



Institut National Agronomique Paris-Grignon

Ecole Doctorale ABIES

Unité Mixte de Recherche Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires

(INRA – INA P-G)

Thèse pour obtenir le grade de

Docteur de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon

Discipline : Sciences des Aliments

Présentée par

Mohamed Haythem RIAHI

Ingénieur en Bio-industries

MODÉLISATION DE PHÉNOMÈNES MICROBIOLOGIQUES,
BIOCHIMIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES INTERVENANT LORS DE
L'AFFINAGE D'UN FROMAGE DE TYPE PÂTE MOLLE CROÛTE LAVÉE

Soutenue le 19 Décembre 2006

Composition du jury :

Pr A. Amrane
Pr J. Scher

ENSCR, Rennes
ENSAIA, Nancy

Rapporteur
Rapporteur

Dr P-S. Mirade
Pr G. Corrieu
Dr C. Tréléa

INRA, Theix
INA Paris-Grignon
INA Paris-Grignon

Président du jury
Directeur de Thèse
Encadrant de Thèse

Remerciements

A Monsieur Georges Corrieu

Professeur consultant à l'Institut National Agronomique Paris-Grignon

Directeur de thèse

Recevez, Georges, mes plus sincères remerciements pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire et d'avoir encadré mon travail depuis le D.E.A et pendant ces années de thèse. Je tiens également à vous exprimer ma reconnaissance pour votre disponibilité, votre rigueur scientifique, et vos précieux conseils qui ont fait progresser ce travail. Les conseils que vous m'avez prodigués tout au long de la rédaction, ont toujours été clairs et succinets, me facilitant grandement la tâche et me permettant d'aboutir à la production de ce manuscrit. Votre intransigeance et votre franc-parler ont forgé mon caractère. Soyez assuré de ma sincère estime.

A Monsieur Pierre-Sylvain Mirade

Chargé de recherche à l'INRA de Theix

Président du jury

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de présider ce jury de Thèse. Soyez assuré de mon plus profond respect.

A Monsieur Abdeltif Amrane

Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes

Rapporteur

Je suis touché de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Veuillez accepter mes plus vifs remerciements pour votre présence dans ce jury et soyez assuré de tout mon respect et de ma profonde gratitude.

A Monsieur Joël Scher

Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et d'Industries Alimentaires de Nancy

Rapporteur

Mes remerciements les plus respectueux vont également à Monsieur Joël Scher qui m'a fait l'honneur de prendre connaissance de ce travail et d'en être le rapporteur. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur Cristian Tréléa

Maître de conférences à l'Institut National Agronomique Paris-Grignon
Encadrant de thèse

Les remerciements exprimés ici ne seront jamais à la hauteur de ton implication dans ce travail de thèse. Ce travail n'aurait jamais pu aboutir sans tes nombreux conseils, tu as toujours su me guider et me conseiller dans mes simulations. Je t'exprime toute ma reconnaissance pour ton aide, ton soutien sans faille, ta disponibilité et ta bonne humeur. Sois assuré, Cristian, de tout mon respect et de ma profonde gratitude. Tu es un enseignant et un être humain merveilleux. Je me considère choyé de t'avoir connu et je n'oublierais jamais ta formule pour calculer le temps nécessaire pour accomplir une tâche...

A Madame Marie-Noëlle Leclercq-Perlat

Chargé de recherche à l'INRA de Grignon

Je souhaite te faire part de toute ma gratitude, ton expertise au niveau de la flore de l'affinage et de la fabrication fromagère ont été d'un précieux recours pour mener à bien ce travail. Je te remercie également pour avoir bien voulu réviser le manuscrit de thèse.

A Monsieur Daniel Picque

Ingénieur de recherche classe exceptionnelle à l'INRA de Grignon

Je t'adresse ma sincère reconnaissance pour tes conseils et ta disponibilité. Tu as significativement contribué à la réalisation de ce travail, sois assuré de mon plus profond respect pour ta compétence.

A Monsieur Arnaud Hélias

Ingénieur de recherche à l'INRA de Grignon

Je t'exprime toute ma reconnaissance pour ton aide et tes conseils pertinents au niveau de la modélisation et de la programmation. Mais surtout, merci pour ton humanité et ton soutien aux moments les plus difficiles. Sois assuré, Arnaud, de mon profond respect et de mon amitié.

A Monsieur Claude Vermenot

Technicien de recherche à l'INRA de Grignon

Je tiens à vous exprimer ma sincère reconnaissance pour l'effort et l'ingéniosité dont vous avez fait preuve tout au long de cette thèse. Vous avez toujours su faire en sorte que les

enceintes de fabrication et d'affinage soient en bon état et qu'elles répondent à toutes nos suggestions et propositions. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Au service de cardiologie du CHU de Poissy

Je remercie tout particulièrement les médecins, infirmières et aides-soignantes du service de cardiologie du CHU de Poissy pour leur professionnalisme et leur bonne humeur. Qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour m'avoir permis de finir cette thèse en vie...

A Anne, Anne-Sophie, Benjamin, Clémentine, Fabrice, Fernanda, Jérôme, Laure, Mathieu, Pawinee, Samuel, Sophie M., Sophie C., Wang Yu

Merci pour tous les moments passés ensemble au travail et en dehors et pour le soutien que vous m'avez apporté tout au long de ma Thèse. Je vous exprime toute mon amitié.

A Chakib, Gisèle, Marie-José, Rana, Soulaf

Compagnons de joie, compagnons de galère, compagnons de succès, compagnons de doute merci pour tout, pour les éclats de rires comme pour les gueules de bois mais surtout pour les impérissables souvenirs des soirées torrides de Grignon aux rythmes de Vaya con dios...

A Naziha

Merci pour m'avoir toujours encouragé dans les moments les plus difficiles. Rien n'aurait été possible sans ta compréhension et ton amour. Tu as été ma "force motrice" pour travailler avec plus de courage et persévérance.

Au GMPA

Je ne terminerai pas mes remerciements sans avoir une pensée sympathique pour tous les gens de l'UMR GMPA, qui savent si bien rendre agréable le cadre de travail.

A mes parents Rawdha et Noureddine,

A mon beau père Moncef

A ma sœur Myriam,

A mon frère Belhassen,

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
BIBLIOGRAPHIE	5
I. La fabrication et l'affinage des fromages	5
A. Principes généraux de la technologie fromagère	5
B. La technologie fromagère des pâtes molles à croûte lavée type Munster	6
C. La microbiologie de l'affinage	7
1. La flore bactérienne	7
1.1 Les bactéries lactiques	7
1.2 Les bactéries de surface	9
2. Les levures	14
D. Voies métaboliques importantes pour l'affinage des fromages	17
1. Métabolisme du lactose et du lactate	18
2. Protéolyse et transformation des acides aminés	19
3. Lipolyse et transformation des acides gras	19
II. Les principaux facteurs influençant l'affinage	20
A. Facteurs internes	20
1. Le pH	20
2. L'activité de l'eau	22
3. La diffusion des solutés dans la matrice fromagère	26
B. Les facteurs externes	28
1. La température de l'enceinte d'affinage	28
2. L'humidité relative de l'enceinte d'affinage	29
3. La composition gazeuse de l'atmosphère de l'enceinte d'affinage	30
3.1 Effets sur la physiologie et la respiration des micro-organismes	30
3.2 Effet sur l'apparence des fromages	32
4. L'aération et la vitesse de l'air dans l'enceinte d'affinage	33

III. La modélisation	36
A. Introduction.....	36
B. Etat de l'art des modèles traitant de l'affinage des fromages.....	37
1. Les modèles empiriques	38
2. Les modèles mécanistiques	40
C. Méthodologie de construction des modèles mécanistiques	41
1. Définition du système à modéliser	41
2. Choix des variables et identification des phénomènes mis en jeu	41
3. Ecriture des équations du modèle.....	42
4. Ajustement des paramètres.....	44
5. Validation des résultats	47
MATÉRIELS ET MÉTHODES	51
I. La fabrication des fromages	51
A. L'enceinte de fabrication.....	51
B. Préparation des Laits	52
C. Préparation des levains.....	52
1. Le levain lactique	52
2. Le levain d'affinage.....	53
2.1 <i>Debaryomyces hansenii</i> (souche 304, UMR GMPA)	53
2.2 <i>Brevibacterium aurantiacum</i> (ATCC 9175)	54
D. Préparation de la présure et du chlorure de calcium	54
1. Préparation de la présure	54
2. Préparation du chlorure de calcium.....	55
E. Protocole de fabrication.....	55
1. La pasteurisation.....	55
2. Ensemencement du lait et ajout du chlorure de calcium	55
3. Emprésurage et raffermissement	56
4. Découpage du caillé et exsudation du lactosérum.....	56
5. Moulage et égouttage	56

6. Démoulage et salage.....	57
F. L'enceinte d'affinage	57
1. Description	57
2. Mesures et contrôles effectués pendant l'affinage.....	60
2.1 Mesure de l'humidité relative et de la température de l'enceinte	60
2.2 Mesure du poids d'un fromage en continu.....	61
G. Protocole d'affinage.....	61
1. Affinage dans l'enceinte.....	61
2. Affinage sous emballage	62
II. Analyses effectuées sur le lait et les fromages.....	62
A. Analyses réalisées sur le lait	62
1. Dosage des matières grasses sur le lait entier.....	62
2. Dénombrements microbiens sur le lait pasteurisé.....	62
B. Analyses réalisées sur les fromages	63
1. Préparation des suspensions fromagères	63
2. Détermination de la concentration en cellules viables	63
2.1 <i>Debaryomyces hansenii</i>	64
2.2 <i>Brevibacterium aurantiacum</i>	64
3. Analyses physico-chimiques	64
3.1 Mesure du taux de matière sèche.....	64
3.2 Détermination des concentrations en lactose et en lactates.....	65
3.2.1 La méthode HPLC.....	65
3.2.2 Préparation des échantillons.....	66
III. Conduite des essais et traitement des données	67
A. Plan d'expériences	67
B. Constitution de la base de données	68
C. Modélisation et ajustement des paramètres.....	68

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....	73
I. Modélisation de la croissance de <i>Debaryomyces hansenii</i> et de la consommation des substrats carbonés durant la désacidification et l'affinage d'un fromage de type pâte molle croûte lavée (modèle microbiologique).....	73
A. Résumé.....	73
B. <i>Publication n°1</i> : A model describing <i>Debaryomyces hansenii</i> growth and substrates consumption during a smear soft cheese deacidification and ripening	75
II. Modélisation de la perte de poids et de l'évolution de la matière sèche durant l'affinage d'un fromage de type pâte molle croûte lavée (modèle perte de poids)	107
A. Résumé.....	107
B. <i>Publication n°2</i> : Model for changes in weight and dry matter during the ripening of a smear soft cheese under controlled temperature and relative humidity.....	109
III. Modélisation de la perte de poids et de l'évolution de la matière sèche durant l'affinage d'un fromage à pâte molle et à croûte lavée en prenant en compte la croissance de <i>D. hansenii</i> et sa consommation des substrats carbonés (modèle généralisé).....	131
A. Introduction.....	131
B. Construction du modèle	132
1. Structure du modèle.....	132
2. Les hypothèses retenues	133
3. Les équations du modèle	133
3.1 Evolution de la concentration en <i>D. hansenii</i> au cours de l'affinage	133
3.2 Evolution de la concentration en lactose au cours de l'affinage.....	134
3.3 Evolution de la concentration en lactate au cours de l'affinage	135
3.4 Evolution de la teneur en matière sèche et de la perte de poids.....	135
3.4.1 La masse sèche	135
3.4.2 La masse humide	136
3.5 Effet de la température et de l'humidité relative.....	138
4. Les paramètres du modèle	139
C. Résultats et discussions	140
D. Conclusion	146

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	149
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	153
ANNEXE I	165
ANNEXE II	173
Valorisation des compétences : un nouveau chapitre de la thèse	177

INTRODUCTION

La France est l'un des seuls pays à avoir une aussi grande variété de fromages, aujourd'hui plus de 1000 sortes sont dénombrées, dont 42 bénéficiant d'une appellation d'origine contrôlée (A.O.C). La France est réputée comme étant le "pays du fromage", tant au niveau de la production que de la consommation.

Selon le Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (C.N.I.E.L, 2005), en 2004, la France se situe au second rang de la production mondiale de fromages (en volume), après les USA et au premier rang européen (1,80 million de tonnes de fromages soit 25 % de la production européenne). Pour la production de fromages à pâte molle, la France détient également la première place européenne, avec 473 000 tonnes, soit près de 60 % de la production européenne. Le chiffre d'affaire 2004 de l'industrie fromagère (hors fromages frais) s'élève à plus de 6,35 milliards d'Euro dont 2,1 milliards concernent les fromages à pâtes molles.

Les français sont les premiers amateurs de fromages, avec une consommation annuelle moyenne de 24,5 kg/habitant en 2004 (C.N.I.E.L, 2005). Parmi les fromages au lait de vache, la préférence des français va, en premier, aux fromages frais, puis, par ordre décroissant, aux fromages à pâte molle, aux fromages à pâte pressée cuite, aux fromages à pâte pressée non cuite et aux fromages à pâte persillée. Durant cette même année, les français ont consommé 179 800 tonnes de fromages à pâte molle.

Toujours en 2004, les exportations de fromages représentent environ 30,1 % de la production fromagère française (C.N.I.E.L, 2005). Les pays de l'union européenne sont les principaux destinataires de ces exportations (83,8 %). Les fromages à pâte molle, avec 151 239 tonnes, constituent la plus grande part des exportations fromagères françaises.

Pour conserver ce rang, et même l'améliorer, l'industrie fromagère française doit veiller au respect, à la fois, de normes d'hygiène de plus en plus strictes et de la qualité

organoleptique recherchée par les consommateurs. Pour satisfaire ces conditions, il est indispensable de maîtriser la matière première, mais également le processus de transformation du lait en fromage et notamment l'affinage qui constitue l'une des étapes clés du processus de fabrication. L'affinage résulte principalement de l'action de différents micro-organismes qui participent à la transformation du caillé en fromage. L'évolution et l'activité de cette flore sont très influencées par les conditions d'affinage (température, humidité relative et composition gazeuse des hâloirs).

Si un grand nombre d'analyses microbiologiques et biochimiques, ainsi que des mesures physiques et chimiques, sont aujourd'hui possibles, de nombreux verrous subsistent lorsqu'il s'agit de caractériser les produits alimentaires en cours de fabrication et les procédés de transformation correspondants. Ceci est particulièrement vrai lors du processus d'affinage, où les grandeurs biologiques et les cinétiques réactionnelles sont très difficiles à déterminer en temps réel, alors qu'elles conditionnent la qualité des fromages et la durée du procédé. L'un des moyens de contourner ces difficultés est la conception et la mise en place de méthodes de mesures indirectes basées sur le concept de "capteurs-logiciel". Il s'agit d'associer des mesures classiques, bien maîtrisées ou supposées telles, et des modèles mathématiques afin d'estimer et/ou de prédire des grandeurs clés, caractéristiques des produits et des procédés, qui ne peuvent être mesurées directement.

