Mozzarella cheese made from microfiltration retentate depleted of whey proteins. *International Journal of Food Science and Technology*, 36 (6):601-610
- Brown, J.A. (2002). Cheese Texture. Graduate Faculty of North Carolina State University, Raleigh
- Casiraghi, E.M., Bagley, E.B., Christianson, D.D. (1985). Behavior of Mozzarella, Cheddar and Processed cheese spread in lubricated and bonded uniaxial compression. *Journal of Texture Studies*, 16 (3):281-301
- Chateri, S.H., Macosko, C.W., & Winter, H.H. (1981). Lubricated squeezing flow: a new biaxial extension rheometer. *Journal of Rheology*, 25, 433
- Creamer, L.K., & Olson, N.F. (1982). Rheological Evaluation of Maturing Cheddar Cheese. *Journal of Food Science*, 47 (2):631-636. doi:10.1111/j.1365-2621.1982.tb10138.x
- Culioli, J., & Sherman, P. (1976). Evaluation of Gouda cheese firmness by compression tests. *Journal of Texture Studies*, 7 (3):353-372. doi:10.1111/j.1745-4603.1976.tb01142.x
- De Freitas, I., Pinon, N., Lopez, C., Thierry, A., Maubois, J.L., & Lortal, S. (2005). Microstructure, physiochemistry, microbial populations and aroma compounds of ripened Cantal cheeses. *Lait*, 85:453-468
- Eberhard, P.P. (1985). Rheologische Eigenschaften ausgewählter Käsesorten ETH Zurich, Zurich
- Famelart, M.H., Le Graet, Y., Michel, F., Richoux, R., & Riaublanc, A. (2002). Evaluation of the methods of measurement for functional properties of Emmental cheeses from the west of France. *Lait*, 82 (2):225-245
- Fenelon, M.A., & Guinee, T.P. (2000). Primary proteolysis and textural changes during ripening in Cheddar cheeses manufactured to different fat contents. *International Dairy Journal*, 10 (3):151-158
- Foegeding, E.A., & Drake, M.A. (2007). Invited review: Sensory and mechanical properties of cheese texture. *Journal of Dairy Science*, 90 (4):1611-1624. doi:10.3168/jds.2006-703
- Fox, P.F., Oconnor, T.P., McSweeney, P.L.H., Guinee, T.P., & O'Brien, N.M. (1996). Cheese: Physical, biochemical, and nutritional aspects. In: Taylor SL (ed) *Advances in Food and Nutrition Research*, Vol 39. *Advances in Food and Nutrition Research*. Academic Press Inc, 525 B Street/Suite 1900/San Diego/CA 92101-4495, pp 163-328
- Grappin, R., Lefier, D., Dasen, A., & Pochet, S. (1993). Characterizing ripening of Gruyere de Comte: influence of time \* temperature and salting conditions on eye and slit formation. *International Dairy Journal*, 1993. pp 313-328

- Guinee, T.P. (2011). Cheese | Cheese Rheology. In: Editor-in-Chief: John WF (ed) Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition). Academic Press, San Diego, pp 685-697. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00082-0>
- Hort, J., Grys, G., & Woodman, J. (1997). The relationships between the chemical, rheological and textural properties of Cheddar cheese. *Lait*, 77 (5):587-600
- Huc, D., Moulin, G., Mariette, F., & Michon C. (2013). Investigation of curd grains in Swiss-type cheese using light and confocal laser scanning microscopy. *International Dairy Journal*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.05.017>
- Kalab, M., Lowrie, R.J., & Nichols, D. (1982). Detection of Curd Granule and Milled Curd Junctions in Cheddar Cheese. *Journal of Dairy Science*, 65 (7):1117-1121
- Launay, B., Michon, C. (2008). Biaxial extension of wheat flour doughs: Lubricated Squeezing Flow and stress relaxation properties. *Journal of Texture Studies*, 39 (5):496-529. doi:10.1111/j.1745-4603.2008.00156.x
- Lawrence, R.C., Creamer, L.K., & Gilles, J. (1987). Texture Development During Cheese Ripening. *Journal of Dairy Science*, 70 (8):1748-1760. doi:[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(87\)80207-2](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(87)80207-2)
- Lopez. C., Camier, B., & Gassi, J.Y. (2007). Development of the milk fat microstructure during the manufacture and ripening of Emmental cheese observed by confocal laser scanning microscopy. *International Dairy Journal*, 17:235-247
- Lopez, C., & Briard-Bion, V. (2007). The composition, supramolecular organisation and thermal properties of milk fat: a new challenge for the quality of food products. *Lait*, 87:317-336
- Lowrie, R.J., Kalab, M., & Nichols, D. (1982)? Curd granule and milled curd junction patterns un Cheddar made by traditionnal and mechanized processes. *Journal of Dairy Science*, 65 (7):1122-1129
- Luyten, H. (1988). The rheological and fracture properties of Gouda cheese. Luyten, Wageningen
- Luyten, H., & vanVliet, T. (1996). Effect of maturation on large deformation and fracture properties of (semi-)hard cheeses. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 50 (2):295-307
- Luyten, H., vanVliet, T., & Walstra, P. (1991). Characterization of the consistency of Gouda cheese - Fracture properties. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 45 (1):55-80
- Pollak, N., & Peleg, M. (1980). Early indications of failure in large compressive deformation of slodi foods. *Journal of Food Science*, 45 (4):825-&. doi:10.1111/j.1365-2621.1980.tb07459.x
- Rohm, H., & Lederer, H. (1992). Uniaxial compression of Swiss-type cheese at different strain rates. *International Dairy Journal*, 2 (6):331-343
- Rousseau, M., & Le Gallo, C. (1990). Etude de la structure de l'Emmental au cours de la fabrication, par la technique de microscopie à balayage électronique. *Lait*, 70: 55-66
- Ruegg, M., Moor, U. (1987). The size distribution and shape of curd granules in traditionnal Swiss hard and semihard cheeses. *Food Microstructure*, 6 (1):35-46

- Suwonsichon, T., & Peleg, M. (1999). Rheological characterization of ricotta cheeses by imperfect squeezing flow viscometry. *Journal of Texture Studies*, 30 (1):89-103
- van Vliet, T., Janseen, A.M., Bloksma, A.H., & Walstra, P. (1992). Strain hardening of dough as a requirement for gas retention. *Journal of Textures Studies*, 23: 439-460
- Venerus, D.C., & Kompani, M. (2000). Equibiaxial extensional flow of polymer melts via lubricated squeezing flow. II. Flow modelin. *Rheologica Acta*, 39, 574-582.
- Walstra, P. (1991). Rheological foundation of eye or slit formation Bulletin - FIL-IDF n°268:p 65-66
- Wang, Y.C., Muthukumarappan, K., Ak, M.M., & Gunasekaran, S. (1998). A device for evaluating melt/flow characteristics of cheeses. *Journal of Texture Studies*, 29 (1):43-55.
- Watkinson, P.J., & Jackson, L.F. (1999). New procedure for estimating the modulus of deformability of cheese from uniaxial compression tests. *Journal of Texture Studies*, 30 (5):563-580
- Weinrichter, B., Rohm, H., & Jaros, D. (2000). Mechanical properties of unpressed semi-hard cheeses by uniaxial compression. *Journal of Texture Studies*, 31 (2):141-152



## 2.4 Facteurs d'influence sur la croissance de bulles

### 2.4.1 Etude de l'évolution de la microstructure dans le temps et dans les fromages (A4)

Ce quatrième article a fait l'objet d'une soumission auprès d'*Innovative Food Science and Emerging Technologies* en Juillet 2013 et est en attente de traitement.

### **Multi-scale investigation of eyes in semi-hard cheese**

#### **Authors:**

D. Huc<sup>abcde</sup>, F. Mariette<sup>de</sup>, S. Challoy<sup>de</sup>, J. Barreau<sup>abc</sup>, G. Moulin<sup>abc</sup>, C. Michon<sup>abc\*</sup>

(a) AgroParisTech, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments F-91300 MASSY

(b) INRA, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments Olympiades F-91300 MASSY

(c) CNAM, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments, F-75003 PARIS

(d) IRSTEA, UR TERE, 17 Avenue de Cucillé, CS 64427, F-35044 RENNES

(e) Université européenne de Bretagne, France

#### **Abstract**

Semi-hard cheeses can be characterized by their bubbles, or “eyes”, whose growth mechanisms have generally been explained empirically. The objective was to design a relevant multi-scale investigation strategy in order to determine if there is a relationship between eye growth kinetics and surrounding cheese microstructure. Magnetic resonance imaging provided the spatial distribution and growth kinetics of individual eyes during ripening. The eyes were smaller, less numerous and growing slower under the rind than in the center. Three microscopic techniques were combined to study cheese microstructure. Light microscopy showed horizontal curd grains with junctions unchanged during ripening. Confocal laser scanning microscopy revealed fat globules embedded in a continuous protein network in both zones and ages. Scanning electron microscopy showed a comparable porous protein network for all samples. No microstructure difference was found on the basis of sample location or age, but this study showed that bacteria repartition could participate to the opening gradient.

**Keywords:** Eye growth kinetic; gradient; microstructure; ripening

## 1. Introduction

A characteristic feature of some semi-hard cheeses is their eyes, which have an impact on both product quality and consumer behavior that is linked to appearance. However, pressed cheese is a very heterogeneous material, composed of assembled curd grains in which gas production takes place and creates eyes. This particular structure is the result of the cheese making process, starting with coagulated milk that is stirred and cut into grains. The curd is then pressed in order to form a continuous matrix that is brined before entering the ripening stage. Due to the pressing step, some questions remain about the inner structure of the cheese matrix, in particular, whether or not curd grain shape and cohesion can evolve during ripening and create weak points. Moreover, to our knowledge, eye growth mechanisms in pressed and non-cooked curd cheeses are not formally understood. They require nuclei, good development of propionic bacteria for gas production, and an adequate curd texture adapted to eye growth, as reported by Daly et al. (2010). The determination of eye growth kinetics is a key to the better understanding of growth mechanisms. Non-invasive techniques have the highest potential to achieve this objective since the same products can be followed during ripening (Lee et al., 2012). However, X-rays, ultrasounds and Magnetic Resonance Imaging (MRI) have generally been used for studying opening defects and cheese quality without taking kinetic aspects into account (Akkerman et al., 1989; Conde et al., 2008; Eskelinen et al., 2007; Guggisberg et al., 2013; Kraggerud et al., 2009; Nassar et al., 2010; Rosenberg, McCarthy, & Kauten, 1992; Schuetz et al., 2013). Other studies focused on microstructure investigations in Emmental and other hard cheeses: light microscopy showed anisotropy in curd grain organization (Huc et al., submitted; Kalab, Lowrie, & Nichols, 1982; Lowrie, Kalab, & Nichols, 1982; Ruegg & Moor, 1987); CLSM revealed a continuous protein matrix disrupted by dispersed fat globules and black holes (Floury et al., 2009; Huc et al., submitted; Lopez & Briard-Bion, 2007; Lopez, Camier, & Gassi, 2007); and SEM showed a porous casein network and micro-eyes (Rousseau & Legallo, 1990). Each step of the process seemed to have an impact on the microstructure: fat globules lost their native globule aspect and organized themselves into clusters before ripening (Lopez et al., 2007; Rousseau & Legallo, 1990), and the protein network lost its micelle organization, becoming a continuous network after pressing (Rousseau & Legallo, 1990).

The aim of the present work was to determine if there was a link between eye growth profiles and the surrounding eye microstructure. Real eye growth kinetics were monitored in semi-hard cheeses using MRI, identifying different growth behaviors between the periphery and the center of the cheese. Slices were cut in these two zones in order to investigate cheese microstructure at different scales by combining three microscopy techniques. Curd grains (observation scale around 1 mm) were studied using light microscopy, fat/protein distribution (scale around 100  $\mu\text{m}$ ) using CLSM, and protein network pores (scale around 1  $\mu\text{m}$ ) using SEM. The evolution of cheese multi-scale microstructure was compared to the corresponding eye growth profiles monitored by MRI.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Cheese characteristics

The products were 11-kg semi-hard cheese blocks characterized by a water content of 42wt% and a fat/dry ratio of 47wt%. They were packaged under an impermeable plastic film before entering ripening, which was divided into two stages: ten days (between Day1 and Day10) at 12 °C, followed by two weeks at 20 °C (between Day11 and Day25) at 20 °C.

### 2.2 MRI acquisitions and image processing

Three cheeses were scanned with a 1.5 Tesla Avanto MRI scanner (Siemens, Munich, Germany) during ripening. The acquisitions were carried out at D4, D7 and D10 (at 12 °C), and at D14, D17, D22 and D25 (at 20 °C). A 3D turbo spin echo sequence was chosen to acquire images with a resolution of  $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$ . The sequence parameters were: TR = 400 ms, TE = 8.7 ms and Turbo Factor = 6. All cheeses were maintained at a constant temperature using a thermostatic tunnel during image acquisition. Image processing allowed each eye to be individually labeled: a specific gray level and set of coordinates were attributed to each of them.

### 2.3 Cheese sampling

Two zones of interest were identified in cheeses when studying MR images: the under-rind and the core. Slices of  $16 \times 16 \times 1.5 \text{ cm}^3$  centered in the cheese blocks were cut at 1 cm and 4 cm under the rind, respectively, and did not include any rind. The first slice was called the “under-rind slice” and the second one, the “core slice”. A previous study of Swiss-type cheeses showed structure anisotropy in the curd grain organization (Huc et al., 2013). The grains were only clearly visible perpendicularly to the pressing axis. Therefore, this direction was chosen to cut thin slices of  $10 \times 20 \times 0.1 \text{ mm}^3$  in both zones using razor blades, for light microscopy and CLSM. SEM samples consisted of  $5 \times 5 \times 5 \text{ mm}^3$  cubes.

### 2.4 Multi-scale microscopy

Light microscopy images were taken using an Eclipse 80i microscope (Nikon, Tokyo, Japan) combined with the NIS-Elements software package (Nikon, Tokyo, Japan). Samples were placed between slides and cover slips so that immediate observation was possible. The final images displayed a resolution of  $1.60 \mu\text{m} \cdot \text{pixel}^{-1}$  and were acquired at Day4, Day8, Day12, Day17, Day22 and Day25. The complete protocol was described by Huc et al. (submitted).

CLSM images were obtained with a TCS SP2 AOBS inverted confocal microscope (Leica, Solms, Germany) equipped with two Helium-Neon lasers with  $\lambda_{\text{ex}}=543 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{ex}}=633 \text{ nm}$ . Images were

taken at D4, D17 and D22. A two-step labeling protocol was carried out in order to individually stain fat and protein using the specific affinity properties of Bodipy 665/676 nm (Invitrogen, Carlsbad, NM, USA) and DyLight 549 nm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), respectively, as detailed by Huc et al. (submitted). Three acquisitions were performed for each observation: protein content only, represented in green; fat content only, represented in red; and, finally, a superimposition of the two images where the co-localized fat-protein areas appeared in yellow. Images shown in the present article are superimpositions and were considered by the authors to be representative of the three replicates.

SEM images were taken using a JSM 6301F microscope (Jeol, Croissy sur Seine, France) at 1000 and 5000 magnifications at Day4, Day8, Day17 and Day22. The preparation of the sample included an immersion for 48 h and 4 h in two consecutive fixative solutions targeting protein (2.5% glutaraldehyde) and fat (1% osmium tetroxyde). Each solution was washed using 0.1M phosphate buffer (pH 7). After 72 h, samples were placed in increasingly anhydrous ethanol solutions before being stored in pure acetone overnight. Samples were critical-point dried using liquid CO<sub>2</sub> and sputter-coated with gold-palladium. Three replicates were made for each ripening day and location in the cheese. Sample images presented here were considered by the authors to be representative of the five takes for each replicate. As the SEM images were obtained as gray scale pictures, it was possible to immediately form the histogram of gray scales repartition by using the “Histogram” function of Image J free imaging software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

### 2.5 Mathematical morphology

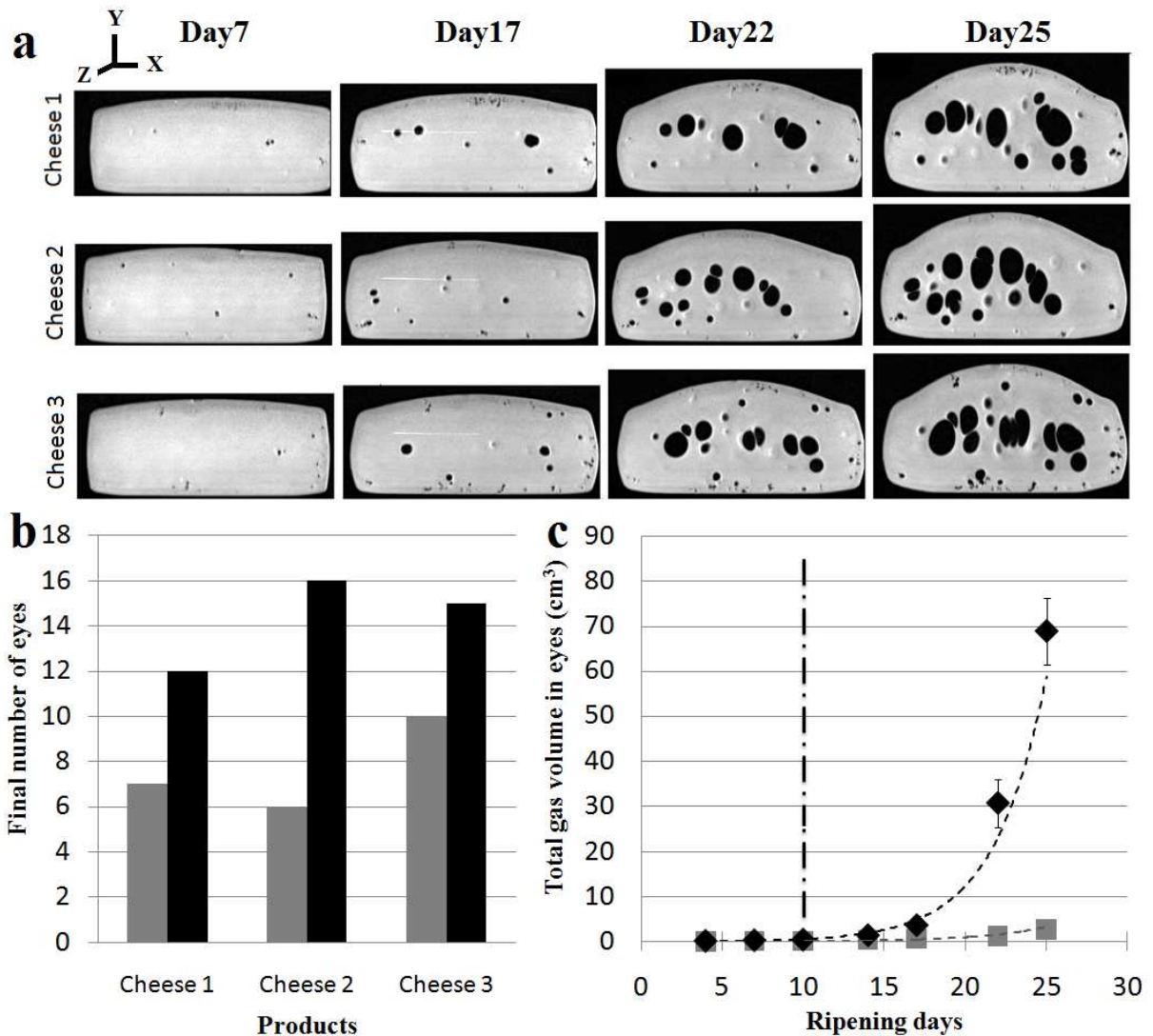
SEM images were processed using the method developed by Devaux et al. (1997), who used grey level mathematical morphology applied to food systems. This technique was also applied on bread crumb (Lassoued, 2005; Lassoued et al., 2008; Rouillé et al., 2005) and on cream cheese (Fenoul et al., 2008). Red Green Blue (RGB) images resulting from SEM acquisitions were converted to gray level images before all images could be processed using mathematical morphology. Each image was cut in four and submitted to 15 successive steps of erosions and 15 steps of dilatations, with a linear structuring element of 1 pixel radius using Image J free imaging software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Erosions decreased the grey level of the images until they became completely black whereas the dilatations increased the grey level until white images were reached. In the current study, erosion could thus be used to discuss the pores of the protein network whereas the dilatations would be more suitable for discussing the protein network branching. The variation of the grey level sum between two successive steps  $g_i$ , was calculated according to Eq. 1, where  $V_i$  and  $V_{i+1}$  are respectively the sum of grey level at step  $i$  and  $i+1$ ,  $V_0$  and  $V_f$  are the initial and final sum of grey levels of the image.

$$g_i = \frac{V_i - V_{i+1}}{V_0 - V_f} \quad (\text{Eq. 1})$$

Plotting  $g_i$  as a function of the size of structuring element led to a granulometric curve. Data were projected using a Principal Component Analysis (CPA) using XLStat (Addinsoft, Paris, France) to get a relevant cartography of the morphology of images taken at different ripening times and locations in cheese.

### 3. Results and discussion

#### 3.1 MRI



**Fig.1** (a) Eye growth in cheese monitored by MRI (resolution:  $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$ ) over 4 days of ripening for three cheeses – transversal central slice; (b) Total number of eyes at the end of ripening in the under-rind (gray) and core (black) zones; (c) Average total gas volume uptake during ripening (out of three cheeses) in the under-rind (■) and core (◆) zones. Vertical non-continuous line at Day10 = switch from 12 to 20 °C.

The Magnetic Resonance images taken during ripening showed different eye growth behaviors in cheese (Fig. 1a). Firstly, small eyes situated under the rind were generally mechanical openings. These bubbles correspond to the incorporation of small quantities of air that may occur during cheese making and that are trapped in the cheese after pressing. They grow very little during ripening and present a

non-spherical shape and a cluster organization (arrows 1). Deeper within the body of the cheese, eyes remain small but well formed, spherical and contribute to cheese porosity uptake (arrows 2). Finally, the biggest eyes were detected in the core zone (arrows 3). At the end of ripening, core eyes were mostly elliptical, oriented along a vertical axis. The body of the cheese was also vertically deformed during ripening, especially after the first week in the hot room (Day17). At the end of ripening, the top of the three cheeses had expanded. The bottom remained flat, except at the sides that were slightly elevated by the plastic film because of the cheese volume uptake, forming a dome shape.

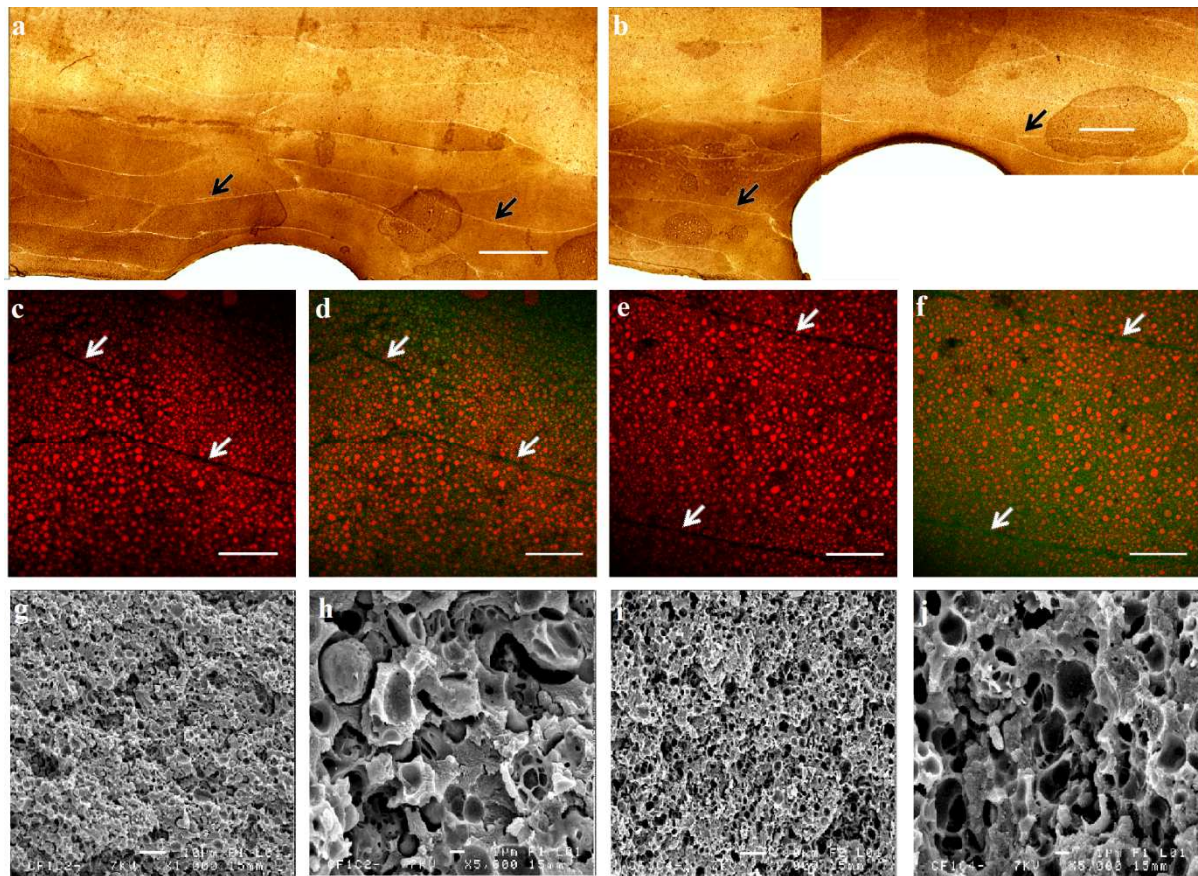
Using the specific set of coordinates attributed to each eye in the cheese after image processing, the effect of location on the final eye volume could be evaluated. A significant effect of eye barycenter coordinates along the Y-axis on the final eye volume was observed (P-value < 0.0001). The impact of coordinates along the X- and Z-axis was not significant, with P-values of 0.374 and 0.559, respectively. This gradient in the final size distribution of eyes along the pressing axis is consistent with the previous description of cheese shape. The main eye axis was vertically oriented at the end of ripening, as was the cheese volume uptake.

Moreover, the number of eyes and their global growth kinetics were different according to the location in cheese, as can be seen on Fig. 1b and Fig. 1c. The total number of eyes at the end of ripening (Day25) was significantly higher in the core zone than the under-rind (Fig. 1b), with a mean value of  $14 \text{ eyes} \pm 2$  and  $8 \text{ eyes} \pm 2$ , respectively (P-value = 0.017). Therefore, more eyes were able to grow in the center of the cheeses than in the under-rind. The average total gas volume of the three cheeses (Fig. 1c) continuously increased during ripening in both zones, even if it was slow at first during the 12°C ripening stage. During this 12 °C period, the average gas volume was not significantly different between the center and the under-rind. At 20 °C, a faster increase in the core zone than in the under-rind was observed. The difference was even more pronounced during the second week at 20 °C, with a final gas volume in the core that was seven times higher than in the under-rind. Some explanation of the spatial dependency of the eyes characteristics may be found in the study of microstructure, especially around the eyes. If a structure gradient could be revealed, it could contribute to the strong differentiation of eye growth between the core and the under-rind zones demonstrated by MRI results. This opening gradient is also in good agreement with the higher gas hole formation found in the center than in the under-rind for Gouda cheese using computed tomography (Lee et al., 2012) and with the earlier eye formation detected by MRI in the interior parts of Swiss-type cheeses than in the peripheral areas (Rosenberg et al., 1992).

### *3.2 Multi-scale microscopy*

- Effect of sample location on cheese microstructure

Light microscopy allowed the direct observation of cheese samples without using any solvent that could modify the inner structure of the cheese matrix. Curd grains could be seen in both the under-rind and core locations during the 12°C ripening period (Day4; Fig. 2a and Fig. 2b).



**Fig. 2: Swiss-type cheese images at the beginning of ripening: lines = microscopy techniques; columns = slice location in the cheese. acdgh = Under-rind Day4, befij = Core Day4; ab = light microscopy (line = 1 mm), cdef = CLSM (ce: fat only, df: superimpositions fat/protein, line = 300 μm), ghij = MEB (gi: line = 100 μm, hj: line = 1 μm)**

Their junctions were easily recognizable due to their brighter color compared to the insides of the grains (black arrows), as already observed by Huc et al. (2013) in the center of commercial cheeses. In both zones, curd grains displayed a “brick” pattern with a horizontally oriented main axis. The average curd grain length was generally around 5 mm, but ranged from 0.5 to 15 mm, with a corresponding width ranging from 0.05 to 2.5 mm. Curd grains were extended and arc-shaped around the eyes, following the opening periphery. Therefore, no microstructure difference was detected between the under-rind and core zones using light microscopy. This result is consistent with the cheese making process since there is no reason why the pressing should have occurred differently in the periphery or in the center of the cheese. They also confirmed the photographic observations carried out on Emmental cheese, showing clear curd grain boundaries on cheese sections of several centimeters, despite the massive use of chemical solvents (Ruegg & Moor, 1987).

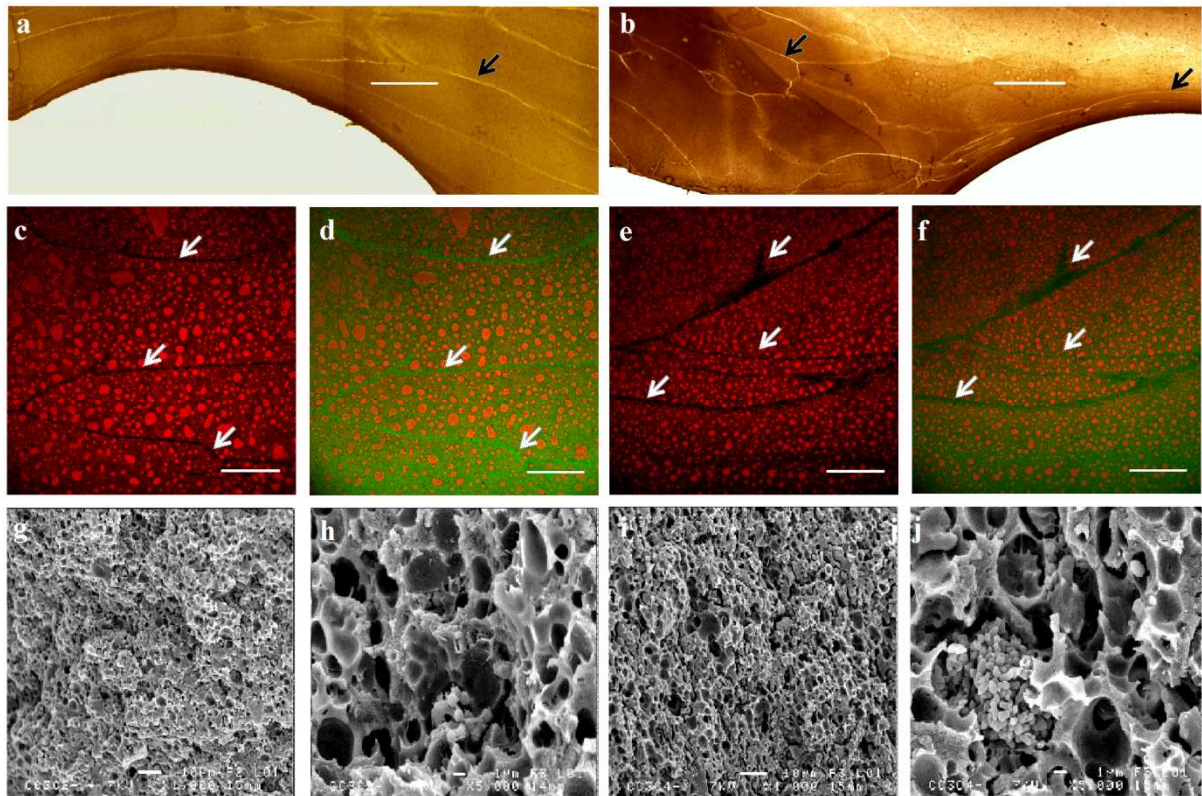
As can be seen on Figs. 2d and 2f in CLSM images, the protein network (in green) formed a continuous background that was only disrupted by fat pools (in red) and some black spots that could correspond to micro gas holes. Figures 2c and 2e displayed the fat content only, showing black lines that correspond to green lines (indicated by white arrows) on superimposition images (Figs. 2d and 2f). These fat-depleted lines are composed of a denser protein network and correspond to curd grain junctions, whereas the inside of grains was composed of both fat globules and protein. These observations confirmed the ones made by Huc et al (2013) in the center slice of commercial semi-hard cheeses. Therefore, no microstructure difference could be found between the core and under-rind zones using CLSM.

SEM images (Figs. 2g, and 2i) show a compact protein network with denser zones and voids. The average diameter of the protein network pores was between 1 to 3  $\mu\text{m}$ , and some cavities could be seen on the pictures at the higher magnification of x5000 (Figs. 2h and 2j). These cavities could correspond to former locations of embedded fat globules that disappeared during sample dehydration. Finally, at this third observation scale, no difference could be seen between under-rind and core microstructure: the protein network appeared to be smooth and continuous with comparable mesh size and fat globule cavities in both zones. It was verified using an image processing based on mathematic morphology, which results were projected on a PCA. Some differences could be observed in the location of the projections on the PCA between UR and C samples, but they were small to be interpreted and not significant enough as regards to the variability due to the samples preparation.

- **Effect of ripening time on cheese microstructure**

The second study of microstructure took place during ripening. A comparison of two ages was carried out using core and under-rind samples taken at the beginning of the 12 °C ripening period (Day4) and at the end of the second week of the 20 °C ripening period (Day22), as can be seen on Fig. 2 and Fig. 3, respectively.





**Fig. 3: Swiss-type cheese images at the end of ripening: lines = microscopy techniques; columns = slice location in cheese. acdgh = Under-rind Day22, befij = Core Day22; ab = light microscopy (line = 1 mm), cdef = CLSM (ce: fat only, df: superimpositions fat/protein, line = 300  $\mu$ m), ghij = MEB (gi: line = 100  $\mu$ m, hj: line = 1  $\mu$ m)**

For both ripening stages, curd grains displayed the same global shape and horizontal organization on light microscopy images (Figs. 2a, 2b, 3a and 3b), except that they were more extended around the eyes at Day22 than at Day4. This is a result of the eye growth that occurred between the beginning and the end of ripening, which induced a higher level of deformation of curd grains. Their junctions appeared similar at both cheese ages (indicated by black arrows), with a comparable width and contrast with the insides of the grains. Therefore, no disappearance of curd grain junctions due to cheese aging could be found in the present study, which is in good agreement with photographic studies carried out on Cheddar (Lowrie et al., 1982) where curd granule distinctiveness was not affected by ripening. Therefore, no time-related gradient was found between the core and the under-rind zones at a scale of 1 mm.

