

EFAM — INFORMATION

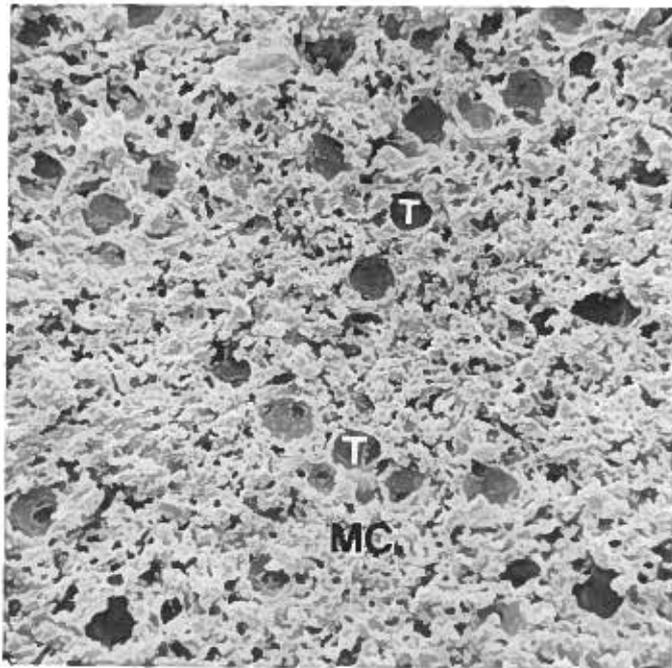
Juni 1979/83

Herausgegeben von der

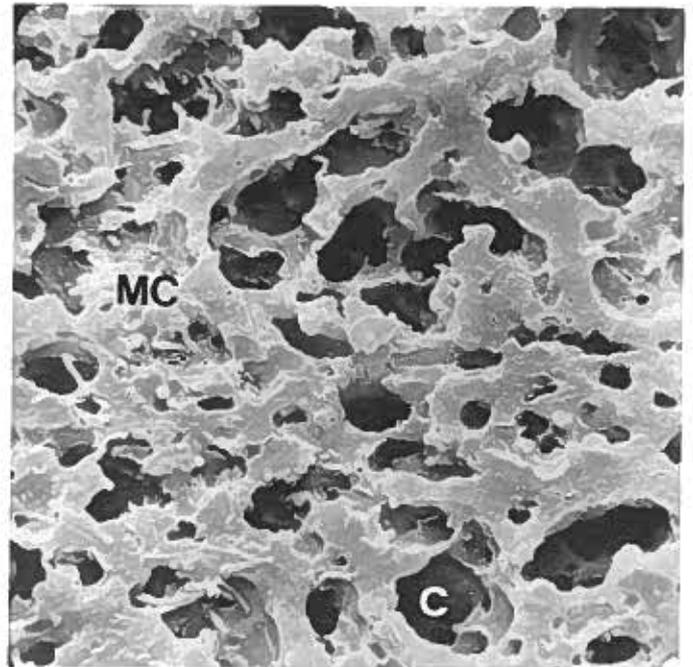
Eidgenössischen Forschungsanstalt für Milchwirtschaft

CH-3097 Liebefeld

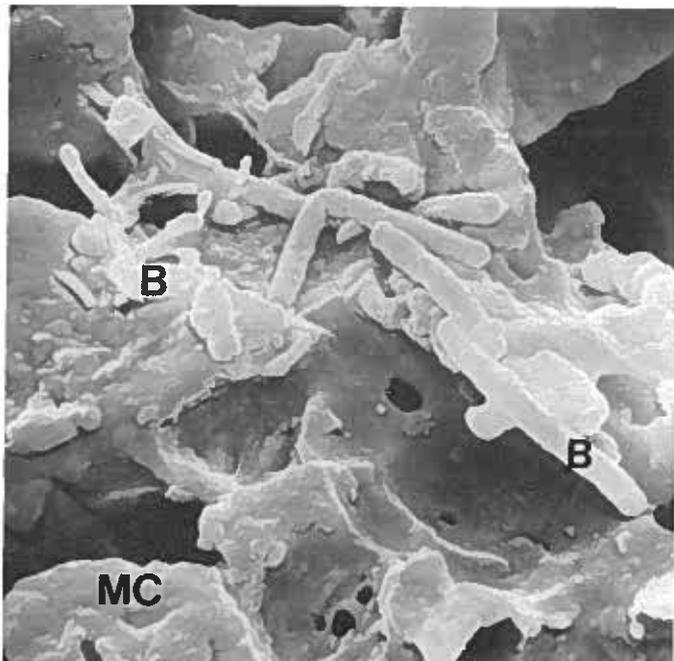
Direktor: Prof. Dr. B. Blanc



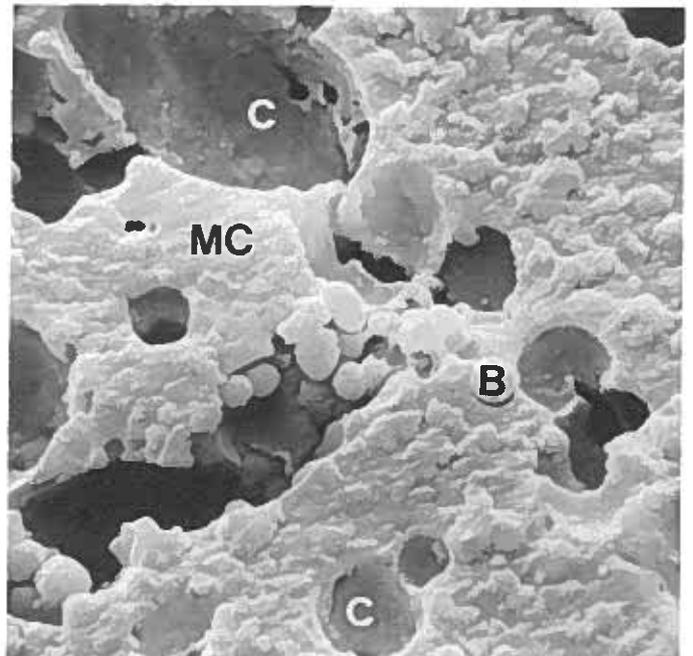
100 μm



20 μm



5 μm



5 μm

Photographies de microscopie électronique à balayage, typique du fromage d'Emmental dégraissé, sans fermentation secondaire. B: bactéries, C: caverne formée par le départ de globules gras, MC: matrice de caséine, T: trous d'environ 20 μm de diamètre probablement formés par un dégagement gazeux.