Ce travail de thèse s'inscrit dans cette démarche. Il a pour principal objectif de développer des modèles mathématiques capables de prédire, en fonction des conditions de température et d'humidité relative de l'atmosphère des hâloirs, l'évolution de la flore d'affinage, la consommation des substrats carbonés (lactose, lactate) ainsi que la perte de poids des fromages au cours de l'affinage.

Afin de constituer une base de données servant à la validation des modèles mathématiques, des fabrications de fromages modèles à pâte molle et à croûte lavée de type

Munster ont été réalisées à une échelle pilote. Ces fromages ont étéensemencés, en plus des bactéries lactiques, par une flore d'affinage composée d'une levure *Debaryomyces hansenii* et d'une bactérie *Brevibacterium aurantiacum*. L'affinage en hâloir pilote de ces fromages a duré 14 jours et a été conduit selon un plan d'expérience à 2 facteurs (température et humidité relative) et à 3 niveaux.

Pour réaliser ce travail de modélisation, il a été choisi d'adopter une approche mécanistique dynamique. Ceci nous permet non seulement de déterminer les grandeurs biologiques mais aussi les paramètres cinétiques et de transfert de matière du système. Trois modèles mathématiques ont été développés. Le premier modèle décrit la croissance de *Debaryomyces hansenii* et l'évolution des concentrations en lactose et en lactate pendant l'affinage des fromages. Le deuxième modèle décrit la perte de poids et l'évolution de la matière sèche des fromages. Le troisième est un modèle généralisé qui permet de prédire la perte de poids et l'évolution de la matière sèche des fromages pendant l'affinage en intégrant l'évolution de la flore d'affinage et des substrats.

Ce manuscrit est structuré en trois chapitres. Le premier chapitre est consacré à l'état des connaissances et comporte trois paragraphes. Dans le premier paragraphe, la fabrication et l'affinage des fromages à pâte molle et à croûte lavée sont présentés. Les principaux facteurs influençant l'affinage sont détaillés dans le deuxième paragraphe et les étapes de la construction d'un modèle mécanistique sont présentées dans le dernier paragraphe.

Le second chapitre du manuscrit présente les matériels et méthodes mis en œuvre dans le cadre de ce travail de thèse. La fabrication des fromages, le déroulement de leur affinage ainsi que les analyses microbiologiques, biochimiques et physico-chimiques sont détaillés. La conduite des essais et le traitement des données sont également présentés.

Les résultats des principaux travaux expérimentaux effectués au cours de cette thèse sont exposés dans le troisième chapitre du manuscrit. Celui-ci est composé de trois

paragraphe correspondants aux trois modèles développés au cours de ce travail. Les deux premiers paragraphes sont présentés sous forme d'articles, rédigés en anglais, acceptés pour publication, respectivement, par le *Journal of Dairy Science* et l'*International Dairy Journal*. Ces deux paragraphes sont précédés par un résumé en français. Le troisième et dernier paragraphe est rédigé en français.

BIBLIOGRAPHIE

I. La fabrication et l'affinage des fromages

A. Principes généraux de la technologie fromagère

Le fromage correspond à une véritable conserve alimentaire, obtenue grâce au jeu croisé de l'élimination plus au moins poussée de l'eau du lait et de la récupération des matières sèches. Selon Brûlé *et al.* (1997), la transformation du lait en fromage comporte trois étapes principales :

- la coagulation du lait qui correspond à des modifications physicochimiques des micelles de caséines sous l'action d'enzymes protéolytiques et (ou) de l'acide lactique, entraînant la formation d'un réseau protéique tridimensionnel appelé coagulum ou gel,
- l'égouttage du caillé qui assure une déshydratation partielle du gel, obtenu par séparation d'une partie du lactosérum,
- l'affinage qui se caractérise par des transformations biochimiques des constituants du caillé, essentiellement sous l'action d'enzymes microbiennes.

Dans la plupart des fabrications, entre l'égouttage et l'affinage, se situe l'opération de salage qui représente à la fois un complément d'égouttage et un facteur important de la maîtrise de l'affinage par action sur l'activité de l'eau.

Selon les paramètres mis en œuvre au niveau des différentes étapes de transformation du lait en fromage, une grande variété de produits peut être obtenue tel que traduit par Lenoir *et al.* (1985) à la **figure I.1**.

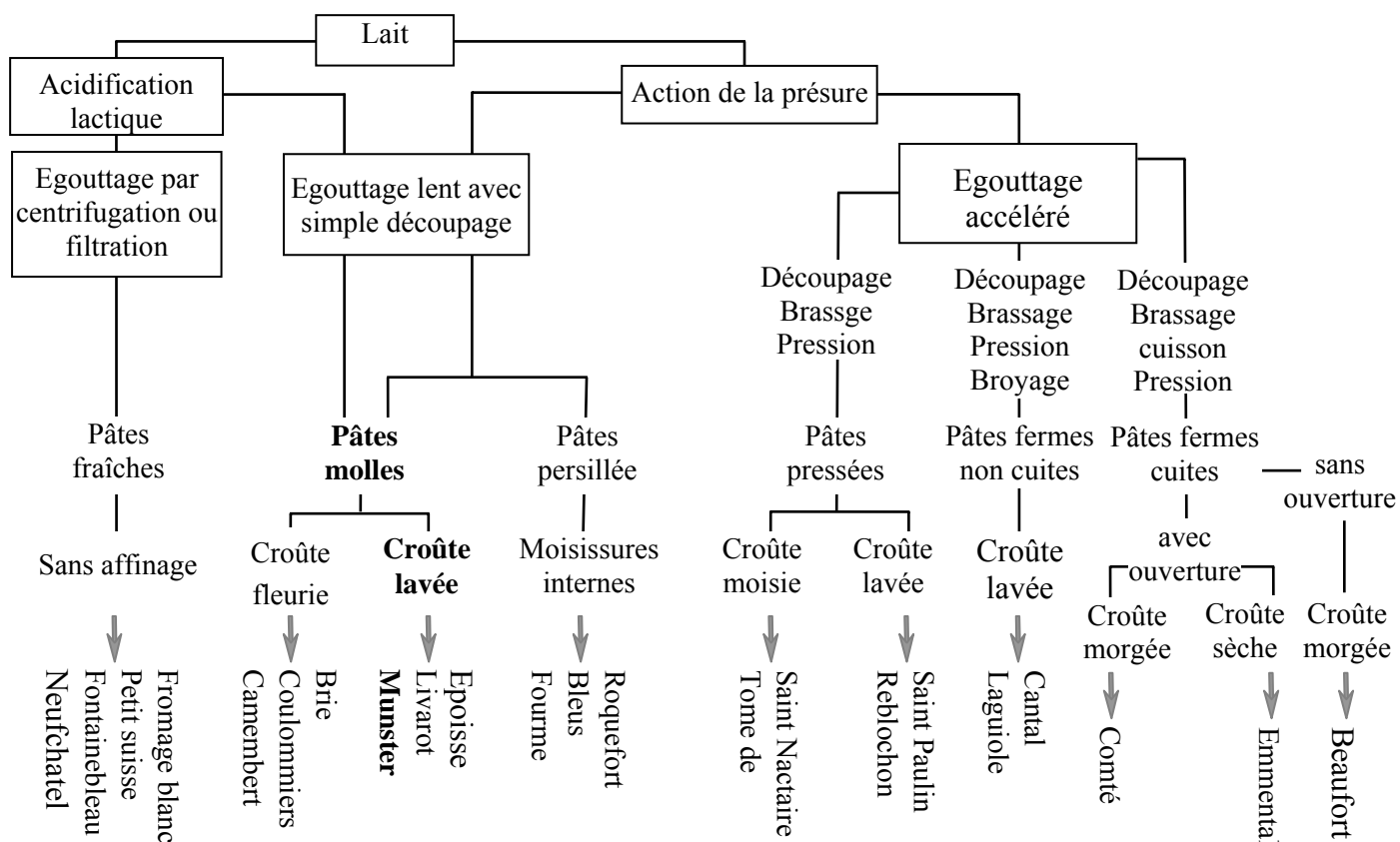


Figure I.1 : La diversité des fabrications fromagères (Lenoir *et al.*, 1985).

B. La technologie fromagère des pâtes molles à croûte lavée type Munster

Selon Ramet (1997), la fabrication des fromages à pâte molle et à croûte lavée se caractérise par une coagulation à caractère mixte mais à dominante enzymatique : elle est obtenue par l'action conjuguée de la voie acide (acidification lactique ou pré-maturation) et de la voie enzymatique (présure), mais avec la prédominance de cette dernière. Dans ce but, la concentration en enzymes coagulantes additionnées est assez élevée (30 mL/100 L de lait contre 18 à 22 mL/100 L pour le Camembert) et l'activité acidifiante est modérée. Le pH à l'emprésurage se situe entre 6,30 et 6,40.

Toujours selon cet auteur, l'égouttage des fromages de type Munster, se caractérise par une évacuation assez rapide du lactosérum, par une division plus forte du gel au tranchage, un brassage faible et discontinu, une acidification tardive et modérée. La pâte obtenue est plus

minéralisée, plus élastique et à plus forte cohésion que les fromages dont la coagulation est à dominante lactique comme le Camembert.

Il est à noter que, dans la pratique industrielle, le pH d'emprésurage ainsi que les concentrations d'ensemencement du Munster sont de plus en plus proches de ceux du Camembert (Leclercq-Perlat, communication personnelle).

C. La microbiologie de l'affinage

Cette partie se limite à l'étude des bactéries lactiques, des bactéries de surface et des levures. Les moisissures ne sont pas abordées puisqu'elles ne font pas partie de la flore d'affinage des fromages à pâte molle et à croûte lavée utilisées lors de cette étude.

La coagulation et l'égouttage conduisent à un caillé essentiellement composé de caséines, de matières grasses, de lactose et de lactate. Au cours de l'affinage, ces constituants sont transformés sous l'action d'enzymes présentes dans le caillé ou élaborées lors de la croissance des micro-organismes. Ces transformations sont complexes en raison de la nature des substrats, de la variété des agents d'affinage et de la diversité des modifications subies par le caillé (Choisy *et al.*, 1997a).

La maîtrise de l'affinage passe par une connaissance précise de l'évolution des principales caractéristiques microbiologiques, physico-chimiques et biochimiques de chaque type de fromages à différents stades de l'affinage.

1. La flore bactérienne

La flore bactérienne utile des fromages à pâte molle comprend deux grands groupes : les bactéries lactiques et les bactéries de surface (Choisy *et al.*, 1997b).

1.1 Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques utilisées dans l'industrie fromagère ont en commun une aptitude à produire de grandes quantités d'acide lactique à partir du lactose. Ce sont des

bactéries Gram+, immobiles, ne formant pas de spores, ne produisant pas de catalase et ne réduisant pas les nitrates. Elles sont anaérobies facultatives ou microaérophiles et, de ce fait, elles ne tolèrent que de très faibles concentrations d'oxygène (Cantéri, 1997). Lors de la fabrication des fromages, leur croissance et leur action acidifiante commencent dès leur ensemencement dans le lait. En général, leur concentration reste constante durant l'affinage dans le hâloir (Hassouna et Guizani, 1995; Lortal et Chapot-Chartier, 2005).

Il existe deux types de ferments lactiques : les ferments mésophiles, composés de bactéries dont la température optimale de croissance est proche de 30 °C et les ferments thermophiles, pour lesquels la température optimale se situe entre 37 et 43 °C. Les fromages fabriqués lors de cette étude sont obtenus par l'action de ferments lactiques mésophiles mixtes (homo et hétérofermentaires). Ceux-ci sont composés d'une association de *Lactococcus lactis* ssp *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* et de *Leuconostoc mesenteroides* ssp *mesenteroides*.

Les espèces du genre *Lactococcus* ont une morphologie en forme de coques souvent assemblées en chaînettes de longueur variable. Elles ont un métabolisme homofermentaire et produisent exclusivement de l'acide lactique L(+) à partir du lactose. Elles se caractérisent par une température optimale de croissance voisine de 30 °C, par leur thermosensibilité et leur inaptitude à croître à de fortes concentrations en sel (6,5 % de NaCl) et dans des milieux basiques (pH au delà de 9,6) (Dellaglio *et al.*, 1994).

Les *Leuconostoc* sont les seules bactéries en forme de coque à avoir un métabolisme hétérofermentaire ; à partir des hexoses elles produisent du dioxyde de carbone, de l'éthanol (ou de l'acide acétique) et de l'acide lactique D(-). Les cellules des *Leuconostoc* sont de forme lenticulaire ou sphérique, disposées par paires ou en chaînettes. Leur température optimale de croissance est comprise entre 25 et 30 °C (Dellaglio *et al.*, 1994). La sous-espèce *Ln.*

mesenteroides ssp *mesenteroides* n'acidifie le lait que très lentement, c'est pourquoi elle est toujours associée à des lactocoques acidifiants (Choisy *et al.*, 1997b).

La fonction principale des bactéries lactiques est de transformer le lactose en acide lactique. Cette activité acidifiante favorise l'égouttage du caillé et règle son degré de minéralisation ainsi que son pH (Cantéri, 1997). La flore lactique des fromages permet aussi de créer des conditions de milieu inhibant le développement de nombreux micro-organismes indésirables. Outre ces fonctions, les bactéries lactiques contribuent à l'affinage par leur activité protéolytique. Selon Law et Haandrikman (1997), de nombreuses enzymes protéolytiques sont intracellulaires, d'où l'importance de la lyse de ces bactéries lors de l'affinage des fromages (Dako *et al.*, 1995; Lortal et Chapot-Chartier, 2005). En dépit de la présence d'enzymes lipolytiques membranaires capables d'hydrolyser des acides gras libres, des tri, di et mono-acylglycérides (El Soda, 1993), les bactéries lactiques (en particulier les lactocoques) sont généralement considérées comme faiblement lipolytiques par comparaison avec des espèces comme *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Flavobacterium* (Fox *et al.*, 1993). Cependant, leur présence dans les fromages, à des concentrations élevées, et pendant des périodes plus au moins importantes, peut les amener à libérer des quantités non négligeables d'acides gras libres (Holland *et al.*, 2005). De plus, les bactéries lactiques produisent de petites quantités de molécules aromatiques (acétaldéhyde, acide acétique, éthanol, diacétyl), principalement à partir du lactose et/ou du citrate (Olson, 1990; Urbach, 1995).

1.2 Les bactéries de surface

Les bactéries dominantes à la surface des fromages sont Gram⁺ et appartiennent, en grande partie, aux groupes des staphylocoques et des bactéries corynéformes. Leur importance relative dépend du type de fromages (**Tableau I.1**).