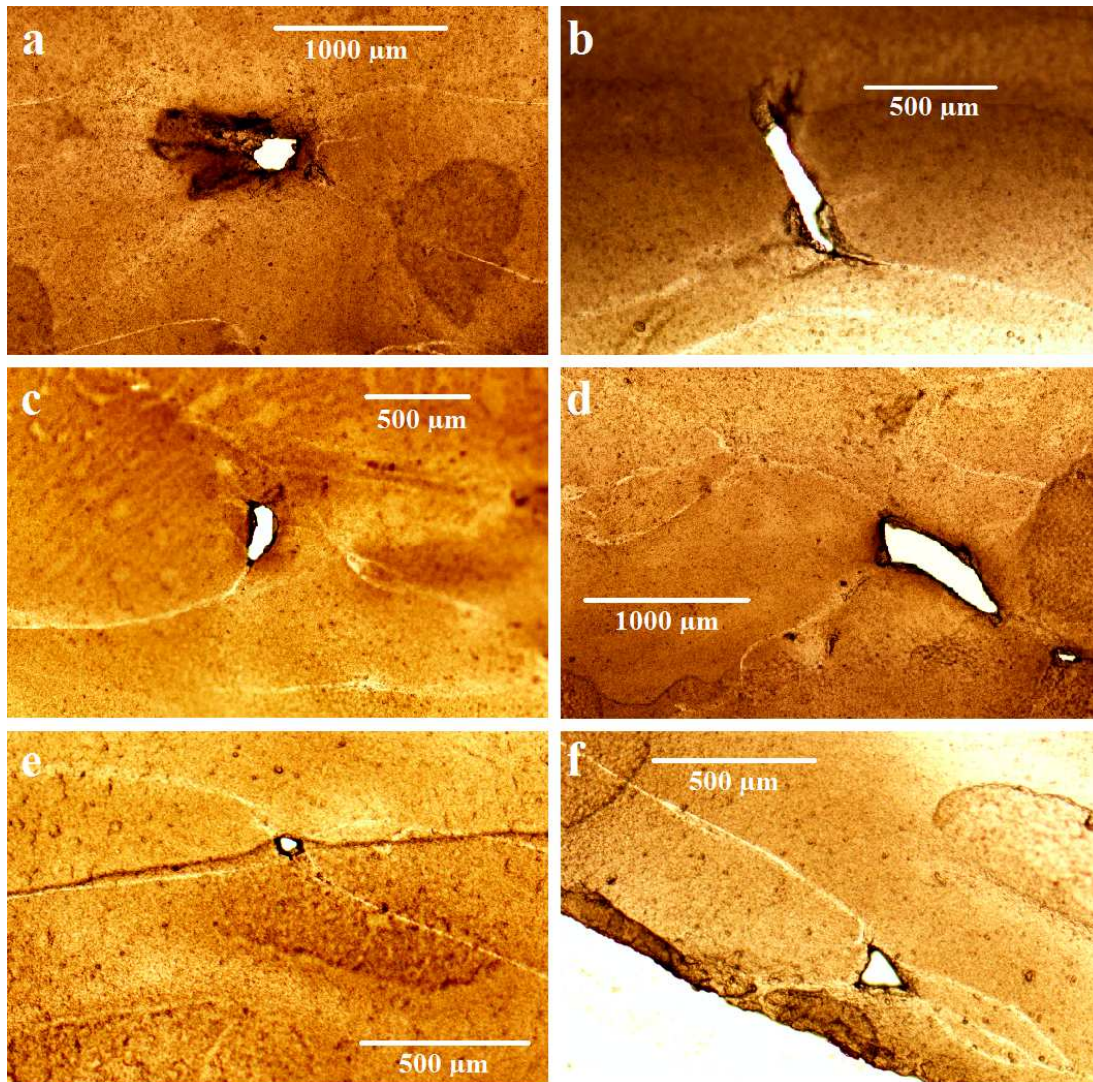
Moreover, CLSM images taken at Day4 (Figs. 2c, 2d, 2e and 2f) and at Day22 (Figs. 3c, 3d, 3e and 3f) did not show any difference in the fat/protein distribution. Curd junctions could be seen at both the 12°C and the 20°C stages (white arrows) as fat-depleted black (Figs. 2c; 2e; 3c and 3e) or green lines (Figs. 2d, 2f, 3d and 3f). The apparent composition of curd grain junctions and the difference with the insides of the grains thus remained unchanged throughout ripening. Moreover, lipids could be found in the form of fat globules and the protein network did not change between Day4 and Day22. This non-influence of aging on fat microstructure in cheese is in good agreement with CLSM results obtained

on Emmental cheese (Everett & Auty, 2008; Lopez et al., 2007) and on Cheddar (Rogers et al., 2010). However, some authors suggested ripening-induced changes on fat organization, with a loss of the globule shape and a formation of aggregates or free fat pools, even if their quantification was not possible from CLSM images: Gouda (Blonk & Vanaalst, 1993) and Emmental (Lopez & Briard-Bion, 2007; Lopez et al., 2007). It is possible that the present ripening time-scale was not long enough to detect any change in microstructure induced by proteolysis or lypolysis. The non-influence of ripening time on microstructure in the present study may also be attributed to the packaging film that did not allow any moisture loss during ripening, whereas it was not controlled in the previous studies, which could explain some of the observed ripening effects.

A big pool of bacteria embedded in the protein matrix could be seen in the core zone at Day22 on SEM images (Fig. 3i), whereas only dispersed cells could be found at the beginning of ripening. Apart from this observation, no obvious microstructure change could be seen. Some pores seemed to be bigger at Day22 than Day4, perhaps as a result of proteolysis. Therefore, the potential influence of the location in cheese and the ripening time was checked using mathematical morphology completed by a PCA. During the 12 °C ripening period, UR Samples and C samples were projected in distinct zones on the PCA, even when taking into account the repetitions brought by the quarters of each images. Their microstructures were different. When entering hot room, all sample projections shifted on the PCA, and this displacement was more pronounced for sample from the end of hot room stage. Ellipses defining the positioning of products taking into account the variability of images are only partially superimposed for UR and C samples. However, these differences in microstructure and in displacement on the PCA map could not be interpreted as regards to the microstructure, due to the apparent variations from one image to the other. Thus, if differences exist, they are too small to be interpreted and to overcome the imaging artifact. That is why we decided not to show the PCA map. This result is in good agreement with SEM observations made by Rousseau et al. (1990), showing that the Emmental protein network was not modified before two weeks in a hot room.

#### **4. Discussion**

Even if no microstructure gradient consistent with the under-rind/core opening differences could be found, curd grain junctions may still play a role in the eye growth mechanisms if not in the gradient phenomenon. Indeed, during the light microscopy observations, some interesting patterns were encountered, including micro-eyes or micro-slits, always located at the grain interfaces. Moreover, they were only found during the first half of ripening, during the 12 °C stage or at the very beginning of the 20 °C stage. After 2 days at 20 °C, such patterns were no longer encountered. Some examples of micro-eyes and micro-slits are presented in Fig. 4, taken from both the under-rind and core zones.



**Fig.4: Micro-eyes (a, e, f) and micro-cracks (b, c, d) observed under light microscopy (magnification x4) at curd grain junctions at Day4 (a, b, c & d) and Day12 (e & f) from the under-rind and core zones**

These observations of micro-cracks are in good agreement with the ones made by Huc et al. (2013) in Swiss-type cheese. However, these results were obtained at a commercial stage, which means after the 20 °C period and after storage, transportation and distribution. Therefore, a hypothesis can be made about the influence of temperature on the apparition of such micro-cracks: maybe the cold temperatures represent favorable conditions for the propagation of slits. Or maybe a colder temperature can favor micro-cracks formation when combined with a supplementary stress, as the cutting in the present experiment at 12 °C. Maybe the transportation and other logistic stages involved in the distribution of cheese combined with the low temperatures applied in its storage could explain the previous observations of cracks made by Huc et al. (accepted) at a commercial age.

Moreover, in the present study, the average diameter of the micro-eyes ranged from 50 μm to 200 μm, and the micro-cracks had an average length ranging from 100 μm to 1 mm. They were always located between at least two adjacent grains, implying that the grain junctions may act as fragility zones that

could facilitate the propagation of slits or the eye growth. The gas found in these junctions may result from the cheese making process since some air could be trapped between grains during the draining step, as suggested by Clark (1918) and Akkerman et al. (1989). Such air inclusions could not be suppressed by pressing, and air pockets would remain in grain junctions. The difference between eyes and cracks may be due to the presence of nuclei or the amount of stress applied at the junctions. Such different types of opening patterns were also observed by Rüegg & Moor (1987) in Raclette cheese and attributed to fused or unfused curd grains.

Finally, the absence of a microstructure gradient that could match the opening one remains surprising. Indeed, one could have expected such strong eye growth differences to interfere with the surrounding structure of the cheese matrix. Some hypothesis can thus be postulated. Maybe even the combination of the three observation scales was not sufficient to enhance some differences. The protein network seems to be the organization element of cheese mostly impacted in the microstructure differences: micro-cracks were found in light microscopy at curd grain junctions, composed of a dense protein network and fat-depleted; some small differences in the pores may exist in the inner structure of the protein network observed in SEM but this could not be proved using mathematical morphology. Therefore, some differences may still exist in the microstructure of cheese that would remain invisible at the studied scales. Finally, the proteolysis could cause some deconstruction of proteins in peptides and amino acids that could not be observed in the present study. Some differences in composition as water or salt content could also cause some differences in the structure organization of cheese that would remain unobserved with the three observation scales used in the present study.

However, another leads must be considered, as a different repartition of bacteria was found between core and under-rind areas using SEM. Indeed, pools of bacteria were found more numerous and bigger in the center than at the periphery, especially at the end of ripening. They were organized as clusters embedded in the protein network, which could have two main consequences: they may act as nuclei themselves, and they should produce more gaz. Both actions would then favor the eye development in the center. Therefore, microbiology seems to be an important factor of influence on eye growth. Both chemical and microbiological fields must then be studied more precisely, searching for some gradient that could match the strong differences found in the number, size and eye growth profiles enhanced in the present study.

## **5. Conclusion**

A strong eye growth gradient was revealed using MRI between the under-rind and core zones in semi-hard cheese. Eyes were significantly more numerous and bigger in the center, and the porosity uptake was faster than under-rind. Moreover, eye location along the cheese pressing axis had a significant impact on the final volume of eyes at the end of ripening. However, no corresponding microstructure

gradient from a scale of the curd grain to the scale of the casein network was found between slices taken from the under-rind and the center of the cheese. Moreover, no ripening time effect could be found either. Indeed, light microscopy revealed the same “brick” pattern of curd grains for all locations and cheese ages, with junctions always clearly visible. CLSM images showed fat depletion at the junctions and a similar distribution of fat/protein content for all locations and cheese ages. Lipids appeared as fat globules, dispersed in a continuous protein network with grain junctions visible in all samples. Finally, SEM images showed a very porous protein network that formed a dense continuum. Therefore, the opening gradient could not be explained by microstructure differences due to location or time-related rearrangements. However, some micro-eyes and micro-cracks were observed during the first half of ripening in both zones at the curd grain junctions that could act as fragility zones in the cheese matrix. Moreover, differences in bacteria repartition were enhanced, revealing a probable microbiological gradient. Therefore, other causes for the opening gradient must be investigated, starting with physico-chemical and metabolic gradients.

## **Acknowledgements**

The authors thank Marine Dewaest for her help with mathematical morphology image processing, Patrick Dabert and Christine Ziebal from UR GERE at Irstea Rennes for giving us full access to the light microscope, Joseph Le Lannic from C.M.E.B.A of Rennes 1 University for performing SEM observations, and the Regional Council of Bretagne, Basse Normandie and Pays de la Loire, the General Council of Ille et Vilaine and Valorial competitiveness cluster for their financial support.

## **References**

- Akkerman, J.C., Walstra P., van Dijk, H.J.M. (1989). Holes in Dutch-type cheese. 1. Conditions allowing eye formation. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 43, 453-476
- Auty, M. A. E., Twomey, M., Guinee, T. P., & Mulvihill, D. M. (2001). Development and application of confocal scanning laser microscopy methods for studying the distribution of fat and protein in selected dairy products. *Journal of Dairy Research*, 68, 417-427.
- Berdague, J. L., & Grappin, R. (1989). Ripening and quality of Gruere-de-Comte cheese. 7. Presentation - openness (eyes) and split defect of cheeses. *Lait*, 69, 173-181.
- Blonk, J. C. G., & Vanaalst, H. (1993). Confocal Scanning Light Microscopy in Food Research. *Food Research International*, 26, 297-311.
- Clark W.M. (1918). *Journal of Dairy Science* 1:91-113
- Conde, T., Mulet, A., Clemente, G., & Benedito, J. (2008). Detection of Internal Cracks in Manchego Cheese Using the Acoustic Impulse-Response Technique and Ultrasounds. *Journal of Dairy Science*, 91, 918-927.

- Daly, D.F.M., McSweeney P.M.C., Sheenan J.J. (2010). Split defect and secondary fermentation in Swiss-type cheeses - A review. *Dairy Science & Technology*, 90, 3-26.
- De Freitas, I., Pinon, N., Lopez, C., Thierry, A., Maubois, J. L., & Lortal, S. (2005). Microstructure, physicochemistry, microbial populations and aroma compounds of ripened Cantal cheeses. *Lait*, 85, 453-468.
- Devaux., M., Robert, P., Melcion, J., & Le Deschault de Moredon, F. (1997). Particle size analysis of bulk powders using mathematical morphology. *Power Technology*, 90 (2), 141-147.
- Eskelinen, J. J., Alavuotunki, A. P., Hægström, E., & Alatossava, T. (2007). Preliminary Study of Ultrasonic Structural Quality Control of Swiss-Type Cheese. *Journal of Dairy Science*, 90, 4071-4077.
- Everett, D. W., & Auty, M. A. E. (2008). Cheese structure and current methods of analysis. *International Dairy Journal*, 18, 759-773
- Fenoul, F., Le Denmat, M, Hamdi, F., Cuvelier, G., & Michon, C. (2008). Confocal scanning laser microscopy and quantitative image analysis: application to cream cheese microstructure investigation. *Journal of Dairy Science*, 91 (4), 1325-33
- Floury, J., Camier, B., Rousseau, F., Lopez, C., Tissier, J.-P., & 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 Science and Technology*, 42, 1611-1620.
- Grappin, R., & Berdague, J. L. (1989). Ripening and quality of Gruyere-de-Comte cheese. 8. Synthesis and conclusions. *Lait*, 69, 183-196.
- Guggisberg, D., Fröhlich-Wyder, M.T., Irmeler, S., Greco, M., Wechsler, D., Schuetz, P. (2013). *Dairy Science & Technology*, 93, 135-149.
- Huc, D., Moulin, G., Mariette., F., Michon, C. (Accepted). Investigation of curd grains in Swiss-type cheese using light and confocal laser scanning microscopy. *International Dairy Journal*.
- Kalab, M., Lowrie, R. J., & Nichols, D. (1982). Detection of Curd Granule and Milled Curd Junctions in Cheddar Cheese. *Journal of Dairy Science*, 65, 1117-1121.
- Kraggerud, H., Wold, J. P., Hoy, M., & Abrahamsen, R. K. (2009). X-ray images for the control of eye formation in cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 62, 147-153.
- Lassoued, N. (2005). Structure alvéolaire des produits céréaliers de cuisson en lien avec les propriétés rhéologiques et thermiques de la pâte : Effet de la composition. Ph.D thesis, ENSIA
- Lassoued, N., Delarue, J., Launay, B., & Michon. C. (2008). Baked product texture: Coorelations between instrumental and sensory characterization using Flash Profile. *Journal of Cereal Science*, 48 (1), 133-143

- Lee, K., Uegaki, K., Nishii, C., Nakamura, T., Kubota, A., Hirai, T., & Yamada, K. (2012). Computed tomographic evaluation of gas hole formation and structural quality in Gouda-type cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 65, 232-236.
- Lopez, C., & Briard-Bion, V. (2007). The composition, supramolecular organisation and thermal properties of milk fat: a new challenge for the quality of food products. *Lait*, 87, 317-336.
- Lopez, C., Camier, B., & Gassi, J. Y. (2007). Development of the milk fat microstructure during the manufacture and ripening of Emmental cheese observed by confocal laser scanning microscopy. *International Dairy Journal*, 17, 235-247.
- Lowrie, R. J., Kalab, M., & Nichols, D. (1982). Curd granule and milled curd junction patterns in Cheddar cheese made by traditional and mechanized processes. *Journal of Dairy Science*, 65, 1122-1129.
- Nassar, G., Lefbvre, F., Skaf, A., Carlier, J., Nongailard, B., & Noël, Y. (2010). Ultrasonic and acoustic investigation of cheese matrix at the beginning and the end of ripening period. *Journal of Food Engineering*, 96, 1-13.
- Rogers, N. R., McMahon, D. J., Daubert, C. R., Berry, T. K., & Foegeding, E. A. (2010). Rheological properties and microstructure of Cheddar cheese made with different fat contents. *Journal of Dairy Science*, 93, 4565-4576.
- Rosenberg, M., McCarthy, M. J., & Kauten, R. (1992). Evaluation of eye formation and structural quality of swiss type cheese by MRI. *Journal of Dairy Science*, 75, 2083-2091.
- Rousseau, M., & Legallo, C. (1990). Scanning electron-microscopic study of the structure of Emmentaler cheese during manufacture. *Lait*, 70, 55-66.
- Ruegg, M., & Moor, U. (1987). The size distribution and shape of curd granules in traditional Swiss hard and semihard cheeses. *Food Microstructure*, 6, 35-46.
- Schuetz, P., Guggisberg, D., Jerjen, I., Fröhlich-Wyder, M.T., Hofmann, J., Wechsler, D., Flisch, A., Bisig, W., Sennhauser, U., Bachmann, H.-P. (2013). Quantitative comparison of the eye formation in cheese using radiography and computed tomography data, *International Dairy Journal*. doi: 10.1016/j.idairyj.2012.12.007.
- Sutheerawattananonda, M., Fulcher, R. G., Martin, F. B., & Bastian, E. D. (1997). Fluorescence image analysis of process cheese manufactured with trisodium citrate and sodium chloride. *Journal of Dairy Science*, 80, 620-627.
- White, S. R., Broadbent, J. R., Oberg, C. J., & McMahon, D. J. (2003). Effect of *Lactobacillus helveticus* and *Propionibacterium freudenrichii* ssp *shermanii* combinations on propensity for split defect in Swiss cheese. *Journal of Dairy Science*, 86, 719-727.

#### 2.4.2 Etude des gradients au sein des fromages PPNC (A5)

Ce cinquième article est en phase terminale de rédaction pour une soumission auprès d'*International Dairy Journal* envisagée à la fin du mois de Juillet 2013.

### **Spatially-resolved characterization of eyes growing kinetic in semi-hard cheeses**

#### **Authors:**

D. Huc<sup>abcde</sup>, S. Challos<sup>ab</sup>, M. Monziols<sup>f</sup>, C. Michon<sup>cde</sup>, F. Mariette<sup>ab\*</sup>

(a) IRSTEA, UR TERE, 17 Avenue de Cucillé, CS 64427, F-35044 RENNES

(b) Université européenne de Bretagne, France

(c) AgroParisTech, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments F-91300 MASSY

(d) INRA, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments Olympiades F-91300 MASSY

(e) CNAM, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments, F-75003 PARIS

(f) IFIP Inst. Porc, F-35651 Le Rheu, France

#### **Abstract**

An important characteristic of Swiss-type cheeses is their eyes, whose features participate to the overall cheese quality. However, so far their growth mechanisms have been empirically apprehended. In order to achieve a better understanding, several techniques were combined. Firstly, X-rays tomography was used to monitor cheeses during their ripening and to gather information about eyes' number, size and growth kinetics without disrupting the products. Chemical assays were also performed to determine the composition of cheese and the trackers of gas production. They were associated with rheological tests investigating the resistance properties of the cheese matrix. Chemical assays and rheological tests were carried out in two zones of cheese and compared to the corresponding X-rays data extracted from the global results. Therefore, the existence of gradients inside cheese was enhanced, especially differences between core and under-rind zones. Smaller and fewer eyes were observed under-rind whereas the core ones displayed the faster growth rate. It appeared that salt content and the Young Modulus were higher under-rind, whereas organic acids were produced or consumed faster in the center. The salt content was the only composition parameter that could affect eye growth. Rheological properties could also participate to the opening gradient.



# 1. Introduction

A characteristic feature of semi-hard cheeses is the presence of holes, usually called eyes. They represent an important quality parameter, through their number, size and shape. Indeed, eyes need to display specific characteristics for each type of cheese. For example, in Swiss-type cheeses, they are required to be “round and regular, from medium to large size” (Frölich-Wyder&Bachmann, 2004; Bachmann et al., 2002; Steffen et al., 1993). Their appearance is also an important criterion for the consumer, as it has an impact on the product’s choice. However, so far eye growth mechanisms are still largely non-elucidated or mostly explained empirically. Product innovation is thus difficult to achieve, as the consequences of a new process or recipe on the eyes development cannot be anticipated. Several fields of interest must be taken into account in order to obtain a better understanding of these mechanisms. Steffen et al. (1993) recapitulated the four requirements for a good eye formation and development: CO<sub>2</sub> production, number and size of nuclei, CO<sub>2</sub> pressure and diffusion rates and cheese body texture. However, the investigation of composition, rheology and eye growth in cheese is complex, due to its intrinsic heterogeneities. Indeed, several gradients were enhanced inside cheeses, as regards to bacteria counting, organic acids, or rheological properties. Higher water content and lower Salt/Moisture ratio were found in the center of Gouda and Swiss-type cheeses (Reinbold et al., 1958; Hollywood et al. 1984; Guinee et al., 2004; Saurel et al., 2004). CO<sub>2</sub> producing propionic acid bacteria (PAB) were also found 5 to 1000 times more numerous in blocks or wheels of Swiss-type cheeses (Reinbold et al., 1958). Hollywood et al. (1984) obtained PAB counting 12 times higher in the center of Swiss-type cheeses at the end of ripening, associated with an amount of organic acids acetate and propionate twice higher. Moreover, Accolas et al. (1978) showed that lactic acid bacteria (LAB, *S. Thermophilus* and *L. Helveticus*) were also 12 to 15 times more numerous in the center of Gruyère cheese after 20 h of pressing. Finally, Culioli et al. (1976) and Prentice et al. (1987) found a fracture force and a level of firmness twice higher in the periphery of Gouda and Cheddar at the end of ripening. The amount of CO<sub>2</sub> inside Emmental wheels was also higher in the core zone according both vertical and horizontal direction, compared to outer zones (Flückiger et al., 1980). Moreover, all these gradients evolve during ripening, increasing or equilibrating inside cheese. For example, the salt content is maximal after brining (12 times higher in the center) and keeps decreasing afterwards (2,54% in the center against 2,81% in the outer slice), as found between 1 and 48h after brining in Cheddar cheese (Morris et al., 1985). However, despite an empirical knowledge of fewer eyes observed under-rind, no study quantifying any opening gradient could be found in cheese. Especially as no kinetic approach during the whole ripening was ever carried out, except recently for Lee et al. (2012) who used X-rays tomography for following porosity uptake in Gouda during ripening. However, no differentiation between eyes in the center and under-rinds eyes was ever achieved. Therefore, there is a missing link between the characterization of cheese chemical and rheological properties on the one hand and cheese opening features on the other hand. Finally, a

decorrelation of influent factors would be necessary to go further and try not only to outline mechanisms but also to prioritize them.

The aim of the current study was to investigate the intensity and influence of chemical and rheological gradients semi-hard cheeses on their openings. Several techniques were used to fulfill this objective: chemical assays for the investigation of cheese composition, rheological tests for the evaluation of the cheese matrix resistance, and X-rays tomography for the monitoring of eye growth kinetics and localization in cheese during ripening. Two zones of interest were identified as under-rind and in the center and all data were cross-linked in order to better understand and prioritize the eyes' growth mechanisms.

## 1. Materials & Methods

### 1.1 Samples preparation

The products were pressed and non-cooked curd cheeses packaged under impermeable film. The ripening was divided in two periods: 10 days at 12 °C (called production room) and 14 days at 20 °C (called hot room). They were shaped in blocs of 11 kg (24 x 10 x 48 cm<sup>3</sup>). Ten of them were followed during the whole ripening using X-rays tomography, while others were sampled at five ripening times to perform destructive measurements. In order to study the gradients, two different locations were chosen: one slice was taken in the center of cheeses (slice C) and the other one was taken 1 cm under rind (slice UR). The location of these two 16 x 16 x 1.5 cm<sup>3</sup> slices can be seen on Fig.1.

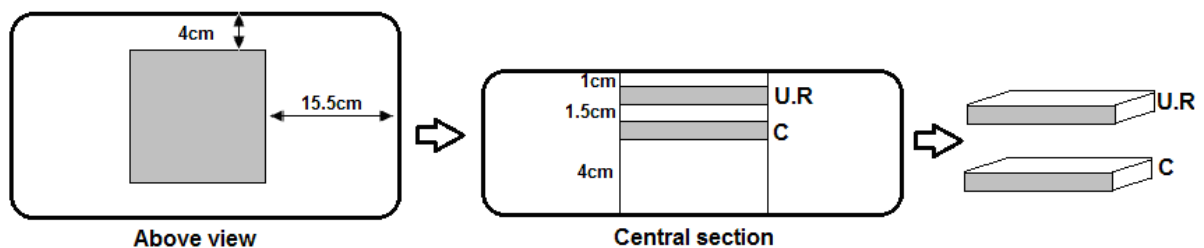


Fig.1: chematization of the cheese bloc sampling (Under-Rind slice UR; Core slice C)

Both UR and C slices were split in two parts, the first one being frozen at -20 °C and used for chemical assays; the second one being stored at +4 °C and used for rheological tests.

### 1.2 Chemical tests

One half of UR and C slices was grinded before performing chemical assays: dry matter content was determined using NF EN ISO 5534-October 2004 method, fat content by using NF V04-287-February 2002 (part B), salt content by using NF EN ISO 5934-January 2007 method and pH by using FD V04-035-July 2009 method. The total and soluble nitrogen were determined using ISO 8968-3 2004 and FIL 20-3 2004. The organic acids were determined using HPLC (with a HCL 1mM eluent gradient with 3 to 5 mL.min<sup>-1</sup> flow, separation on an ionic exclusion column ICE-AS6 (ThermoFisher

Scientific, Waltham, MA, USA), detection by conductimetry (20  $\mu\text{s}$  cell) coupled to an anionic suppressor, quantification using chemical standards injected in the same conditions as the tested solutions). Chemical tests were carried out at five different times during ripening, two during cold room (Day3 and Day7 at 12 °C) and three during hot room (Day12, Day21 and Day25 at 20 °C).

### *1.3 Rheological tests*

Cylinders of cheese were cut using a cork-borer in the second half of UR and C slices at 4 °C. Discs were then cut in these cylinders, and the ends were carefully cut as parallel as possible using a cutting tool with two razor blades. This sampling protocol was designed in order to give a diameter D twice higher than the height H ( $D=2H$ ) to the discs, that were placed in a silicon oil bath during 1 h in order to equilibrate at 20 °C. A least 3 replicates were made for each sample (location in cheese and ripening time). Lubricated Squeezing Flow (LSF) test was chosen in order to obtain conditions as close as possible to real eye growth, as developed by Huc et al. (submitted). LSF tests were carried out using a MCR 301 rheometer (Anton Paar, Graz, Austria) in a texturometer mode with a main head driven at an exponentially decreasing speed. It allowed maintaining the biaxial extension rate  $\dot{\epsilon}_b$  ( $\text{s}^{-1}$ ) constant during all experiment, led at a constant temperature of 20 °C, regulated by a Peltier plan. The cheese discs were put on the Peltier plan and covered with silicon oil before starting the test. An exhaustive description of this protocol is presented by Huc et al. (submitted). Rheological tests were carried out at two different times during ripening: one at 12 °C (Day7) and one at 20 °C (Day17), as Huc et al. (submitted) demonstrated that rheological properties of semi-hard cheeses did not evolve during ripening.

### *1.4 X-rays tomography and image processing*

3D X-rays images were acquired using a Emotion Duo scanner (Siemens, Erlangen, Germany) with a resolution of 0.78 x 0.78 x 1.5  $\text{mm}^3$ , with 324 images/cheese acquired in 8 minutes. The acquisition parameters were an axial sequence, an X-ray tube tension of 130 kV, 70 mA for the tube intensity and a convolution filter B20s (soft tissue). The same cheeses were scanned eight times during their whole ripening: three times during production room (Day3, Day7 and Day10) and five times during hot room (Day14, Day15, Day18, Day21 and Day25). During the acquisitions, the cheeses were put in a dedicated insulated box in order to maintain a constant temperature. Once acquired, image processing was carried out using the protocol developed by Musse et al. (submitted). A unique grey level was attributed to each eye, also characterized by unique coordinates (x;y;z).

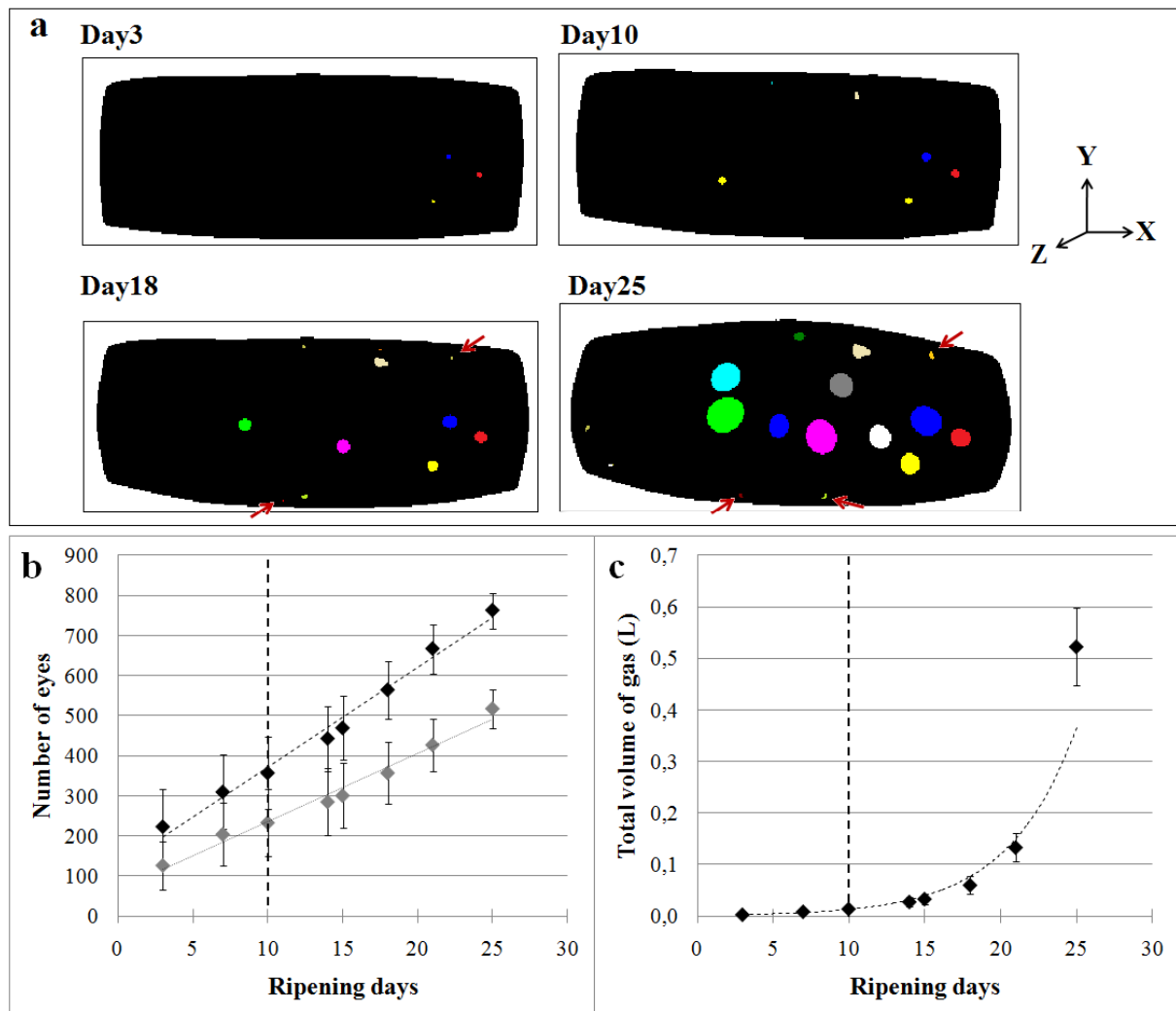
Different global opening indicators were obtained after image processing: total number of eyes, total volume of gas, average volume of each eye, volume of cheese matrix only and global cheese porosity, calculated as the ratio between total volume of gas and total volume of cheese (matrix + gas). Moreover, X-rays images were also used to determine individual eye growth kinetic during during ripening. Knowing the position of each eye, the size and the position of the core and under-rind slice

in the cheese, it was possible to attribute eyes to artificial C and UR slices according to the coordinates of their barycenter. Therefore, local indicators were determined: growth rate, number and volume of eyes and starting growth point.

## 2. Results

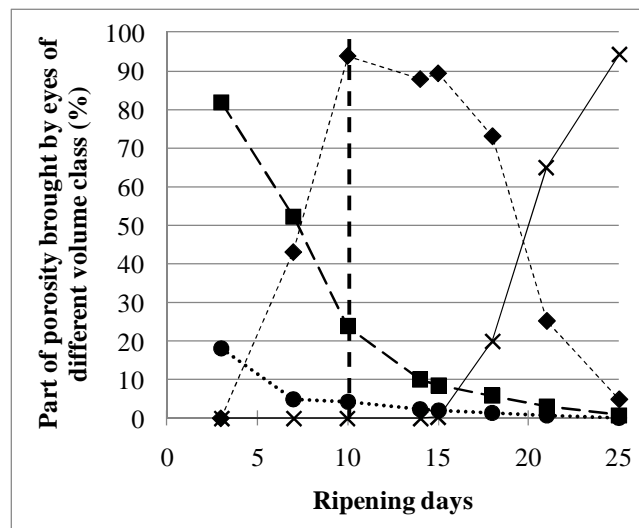
### 2.1 Global indicators and opening kinetics

Examples of processed X-rays images are presented on Fig. 2a for a representative semi-hard cheese among the ten monitored during ripening. All segmented eye are represented with different colors after image processing. These images represent the center slice of the cheese, according to the transversal Z axis. It is interesting to note that until Day18, all eyes remained small-sized whereas in the last week of ripening, larger size eyes were observed, demonstrating a faster growing kinetic between Day18 and Day25.