Essais comparatifs dans le fromage d'Emmental avec et sans fermentation secondaire

B. Blanc, M. Rüegg, A. Baer, M. Casey et A. Lukesch

Station fédérale de recherches laitières, CH-3097 Liebefeld

Sousmis le 15. 12. 1978

IV Comparaison biochimique et physico-chimique

Les résultats présentés ici, obtenus par des techniques différentes confirment l'opinion déjà émise (5, 9—12) que la fermentation secondaire dans le fromage d'Emmental est étroitement liée à la protéolyse. Il a été démontré, par électrophorèse, que la caséine alpha-s subissait une hydrolyse plus importante lors de la fermentation secondaire. Parallèlement, on a remarqué une augmentation des grands peptides. La chromatographie de partition a mis en évidence une hydrolyse des peptides d'un poids moléculaire d'environ 3 000, en plus petits peptides et en acides aminés. On a trouvé une activité de l'iminopeptidase augmentée pour les fromages à fermentation secondaire, ce qui explique l'augmentation des acides aminés libres. Ces résultats furent confirmés par les analyses physico-chimiques: diminution de l'activité en eau et augmentation de la sorption d'eau ainsi que du pouvoir tampon. Les images de la microscopie électronique ont montré la présence de cristaux, vraisemblablement de calcium-tyrosinate, indiquant une plus grande protéolyse dans le fromage à fermentation secondaire.

1. Introduction

Plusieurs travaux précédents ont montré l'importance de la protéolyse pour les fromages qui ont subi une fermentation secondaire (5, 9—12). Nous avons donc utilisé plusieurs méthodes, biochimiques et physico-chimiques, afin de mieux comprendre cette protéolyse. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide et la chromatographie de partition ont été utilisées pour séparer les différents produits de l'hydrolyse des caséines. Une nouvelle méthode enzymatique a été développée pour mesurer l'activité des enzymes protéolytiques. Pour confirmer les résultats obtenus, les méthodes physico-chimiques suivantes ont été appliquées: mesure de l'activité en eau et pouvoir d'adsorption d'eau par la pâte du fromage, ainsi que son pouvoir tampon et son acidité. Enfin, la texture des pâtes des fromages ayant subi ou non une fermentation secondaire a été comparée par l'analyse au microscope électronique à balayage. Toutes ces mesures ont été effectuées à double, sur 20 échantillons par mois durant une année.

2. Méthodes

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les échantillons ont été préparés à partir de fromage râpé, extraits trois fois à l'éther puis lyophilisés (5). Pour l'électrophorèse, 10 mg de la poudre obtenue ont été mis en solution dans 1,0 ml d'urée, 5 mol/l et incubés durant 15 min à 37 °C. Un volume de 20 μ l de cette solution a été déposé dans chaque tube contenant un gel de polyacrylamide de 6,0%. L'électrophorèse s'est déroulée à raison de 3mA par tube dans un tampon Tris-Glycine, pH 8,4, 0,005 mol/l, durant environ 80 minutes. Les gels ont été colorés par du noir amido et mesurés par un Intégraphe-CH (Bender + Hobein, Zürich).

Chromatographie

La chromatographie d'un extrait de fromage a été faite sur une colonne d'Ultragel AcA 54 pendant les huit premiers mois de l'expérience. Cependant, une comparaison statistique des résultats à ce moment-là a montré qu'en

utilisant ce gel aucune différence entre les deux lots de fromages n'était visible. Pendant les quatre derniers mois de l'expérience nous avons utilisé une colonne de Sephadex G-50. On a effectué une chromatographie sur gel d'un extrait de fromage (5) sur une colonne de Sephadex G-50 fin (2,5 cm \times 50 cm). On a d'abord homogénéisé 2,5 g d'extrait de fromage dans 20 ml d'H₂O contenant 0,3 g EDTA, 3 ml de NaOH à 1,0 mol/l, puis centrifugé à 12 000 \times g pendant 30 min à 20 °C. 0,250 ml du surnageant a été ensuite mis sur la colonne qui a été éluée avec un tampon phosphate, pH 7,1, 0,016 mol/l à 30 ml/h. On a contrôlé l'éluat de la colonne à 215 nm avec un spectrophotomètre (Hitachi 181). Le profil d'un fromage d'Emmental a donné en général 10 pics distincts. La surface totale sous le profil a été fixée à 100% et le pourcentage occupé par chaque pic a été calculé. Les résultats correspondent à la surface relative de chaque pic exprimée en % de la surface totale.

Détermination de l'activité de l'iminopeptidase

L'activité de l'iminopeptidase a été dosée dans un extrait par le citrate de fromage (1 g de fromage/20 ml 2% de citrate). La méthode est basée sur le taux d'hydrolyse d'un substrat non fluorescent qui, lors d'une hydrolyse, devient fluorescent. On utilise la L-Proline- β -naphthylamide pour doser l'activité de l'iminopeptidase. On ajoute 0,1 ml d'extrait de fromage à 5,0 ml de solution de substrat (10 mg de substrat/100 ml de tampon phosphate de potassium, pH 7,0, 0,05 mol/l) et on incube à 35 °C pendant 2 heures. Puis on ajoute 1 ml de cette solution à 2 ml de tampon borate de sodium, pH 10,0, 0,2 mol/l afin d'arrêter la réaction. Puis on lit la fluorescence relative sur un fluorimètre (Aminco-Bowman, Kontron AG, Zürich). Les blancs normaux ont été faits pour tous les échantillons. Les résultats s'expriment en unités de fluorescence relative. On standardise le fluorimètre chaque jour, à l'aide d'une solution de sulfate de quinine à 1 μ g/l.