Tableau I.1 : répartition et inventaire des bactéries halotolérantes, isolées de la surface de différents fromages

Fromages	Méthodes d'identification	Inventaire Staphylocoques et bactéries corynéformes	Auteurs (année)
Limburger, Romadur, Weinkäse, Munster, Harzer, Tilsit	Méthode phénotypique : 53 tests d'assimilation	41 % <i>Corynebacterium</i> : 36 <i>C. ammoniagenes</i> , 13 <i>C.sp.</i> , 13 <i>C. variabilis</i> , 24 % <i>Arthrobacter</i> : 24 <i>A. nicotianae</i> , 21 <i>A. sp.</i> , 1 <i>A. citreus</i> , 17 % <i>Brevibacterium</i> : 25 <i>B.linens</i> 10 % <i>Rhodococcus</i> : 15 <i>R. fascians</i> , 5 % <i>Microbacterium</i> : 5 <i>Mi. imperiale</i> , 2 <i>Mi. Sp.</i> , 1 <i>Mi. oxydans</i> 2 % <i>Cellulomonas</i> : <i>Ce. cellulans</i>	(Valdès-Stauber <i>et al.</i> , 1997)
Tilsit	Differenciation mic./staph Séquençage ARNr 16S	5-15 % <i>Staphylococcus</i> : 4 -11 % <i>S. equorum</i> , 0,5-2 % <i>S.saprophyticus</i> , 0,5-2 % <i>S.sciuri</i> 75-95 % bactéries corynéformes : 0-15 % <i>B. linens</i> , 75-95 % <i>coryneforms</i> / <i>Arthrobacter species</i>	(Bockelman <i>et al.</i> , 1997)
Gubbeen	Méthodes moléculaires : RAPD-PCR, PFGE	2,5 % <i>Staphylococcus species</i> (10 isolats) 97,5 % bactéries corynéformes (390 isolats) : 49 % <i>C.casei</i> , 25,5% <i>C.mooreparkense</i> , 12,5 % <i>Mi. Gubbeenense</i> , 1,25 % <i>C.flavescens</i> 9,25 % bactéries corynéformes non identifiées	(Brennan <i>et al.</i> , 2002)

S : *Staphylococcus* *B* : *Brevibacterium* *C* : *Corynebacterium* *A* : *Arthrobacter* *Mi* : *Microbacterium*
Cu. : *Curtobacterium* *R.* : *Rhodococcus* *sp.* : *species* *Ce* : *Cellulomonas*

La taxonomie de ces groupes, restée longtemps confuse, a été clarifiée par le développement des techniques de biologie moléculaire qui remettent en question les anciennes classifications uniquement basées sur des critères biochimiques et morphologiques. Ces deux groupes ne sont pas proches sur le plan phylogénétique, puisque les bactéries corynéformes sont reliées à la branche *Actinobacteria* (teneur en guanine et en cytosine supérieure à 50 %, "high G+C") alors que les staphylocoques appartiennent à la branche des *Firmicutes* (% GC compris entre 30 et 39 %, "low G+C") (**figure I.2**).

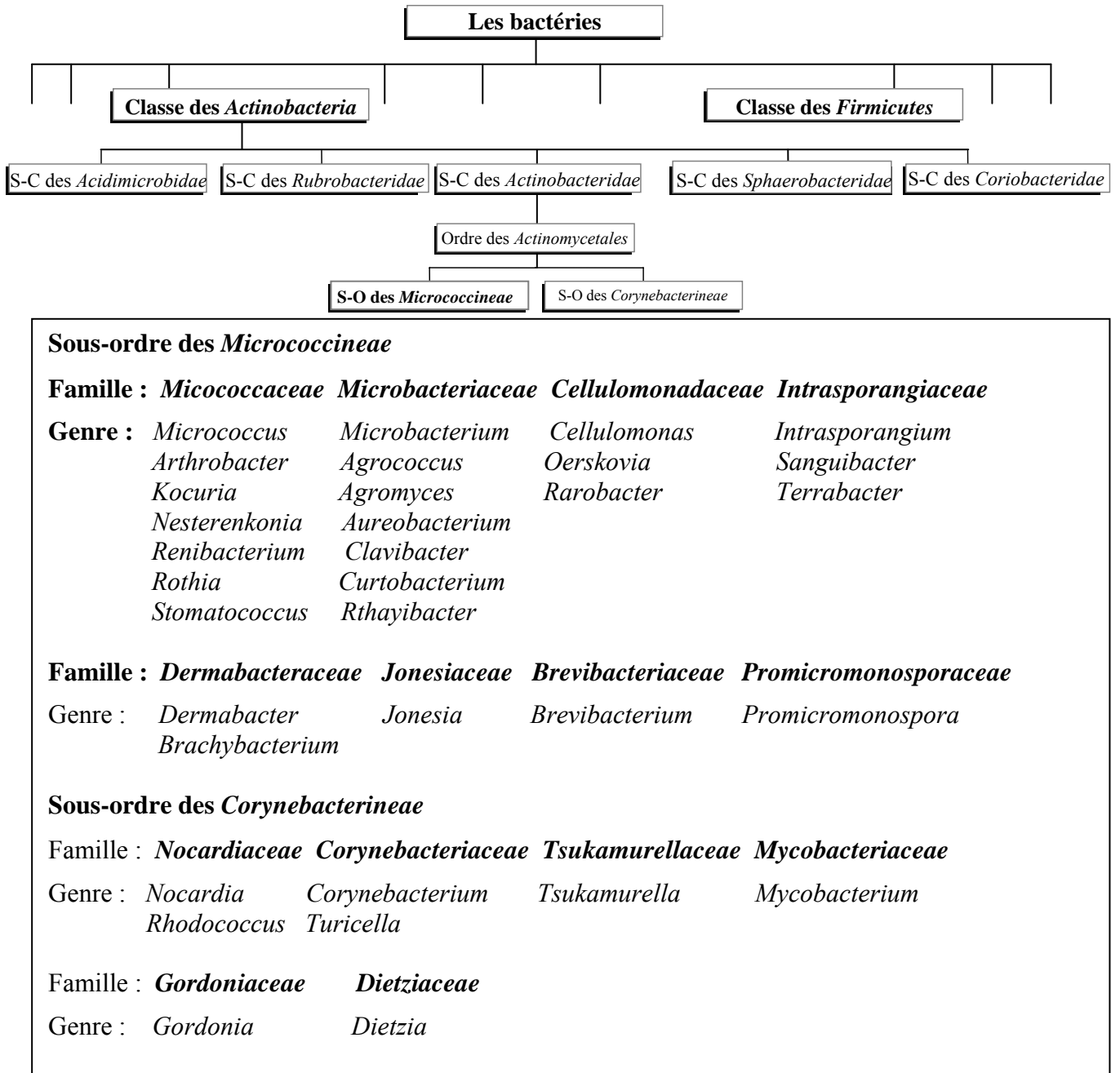


Figure I.2 : classification des bactéries corynéformes au sein de la classe *Actinobacteria*, basée sur l'analyse phylogénétique des séquences d'ADNr/ARNr 16S (adaptée de (Stackebrandt *et al.*, 1997)).

Les staphylocoques et les bactéries corynéformes possèdent en commun certains caractères physiologiques qui expliquent leur aptitude à s'implanter à la surface des fromages : elles sont le plus souvent aérobies, mésophiles, halotolérantes et acidosensibles, ne pouvant de ce fait se développer que dans une zone de pH proche de la neutralité (6 à 8,5).

Ces bactéries ont un rôle prédominant dans l'affinage des fromages. Sur environ 400 souches isolées du fromage, Bloës-Breton et Bergère (1994) montrent que la majorité des isolats bactériens donnent, en culture pure, des notes fromagères. En effet, les bactéries corynéformes sont connues pour avoir un fort potentiel pour la production de composés soufrés qui renforcent les caractères "fromager" et "affiné" d'un fromage (Cuer *et al.*, 1979; Rattray et Fox, 1999; Arfi *et al.*, 2003).

L'identification des souches d'origine fromagère reste encore problématique car les critères phénotypiques pris en compte pour les identifier se révèlent insuffisants. En effet, les souches fromagères ont la particularité de n'utiliser que très peu de sucres (Irlinger, 2000), aussi les galeries d'identification commercialisées basées principalement sur l'acidification de sucres (API Coryne, API Staph) donnent des identifications atypiques dans différentes bases de données. C'est pourquoi les travaux effectués sur l'écologie fromagère, il y a quelques années encore, se limitent à classer les souches, Gram+, catalase+ et en trois ou quatre groupes pigmentaires, (orange, jaune, blanc, translucide) (Richard et Zadi, 1983; Piton et Fontanier, 1990). Bockelman *et al.* (1997) puis Brennan *et al.* (2002) sont les seuls à avoir utilisé des outils moléculaires pour étudier l'écologie microbienne d'un fromage (**Tableau I.1**). Toutes ces études ont montré que les bactéries de surface présentent une diversité de genres et constituent une part importante, voire dominante, de la flore microbienne de divers types de fromages, comme le Munster (Valance, 1996), le Tilsit (Bockelman *et al.*, 1997), le Gubbeen (Brennan *et al.*, 2002). Cette flore appartiendrait aux genres *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Corynebacteriu* ou encore *Brachybacterium*. Il est probable que de nouvelles espèces soient décrites prochainement étant donné l'originalité phénotypique des souches fromagères et la faible homologie de séquences d'ADNr 16S avec les souches connues et référencées. Parmi ces bactéries, *Brevibacterium linens* est l'espèce la mieux connue.

Le genre *Brevibacterium* est l'unique genre de la famille des *Brevibacteriaceae*. Plus de 25 espèces différentes ont été décrites au sein du genre *Brevibacterium* mais seuls *B. avium*, *B. casei*, *B. epidermidis*, *B. iodinum*, *B. linens*, *B. luteolum*, *B. paucivorans* et *B. otitidis* semblent effectivement appartenir à ce genre. *B. linens* est l'espèce type du genre *Brevibacterium* (Ratray et Fox, 1999). Cependant, une étude de l'homologie ADN-ADN a révélé la présence d'une hétérogénéité au sein de cette espèce (Fiedler *et al.*, 1981). Quatre espèces différentes ont ainsi pu être décrites, dont *B. aurantiacum* est la plus représentée en surface des fromages (Gavrish *et al.*, 2004). La souche type décrivant cette nouvelle espèce est ATCC 9175, anciennement souche de référence de l'espèce *B. linens*. *B. aurantiacum* ATCC 9175 est la seule bactérie utilisée dans cette étude.

- Caractères morphologiques et croissance de *B. aurantiacum* ATCC 9175

B. aurantiacum est facile à identifier par sa couleur qui varie de jaune-orange à rose-pourpre, du fait de pigments caroténoïdes (Kohl *et al.*, 1983). C'est une bactérie polymorphe, se présentant sous forme de bâtonnets ou de coccoïdes, selon l'âge de la culture. Elle est aérobie stricte, acido-sensible et halotolérante (Piton et Fontanier, 1990). Sa sensibilité aux pH acides n'autorise sa croissance à la surface des fromages qu'en association avec des levures et/ou des moisissures (Lecocq *et al.*, 1996). Pendant les cinq premiers jours d'affinage du Munster, la population de *B. aurantiacum* se maintient en surface à la concentration d'ensemencement, soit 10^6 unités formant colonie/g de fromage sec (ufc/g FS). Suit une phase de croissance rapide avec un taux de croissance d'environ $0,85 \text{ jour}^{-1}$ (Bonaïti *et al.*, 2004) qui prend fin vers le 8^{ème} jour d'affinage. Au-delà de cette date, *B. aurantiacum* continue sa croissance avec une vitesse plus modérée pour atteindre une concentration voisine de 10^9 (ufc/gFS) au 42^{ème} jour d'affinage (Bonaïti *et al.*, 2004).

- Aptitude biochimique de *B. aurantiacum* ATCC 9175

La croissance de *B. aurantiacum* à la surface des fromages est à l'origine du développement de leur arôme, de leur texture et de leur couleur caractéristique (Boyaval et Desmazeaud, 1983). L'action des enzymes extracellulaires et membranaires de *B. aurantiacum* (protéases, aminopeptidases et estérases) sur la caséine et la matière grasse du lait conduit à la formation de molécules de petit poids moléculaire précurseurs de nombreux composés d'arôme (Ratray et Fox, 1999). De plus, selon Motta et Brandelli (2002), *B. aurantiacum* ATCC 9175 est capable de produire une bactériocine qui inhibe la croissance de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (souche pathogène) et de *Corynebacterium fimi* NCTC 7547 (considérée comme une bactérie d'altération pour les fromages à pâte molle).

Par sa production de pigments caroténoïdes, *B. aurantiacum* joue un rôle important dans la coloration et l'aspect de la croûte des fromages à croûte lavée. Cependant, l'intensité de cette coloration dépend de la levure de désacidification utilisée et de la concentration en bactéries (Masoud et Jakobsen, 2003; Leclercq-Perlat *et al.*, 2004b).

2. Les levures

Par leur caractère ubiquitaire, les levures se retrouvent présentes à la fois dans le lait et dans les fromages. Elles appartiennent à la flore banale du lait cru avec des teneurs moyennes de 10^4 ufc/mL (Baroiller et Schmidt, 1990). L'étude de la composition de quelques fromages à pâte molle souligne l'importance et la diversité des espèces présentes dans ces produits. Dans les fromages bleus et le camembert, *Debaryomyces hansenii*, *Candida catenulata*, *C. lipolytica*, *C. kefir*, *C. intermedia*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus albidus*, *Kluyveromyces lactis* et *K. marxianus* sont fréquemment observées (Roostita et Fleet, 1996). Cependant, une étude récente, (Viljoen *et al.*, 2003) portant sur le Camembert et le Brie, a montré que la flore fongique de ces fromages varie selon les saisons. En effet, 20 espèces

appartenant à 10 genres différents ont été isolées pendant l'hiver alors que, pendant l'été, seulement 7 espèces appartenant à 6 genres l'ont été.

Dans le cas des fromages à pâte molle et à croûte fleurie, de nombreux travaux soulignent l'importance de *K. lactis* et de *K. marxianus* dans l'affinage. En effet, ces espèces sont typiquement des levures fromagères, isolées de très nombreux types de fromages (Ashenafi, 1989; Besancon *et al.*, 1992; Eliskases-Lechner et Ginzinger, 1995; Rosso *et al.*, 1996; van den Tempel et Jakobsen, 1998; Fadda *et al.*, 2001). Pour les fromages à pâte molle et à croûte lavée, l'espèce majoritaire est *Debaryomyces hansenii* (Bockelmann *et al.*, 1997; Bockelmann *et al.*, 2005).

Ainsi, selon Choisy *et al.* (1997b), la flore levurienne dominante de la plupart des fromages est constituée d'espèces du genre *Kluyveromyces* et/ou de *Debaryomyces* et de leurs formes imparfaites. A côté de cette flore dominante, cohabitent des souches appartenant essentiellement aux genres *Geotrichum* et *Saccharomyces*.

Dans la fabrication d'un fromage, l'action des levures commence dès les premières heures de l'égouttage et se poursuit pendant tout l'affinage (Guéguen, 1995; Jacobsen et Poulsen, 1995; Leclercq-Perlat *et al.*, 1999; Leclercq-Perlat *et al.*, 2004a). Elle consiste à transformer le lactose en alcools, en dioxyde de carbone et en eau mais également à métaboliser le lactate issu de la dégradation du lactose par les bactéries lactiques. De ce fait, les levures sont les principaux agents contribuant à la remontée du pH lors des quatre à cinq premiers jours d'affinage. Cette désacidification progressive de la surface des fromages par les levures est un phénomène fondamental. En effet, elle permet l'installation et le développement des bactéries acido-sensibles (Lenoir *et al.*, 1985; Guéguen et Schmidt, 1992). Ainsi, l'implantation précoce de *B. auranticum* ou de la flore corynéforme est favorisée par la croissance de *G. candidum* (Lecocq *et al.*, 1996) ou de *D. hansenii* (Eliskases-Lechner et Ginzinger, 1995). D'autre part, la désacidification de la pâte contribue aux modifications de la

texture (Vassal *et al.*, 1986), à l'accroissement des activités enzymatiques (Lenoir *et al.*, 1985) et à la répartition des minéraux dans le fromage (Le Graët *et al.*, 1986). Lors des fabrications fromagères, les levures peuvent également avoir un pouvoir d'inhibition sur des flores microbiennes indésirables comme les *Clostridia*, agents du gonflement tardif, ou les *Mucor*, responsables de l'accident du "poil de chat" (Bergère et Lenoir, 1997). Elles agissent aussi comme un agent naturel anti-fongique et anti-bactérien contre la flore pathogène (Corsetti *et al.*, 2001).