**Fig.2:** (a) Processed X-rays images showing individual labeling of eyes in three semi-hard cheeses C1,C2 & C3; (b) Evolution of the total number of eyes (◆) and eyes higher than 10mm<sup>3</sup> (◇) during ripening; (c) Evolution of the total volume of gas in cheese during ripening. Vertical non-continuous line = shift from 12 to 20 °C

A first analysis of the eye growth was carried out quantitatively, based on global parameters. Firstly, the evolution of the total number of eyes was determined during ripening (Fig. 2b). It is interesting to note the good reproducibility of these average results taken out of ten different products.  $220 \pm 90$  eyes were identified at the beginning of ripening, proving that some gas production had already happened during previous process steps. At the end of the 12 °C ripening period, the total number of eyes reached  $360 \pm 90$ , proving that some eye growth took place during the 12 °C ripening period. At the end of ripening,  $760 \pm 45$  eyes were identified. The eye formation rate could be approximated by taking the slope of the linear curve fitted on the evolution of the eyes' number ( $R^2=0.985$ ). It was found around  $25 \text{ eyes} \cdot \text{day}^{-1}$ . However, this rate took into account every eye that could be detected with the  $0.78 \times 0.78 \times 1.5 \text{ mm}^3$  resolution of the X-rays images, from the biggest to the smallest ones. However, these very small bubbles can be mechanical openings. They are mostly found under-rind and they almost do not grow during ripening, as marked on X-rays images displayed on Fig. 2a by red arrows. A good way to take them apart from the growing eyes number is to set a threshold value on the eye size. This choice was based on the amount of porosity brought by eyes from different volume classes, at different ripening stages, as presented on Fig. 3.



**Fig.3:** Part of the global porosity of cheese brought by eyes from different volume classes: (●)  $V < 10 \text{ mm}^3$ , (■)  $10 < V < 50 \text{ mm}^3$ , (◆)  $50 < V < 500 \text{ mm}^3$  and (×)  $V > 500 \text{ mm}^3$

At the beginning of ripening, the smallest eyes with a volume lower than  $10 \text{ mm}^3$  counted for 20% of the porosity of cheeses, whereas the ones with a volume higher than  $50 \text{ mm}^3$  explained 80% of the porosity. Moreover, the days after Day3, the part of porosity brought by these smallest eyes kept decreasing. At Day7 already, their part reached 5%, which could be neglected in comparison with the 95% brought by bigger eyes. According to the X-rays images resolution and to these results, the chosen threshold value was  $10 \text{ mm}^3$ , which correspond to a 1.3 mm radius. Therefore, all the openings having a volume smaller than  $10 \text{ mm}^3$  were considered as mechanical openings or micro-eyes that did not participate to the porosity uptake at the considered day (they could be taken into account the next

day of acquisitions if bigger than  $10 \text{ mm}^3$ ). The evolution of the corresponding number of eyes with a volume higher than  $10 \text{ mm}^3$  is displayed on Fig. 2b. When setting apart the smallest eyes from the growing ones, the number of eyes higher than  $10 \text{ mm}^3$  was  $125 \pm 60$  at the beginning of ripening. A linear curve could also be fitted on the evolution of the growing eyes number during ripening ( $R^2=0.978$ ). Their apparition rate was calculated:  $17 \text{ eyes higher than } 10 \text{ mm}^3 \cdot \text{day}^{-1}$ . This value is close to the one previously found for the total number of eyes.

The global cheese porosity grew from  $0.03 \pm 0.01\%$  at the beginning of ripening until  $0.13 \pm 0.05\%$  at the end of  $12^\circ\text{C}$  ripening period and  $4.60 \pm 0.60\%$  at the end of hot room (Fig. 2c). It is interesting to note the low standard deviations also found for this opening indicator between the ten studied cheeses. Two different rates were present in the porosity uptake: one during the  $12^\circ\text{C}$  ripening period with a small porosity increase, and one in hot room, where the increase was much faster. An exponential curve could be fitted on these data ( $R^2=0.984$ ). Caccamo et al. (2004) measured the area occupied by openings on three photographed slices of different Ragusano cheeses and found between 0.9 and 6.8% of the slices' surface occupied by gas holes. This first approximation was still limited by the 2D image processing. On the contrary, Lee et al. (2012) used X-rays tomography to study the porosity uptake in Gouda cheese during 16 weeks of ripening at  $15^\circ\text{C}$  and were not limited by 2D. They found a final porosity ranging from 0.5 to 1.5% for five cheeses and reached 10% for the last one at the end of the 16<sup>th</sup> week.

The current results also showed that even if more than 200 openings (and among them 125 growing ones) were already present at the beginning of ripening, their corresponding porosity was almost non-existent. The eye size is thus another important parameter to take into account. The average growing eyes volume at the beginning of ripening was  $16.3 \pm 0.6 \text{ mm}^3$  whereas it reached  $1015 \pm 160 \text{ mm}^3$  at the end of ripening. These values correspond to an average radius of 1.6 mm at the beginning of ripening and 6.2 mm in the end. However, this 4.8 fold increase of the growing eyes average radius mostly occurred during hot room. The eye growth during the  $12^\circ\text{C}$  ripening period appears very slow. On the contrary, after 5 days at  $20^\circ\text{C}$ , the porosity started increasing faster, until a 3.4% uptake was reached in only four days, between Day21 and Day25, at the end of ripening. Therefore, it seems that contrarily to the number of eyes, their volume is influenced by the temperature, even if it does not seem to be an immediate phenomenon.

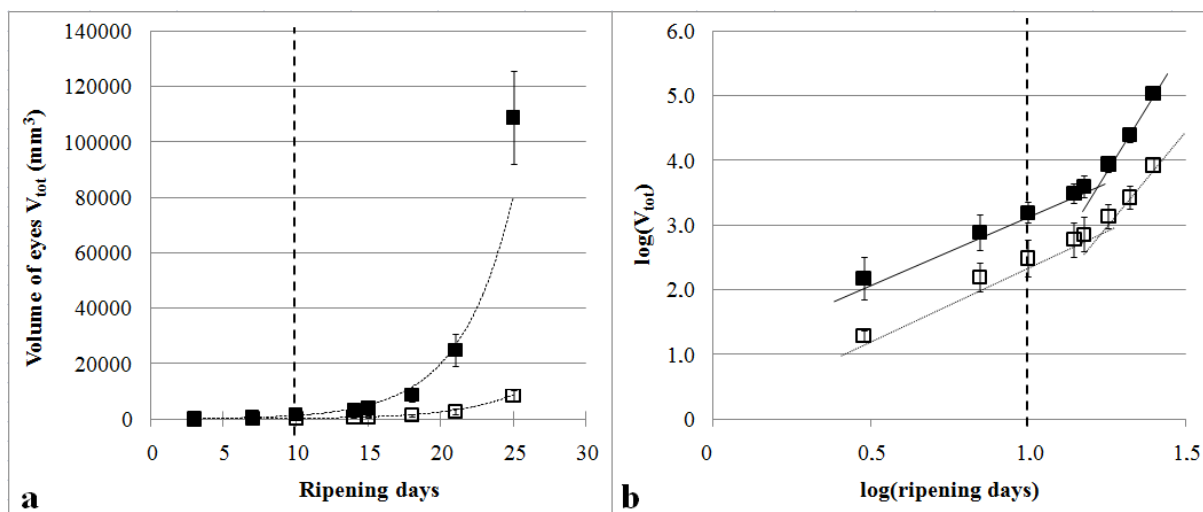
Moreover, the current image processing enabled the following individual eye growth kinetics on X-rays images. Therefore, the growth beginning point could be determined for each eye. Indeed, the growth curve displayed in Fig. 2c is not sufficient for differentiating the fraction of porosity coming from eyes detected at the beginning of ripening and having a growing kinetic during the all ripening stage, from the fraction coming from new detected eyes. In order to better apprehend these

specificities, each opening bigger than  $10 \text{ mm}^3$  was considered individually so that the number of eyes appearing in cold and hot room and the porosity brought at each stage could be quantified. 44% of eyes started their growth in cold room while 56% started growing during hot room. Therefore, around half of the eyes started their growth as early openings during the  $12 \text{ }^\circ\text{C}$  ripening period and the other half as late openings during hot room. Interestingly, the early eyes also represented respectively 67% of the final porosity, while the late ones represented 33% of the final porosity. The variability from one cheese to another on the growth starting point was  $\pm 15\%$ , so the difference between early and late eyes was significant. These results showed that half of the eyes grew during the  $12 \text{ }^\circ\text{C}$  ripening period and led to the bigger amount of gas, while the other half which was formed during hot room did not bring more than a third of the final porosity.

The observation of X-rays images finally showed that most of the bigger eyes were localized in the center of cheese. Under-rind, there was much less eyes and this population appeared smaller than the core one. This relationship can be formalized by correlating barycenter coordinates to the final volume of eyes at Day25. It was significantly influenced by the coordinates along the vertical axis Y (P-value 0.003) whereas the influence of other coordinates was insignificant (P-value  $> 0.5$  along both X and Z axis). It is thus of a high interest not to only study the global indicators but also to investigate the different eye growth patterns due to localization of eyes in cheeses.

### *2.2 Local indicators: opening gradient*

Therefore, in order to investigate the spatial distribution of eye growth kinetics, two zones of interest were selected. The core and under-rind zones were recreated on the X-rays images, and local indicators were computed. The eyes with a volume higher than  $10 \text{ mm}^3$  corresponded to only 0.15% of the final gas volume found in cheese (Fig. 3). All the other eyes corresponding to more than 98% of the final cheese porosity were kept for determining their individual growth kinetic. At the end of ripening, a porosity of  $1.0 \pm 0.15\%$  was found in the center against  $0.1 \pm 0.02\%$  under-rind. This 10 fold difference in porosity according to the location in cheese demonstrated that a porosity gradient existed inside the cheese. Moreover, the final volume of gas identified in the two slices represented  $21.8 \pm 2.8\%$  and  $1.7 \pm 0.5\%$  of the final total porosity of the cheeses for C and for UR respectively. This result shows that C slice counted more than a fifth of the final quantity of gas of the whole cheeses, which confirmed the importance of the central zone in the  $\text{CO}_2$  production taking place in cheese. Moreover, different eye growth kinetics between core and under-rind zones were observed, as regards to the gas volume increase rate in both slices. The evolution of the total gas volume contained in C and UR eyes during ripening was plotted on Fig. 4a and its log/log evolution was plotted on Fig. 4b in order to linearize the exponential profiles.



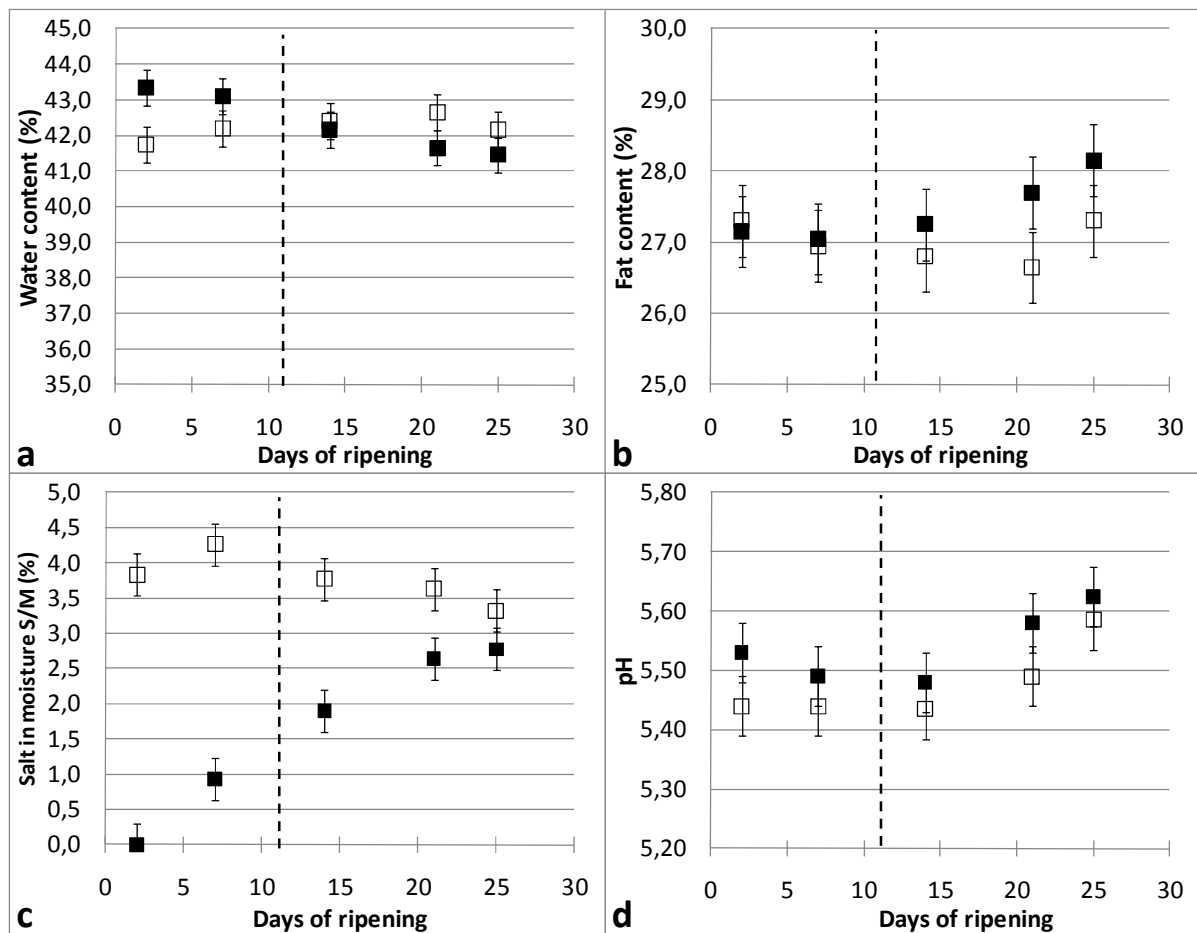
**Fig.4:** (a) Evolution of average total volume in C (■) and UR (□) slices out of ten cheeses; (b) Evolution of log/log plot of average total volume in C (■) and UR (□) slices out of ten cheeses. Non-continuous line = shift from 12 to 20 °C

The total gas volume in eyes ( $V_{tot}$ ) did not seem to display any difference during the 12 °C ripening period between C and UR slices on Fig. 4a. However, the Fig. 4b allowed a better visualization of the first ripening step thanks to the logarithm scale. The difference between UR and C slices during the 12 °C ripening period appeared to be the initial state of the cheeses when entering ripening. Afterwards, the eye growth in the center became faster than under-rind during the second week of hot room. The final total gas volume reached in C slice was  $109.10^3 \pm 17.10^3 mm^3$  against  $8.10^3 \pm 2.10^3 mm^3$  in UR slice. It represented a total gas volume almost 13 times bigger in the center than under-rind. The higher standard deviations found in the quantification of the volume of gas in the center is due to the wider variability of eye size observed in that zone. Indeed, while mostly small eyes can be found under-rind, both small and bigger eyes are present in the center. As a consequence, the population was more homogeneous in the UR slice than in the C one. However, an exponential curve could be fitted on the total gas volume evolutions for both slices ( $R^2=0.984$  and  $R^2=0.966$ ). Therefore, the gradient did not influence the profile of eye growth but mostly the growth rate. The results were plotted as log/log curves, as can be seen on Fig. 7b revealed two consecutive growth rates depending on the ripening time: one from the beginning of ripening until mid-hot room and the other one during the last week of hot room. Therefore, the core zone displayed a faster growth rate than under-rind only in the last week of hot room. The first ripening period showed a same growth rates, 2.20 and 2.00 for both UR and C slices, respectively. Afterwards, during the second week of hot room, differences between the two slopes were observed, with 5.54 and 7.66 in under-rind and central slices respectively. Interestingly, the ripening day where the growth began to change was Day17 in both slices, which matched the end of the first week of hot room. These results showed the strong influence of eye location on its growth rate, especially after Day17, and as a consequence on the final gas volume reached in different parts of cheese.



### *2.3 Chemical gradients*

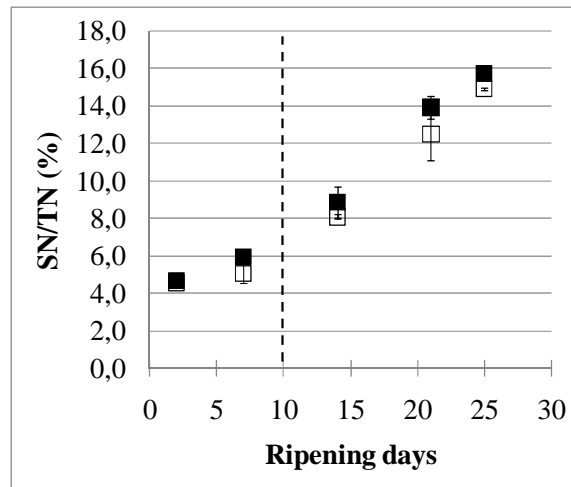
The water content (Fig. 5a) in cheeses ranged between 41.8 and  $43.4\pm 0.5\%$  at the beginning of ripening in UR and C slices respectively. At the beginning of hot room, the water content was equilibrated between the two locations and remained constant until the end of ripening, with an average value of  $42.0\pm 0.5\%$ . The fat content (Fig. 5b) at the beginning of cold room in both UR and C slices was  $27.3\pm 0.5\%$ . After the end of ripening (Day25), the fat content in both slices ranged between 27.3 and  $28.2\pm 0.5\%$ , which is a non significant difference (corresponding to a 47 at Day3 to 48% at Day25 in Fat/dry ratio). Therefore, neither the water nor the fat content was submitted to a gradient in cheese during ripening. On the contrary, the salt content (Fig. 5c) displayed strong differences between C and UR slices. At the beginning of ripening, no salt could be found in the center, while the Salt/Moisture ratio reached 3.8% under-rind. This strong gradient decreased during ripening, and equilibrium was reached at the end of ripening. At Day25, both slices displayed non significant differences in S/M levels, with an average value of  $3.0\pm 0.3\%$ . Finally, the pH values were also controlled (Fig. 5d), but no significant gradient could be found between the C and UR slices during ripening. In both locations, the pH was almost constant during the 12 °C ripening period around 5.45 before increasing after 5 days of hot room until 5.60 at Day25.



**Fig.5: Evolution of water (a) and fat (b) content, salt in moisture (S/M) ratio (c) and pH (d) in semi-hard cheeses during ripening (■ in the center & □ under rind). Non-continuous line = shift from 12 to 20 °C**

These results are in good agreement with other studies showing a salt uptake in cheese, as in Romano cheeses (Guinee et al., 1986) or in Gouda cheeses (Geurts et al., 1974; Guinee, 1985; Guinee, 2004). However, in most of these works, the salt uptake in the whole cheeses was associated with a water loss that was not found in the current products, as they were packaged during ripening. The time scale of ripening was also very different, influencing the delay needed for salt content to equilibrate that depends on the cheese technology: from days for Camembert to weeks for Edam, or Gouda and months for Emmental (Geurts et al., 1974). Some gradients were also enhanced in Swiss-type cheeses, showing a higher water content and reversely lower salt content in the center and depending on cheese age (Reinbold et al., 1958; Hollywood et al., 1984). A decreasing S/M gradient was found during ripening between the center and the periphery of Swiss-type cheeses, coming from 3% difference at the beginning of ripening to 1.5% at the end of it. The heterogeneity of salt and water in cheese was also enlightened for Cheddar cheese even if only in small 30g samples (Moriss et al., 1985). However, there is a main difference with the current study: the packaging film, which did not allow a water or loss in the semi-hard cheeses during ripening.

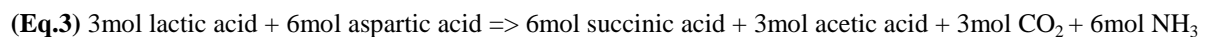
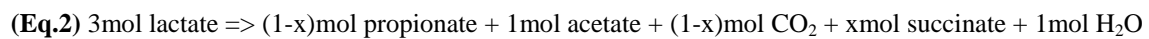
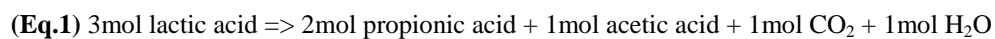
Proteolysis indicators such as total nitrogen (TN) and soluble nitrogen (SN) were quantified and the ratio SN/TN is presented on Fig. 6.



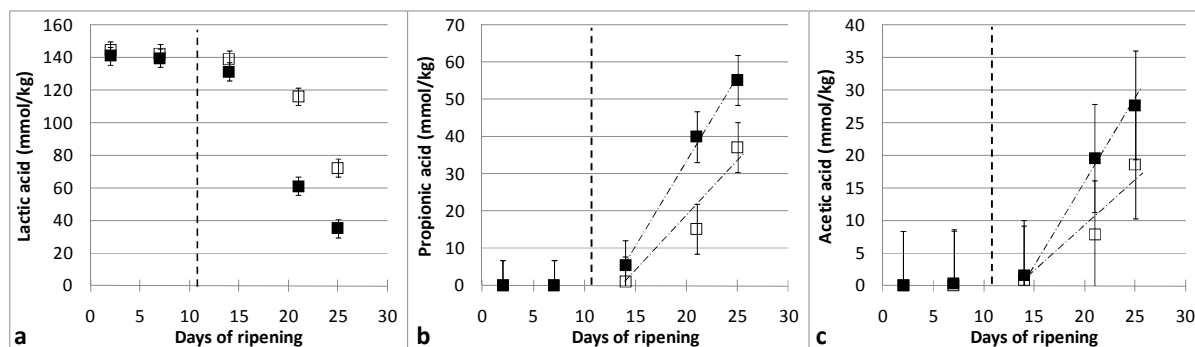
**Fig.6: Evolution of Soluble Nitrogen/Total Nitrogen ratio in semi-hard cheeses during ripening (■) in the center and (□) under-rind. Vertical non-continuous line = shift from 12 to 20 °C**

The SN/TN ratio increased linearly during ripening from 4 to 16%. No difference could be found between UR and C slices as regards to the primary proteolysis.

Finally, the evolution of lactic, acetic and propionic acids during ripening was plotted on Fig. 6. These organic acids are involved in bacterial metabolism as PAB's and can be used as CO<sub>2</sub> production indicators, especially acetic acid, theoretically equimolar with CO<sub>2</sub>, according to metabolic pathways described by Eq. 1, Eq. 2 and Eq. 3.



Eq. 1 is the classical pathway for CO<sub>2</sub> production, named Fitz pathway. Eq. 3 is the reaction of aspartate deaminatoin, which can only be activated if there is aspartate in the environment of PAB and if the bacteria possess the aspartase enzyme. Eq. 2 represents the fixation of carbon dioxide that can be tracked by succinate.



**Fig.7: Evolution of organic acids during ripening: (a) lactic acid, (b) propionic acid and (c) acetic acid, ■ in the center & □ under rind. Non-continuous line = shift from 12 to 20 °C**

During the 12 °C ripening period, the consumption of lactic acid was very slow and this maximal value was the same in both C and UR slice, around 140 mmol.kg<sup>-1</sup> (Fig. 7a). After the temperature shift from 12 to 20 °C (Day11), the amount of lactic acid started decreasing, which is coherent as lactate is a substrate for PAB (Eq.1). A lactic acid gradient appeared in hot room: its decrease was faster in the center than under-rind, with 50% of lactate consumed in UR slice and 80% in C one. The magnitude of these results is in good agreement with the average 89mmol.kg<sup>-1</sup> lactic acid consumption found for Swiss-type cheese after 42 days of ripening (Crow et al., 1986).

No propionic acid could be found in both zones during the 12 °C ripening period (Fig. 7b). Its concentration started increasing after the temperature shift only, which is in good agreement with PAB metabolic pathways, as propionic acid is a metabolic products of PAB (Eq.1). During hot room, propionic acid production was faster in C slice than in UR. At Day 25, the final propionic acid amount was 55.2 mmol.kg<sup>-1</sup> in the center against 37.1 mmol.kg<sup>-1</sup> under-rind. The propionate production in hot room could be fitted with a linear curve, which slope was 4.6 mmol.kg<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup> in the centre, against 3.1 mmol.kg<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup> under-rind. Therefore, the PAB seemed to have a faster/better growth metabolism in the center slice of cheeses than under-rind.

Finally, a gradient of acetic acid could also be found, but only during hot room, as no acetate could be quantified during the 12 °C ripening period (Fig. 6c). As for propionic acid, the production of acetate was faster in the center during hot room, with 2.4 mmol.kg<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup> in the centre, against 1.5 mmol.kg<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup> under-rind. The final values reached at Day25 were 18.7 mmol.kg<sup>-1</sup> in the centre, against 27.7 mmol.kg<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup> under-rind. Acetic acid can be produced by other micro-organisms than PAB, as LAB consuming citrate as main substrate. However, these results proved that the fermentations implied in its production are occurring faster in the center of cheeses than under-rind. These results are in good agreement with the average 5000 and 2500 mg.kg<sup>-1</sup> final propionic and acetic values found in Swiss-type cheeses after 42 days of ripening, which corresponds to respectively 65.7 mmol.kg<sup>-1</sup> and 41.6 mmol.kg<sup>-1</sup> (Crow et al., 1986). The magnitude of these results is especially close to the values currently found in the center of the semi-hard cheeses. Hollywood et al. (1984) found lower organic

acid levels after 8 days at 20 °C and 21 days at 8 °C but with a higher gradient between the center and the edge of Swiss-type cheeses (acetate content 8 times higher in the center and propionate 6 times higher, compared to 1.5 times higher for both organic acids in the current study). However, both process and recipe of cheeses were different from the conditions currently studied. Nevertheless, all these results enhanced a faster metabolism in the core zone of cheeses, probably thanks to a higher number of bacteria in that area, as showed by Hollywood et al. (1984) who found 6.8 times more numerous PAB in the center of Swiss-type cheeses after 29 days of ripening.

The final  $\frac{\text{Propionic acid}}{\text{Acetic acid}}$  molar ratio was equal to 1.99 in both zones at Day25. As it is close to 2, the Fitz pathway is the major metabolic pathway active in the semi-hard cheeses, according to Eq. 1. Therefore, the majority of carbon dioxide can be attributed to PAB. A value of produced CO<sub>2</sub> in semi-hard cheeses could thus be deduced, equal to the molar amount of acetic acid previously calculated. In the center, 27.7 mmol.kg<sup>-1</sup> of CO<sub>2</sub> were produced against 18.7 mmol.kg<sup>-1</sup> in the cortical zone. Making the hypothesis that the production is maximal in the center and minimal under-rind, the CO<sub>2</sub> production in these 11 kg semi-hard cheeses should then range between 0.2 and 0.3 mol of CO<sub>2</sub> after 25 days of ripening.

#### 2.4 Rheological gradients

The rheological properties of semi-hard cheeses were determined at two different ripening stages as they were found constant during ripening by Huc et al. (submitted). And as can be seen on Fig. 8a and Fig. 8b, both biaxial fracture stress and strain were constant between the end of the 12 °C ripening stage and at mi-hot room.

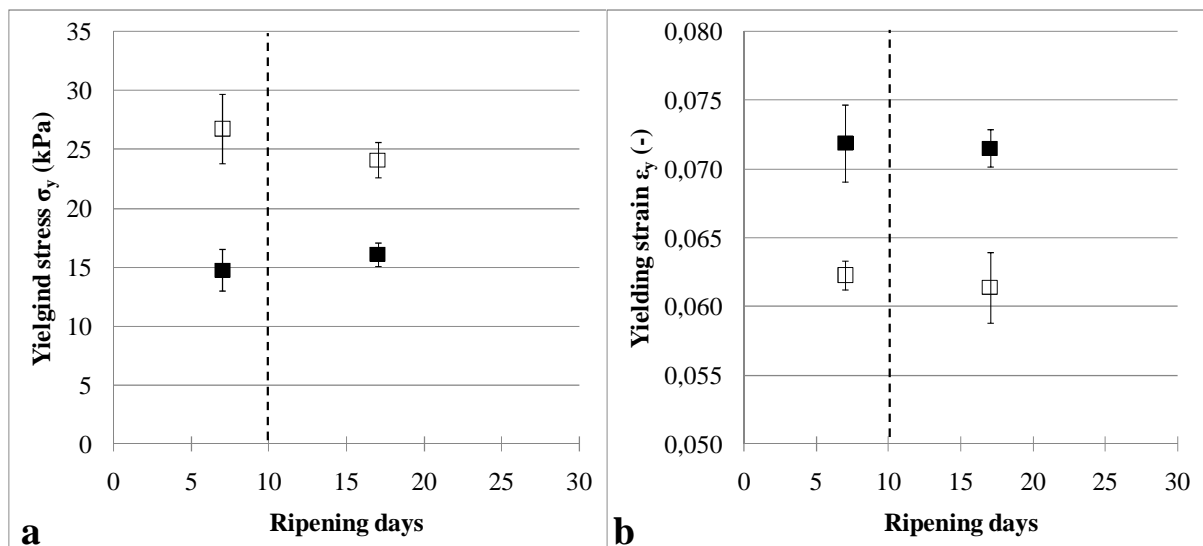


Fig.8: Rheological properties of semi-hard cheeses: (a) Biaxial yielding stress and (b) Biaxial yielding strain during ripening, in the center (■) and under-rind (□).

However, some significant differences were enhanced between C and UR slices. Fig. 6a showed that the biaxial yielding stress was 1.3 to 1.8 times higher under-rind than in the center of cheese (respectively at Day17 and Day7), with 26 kPa against 14 kPa with standard deviations comprised between  $\pm 0.7$  and  $\pm 2.0$ . This indicator is directly correlated to the Young Modulus, which was twice higher under-rind than in the center (1.8 at Day17 and 2.2 times higher at Day7), with around 520 kPa in UR samples against 260 kPa in C ones. Fig. 6b showed that the biaxial yielding strain was also impacted by the location of the samples.  $\epsilon_y$  was slightly higher in the center (x1.1) than under-rind with  $0.071 \pm 0.001$  against  $0.062 \pm 0.002$  during the whole ripening. Culioli & Sherman (1976) also showed that sample location influenced the rheological properties. They found a Young Modulus and a fracture force higher near the surface of young and mature Gouda cheeses. However, the fracture compression was slightly higher in the central region. Therefore, there is also a rheological gradient between under-rind and the central zone of semi-hard cheeses. However, the intensity of this gradient does not seem to evolve during ripening but is rather static.

### 3. Discussion

Two different populations of eyes could be isolated by X-rays image processing: eyes situated 1 cm under-rind and eyes situated in the center. This approach revealed a gas volume uptake increasing exponentially in both core and under-rind zone. The eye growth during the 12 °C ripening period appeared to be slow, showing that micro-organisms may not display a very effective gas production at 12 °C. However, when using a log/log representation to linearize the exponential gas volume uptake, two rates were revealed with a breaking point that did not match the temperature shift. Indeed, from the beginning of ripening until the end of the first week of hot room, the growth rate was very close for the two populations but at the end of ripening, it became faster in the center. Therefore, there might be a temperature-dependence of the gas volume uptake in cheese, but a 5 days latency phase is observed before the growth rate could become faster. As a consequence, the final volume of gas contained in the center reached a higher value than the one under-rind. This temperature-dependence of cheese porosity was enlighten by Kraggerud et al. (2009), who showed that eyes volume was significantly higher after 12 days of hot room, in cheeses ripened at three temperatures with a  $\Delta T$  of 3 °C between each level. Finally, the mean final eye volume was also higher for core eyes than for under-rind ones. Therefore, a strong opening gradient was identified according to the location of eyes in cheese. Other potential gradients were thus investigated in order to determine which parameter(s) could cause or participate to these opening differences.

The salt content is the only composition parameter that was submitted to a core/under-rind gradient during ripening. It decreased in time due to diffusion from the periphery towards the core zone. The other cheese components submitted to a gradient were the lactic, propionic and acetic acids. At the beginning of ripening, their concentration was the same in both zone of cheese but during hot room,

the consumption of lactate and the production of acetate and propionate became faster in the center. Such differences in the organic acids according to sample location in cheese traduce heterogeneities in the bacterial metabolism. Indeed, propionate is a direct indicator of PAB metabolism and acetate is a tracker of CO<sub>2</sub> responsible for eye formation. This statement is in good agreement with the low gas volume increase observed by X-rays tomography. However, as a small increase of gas volume was detected during the 12 °C ripening, there must be another gas production which cannot be attributed to PAB. It may be lower than the one observed in hot room and or the latency phase observed until 5 days at 20°C may correspond to the duration necessary for CO<sub>2</sub> to saturate the cheese matrix. After this delay, as gas production is faster according to the monitoring of organic acids and if the cheese matrix is saturated in CO<sub>2</sub>, one can understand why the porosity starts increasing faster. Several studies in literature have shown that a lower salt content provides better development conditions for bacteria in cheese. Indeed, PAB are known to be sensitive to salt content, among other parameters as temperature or pH, but these were both constant in the present study. The action of salt content on PAB is known as an inhibition (Boyaval, 1999; Caccamo, 2004; Richoux et al., 1998; Saurel, 2004), leading to a lower development and metabolism activity. It could explain the differences found between C and UR slices in organic acids content. Even if the salt content was equilibrated in cheeses at the end of ripening, its original difference must have impacted the bacterial development. Therefore, when cheeses were transferred to hot room, the temperature became closer to the optimum conditions for bacterial development (between 25 and 35 °C for most PAB strains, according to Richoux (1998), but PAB in the center reacted faster to this improvement than under-rind ones.

Finally, the last elements submitted to a gradient in cheese were the rheological indicators Young Modulus, biaxial yielding stress and in to a lesser extent the biaxial yielding strain. They showed that the cheese matrix was firmer and more rigid under-rind than in the center. The higher firmness in the periphery of cheeses could also participate to the lower development of eyes by adding a supplementary strain that would slow down eye expansion. Surprisingly, no proteolysis gradient was found to match these rheological differences. It thus seems that the rheological properties of the semi-hard cheeses are decorrelated from the primary proteolysis.

Moreover, according to Fig. 2b, more than 200 eyes among which a half bigger than 10 mm<sup>3</sup> were already detected in cheese at the beginning of ripening. Therefore, a gas production must take place in cheeses before entering ripening. This result is in good agreement with some scanning electron microscopy (SEM) investigations realized on Emmental cheese during ripening, showing an early apparition of small openings during production room that could not be attributed to PAB fermentation (Rousseau et al., 1990). The gas at this stage was not produced by PAB, but by other gas productive bacteria as citrate-dependent LAB or by NSLAB for example. In a technological point of view, these previous process steps seem very important to better understand and control the eye growth

mechanisms. It would be interesting to better characterize the porosity of cheese earlier in the process and not only during ripening.

The 12 °C ripening period also seems to be an important in eyes development. Indeed, around 50% of eyes started to grow during this ripening period and led to the bigger openings at the end of ripening. On the contrary, the eyes growing during hot room only bring 33% of the final cheese porosity, despite the stronger CO<sub>2</sub> production occurring in hot room. It seemed logical that the openings that first appeared had the longer ripening time and thus became bigger in average. Could a longer 12 °C ripening period then lead to bigger eyes in the final products? A reduction of the hot room phase could even be considered if the 12 °C period was reinforced, especially as the first week of hot room did not modify the growth rate of the eyes in cheese.