Activité en eau

Les valeurs d'activité en eau a_w des fromages ont été mesurées à 25 °C au moyen d'un équipement NOVA-SINA modifié (7). L'étalonnage a été effectué mensuellement en recourant à des solutions d'acide sulfurique et à des

solutions salines saturées (3, 4). Dans le domaine des valeurs d' a_w comprises entre 0,90 et 0,98, la courbe d'éta-lonnage a été calculée par régression quadratique: $y = \alpha + \beta \cdot a_w + \gamma \cdot a_w^2$. Les valeurs numériques des coefficients α , β et γ de ce trinôme du second degré ont servi à calculer les valeurs d' a_w des fromages à partir du signal y , donné par le détecteur. Lors de tests de répétabilité sur des fromages d' a_w proche de 0,95, le coefficient de variation obtenu est voisin de 0,5%.

Adsorption de l'eau

La méthode de détermination de la teneur en eau à l'équilibre pour $a_w = 0,933$ à 25 °C (valeur d' a_w d'une solution de KNO_3 saturée) a déjà été décrite (7). Les conditions de mesures sont restées les mêmes que celles indiquées précédemment (7) à l'exception des quantités de fromage utilisées (soit 200—300 mg) et de la taille des flacons à peser (soit 4 cm de diamètre sur 4 cm de hauteur) dans lesquels les échantillons sont mis en équilibre avec l'humidité donnée par les solutions salines. Le coefficient de variation calculé pour les échantillons de fromage correspond approximativement à 3% de la quantité d'eau adsorbée.

Titrage de l'acidité

Pour les titrages de l'acidité, 5 g de fromage ont été homogénéisés dans 50 ml d'une solution aqueuse de KCl à 0,1 mol/l, puis titrés — après élimination de la matière grasse surnageante — jusqu'au pH de 9 avec une solution aqueuse de KOH à 0,1 mol/l à raison de 1 ml/min. Le pH de départ était celui de l'émulsion de fromage à titrer. Les courbes de titrage ont été enregistrées au moyen d'un équipement de titrage automatique (Potentiographe E 536 et Dosimat E 535 de Metrohm AG, Herisau). La mesure du pH a été effectuée au moyen d'une électrode de verre (Metrohm EA 109) et d'une électrode au calomel (Metrohm EA 410). Cette dernière a été mise en contact avec l'échantillon au moyen d'un pont KCl garni d'une fritte et d'un réservoir à KCl (Metrohm EA 931). La pente de la tangente aux courbes de titrage a été déterminée graphiquement au point de départ de ces dernières (pente «à l'origine»). A partir de cette pente a été calculé le «pouvoir tampon» de l'échantillon de fromage, défini comme la variation du pH du milieu par mmole de KOH ajoutée et par g d'extrait sec dégraissé.

Microscopie électronique

La méthode de préparation utilisée pour la microscopie électronique à balayage a déjà été décrite en détail (6). En ce qui concerne la microanalyse X par spectrométrie dispersive en énergie, effectuée dans le microscope électronique à balayage, les échantillons de fromage — une fois fixés par le mélange d'aldéhydes et deshydratés — n'ont pas été fixés au OsO_4 . Contrairement encore à la technique usuelle, les échantillons ont été ombrés au cuivre et non à l'or (les raies d'émission de l'osmium et de l'or masqueraient sinon un domaine spectral intéressant).

3. Résultats et discussion

Analyses par électrophorèses sur gel de polyacrylamide (Disc Electrophoresis)

L'application de la méthode de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAG-Electrophorèse) à l'analyse des fromages à pâte dure ayant subi ou non une fermentation secondaire n'a été publiée qu'une seule fois par STEFFEN et PUHAN (9). Cette méthode, qui sépare les

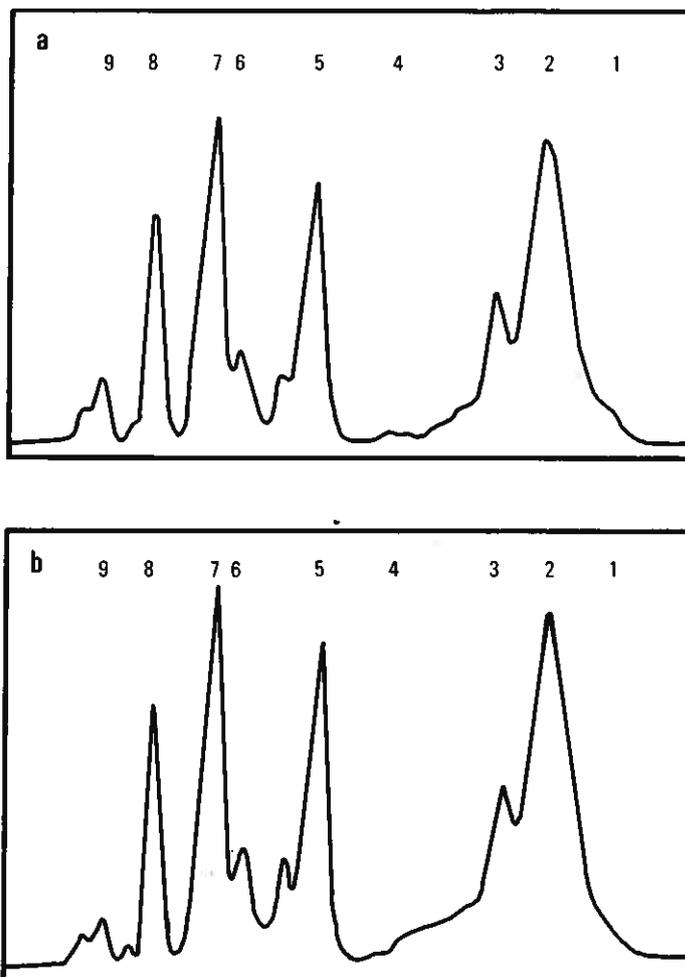


Fig. 1: Densitogramme obtenu par électrophorèse sur gel de polyacrylamide d'un fromage d'Emmental qui, (a), n'a pas subi une fermentation secondaire et qui, (b), a subi une telle fermentation.

divers composants protéiques à la fois en fonction de leur poids moléculaire et de leur charge électrique globale devrait permettre d'identifier la diminution de certains de ces composants qui auraient subi une hydrolyse. En effet, la rupture enzymatique d'une partie des ponts peptidiques d'une protéine produit une série de peptides que la PAG-Electrophorèse ne permet pas d'identifier à cause de leur faible poids moléculaire. Une comparaison des profils des électrophérogrammes obtenus avec des fromages avec ou sans fermentation secondaire devrait donc montrer des différences si l'on admet que la fermentation secondaire est, en partie, provoquée par une plus grande hydrolyse des protéines du fromage.