En plus de leur activité désacidifiante et de leur potentiel antimicrobien, les levures sont dotées d'activités enzymatiques variées qui leur permettent de contribuer à l'affinage et au développement de la flaveur. Dans ce qui suit, l'aptitude biochimique et le rôle dans l'affinage de *Debaryomyces hansenii*, seule levure à avoir été utilisée dans ce travail, seront détaillés.

L'espèce *D. hansenii* est aérobic stricte et seules quelques souches sont capables de fermenter certains sucres tels que le D-glucose, le maltose et le saccharose (Barnett *et al.*, 1990). En revanche, en aérobiose, elle assimile de nombreux sucres par la voie métabolique de la glycolyse et du cycle de Krebs, et en particulier, le lactose. *D. hansenii* utilise également, comme la plupart des levures, le citrate comme source de carbone, ainsi que les acides aminés (Botton, 1991). Cette levure présente la particularité de consommer le lactose et le lactate en même temps, mais avec des vitesses de consommation différentes (Soulignac, 1995). *D. hansenii*, avec sa forme anasporogène, et *Kluyveromyces lactis* font partie d'un groupe de levures qui désacidifie le plus rapidement le milieu de culture. Leclercq-Perlat *et al.* (1999) ont montré une corrélation statistiquement significative existant entre la consommation du lactate et la remontée de pH.

L'activité lipasique de *D. hansenii* est très faible et seules quelques souches consomment le glycérol (Soulignac, 1995). Au niveau de la production de composés d'arôme,

les souches de *D. hansenii* étudiées par Soullignac (1995), présentent des notes aromatiques "sulfurées/alliacées".

Lors des 24 premières heures de la fabrication fromagère, la température des salles, en particulier durant l'égouttage, est comprise entre 25 et 30 °C, température optimale de croissance de *D. hansenii*. Ceci explique qu'un développement exponentiel de la levure est alors observé, avec un temps de génération d'environ 5 heures (Leclercq-Perlat *et al.*, 1999). Par la suite, intervient un ralentissement de la croissance de *D. hansenii* (temps de génération d'environ 94 heures) qui correspond à l'effet de la température de l'affinage (≈ 12 °C) (Leclercq-Perlat *et al.*, 1999). Sorensen et Jakobsen (1997), en étudiant l'influence des variations de température, de la concentration NaCl et du pH sur la croissance de *D. hansenii*, montrent que quelques souches sont encore capables de pousser à des concentrations en NaCl de l'ordre de 12 % et que l'augmentation de la température jusqu'à la valeur de croissance optimale de la levure (25 à 30 °C) augmente le taux de croissance. Cette levure est également capable de croître à des pH voisins de 4. Barnett *et al.* (1990) ont élargi le champ d'étude en indiquant que les conditions de croissance optimales sont observées pour des températures comprises entre 25 et 30°C, des pH variant de 5,5 à 6,5 et à des hygrométries supérieures à 80 %.

En conclusion, *Debaryomyces hansenii* a un rôle complexe et significatif dans l'affinage des fromages. Son évolution est fonction du type de produit, de la composition de la flore, de celle de la pâte, du procédé de fabrication et des conditions d'affinage.

D. Voies métaboliques importantes pour l'affinage des fromages

L'évolution des principaux paramètres physico-chimiques relatifs à l'affinage des fromages à pâtes molles ont fait l'objet de nombreuses études (Lenoir *et al.*, 1985; Vassal *et al.*, 1986; Hassouna et Guizani, 1995; Choisy *et al.*, 1997a; McSweeney, 2004). Les évolutions observées diffèrent entre la surface et l'intérieur du fromage. Plusieurs types de

réactions concernent, simultanément ou successivement, les trois principaux constituants du caillé : les sucres (principalement le lactose et le lactate), les protéines et la matière grasse, ainsi que leurs produits de dégradation.

1. Métabolisme du lactose et du lactate

La quantité de lactose restant dans le fromage au début de l'affinage dépend des modalités de la coagulation et de l'égouttage. Ceci est notamment due à l'activité des levains lactiques, au lavage ou non des grains de caillé, au degré d'égouttage et aux conditions de salage (Choisy *et al.*, 1997a). Le lactose est donc métabolisé, très tôt lors des fabrications fromagères, en D- et L-lactate principalement par les bactéries lactiques (Mc Sweeney, 2004). Comme le décrivent Leclercq-Perlat *et al.* (2004a) dans le cas du Camembert, en surface, le lactose est consommé rapidement, durant les 8 premiers jours, avec une vitesse de l'ordre de $0,8 \pm 0,2$ mmol/kg de fromage sec par jour. Au cœur, la concentration en lactose est un peu plus importante et il est métabolisé plus lentement. Ce composé ne disparaît entièrement que vers le 15^{ème} jour d'affinage. Cette disparition peut être attribuée à l'action des bactéries lactiques, mais aussi à celle des levures capables de consommer le lactose à la surface des fromages (Soulignac, 1995).

L'acide lactique, présent essentiellement sous forme de lactate, est lui-même métabolisé selon plusieurs voies (Mc Sweeney, 2004). Dans le Munster, il est principalement métabolisé par les levures pour donner de l'eau et du dioxyde de carbone. La concentration en lactate augmente rapidement durant les 6 premiers jours d'affinage au cœur et à la surface du fromage. Selon Leclercq-Perlat *et al.* (2004a), cette concentration augmente avec une vitesse moyenne de l'ordre de $16 \pm 0,3$ mmol/kg.jour. Selon ces mêmes auteurs, après le 6^{ème} jour, la concentration en lactate à la surface décroît avec une vitesse moyenne de l'ordre de $12,5 \pm 0,5$ mmol/kg.jour jusqu'au 25 ou 27^{ème} jour, puis avec une vitesse moyenne de l'ordre de $3,7 \pm 0,05$ mmol/kg.jour pour devenir négligeable à partir du 35^{ème} jour. L'évolution de la

concentration du lactate au cœur suit la même évolution que celle de la surface mais ne devient nulle qu'au bout du 40^{ème} jour.

2. Protéolyse et transformation des acides aminés

L'évolution du degré de protéolyse, au cours de l'affinage, est différente entre la surface et le cœur des fromages à pâte molle. Selon Noomen (1983), ceci est essentiellement dû à deux raisons principales:

- les enzymes microbiennes (principal agent de la protéolyse) ne diffusent pas dans la matrice fromagère,
- la croissance des micro-organismes les plus protéolytiques (*G. candidum* et *P. camemberti*) est beaucoup plus importante à la surface qu'au cœur du fromage.

L'action déterminante des *Penicillium* est bien mise en évidence dans le Camembert où l'activité protéolytique mesurée à la surface est beaucoup plus importante que celle mesurée au cœur (Lenoir *et al.*, 1985). Outre l'action de *Penicillium* et de *Geotrichum* (qui ne sont pas présents à la surface des fromages de type Munster pris en compte dans cette étude) cette dégradation peut être également du fait de la flore bactérienne de surface, telles les bactéries corynéformes et les microcoques (Dako *et al.*, 1995; Farkye *et al.*, 1995). Ce phénomène ne concerne pas la souche de *Brevibacterium* utilisée dans cette étude connue pour avoir un pouvoir protéolytique beaucoup plus faible que celui de *G. candidum* et de *P. camemberti* (Lecocq *et al.*, 1996).

3. Lipolyse et transformation des acides gras

La matière grasse (constituée à 98 % de triglycérides) joue un rôle important dans l'aromatisation des fromages à pâte molle ; non seulement du fait de leur pouvoir aromatisant, mais aussi en tant que précurseurs des méthylcétones, des alcools, des lactones et des esters. L'hydrolyse des lipides, lors de l'affinage, est un phénomène qui a été largement décrit

(Molimard et Spinnler, 1996; Fox et Wallace, 1997; Mc Sweeney et Sousa, 2000; Collins *et al.*, 2003; Mc Sweeney, 2004). Après les Bleus, le Camembert est le fromage présentant la plus forte dégradation de matière grasse (Collins *et al.*, 2003). La quantité importante d'acides gras libres dans le Camembert et les fromages bleus est essentiellement due à l'action de la moisissure et, à moindre degré, aux autres lipases microbiennes. En fait, la majeure partie des acides gras libres ayant un nombre de carbone entre 4 et 20 provient de la lipolyse des triglycérides par les moisissures, alors que ceux ayant un nombre de carbone entre 2 et 6 proviennent principalement de la dégradation du lactose et des acides aminés (Molimard et Spinnler, 1996). De leur côté, Hassouna et Guizani (1995) montrent que la lipolyse est près de deux fois plus importante en surface qu'au centre du fromage, et que l'accélération de la lipolyse superficielle semble être corrélée à la croissance de la moisissure.

II. Les principaux facteurs influençant l'affinage

Tous les facteurs susceptibles d'agir sur le développement microbien et les activités enzymatiques jouent un rôle déterminant sur la dynamique de l'affinage. Ils peuvent être classés en deux catégories : les facteurs internes qui sont propres aux fromages et les facteurs externes liés à l'environnement.

A. Facteurs internes

1. Le pH

Pendant l'affinage, l'influence du pH sur les développements microbiens, l'activité des enzymes associées et la texture des fromages est déterminante (Lenoir *et al.*, 1985).

Parmi les micro-organismes intervenant dans l'affinage, seules les bactéries lactiques (Dellaglio *et al.*, 1994), les levures et les moisissures (van den Tempel et Nielsen, 2000) peuvent se développer à des pH inférieurs à 5 ; en revanche, certaines espèces comme *Brevibacterium* ou certains groupes, tels les *Pseudomonas*, sont inhibés dans les milieux à pH bas (Ratray et Fox, 1999).

L'activité des enzymes est également très sensible aux variations de pH. En effet, l'activité de la plupart des protéases microbiennes est maximale pour des pH compris entre 5,5 et 7,5 et celle des lipases pour des pH allant de 7,5 à 9,0. Au dessous de pH 4,5, l'activité et la stabilité de nombreuses enzymes sont fortement réduites (Weimer *et al.*, 1997; Gobbetti *et al.*, 1999).

Les caillés de type pâte molle ont un pH inférieur à 5 et voisin de 4,7 pour le Munster. Un tel pH ne permet ni le développement des *Micrococcacees* et des *Coryneformes*, qui sont des agents de la maturation de ce type de fromage, ni une action suffisante des protéases et des lipases ; en outre, il interdit les interactions protéines-minéraux et protéines-eau qui confèrent à la pâte une texture souple et homogène (Vassal *et al.*, 1986).

Une certaine neutralisation du caillé est donc nécessaire. Celle-ci est assurée, soit par le développement de levures et de moisissures qui utilisent l'acide lactique comme source de carbone (cas des pâtes molles à croûte fleurie de type Camembert), soit par les actions conjuguées des levures et de l'atmosphère ammoniacale de certaines caves d'affinage (cas des pâtes molles à croûte lavée de type Munster).

Dans les fromages de type Camembert, le pH remonte rapidement et atteint en surface une valeur proche de 7 bien avant la fin de l'affinage, alors que l'augmentation du pH à l'intérieur de la pâte est beaucoup plus lent (Lenoir *et al.*, 1985; Leclercq-Perlat *et al.*, 2004a). comme ceci est illustré à la **figure I.3**.

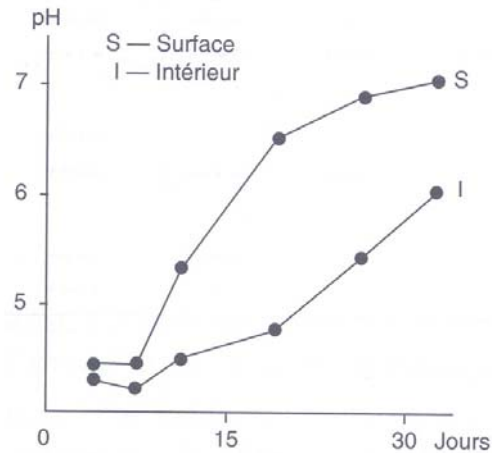


Figure I.3 : évolution du pH au cours de la maturation du Camembert (Lenoir *et al.*, 1985)

2. L'activité de l'eau

Selon Scott (1953), l'activité de l'eau (a_w) est un concept thermodynamique qui est défini, pour un système en équilibre avec son atmosphère gazeuse, par le rapport entre la pression relative de vapeur d'eau dans l'atmosphère et la pression relative de vapeur d'eau dans l'échantillon. Elle est définie par la **relation I.1** :

$$\frac{HRE}{100} = \frac{P'}{P_0} = \frac{P}{P_0} = a_w \quad \text{relation I.1}$$

HRE est l'humidité relative à l'équilibre, P' est la pression de la vapeur d'eau dans l'air, P est la pression de vapeur d'eau dans l'échantillon, P_0 est la pression de vapeur d'eau pure à la même température et a_w est l'activité de l'eau dans l'échantillon.

Lors de l'affinage, l'activité de l'eau des fromages constitue un paramètre tout aussi important que la température ou le pH pour le développement des micro-organismes et la vitesse de certaines réactions enzymatiques (Marcos, 1993). Même les propriétés texturales peuvent, dans une certaine mesure, y être rapportées (Geurts *et al.*, 1974).

En effet, l'abaissement de l'activité de l'eau augmente la durée de la phase de latence des micro-organismes et diminue sélectivement leur vitesse de croissance (Fox *et al.*, 1993). Ainsi, les bactéries sont très sensibles à l'abaissement de l'activité de l'eau et aucun

développement n'a été enregistré en dessous d'une activité de l'eau de 0,85, sauf pour quelques espèces halophiles. A l'exception de quelques espèces de *Saccharomyces*, les levures ne se développent plus si l'activité de l'eau est inférieure à 0,80 alors que pour les moisissures ce seuil se situe vers 0,70 (Hardy, 1997). Parallèlement à son effet sur la flore microbienne, l'activité de l'eau influence aussi certaines réactions chimiques. Généralement, une réduction dans l'activité de l'eau entraîne une baisse de l'activité des enzymes hydrosolubles. Des enzymes comme les peroxydases et les amylases sont complètement inactivées à une activité de l'eau inférieure à 0,85. Par contre, les lipases restent actives à des activités de l'eau aussi basses que 0,3 ou 0,1 (Jacobsen et Poulsen, 1995).