## **5. Conclusion**

X-rays tomography revealed a strong opening gradient in semi-hard cheeses, with a higher volume of gas and final mean size of eyes found in the center compared to the under-rind area. The barycenter coordinates were significantly correlated to the final eye volume along the vertical Y axis, proving that location impacts the eye growth. Other gradient phenomena were thus investigated in the composition and rheological properties of cheeses. The salt content was the only component of cheese displaying differences according to sample location, as neither the water nor the fat content, the pH or the proteolysis indicators were submitted to a gradient. The packaging film seems to prevent any influence from cheese composition other than the salt content. The other parameters submitted to a gradient between under-rind and core zones were the rheological indicators Young Modulus, yielding stress and in a lesser extent yielding strain. The influence of salt content on eye growth could be explain by its influence on PAB as reported in literature but quantified for the first time on intrinsic cheese porosity. The main leverage on the eye growth mechanisms would then be the CO<sub>2</sub> production. However, the firmness and rigidity were also higher under-rind, which could participate to a supplementary constraint on eye development. In the objective of a decorrelation between all mechanisms involved in eye growth, it would be interesting to compare two different CO<sub>2</sub> productions in cheeses with a similar rheology and two different cheese rheological behaviors but with the same gas production. Moreover, it is still unclear if the salt content could affect enough the CO<sub>2</sub> solubility and diffusion inside cheese to participate to the opening gradient. The individual study of CO<sub>2</sub> production, solubility and diffusion aiming for their prioritization still seems difficult to achieve in practice.

## **Acknowledgements**

The authors thank Gabrielle Moulin for performing the rheological tests; Vincent Louveau and Stephane Quellec for their help with the X-rays acquisitions; the Regional Council of Bretagne, Basse



Normandie and Pays de la Loire, the General Council of Ile et Vilaine and the competitiveness cluster Valorial for their financial support.

## References

- Accolas, J. P., Veaux, M., Vassal, L., & Mocquot, G. (1978). Development of thermophilic lactic-acid bacteria of hard cheeses during pressing. *Lait*, 58, 118-132.
- Bachmann, H. P., Butikofer, U., & Meyer, J. (1999). Prediction of flavour and texture development in Swiss-type cheeses. *Food Science and Technology Lebensmittel Wissenschaft & Technologie*, 32, 284-289.
- Bachmann, H. P., Butikofer, U., & Isolini, D. (2002). Swiss-type cheese. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. (pp. 363-374). Elsevier Academic Press.
- Caccamo, M., Melilli, C., Barbano, D. M., Portelli, G., Marino, G., & Licitra, G. (2004). Measurement of Gas Holes and Mechanical Openness in Cheese by Image Analysis. *Journal of Dairy Science*, 87, 739-748.
- Crow, V.L., & Turner, K.W. (1986). The effect of succinate production on other fermentation products in Swiss-type cheese. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 21, 217-227.
- Culioli, J., & Sherman, P. (1976). Evaluation of Gouda cheese firmness by compression tests. *Journal of Texture Studies*, 7, 353-372.
- Fluckiger, E. (1980). Formation of CO<sub>2</sub> and eyes in Emmental cheese. *Schweizerische Milchzeitung*, 106, 473-474; 479-480.
- Fröhlich-Wyder, M.T., & Bachmann, H.P. (2004). Cheese with Propionic Acid Fermentation. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol.2 Major Cheese Groups. (pp 141-156).
- Geurts, T. J., Walstra, P., & Mulder, H. (1974). Transport of salt and water during salting of cheese. 1. Analysis of the processes involved. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 28, 102-129.
- Geurts, T. J., Walstra, P., & Mulder, H. (1980). Transport of salt and water during salting of cheese. 2. Quantities of salt taken up of moisture lost. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 34, 229-254.
- Guinee, T.P. (1985). Studies on the Movements of Sodium Chloride and Water in Cheese and the Effects thereof on Cheese Ripening. *PhD thesis*, National University of Ireland, Cork.
- Guinee, T.P. (1986). Transport of Sodium Chloride and Water in Romano Cheese Slices During Brining. *Food Chemistry*, 19, 49-64.
- Guinee, T. P. (2004). Salting and the role of salt in cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 99-109.
- Hollywood, N. W., & Doelle, H. W. (1984). The effect of sampling position and age on levels of propionibacteria and flavor-related compounds in Swiss-type cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 39, 80-82.
- Kraggerud, H., Wold, J.P., Hoy, M., Abrahamsen, R.K. (2009). X-rays images for the control of eye formation in cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 62, 147-153.
- Lee, K., Uegaki, K., Nishii, C., Nakamura, T., Kubota, A., Hirai, T., & Yamada, K. (2012). Computed tomographic evaluation of gas hole formation and structural quality in Gouda-type cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 65, 232-236.
- Morris, H.A., Guine, T.P., Fox, P.F. (1985). Salt diffusion in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 68, 1851-1858.

- Prentice, J.H. (1987). Chees Rheology. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol.1 *General Aspects*. (pp299-344). Elsevier Applied Science.
- Reinbold, G. W., Hussong, B. V., & Stine, J. B. (1958). Distribution of Propionibacteria in Swiss Cheese. *Journal of Dairy Science*, *41*, 606-610.
- Rousseau, M., & Legallo, C. (1990). Scanning electron-microscopic study of the structure of Emmentaler cheese during manufacture. *Lait*, *70*, 55-66.
- Saurel, R., Pajonk, A., & Andrieu, J. (2004). Modelling of French Emmental cheese water activity during salting and ripening periods. *Journal of Food Engineering*, *63*, 163-170.
- Steffen, C., Eberhard, C., Bosset, J.O., & Rüegg, M. (1993). Swiss-type varieties. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology Vol. 2 Major Cheese Groups* (pp. 83-110): Springer.

### 2.4.3 Etude de l'influence du gradient de teneur en sel sur la croissance de bulles (A6)

Ce sixième article est en phase terminale de rédaction pour une soumission auprès d'*International Dairy Journal* envisagée à la fin du mois de Juillet 2013.

## **Study of the influence of salt content on eye growth in semi-hard cheeses by MRI and CO<sub>2</sub> production measurements**

### **Authors:**

D. Huc<sup>abcde</sup>, N. Roland<sup>f</sup>, D. Grenier<sup>ab</sup>, S. Challos<sup>ab</sup>, M. Monziols<sup>f</sup>, C. Michon<sup>cde</sup>, F. Mariette<sup>ab\*</sup>

(a) IRSTEA, UR TERE, 17 Avenue de Cucillé, CS 64427, F-35044 RENNES

(b) Université européenne de Bretagne, France

(c) AgroParisTech, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments F-91300 MASSY

(d) INRA, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments Olympiades F-91300 MASSY

(e) CNAM, UMR1145 Ingénierie Procédés Aliments, F-75003 PARIS

(f) Laboratoires Standa, F-14050 CAEN cedex 4

### **Abstract**

In a previous study, the eye growth in semi-hard cheeses was found to be submitted to a strong gradient in cheeses between the periphery and the core zone. However, no corresponding differences could be found in composition parameters other than the salt content. As salt is also known to influence the rheological properties of cheese, it appeared as a prior factor to study in order to better understand the eye growth phenomenon. Therefore, an experiment was designed to study salted and unsalted cheeses, by combining MRI and a CO<sub>2</sub> production determination based on gas pressure measurements. Chemical and rheological tests were also performed to check that only the salt content was modified between the two types of cheese. It appeared that the presence of salt induced a delay in the bacterial development and in the CO<sub>2</sub> production. As a consequence, the eyes in salted cheeses were found six times smaller and their growing kinetic was lower. Moreover, the eye formation rate was higher in unsalted cheeses, leading to a strong coalescence phenomenon. The combination of these two techniques thus allowed to decorrelate factors and to quantify the influence of the salt content on the openings.

## 1. Introduction

Swiss-type cheeses are characterized by their eyes, whose features are very important quality parameters and can influence the consumer choice. However, as their growth mechanisms are generally known empirically, product innovation based on process or formulation can be difficult, as the impact on eyes cannot be anticipated. Indeed, some defects as cracks or slits can appear instead of an eye, there can be too many or too few eyes or an uneven repartition within cheeses. Pressed and non-cooked curd cheeses are characterized by their fabrication process led in six main steps: milk preparation, renneting, cutting, draining, pressing and ripening. Some specific bacterial strains are used during the cheese making, called propionic acid bacteria (PAB), mainly responsible for the formation of eyes in most Swiss-type cheeses during the ripening stage. The eye growth depends upon CO<sub>2</sub> production and diffusion rates, number and size of nuclei as areas of future eye formation, and body texture (Steffen et al., 1993). Therefore, physics and chemical parameters can affect PAB and as a consequence the eyes of Swiss-type cheeses. For example, inhibition can come from a low temperature or pH, or from negative interactions with other bacteria strains (Richoux et al., 2005; Jaros et al., 1997; Jimeno et al., 1995; White et al., 2003). Salt was particularly identified as an important factor of influence: it can inhibit bacteria (Boyaval et al., 1999; Carcano et al., 1995; Richoux et al., 1998; Saurel et al., 2004), by inducing changes in the ionic strength and osmotic pressure (Geurts et al., 1974, Lucey et al., 2003). However, salt can also influence the rheological properties of cheeses: the Young modulus of Emmental and Gouda cheese increased while the fracture strain decreased with a higher salt content (Famelart et al., 2001; Guinee et al., 2002; Luyten, 1988; Visser et al., 1991); the longer the salting time of Appenzell cheese, the firmer and shorter was its texture (Eberhard, 1985). Still, contradictory results from TPA tests led on model or Cheddar cheeses showed either an increased or decreased hardness of the cheese matrix with a higher salt content (Floury et al., 2009; Pastorino et al., 2003).

Moreover, the understanding of the mechanism involved in eyes growing is complicated by the non-uniform composition of the cheese. For example, a higher development of PAB was found in the center than at the cheese periphery (Hollywood & Doelle, 1984; Huc et al., submitted; G. W. Reinbold, Hussong, & Stine, 1958; R. S. Reinbold, Erstrom, & Hansen, 1992; Steffen, Nick, & Blanc, 1974) and a strong salt gradient was enhanced with lower salt contents in the center of Swiss-type cheeses (Geurts, Walstra, & Mulder, 1974, 1980; Guinee, 2004; Hollywood & Doelle, 1984; Huc et al., submitted). This salt concentration gradient in cheese due to the brining step is also closely linked to pH, calcium content, and especially water content which displays an opposite gradient with salt in unpacked cheeses during ripening (Lucey et al., 2003; Luyten, 1988).

Finally, a strong eye growth gradient was evidenced inside Swiss-type cheeses using MRI. The eyes in the center are more numerous, bigger and growing faster than in the periphery (Huc et al., submitted) without any apparent differences in the microstructure from the millimeter to the micron scales.

However, to the best of our knowledge, no attempt to find a relationship between all these gradients of opening, CO<sub>2</sub> production and salt could be found in literature.

Therefore, the aim of the current study was to determine the influence of salt content on eye growth kinetic. Cheeses were produced from the same vat, half of them being salted and the other half unsalted in order to keep all other composition parameters constant and to only focus on the influence of salt. Eye growth kinetics were monitored using MRI during ripening and the evolution of cheese composition, CO<sub>2</sub> production and cheese matrix resistance were also tested during ripening and analyzed in relation to the salt content.

## 2. Materials & Methods

### 2.1 Cheese characteristics

The products were pressed and non-cooked curd cheeses (Fat/Dry 47%, water content 42%) submitted to different brining conditions. The first half was placed in a 22% w/w solution of NaCl at 12 °C during 3 days and named “salted cheeses” or S+ while the other half were not brined and kept at 12 °C during 3 days; they were called “unsalted cheeses” or S-. After these 3 days, all cheeses were packaged under an impermeable plastic film and vacuumed (250mbar) before entering ripening. They were followed during ripening, carried out in two steps: one week at 12 °C (production room, from Day1 until Day7), followed by two weeks at 20 °C (hot room, from Day8 until Day22). The temperature change from 12 to 20 °C occurring at Day10 was set at mid-day.

### 2.2 Cheese sampling

For chemical analysis, rheological measurement and CO<sub>2</sub> production, samples were taken in a specific slice named “C” for “center”, following the sampling protocol developed by Huc et al. (2013), as described on Fig. 1.

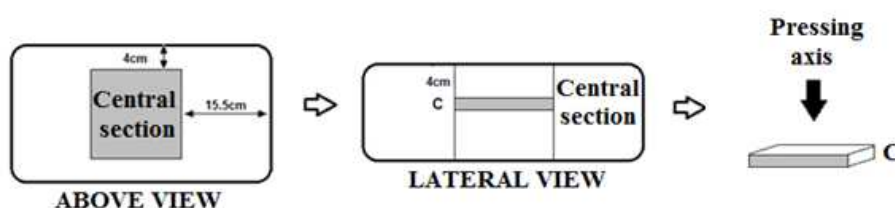


Fig.1: Schematic representation of sampling zone in Swiss-type cheese blocs

### 2.3 MRI acquisitions and image processing

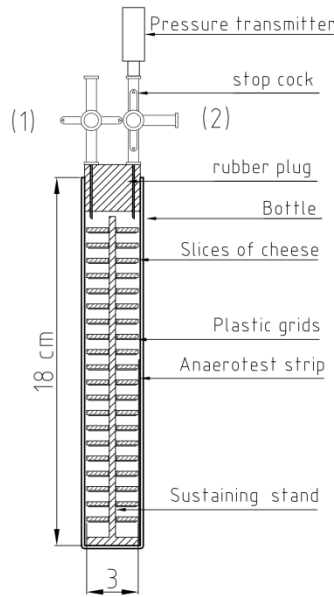
A 1.5 Tesla Avanto MRI scanner (Siemens, Munich, Germany) and a turbo spin echo sequence with a 1x1x1 mm<sup>3</sup> resolution, TR=200 ms, TE=8.7 ms and TF=6 was used. Three salted and three unsalted cheeses were followed during their ripening using Acquisitions were made at 11 different ripening

ages: Day1, Day4, Day6 (at 12 °C) and Day8, Day11, Day13, Day15, Day18, Day20 and Day22 (at 20 °C). A thermostated tank was used to maintain all products at the ripening temperature inside the MRI scanner, thanks to an air flow. All the details of imaging parameters were described by Musse et al. (submitted). The image processing allowed the determination of opening indicators (total eye number, volume of gas in cheese, mean volume of eyes, cheese porosity and volume of the body of the cheese) for the cheeses, but also in a specific volume in the center corresponding to the C slices as detailed by Huc et al. (submitted).

During ripening, unsalted cheeses developed a headspace and the quantification of its volume was necessary for obtaining accurate CO<sub>2</sub> balances. As any detectable MRI signal could be observed from the plastic film, an absorbing paper soaked with water and covered by a film to avoid any leak in the scanner was placed on the cheese. Due to its electrostatic action, the soaked paper perfectly covered the packaging film of cheeses while emitting a detectable MRI signal. Therefore, headspace volume delimited by the body of the cheese at the bottom and the water film on the top became visible and could be quantified using the same image processing as the one used for eye volume determination.

#### *2.4 Determination of CO<sub>2</sub> production by gas pressure measurements*

CO<sub>2</sub> production was estimated by the gas pressure measurement carried out in a closed airtight bottle containing slices of cheese (Fig.2), adapted from Benjelloun et al. (2005). The CO<sub>2</sub> release by bacteria inside the closed bottle during ripening at 20°C led to an increase of the gas pressure measured by the pressure transmitter. Measurements were carried out on C slices taken from salted and unsalted cheeses at the end of production room (Day 7) and at mid-hot room (Day 13). All slices were frozen at -20 °C during two weeks before being thawed the night before the experiments at 4 °C, as the non-influence of freezing was verified beforehand (data not shown). C slices were cut in thin rings of cheese (diameter 3 cm, thickness 1.5 mm) with a ham slicer and a core-borer. The high surface to volume ratio of the samples was chosen in order to reduce the CO<sub>2</sub> accumulation in the cheese matrix and to maximize the gas release in the bottle. These conditions allowed the study of the gas production in non-limiting diffusion conditions. About 20 rings (representing 25 to 30 g of cheese) were skewered on a sustaining stand, without contact between them (each slice was placed on a plastic grid) and placed in air-tight glass bottles sealed with rubber plugs, only pierced by two needles equipped with a two or three-way stop cock, as presented on Fig. 2.



**Fig.2: Schematic representation of the device used for gas pressure measurement**

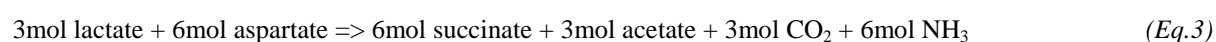
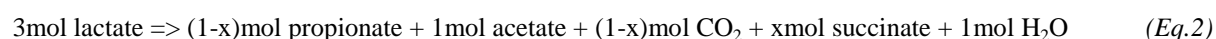
Air was removed by sweeping the bottles with Nitrogen (input 1 on Fig. 2). Anaerobiosis was controlled with an Anaerotest strip (Merck, Darmstadt, Germany). Eight bottles were filled with cheese samples and placed in a thermo-regulated cupboard at  $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Two replicates of each ripening time and salt content: S+ at Day10, S+ at Day16, S- at Day10 and S- at Day16 were monitored. At the beginning of the experiment, and 2 times a day, bottles were connected with piezoelectric pressure transmitter (Sensortech CTE7000, FirstSensor, Berlin, Germany) (output 2 on Fig. 2). Gas pressure was registered on a computer via a pressure values acquisition system designed by the Electronics Service of Technological University of Compiègne (Benjelloun, Rochex, Lecouturier, Dechemi, & Lebeault, 2005). Each pressure transmitter was first checked with a calibrated reference pressure transmitter that is controlled every year on a water column device. The  $\text{CO}_2$  release by bacteria inside the closed bottle leads to an increase in gas pressure ( $\Delta P$ ) measured by pressure sensor. The pressure in the bottle was  $P = \Delta P + P_{\text{atm}}$ , with  $P_{\text{atm}}$  the atmospheric pressure when the bottle was closed. Assuming that all the gas produced inside the bottle was  $\text{CO}_2$ , the number of mole of released  $\text{CO}_2$  ( $\Delta n$ ) was estimated according to the ideal gas law:  $\Delta PV = \Delta nRT$ . Such assumption was evaluated on a dedicated experiment (data not shown) that demonstrated that the gas inside the bottle, without taking into account the  $\text{N}_2$  was composed of at least 95% of  $\text{CO}_2$ , 4% of water and 1% of undetermined gases ( $\text{CH}_4$ ...). As no water was globally produced in the slices of cheese, the increase in pressure was all due to  $\text{CO}_2$  production.

### 2.5 Counting of PAB

A counting of the propionic acid bacteria was realized at the beginning (Day7) and at the end (Day22) of hot room in C slices of S+ and S- cheeses. Samples of cheese (20 g) were dispersed in 180 g of a 2% sodium-citrate solution, homogenized, diluted with tryptone saline solution, plated on PAL Propio-bac medium (Laboratoires Standa, Caen) and incubated at  $30^\circ\text{C}$  in anaerobiosis for 6 days.

## 2.6 Quantification of organic acids

High performance liquid chromatography (HPLC) was performed to determine the concentrations of organic acids as lactic, acetic or propionic acids, which also are PAB metabolites. Tests were carried out on the C slices of salted and unsalted cheeses, at 3 different ripening ages: Day4 (12 °C ripening stage), Day13 and Day18 (20 °C ripening stage). These tests can be used to follow the PAB metabolites, linked to each other's by the following equations showing their relationship as substrates and products of PAB metabolism:



The first equation (Eq. 1) represents the Fitz pathway, the most classical metabolic pathway used by PAB. The second equation (Eq. 2) represents the fixation of carbon dioxide and the third one (Eq. 3) the aspartate deamination. This last metabolic pathway requires the presence of aspartate and aspartase to work, but when it is activated, the CO<sub>2</sub> production is three times higher than for the Fitz pathway only.

## 2.7 Cheese composition

Chemical assays were performed to determine the composition of C slices in salted and unsalted cheeses. Three ripening ages were studied: Day4 (12 °C ripening stage), Day13 and Day18 (20 °C ripening stage) in order to quantify the evolution of chemical gradients during ripening. The sampling of cheese was realized according the reference method NF V04-281. The other methods used to quantify the cheese composition and the organic acids are presented in Table .

**Table 1: Methods used to quantify chemical and microbiological indicators in cheese**

Indicator	Methods of analysis
Dry matter	NF EN ISO 5534-October 2004
pH	FD V04-035-July 2009
Fat content	NF V04-287-February 2002 part B
Salt content (NaCl)	NF EN ISO 5943-January 2007
Organic Acids	HPLC method: HCL 1mM eluent gradient with 3 to 5 mL.min <sup>-1</sup> flow, separation using ionic exclusion column ICE-AS6 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), detection by conductimetry (20 μs cell) coupled to an



	anionic suppressor, quantification using chemical standards injected in the same conditions as the tested solutions.
--	--

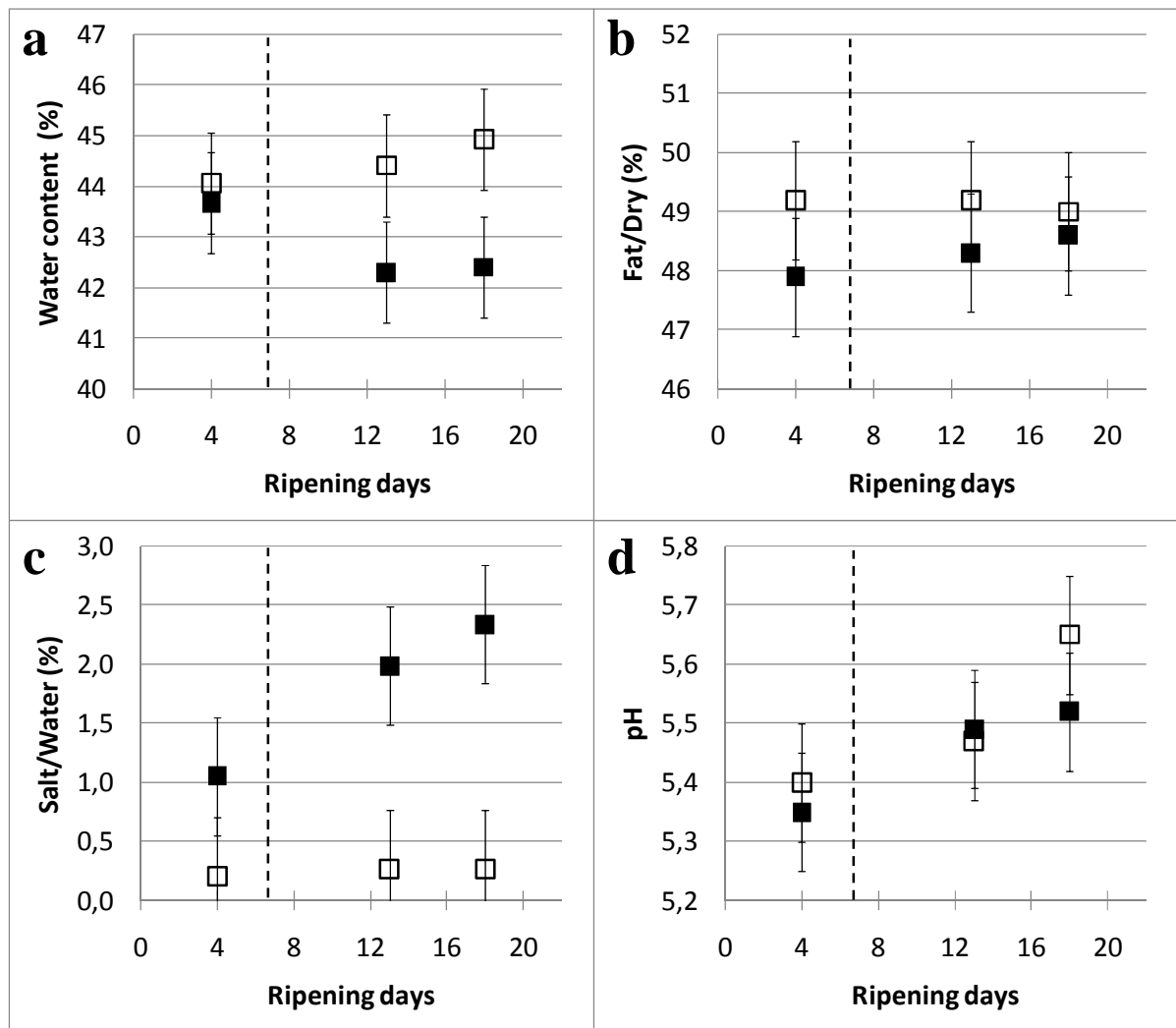
## 2.8 Rheology

Lubricated Squeezing Flow (LSF) tests were carried out on three replicates for each brining conditions and ripening ages. Two ripening ages were sufficient to characterize the resistance properties of salted and unsalted cheeses during ripening as no changes during ripening have been reported (see Huc et al., submitted). Tests were carried out on C slices at Day4 and Day13 kept at 4 °C during a day after being cut in the 12 °C or 20 °C ripening stage, in order to prevent any further evolution of cheese samples. Three replicates were realized for each Lubricated Squeezing Flow test. Samples were cylinders with a height of 3.5 mm and a diameter of 7 mm. The chosen biaxial extension rate was  $0.02\text{s}^{-1}$  and samples were lubricated with silicone oil (dynamic viscosity 1 Pa.s). All the details of the LSF protocol can be found in Huc et al. (submitted). The Young Modulus E (kPa) was calculated as the initial slope of the stress=f(strain) curves.

## 3. Results and Discussion

### 3.1 Cheese composition

The water content and Fat/dry ratio of unsalted and salted cheeses is presented on Fig. 3a and Fig. 3b; salt content is presented as the Salt/Water ratio on Fig. 3c and the pH evolution is presented on Fig. 3d.



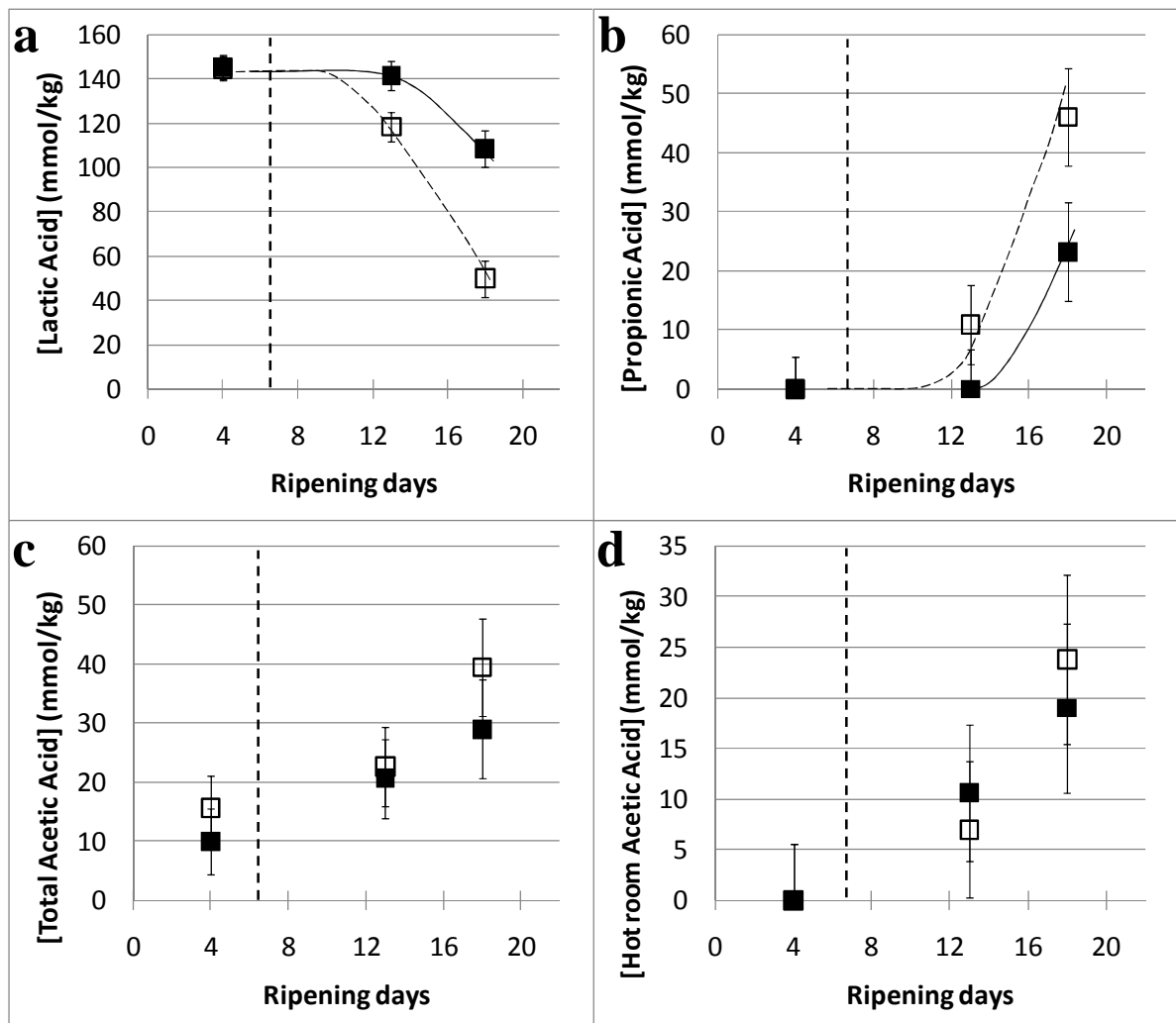
**Fig.3: Evolution of a) Water content; b) Fat/Dry ratio; c) Salt content/Water content and d) pH during ripening in the center slice of salted (■) and unsalted (□) cheeses. Non-continuous line = change of ripening room 12 °C -> 20 °C**

The water content was constant (non-significant differences) during ripening for both types of cheese, which was expected as they were all ripened under an impermeable packaging which did not allow any water loss in time. Moreover, due to the 1% standard deviation, no significant difference could be found between salted and unsalted cheeses until mid-hot room. At Day18, the water content in the center of unsalted cheeses was higher than the one in salted cheeses. This difference can be explained as regards to the salt content, displayed on Fig. 3c as the Sal/Water ratio. Indeed, the increase of salt content in the center slice of salted cheese could explain the slight decrease of water content previously observed. Therefore, even if this decrease is not significant, it could participate to the final differentiation in the water content of salted and unsalted cheeses. However, as both S+ and S- cheeses were produced from the same vat, there is no reason why they should exhibit any other composition differences. This hypothesis was verified with the Fat/Dry ratio and the pH values that were not significantly different between S+ and S- cheeses at any ripening time (Fig. 3b and Fig. 3d). The Salt/Water ratio was controlled for salted and unsalted cheeses: as S- cheeses were not brined in NaCl,

the salt content was not significantly different from 0 g/100g. On the contrary, as the S+ cheeses being brined in concentrated NaCl, a salt gradient took place, due to salt diffusion from the periphery towards the center of cheeses, as found in previous studies (Geurts et al., 1974, 1980; Guinee, 2004; Hollywood & Doelle, 1984; Huc et al., submitted G. W. Reinbold et al., 1958). The center slice of S+ cheese was submitted to a salt uptake traduced by a linear increase of the Salt/Water ratio. The Salt/Water difference already existed at Day4 but became stronger during hot room until S+ cheeses reached almost 2.5% in Salt/Water ratio against 0% for S- ones. Therefore, the desired original objective of obtaining constant cheese composition apart for the salt content was satisfying.

### 3.2 Evolution of organic acids

The evolution of the organic acids during ripening in S+ and S- cheeses is described on Fig. 4.



**Fig.4:** Evolution of a) Lactic acid content; b) Propionic acid content; c) Total acetic acid content and d) Hot room produced acetic acid during ripening in the center slice of salted (■) and unsalted (□) cheeses. Non-continuous line = change of ripening room 12 °C -> 20 °C

Fig. 4a shows the consumptions of lactic acid in salted and unsalted cheeses. During the 12 °C ripening stage, both center slices in S+ and S- cheeses displayed similar lactic acid content. After the temperature change from 12°C to 20°C a faster consumption of lactic acid was observed in unsalted cheeses. At the end of ripening, the lactic acid content was higher in the center of S+ cheese, with 109 mmol.kg<sup>-1</sup> against 50 mmol.kg<sup>-1</sup> in the center of S- ones. The corresponding consumption of lactic acid between Day4 and Day18 is 25% in S+ cheeses against 65.5% for unsalted ones. Moreover, if a second-order polynomial equation is fitted on the lactic acid content evolution, a projection toward the end of ripening (Day22) shows that this metabolite should be completely consumed in S- cheeses while it should not be the case in S+ ones. It is thus interesting to note that salted cheeses exhibit a delay in the lactic acid evolution compared to unsalted ones. The metabolism of bacteria is thus faster in S- cheeses, whereas they seem slower and/or delayed in salted ones.

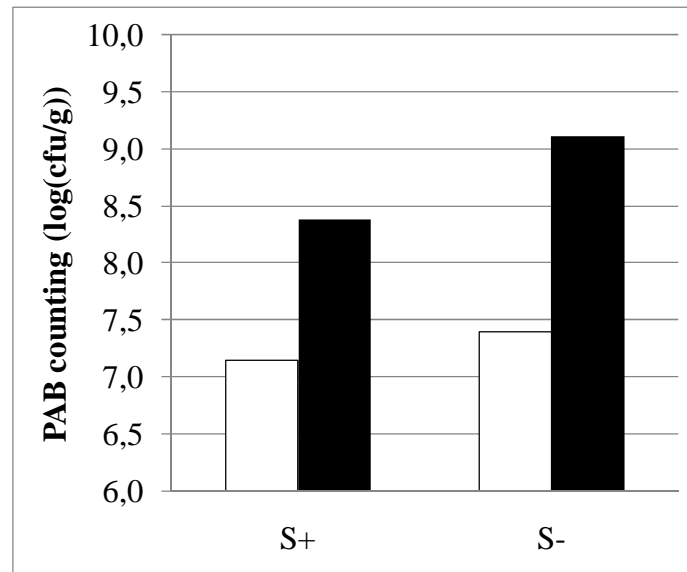
The study of propionic acid production confirmed these results. As can be seen on Fig. 4b, no propionic acid could be found during the 12 °C ripening stage in both zones, whereas at Day18, the propionic acid content reached 23 mmol.kg<sup>-1</sup> in S+ cheeses against 46 mmol.kg<sup>-1</sup> in S- ones. The production of propionic acid seemed delayed for salted cheese, with an absence of propionate in the center of S+ cheeses until the second half of hot room and a final value twice lower than for S- cheeses. The production of propionic acid is thus faster in S- cheeses than S+ ones.

Finally, the evolution of acetic acid content was also measured. Fig. 4c showed the total acetic acid content and Fig. 3d showed the amount of acetic acid produced in hot room only, by taking the difference between the value in hot room and the value at Day4. However, this approach is still an approximation, as the correct difference would have been between the values in hot room and the value at Day7. This approach showed that 10 to 16 mmol.kg<sup>-1</sup> of acetic acid were already present in salted and unsalted cheeses during the 12 °C ripening period. This amount cannot come from PAB production, as lactic acid consumption and propionate production were inexistent at this stage. During hot room, the acetic acid can be attributed to both PAB and other bacteria as lactate began to decrease. No significant difference could be found in acetic acid content between S+ and S- cheeses, due to the experimental and the analysis uncertainties. It is also interesting to note that the ratio “Propionate / Hot room produced Acetate” at Day18 was equal to 1.9 in unsalted cheeses, which would confirm that the Fitz equation is the main metabolic pathway for PAB (theoretical ratio = 2). In S+ cheeses, the ratio was equal to 1.2, probably because propionic acid bacteria were only at the beginning of the exponential stage.