La figure 1 montre le profil d'un électrophérogramme obtenu avec un fromage ayant subi une fermentation secondaire, comparé à celui obtenu avec un fromage de qualité normale. L'électrophorèse s'est déroulée de gauche à droite. L'intégration de tout l'électrophérogramme a été ramenée à une valeur arbitraire de 100, chaque pic étant ainsi exprimé en pourcents relatifs. Pour simplifier la reconnaissance des différents pics, ceux-ci ont été numérotés de 1 à 9.

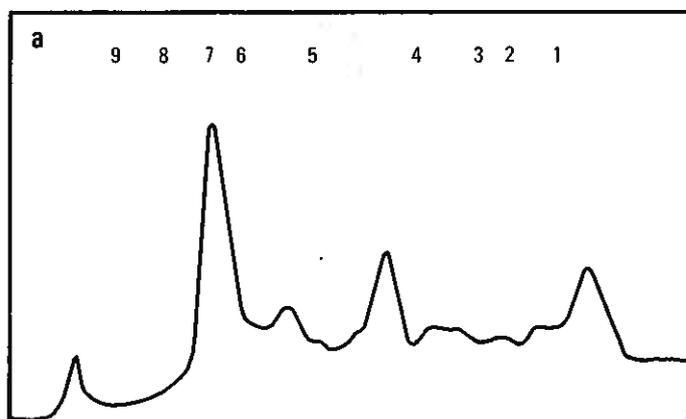
En considérant la figure 1, on ne remarque pas de différence frappante entre les deux profils. L'analyse statistique pourtant, basée sur 240 échantillons, a mis en évidence une diminution faible mais significative, du pic no 2, ainsi qu'une augmentation des pics no 7 et 8 (cf. tableau 1).

Tableau 1: Valeurs, en % relatifs, de la surface des pics obtenues par intégration des électrophérogrammes des fromages avec et sans fermentation secondaire (FS).

Pic no ¹	Valeur moyenne		Ecart-type		Probabilité d'erreur dans la comparaison ²	
	avec FS	sans FS	avec FS	sans FS	des fromages avec et sans FS	des essais mensuels
1		3,93		1,63	—	○
2	25,72	26,64	2,17	2,61	*	○
3		17,65		2,32	—	○
4		14,58		3,01	—	○
5		3,20		1,91	—	○
6		4,61		1,09	—	○
7	17,00	16,00	1,74	1,72	**	—
8	9,34	8,71	1,04	1,17	**	○
9		4,40		1,69	—	○

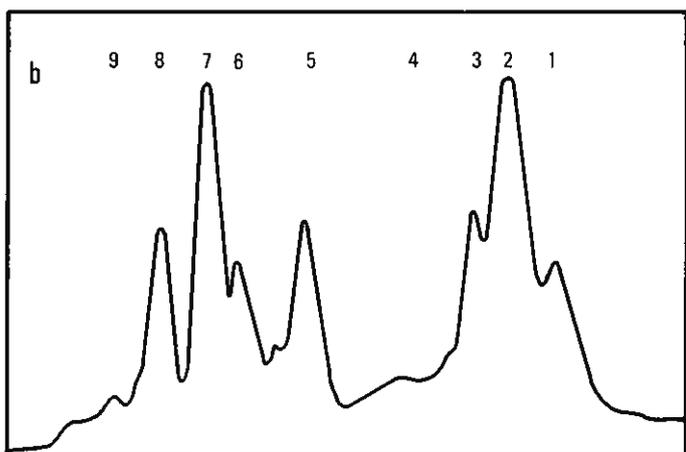
¹ la numérotation des pics correspond à celle des figures no 1 et 2

² **, *: $1\% \geq P \geq 0,1\%$. $5\% \geq P \geq 1\%$; ○: $P \leq 5\%$; —: non significatif ($P > 5\%$)



Le pic no 3 est une épaule du pic no 2, tous deux faisant partie, avec le pic no 1 de l'ensemble formé par la caséine alpha-s. On obtient facilement une diminution du pic no 2 «in vitro» si l'on ajoute une culture bactérienne (MK no 101) à du lait caillé par de la présure (cf. fig. 2). Il s'agit donc du résultat de l'action de protéases bactériennes provenant du lactobacille lactis probablement.

L'identification des pics no 7 et 8 est beaucoup plus complexe car on ne les trouve ni dans un électrophérogramme de l'ensemble des caséines, ni dans celui des protéines du lactosérum. Le pic no 7 correspond plus ou moins bien à celui de la caséine kappa, mais comme on ne peut plus identifier cette protéine dans un fromage puisqu'elle est le principal composant du lait à être hydrolysé par la présure, cette concordance n'est que fortuite.



Lors d'une autre série d'analyses, où nous avons suivi la maturation d'un fromage, nous avons constaté que les pics no 7 et 8 commençaient à apparaître après 1 à 2 mois seulement, et que leur importance croissait avec le temps. Il s'agit donc de produits de transformation de certaines protéines du fromage en cours de maturation. Ces produits ne sont pas solubles dans l'acide trichloro acétique (TCA) à 3% et il faut donc les considérer comme de très gros peptides résultant de l'action protéasique bactérienne, ou éventuellement comme des agrégats macromoléculaires de divers produits d'hydrolyse. Mais cette dernière hypothèse est peu probable, car de tels complexes devraient être solubles dans l'urée à 5 mol/l.

Les phénomènes observables par ces analyses électrophorétiques et qui seraient impliqués dans la fermentation secondaire, seraient dûs à des hydrolyses enzymatiques normales à tous les fromages, mais dont l'intensité serait plus grande lors de la fermentation secondaire.

Ces hydrolyses «intempestives» peuvent être provoquées par plusieurs facteurs, par exemple:

- Certaines souches de bactéries sont plus riches en protéases et en peptidases que d'autres.
- Une croissance plus rapide ou plus importante des bactéries, provoquant un métabolisme plus intense impliquant une augmentation de la biosynthèse des enzymes protéolytiques.
- Manque d'une inhibition de la croissance bactérienne en cours de maturation du fromage due, par exemple, à la concentration en sels.