Compte tenu de l'importance de ce paramètre dans l'affinage du fromage, il peut paraître utile de le diriger efficacement. Certaines techniques fromagères constituent des outils susceptibles de modifier l'activité de l'eau des fromages et l'affinage lui-même fait évoluer ce paramètre (Hardy, 1997). Parmi ces techniques, nous retiendrons :

- le délactosage (ou le lavage des graines de caillé) qui modifie la teneur en eau des fromages en diminuant l'acidité de la pâte ainsi que la pression osmotique dans le fromage égoutté,
- le ressuyage qui abaisse notablement l' a_w superficielle,
- le lavage ou le frottage de la croûte avec de l'eau (avec une eau plus au moins salée) qui entraîne une élévation de l' a_w superficielle en provoquant une dilution, voire une extraction du sel,
- le salage est, de toute évidence, le principal moteur de la dépression de l' a_w (Marcos et Esteban, 1982).

Des résultats concernant le salage de fromages à pâte molle sont montrés en **figure I.4**. Ils illustrent l'importance du rôle du sel et peuvent être utilisés pour décrire l'évolution de

l'activité de l'eau, après salage, lorsque le sel d'abord concentré en surface, opère une lente migration vers le cœur du fromage (Hardy, 1997).

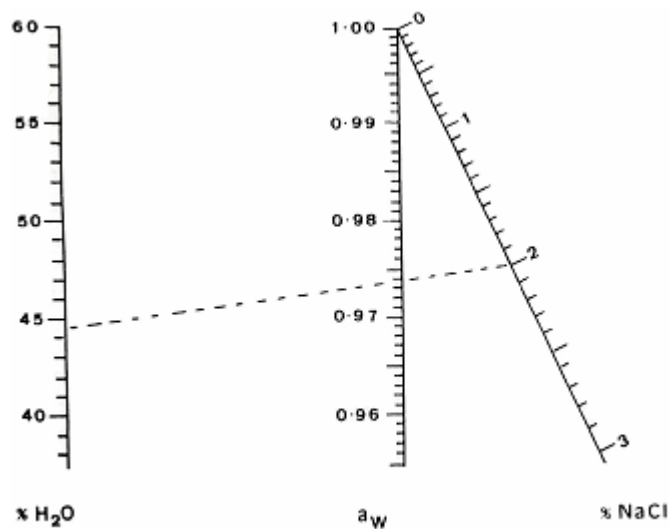


Figure I.4 : abaque donnant une estimation directe de l'activité de l'eau (a_w) de fromages fraîchement égouttés à partir de la teneur en eau (% H₂O) et de la concentration en sel (% NaCl) (Marcos et Esteban, 1982). Par exemple, pour une teneur en eau de 44 % et une concentration en NaCl de 2 %, l' a_w se situe vers 0,974.

Pendant l'affinage, l'activité de l'eau ne peut être considérée comme un facteur constant, car la déshydratation qui s'opère contribue à son abaissement. De plus, les molécules de faible poids moléculaire qui sont formées pendant l'affinage modifient aussi bien l'activité de l'eau que les propriétés de sorption de l'eau par le fromage (Mathlouthi, 2001). Il est donc nécessaire, pour bien définir l'activité de l'eau d'un fromage de préciser sa composition et son degré d'affinage. Le **tableau I.1** reprend quelques valeurs typiques d' a_w pour des fromages caractérisés au stade de leur commercialisation. Il est à noter que les valeurs observées varient de façon relativement modeste, de 0,988 (fromages blanc) à 0,917 (Parmesan).

Tableau I.1 : activité de l'eau de divers fromages lors de leur commercialisation (Marcos, 1993)

Fromage	a_w	Fromage	a_w
Brie	0,980	Gouda	0,950
Camembert	0,982	Gruyère	0,948
Cheddar	0,950	Munster	0,977
Fromage blanc	0,988	Saint-Paulin	0,968
Edam	0,960	Parmesan	0,917
Emmental	0,972	Sbrinz	0,940
Gorgonzola	0,970	Tilsit	0,962

Au cours de l'affinage des fromages à pâte molle, la mesure directe de la valeur de l'activité de l'eau est très délicate, et ceci pour plusieurs raisons :

- l'activité de l'eau de ces fromages n'est pas homogène et varie entre le cœur et la surface selon la concentration en sel, mais aussi, l'humidité relative et la température de l'enceinte (Marcos *et al.*, 1981),
- comme les fromages ont des activités de l'eau très élevées (entre 0,96 et 0,99) l'appareil de mesure tend à être saturé en vapeur d'eau avant que le point d'équilibre soit atteint,
- les fromages présentent, en cours d'affinage, de faibles variations de l'activité de l'eau se situant à la limite de précision des appareils de mesure.

Cependant, l'évolution de l'activité de l'eau peut être représentée par des modèles mathématiques. Le modèle Guggenheim, Anderson, and de Boer (GAB) (Guggenheim, 1966), qui décrit la teneur en eau (X) en fonction de l'activité de l'eau (a_w), est le modèle le plus utilisé dans le cas des produits alimentaires (Iglesias et Chirife, 1995). Ce modèle s'écrit de la façon suivante :

$$X = \frac{C \cdot k \cdot x_o \cdot a_w}{(1 - k \cdot a_w) \cdot (1 - k \cdot a_w + C \cdot k \cdot a_w)}$$

relation I.2

x_0 est la teneur en eau de la première monocouche alors que C et k sont des constantes du modèle GAB.

Ce modèle a été recommandé par les responsables du projet européen COST 90 (projet traitant des propriétés physiques des aliments) comme étant l'équation fondamentale pour la description de la sorption de l'eau dans les produits alimentaires (Wolf *et al.*, 1985).

3. La diffusion des solutés dans la matrice fromagère

Le fromage est constitué d'un réseau poreux de micelles de caséines à l'intérieur duquel se trouve la phase aqueuse où diffusent les molécules. Selon Hardy (1997), les principaux facteurs influençant la diffusion d'un soluté dans la matrice fromagère sont :

- la matrice de protéines, lesquelles s'opposent à la migration de solutés,
- les "pores" de la matrice qui sélectionnent les molécules selon leur taille,
- l'eau liée aux protéines qui réduit l'eau disponible pour la diffusion ; de plus, elle diminue la taille des pores de la matrice protéique et augmente les phénomènes de friction,
- la viscosité de la phase aqueuse : elle est plus forte dans le fromage à cause de la présence de substances solubles telles que le lactose, l'acide lactique, les sels ou les composés azotés,
- la tortuosité : la présence de globules gras et de protéines globulaires augmente le trajet des molécules d'un facteur λ , appelé tortuosité. Ce facteur représente le rapport entre la distance réelle et la distance théorique, laquelle varie entre 1 et $\pi/2$ ($\lambda = 1$ pour un système sans particules et $\lambda = \pi/2$ dans une phase où les particules sphériques sont contigües).

Pour caractériser la diffusion d'une molécule dans une matrice complexe, tel que le fromage, Geurts *et al.* (1974) utilisent le terme de "pseudo-diffusion" ou "diffusion apparente". Le Graët *et al.* (1983) ont étudié la migration du calcium et des phosphates inorganiques dans les fromages à pâte molle. Ils ont montré que ces minéraux migrent du

cœur vers la surface de façon irréversible. Le calcium s'associe à l'ion phosphate formant un sel insoluble ($\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$) qui précipite à la surface sous l'action du gradient de pH. Le Graët et Brulé (1988) se sont intéressés à la migration des macro et oligo-éléments dans un fromage de type Camembert. Ils ont montré que le potassium, le sodium, le zinc et le fer ont une migration réversible : elle se fait dans les deux sens cœur-surface et surface-cœur ; cette migration se fait sous l'action de la flore de surface et non du gradient de pH. Quant au cuivre, fortement fixé aux protéines, il ne migre pas et sa concentration reste constante durant l'affinage.

Selon Mc Sweeney (2004), la consommation du lactose et de l'acide lactique par la flore de surface crée un gradient de concentration qui provoque la diffusion de ces substrats du cœur vers la surface. De la même façon, la croissance de *Penicillium camemberti* dans le cas des fromages à croûte fleurie et l'atmosphère ammoniacale des caves d'affinage (cas des caves du Munster) provoquent l'accumulation d'ammonium à la surface des fromages créant ainsi un gradient de concentration qui induit la diffusion de cet ion de la surface vers le cœur. La **figure I.5** schématise le sens de diffusion et les gradients de concentration des principales solutés durant l'affinage d'un fromage à pâte molle.

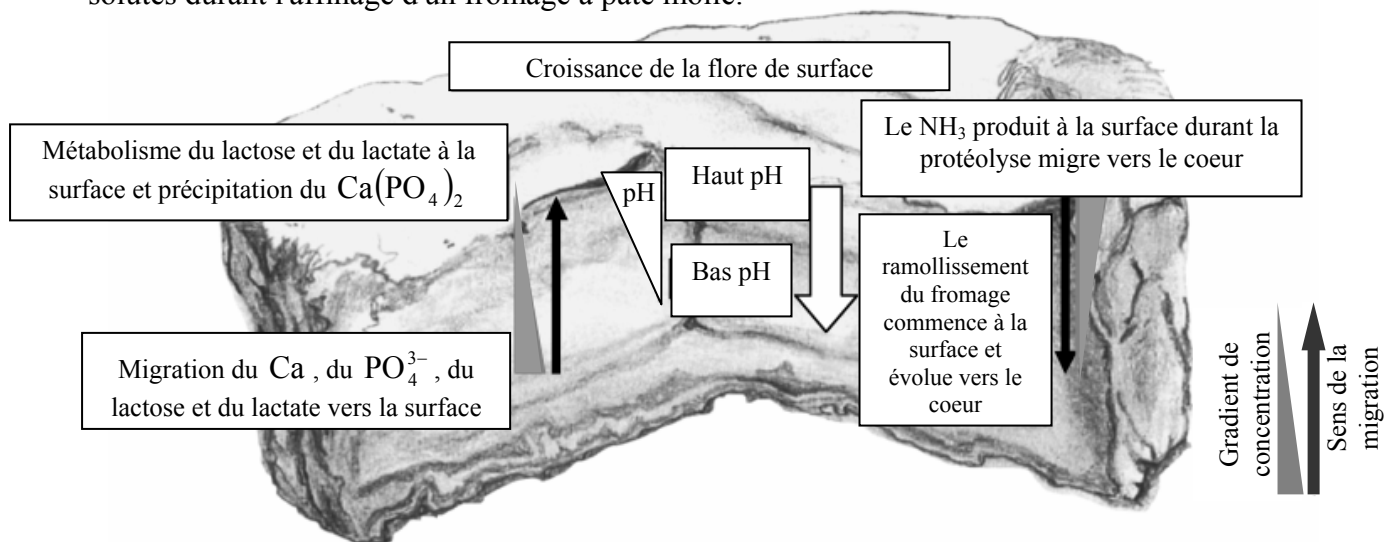


Figure I.5 : représentation schématique des changements ayant lieu lors de l'affinage d'un fromage à pâte molle en fonction des gradients de concentration qui s'installent (Mc Sweeney, 2004).

B. Les facteurs externes

Il s'agit de facteurs liés aux conditions d'environnement physico-chimique dans lesquelles s'effectue l'affinage au sein d'un hâloir, dédié à cet effet.

1. La température de l'enceinte d'affinage

La température joue un rôle déterminant sur les développements microbiens et les processus enzymatiques. Les températures optimales sont fonction du groupe microbien considéré. Elles sont comprises entre 20 et 30 °C pour les levures, les moisissures et les bactéries de surface. De même, les températures optimales d'activité des enzymes varient selon leur type ; elles sont de l'ordre de 30 à 35 °C pour les lipases, et de 40 à 45 °C pour les protéases. En pratique, les températures d'affinage, adaptées au type de fromage fabriqué, sont très inférieures à ces valeurs. Pour la plupart des fromages à pâte molle, la température des caves varie entre 8 et 14 °C. Cette pratique permet de ralentir l'évolution des processus biochimiques et d'obtenir des transformations lentes et mieux contrôlées de la pâte fromagère.

Pour un fromage donné, une température plus basse ou plus élevée que la normale se traduit par un affinage plus ou moins rapide. Cependant, toute modification de la température n'a pas pour seul effet de changer globalement la vitesse d'affinage. En effet, selon le groupe microbien ou le processus enzymatique, son influence sera plus ou moins grande et la dynamique interne du phénomène sera profondément modifiée (Lenoir *et al.*, 1985). Toute variation de température provoque donc des différences dans les caractéristiques des fromages notamment sur la protéolyse et la texture (Al Otaibi et Wilbey, 2004). Une température d'affinage trop élevée peut, aussi, conduire à la production de composés indésirables qui affectent négativement les propriétés organoleptiques des fromages (Kujawski *et al.*, 2003).

2. L'humidité relative de l'enceinte d'affinage

L'humidité relative, ou teneur en vapeur d'eau, de l'atmosphère des hâloirs joue un rôle important dans l'évolution de l'affinage des fromages. En effet, elle influence, à la fois, la perte de poids des fromages et l'activité de l'eau à leur surface (Fox *et al.*, 1993).

Dans les hâloirs, l'hygrométrie est inférieure à 100 %, de sorte qu'il se produit toujours une évaporation de l'eau de la surface du fromage vers l'atmosphère. Selon Ramet (1997), cette perte en eau varie fortement d'un type de fromage à un autre, en fonction de :

- la teneur en eau totale : toutes les conditions étant identiques : plus le fromage est humide, plus la perte d'eau est importante,
- la surface spécifique du fromage définie par le rapport volume/surface : plus elle est élevée, plus l'évaporation est importante,
- le temps de séjour en cave : ce temps influence également la perte totale en eau,
- l'état de liaison de l'eau : seule l'eau "libre" est susceptible de s'évaporer, c'est donc l'activité de l'eau qui règle l'évaporation dans l'atmosphère.

En plus des facteurs cités par cet auteur, la vitesse de circulation de l'air dans les hâloirs influence significativement la perte d'eau des fromages. Cet aspect sera abordé avec plus de détail au paragraphe 4. En accord avec Ramet (1997), Picque *et al.* (2006) ont montré que cette perte de poids est proportionnelle à la différence entre l'humidité relative des caves et l'activité de l'eau à la surface des fromages, c'est à dire le gradient de concentration en eau. Plus ce gradient est important, plus la perte de poids augmente.

Compte tenu du rôle sélectif de l'activité de l'eau sur la croissance et l'activité des micro-organismes, la régulation de l'hygrométrie des hâloirs est un moyen pour favoriser le développement, en surface des fromages, de certains groupes microbiens et pour éviter la prolifération d'autres groupes indésirables. Pour les Camemberts, une hygrométrie de 100 % favorise les échanges respiratoires de *P. camemberti*, alors qu'une humidité relative de 92 %

entraîne des diminutions de la consommation d'oxygène de 27 % et de la production de dioxyde de carbone de 37 % (Roger *et al.*, 1998). Bien que l'activité respiratoire semble maximale à 100 % d'humidité relative, les fromages affinés sous une hygrométrie supérieure à 95 % présentent généralement une croûte dont l'aspect est considéré comme inacceptable. En effet, les flores feutrantes, tels *P. camemberti* et *G. candidum*, ne se développent pas à de très fortes activités de l'eau et la couverture de tels fromages les rend impropres à la commercialisation. Bonaïti *et al.* (2004) ont montré que les meilleures conditions d'affinage d'un fromage de type Munster correspondaient à une température de 12 °C et une humidité relative de 95 %.