If considering that acetic acid is directly correlated to CO<sub>2</sub> content, the amount of produced CO<sub>2</sub> can be calculated as theoretically equimolar to acetate. Therefore, the amount of CO<sub>2</sub> produced during hot room in the center of cheeses for S+ and S- cheese was respectively 10 and 16 mmol.kg<sup>-1</sup>. However, these values were calculated at Day18 which is not the very end of ripening. The difference between S+ and S- would probably be enhanced at Day22.

### 3.3 Counting of PAB

The counting of PAB found in the center of S+ and S- cheeses at Day7 and Day18 is presented on Fig.5.

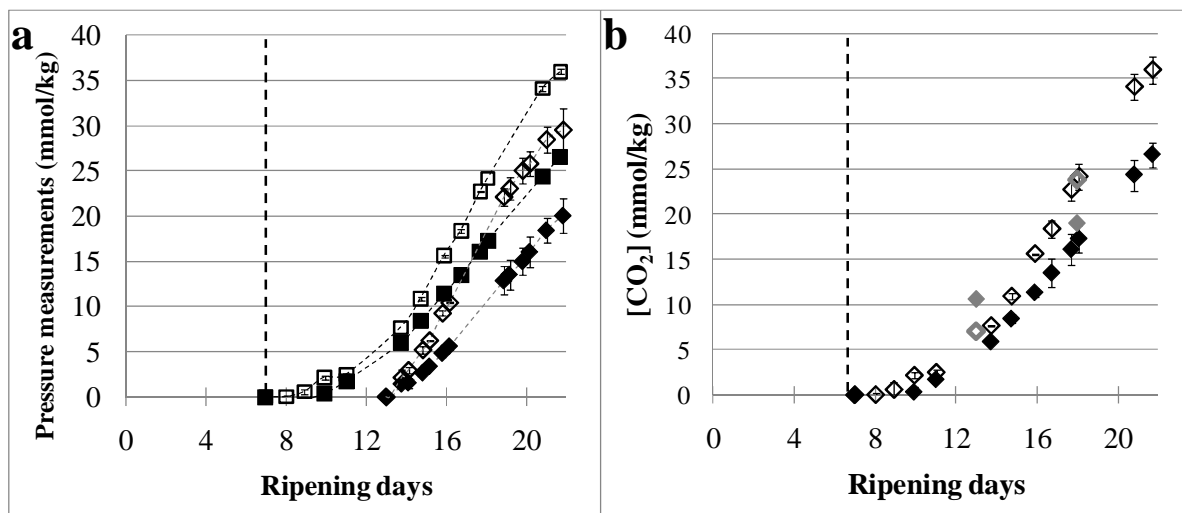


**Fig.5: Counting of PAB in salted (S+) and unsalted (S-) cheeses at the beginning (Day7 in white) and end of hot room (Day22 in black)**

At the beginning of hot room (Day7), the number of PAB is slightly higher in unsalted cheese (0.25 log(cfu/g) difference between both cheeses). At the end of ripening (Day22), the difference was stronger, with 0.75 log(cfu/g) more PAB in unsalted cheeses than in salted ones. Therefore, the PAB displayed a higher growth in the center of unsalted cheeses (number of bacteria 5 times higher).

### 3.4 Measurement of CO<sub>2</sub> production

The profiles of the CO<sub>2</sub> production rate coming from bacteria fermentation during complete or half hot room in S+ and S- cheeses are presented on Fig. 6a and the comparison between CO<sub>2</sub> concentration deduced by CO<sub>2</sub> pressure measurements or mass balances on acetic acid is presented on Fig. 6b.



**Fig.6:** a) Average CO<sub>2</sub> production results at the beginning (squares) and the middle (diamonds) of hot room, from salted (■ and ◆) and unsalted (□ and ◇) cheeses; b) CO<sub>2</sub> concentration deduced by pressure measurements from the beginning of hot room (black) and by mass balances on acetic acid (grey) at Day16 and Day 21 in salted (plain diamonds) or unsalted (empty diamonds) cheeses. Day7 = change of ripening room 12 °C -> 20 °C

At the beginning of hot room and until Day14, the CO<sub>2</sub> production uptake in the vials was small for salted and unsalted cheese. After Day14 and this delay, the CO<sub>2</sub> production in S- vials started to increase faster than in S+ vials one (Fig. 6a). If the samples are taken at the middle of hot room step (diamonds), the first latency stage did not exist for both S+ and S- cheeses. However, the CO<sub>2</sub> production for S- vials still increased faster than for S+ one. At both ripening stages, a linear increase was observed between Day13 and Day22 for both S+ and S- cheeses. The corresponding slopes, or CO<sub>2</sub> production rates, could be calculated between Day 13 or Day14 and Day 22, as presented in Table 2. The difference between S+ and S- slopes was found significant by an variance analysis test (P-value = 0.026) with a CO<sub>2</sub> production rate always higher in S- cheeses than in S+ ones (1.4 to 1.5 faster).

**Table 2:** CO<sub>2</sub> production rates obtained from pressure measurements data during the linear phase [Day13 – Day22] for salted (S+) and unsalted (S-) cheeses taken from center slices at the beginning (D7) or the middle (D13) of hot room

	Slope (mmol.kg <sup>-1</sup> .day <sup>-1</sup> )	Standard deviations	R <sup>2</sup>
S+ D7	2,6	0,01	0,998
S- D7	3,7	0,01	0,9973
S+ D13	2,4	0,2	0,9939
S- D13	3,7	0,2	0,9935

The determination of these slopes displayed a very good reproducibility, enhancing the interest of the pressure measurement method, with standard deviations comprised between ±0.01 for samples taken at Day7 and ±0.2 for samples taken at Day13. However, the very good correspondence between the

slopes for samples from Day7 and Day13 proved that even if the gradients are equilibrating during the first week of hot room, it does not impact the determination of the CO<sub>2</sub> production rate, apart from the final levels of CO<sub>2</sub>, which are not the same, as presented on Fig. 6a.

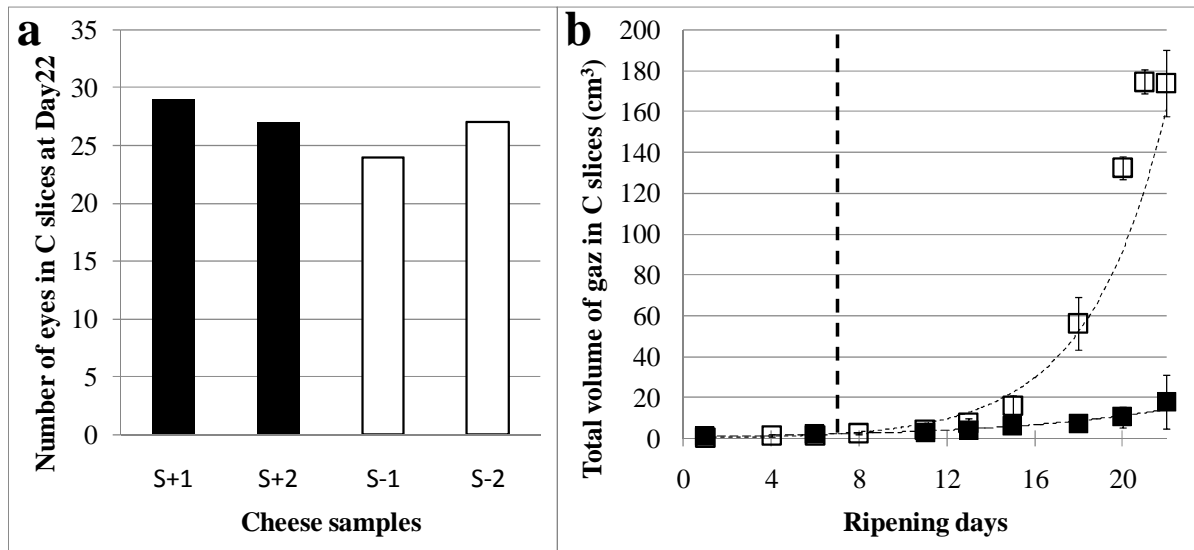
Based on the pressure measurements, the concentration of CO<sub>2</sub> produced by PAB in hot room could be calculated using  $\Delta PV = \Delta nRT$ . These results could be correlated with the CO<sub>2</sub> concentrations calculated from acetic acid production assuming the metabolic equations eq XX showing an equimolarity of CO<sub>2</sub> with acetic acid, , as can be seen on Fig. 4b. A very good correlation was found between the two methods of calculation, especially for unsalted cheeses when the CO<sub>2</sub> data deduced from acetic acid production were compared with the “pressure measurements” ones. Moreover, the difference between salted and unsalted cheeses became more obvious using pressure measurements than when using acetic acid mass balances, as the experiments were led until the very end of ripening Day22 and not Day18 and with far more experimental data. Therefore, the final difference of CO<sub>2</sub> concentrations in salted and unsalted cheeses reached 40% at Day22 with a final value 1.4 times higher in S- cheeses. The combination of experiments proved that the metabolism in unsalted cheeses was thus faster than in salted products.

### *3.5 Rheology*

Young modulus values of center slices in S+ and S- cheeses were compared at Day6 and Day17. The Young Modulus in S+ cheeses was found 13 kPa higher than in S- cheeses, for the 12 °C ripening period (Day4) and 42 kPa for hot room (Day13). However, as regards to the standard deviations obtained on three replicates per sample and going from  $\pm 5$  to  $\pm 27$  kPa, such differences were found non-significant. Therefore, the center S+ and S- slices could not be differentiated according to their hardness. It thus seems that the salt uptake occurring in S+ cheeses during ripening did not modify their rheological properties, compared to S- cheeses where no salt was present. These results are in good agreement with the constant Young Modulus found during the whole ripening in the center of semi-hard cheeses submitted to a standard brining and proving that the salt uptake did not modified either the rheological properties of the cheese matrix (Huc et al., submitted).

### *3.6 Opening characteristics and kinetics monitored by MRI*

An interesting comparison between salted and unsalted cheese could be achieved from the average opening indicators for the center slice only, as described beforehand for chemical, rheological and pressure measurements data in order to improve the comparison with MRI results. The final number of eyes and the evolution of total volume of gaz in C slices for both S+ and S- cheeses could be determined, as presented in Fig. 7a and Fig. 7b respectively.



**Fig.7:** a) Final number of eyes in the center (C) slice of two salted (S+) and unsalted (S-) cheeses; b) Evolution of volume of gas in the center slices of salted (■) and unsalted (□) cheeses. Non-continuous line = change of ripening room 12 °C -> 20 °C

No significant difference could be enhanced in the final number of eyes (Fig.7a) at Day22 (P-value 0.300) of the center slices of both types of cheese, due to a strong coalescence phenomenon that occurred in unsalted cheeses. On the contrary, the total as volume in cheese was highly impacted by the salt content. An exponential  $y=Ae^{kt}$  curve could be fitted on both S+ and S- total gas volume increase (Fig.7b) and the k coefficient 2.3 times higher for S- cheeses than S+ ones and this difference was found significant according to a variance analysis test (P-value 0.071). At the end of ripening (Day22), the final total gas volume was more than 5 times higher in unsalted cheeses than in salted ones. Moreover, the mean eye size was also impacted by the salt content. At Day22, the mean eye volume reached  $1.2\pm 0.03 \text{ cm}^3$  for S+ and  $6.8\pm 0.07 \text{ mm}^3$  for S- cheeses. Therefore, in S- cheeses, the mean eye volume was 6 times bigger in average than eyes in salted ones.

Finally, a headspace was also formed on the top of S- cheeses during hot room, whereas the packaging film remained completely flat and close to the body of the cheese for S+ ones. At the end of ripening,  $0.83\pm 0.04 \text{ L}$  of gas was found in the headspace of S- cheeses. Considering that the major part of this gas uptake is due to  $\text{CO}_2$  produced in cheese, as a first approximation, this result showed that the  $\text{CO}_2$  production was much more important in unsalted cheeses than in salted ones.

Based on the  $\text{CO}_2$  production and MRI measurements,  $\text{CO}_2$  repartition could be evaluated in the center slice of S+ and S- cheeses into three possible locations: eyes, cheese matrix or headspace. The amount of  $\text{CO}_2$  in eyes was calculated from the sum of all eyes volume in the center slice determined by MRI and considering that the overpressure in eyes was about 1500 Pa higher than atmospheric pressure (data not shown). The amount of  $\text{CO}_2$  in the headspace was also determined based on the measurement



of headspace volume by MRI. The amount of total CO<sub>2</sub> produced was calculated based on respirometry measurements, as these tests were performed until Day22 and were well-correlated to the chemical assays. However, as it corresponded to the production in the center, which is maximal in cheese according to Huc et al. (submitted) and Pauchard et al. (1980), it could not be representative of the CO<sub>2</sub> production in the complete cheeses but was considered as a good approximation of the maximal value for CO<sub>2</sub> production. The pressure in the headspace was not calculated in the current study and thus needed to be postulated. A first approximation was an overpressure 10 times higher than in the eyes (15 000Pa). Finally, the minimal amount of CO<sub>2</sub> dissolved in the cheese matrix was approximated by taking the difference between the amount of hot room produced CO<sub>2</sub> and the amount of CO<sub>2</sub> in the eyes and the headspace, according to Eq. 4, showing the potential locations of CO<sub>2</sub> in cheeses:

$$n(\text{CO}_2)_{\text{tot}} = n(\text{CO}_2)_{\text{eyes}} + n(\text{CO}_2)_{\text{matrix}} + n(\text{CO}_2)_{\text{headspace}} \quad (\text{Eq. 4})$$

Salted cheeses did not develop any headspace, so only two locations were available for CO<sub>2</sub>, whereas the headspace added a third one in unsalted cheeses. The minimal amount of CO<sub>2</sub> dissolved in the cheese matrix deduced from Eq. 4 using the previous pressure conditions in the eyes and the headspace was 0.27 mol in S+ cheeses against 0.19 mol in S- ones. As all cheeses were 11 kg blocs, if extrapolating the local maximum CO<sub>2</sub> production in the center to the whole cheese, these values would correspond to a minimal solubility in the whole cheese of 24 mmol.kg<sup>-1</sup> in salted cheeses and 17 mmol.kg<sup>-1</sup> in S- ones. The magnitude of the present results is in good agreement with the CO<sub>2</sub> solubility of 37 mmol.kg<sup>-1</sup> found by Pauchard et al. (1980).

## 4. Discussion

The higher consumption of lactic acid and higher production of propionic acid found in unsalted cheeses than in salted ones proved that PAB metabolism was delayed by salt. These results are in good agreement with the salt effect on PAB screening realized in Emmental mini-cheeses by Richoux et al. (1998), who found that 8 PAB strains on the 23 tested developed a latency phase of 7 to 14 days when confronted to 2% S/M ratio and 8 others displayed a reduced CO<sub>2</sub> production coupled with this fermentation delay. This wide reactivity of PAB to salt content due to the different salt sensitivity of strains was also enhanced by Carcano et al. (1995) in Italian hard cheese. Moreover, the link between salt and PAB development was described by Boyaval et al. (1999) as an osmo-stress phenomenon of PAB in the presence of salt. Their study showed that a concentration of 0.3 mol.L<sup>-1</sup> of NaCl led to a doubled PAB generation time in controlled medium or in milk, but it has not been checked in cheeses. Finally, an anti-correlated equation between water activity and salt content was formalized in core zones of Emmental cheeses, quantifying the depressor effect of salt on micro-organisms (Saurel et al., 1993). Therefore, the presence of salt can delay and/or reduce the growth of PAB by inducing a lower

water activity. The osmotic pressure would then become higher, which would ensure a poorer microbial development (Frölich-Wyder, 2004).

As regards to the acetic acid evolution, two stages were enlightened. Firstly, some acetic acid was already detected during the 12 °C ripening period, which means that some CO<sub>2</sub> must have been produced during this first ripening stage. This early production can be attributed to other microorganisms as LAB. Indeed, PAB metabolites as propionic acid were not found at this stage. On the contrary, as the two organic acids lactate and propionate were detected after mid-hot room, PAB were active during hot room, adding a new source of CO<sub>2</sub>. The determination of CO<sub>2</sub> based on acetic acid is thus interesting but does not allow a clear conclusion on the influence or non-influence of salt on CO<sub>2</sub> production, especially as it was not possible to make measurements at the very end of ripening (Day22). Therefore, it was of a high interest to validate some probable differences between salted and unsalted cheeses on CO<sub>2</sub> production. The development of the gas pressure measurement protocol allowed another determination of CO<sub>2</sub> production, without having to use acetic acid as a tracker, thus leading to a more precise kinetic. Moreover, these measurements were carried out until Day22 and as they showed a very good correlation with the results indirectly obtained with the acetic acid tracker, they proved the existence of significant differences in the CO<sub>2</sub> production between salted and unsalted cheeses. Finally, gas pressure measurements and chemical assays quantifying acetic acids represent complementary methods for following the CO<sub>2</sub> production in cheeses. The first one is very accurate during hot room whereas the second one is useful for quantifying the basal amount of CO<sub>2</sub> already existing at the beginning of ripening. However, the most interesting gain brought by CO<sub>2</sub> production determination by gas pressure measurements is that the same samples are followed during the whole hot room, while new products need to be cut each time chemical tests are realized. It implies a longer sample preparation and less accurate results, as they take into account the intra-batch variability.

It is interesting to compare the evolution of CO<sub>2</sub> to the opening indicators quantified by MRI. Indeed, while some CO<sub>2</sub> was found during the 12 °C ripening period, it did not induce an important volume uptake in cheeses, even if the MRI was able to monitor such small variations. Maybe the small CO<sub>2</sub> production during the 12 °C ripening period starts by locally filling the nuclei, considered as micro-cavities, which makes these micro-bubbles reach the critical size of detection and leads to a strong eye apparition rate at this stage. There would then be an increase of the number of eyes but not a strong porosity uptake. This delay may also correspond to the time necessary for the CO<sub>2</sub> to saturate the cheese matrix or for the PAB to start producing CO<sub>2</sub> after a slower growing phase. However, in hot room the gas volume uptake became faster in unsalted cheeses, leading to a final total gas volume 5 times higher in the core zone of S- cheeses and to a mean eye volume 6 times higher. These results confirmed the observations made on Emmental loaves, showing that an increase from 1 to 3% of Salt/Moisture ratio divided the cheeses' volume (measured by immersion) uptake by 11.7 (Richoux et

al., 1998). The magnitude of the gas volume is consistent with the 5 times higher gas volume found only in the center slice of unsalted cheeses in comparison to salted ones, so the headspace volume upon S- cheeses was not taken into account in that ratio (internal porosity in the center only). Grappin et al. (1993) also found a higher opening intensity graded by a jury of 10-15 persons at the end of a 4-months ripening when Gruyere de Comté cheeses were less salted. As both S+ and S- cheeses were produced from the same vat, the number or repartition of nuclei cannot be an explanation to these opening differences, especially when considering the very good reproducibility found from one cheese to another. Therefore, the salt content must induce some differences in the CO<sub>2</sub> production and maybe in its solubility. Moreover, the influence of salt on openings seems to act through the bacteria metabolism. Indeed, the final number of PAB was found 5 times higher in unsalted cheeses than in salted ones. During hot room, the CO<sub>2</sub> production rate directly followed by gas pressure measurements was higher between Day13 and Day22 than at the beginning of hot room. Therefore, 5 or 6 days at 20 °C were necessary in all cheeses, as a delay, before any change in the CO<sub>2</sub> production rate could be detected. However, after these 5 days, the CO<sub>2</sub> production rate became 1.4 to 1.5 times faster in the absence of salt, which confirmed the cause of the salt's influence on openings. As delay was also found in the evolution of cheese porosity, it is also interesting to note that in both cases, the temperature switch from 12 to 20 °C did not seem to immediately influence the gas production and porosity uptake.

The current study also enhanced that the final number of eyes in cheese did not only rely on CO<sub>2</sub> equilibrium, as two very different gas productions still led to a comparable final number of eyes. This experiment could not conclude as regards to the importance of coalescence and nucleation as the most relevant mechanism influencing the eye number in cheeses. Indeed, the coalescence seemed to be the major mechanism in S- cheeses. However, the evolution of the total number of eyes in unsalted cheeses could also be interpreted in two stages: at first, all nuclei were not enough filled with CO<sub>2</sub> so “new” eyes became detectable when a micro-bubble starts growing; then, all nuclei may had already been used for eye development, so the total number of eyes would start to decrease due to coalescence. On the contrary, much less coalescence was observed in salted cheeses, as regards to the lower eye size. Therefore, the MRI represented a powerful tool to follow the opening indicators and brought information upon the eyes number, size and growth kinetic. The influence of the salt content on eyes could thus be directly discussed, adding a new step in the understanding of eye growth mechanisms compared to literature, more focused on the link between salt and bacteria.

## **5. Conclusion**

The present study was successfully designed in order to separate the influence of correlated physics and chemical parameters, by focusing on the salt content only. Indeed, the chemical composition and the rheological properties of the core zone of salted and unsalted cheeses were very close, except for

the salt content. The combination of MRI, gas pressure measurements, rheological tests and chemical assays formed a powerful tool to investigate the link between CO<sub>2</sub> production and eye growth. The determination of the porosity of cheeses by image processing showed that the gas volume in unsalted cheeses was 5 times higher than in standard salted ones. On the contrary, the final number of eyes was very close in both types of cheese, due to a strong coalescence in S- cheeses. The CO<sub>2</sub> production rate was found faster in unsalted cheeses by two different methods, leading to eyes 6 times bigger in unsalted cheeses. Moreover, a headspace was formed in unsalted cheeses, in order to let the CO<sub>2</sub> in excess out of the body of the cheese. Therefore, the influence of salt on eye growth is very important, and acting through the bacteria development and as a consequence through CO<sub>2</sub> production and maybe its solubility. As regards to eye growth mechanisms, the nucleation also seems to be an important factor, as it could set the maximum number of eyes that can be formed while the gas production sets their size.

## Acknowledgements

The authors thank Gabrielle Moulin for performing the rheological tests; Stéphane Quellec for his help with the MRI acquisitions; the Regional Council of Bretagne, Basse Normandie and Pays de la Loire, the General Council of Ille et Vilaine and the competitiveness cluster Valorial for their financial support.

## References

- Akkerman, J. C., Walstra, P., & Van Dick, H. J. M. (1989). Holes in dutch-type cheese. . Conditions allowing eye formation. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, *43*, 453-476.
- Benjelloun, H., Rochex, A., Lecouturier, D., Dechemi, S., & Lebeault, J. M. (2005). An on-line technique for monitoring propionic acid fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *68*, 316-321.
- Boyaval, P., Deborde, C., Corre, C., Blanco, C., & Bégué, É. (1999). Stress and osmoprotection in propionibacteria. *Lait*, *79*, 59-69.
- Carcano, M., Todesco, R., Lodi, R., & Brasca, M. (1995). Propionibacteria in Italian hard cheeses. *Lait*, *75*, 415-426.
- Conde, T., Mulet, A., Clemente, G., & Benedito, J. (2008). Detection of internal cracks in Manchego cheese using the acoustic impulse-response technique and ultrasounds. *Journal of Dairy Science*, *91*, 918-927.
- Eberhard. (1985). *Rheologische Eigenschaften ausgewählter Käsesorten* ETH Zurich, Zurich.
- Eskelinen, J. J., Alavuotunki, A. P., Hægström, E., & Alatossava, T. (2007). Preliminary Study of Ultrasonic Structural Quality Control of Swiss-Type Cheese. *Journal of Dairy Science*, *90*, 4071-4077.
- Famelart, M. H., Le Graet, Y., Michel, F., Richoux, R., & Riaublanc, A. (2002). Evaluation of the methods of measurement for functional properties of Emmental cheeses from the west of France. *Lait*, *82*, 225-245.

- Floury, J., Camier, B., Rousseau, F., Lopez, C., Tissier, J.-P., & 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 Science and Technology*, 42, 1611-1620.
- Fröhlich-Wyder, M.T., & Bachmann, H.P. (2004). Cheese with Propionic Acid Fermentation. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol.2 Major Cheese Groups. (pp 141-156).
- Geurts, T. J., Walstra, P., & Mulder, H. (1974). Transport of salt and water during salting of cheese. 1. Analysis of the processes involved. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 28, 102-129.
- Geurts, T. J., Walstra, P., & Mulder, H. (1980). Transport of salt and water during salting of cheese. 2. Quantities of salt taken up of moisture lost. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 34, 229-254.
- Grappin, R., Lefier, D., Dasen, A., & Pochet, S. (1993). Characterizing ripening of Gruyere de Comte: influence of time \* temperature and salting conditions on eye and slit formation. In (Vol. 3, pp. 313-328).
- Guinee, T.P. (2002). Cheese Rheology. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (pp 341-349). Elsevier Academic Press
- Guinee, T. P. (2004). Salting and the role of salt in cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 99-109.
- Hollywood, N. W., & Doelle, H. W. (1984). The effect of sampling position and age on levels of propionibacteria and flavor-related compounds in Swiss-type cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 39, 80-82.
- Jaros, D., Ginzinger, W., Tschager, E., Mayer, H. K., & Rohm, H. (1997). Effects of water addition on composition and fracture properties of emmental cheese. *Lait*, 77, 467-471.
- Jimeno, J., Lazaro, M., J., & Sollberger, H. (1995). Antagonistic interactions between propionic acid bacteria and non-starter lactic acid bacteria. *Lait*, 75, 401-413.
- Kraggerud, H., Wold, J. P., Hoy, M., & Abrahamsen, R. K. (2009). X-ray images for the control of eye formation in cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 62, 147-153.
- Lassoued, N., Babin, P., Della Valle, G., Devaux, M.F., Réguerre, A.L. (2007). Granulometry of bread crumb grain: Contributions of 2D and 3D image analysis at different scales.
- Lee, K., Uegaki, K., Nishii, C., Nakamura, T., Kubota, A., Hirai, T., & Yamada, K. (2012). Computed tomographic evaluation of gas hole formation and structural quality in Gouda-type cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 65, 232-236.
- Lucey, J. A., Johnson, M. E., & Horne, D. S. (2003). Invited review: Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *Journal of Dairy Science*, 86, 2725-2743.
- Luyten, H. (1988). *The rheological and fracture properties of Gouda cheese*. Luyten, Wageningen.
- Nassar, G., Lefbvre, F., Skaf, A., Carlier, J., Nongailard, B., & Noël, Y. (2010). Ultrasonic and acoustic investigation of cheese matrix at the beginning and the end of ripening period. *Journal of Food Engineering*, 96, 1-13.
- Pastorino, A. J., Hansen, C. L., & McMahon, D. J. (2003). Effect of pH on the chemical composition and structure-function relationships of cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 86, 2751-2760.
- Pauchard, J. P., Fluckiger, E., Bosset, J. O., & Blanc, B. (1980). CO<sub>2</sub> solubility, concentration and distribution in relation to eye formation in Emmental cheese. *Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung*, 9, 69-73.

- Reinbold, G. W., Hussong, B. V., & Stine, J. B. (1958). Distribution of Propionibacteria in Swiss Cheese. *Journal of Dairy Science*, 41, 606-610.
- Reinbold, R. S., Erstrom, C. A., & Hansen, C. L. (1992). Temperature, pH, and moisture profiles during cooling of 290-kilogram stirred curd Cheddar cheese blocks. *Journal of Dairy Science*, 75, 2071-2082.
- Richoux, R., Faivre, E., & Kerjean, J. R. (1998). Effect of NaCl content on lactate fermentation by Propionibacterium freudenreichii in small scale Swiss-type cheeses. *Lait*, 78, 319-331.
- Richoux, R. (2005). Livret PAL®. Bactéries Laitières propioniques, Standa Industrie.
- Rosenberg, M., McCarthy, M. J., & Kauten, R. (1991). Magnetic Resonance Imaging of Cheese Structure. *Food Structure*, 10, 185-192.
- Rosenberg, M., McCarthy, M. J., & Kauten, R. (1992). Evaluation of eye formation and structural quality of swiss type cheese by MRI. *Journal of Dairy Science*, 75, 2083-2091.
- Saurel, R. (1993). *Contribution a l'etude des transferts de matiere en deshydratation-impregnation pr immersion (DII) de produits biologiques*. Thesis, Universite Montpellier II.
- Saurel, R., Pajonk, A., & Andrieu, J. (2004). Modelling of French Emmental cheese water activity during salting and ripening periods. *Journal of Food Engineering*, 63, 163-170.
- Seuvre, A. M., & Mathlouthi, M. (1982). Contribution to the study of gaz-release during the maturation of a French Emmental Cheese. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 15, 258-262.
- Steffen, C., Nick, B., & Blanc, B. H. (1974). Lactic acid configuration of various strains of lactic acid bacteria as a function of production conditions. *XIX International Dairy Congress*, 1E, 404-406.
- Steffen, C., Eberhard, C., Bosset, J.O., & Rüegg, M. (1993). Swiss-type varieties. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology Vol. 2 Major Cheese Groups* (pp. 83-110): Springer.
- Visser, J. (1991). Factors affecting the rheological and fracture properties of hard and semi-hard cheese. *Federation Internationale de Laiterie; International Dairy Federation*.
- Viver, D., Compan, D., Moulin, G., Galzy, P. (1996). Study of carbon dioxide release from Feta cheese. *Food research International*, 29, 2:169-174.
- White, S.R., Broadbent, J.R., Oberg, C.J., McMahan, D.J. (2003). Effect of Lactobacillus helveticus and Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii. Combinations on Propensity for Split Defect in Swiss Cheese. *Journal of Dairy Science*, 86, 719-727.



# **Chapitre III - Discussion et perspectives**



Le cadre du travail s'inscrivait dans une démarche générale visant à mieux comprendre et hiérarchiser les mécanismes de croissance de bulles. Pour se faire, une des premières étapes du projet a été la mise en place d'une méthode de mesure permettant d'établir une cinétique de croissance de façon non invasive. Sur la base de cette méthode nous avons rapidement mis en évidence que la cinétique de croissance des bulles n'était pas homogène dans les fromages, mais que de forts contrastes existaient entre différentes zones. Aussi avons-nous mis en place une stratégie expérimentale exploitant ce gradient comme un élément de réponse permettant de proposer une hiérarchie des facteurs entre le rôle des propriétés mécaniques, de la production de CO<sub>2</sub> et des paramètres technologiques.

Une première partie de la discussion sera dédiée au rappel des principales avancées méthodologiques de la thèse et à la proposition de pistes d'amélioration. Dans une deuxième partie, nous discuterons l'ensemble des résultats en mettant en exergue leurs relations, les mécanismes sous-jacents et les questions que nous proposons d'aborder dans le futur.

## 1. Avancées méthodologiques

L'Imagerie par Résonance Magnétique et la tomographie RX associées à un traitement d'images original ont constitué la première avancée du projet. En effet, une telle combinaison, très innovante, permet à la fois de quantifier des indicateurs d'ouvertures, de localiser précisément les bulles dans les fromages, de mesurer leurs cinétiques individuelles de croissance au cours de l'affinage et de quantifier un espace de tête. Les indicateurs d'ouverture sont donc de deux sortes : globaux (nombre total de bulles, volume de gaz, volume moyen des yeux, porosité) et locaux (cinétique de croissance de chaque bulle, découplage entre croissance et accroissement du nombre, coordonnées des ouvertures). De plus, ces deux techniques d'imagerie permettent de scanner en 3D l'ensemble des fromages, ce qui représente une réelle plus-value par rapport aux méthodes d'appréciation visuelle traditionnelles, qui n'autorisent qu'une information 2D d'un nombre limité de plans de coupe, non représentatifs de l'ensemble du fromage. En effet, deux coupes réalisées dans un fromage à 1 cm d'intervalle peuvent révéler des résultats contradictoires, comme le montre la Figure 16.

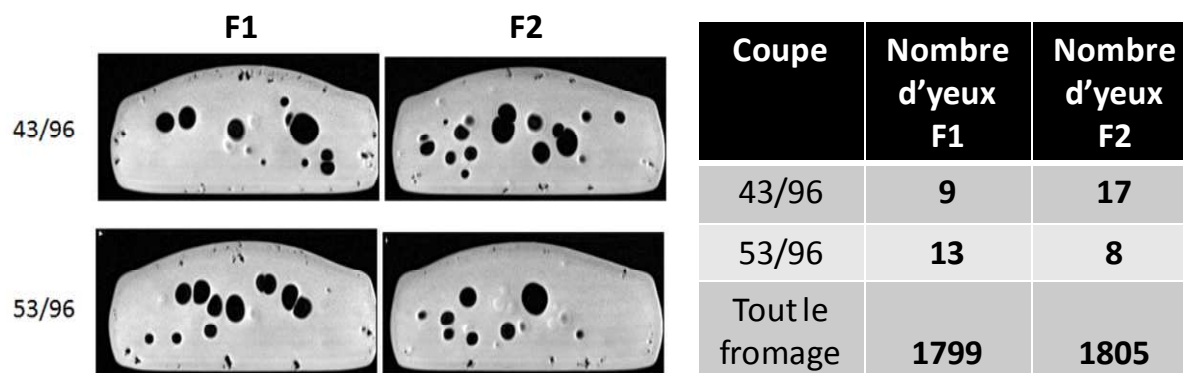


Figure 16 : Coupes centrales dans des fromages de type PPNC (F1 et F2) en fin d'affinage espacées d'1 cm (n°43 et 53) et nombre d'yeux décomptés visuellement sur chaque coupe

Ainsi, sur la base de la coupe 43, le fromage F2 semble avoir près de deux fois plus de bulles que le F1. Au contraire, 1 cm plus loin sur la coupe 53, l'écart est plus faible et inversé, avec 13 yeux pour le fromage F1 contre 8 pour F2. Cependant, en considérant la totalité des bulles comptabilisées dans les fromages par IRM, aucune différence entre F1 et F2 n'a été mise en exergue. Il apparaît donc que l'appréciation visuelle a de fortes limitations dans la quantification du nombre de bulles. Cela s'applique également pour le volume moyen des ouvertures aussi bien que pour le volume de gaz total, dont la quantification 2D ne permet qu'une approximation, sans intégrer un modèle du volume de chaque bulle. Ainsi, le suivi individuel des ouvertures par imagerie 3D permet une détermination précise du volume moyen des yeux et l'estimation de la déformation relative des bulles au cours de l'affinage. Le périmètre des yeux est soumis à une déformation relative de 370 à 480% entre le début et la fin de l'affinage, respectivement en périphérie et au centre des fromages. La vitesse moyenne de déformation durant tout l'affinage serait donc de  $3 \cdot 10^{-6} \text{s}^{-1}$  à cœur et  $2 \cdot 10^{-6} \text{s}^{-1}$  en périphérie des fromages. Cet ordre de grandeur est comparable aux estimations réalisées par Walstra (1991) autour de  $10^{-6} \text{s}^{-1}$ . La plus-value des méthodes non destructives est donc très significative. Néanmoins, elles restent confrontées à des limites. Par exemple, la durée des expérimentations IRM constitue un premier frein. En effet, environ 1h d'acquisition est nécessaire par fromage de 11kg pour une résolution de  $1 \times 1 \times 1 \text{mm}^3$ , contre une durée de 8 min par fromage pour une résolution de  $0,78 \times 0,78 \times 1,5 \text{mm}^3$  en tomographie RX. Toutefois, l'IRM peut être utilisée pour accéder à des informations en lien avec la composition ou la structure de la pâte, via par exemple, des mesures de temps de relaxation, ou via des mesures de coefficient de diffusion de l'eau directement au sein du fromage (Mariette, 2011). Enfin, une information originale autre que les données d'ouverture également apportée par l'imagerie 3D est la quantification du volume gazeux de l'espace de tête des fromages. Ainsi,

la méthode permet une détermination rapide de la répartition du gaz entre ses différents compartiments potentiels. La plus-value de la présente étude réside dans la variété et la précision des informations obtenues. Un tel outil pourrait être plus communément utilisé au même titre que les autres méthodes analytiques pour affiner la connaissance des produits et déterminer l'impact d'un changement de recette ou de procédé sur l'ouverture, lors de tests à l'échelle pilote par exemple.