En résumé, on constate qu'il y a une hydrolyse de la caséine alpha-s par des protéases faisant apparaître une augmentation relative des pics no 7 et 8. Les protéases incriminées attaquent vraisemblablement aussi d'autres caséines. Les produits de dégradation ainsi obtenus sont des macropeptides dont deux au moins sont de poids moléculaires assez grand pour qu'on puisse les identifier à ces deux pics.

Chromatographie

La figure 3 montre un profil typique d'extrait de fromage d'Emmental. Le pic I contenait des substances sortant dans le volume vide (V_0), c'est-à-dire ayant un poids moléculaire de plus de 30 000. Les pics (VIII, IX et X) contenaient des acides aminés libres et des petits peptides. Les résultats des expériences de la chromatographie sur gel confirment l'activité plus élevée de la peptidase. Seuls deux des pics sont différents de façon significative dans les 2 types de fromage. On a trouvé que le pic no VII était plus bas dans le fromage à fermentation secondaire, tandis que le pic no IX est plus haut (tableau no 2). Le pic no VII représente un groupe de peptides ayant un

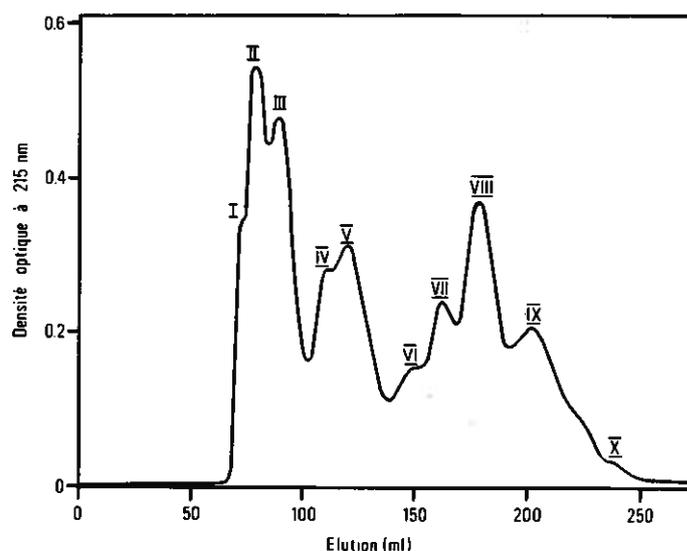


Fig. 3: Profil d'éluion d'un extrait de fromage d'Emmental obtenu par filtration sur gel Sephadex G-50. Le domaine de séparation s'étend d'un poids moléculaire de 1 500 à 30 000 environ. Les protéines des pics I et II, éluées dans le volume d'exclusion du gel, ont un poids moléculaire supérieur à 30 000. Les petits peptides et les acides aminés libres sont élués après le pic VIII.

poids moléculaire d'environ 3 000 et le pic no IX représente de petits peptides et des acides aminés libres. On peut donc voir que dans le fromage à fermentation secondaire, l'activité plus élevée de la peptidase entraîne une dégradation des peptides relativement grands en acides aminés et en peptides plus petits.

Tableau 2: Chromatographie sur gel des extraits de fromage d'Emmental avec et sans fermentation secondaire (FS)

Pic ¹	Valeur moyenne en %		Ecart-type		Probabilité d'erreur dans la comparaison ²	
	sans FS	avec FS	sans FS	avec FS	des fromages avec et sans FS	des essais mensuels
I		7,53		10,78	—	○
II		11,80		4,38	—	○
III		16,27		4,65	—	○
IV		7,73		3,64	—	○
V		13,62		4,55	—	○
VI		4,14		2,02	—	○
VII	9,95	4,06	6,06	3,91	***	○
VIII		19,03		4,65	—	○
IX	19,20	28,26	6,26	11,43	**	○
X		0,98		1,17	—	○

¹ la numérotation des pics correspond à celle de la figure 3

² ***, **: $P \leq 0,1\%$, $1\% \geq P \geq 0,1\%$; ○: $P \leq 5\%$; —: non significatif ($P > 5\%$)

Activité de l'iminopeptidase

Les fromages à fermentation secondaire présentaient un taux plus élevé d'activité de l'iminopeptidase que les fromages normaux. Dans les fromages normaux le taux d'activité de l'iminopeptidase était de $9,95 \pm 1,72$, tandis qu'il était de $11,35 \pm 1,92$ dans les fromages ayant une fermentation secondaire.

L'activité plus élevée de ces enzymes protéolytiques dans les fromages avec fermentation secondaire est donc en accord avec la protéolyse plus élevée trouvée dans ces fromages.

Etant donné qu'on a pu démontrer (1) que les bactéries propioniques (*Propionibacterium shermanii*) ont une activité iminopeptidasique importante et que les autres bactéries jouant un rôle dans la production de l'Emmental ont une activité de l'iminopeptidase très basse, il semblerait donc qu'il y ait une activité plus élevée de ces bactéries propioniques dans les fromages d'Emmental à fermentation secondaire. Ceci est en accord avec d'autres résultats décrits précédemment (par exemple un contenu d'acétate plus élevé dans le fromage à fermentation secondaire) mettant en évidence une activité plus élevée des bactéries propioniques dans le fromage à fermentation secondaire (11).

Tableau 3: Activité en eau, pouvoir de sorption de l'eau et titrage acido-basique des fromages d'Emmental avec et sans fermentation secondaire (FS).

Variable	Valeur moyenne		Ecart-type		Probabilité d'erreur dans la comparaison ¹		
	sans FS	avec FS	sans FS	avec FS	des fromages avec et sans FS	des essais mensuels	
Activité en eau (a_w)	0,972	0,968	0,007	0,008	***	○	
Sorption de l'eau à ² $a_w = 0,933$	% H ₂ O	25,5	28,5	2,9	3,2	***	○
«Pouvoir tampon» ³	$\frac{\text{pH}}{\text{g} \cdot \text{mmole}}$	3,26	3,36	0,46	0,40	*	○
Consommation de KOH ⁴ jusqu'à pH = 8,3	$\frac{\text{mmole}}{\text{g}}$	0,59		0,06		—	○
Consommation de KOH ⁴ jusqu'à pH = 9,0	$\frac{\text{mmole}}{\text{g}}$	0,85		0,11		—	○