La durée de séjour et l'humidité relative du hâloir sont fonction du type de fromage. En général, pour les fromages à pâte molle et à croûte lavée, elles se situent, respectivement, aux environs de 15 à 30 jours et de 90 à 95 %.

3. La composition gazeuse de l'atmosphère de l'enceinte d'affinage

Mis à part la vapeur d'eau, traitée ci-dessus, la composition gazeuse de l'atmosphère des caves d'affinage intéresse essentiellement trois gaz présents dans le voisinage des fromages au cours de l'affinage : le dioxyde de carbone, l'oxygène et l'ammoniac. Ces trois gaz, et leurs concentrations respectives, influencent la physiologie et l'activité respiratoire de la flore d'affinage ainsi que l'apparence des fromages. Ils vont donc agir sur la dynamique (cinétique) d'affinage.

3.1 Effets sur la physiologie et la respiration des micro-organismes

En étudiant l'influence du stockage sous atmosphère contrôlée, à différentes concentrations en dioxyde de carbone et en oxygène, de fromages de type Brie, Champagne *et al.* (2003) ont montré qu'une teneur réduite en oxygène permet de ralentir le métabolisme des micro-organismes aérobies, telles *P. camemberti* et les bactéries de surface. D'autre part, une concentration en dioxyde de carbone inférieure à 5 % ralentit, voire inhibe,

de façon significative la croissance des moisissures alors que des concentrations supérieures à 10 % les endommagent sérieusement. Toujours selon Champagne *et al.* (2003), l'utilisation de l'acide lactique par la flore apparaît plus importante en conditions aérobies, et cela quelle que soit la concentration en oxygène testée. Ceci entraîne une plus forte remontée du pH en présence d'oxygène en favorisant l'oxydation de l'acide lactique par la flore d'affinage.

Récemment, Leclercq-Perlat *et al.* (2006) ont étudié l'influence de la composition gazeuse des hâloirs sur l'affinage de fromages de type Camembert. Les fromagesensemencés par une flore d'affinage composée de *Kluyveromyces lactis*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium camemberti* et *Brevibacterium aurantiacum*, ont été affinés sous cinq atmosphères différentes. Ces auteurs ont montré que *K. lactis* n'était pas sensible à la concentration en dioxyde de carbone pendant sa phase de croissance, mais que pendant la phase de déclin une concentration plus importante de ce gaz augmentait sa mortalité. Une augmentation de la concentration en dioxyde de carbone, entre 2 et 6 %, induit une amélioration significative de la croissance de *G. candidum*. Le développement du mycélium de *P. camemberti* est favorisé par une concentration en gaz carbonique de 2 %. Quand la concentration en gaz carbonique devient supérieure à 4 %, l'équilibre entre les populations de *P. camemberti* et de *G. candidum* est perturbé en faveur de ce dernier. Enfin, la croissance de *B. aurantiacum* dépend plus de la concentration de l'atmosphère en oxygène que de celle en dioxyde de carbone (Leclercq-Perlat *et al.*, 2006).

Picque *et al.* (2006) ont montré que la composition gazeuse de l'atmosphère des caves joue un rôle prédominant sur l'activité respiratoire de la flore d'affinage. En effet, dans le cas où l'atmosphère des caves est maintenue à 2 ou à 6 % de dioxyde de carbone durant l'affinage, l'activité respiratoire globale (consommation d'oxygène et production de dioxyde de carbone) ainsi que l'épaisseur de la sous-croûte crémeuse sont significativement plus importantes que dans les cas où l'atmosphère des caves est complètement ou partiellement renouvelée. Ces

résultats montrent que le contrôle de la composition gazeuse de l'atmosphère des caves constitue une méthode susceptible d'accélérer le processus d'affinage et de réduire son coût.

Dans les fromages, l'ammoniac se présente sous forme d'ion ammonium (NH_4^+). L'évolution de l'ammonium dissous, en surface et au cœur des fromages à pâte molle, a parfois été analysée (Oumer, 1997; Leclercq-Perlat *et al.*, 2000b; Leclercq-Perlat *et al.*, 2004a) mais les observations réalisées ne permettent pas d'expliquer l'action de l'ammoniac libre de l'atmosphère sur la physiologie et l'activité respiratoire de la flore d'affinage. Cependant, Bachmann (1997) a montré que la dissolution de l'ammoniac ambiant en surface des fromages permet une migration plus rapide des lactates et du calcium de l'intérieur du produit vers sa surface. Selon Ramet (1985), dans le cas des fromages à pâte molle et à croûte lavée de type Munster, affinés à l'aide de flores bactériennes très protéolytiques de type "rouge" (notamment *B. aurantiacum*), l'ammoniac de l'atmosphère contribue à la neutralisation de la surface des fromages et favorise, ainsi, le développement et l'action de la flore bactérienne acido-sensible. En règle générale, l'apport éventuel de ce composé est réalisé de façon empirique, en disposant une ou plusieurs coupelles contenant de l'ammoniac dans les hâloirs au sein desquels le développement des bactéries "colorantes" est recherché.

3.2 Effet sur l'apparence des fromages

La fermeté des croûtes de Brie semble aussi dépendre de la concentration en dioxyde de carbone existant au voisinage des fromages. Plus cette concentration est élevée, moins la croûte est ferme. L'absence de dioxyde de carbone (fromages stockés en présence d'air) permet d'obtenir des fromages dont la croûte est, à la fois, ferme et élastique (Champagne *et al.*, 2003).

Leclercq-Perlat *et al.* (2006) ont mis en évidence deux profils d'affinage type, en fonction de la concentration en dioxyde de carbone fixée dès le début de l'affinage à 2 ou à 6 %. En présence de dioxyde de carbone, l'affinage présente un profil de type "rapide-lent",

alors qu'en l'absence de dioxyde de carbone, ce profil est de type "lent-rapide". Toutefois, quand la concentration en dioxyde de carbone est supérieure ou égale à 6 %, la sous-croûte crémeuse se révèle bien trop liquide pour être acceptable. Ces auteurs ont conclu que la composition atmosphérique la plus favorable pour affiner ce type de fromage (compromis entre croissance des micro-organismes, dynamique biochimique et aspect des fromages) se situait à un niveau de dioxyde de carbone de l'ordre de 2 %, en présence d'une concentration d'oxygène de l'ordre de 17 à 18 %. Le rôle "d'activateur d'affinage" du dioxyde de carbone est clairement démontré par ces auteurs mais sans qu'ils proposent une explication physiologique du phénomène.

4. L'aération et la vitesse de l'air dans l'enceinte d'affinage

Selon Ramet (1985), les atmosphères confinées sont à proscrire dans tous les cas d'affinage. De telles atmosphères rendent difficile la croissance de la flore souhaitée et favorisent le développement de micro-organismes indésirables. De ce fait, les caves sont régulièrement aérées pour permettre le renouvellement de l'atmosphère. Différents ouvrages, décrivant le processus d'affinage des fromages, soulignent le rôle important de la ventilation dans le bon déroulement de l'affinage, sans toutefois donner d'informations quantitatives précises (Fox *et al.*, 1993; Ramet, 1997). Ces auteurs s'accordent à recommander une ambiance homogène, avec une circulation d'air autour des fromages "faible" et un débit d'air dans l'installation "suffisamment grand". Ceci contraste avec les anciennes pratiques d'affinage consistant à n'assurer un certain renouvellement d'air qu'à l'occasion de l'ouverture des portes des hâloirs, en particulier lors de la mise en place et de l'enlèvement des piles de fromages ou pendant les nuits. Dans la pratique industrielle actuelle, l'affinage se déroule dans des caves de grandes dimensions dont l'atmosphère est contrôlée. Dans la plupart des cas, ce contrôle se fait grâce à une unité de gestion globale des flux d'air. Cette unité permettant de fixer les taux de re-circulation et de renouvellement des gaz, par un processus

de soufflage et de reprise d'air, afin d'assurer le brassage de l'atmosphère du hâloir de façon homogène en évitant la formation de zones mortes et le phénomène de stratification.

Cependant, un environnement homogène est particulièrement délicat à générer dans des locaux de grande hauteur. En effet, les réactions enzymatiques créent un réchauffement de l'air. De plus, l'évaporation de l'eau nécessite un apport d'énergie fournie par l'air entraînant son refroidissement à proximité du fromage. Il se crée alors des gradients de température (parfois plusieurs degrés) au sein de l'atmosphère et les masses d'air chaud plus légères s'accumulent dans les parties hautes du hâloir. Ces différences de température et de vitesse d'air au sein du hâloir entraînent une forte hétérogénéité dans la qualité des fromages. Une vitesse d'air trop élevée favorise la formation d'une croûte plus épaisse limitant le développement des bactéries aérobies. A l'inverse, une vitesse d'air trop faible induit l'implantation de micro-organismes pathogènes ou d'altération, comme les *Listeria* et certaines moisissures, se développant à une activité de l'eau plus élevée. Pour éviter ces défauts d'affinage, les fromagers sont contraints de placer quotidiennement les produits à des hauteurs différentes dans le hâloir. Ce surcoût économique (main-d'oeuvre) justifie la maîtrise des procédés de l'aéraulique. A notre connaissance, les problèmes d'aéraulique des hâloirs (ou la caractérisation du comportement hydrodynamique du flux d'air en leur sein) n'ont jamais été abordés de façon à aboutir à des procédures de conduite reconnues. Le fait que la circulation de l'air soit particulière à chaque installation peut expliquer cette situation. De plus, l'écoulement de l'air dans les équipements alimentaires, tels que les hâloirs d'affinage, est instable et turbulent, ce qui tend à complexifier les mesures de vitesse moyenne (Peyrin *et al.*, 1995). Cependant, les travaux de Mirade *et al.* (2004) constituent une avancée considérable dans la caractérisation de l'aéraulique des hâloirs. Ces auteurs ont réussi à caractériser l'hétérogénéité dans la distribution de la ventilation au sein d'un hâloir pilote, dont la géométrie et le fonctionnement sont représentatifs de la pratique industrielle. Par exemple,

pour un débit de re-circulation d'air de l'ordre de 1600 m³/h, la vitesse de l'air entre les piles de fromage varie de 0,1 à 0,7 m/s, alors qu'autour des fromages ses valeurs sont comprises entre 0 et 0,2 m/s. Ceci est illustré par la **figure I.6** qui représente la distribution des vitesses d'air, déterminée expérimentalement, au sein d'un hâloir pilote de 81 m³.

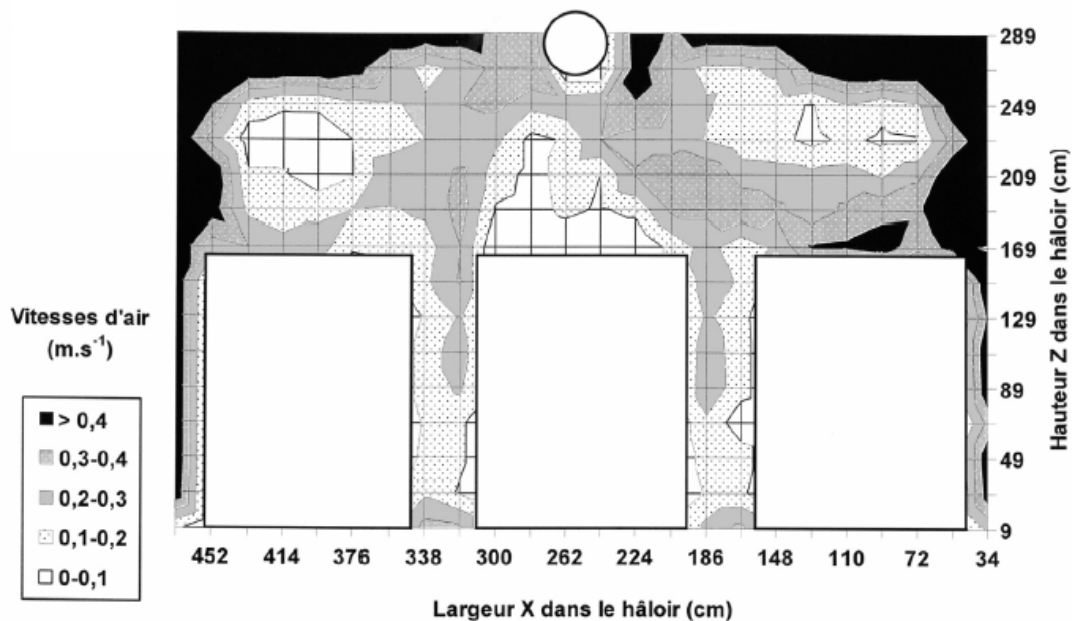


Figure I.6 : distribution des vitesses d'air mesurées autour de trois piles de fromages, selon une coupe verticale située à mi-longueur dans le hâloir pilote. Les rectangles blancs matérialisent les piles de fromages, le cercle blanc représente la gaine de soufflage (Mirade *et al.*, 2004).

La vitesse de l'air au niveau des fromages influence l'évaporation de l'eau à leur surface en agissant sur le coefficient de transfert de matière entre la surface et l'air (Weissenfluh et Puhan, 1987). Mirade *et al.* (2004) ont aussi montré que, pour une même humidité relative, la perte de poids des fromages double quand la vitesse de l'air augmente de 0,1 à 0,5 m/s comme le montre la **figure I.7**.

En agissant sur les transferts de matière, la vitesse de l'air va également modifier la composition gazeuse de l'atmosphère des hâloirs en favorisant l'apport d'oxygène et l'élimination du dioxyde de carbone résultant de l'activité respiratoire des fromages.