L'application du test de compression en conditions lubrifiées ou Lubricated Squeezing Flow (LSF) de produits de panification ou fromages à pâte molle aux fromages semi-durs constitue un autre développement original du projet. L'intérêt de la LSF est de soumettre la pâte fromagère à une déformation appliquée dans des conditions plus proches de celles réellement subies lors de l'extension provoquée par une bulle en train de croître. Les caractéristiques de cette extension provoquée par la croissance d'une bulle sont un taux de déformation très élevé (de l'ordre de 400%) mais une durée longue, de trois semaines pour les produits étudiés dans ce projet. C'est pourquoi le test reste confronté à une limite matérielle du rhéomètre ne pouvant fonctionner à des vitesses de l'ordre de  $10^{-6}\text{s}^{-1}$ . La limite inférieure de la gamme de vitesse se situe aux alentours de  $10^{-4}\text{s}^{-1}$ . Seules les extrapolations de résultats obtenus sur plusieurs décades permettent d'approximer le comportement rhéologique réel de la pâte soumise à une croissance de bulles. Néanmoins, contrairement à la compression uniaxiale classiquement employée dans la littérature pour caractériser les propriétés rhéologiques des fromages aux grandes déformations, les dimensions des échantillons plus larges que haut ainsi que la lubrification totale permettent de se placer dans des conditions dans lesquelles l'extension biaxiale l'emporte largement sur la compression et sur le cisaillement. Si la gamme de vitesse reste donc plus élevée que lors d'une croissance de bulle, le phénomène n'en reste pas moins aussi bien décrit que possible par l'emploi du test de LSF.

La troisième avancée méthodologique de la thèse a été la combinaison de trois techniques microscopiques complémentaires : optique, confocale (MCBL) et électronique (MEB). Outre leur différent niveau de déstructuration de la matrice fromagère, cette combinaison permet d'observer de la microstructure des fromages à trois échelles, chacune étant dédiée à un élément organisationnel des fromages. Les grains de caillé et leurs jonctions sont étudiés en microscopie optique à l'échelle de 1 mm ; la répartition des globules gras dans la matrice protéique est spécifiquement observée en MCBL à l'échelle de 100  $\mu\text{m}$  ; les pores du réseau protéique et sa structuration est accessible en MEB, à l'échelle de 1  $\mu\text{m}$ . De plus, la MCBL a permis de révéler la présence d'une couche de matière grasse pure en périphérie des bulles,

qui serait expulsée lors de l'étirement du réseau protéique autour des yeux en cours de croissance. Ce résultat a été confirmé par des observations à 4°C d'échantillons préparés à cette même température afin de diminuer un éventuel biais via un relargage de matière grasse attribuable à une découpe et une observation à 20°C.

Cette approche multi-échelles a permis de rassembler des informations variées et dédiées à des éléments précis d'organisation des fromages. La continuité des échelles a été assurée grâce à l'emploi de trois techniques de microscopie permettant de remonter jusqu'à un ordre de grandeur du millimètre, proche de la résolution choisie pour l'imagerie 3D. En revanche, il nous est apparu qu'il pouvait manquer un lien entre les études rhéologiques, également réalisées à l'échelle macroscopique et les observations de microstructure, en particulier en microscopie confocale. En effet, il semblait intéressant de suivre l'évolution de la microstructure d'un échantillon lors d'une compression, comme celle réalisée au cours d'un test de LSF, de façon à mieux comprendre comment réagit un produit à une échelle de quelques microns sous contrainte. Pour introduire ces aspects dynamiques au sein du suivi de la microstructure, des essais préliminaires ont débuté en microscopie confocale à l'aide d'une cellule rhéo-optique permettant l'observation directe de la microstructure d'un échantillon de fromage au cours de la compression. Les tests de faisabilité montrent déjà la complexité de telles mesures, notamment en termes de perte du plan focal.

Enfin, une attention particulière a été apportée à la mise en place d'un protocole de découpe des échantillons de fromages. En effet, ce point s'est révélé clef dans la maîtrise et la comparaison des techniques déployées pour la compréhension des mécanismes de croissance de bulles. Outre la détermination des deux zones extrêmes « périphérie » et « centre », des outils de découpe ont été spécialement usinés pour assurer une planéité et une reproductibilité aussi maîtrisée que possible. En effet, à cause des multiples hétérogénéités rencontrées dans les fromages de type pâte pressée non cuite (PPNC), un échantillonnage uniformisé en amont de tous les tests destructifs est essentiel pour ne pas ajouter de biais expérimental. Une attention particulière a aussi été apportée à la maîtrise des conditions thermiques du produit lors de sa caractérisation. Ainsi le tunnel régulé en température utilisé pour les mesures IRM ainsi que les temps d'équilibration thermique à 20°C avant les tests rhéologiques ont fait l'objet de tests spécifiques, tout comme les conditions thermiques de transports. L'optimisation des divers protocoles est détaillée dans le Chapitre IV : Matériels et Méthodes (p 189).

## 2. Discussion des résultats

### 2.1 *Gradients constatés*

Parmi les différents éléments de composition qui ont été quantifiés, seules la teneur en sel et la concentration en acides organiques présentent un gradient entre le cœur et la périphérie des fromages. De plus, l'amplitude de ce gradient évolue avec l'affinage. Les autres critères de composition tels que teneur en eau, le pH, ou les indicateurs de protéolyse sont identiques dans les différentes zones caractérisées et se comportent de façon homogène dans le temps. Cette homogénéité des paramètres de composition est expliquée par l'emballage des fromages avant l'affinage à l'aide d'un film imperméable.

Un fort gradient du nombre, de la taille et de la cinétique de croissance entre le centre et la périphérie des fromages a été détecté par IRM et tomographie RX, en particulier en cave chaude. En effet, l'amplitude de ce gradient évolue durant l'affinage. En cave froide, bien que de nombreuses ouvertures soient déjà présentes, le volume de gaz associé est faible, quelle que soit la zone considérée. Par la suite, les yeux se sont révélés plus nombreux, plus gros et ont présenté un taux de croissance plus rapide à cœur qu'en périphérie.

De plus, le taux d'apparition des ouvertures reste inchangé entre 12 et 20°C. Le changement de température ne semble donc pas influencer l'apparition des nouvelles bulles. De plus, ce taux est également insensible à l'accélération de la production de CO<sub>2</sub>, passant de basale à plus forte après 5 à 6 jours à 20°C, comme démontré en respirométrie. De plus, le jour où l'augmentation de porosité (ou du volume de gaz total) commence à accélérer ne correspond pas au jour de changement de cave mais se situe selon les productions entre 1 et 7 jours à 20°C. L'augmentation de porosité n'est donc pas immédiatement impactée par le changement de température. Il existe donc une latence, ou un retard de quelques jours, avant que la production de CO<sub>2</sub> ne se différencie entre cœur et périphérie et que la porosité ne devienne plus rapide dans les fromages.

Les propriétés rhéologiques des fromages sont également soumises à un gradient cœur/périphérie, notamment au regard de la dureté (Module d'Young, contrainte au seuil de plasticité). Contrairement au précédent, l'amplitude de ce gradient n'évolue pas, la périphérie restant environ deux fois plus dure que le cœur des fromages du début à la fin de l'affinage. Il semble donc y avoir une décorrélation entre les indicateurs de protéolyse primaire et secondaire et les propriétés rhéologiques des fromages. Enfin, des disparités locales de

résistance de la pâte ont pu être postulées lors de la mise en exergue de propriétés rhéo-durcissantes de la pâte fromagère. Ainsi, plus la déformation est élevée, plus elle va résister, ce qui pourrait signifier que la zone de déformation maximale autour des bulles, c'est à dire l'apex, est donc la plus résistante. Au contraire, les côtés des bulles orientés selon un axe horizontal représenteraient les zones les moins résistantes car moins déformées, d'où des propriétés rhéo-durcissantes moindre. Ces disparités locales pourraient contribuer à expliquer la propagation exclusivement horizontale des cracks.

Une absence de gradient a été constatée au niveau de la microstructure des fromages, avec une uniformité d'organisation aux trois échelles, du millimètre au micromètre. Cette uniformité de structure est surprenante étant donné le gradient rhéologique et la croissance différenciée des ouvertures. La microstructure n'est donc pas un élément de différenciation mais un élément d'uniformité dans les fromages, résultat direct des étapes de procédé en amont de l'affinage. Peut-être manquerait-il un niveau dans les échelles d'observation pour accéder à des différences de structure, notamment s'il existe des écarts de structuration du réseau protéine par exemple. Cependant, puisqu'aucun gradient de protéolyse n'a pu être mis en exergue, une différence d'organisation du réseau protéique ne semble pas être un élément d'explication satisfaisant. Il y aurait donc une absence de lien entre rhéologie d'une part et protéolyse et microstructure de l'autre.

## *2.2 Hiérarchisation des facteurs contribuant à la croissance de bulles*

La périphérie des fromages, plus dure que le cœur, peut accentuer des écarts d'ouverture en exerçant une résistance plus grande à la pression gazeuse exercée lorsque le CO<sub>2</sub> diffuse au sein de la bulle. Néanmoins, le seul paramètre de composition soumis à un gradient est la teneur en sel. Ce facteur a donc fait l'objet d'une étude dédiée étant donné sa convergence avec les gradients d'ouverture. Cette étude a montré que l'action du sel sur l'ouverture semble s'effectuer via la production de CO<sub>2</sub>, et/ou sa solubilité dans les fromages. Ainsi, nos résultats montrent de façon cohérente avec la littérature que l'accroissement de la teneur en sel entraîne une action inhibitrice sur le développement bactérien. Ce résultat a été confirmé par l'observation en microscopie électronique à balayage de clusters de PAB plus nombreux et plus gros à cœur qu'en périphérie des fromages, en particulier en fin d'affinage. Ceci se traduit également par une production d'acide acétique et propionique plus importante à cœur qu'en périphérie. Enfin, la production de CO<sub>2</sub> mesurée par respirométrie apporte un élément de confirmation directe, avec une production plus rapide à cœur qu'en périphérie. Le lien

entre la présence de sel et le retard d'activité métabolique des bactéries est donc confirmé, mais également relié au gradient d'ouverture. Son impact sur la production de CO<sub>2</sub> peut être décrit à travers trois jeux de données intéressants (Tableau 10) : la périphérie des fromages salés, présentant une valeur maximale de teneur en sel, constante durant l'affinage ; le cœur des fromages salés représentant une valeur intermédiaire, nulle au début d'affinage puis élevée en fin de cave chaude ; le cœur des fromages sans sel, présentant une valeur minimale de teneur en sel, nulle durant tout l'affinage.

**Tableau 10 : Comparaison de la quantité finale de CO<sub>2</sub> produite mesurée par respirométrie, des dénombrements finaux de PAB et du taux de production de CO<sub>2</sub> en cave chaude pour 3 ratios Sel/Eau différents : 3,3%, 1 à 2,5% entre début et fin d'affinage et 0% (autres paramètres de composition chimique comparables)**

Tranche	Fromage	Sel	Sel/Eau (%)	n(CO <sub>2</sub> ) <sub>f</sub> (mmol.kg <sup>-1</sup> )	PAB <sub>f</sub> (log(cfu/g))	Taux prod CO <sub>2</sub> (mmol.kg <sup>-1</sup> .jour <sup>-1</sup> )
Périphérie	Salé	MAX	3,3	9,6	7,8	1,0
Cœur	Salé	INTER	1 -> 2,5	26,6	8,4	2,6
Cœur	Sans sel	MIN	0	36,0	9,1	3,7

La quantité finale de CO<sub>2</sub> mesurée par respirométrie est 2,8 fois plus élevée au centre qu'entre périphérie pour les fromages salés, et 1,4 fois supérieure entre le cœur des fromages non salés et le cœur des fromages salés. En comparant les bornes extrêmes de teneur en sel 3,3% de Sel/Eau (périphérie des fromages salés) contre 0% (cœur des fromages sans sel), la quantité de CO<sub>2</sub> produite est donc 3,7 fois supérieure, soient 26,4 mmol.kg<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> supplémentaires. Ces écarts sont les mêmes si l'on considère le taux de production du CO<sub>2</sub>, passant de 1,0 à 3,7 mmol.kg<sup>-1</sup>.jour<sup>-1</sup> entre 3,3 et 0% de Sel/Eau. De plus, le dénombrement des PAB présente un écart de 0,6 log(cfu/g) entre la périphérie et le cœur des fromages salés. Cela correspond à un nombre de PAB de l'ordre de 4 fois plus important à cœur des fromages standards (référence). En comparant le cœur des fromages salés et non salés, l'écart est de 0,7 log(cfu/g), soient 5 fois plus de PAB détectées au centre des fromages sans sel. Ainsi, entre les extrêmes 3,3 et 0% de Sel/Eau, l'écart serait de 1,3 log(cfu/g), soit 20 fois plus de PAB dans les fromages sans sel.

En revanche, ces mesures ne rendent pas compte de la formation d'un espace de tête pour les fromages sans sel. Celui-ci atteint 0,83 L de gaz en fin d'affinage, ce qui n'est pas négligeable par rapport aux 3,96 L de gaz quantifiés dans les yeux par IRM, et surtout face aux 0,51 L de gaz dans les yeux des fromages salés. En termes de volume de gaz, les fromages sans sel comptent dans leur globalité 9,4 fois plus de gaz que les fromages salés, soient 4,79 L (espace de tête + yeux) contre 0,51 L (yeux seuls). Ainsi, outre la production de CO<sub>2</sub> plus rapide, l'absence de sel aurait donc déplacé l'équilibre du CO<sub>2</sub>, ajoutant un

compartiment supplémentaire par rapport aux fromages salés. Il est cependant impossible de conclure si cette modification est liée à une modification de la solubilité et/ou de la vitesse de diffusion du gaz dans la matrice fromagère. Cette incertitude empêche d'établir un unique lien entre production de CO<sub>2</sub> et paramètres d'ouvertures tels que le volume final gazeux quantifié dans les fromages.

De plus, l'importance des mécanismes de diffusion et de solubilité du gaz carbonique dans la matrice fromagère pourrait aussi se manifester à travers la couche de matière grasse pure observée à la surface des bulles. L'expulsion de cette matière grasse dans les bulles conduit à la formation d'une couche purement protéique en proximité immédiate sous la surface des yeux. Celle-ci pourrait créer une disparité de microstructure locale. Le pourtour des bulles pourrait donc être localement l'objet d'écarts de solubilité et de diffusion du CO<sub>2</sub>. Le gaz pourrait-il être plus soluble dans la couche lipidique et diffuser préférentiellement hors de la matrice fromagère et dans les bulles via ce compartiment ?

### *2.3 Aspects cinétiques*

Pour mieux appréhender les mécanismes de croissance de bulles, il est nécessaire de prendre également en compte la dynamique de la croissance. En effet, au stade de la cave froide, le taux d'augmentation de porosité est le même entre la périphérie et le cœur des fromages, et les acides organiques sont au même niveau basal dans les deux zones. Suite au changement de la température de la cave d'affinage (12 à 20°C), il faut 5 à 6 jours à 20°C avant qu'une production de CO<sub>2</sub> puisse être enregistrée en respirométrie. Cette durée de latence ou de retard est observée indépendamment de la teneur en sel et de façon uniforme dans le fromage. Ce délai signifie que la température de 20°C ne déclenche pas immédiatement un accroissement de la production en CO<sub>2</sub>. Il pourrait correspondre au temps nécessaire à la saturation de la pâte en gaz carbonique mais également à la multiplication des PAB qui entraîne une augmentation de la production de CO<sub>2</sub> de façon significative.

Les facteurs contribuant à la croissance des bulles dans les fromages à pâte pressée non cuite peuvent donc être résumés sous la forme du schéma présenté en Figure 17. Il permet de mettre en perspective les différences de croissance de bulles au sein des fromages via des productions de CO<sub>2</sub> différentes dues à une croissance bactérienne ralentie en périphérie. L'évolution des deux facteurs teneur en sel et propriétés rhéologiques sont également représentés, l'un s'équilibrant alors que l'autre reste constant.



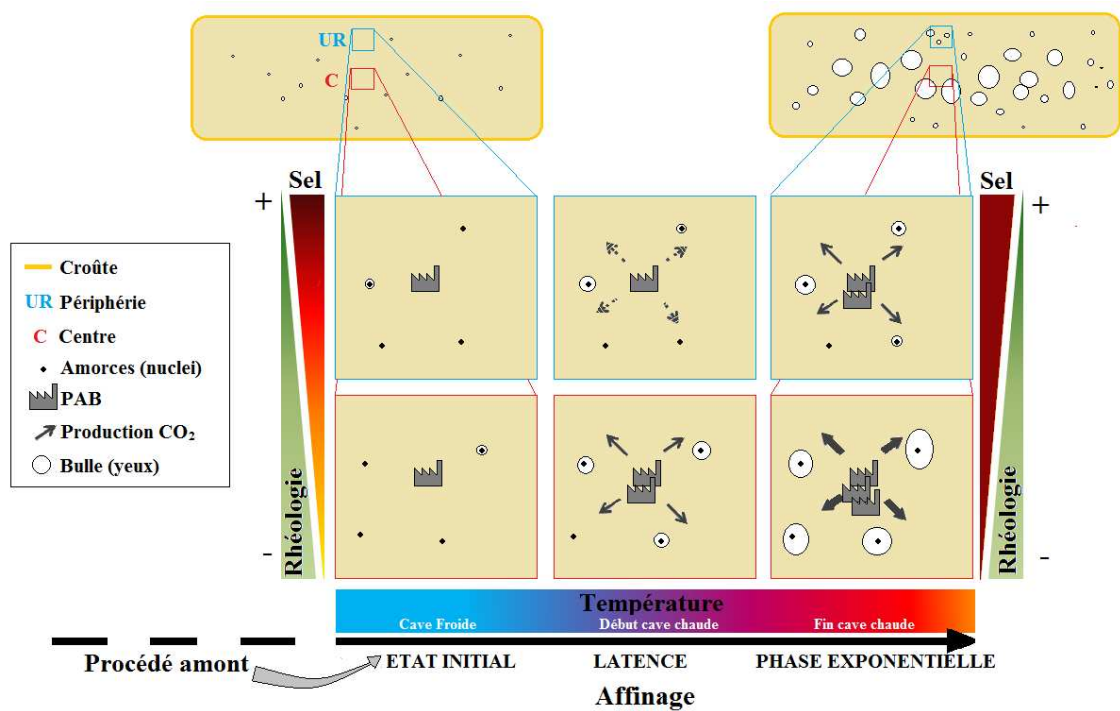


Figure 17 : Schéma bilan des mécanismes impactant l'ouverture des fromages

#### 2.4 Etat initial des fromages en entrée d'affinage

L'étude de différentes productions de fromages de type PPNC permet de s'intéresser à la reproductibilité inter-production. Le taux d'apparition du nombre total de bulles entre deux fabrications espacées de 18 mois s'est révélé le même, constant au cours de l'affinage. La variation du nombre de bulle suit un comportement linéaire avec le temps, avec un taux moyen d'apparition des bulles de  $25 \text{ yeux.jour}^{-1}$ . Il existe néanmoins des différences en fonction de la taille des bulles. Ainsi, l'apparition des yeux de plus de  $10\text{mm}^3$  varie d'une fabrication à l'autre, avec  $31 \text{ yeux.jour}^{-1}$  pour l'une et  $17 \text{ yeux.jour}^{-1}$  pour l'autre. Néanmoins, l'élément le plus différenciateur d'une fabrication à l'autre est l'état initial du nombre de bulles dans les fromages, comme le montre la Figure 18.

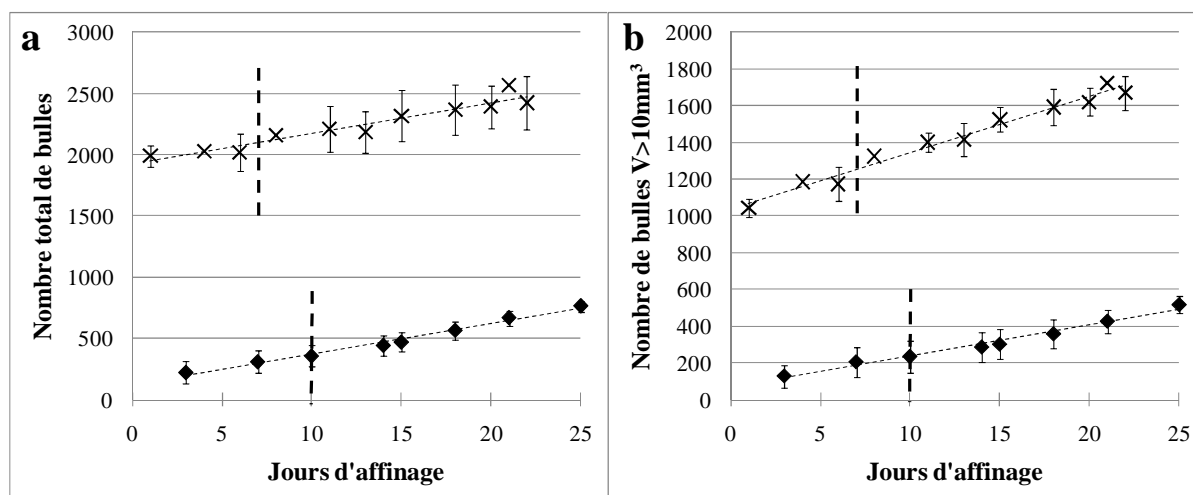


Figure 18 : Augmentation du nombre total de bulles dans les fromages des fabrications B1 (◆) et B2 (X). Ligne verticale pointillés = changement de cave de 12 à 20°C

Il apparaît donc de forts écarts de nombres de bulles initiaux, avec près de 10 fois plus de bulles pour la fabrication B2. Cet écart ne peut pas être expliqué par les ouvertures dites mécaniques puisque le même écart est observé quand les seules bulles de plus de 10 mm<sup>3</sup> sont considérées. Les étapes de procédé précédant l'affinage sont donc primordiales car elles déterminent l'état initial des fromages lors du début de l'affinage. Il serait donc pertinent de s'interroger sur le nombre et la densité de répartition des amorceurs dans le caillé initial et de mieux caractériser l'influence des étapes de procédé en amont de l'affinage, telles que l'étape de pressage et l'étape de saumurage. En effet, dans le cas de ces deux fabrications, comparer le seul état final aurait pu biaiser l'interprétation des différences constatées.

De plus, le gradient de dureté entre la périphérie et le centre mis en exergue par les tests de compression en conditions lubrifiées est constant au cours de l'affinage. Les écarts cœur / périphérie sont les mêmes en début et en fin d'affinage, prouvant que cette étape de procédé n'a aucune influence sur les propriétés rhéologiques des fromages. En revanche, l'écart observé est forcément causé par un traitement thermomécanique précédent l'affinage et qui serait la source des différences observées dès l'entrée en cave froide. Les étapes de procédé précédant l'affinage influencent donc également la résistance de la pâte et pourraient par ce biais participer au gradient d'ouverture en périphérie et cœur des fromages.

La quantité de CO<sub>2</sub> produit après 15 jours de cave chaude pour les fabrications B1 et B2 sont comparables, tout comme pour le niveau final de porosité de 5%, ce qui correspond à un volume de gaz de 0,5 L dans les deux cas. De plus, la quantité de CO<sub>2</sub> produit dans les fromages mesurée soit via l'acide acétique pour la fabrication B1, soit par respirométrie pour la fabrication B2 est identique à cœur, tandis qu'une valeur moindre est observée en

périphérie pour les fromages des fabrications B2. En effet, 26 à 27mmol.kg<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> sont produites à cœur des fromages des deux fabrications, mais deux fois plus de CO<sub>2</sub> a été obtenu en périphérie des fromages B1 que B2. La différence en périphérie pourrait être moindre en réalité puisque la comparaison des méthodes chimie / respirométrie a montré que la mesure de la quantité de CO<sub>2</sub> via la production d'acide acétique est d'autant plus précise que la quantité de CO<sub>2</sub> est importante. Il se pourrait également que les bactéries n'aient pas connu exactement les mêmes conditions d'une fabrication à l'autre (facteurs de croissance, qualité du lait, etc). Cependant, le gradient UR/C apparaît moindre pour la fabrication B1 qui présente donc une production de CO<sub>2</sub> plus homogène et en moyenne plus importante que la fabrication B2. De plus, le taux d'augmentation du volume gazeux dans les fromages est différent, comme le montre la Figure 19.

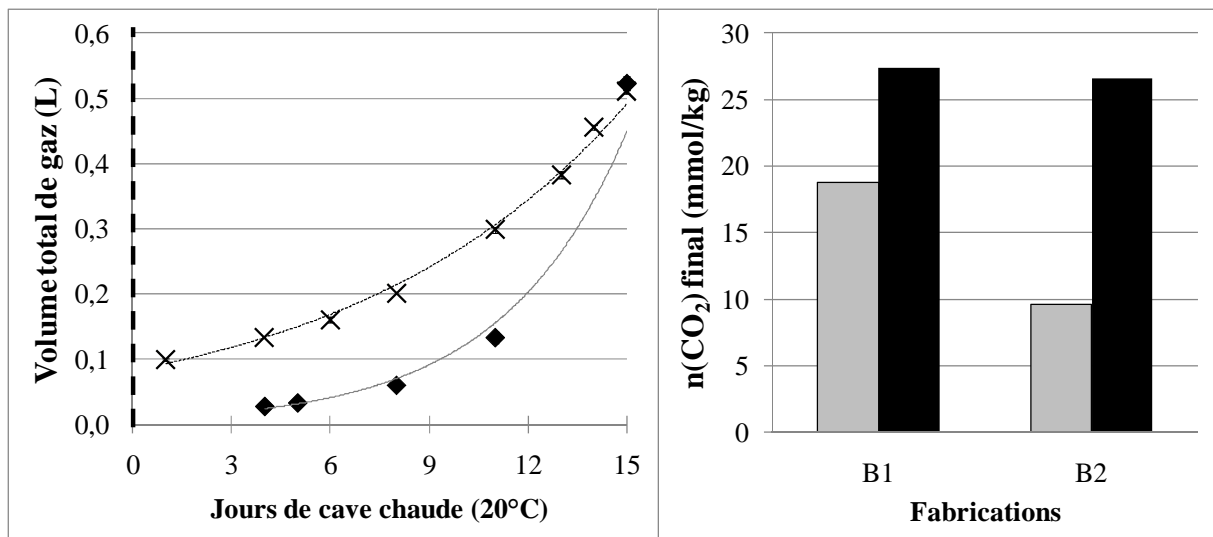


Figure 19 : (Gauche) Augmentation du volume de gaz dans les fromages des fabrications B1 (◆) et B2 (X) en cave chaude. Ligne pointillée verticale = changement de cave de 12 à 20°C. (Droite) Quantité de CO<sub>2</sub> produite en fin d'affinage en périphérie (gris) et à cœur (noir) des fromages.

D'une part, le volume de gaz en entrée de cave chaude est supérieur pour la fabrication B2 avec 0,1 L contre près de 10 fois pour la fabrication B1. D'autre part, le taux d'augmentation du volume de gaz total augmente plus vite pour la fabrication B1 que pour la B2. En effet, en approximant l'évolution du volume total de gaz dans les fromages durant la cave chaude par un profil exponentiel de type  $y = A.e^{kt}$ , il est possible de relever le coefficient pour comparer les deux fabrications. Il est de 0,26 pour B1 et de 0,12 pour B2, soit un coefficient k 2,2 fois plus élevé pour la fabrication B1 que pour la B2. Ceci peut être rapproché du nombre de bulle (Figure 18) dont l'évolution montre que malgré une porosité identique en fin de cave chaude, alors la taille moyenne des bulles de la fabrication B2 est plus faible que celle des bulles de la fabrication B1. Or dans le cas de petites bulles, l'interface avec entre l'air et la pâte fromagère

pour chaque bulle individuelle est moindre par rapport à des bulles de grande taille. Il est donc possible de supposer que le transfert du CO<sub>2</sub> vers la bulle est plus lent pour les petites bulles et que la croissance serait donc ralentie par rapport à des bulles de grande taille. Ceci semble démontrer que pour un nombre de bactérie identiques et une production de CO<sub>2</sub> semblable, la surface d'échange piloterait la vitesse de transfert dans la phase gazeuse et donc la croissance des yeux. Toutefois, dans le cas présent, la surface d'échange peut être un facteur d'influence mais la production de CO<sub>2</sub> n'est pas identique aux vues de la Figure 19, puisque qu'en moyennant les valeurs obtenues entre UR et C, on obtient une production de CO<sub>2</sub> de 23,1 mmol.kg<sup>-1</sup> pour la fabrication B1 et de 18,1 mmol.kg<sup>-1</sup> pour B2. La production de CO<sub>2</sub> comme la surface d'échange seraient donc en faveur d'une augmentation de volume plus rapide pour la fabrication B1 que pour la fabrication B2. Enfin, un troisième facteur pourrait également contribuer à expliquer ces écarts : la pression nécessaire à la croissance des petites bulles est supérieure à celle nécessaire à la croissance des bulles de plus grande taille. Il est donc cohérent que des fromages disposant initialement de plus grandes bulles aient eu une augmentation de porosité plus rapide.

### 3. Conclusion

L'objectif de la thèse était de déterminer quels étaient les paramètres les plus influents sur la croissance des bulles dans des fromages à pâte pressée non cuite. La première étape a donc consisté à mettre en place une méthodologie s'appuyant sur l'expertise des différents partenaires, où chaque technique était dédiée à l'analyse de différents éléments des fromages. Ont ainsi été analysés la composition, les propriétés rhéologiques, le métabolisme bactérien, et la microstructure, idéalement autour des yeux ou dans des zones présentant des différences d'ouverture. Celles-ci ont pu être identifiées grâce à la mise en place d'une méthode d'imagerie 3D par IRM et tomographie RX, couplée à un traitement d'images permettant d'obtenir des indicateurs d'ouvertures globaux tels que le nombre et la taille des bulles, mais aussi locaux via leur localisation dans les fromages et leur cinétique individuelle de croissance. Un fort gradient d'ouverture entre le centre et la périphérie des fromages a été quantifié, formalisant les observations empiriques des technologues. Les yeux sont moins nombreux, plus petits et croissent moins vite en zone sous-croûte par rapport à la zone à cœur. Plusieurs pistes ont été explorées pour expliquer ces disparités. La microstructure des deux zones n'ayant pas présenté de différence significative, les seuls paramètres restant en mesure de provoquer le gradient d'ouverture sont la teneur en sel et les propriétés rhéologiques. En effet, aucun autre paramètre de composition n'est soumis à un gradient dans ces fromages

emballés avant l'affinage. La complémentarité de l'IRM et du protocole de mesure de production de CO<sub>2</sub> par respirométrie a permis de démontrer que le sel influence l'ouverture des fromages via la production de CO<sub>2</sub> et potentiellement via sa solubilité. La dureté plus élevée de la périphérie des fromages pourrait accentuer les écarts sans qu'une corrélation puisse être formellement établie, l'amplitude du gradient de dureté étant stable (et importante) durant tout l'affinage alors que celui d'ouverture apparaît progressivement et s'amplifie en cave chaude. Le facteur clef de contrôle du gradient d'ouverture dans les fromages type PPNC emballés serait donc le sel, bien que les étapes de procédé précédant l'affinage semblent également primordiales. En effet, l'état initial des fromages à leur arrivée en cave froide impacte fortement l'ouverture qui s'en suit. Enfin, des éléments d'uniformité tels que la microstructure ou le taux d'apparition des yeux au cours du temps révèlent que tous les paramètres de caractérisation des fromages ne sont pas soumis à gradient. Il existe des mécanismes communs à l'ensemble des zones des fromages, que l'on peut donc rapprocher des étapes de procédé amont.

Les principales avancées apportées par ce projet de recherche sont donc d'une part l'approche multi-échelles basée sur une combinaison raisonnée et originale de diverses techniques dédiées ; et d'autre part la volonté de décorrélérer les facteurs d'influence étudiés afin d'analyser uniquement leur impact, sans biais apporté par trop d'interaction. En première approximation la croissance de bulles seraient donc majoritairement expliquée par les mécanismes de production et transfert du CO<sub>2</sub> dans les fromages. Les éléments de résistance de la pâte seraient moins impactant bien qu'ils puissent jouer un plus grand rôle dans la formation de lainures si les propriétés de résistance de la pâte sont modifiées. Il semble que la température soit un levier majeur dans ce domaine puisque les seuls cracks observés l'ont été à froid (entre 4 et 12°C), qu'ils soient macroscopiques ou sous forme de micro-cracks observés en microscopie.

Technologiquement, une bonne maîtrise de l'ouverture passerait donc par une attention particulière aux étapes de procédé amont qui conduisent pour l'instant à un état initiale des fromages très variable. Elle serait également optimisée par une fermentation gazeuse mieux répartie dans les fromages, peut être en diminuant les quantités de sel, en changeant le mode de salage ou en utilisant des souches plus halotolérantes. Enfin, la maîtrise des températures et la limitation des contraintes exercées sur les produits stockées à froid pourrait peut être prévenir la formation de certaines lainures.

## 4. Perspectives

Plusieurs perspectives peuvent être envisagées tant d'un point de vue des techniques que des mécanismes de croissance des bulles.