¹ ***, *: $P \leq 0,1\%$, $1,0\% \leq P \leq 5,0\%$; ○: $P < 5\%$; —: non significatif ($P > 5\%$)

² Teneur en eau en équilibre à 25 °C et pour $a_w = 0,933$ (solution aqueuse saturée en KNO₃ [4])

³ Le «pouvoir tampon» correspond à la pente de la tangente à la courbe de titrage à l'origine de ce dernier, c'est-à-dire à la valeur initiale de la suspension de fromage (unité: nombre d'unité pH/g d'extrait sec dégraissé. mmole KOH)

⁴ mmole KOH/g d'extrait sec dégraissé

Etudes physico-chimiques

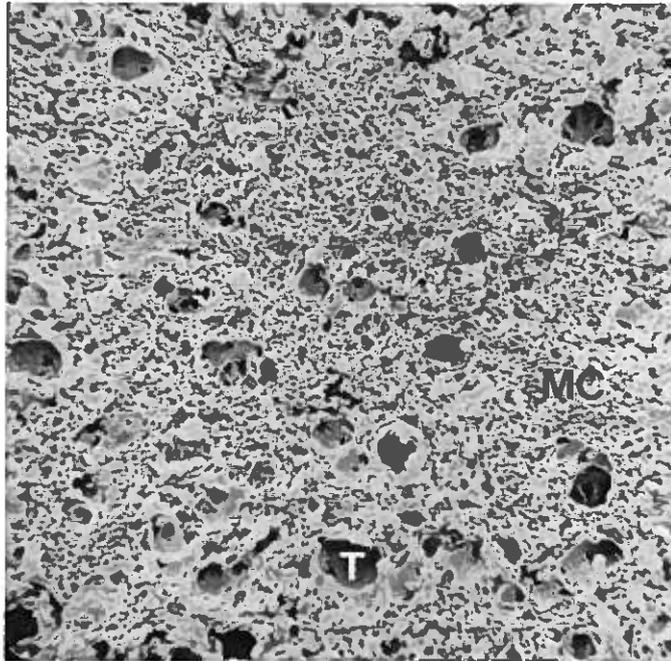
Le tableau 3 indique les résultats des déterminations de quelques grandeurs chimico-physiques étudiées dans les fromages avec et sans fermentation secondaire. On y remarque que les fromages avec fermentation secondaire présentent une activité en eau plus basse et, par conséquent, un pouvoir de sorption de l'eau plus élevé. Si l'on prend en considération les faits que d'une part l'activité en eau et le pouvoir de sorption de l'eau sont déterminés essentiellement par la concentration des composants à faible poids moléculaire (7, 8) et que d'autre part les fromages avec fermentation secondaire présentent une teneur en azote non protéique (NPN) significativement plus élevée que ceux à fermentation normale (12), on peut à nouveau faire correspondre les différences obtenues entre ces deux catégories de fromages avec leur degré de protéolyse. Une différence de teneur en NPN de 0,18% (calculé en extrait sec) (12) rend déjà compte d'une différence de 0,004 unités d'activité en eau a_w et d'une différence de 1,7% dans la sorption de l'eau. Les mesures de sorption s'avèrent donc particulièrement efficaces. La différence trouvée entre les moyennes des fromages avec

et sans fermentation secondaire s'élève à 12% (relatifs) alors que le coefficient de variation est de 3% (relatifs) au maximum.

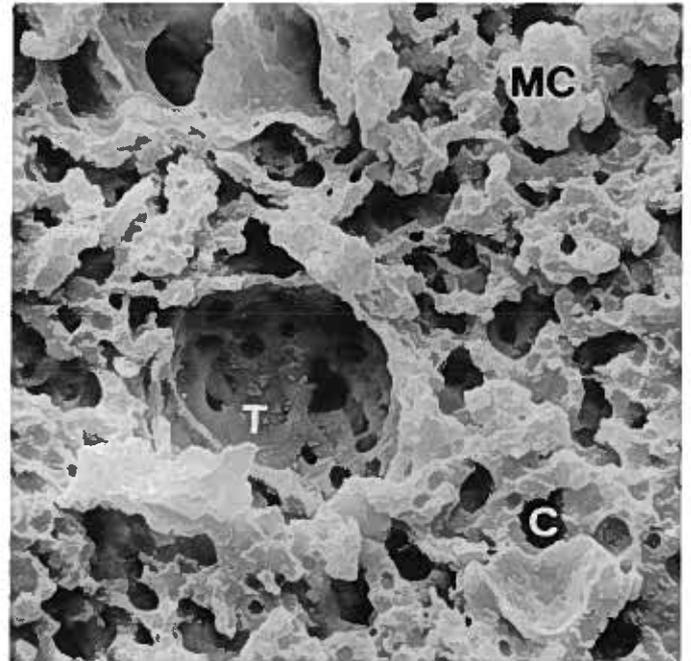
Les différences dans les quantités de KOH utilisées pour les titrages des fromages avec et sans fermentation secondaire jusqu'au pH de 8,3 — respectivement de 9,0 — n'ont pas présenté de différences significatives. Lorsque l'on commence le titrage d'une émulsion de fromage à partir du pH de ce dernier, la déprotonisation la plus importante est celle des groupes aminés. Les fromages à fermentation secondaire présentent un «pouvoir tampon» légèrement accru à condition toutefois de prendre en considération l'extrait sec dégraissé pour le calcul, ainsi que l'âge des échantillons pour la comparaison statistique. Le «pouvoir tampon» moyen du fromage se situe à $9,9 \pm 1,4$ unité de pH par g de fromage frais et par mmole de KOH.