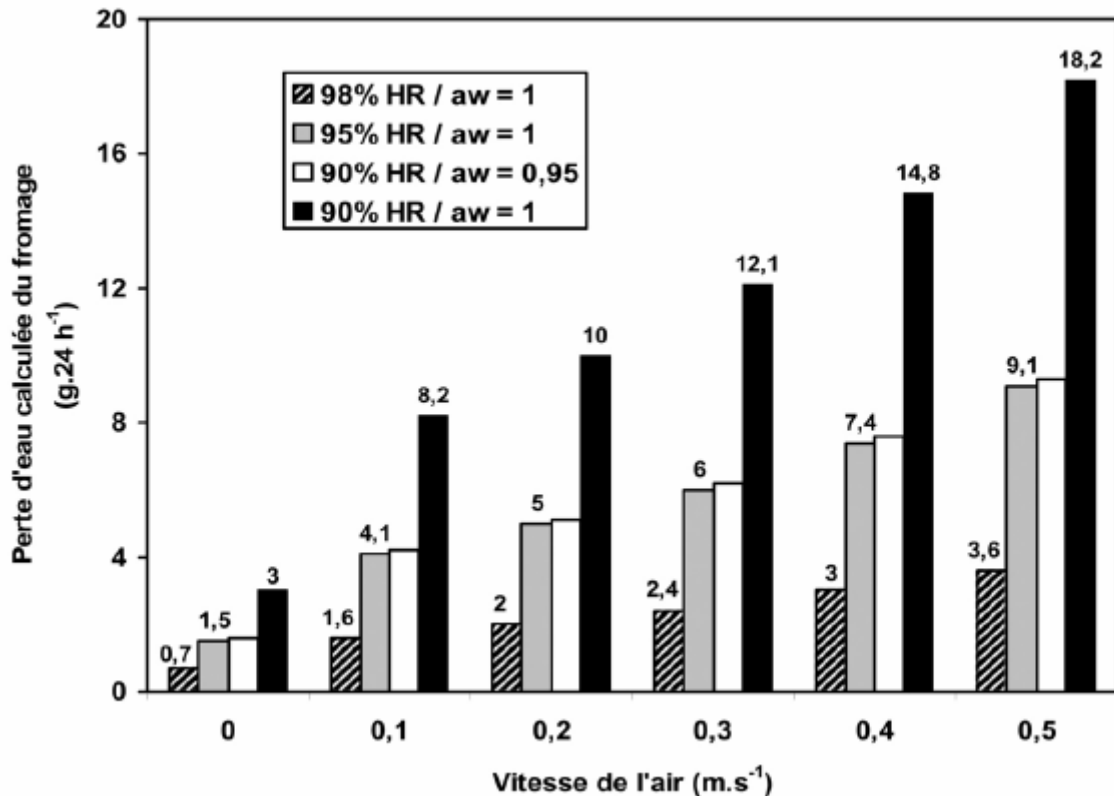


Figure I.7 : influence, pour différentes vitesses de l'air, de l'humidité relative et de l'activité de l'eau de la surface sur la perte de poids calculée sur des fromages (diamètre = 110 mm, poids \approx 400g) (Mirade *et al.*, 2004).

III. La modélisation

A. Introduction

Selon la définition du National Research Council (1990), un modèle mathématique est une tentative systématique de traduire la compréhension conceptuelle d'un système réel en des termes mathématiques. C'est donc un moyen intéressant de compréhension d'un processus se produisant dans le système considéré. Si la conceptualisation est bonne, le modèle devrait reproduire les phénomènes pertinents. Ainsi, un modèle mathématique est un outil valable pour vérifier notre compréhension de la façon dont un système fonctionne.

Selon la nature des connaissances introduites, deux approches majeures de la modélisation peuvent être adoptées :

- l'approche empirique, ou boîte noire, qui permet d'établir des modèles donnant une corrélation statistique, linéaire ou non, entre différentes grandeurs mesurées, sans prendre en considération les phénomènes impliqués,
- l'approche mécanistique basée sur les lois biologiques, physiques, chimiques régissant le comportement du processus considéré.

De plus, selon la prise en compte de l'évolution du système dans le temps, les modèles mathématiques peuvent être classés en deux catégories :

- les modèles statiques, où la relation entre les grandeurs du système est indépendante du temps (par exemple une stœchiométrie réactionnelle) qui se traduit mathématiquement par des équations algébriques,
- les modèles dynamiques, qui décrivent des systèmes dont les grandeurs évoluent dans le temps ; c'est le cas, par exemple, des cinétiques réactionnelles. Mathématiquement, ces modèles sont construits sous la forme d'équations différentielles.

Notons que ces deux classifications (empirique ou mécanistique et statique ou dynamique) sont indépendantes. Ainsi, un modèle peut être mécanistique et statique ou empirique et dynamique.

B. Etat de l'art des modèles traitant de l'affinage des fromages

Les fromages affinés sont considérés, par l'industrie alimentaire, parmi les produits les plus difficiles à maîtriser. En effet, le processus d'affinage met en jeu un grand nombre de souches microbiennes (mal connues pour une partie d'entre elles) entre lesquelles des phénomènes de compétition, de symbiose et/ou de succession de flores peuvent intervenir. De plus, la matrice fromagère est un milieu solide, poreux, où les diffusions d'eau, de substrats carbonés et azotés, de sels et de macroéléments jouent un rôle capital dans le processus d'affinage, mais ces grandeurs restent très difficiles à mesurer directement. Si on ajoute à cela l'influence des conditions externes sur ces phénomènes, l'exigence par les consommateurs de

produits ayant gardé leur typicité et les contraintes légales relatives à la sécurité alimentaire, le besoin d'adopter de nouvelles techniques capables d'intégrer cette complexité s'impose.

C'est dans cette optique que les modèles mathématiques sont de plus en plus utilisés dans le domaine des sciences des aliments. L'objectif principal de ces modèles est de décrire les phénomènes microbiologiques ou physico-chimiques en fonction des conditions opératoires du processus considéré. Un certain nombre de modèles mathématiques, traitant de divers aspects de l'affinage des fromages, a été publié. Dans ce qui suit, ces modèles seront présentés selon un ordre de complexité croissante.

1. Les modèles empiriques

Les modèles empiriques ont été adoptés par plusieurs auteurs. Frau *et al.* (1999) ont évalué les caractéristiques chimiques des fromages de type Mahon (fromage à pâte cuite) en utilisant des analyses en composantes principales (ACP). Ces auteurs ont trouvé des différences statistiquement significatives entre les fromages en considérant leurs teneurs en eau et en azote non protéique ; ces différences étaient indépendantes de la méthode de fabrication (industrielle ou artisanale). Cependant, les teneurs en cendres et en matière grasse des fromages démarquaient les fabrications artisanales des industrielles.

Lues et Bekker (2002) ont utilisé des modèles de régression linéaire afin de déterminer les concentrations de neuf acides organiques durant l'affinage du Cheddar. Des équations de régression, indiquant ces neuf concentrations, ont été proposées avec des coefficients de corrélation (R^2) allant de 0,91 à 0,99.

Poveda *et al.* (2004) ont appliqué la méthode de régression partielle des moindres carrés (PLS) pour prédire le temps d'affinage des fromages de Manchego (fromage de brebis à pâte pressée non cuite) à partir de quelques paramètres physico-chimiques. Ils ont proposé une équation empirique indiquant le temps d'affinage en fonction du pH, de l'activité de l'eau et de la teneur en matière sèche.

Bonaïti *et al.* (2004) ont proposé des modèles polynomiaux permettant de quantifier l'effet de la température et de l'humidité relative sur la cinétique de désacidification, par *Debaryomyces hansenii*, de fromages de type Munster. Ces auteurs ont montré que les conditions permettant d'atteindre un compromis entre la vitesse de désacidification et l'apparence des fromages correspondent à une température de 12 °C et à une humidité relative de 95 ± 1 %.

Leclercq-Perlat *et al.* (2004a) ont établi des relations statistiquement significatives entre la croissance de la flore d'affinage et les évolutions biochimiques ayant lieu lors de l'affinage d'un fromage modèle de type Camembert. Leurs travaux ont montré que la croissance microbienne était hautement corrélée aux concentrations en substrats carbonés au cœur et à la surface des fromages, et que le pH de surface est significativement lié à la concentration en NH_3 et la croissance de *Penicillium camemberti*.

Ces modèles empiriques présentent le double avantage d'être simples à mettre en place et de constituer une base éventuelle pour la construction d'un modèle mécanistique. Cependant, ils ne peuvent modéliser que des phénomènes reliés entre eux par des relations linéaires. Les modèles basés sur les réseaux de neurones artificiels sont, quant à eux, capables de décrire des relations non-linéaires entre un nombre important de phénomènes. Ces modèles sont de plus en plus utilisés dans différents contextes industriels grâce, entre autres, à leur capacité à être facilement intégrés dans une procédure de contrôle ou d'automatisation des procédés. Les techniques neuronales ont été utilisées dans un certain nombre d'études. Hongxu et Gunasekaran (1998) ont réussi à construire un modèle neuronal capable de prédire les caractéristiques rhéologiques de fromages à pâte pressée cuite à partir de leur composition chimique et de mesures de leur pH. Paquet *et al.* (2000) ont construit un modèle capable de prédire le pH final des Cheddar à partir de leur composition initiale et de neuf autres variables relatives à la conduite du processus d'affinage. Horiuchi *et al.* (2004) ont développé un réseau

de neurones artificiels capable de prédire le temps optimum pour l'addition de la présure et la durée de l'étape d'acidification. Récemment, Jimenez-Marquez *et al.* (2005) ont publié un modèle empruntant cette même approche et prédisant la teneur en eau du Cheddar à la fin de l'affinage.

2. Les modèles mécanistiques

Outre leur capacité à prédire le comportement d'un processus, les modèles mécanistiques contribuent à la compréhension des phénomènes physiques, chimiques et biologiques impliqués. Ils sont basés sur les lois fondamentales régissant le comportement du processus étudié. Selon cette approche, Biazar *et al.* (2003) ont proposé un modèle cinétique qui prédit la production d'acide lactique par *Lactobacillus helveticus*. Ce modèle prend en compte non seulement l'utilisation du substrat et la production d'acide lactique durant le processus de fermentation, mais aussi l'effet de la limitation par le substrat et l'effet de l'énergie de maintenance sur la croissance des cellules. Ce modèle a contribué à l'approfondissement des connaissances concernant l'utilisation du substrat et la production d'acide lactique par les bactéries lactiques lors de fermentations en milieu liquide. Gerla et Rubiolo (2003) ont proposé un modèle mécanistique qui décrit les phénomènes de diffusion du chlorure de calcium, de l'acide lactique et de l'eau durant l'affinage des fromages Pategras (fromage argentin à pâte molle). Pajonk *et al.*, (2003b) se sont intéressés aux transferts de chaleur intervenant lors de l'affinage de l'Emmental. Les valeurs de la conductivité thermique et de la chaleur spécifique ont été mesurées tout au long de l'affinage. Ensuite, un modèle de transfert de chaleur a été construit basé sur les lois de la thermodynamique et utilisant les valeurs précédemment mesurées. Récemment, Aldarf *et al.* (2006) ont proposé un modèle capable de simuler la diffusion du substrat et des métabolites dans un milieu gélosé, mimant le fromage, en fonction de la croissance de *Penicillium camemberti*. Ces auteurs ont montré que la limitation de la diffusion des substrats carbonés n'affecte pas la croissance

exponentielle de *Penicillium camemberti* mais que la limitation de la diffusion de l'azote contribue à l'arrêt de sa croissance.

En conclusion, la majorité de ces modèles mécanistiques s'intéressent aux phénomènes de transfert (eau, sel, chaleur, substrats, métabolites...) mais rares sont ceux qui ont abordés les aspects liés aux croissances microbiennes et aux cinétiques de consommation des substrats. Ce sont ces aspects qui sont abordés dans ce travail au moyen de modèles mécanistiques et dynamiques. La méthodologie permettant la construction de ce genre de modèles est détaillée dans le paragraphe suivant.

C. Méthodologie de construction des modèles mécanistiques

Typiquement, la construction d'un modèle mécanistique suit les cinq étapes suivantes (Eberl *et al.*, 2006).

1. Définition du système à modéliser

Cette étape consiste à définir le système à modéliser et les phénomènes à représenter. Compte tenu des objectifs visés (compréhension, prédiction, optimisation...), il est nécessaire de délimiter le système à considérer. Par exemple, pour modéliser le processus de fabrication fromagère, il est possible de s'intéresser à un fromage individuel, à une partie de celui-ci (surface ou cœur), ou au contraire, représenter une cave d'affinage dans son ensemble.

2. Choix des variables et identification des phénomènes mis en jeu

Les variables et les phénomènes importants agissant sur le système doivent être identifiés. Les variables peuvent être classées suivant les trois catégories ci-dessous :

Variables d'état : ce sont des grandeurs internes propres au système. L'ensemble de ces variables doit décrire l'état du système à un instant donné, compte tenu des phénomènes à observer et du degré de précision souhaité. Cet ensemble doit être suffisant pour pouvoir calculer l'évolution du système dans le temps.

Variables d'entrée : elles décrivent les effets du milieu extérieur sur le système. Ces variables traduisent des variables d'action ou des conditions opératoires qui peuvent être régulées, avec un point de consigne fixe ou variable dans le temps, ou subies (perturbations).

Variables de sortie : ce sont les variables qui peuvent être mesurées et exprimées comme une fonction des variables d'état. Il s'agit, souvent, d'un sous-ensemble des variables d'état.

Prenons comme exemple de système à modéliser un fromage qui s'affine dans une chambre régulée en température et en humidité relative. Selon les objectifs du modèle, les variables d'états peuvent être les évolutions des concentrations de la flore d'affinage et des substrats ou la teneur en eau du fromage. Les phénomènes mis en jeu peuvent être la consommation du substrat, la diffusion et l'évaporation d'eau. Les variables d'entrée sont la température et l'humidité relative de la chambre, alors que et les cycles de dégivrage, qui se traduisent par des variations rapides de température, peuvent être considérées comme des perturbations mesurables. Quant aux variables de sortie il peut s'agir des mesures de la concentration d'un substrat ou d'un produit ou d'un métabolisme et la perte de poids.

3. Ecriture des équations du modèle

Il s'agit de traduire les phénomènes identifiés selon des expressions mathématiques. Typiquement, les équations d'un modèle comportent deux types d'informations : des bilans (de matière, d'énergie...) et/ou des cinétiques (croissance, consommation de substrat...). Avec le même exemple que précédemment, la mise en équation de la croissance d'un micro-organisme et la diffusion d'un substrat seront détaillés dans ce chapitre.

La vitesse de croissance spécifique d'un micro-organisme, sur un substrat éventuellement limitant, peut être traduite par l'équation de Monod (1942):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{k_s + S}$$

relation I.3

où μ est le taux spécifique de croissance, μ_{max} est le taux spécifique de croissance maximum, S est la concentration du substrat et k_S est la concentration spécifique du substrat quand il devient limitant.

La diffusion peut être considérée de deux façons :

- soit on considère le transfert de matière global entre deux points que l'on exprime sous forme d'un coefficient de transfert de matière et d'une différence (ou gradient) de concentration,
- soit on s'intéresse à l'évolution détaillée du profil de concentration dans l'espace, auquel cas le phénomène est décrit par un coefficient de diffusion et un gradient local de concentration selon la première loi de Fick.

Dans cette étude, nous avons choisi de décrire la diffusion selon le coefficient de transfert de matière global : le flux de matière est traduit par une quantité de matière transférée en un temps donné, selon la relation suivante :

$$\text{Flux du composant} = \left(\frac{\text{quantité de matière déplacée}}{\text{temps d'observation} \times \text{surface d'échange}} \right) \quad \text{relation I.4}$$

Ce modèle de transfert de matière suppose que le flux de matière est proportionnel à la différence de concentration du composant et qu'il n'y a pas de changement de phase. Ce qui impose une approche globale du transfert. Le sens du flux de matière entre deux points est défini comme suit :

$$\text{Sens du flux du composant} = A \cdot K \cdot (C_1 - C_2) \quad \text{relation I.5}$$

Où K est le coefficient de transfert de matière, A est la surface d'échange, C_1 et C_2 sont les concentrations du composant entre les deux points considérés.

4. Ajustement des paramètres

Les expressions mathématiques décrites précédemment font intervenir des paramètres inconnus. Ceux-ci doivent être identifiés (on parle d'ajustement ou d'optimisation des paramètres) pour que le modèle représente au mieux le système réel. Par exemple, dans la **relation I.3**, les paramètres de l'équation à identifier sont le taux spécifique de croissance maximum (μ_{max}) et la concentration spécifique du substrat limitant (k_s).