### *4.1 Perspectives méthodologiques*

Il a été précédemment évoqué la durée des acquisitions IRM de l'ordre d'une heure par fromage. Or une optimisation de la séquence d'acquisition des images basée sur un plan coronal et non plus transversal serait intéressante pour réduire le temps d'acquisition. Cette optimisation serait particulièrement adaptée pour une opération de passage en revue de produits, à raison toutefois de 20 min nécessaire à la caractérisation d'un fromage de 11 kg si la résolution  $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$  est maintenue. Des tests sur les facteurs turbo et une réduction de la résolution permettraient de réduire encore ce temps. La résolution avait été initialement choisie pour maximiser la détection de petites bulles, mais étant donné que nous avons montré que leur contribution à la porosité était négligeable il est alors possible de dégrader la résolution. De plus, le traitement d'images pourrait être renforcé en y ajoutant un facteur de forme des yeux permettant de mieux caractériser la déformation relative des bulles et peut être de pouvoir mettre à l'écart les ouvertures mécaniques autrement que par le filtre de taille «  $V < 10 \text{ mm}^3$  », tel que développé jusqu'alors. En effet, les petits amas formés par ces micro-ouvertures positionnées en sous-croûte pourraient être écartés par un filtre sur la forme. Enfin, il serait possible de quantifier la déviation de la forme des bulles par rapport au modèle sphérique et de déterminer si cette variation est homogène partout dans le fromage. Ceci permettrait de mieux mettre en évidence les contraintes mécaniques appliquées sur le fromage par la croûte. Les bulles de périphéries pourraient donc être moins étirées que celles du centre par exemple. Enfin, il pourrait être intéressant de mettre au point des séquences IRM dédiées à la cartographie des temps de relaxation T2 en lien avec la composition des fromages et leur structure. Serait-il possible de descendre assez en résolution d'imagerie pour percevoir la couche lipidique pure observée en microscopie confocale ? Un suivi IRM de cette couche pourrait-il permettre de déterminer son stade d'apparition, ou si elle est déjà présente dès le début de l'affinage ?

En termes d'analyses chimiques, une caractérisation plus fine des phénomènes de protéolyse primaire et secondaire serait une indication supplémentaire permettant de déterminer s'il n'y a vraiment aucun lien entre protéolyse, microstructure et propriétés rhéologiques notamment. Un recours à des techniques de chromatographie par exemple

permettrait de déterminer la taille des peptides présents dans les différentes zones de fromages. Avec un étalon constitué des produits de réactions standards des enzymes protéolytiques, il serait même envisageable de remonter à l'activité des protéinases.

Un autre développement intéressant des tests rhéologiques serait un couplage avec des observations microscopiques. Ceci serait peut-être une voie d'explication du gradient de dureté au sein du fromage. Le recours à une cellule rhéo-optique devrait être une bonne solution pour coupler observation et mise sous contrainte. L'emploi de cette cellule serait également intéressant afin d'observer si la matière grasse subit des réarrangements dus à la contrainte exercée par la compression.

De plus, l'utilisation de sondes dédiées à la viabilité cellulaire en microscopie confocale permettrait peut-être de cartographier la présence de bactéries dans les fromages et de voir s'il existe des différences cœur / périphérie autrement que par les observations directes des clusters en microscopie électronique. Ces résultats pourraient appuyer ceux de dénombrement parfois difficiles à mettre en œuvre ainsi que ceux issus des mesures indirectes de concentrations d'acides organiques. De plus, des clusters composés de différentes souches bactériennes, par exemple d'un mélange de bactéries propioniques et lactiques pourraient également renseigner sur la présence d'interactions potentielles pouvant participer au gradient de production quantifié en respirométrie. Enfin, le développement d'une méthode permettant de quantifier le CO<sub>2</sub> solubilisé dans la pâte permettrait de compléter très efficacement cette méthode de respirométrie mise en place par les Laboratoires Standa. Une mesure directe du gaz carbonique solubilisé dans la pâte permettrait de vérifier la cohérence du bilan sur le CO<sub>2</sub> basé sur trois ou quatre termes : produit = yeux + pâte + espace de tête, les termes « yeux » et « espace de tête » étant quantifiés par imagerie.

#### *4.2 Perspectives de hiérarchisation des facteurs d'influence sur l'ouverture*

Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes de croissance de bulles, plusieurs pistes peuvent être envisagées. Tout d'abord, tenter de décorrélérer production, diffusion et solubilité du CO<sub>2</sub> en étudiant des souches de PAB plus ou moins productrices de CO<sub>2</sub> (via la voie de l'aspartase notamment). Dans ce cas, aucun autre facteur que la production ne serait modifié, ce qui permettrait de mieux appréhender l'importance de la production de CO<sub>2</sub> par rapport à sa solubilité et sa diffusion.

Il apparaît également essentiel de tester l'influence des étapes de procédé précédant l'affinage en étudiant les fromages avant / après saumure par exemple. Un suivi de la composition du sérum soutiré de la cuve lors de l'égouttage serait aussi intéressant. Travailler sur l'importance des amorces en micro-filtrant le lait pour tenter d'obtenir des fromages aveugles malgré la présence d'une fermentation gazeuse standard serait aussi intéressante. Il serait possible de compléter ce cas d'étude par l'ajout d'amorces de taille et de nombre parfaitement déterminés afin d'observer si toutes donnent naissance à des yeux, s'il existe un nombre limite, si de plus grosses amorces produisent en fin d'affinage des yeux plus gros, etc.

Enfin, il serait également envisageable de tester différents films d'emballage afin de s'intéresser aux phénomènes de transport du CO<sub>2</sub> vers l'extérieur des fromages notamment. Faire varier la perméabilité du film d'emballage, ou ses propriétés mécaniques, en particulier de résistance à une traction, permettrait d'étudier une gamme d'échanges gazeux et de contrainte des fromages plus importante.

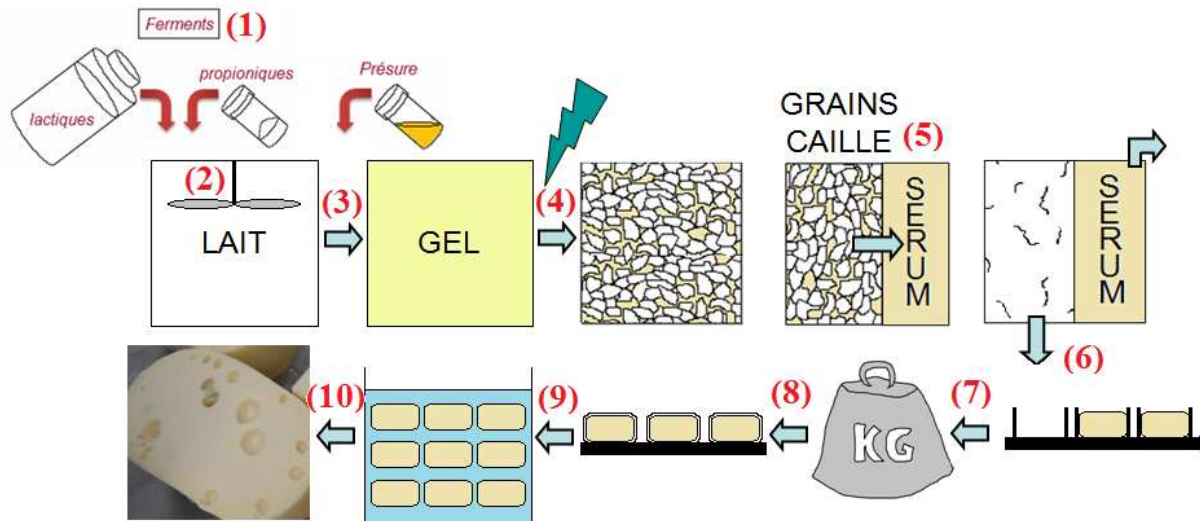




# **Chapitre IV - Matériels et Méthodes**

## 4.1 Production des fromages

Des fromages de type pâte pressée non cuite ont été produits industriellement selon le procédé de fabrication global décrit dans la Figure 20.



**Figure 20 : Schématisation du procédé de fabrication des fromages à pâte pressée non cuite**

Ces fromages formaient des blocs de  $24 \times 48 \times 9 \text{ cm}^3$  et d'environ 11kg. Après saumurage, ils étaient emballés à l'aide d'un film plastique imperméable (thermo-rétracté et mis sous vide sous un barème de 250mbar), placés dans des cartons individuels et envoyés au laboratoire le jour même ou le lendemain par transporteur. Le transfert a été réalisé à température ambiante, les fromages étant empilés les uns sur les autres jusqu'à leur dépôt dans la chambre froide à  $12^\circ\text{C}$ . Ils ont alors été placés les uns à côté des autres sans superposition et affinés en laboratoire selon le protocole décrit ci-après (chapitre 2.2). L'affinage se déroule en deux temps : 7 à 10 jours en cave froide ( $12^\circ\text{C}$ ) suivis de 15 jours en cave chaude ( $20^\circ\text{C}$ ). Des différences d'affinage entre les conditions du laboratoire et les conditions industrielles ont été prises en compte lors d'une phase de test comparative (résultats non montrés). Les échantillons seront donc identifiés dans tout le document par les abréviations suivantes :

- CF = cave froide (ou « production room ») à  $12^\circ\text{C}$
- CC = cave chaude (ou « hot room ») à  $20^\circ\text{C}$
- J1 à J10 = jours de cave froide à  $12^\circ\text{C}$
- J10 = jour de changement de cave d'affinage  $12 \rightarrow 20^\circ\text{C}$
- J11 à J25 = jours de cave chaude à  $20^\circ\text{C}$

## 4.2 Affinage des fromages

L'affinage des fromages s'est déroulé en deux parties : 10 jours de cave froide à 12°C et deux semaines de cave chaude à 20°C. En raison du nombre de produits, la partie cave froide a été réalisée en chambre froide positive à 12°C de façon à accueillir jusqu'à 30 blocs de fromage. Des planches ont été posées sur les étagères ajourées de la chambre froide pour éviter de marquer les produits lors de leur affinage, ou de les voir couler à travers. Les fromages ayant été envoyés à J1 et reçus à J2, la température de la chambre froide a été contrôlée entre J2 et J10 avec une consigne à 12°C, soit une température moyenne mesurée par une sonde de  $12,1 \pm 1,3^\circ\text{C}$ . Les fromages étaient apportés à l'IRM un par un pour les acquisitions et aussitôt placés dans un tunnel thermostaté de façon à éviter toute variation de température pendant les acquisitions d'images, pouvant durer plus d'une heure par produit.

Etant donné le nombre et la taille des blocs affinés, la cave chaude s'est déroulée directement dans la cage de Faraday de l'IRM dont la consigne était de 20°C. La température réelle s'est révélée plus faible, le suivi par quatre fibres optiques dans la cage ayant calculé une température moyenne globale de  $20,02 \pm 0,60^\circ\text{C}$  sur les dix jours, en comptant les entrées et sorties journalières dans la cage de Faraday pour les acquisitions IRM. Toutes les expérimentations ont été menées dans les mêmes conditions d'acquisition avec ces consignes d'entrée et de sortie. En effet, les étagères de stockage ont été installées au fond de la cage de Faraday, derrière l'IRM et le plus loin possible de la porte et des bouches d'aération pour limiter au maximum toute variation de température durant l'affinage. Pour les acquisitions d'images, les fromages ont à nouveau été placés dans le tunnel thermostaté à 20°C même si la cage de Faraday était déjà contrôlée en température, de façon à conserver les mêmes conditions que lors de la cave froide (flux d'air notamment).

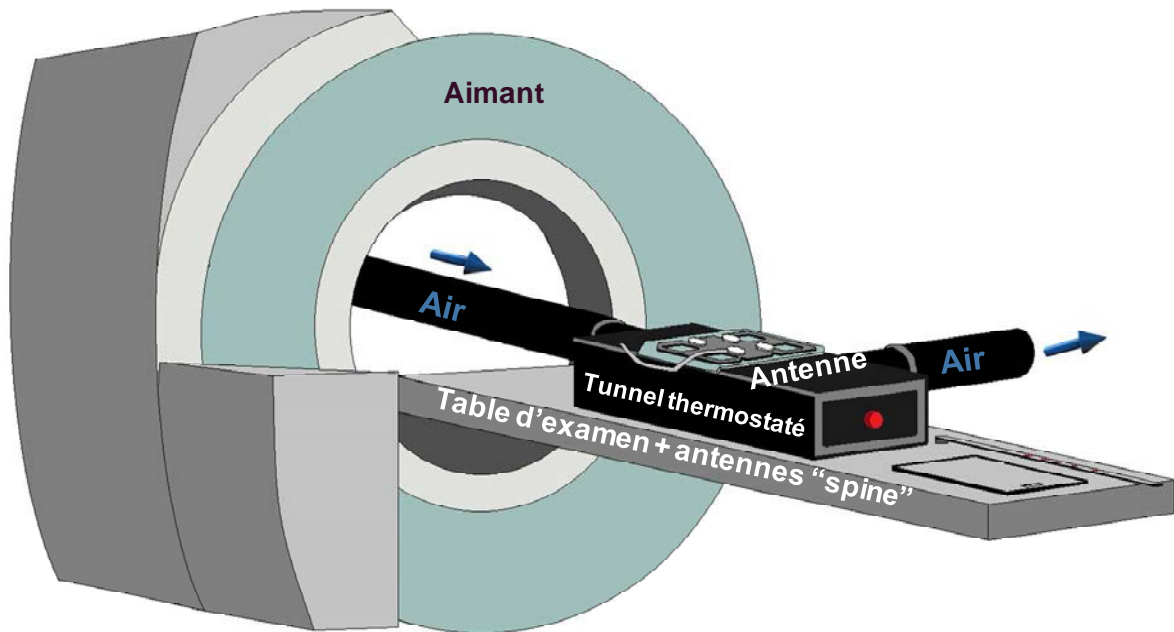
Le changement de cave a eu lieu lors de la septième (J7) ou la dixième journée de cave froide (J10), en milieu de journée, entre 14 et 16h. Il a été contrôlé que de par leur masse, les fromages de 11 kg avaient besoin de 12h pour être complètement uniforme en température. La nuit entre le 10<sup>ème</sup> et le 11<sup>ème</sup> jour a donc assuré cette transition.

## 4.3 Suivi de la croissance de bulles par imagerie

### 4.3.1 IRM

Un scanner IRM Avanto (Siemens) 1,5 Tesla a été utilisé pour acquérir les images des blocs de fromage au cours de l'affinage à l'aide d'une séquence turbo spin echo (tse) 3D

caractérisée par une résolution  $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$ , Facteur Turbo = 6, TR = 200ms et TE = 8,7ms. Pour optimiser la réception du signal, une combinaison d'antennes a été utilisée : une « body » souple sanglée sur le tunnel thermostaté dans lequel les fromages étaient placés pendant les acquisitions et deux antennes « spine » incluses dans la table d'examen et donc placées sous le tunnel, comme schématisé en Figure 21.

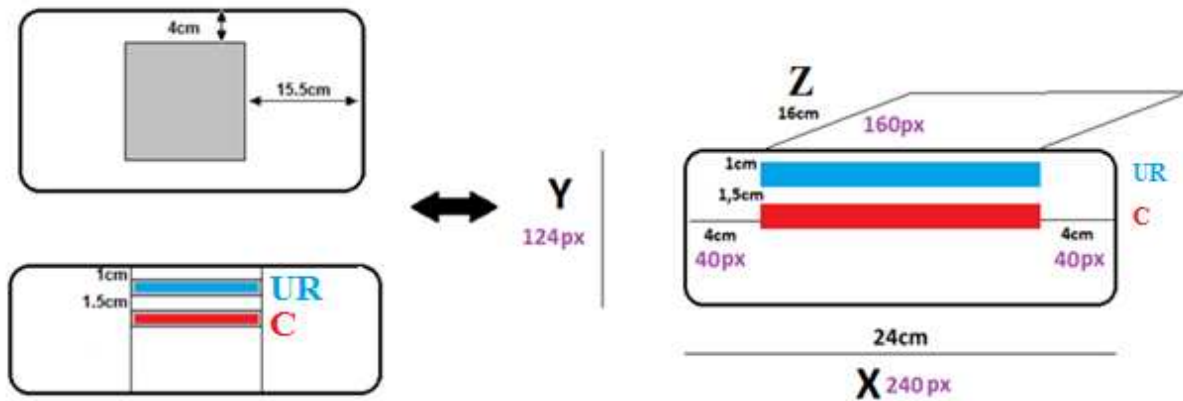


**Figure 21 : Schématisation de l'organisation des éléments nécessaires aux acquisitions d'images IRM**

Les acquisitions s'effectuaient par blocs à cause de la limite de 96 coupes maximum imposée par l'IRM. Selon les dimensions des fromages, 5 ou 6 blocs de 9,6 cm (de par la résolution choisie de 1mm de coupe) étaient ainsi artificiellement créés, soient 480 ou 576 images transversales acquises par fromage et par jour d'affinage. Les produits étaient déplacés toutes les 15 min environ pour réaliser l'acquisition du bloc suivant.

A la fin des acquisitions, les images étaient exportées pour traitement, divisé en trois parties principales. La première partie visait à la labellisation et l'attribution de coordonnées uniques pour chaque bulle, à la suite desquelles des données globales telles que le nombre de bulles, l'histogramme de répartition des tailles, le volume de chaque bulle, le volume total de gaz dans le fromage, le volume total du fromage, le volume de pâte seul et la porosité étaient calculés. La seconde partie du traitement visait à obtenir le suivi cinétique de la croissance des ouvertures, chacune étant repérée au stade final d'affinage qui sert de référence. La trajectoire de croissance de chaque bulle de plus de  $50 \text{ mm}^3$  détectée en fin d'affinage était retracée au cours des stades précédents de façon à retrouver son état antérieur. Son volume et ses

coordonnées étaient listés pour finalement obtenir sa cinétique complète de croissance et son positionnement au cours du temps. Enfin, la dernière partie du traitement d'images vise à reconstruire artificiellement les tranches en périphérie et à cœur décrites précédemment sur les images IRM, afin d'obtenir des données locales. Les tranches ainsi artificiellement reconstituées possédaient des dimensions réelles de  $16 \times 16 \times 1,5 \text{ cm}^3$  et une résolution de  $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$  (Figure 22).



**Figure 22 : Création artificielle des tranches UR et C sur les images IRM et correspondance en correspondance avec les véritables tranches découpées pour les tests destructifs**

Les indicateurs nombre de bulles, volume de chaque bulle, volume de gaz total, volume moyen des ouvertures et porosité ont été récupérés pour chaque tranche. Il a alors été possible d'étudier séparément les données spécifiques aux deux populations de bulles et de les confronter aux données de chimie, rhéologie ou respirométrie par exemple.

Le détail des deux premières étapes du traitement d'images codées sous Matlab (The MathWorks, Natick, MA, USA) et Sclab (logiciel open source, Scilab Entreprises, <http://www.scilab.org/>) fait l'objet du premier article (« MRI method for investigation of eye growth in semi-hard cheese »). La troisième étape reposait sur les deux précédentes mais était effectuée directement sous Excel à partir des résultats des étapes précédentes. Le tableau de données obtenu se présentait sous la forme de lignes correspondant aux différentes bulles et de colonnes correspondant aux volumes, numéros de bulles et coordonnées de chaque bulle pour chaque jour d'affinage, soient entre 100 et 1000 lignes pour 50 colonnes environ. Un filtre était alors appliqué à la croissance des bulles pour vérifier que le traitement n'ait pas induit de biais, en s'assurant que le volume à  $J+1$  était bien supérieur ou égal au volume au jour  $J$ . Après avoir vérifié que les bulles conservées représentaient bien au minimum 80% de la porosité totale, des tests logiques étaient appliqués pour placer les coordonnées des bulles dans les tranches UR et C grâce à la position de leur barycentre. Cette action reposait sur

l'hypothèse que le volume des bulles exclues des tranches (car leur barycentre est hors champs alors qu'une partie de leur volume est en fait dans la zone) était compensé par celui des bulles qui ne sont pas entièrement dans la tranche mais dont le barycentre en fait partie.

#### 4.3.2 Détermination de l'espace de tête des fromages

Pour déterminer le volume de l'espace de tête qui peut se former entre le fromage et le film d'emballage, l'IRM est un outil très intéressant. Il faut appliquer la même démarche que pour la détermination du volume de bulles. Cependant, contrairement aux bulles présentes dans une matrice fromagère composée d'eau et de matière grasse, le film plastique ne donne aucun signal en IRM, d'où l'impossibilité de délimiter l'espace de tête. L'idée de base était donc de recouvrir le film avec un matériau émettant un signal, c'est-à-dire de l'eau ou de la matière grasse. Une couche d'eau a été privilégiée, appliquée sur les fromages de façon détournée via un papier absorbant imbibé d'eau. Celui-ci a été enrobé dans du film alimentaire, ce qui offre trois avantages : pas d'assèchement, les fuites sont contenues à l'intérieur et son action électrostatique colle le papier absorbant sur le film d'emballage des fromages. La forme de l'espace de tête est ainsi obtenue fidèlement. Différents essais ont été réalisés pour déterminer le nombre de couches de papier absorbant nécessaire à l'obtention d'un signal IRM détectable. Comme le montre Figure 23, 4 pliements ne permettaient pas de délimiter l'espace de tête sur les bords des fromages, alors qu'à partir de 7 pliements, cela été plus aisé. Enfin, il a également été vérifié qu'il n'y a pas d'assèchement impliquant une diminution de signal durant les 10h d'une journée d'acquisition d'images IRM.

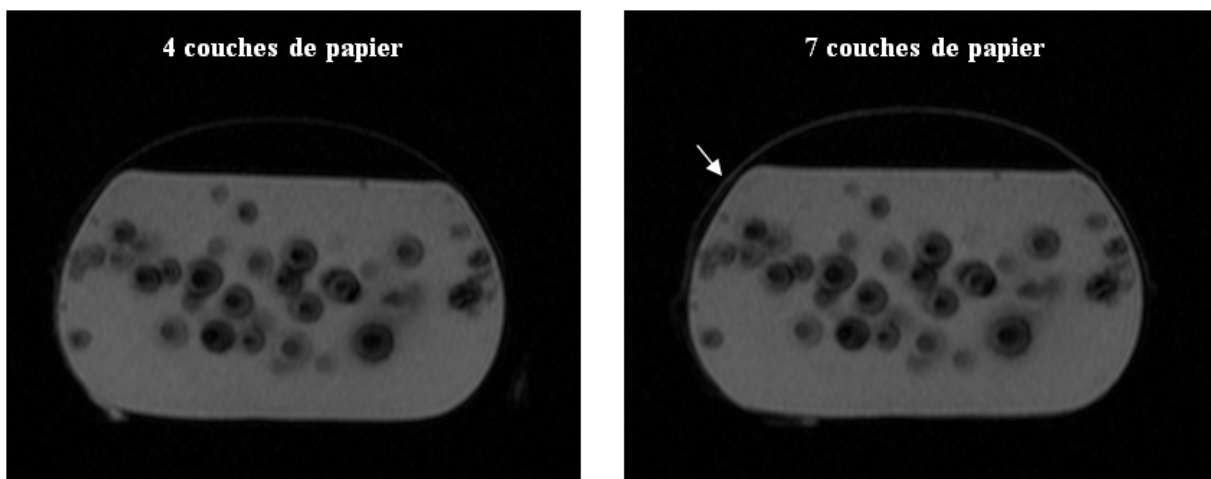


Figure 23 : Comparaison du signal IRM émis par le film d'eau déposé à la surface des emballages des fromages

#### 4.3.3 RX

Des images en 3D ont été obtenues à l'aide d'un scanner Emotion Duo (Siemens, Erlangen, Allemagne), avec une résolution de  $0,78 \times 0,78 \times 1,5 \text{ mm}^3$ , à raison de 324 images/fromage acquises en 8 min. Les paramètres d'acquisition utilisés étaient les suivants : 130 KV de tension du tube RX, 70 mA d'intensité du tube, filtre de convolution B20s (tissus mous). La séquence était de type axial, car une séquence hélicoïdale générerait des artefacts de reconstruction en périphérie des bulles. Les fromages étaient maintenus dans des caissons thermostatés durant la durée des acquisitions.

#### 4.3.4 Calcul du taux de déformation des bulles durant l'affinage

Grâce aux données issues de l'imagerie, il est possible de déterminer la déformation relative subie par les yeux dans différentes zones au cours de l'affinage. Pour cela, le rayon moyen des yeux est déduit à partir du volume moyen déterminé suite aux traitements d'images, en se basant sur une hypothèse de sphéricité des bulles. Une fois le rayon moyen connu en début et en fin d'affinage, la déformation relative des yeux est calculée sur le périmètre. Connaissant la durée de l'affinage, il est également possible de remonter également jusqu'à la vitesse de déformation des yeux, en  $\text{s}^{-1}$ .

### **4.4 Découpe des zones d'intérêt dans les fromages**

Deux zones de référence ont été choisies pour prendre en compte les effets gradients : UR, ou la tranche située 1cm sous croûte (appelée ainsi par analogie avec certains articles où l'abréviation « UR » était employée pour « Under Rind ») et C, ou la tranche située 4cm sous croûte au centre du fromage (appelée « C » pour « Core » dans les articles). La découpe a toujours été réalisée en laboratoire, les fromages étant découpés en blocs de  $16 \times 16 \times 9 \text{ cm}^3$  à l'aide d'un fil à découper avant que les tranches ne soient extraites comme présenté en Figure 24.



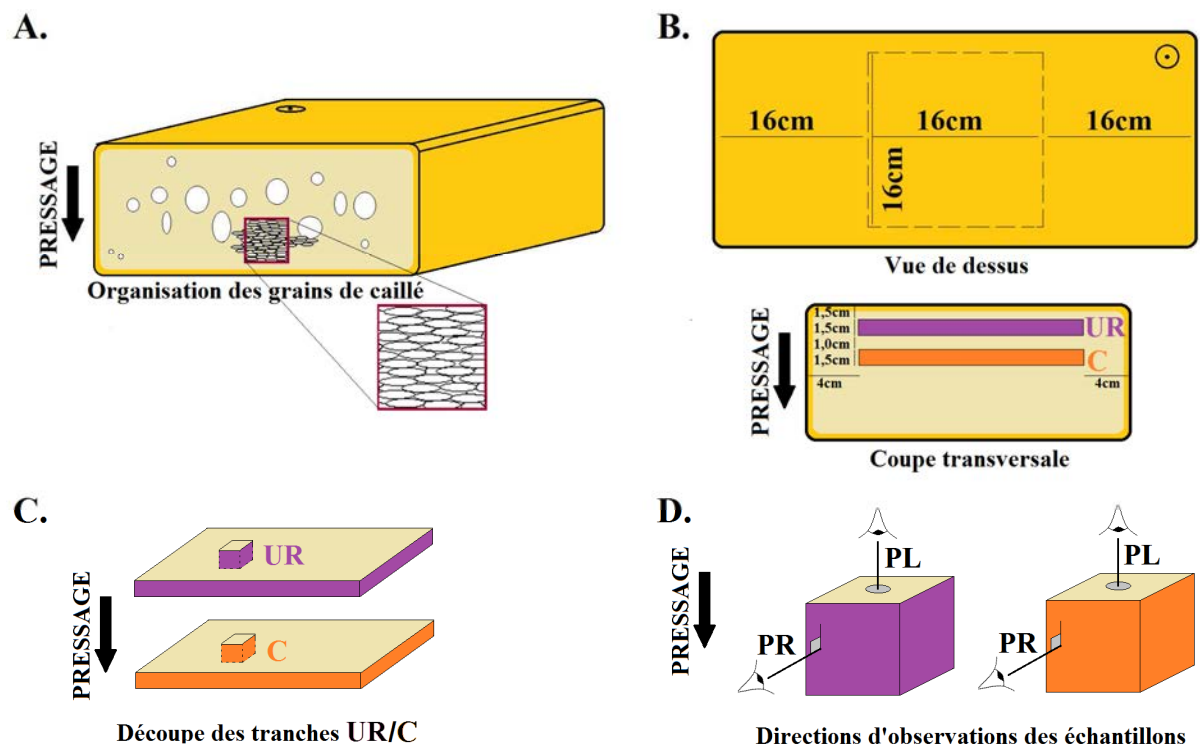


Figure 24 : Schéma de la découpe de tranches spécifiques et des échantillons de fromages

Tous les échantillons sont identifiés par leur localisation dans les fromages et leur direction de prélèvement grâce au code suivant adopté par tous les partenaires du projet :

- UR = tranche 1cm sous croûte (ou « under-rind »)
- C = tranche centrale (4cm sous croûte, ou « core »)
- PR = direction d'observation perpendiculaire à l'axe de pressage vertical
- PL = direction d'observation parallèle à l'axe de pressage vertical

#### 4.5 Rhéologie de la pâte fromagère

Les tranches découpées selon la Figure 24 sont emballées et placées à 4°C jusqu'à l'envoi vers le laboratoire assurant les tests rhéologiques qui s'effectuent le lendemain du prélèvement.

Tous les tests rhéologiques sont effectués à l'aide du rhéomètre MCR 301 (Anton Paar, Autriche) placé en mode texturomètre, c'est-à-dire avec une traverse descendant verticalement et comprimant un échantillon de fromage. Entre 3 et 10 répliques sont effectués par échantillon testé. Ces cylindres de fromage sont prélevés aussi proches que possible les uns des autres à l'aide d'un emporte-pièce de diamètre  $\phi=7\text{mm}$ , que ce soit sur tranche UR/C ou sur plaquette du commerce complètement affinée, comme dans l'exemple de la Figure 25. Des tranches

d'épaisseur  $h = 3,5 \text{ mm}$  sont découpées dans les cylindres en utilisant un outil de découpe qui assure un bon parallélisme aux deux faces de l'échantillon (étape 3 Figure 25). En effet, la qualité de la mise au contact échantillon/traverse de compression dépend de la planéité des échantillons testés. Ceux-ci sont ensuite recouverts d'huile de silicone dans un cristalliseur de façon à s'équilibrer à  $20^\circ\text{C}$  pendant 1h (étape 4 Figure 25). Ils sont finalement placés un à un sur le plan Peltier du rhéomètre, lubrifiés et compressés (étape 5 Figure 25) par la traverse pilotée à vitesse  $\frac{dh}{dt}$  ( $\text{mm.s}^{-1}$ ) exponentiellement décroissante, assurant une vitesse d'extension biaxiale  $\dot{\epsilon}_b$  ( $\text{s}^{-1}$ ) égale à  $\frac{dh}{h.dt}$  constante. C'est la force normale  $F_N$  (N) exercée par l'échantillon sur la traverse qui est mesurée au cours du test. La hauteur  $h$  (mm) des échantillons est également suivie une fois que sa valeur initiale est déterminée par le rhéomètre lors de la mise au contact (considérée établie lorsque  $F_N = 0,01\text{N}$  pendant 5s).

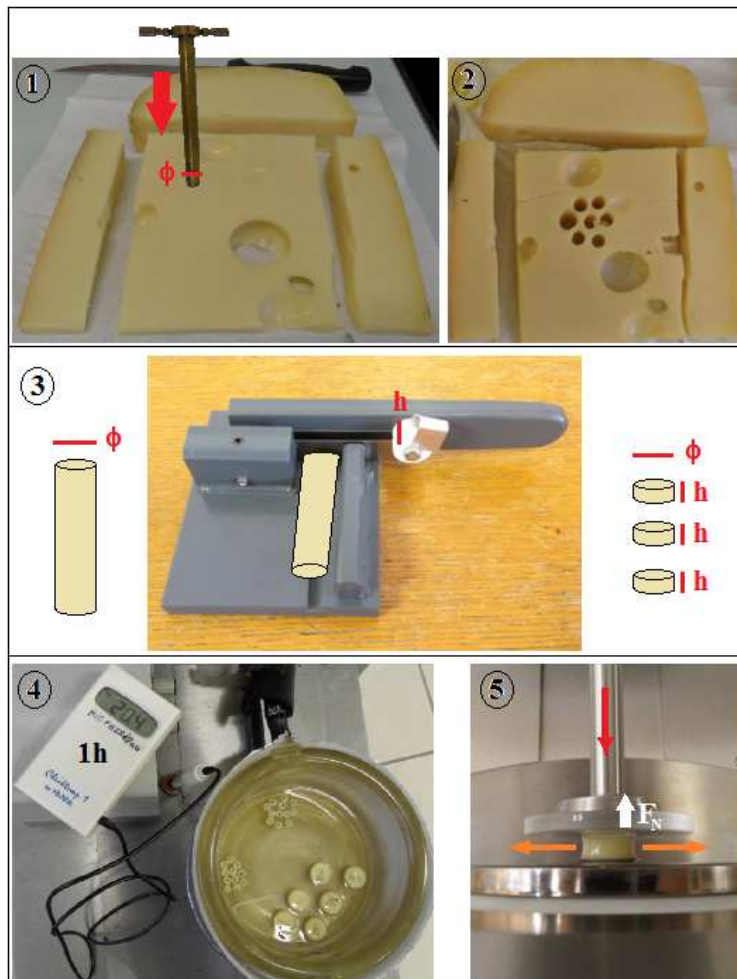


Figure 25 : Illustration du protocole de préparation des échantillons pour les tests de LSF

L'idée a été d'adapter ce test originellement destiné aux produits de panification à un fromage produit à pâte dure en utilisant une géométrie à volume constant. L'objectif était donc d'étudier une large gamme de déformation puisque la pâte autour des bulles est fortement déformée durant leur croissance, comme montré précédemment (cf chapitre 3.2). Cependant l'échelle de temps de la croissance de bulles est très longue (plusieurs semaines d'affinage), la vitesse de déformation de la pâte fromagère autour des yeux est donc faible. Ce sont donc ces deux conditions de forte déformation et faible vitesse qui ont été recherchées dans la mise en place du test de LSF appliqué au fromage. Les pré-requis nécessitaient de vérifier l'incompressibilité du produit (cf Article 3 « Rheological characterization of semi-hard cheese using lubricated squeezing flow test »), de construire une géométrie adaptée pour que l'extension et non la compression domine et d'assurer des conditions de lubrification suffisantes pour éviter tout cisaillement des échantillons. Pour déterminer la faisabilité de la démarche, des essais préliminaires ont été réalisés afin de déterminer les paramètres optimaux :

- Géométrie des échantillons

La géométrie des échantillons impacte directement la réalisation du test de LSF. Tout d'abord, un rapport 2 a été choisi entre la hauteur  $h$  et le diamètre  $D$  des échantillons de fromages, soit  $D = 2h$ . Les premiers tests effectués reposaient donc sur des cylindres de diamètre  $D = 15$  mm dans lesquels des tranches de  $h = 7$  mm de haut étaient découpées. Cependant, lors des essais de variation de la vitesse d'extension biaxiale, les plus hautes valeurs de vitesse conduisaient à une saturation du capteur de force du MCR (plafond à 45N). Ces impossibilités techniques ont donc conduit à une diminution des dimensions des échantillons à  $D = 7$  mm et  $h = 3,5$  mm. De cette façon, toutes les vitesses testées permettaient néanmoins d'acquérir les données sans mettre en péril le capteur de force.