Microscopie électronique à balayage

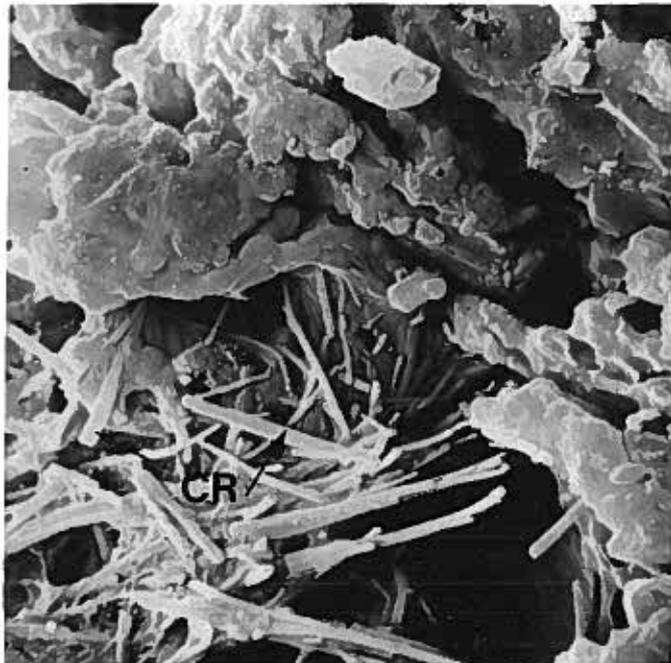
Les figures 4 et 5 montrent des images typiques de pâte de fromage dégraissé à divers grossissements. Aux faibles grossissements, on observe de petits trous de 20 μm



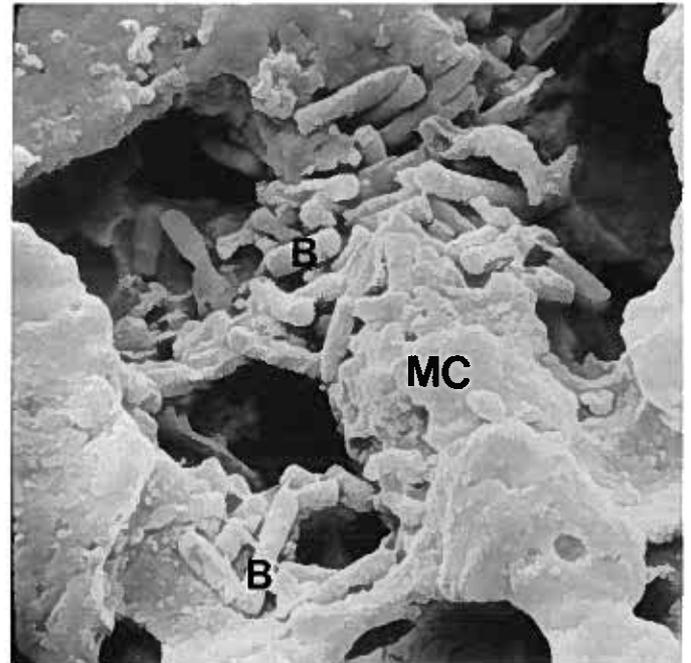
100 μm



20 μm



10 μm



5 μm

Fig. 5: Photographies de microscopie électronique à balayage, typique du fromage d'Emmental avec fermentation secondaire. B: bactéries, C: caverne formée par le départ de globules gras, CR: agrégats de cristaux en aiguilles (voir texte), MC: matrice de caséine, T: trous d'environ 20 μm de diamètre probablement formés par un dégagement gazeux.

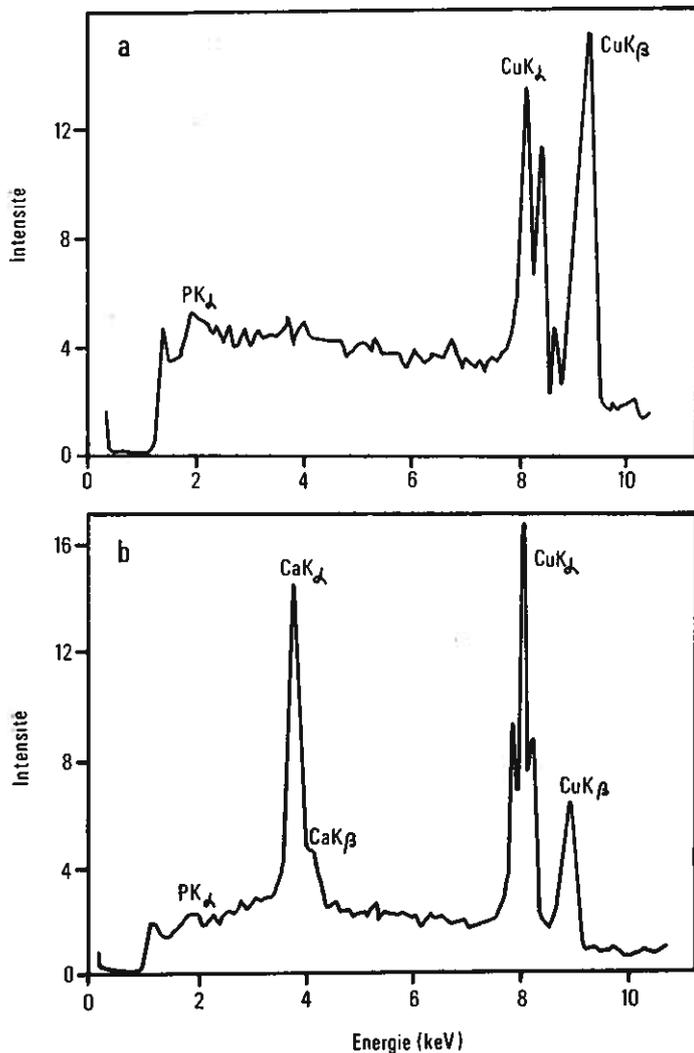


Fig. 6: Microanalyse X (spectrometre X dispersif en énergie des cristaux en forme d'aiguilles observés dans les fromages d'Emmental (cf. également la figure 5 et le texte). Les raies du cuivre proviennent du matériel d'ombrage). (a) Spectre de la matrice de caséine entourant les cristaux en aiguilles; (b) spectre des aiguilles proprement dites.

environ de diamètre moyen, caractéristiques de la pâte des fromages d'Emmental. Aux plus forts grossissements, on observe des colonies de microorganismes. Dans les préparations d'échantillons de fromage présentant une fermentation secondaire, on remarque un nombre plus élevé d'agrégats cristallins en forme d'aiguilles de 5 à 20 μ m de longueur. On suppose qu'il doit s'agir de dépôts cristallins qui pourraient constituer une première étape dans la formation de ce que l'on appelle communément les «points blancs» (2). Ces agrégats cristallins, qui apparaissent tout particulièrement dans les vieux fromages à pâte dure, se composent surtout de tyrosinate de calcium à cause de la très faible solubilité de ce sel dans l'eau. La figure 6 montre le résultat d'une microanalyse X de ces agglomérats d'aiguilles dans le microscope électronique à balayage. Les spectres obtenus suggèrent la présence de fortes concentrations de calcium. Comme on trouve sensiblement la même faible concentration de phosphore dans les cristaux et dans la matrice du fromage qui les entoure, on en déduit que ces cristaux ne sont pas formés de phosphates de calcium. Ces constatations amènent à penser que l'apparition plus fréquente de ces agrégats cristallins d'aiguilles est en rapport avec la protéolyse particulièrement avancée des fromages qui présen-

tent une fermentation secondaire. L'analyse de la teneur en acides aminés libres de ces derniers indique d'ailleurs une teneur en tyrosine significativement plus élevée (5). La répartition de ces cristaux pourrait expliquer les grandes variations de la concentration en tyrosine observée à différents endroits de la pâte du fromage (5).

Vergleichende Untersuchungen in Emmentalerkäsen mit und ohne Nachgärung

IV. Biochemischer und physikalisch-chemischer Vergleich

Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit angewandten biochemischen und physikalisch-chemischen Untersuchungsmethoden bestätigen die bereits in früheren Veröffentlichungen (5, 9—12) geäußerte Beobachtung, dass die Nachgärung im Emmentalerkäse in einem engen Zusammenhang mit dem Eiweissabbau steht. Mit Hilfe der Polyacrylamidgel-Elektrophorese konnte gezeigt werden, dass in Käsen mit Nachgärung α_S -Casein stärker hydrolysiert war als in Normalkäsen gleichen Alters. Es wurde ebenfalls beobachtet, dass grössere Peptide bei Nachgärung in grösserer Konzentration vorlagen. Mit Säulenchromatographie wurde festgestellt, dass im Falle von Nachgärung die Hydrolyse von Peptiden mit Molekulargewichten um 3 000 in kleinere Peptide und Aminosäuren ausgeprägter war. Die Aktivität der Imino-peptidase war im Falle von Nachgärung deutlich erhöht. Dies erklärt die grössere Konzentration freier Aminosäuren. Die Resultate der physikalisch-chemischen Untersuchungen bestätigen die erwähnten Befunde. Unter anderem wiesen Nachgärungskäse eine tiefere Wasseraktivität, ein höheres Wasser-Sorptionsvermögen und eine höhere Pufferkapazität auf. Bilder im Raster-Elektronenmikroskop zeigten ein vermehrtes Vorhandensein von submikroskopischen Nadelbüscheln, die wahrscheinlich aus Kalzium-Tyrosinat bestehen. Dies deutet wiederum auf die intensivere Proteolyse.

Comparative tests in Emmental cheese with and without late fermentation

IV. Biochemical and physico-chemical comparison

Summary

The various techniques used in this study confirm the ideas put forward in earlier reports (5, 9—12), that secondary fermentation in Emmental cheese is closely linked to proteolysis. It was found by means of electrophoresis that there was an increased breakdown of α_S -casein in cheese with secondary fermentation. It was also noted that there was an increase in the amount of large peptides in this cheese. Partition chromatography showed that there was an increased breakdown of peptides having a molecular weight of about 3,000 into smaller peptides and free amino acids. Imino-peptidase activity was found to be higher in cheeses with secondary fermentation thus explaining the increased amount of free amino acids. The increased breakdown of protein in cheese with secondary fermentation was also confirmed using physicochemical methods. There was a decrease in the water activity of the cheese as well as an increase in the water sorption. The buffering capacity was also found to be higher. Electron microscope studies indicated the presence of calcium tyrosinate crystals in cheese with secondary fermentation thus indicating a higher rate of proteolysis.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier Mlle U. Moor, M. M. Oroz et M. J. Gruskovnjak de leur précieuse collaboration aux mesures physico-chimiques et biochimiques. Leurs remerciements s'adressent également à M. le Prof. F. Allemann et à M. F. Zweifel (Institut de géologie de l'Université de Berne) qui ont aimablement mis à leur disposition le microscope électronique à balayage et qui leur ont aidé dans l'utilisation de ce dernier. Leurs remerciements vont enfin à M. P. Muster et à Mme C. Schenk (Laboratoire fédéral d'essai des matériaux, Dübendorf) pour leurs microanalyses X.

Références

- 1 CASEY, M. et BLANC, B. (publication en préparation)
- 2 FLUECKIGER, E. et SCHILT, P., *Milchwissenschaft* **18**, 437—442 (1963)
- 3 GAL, S. *Die Methodik der Wasserdampf-Sorptionsmessungen*, Springer, Berlin (1967)
- 4 GREENSPAN, L., *J. Res. Nat. Bureau Standards* **81A**, 89—100 (1977)
- 5 LAVANCHY, P., BUEHLMANN, C. et BLANC, B., *Schweiz. Milch. Forschung* **8**, 9—14 (1979)
- 6 RÜEGG, M., SIEBER, R. et BLANC, B., *Schweiz. Milch. Forschung* **3**, 1—5 (1974)
- 7 RÜEGG, M. et BLANC, B., *Milchwissenschaft* **32**, 193—202 (1977)
- 8 RÜEGG, M. et BLANC, B., *Water activity in cheese (Proceedings of the International Conference on the Properties of Water in Relation to Food Quality and Stability, Osaka, 1978; sous presse)*
- 9 STEFFEN, Chr. et PUHAN, Z., *Schweiz. Milch. Forschung* **5**, 1—4 (1976)
- 10 STEFFEN, Chr., *Schweiz. Milch. Forschung* **8**, 3—8 (1979)
- 11 STEFFEN, Chr., GLAETTLI, H. et NICK, B., *Schweiz. Milch. Forschung* **8**, 16—26 (1979)
- 12 STEIGER, G. et FLUECKIGER, E., *Schweiz. Milch. Forschung* **8**, 37 (1979)

ERRATUM

Die Fig. 4, die auf der Titelseite abgebildet ist, fehlt im Text !
Sie sollte unmittelbar neben der Fig. 5 stehen.

Fig. 4 which is on the title-page is missing in the text of this reprint. It should be next to Fig. 5 on page 8.

La figure 4, utilisée comme illustration sur la couverture du présent tiré à part, devrait se situer juste à côté de la figure 5, page 8.