- Planéité des échantillons

Autre point d'attention particulier lors de la découpe des échantillons : le parallélisme des faces des cylindres de fromages. En effet, en cas d'imprécision, la mise au contact initiale entre le plateau et l'échantillon est biaisée. La détermination de la hauteur initiale  $h_0$

nécessaire au calcul de la déformation des cylindres au cours du test est donc entachée d'imprécision, tout comme la compression elle-même, qui n'est pas équilibrée sur toute la surface. Ainsi, pour assurer la meilleure planéité possible des faces des cylindres, un outil de découpe a été conçu sous la forme de deux lames de rasoir maintenues sur un support coulissant à une distance  $h = 3,5$  mm l'une de l'autre par une entretoise (modifiable si les dimensions doivent être modifiées). De cette façon, les faces des petits cylindres de fromages sont découpées dans un même mouvement et à la même vitesse. En effet, le paramètre de vitesse de découpe est primordial pour échantillonner les fromages. Lors du prélèvement des cylindres à l'aide de l'emporte-pièce, la descente dans le produit doit être lente et surtout aussi constante que possible sous peine d'obtenir des cylindres « coniques » ou en « tonneau ». Une fois la découpe optimisée et maîtrisée, les petits cylindres de fromage sont obtenus de façon reproductible et leur diamètre initial  $D_0$  est systématiquement mesuré à l'aide d'un pied à coulisse pour servir au calcul de la contrainte et de la déformation.

- Temps d'équilibration des produits avant les tests

Les échantillons sont prélevés à différents stades d'affinage pour assurer la caractérisation du fromage au cours de tout l'affinage. Or cette étape se divise en deux caves aux températures différentes. Cependant, l'ensemble des mesures a été réalisée à 20°C pour assurer une meilleure comparaison des résultats d'une cave à l'autre. Ainsi, seul l'effet de la température d'affinage est pris en compte et non celui de la température de mesure. Cependant, les échantillons étant prélevés à 12 ou à 20°C selon le stade d'affinage, les petits cylindres doivent être équilibrés en température avant d'être compressés. Le temps de cette équilibration à 20°C a fait l'objet d'une étude préliminaire et différentes durées ont été testées, entre 15 et 240 min. Les écarts types obtenus sont plus importants avant 50 min et après 160 min d'équilibration à 20°C avant les tests. De plus, le module d'Young diminue entre 20 min et des durées d'équilibration plus longues.

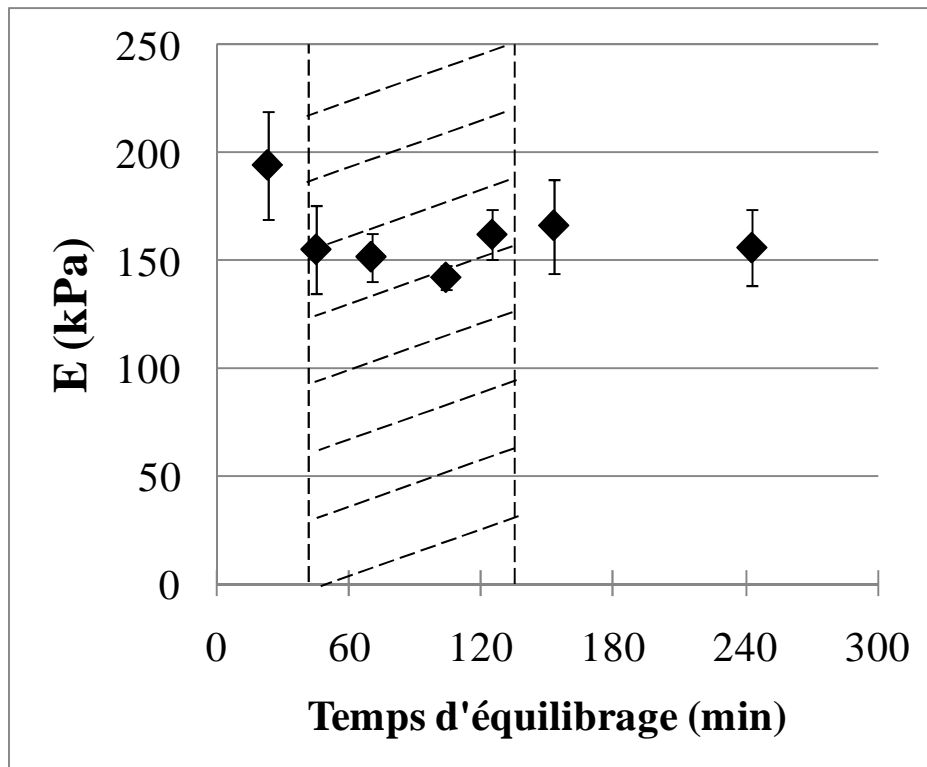


Figure 26 : Influence du temps d'équilibration en température avant les tests rhéologiques sur le module d'Young obtenu par la méthode de LSF

Finalement, pour assurer une bonne équilibration, il a été déterminé que les échantillons doivent rester dans un cristalliseur durant 45 minutes minimum et 2h maximum, recouverts d'huile de silicone pour éviter toute dessiccation.

- Vitesse d'extension biaxiale

Idéalement, les échantillons doivent être compressés à très faible vitesse pour se replacer dans les conditions les plus proches de celles de croissance de bulles réelle. Cependant, la mécanique du rhéomètre impose des limites de faisabilité. Parmi la gamme de vitesse d'extension biaxiale testée, il est apparu que  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$  représentait la borne inférieure de vitesse réalisable. Il est toutefois possible de tester plusieurs vitesses et d'extrapoler les résultats vers des valeurs de  $10^{-5} - 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ . Mais la gamme de vitesse réalisable est également limitée aux valeurs supérieures car au-delà d'une vitesse de traverse de  $1 \text{ mm.s}^{-1}$ , son accélération ne peut plus être considérée comme négligeable au regard de l'expérience, qui est alors réalisée avec une vitesse de traverse (et donc une vitesse d'extension biaxiale) non maîtrisée.

Enfin, le traitement de données nécessite le calcul de la contrainte d'extension biaxiale  $\sigma_b$  (kPa) et de la déformation d'extension biaxiale  $\varepsilon_b$  (-) exercées sur l'échantillon au cours

du test. Les courbes types obtenues après un test de LSF sur du fromage en cours d'affinage ou sur plaquette commerciale complètement affinée sont présentées en Figure 27a et Figure 27b respectivement.

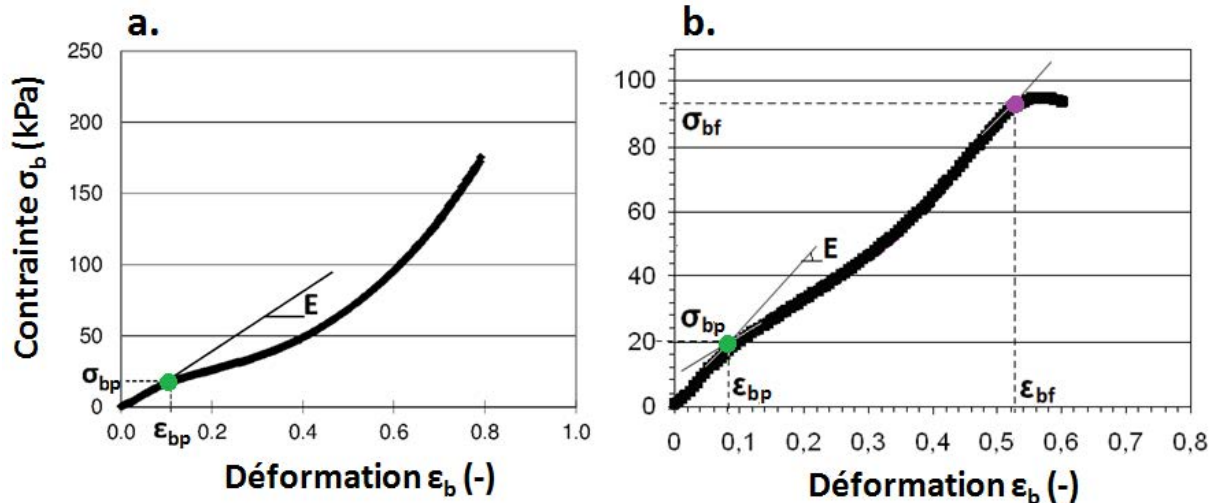


Figure 27 : Courbe type de contrainte = f(déformation) suite à un test de LSF sur a) fromage en cours d'affinage et b) plaquette commerciale complètement affinée

Deux points caractéristiques sont repérés sur ces courbes, correspondant aux changements de pente, caractéristiques d'une modification de la structure des produits. Le premier (vert) est appelé seuil de plasticité (p) et le second (violet), uniquement visible sur les plaquettes du commerce est appelé fracture (f).

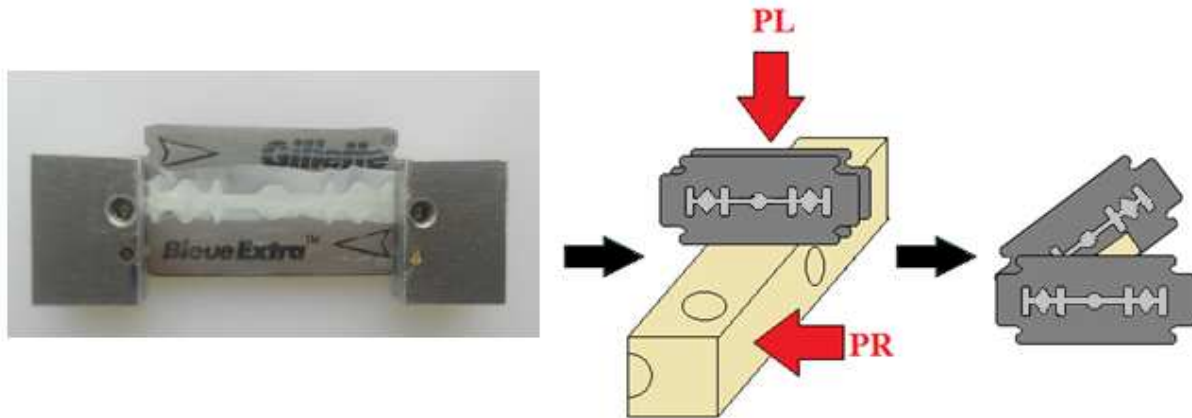
Enfin, un masque Excel permet de calculer le module d'Young  $E$  (kPa) comme la pente à l'origine des courbes précédentes (sous réserve d'une bonne planéité de l'échantillon) ainsi que la contrainte et la déformation au seuil de plasticité, en ajustant un polynôme de degré 4 sur les courbes contrainte=f(déformation). C'est la fonction DroiteReg qui permet de récupérer les valeurs des coefficients du polynôme et en les dérivant, d'obtenir les coordonnées du ou des changement(s) de pente (points d'inflexion).

## 4.6 Observations de la microstructure des fromages

### 4.6.1 Microscopie optique

L'étude de la microstructure de la pâte fromagère en microscopie optique est réalisée à partir d'échantillons prélevés dans les tranches UR et C à différents stades d'affinage ou sur plaquette commerciale complètement affinée, à l'aide de deux lames de rasoir. Un dispositif de serre-joint a été mis au point pour serrer au maximum deux lames entre elles et assurer une

meilleure reproductibilité de l'épaisseur des tranches d'un échantillon à l'autre, grâce à un vis permettant d'ajuster l'écartement des lames. En effet, en microscopie optique, l'objectif est d'obtenir des tranches de fromage les plus fines possibles de façon à ce que la lumière diffuse au travers des échantillons. Deux directions de prélèvement ont été réalisées : parallèle (PL) ou perpendiculaire (PR) à l'axe vertical de pressage des fromages (Figure 28).



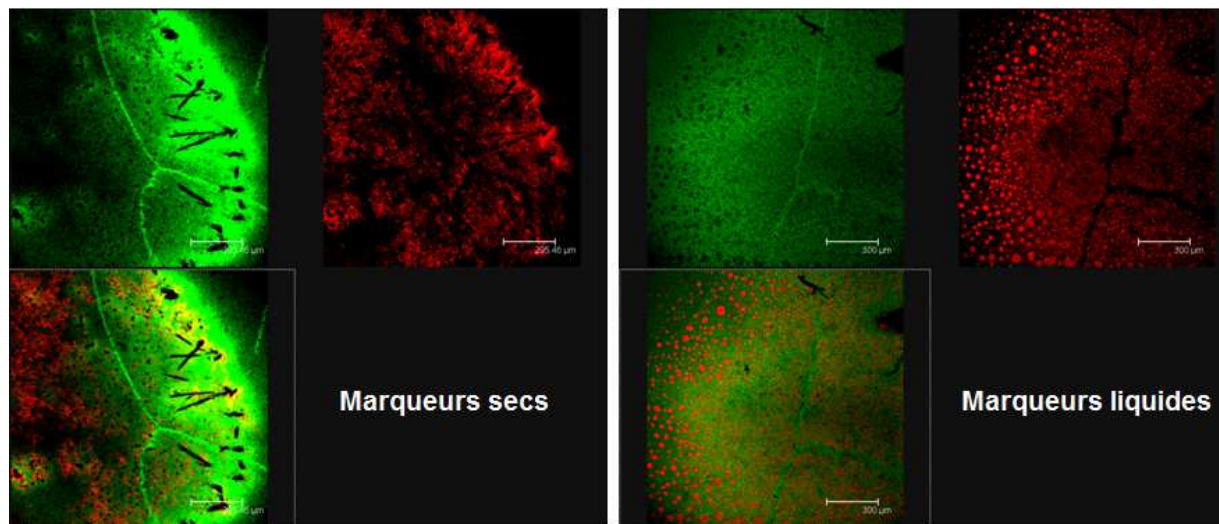
**Figure 28 : Schéma de la découpe de tranches fines pour l'observation en microscopie optique**

Après découpe, les fines tranches de fromage ont été déposées entre lame et lamelle et immédiatement observées sous microscope optique Eclipse 80i (Nikon) au grossissement x4.

#### 4.6.2 Microscopie confocale

Les échantillons observés en MCBL étaient issus du même type de découpe que celle présentée précédemment pour la microscopie optique (Figure 28) mais sans l'utilisation du serre-joint. En effet, la reproductibilité sur l'épaisseur des tranches est moins importante dans la mesure où la microscopie confocale permet de placer le plan focal à l'intérieur de l'échantillon et non pas en surface comme en optique. Après découpe, les échantillons étaient prélevés dans les tranches UR/C à différents stades d'affinage et selon les directions PR ou PL puis placés sur une lame dans un puits formé par un écarteur. Deux marqueurs choisis pour leur affinité spécifique ont été appliqués sur le fromage sous forme liquide (2 $\mu$ L) : le Bodipy 665/676nm pour la matière grasse et le DyLight 549nm pour les protéines. L'écarteur étant autocollant, la lamelle venait fermer le système qui était placé à 4°C pendant 2h dans du papier aluminium, puisque les sondes sont sensibles à la lumière. Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope inversé TCS SP2 AOBS (Leica) équipé de deux lasers Hélium-Néon de longueurs d'onde  $\lambda_{ex} = 543 \text{ nm}$  and  $\lambda_{ex} = 633 \text{ nm}$ .

Ce double marquage spécifique est une optimisation apportée lors du projet au protocole initialement utilisé dans le laboratoire. En effet, les marqueurs étaient initialement amenés à la surface des tranches de fromage pour diffusion sous forme solide après évaporation des solvants pour éviter tout impact du DMF/DMSO sur le fromage. Mais la diffusion des marqueurs s'est révélée insuffisante, avec l'apparition de paillettes et de cristaux formant des stries noire en MCBL, comme le montre la Figure 29.



**Figure 29 : Résultats d'observations d'échantillons en MCBL marqués à sec ou sous forme liquide. Vert = protéines seules, Rouge = matière grasse seule, Jaune = colocalisation**

C'est pourquoi les marqueurs ont finalement été appliqués sous forme liquide de façon à optimiser la diffusion dans un produit aussi compact et hétérogène que le fromage. La question d'une interaction des solvants des marqueurs avec les protéines ou la matière grasse s'est posée, mais aux vues de la bonne cohérence des résultats obtenus en microscopie confocale avec les observations réalisées en microscopie optique dans le projet ainsi qu'avec celles réalisées dans les études de la littérature, la fiabilité des résultats obtenus en MCBL a été démontrée.

#### 4.6.3 Microscopie électronique

Les observations en MEB ont été réalisées à l'aide d'un microscope JSM 6301F (Jeol) sur des cubes de fromages de  $5 \times 5 \times 5 \text{ mm}^3$  prélevés dans les tranches UR et C à différents stades d'affinage. Ils ont été placés dans une solution de glutéraldéhyde à 2,5% dans du tampon phosphate à pH 7 pendant 48h. Cette première solution était destinée à fixer les protéines des échantillons et a été renouvelée trois fois durant les 48h. Trois lavages successifs ont ensuite été réalisés à l'aide de la solution de tampon phosphate avant que les échantillons soient plongés dans la deuxième solution fixatrice durant 4h, destinée à la matière grasse : le



tetroxyde d'osmium à 1% dans du tampon phosphate. Après trois autres lavages avec la solution tampon, les échantillons ont été plongés dans des bains d'éthanol de plus en plus anhydre (jusqu'à 100%) durant 20 minutes chacun, puis dans deux bains d'acétone pure avant d'être stockés à 4°C sur la nuit. Ils ont finalement été fracturés par la méthode du point critique du CO<sub>2</sub> liquide avant d'être métallisés à l'or/palladium (80/20%). Ce protocole a donc nécessité 4 jours de préparation avant que les échantillons n'aient pu être observés.

#### **4.7 Mesure de la production de CO<sub>2</sub> par respirométrie**

Les échantillons destinés aux tests de respirométrie ont été prélevés comme décrit précédemment en Figure 24 et les tranches UR et C furent soit récupérées fraîches le jour même du changement de cave par la personne en charge des mesures, soit récupérées congelées à -20°C à la fin de l'affinage si différents points sont nécessaires. Le développement du protocole de respirométrie et la vérification de la non perturbation des résultats par la congélation ont été vérifiés par les laboratoires Standa.

Une vingtaine de fines tranches (soit environ 35 à 30g de fromage) ont été découpées dans les tranches UR et C en début de cave chaude (J10) à l'aide d'un emporte-pièce (3cm x 1,5mm) et placées dans des fioles en verre sans contact entre elles. Chaque flacon a été scellé à l'aide d'un bouchon en caoutchouc percé de deux aiguilles équipées de robinets 2 ou 3 voies. Une bandelette témoin d'anaérobiose (Merck, Darmstadt, Allemagne) a été placée dans chaque flacon et l'élimination de l'air est assurée par un balayage à l'azote durant 10min. Les fioles ont ensuite été placées à 20°C dans une armoire régulée en température et deux fois par jour elles ont été connectées à un transmetteur de pression piézoélectrique CTE 700 (Sensortech, Berlin, Allemagne) pour que la pression gazeuse dans les flacons soit enregistrée via un système d'acquisitions développé par le Service Electronique de l'UTC de Compiègne. Au début des manipulations, tous les capteurs étaient calibrés sur la pression atmosphérique  $P_{atm}$ . Puis le CO<sub>2</sub> produit par les bactéries propioniques a conduit à une augmentation de la pression  $\Delta P$  dans les fioles mesurées par les capteurs. La pression totale dans les flacons était donc  $P = \Delta P + P_{atm}$  et le nombre de moles de CO<sub>2</sub> produit par les PAB durant la cave chaude a pu être calculé selon la loi  $\Delta PV = \Delta nRT$ .

#### **4.8 Composition chimique des fromages**

Les demi tranches découpées durant l'affinage comme schématisé en Figure 24 et destinés aux tests chimiques ont été congelés à -20°C (l'autre moitié des tranches étant destinée aux tests rhéologiques, cf 2.5). Elles ont été emballées dans du papier alimentaire pour éviter la

dessiccation, dans du papier aluminium pour éviter l'oxydation et placées sous vide dans des sachets stockés à -20°C pour éviter toute dégradation biologique. Un seul envoi était effectué vers le site responsable des tests chimiques en fin d'affinage une fois que toutes les tranches étaient prélevées en congelées. Les demi-tranches étaient alors mixées et les tests chimiques suivants réalisés à l'aide des méthodes décrites dans le Tableau 11 :

- Détermination de la composition (EST, MG, Sel, pH)
- Détermination du métabolisme des PAB (acétique, propionique, lactique)
- Détermination de la matière azotée.

**Tableau 11 : Récapitulatif des méthodes d'analyses utilisées pour les dosages chimiques et les tests microbiologiques**

Laboratoire	Analyses	Méthodes d'analyses
Chimie	EST	NF EN ISO 5534-oct 2004
	pH	FD V04-035 - juil 2009
	MG	NF V04-287 - fév 2002 partie B
	NaCl	NF EN ISO 5943- janv 2007
	acides organiques	méthode interne HPLC Q7101562
	MAT	ISO 8968-3 2004 FIL20-3 - 2004
	MAS	
	NPN	
	NAPT	
Microbio	Propioniques	méthode interne Q7201431
	Butyriques	méthode interne Q7201200

A partir de la quantité d'acide acétique obtenue à l'issue de ces tests, un calcul indirect du CO<sub>2</sub> produit est possible par bilan de matière puisqu'il est équimolaire avec l'acétate. C'est une détermination complémentaire des mesures précédentes de respirométrie pour accéder aux bilans de matière du CO<sub>2</sub>.

## Valorisation de la thèse

Les travaux réalisés dans le cadre du présent projet de recherche ont fait l'objet d'une valorisation lors de congrès ou dans des revues à comités de lecture, répartis sur les trois années de thèse.

- Articles scientifiques

1. Huc D., Moulin G., Mariette F., Michon C. (Sous presse, publication prévue en 2013). Investigation of curd grains in Swiss-type cheese using light and confocal laser scanning microscopy. *International Dairy Journal*.
2. Musse M., Challoy S., Huc D., Quéllec S., Mariette F. (Soumis 04/2013). MRI method for investigating eye growth in Swiss-type cheese. *Food Engineering*.
3. Huc D., Mariette F., Michon C. (Soumis 07/2013). Rheological characterization of Swiss-type cheese using lubricated squeezing flow test. *International Dairy Journal*.
4. Huc D., Mariette F., Challoy S., Barreau J., Moulin G., Michon C. (Soumis 07/2013). Multi-scale investigation of eyes in Swiss-type cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies. Special issue "Food Microstructure"*.
5. Huc D., Challoy S., Monziol M., Michon C., Mariette F. (Soumission prévue avant fin 07/2013). Influence of gradients on the openings in Swiss-type cheeses. *International Dairy Journal*.
6. Huc D., Michon C., Challoy S., Roland N., Mariette F. (Soumission prévue avant fin 07/2013). Influence of salt content on eye growth in Swiss-type cheeses. *International Dairy Journal*.

- Congrès

1. Congrès annuel du Groupe Français de Rhéologie (GFR). Nancy, 19-21/10/2011. Conférence orale avec actes : Huc D., Bertollo L., Mariette F., Michon C. « Caractérisation des propriétés rhéologiques d'une pâte fromagère en extension biaxiale ».
2. International Symposium on Food Rheology and Structure (ISFRS). Zurich, 10-13/04/2012. Conférence orale sans actes : Huc D., Moulin G., Mottet J., Mariette F., Michon C. « Characterization of the resistance of a Swiss-type cheese as regards to its structure ».
3. International Conference on the applications of Magnetic Resonance in Food (MR in Food). Wageningen, 26-29/06/2012. Poster : Musse M., Challoy S., Huc D., Quéllec S., Mariette F. « Quantitative MRI method for individual eye growing kinetic in Swiss-type cheese ».
4. InsideFood Symposium. Leuven, 9-12/04/2013. Conférence orale avec actes : Huc D., Mariette F., Challoy S., Barreau J., Moulin G., Michon C. « Multi-scales investigation of eyes in Swiss-type cheese ».

## Table des figures

Figure 1 : Schématisation de la structure des fromages à différentes échelles

Figure 2 : Grains de caillé photographiés dans du Sbrinz. Gauche = axe horizontal ; Droite = axe vertical. D'après Rüegg & Moor, 1987

Figure 3 : Observation de bordure de grains de caillé dans l'Emmental affiné pendant 52j en microscopie confocale à balayage laser : protéines seules (C,E ) et matière grasse seule (D,F), d'après Lopez et al., 2007

Figure 4 : Propriétés thermiques de l'Emmental déterminées par intégration des courbes de profils de fusion obtenus par DSC (d'après Lopez et al., 2007)

Figure 5 : Différents états de la matière grasse dans les fromages de type Emmental

Figure 6 : Evolution de l'extrait sec total dans un Emmental en cours de fabrication : caillé, grains de caillé chauffé, avant pressage, après pressage, en sortie de saumure (P+1) et à 52 jours d'affinage (P+52). D'après Lopez et al., 2007

Figure 7 : Images MCBL d'Emmental (1) : A coagulation du lait, B après tranchage, C après pressage, D après saumurage, E,F affinage (d'après Lopez et al., 2007) ; Cantal affinés 4 mois (2) : A ,B,D centre et C sous croûte (d'après De Freitas et al., 2005) et Mozzarella (3) : A base lait de vache et B base lait de vache UF (d'après Hussain et al., 2012) – Matière grasse en rouge et Protéines en niveaux de gris ou vert.

Figure 8 : Solubilité du CO<sub>2</sub> dans différents matériaux à 22°C (\*Emulsion = Tampon phosphate + Caséine-LAB + Matière grasse), d'après Pauchard et al., 1980

Figure 9 : Quantité de CO<sub>2</sub> produite durant la cave chaude dans une meule d'Emmental de 75kg, d'après l'étude ITFF-ITG SS/1984/5/C

Figure 10 : Evolution du CO<sub>2</sub> entre fromage « semi-hard » et espace de tête dans deux cas : (A) concentration initiale en CO<sub>2</sub> dans le fromage nulle et (B) concentration initiale de 0,6L/kg. (m=0,2Kg), d'après Jakobsen et al., 2009

Figure 11 : Evolution de la solubilité du CO<sub>2</sub> dans l'eau en fonction de la température et de la teneur en sel, d'après Pauchard et al., 1980

Figure 12 : Courbe de compression contrainte=f(déformation) pour du Gouda affiné durant 1 semaine à 20°C ;  $\dot{\epsilon}_c = 0,028s^{-1}$  ; pH = 4,94 et teneur en eau 49,7% ou pH = 5,25 et teneur en eau 43,3% (d'après Visser et al., 1991)

Figure 13 : Gradient de CO<sub>2</sub> dans des meules d'Emmental selon la localisation des échantillons dans le plan horizontal avec prise en compte de la symétrie (exemple 1  $\equiv$  11) ou selon l'axe vertical, d'après Flückiger et al., 1980

Figure 14 : Récapitulatif des différents facteurs d'influence sur l'ouverture et de leur mode d'action issu de la bibliographie

Figure 15 : Organisation des techniques d'observation multi-échelles de la structure des fromages

Figure 16 : Coupes centrales dans des fromages de type PPNC (F1 et F2) en fin d'affinage espacées d'1 cm (n°43 et 53) et nombre d'yeux décomptés visuellement sur chaque coupe

Figure 17 : Schéma bilan des mécanismes impactant l'ouverture des fromages

Figure 18 : Augmentation du nombre total de bulles dans les fromages des fabrications B1 (◆) et B2 (X). Ligne verticale pointillés = changement de cave de 12 à 20°C

Figure 19 : (Gauche) Augmentation du volume de gaz dans les fromages des fabrications B1 (◆) et B2 (X) en cave chaude. Ligne pointillée verticale = changement de cave de 12 à 20°C. (Droite) Quantité de CO<sub>2</sub> produite en fin d'affinage en périphérie (gris) et à cœur (noir) des fromages.

Figure 20 : Schématisation du procédé de fabrication des fromages à pâte pressée non cuite

Figure 21 : Schématisation de l'organisation des éléments nécessaires aux acquisitions d'images IRM

Figure 22 : Création artificielle des tranches UR et C sur les images IRM et correspondance en correspondance avec les véritables tranches découpées pour les tests destructifs

Figure 23 : Comparaison du signal IRM émis par le film d'eau déposé à la surface des emballages des fromages

Figure 24 : Schéma de la découpe de tranches spécifiques et des échantillons de fromages

Figure 25 : Illustration du protocole de préparation des échantillons pour les tests de LSF

Figure 26 : Influence du temps d'équilibrage en température avant les tests rhéologiques sur le module d'Young obtenu par la méthode de LSF

Figure 27 : Courbe type de contrainte = f(déformation) suite à un test de LSF sur a) fromage en cours d'affinage et b) plaquette commerciale complètement affinée

Figure 28 : Schéma de la découpe de tranches fines pour l'observation en microscopie optique

Figure 29 : Résultats d'observations d'échantillons en MCBL marqués à sec ou sous forme liquide. Vert = protéines seules, Rouge = matière grasse seule, Jaune = colocalisation

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des méthodes d'observation de la microstructure des fromages dans la littérature

Tableau 2 : Récapitulatif des méthodes de dosage du CO<sub>2</sub> et de l'influence de divers paramètres physico-chimiques sur sa répartition dans les fromages. Code couleur : bleu=production de CO<sub>2</sub> ; rouge=CO<sub>2</sub> dans les yeux ; jaune=CO<sub>2</sub> dans la pâte (solubilité) ; vert=CO<sub>2</sub> dans l'espace de tête ; gris=solubilité dans l'eau ou la matière grasse pure

Tableau 3 : Répartition du CO<sub>2</sub> dans des fromages Emmental après 5mois d'affinage (Litres CO<sub>2</sub>), d'après Flückiger et al., 1980

Tableau 4 : Récapitulatif des tests rhéologiques réalisés aux grandes déformations sur des fromages à pâte dure et d'extension biaxiale de la littérature. Conditions expérimentales (V=vitesse de traverse,  $\dot{\epsilon}$ =vitesse de déformation) et indicateurs rhéologiques obtenus (E=mode d'Young,  $\sigma_{\text{fracture}}$ =contrainte à la fracture,  $\epsilon_{\text{fracture}}$ =déformation à la fracture).

Tableau 5 : Récapitulatif de l'influence de divers paramètres physico-chimiques sur la rhéologie des fromages. Code couleur : bleu=composition ; rouge=température ; vert=indicateurs de protéolyse ; jaune=anisotropie ; noir=temps d'affinage et violet=vitesse de déformation ; blanc=autre paramètre.

Tableau 6 : Récapitulatif des études et résultats mettant en évidence l'existence de gradients de paramètres physico-chimiques entre le cœur et la périphérie de fromages à pâte dure ou semi-dure au cours de différentes étapes du procédé de fabrication. Code couleur : bleu=composition ; rouge=température ; vert=indicateurs de protéolyse ; jaune=microbiologie ; et blanc=microstructure

Tableau 7 : Méthodes d'observation des ouvertures (yeux et défauts) dans la littérature

Tableau 8 : Synthèse des paramètres physico-chimiques pouvant influencer plusieurs phénomènes de l'affinage simultanément (d'après l'étude ITFF-ITG SS/1984/07.08/C)

Table 9: Comparison of shear-thinning behavior of several cheeses

Tableau 10 : Comparaison de la quantité finale de CO<sub>2</sub> produite mesurée par respirométrie, des dénombrements finaux de PAB et du taux de production de CO<sub>2</sub> en cave chaude pour 3 ratios Sel/Eau différents : 3,3%, 1 à 2,5% entre début et fin d'affinage et 0% (autres paramètres de composition chimique comparables)

Tableau 11 : Récapitulatif des méthodes d'analyses utilisées pour les dosages chimiques et les tests microbiologiques

## Table des abréviations

- PPNC = Pâte Pressée Non Cuite
- CF = Cave Froide (période d'affinage passée à 12°C)
- CC = Cave Chaude (période d'affinage passée à 20°C)
- PL = observation d'échantillons Parallèlement à l'axe de pressage des fromages
- PR = observation d'échantillons PeRpendiculairement à l'axe de pressage des fromages
- UR = tranche 1cm sous-croûte des fromages
- C = tranche centrale des fromages (4cm sous croûte)
  
- MCBL ou CLSM = Microscopie Confocale à Balayage Laser
- MEB ou SEM = Microscopie Electronique à Balayage
- IRM ou MRI = Imagerie à Résonance Magnétique
- 
- HFD = TEFD = Humidité sur Fromage Dégraissé ou Teneur en Eau sur Fromage Dégraissé
- LSF = Lubricated Squeezing Flow
- PAB = Propionic Acid Bacteria
- LAB = Lactic Acid Bacteria

# **Hierarchisation des facteurs contribuant à la croissance des bulles dans des fromages à pâte pressée non cuite par une approche multi-échelles**

## **Résumé**

L'objectif de la thèse était de déterminer les paramètres impactant la croissance des bulles dans des fromages à pâte pressée non cuite et de les hiérarchiser. Ce travail s'est appuyé sur la confrontation de données complémentaires telles que la composition, les propriétés rhéologiques, le métabolisme bactérien, la microstructure et l'ouverture des fromages. La plupart des méthodologies mises en place étaient originales, notamment l'imagerie 3D couplée à un traitement d'images permettant d'obtenir le nombre et le volume des yeux mais aussi leur localisation dans les fromages et leur cinétique individuelle de croissance. Or un fort gradient de taille et de cinétique de croissance a été mis en exergue entre le centre et la périphérie des fromages, avec des bulles moins nombreuses, plus petites et croissant moins vite en périphérie qu'à cœur. Plusieurs pistes ont été explorées pour expliquer ces disparités. La microstructure des deux zones n'ayant pas présenté de différence significative, les seuls paramètres en mesure de provoquer le gradient d'ouverture étaient la teneur en sel et les propriétés rhéologiques. En effet, la périphérie des fromages est plus salée et plus dure que le centre. La combinaison d'IRM et de respirométrie a permis de démontrer que le sel influence le gradient d'ouverture des fromages via la production de CO<sub>2</sub> en ralentissant la croissance et le métabolisme des bactéries et potentiellement via sa solubilité. La dureté plus élevée de la périphérie des fromages pourrait accentuer les écarts. Le facteur clef de contrôle du gradient d'ouverture dans les fromages type PPNC emballés serait donc le sel, bien que les étapes de procédé précédant l'affinage semblent également être un paramètre intéressant à étudier car elles déterminent l'état initial des fromages en entrée d'affinage.

## **Abstract**

The main objective of the PhD was to determine and prioritize the factors affecting the eye growth in semi-hard cheeses. To do so, a combination of protocols dedicated to the analysis of specific elements of cheese was developed: cheese composition, microstructure, and rheological properties, opening indicators and bacteria metabolism. Several methods were innovating, especially the 3D imaging techniques combined with an image processing allowing the determination of eye's number and volume but also their location in cheese and their individual specific growth during ripening. Therefore, a strong opening gradient could be identified between under-rind and core zones, with smaller and fewer eyes under-rind, which were growing slower than in the center. Several leads were investigated to explain these differences. The microstructure of the cheese matrix in these two zones did not present any significant difference, so the only parameters left that could cause the opening gradient were the salt content and the rheological properties. Indeed, the salt content and the firmness were higher under-rind than in the center of cheese. The combination of MRI and gas pressure measurement demonstrated that the salt content influences the eye growth gradient through the CO<sub>2</sub> production by slowing down the growth and metabolism of bacteria, and maybe also through its solubility in the cheese matrix. The higher firmness under-rind could increase the opening gradient. Therefore, the key factor to control the opening gradient in packaged semi-hard cheeses would be the salt content, even if the process steps occurring before ripening could also be interesting to study, as they set the initial state of cheeses entering ripening.