Un algorithme d'ajustement des paramètres suppose la définition d'un critère d'erreur J à minimiser. Ce critère, souvent appelé fonction objectif, mesure l'écart entre la sortie du modèle (courbe simulée C_{Sim}) issue d'un vecteur de paramètres \vec{w} (l'ensemble des paramètres d'un modèle) et la mesure réelle (courbe mesurée C_{Exp}). Un critère statistiquement rigoureux est celui du maximum de vraisemblance (*likelihood function*) (Walter et Pronzato, 1994). Il s'agit de trouver le vecteur des paramètres \vec{w} qui maximise la probabilité d'observer les mesures expérimentales. Il est possible d'utiliser une connaissance à priori (un ensemble d'apprentissage ou de calibration) pour pondérer la fonction de probabilité. Avec l'hypothèse usuelle d'erreurs de mesure aléatoires, indépendantes, de moyenne nulle et de distribution normale, maximiser la vraisemblance revient à minimiser la somme des carrés des écarts entre les simulations du modèle et les valeurs mesurées, pondérés par les variances des erreurs de mesure selon la relation suivante :

$$J(\vec{w}) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{(C_i^{exp} - C_i^{mes})^2}{\sigma_i^2} \quad \text{relation I.6}$$

où n est le nombre de mesures expérimentales et σ_i est l'écart de la mesure expérimentale.

Il existe plusieurs techniques de résolution numérique dont le principe est d'ajuster les paramètres en fonction de leur contribution à l'erreur J . Dans cette étude, l'optimisation des paramètres par minimisation de la fonction objectif a été réalisée par régression non-linéaire à partir de l'algorithme de Levenberg-Marquardt (Marquardt, 1963) en raison de son efficacité

prouvée dans la résolution de ce genre de problème (Walter et Pronzato, 1994). Cet algorithme utilise une procédure itérative pour optimiser les paramètres : les étapes de résolution des équations d'état, de vérification de l'ajustement entre les valeurs simulées et les valeurs mesurées, de modification des valeurs des paramètres pour améliorer l'ajustement, sont répétées jusqu'à ce que la différence entre les valeurs expérimentales mesurées et calculées atteigne un minimum. Ce minimum est généralement de l'ordre de grandeur des erreurs de mesure des valeurs expérimentales.

La procédure d'estimation étant itérative, un jeu initial de paramètres ajustables \vec{w}_0 est nécessaire en début de processus. Le problème d'optimisation non-linéaire est linéarisé localement, autour de la valeur courante de \vec{w} par un développement en série de Taylor limité du premier ordre (approximation de Taylor) (Carrera et Neuman, 1986). Théoriquement, la solution du problème linéarisé est immédiatement connue. En pratique, cette solution ne constitue qu'une approximation. Le vecteur \vec{w} trouvé n'est, en général, pas celui qui minimise globalement la fonction objectif $J(\vec{w})$. La valeur de $J(\vec{w})$ minimum est, dès lors, approchée par itérations successives, en modifiant progressivement la valeur des paramètres du vecteur \vec{w} .

Malheureusement, dans de nombreux cas de problèmes non-linéaires, outre le minimum global, la fonction objectif peut présenter plusieurs minimums locaux (voir **figure I.7**). Il est donc nécessaire de tester plusieurs jeux initiaux de paramètres (Bertsekas, 1997).

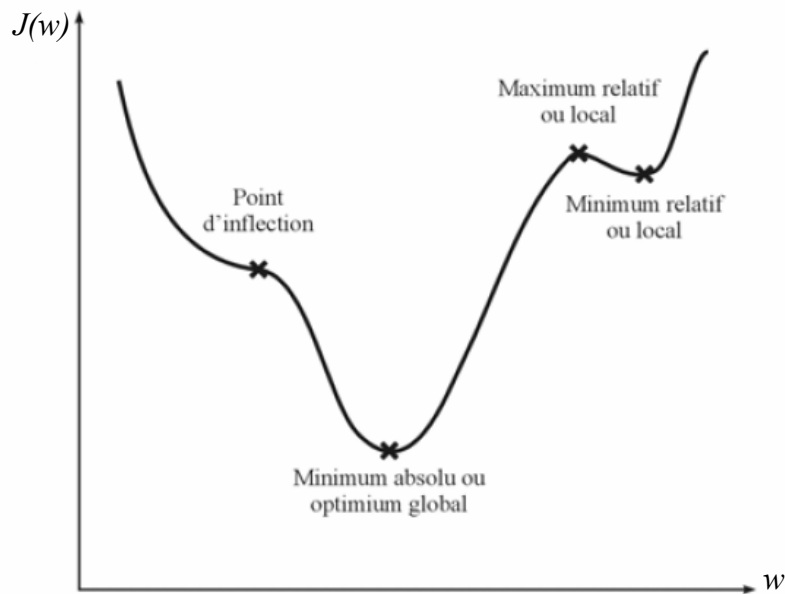


Figure I.7 : Minimum global et minimums locaux d'une fonction objectif pour un problème à un seul paramètre w (Bertsekas, 1997)

Plusieurs critères d'arrêt du processus d'estimation, basés sur l'analyse de l'évolution de la fonction objectif et sur le comportement des paramètres ajustables, existent. Le processus d'estimation s'arrête lorsque une ou plusieurs des conditions suivantes sont atteintes :

- la fonction objectif ne diminue plus ou très peu après un nombre donné d'itérations d'optimisations successives,
- les paramètres ajustables ne sont que très faiblement modifiés après un nombre donné d'itérations d'optimisations successives,
- le nombre maximum d'itérations du processus d'estimation est atteint, indépendamment de la valeur de la fonction objectif et l'estimation des paramètres ajustables.

Dans les deux premiers cas, l'arrêt du processus signifie que les paramètres ajustables ont convergé vers une valeur optimale, mais ne signifie pas que l'optimum global est atteint. En effet, le processus peut s'arrêter à un minimum local puisque de faibles variations des paramètres ne permettent pas de s'en éloigner (**figure I.7**). Dans tous les cas, il convient de tester plusieurs jeux de paramètres initiaux différents.

5. Validation des résultats

Valider les résultats consiste à s'assurer que le modèle construit est adéquat pour représenter correctement le système considéré.

La première étape consiste à vérifier que le jeu de paramètres obtenu à l'issue de l'étape d'ajustement, permet d'avoir l'écart quadratique moyen le plus faible (le vecteur \vec{w} converge vers l'optimum global) et que la sortie prédite par le modèle et la sortie réelle sont graphiquement proches. Si ces conditions ne sont pas remplies, la structure du modèle n'est pas satisfaisante : d'autres variables explicatives doivent être prises en compte. Si elles le sont, le modèle obtenu est considéré comme représentatif.

Il convient alors de vérifier que les paramètres ont bien été identifiés, en particulier, en examinant leur matrice de covariance, leur matrice des coefficients de corrélation, leur intervalle de confiance et de procéder à l'étude de leur sensibilité.

- La matrice de covariance des paramètres

Il s'agit d'une matrice symétrique carrée ayant autant de lignes (et de colonnes) que de paramètres à estimer. Ses éléments diagonaux sont les variances des paramètres correspondants. Les éléments non-diagonaux sont les covariances entre chaque paire de paramètres. La matrice de covariance n'a pas beaucoup d'intérêt en soi mais elle sert de base au calcul de la matrice des coefficients de corrélation et de l'intervalle de confiance.

- La matrice des coefficients de corrélation

La matrice des coefficients de corrélation est une matrice symétrique carrée dont les éléments dérivent de la matrice de covariance. Les éléments diagonaux sont toujours égaux à l'unité, les autres varient entre -1 et 1 . Plus la valeur de ces éléments non-diagonaux se rapproche de ces extrêmes, plus les paramètres respectifs sont corrélés. Il est généralement admis que des valeurs inférieures à $-0,95$ ou supérieures à $0,95$ indiquent une forte corrélation entre les paramètres considérés. Une forte corrélation entre deux ou plusieurs

paramètres signifie que ces paramètres ne peuvent pas être bien déterminés individuellement (avec les données expérimentales disponibles). Si ces valeurs sont importantes en soi, il convient de modifier la structure du modèle ou d'acquérir des données expérimentales plus informatives. Si l'on est surtout intéressés par les prédictions fournies par le modèle, une forte corrélation entre paramètres n'est pas nécessairement un défaut rédhibitoire.

- L'intervalle de confiance

L'intervalle de confiance, par exemple à 95 %, fournit un moyen utile de détermination de la certitude avec laquelle les différentes valeurs de paramètres sont estimées. Si le modèle contient trop peu de paramètres pour simuler un système particulier avec précision, la fonction objectif sera grande. Les éléments de la matrice de covariance des paramètres seront donc également élevés, ce qui induira d'importants intervalles de confiance des paramètres. Inversement, si le modèle contient trop de paramètres, la fonction objectif sera plus faible mais le nombre insuffisant d'observations induira alors de fortes corrélations entre ces paramètres, provoquant une augmentation de la valeur de la covariance pour les paramètres corrélés et, donc, de larges intervalles de confiance. Un paramètre est déterminé de façon d'autant plus précise qu'il a une forte influence sur la valeur de la fonction objectif et que cette influence est indépendante de celle des autres paramètres. La détermination de l'intervalle de confiance est basée sur l'approximation linéaire (approximation de Taylor) et dépend directement de la valeur des éléments de la matrice de covariance des paramètres.

- Etude de sensibilité des paramètres

L'influence de chaque paramètre sur les prédictions du modèle peut être évaluée en procédant à une analyse de sensibilité élémentaire. Elle consiste à observer l'effet d'une perturbation, appliquée à un paramètre, sur la qualité de prédiction du modèle (Savageau, 1971). Un schéma de base de cette analyse consiste à faire varier un par un, par exemple de

plus ou moins 10 %, la valeur des paramètres du modèle autour de leur meilleure estimation et de noter l'incidence de cette variation sur les prédictions du modèle.

Par ailleurs, puisque le critère le plus important est la capacité du modèle à simuler le comportement du système réel, la sortie simulée au moyen du modèle devra toujours être comparée avec la sortie réelle. Ensuite, la validation finale d'un modèle se fera en comparant les simulations aux sorties réelles sur d'autres jeux de données non utilisés pour l'ajustement des paramètres. Ceci permet de tester la capacité de généralisation du modèle. Si ce test est réussi, le modèle est considéré comme étant une bonne représentation du procédé.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. La fabrication des fromages

Deux enceintes ont été utilisées lors de ce travail. Elles ont été conçues et réalisées par les ateliers de mécanique et d'électronique de l'Unité Mixte de Recherche de Génie et de Microbiologie des Procédés Alimentaires (UMR GMPA, INRA - Grignon). L'une sert à la fabrication des fromages et l'autre à leur affinage. Elles permettent de préparer et d'affiner les fromages dans des conditions d'ambiance et d'asepsie contrôlées. Elles sont maintenues en légère surpression (environ 100 mm H₂O) afin d'éviter l'entrée de contaminants extérieurs. Lors de cette étude, une seule technologie fromagère a été abordée : les fromages à pâte molle et à croûte lavée (type Munster).

A. L'enceinte de fabrication

Toutes les étapes de la fabrication des fromages (pasteurisation, coagulation, tranchage du caillé, moulage, égouttage et salage) sont conduites dans l'enceinte de fabrication. Il s'agit d'une unité pilote de fabrication d'un volume de 2 m³ (L = 2,0 m ; l = 1,0 m ; h = 1,0 m). Elle est schématiquement présentée à la **figure II.1**

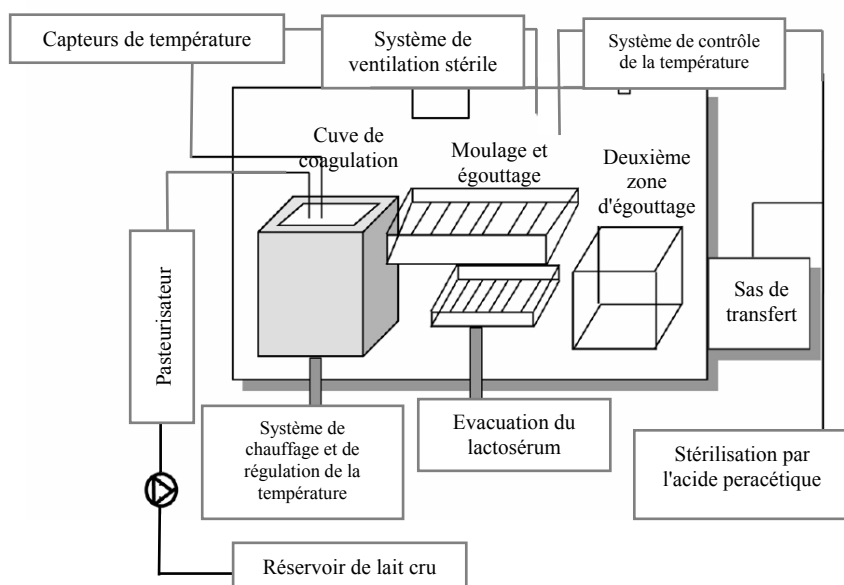


Figure II.1 : schéma de l'enceinte de fabrication des fromages.

Pendant la fabrication, la température ambiante à l'intérieur de l'enceinte est maintenue à 28 ± 1 °C. Tout le matériel non autoclavable est nettoyé et stérilisé : lavage au RBS 35[®] ; rinçage à l'eau osmosée ; frottage avec de l'Anios Spray (désinfectant de surface) puis transfert dans l'enceinte avant stérilisation à l'acide peracétique (Soproper 3,5 %, Seppic, France). Cette dernière étape est réalisée en pulvérisant de l'acide peracétique pendant 48 heures, à température ambiante, à l'aide d'un pulvérisateur-stérilisateur (Alcoplast, Paris, France).

B. Préparation des Laits

Pour tous les essais réalisés, 100 litres de lait sont traités pour fabriquer 45 fromages de type Munster. Les laits (entier et écrémé) sont fournis par la ferme de Viltain (78 350 Viltain, France). Le lait utilisé est standardisé à 29 g de matières grasses par litre (en mélangeant des laits écrémé et entier) et contient au moins 32 g de matière protéique totale par litre.

C. Préparation des levains

1. Le levain lactique

Ce levain, utilisé sous forme lyophilisée (CHN11), appartient à la gamme FLORA DANICA[®] (Chr HANSEN, France). Il constitue un écosystème microbien mésophile, acidifiant et aromatique du type LD (production de L et D-Lactate), composé d'un nombre indéfini de souches des sous-espèces :

- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, à raison de 75 % des UFC/g de lyophilisat
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (biovar *diacetylactis*), à raison de 20 % des UFC/g de lyophilisat
- *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, à raison de 5 % des UFC/g de lyophilisat.

Ce levain est repris dans du lait écrémé reconstitué stérile (Elle et Vire), additionné de 5 % de glycérol, puis conservé à – 20 °C en aliquots de 10 mL. Lors de son utilisation, il est remis en culture, par ensemencement à 2,5 % dans du lait écrémé reconstitué stérile et incubé de manière statique à une température de 30 °C pendant 16 heures dans une étuve. Lors de la fabrication des fromages, le lait pasteurisé estensemencé avec cette culture à raison de 1,5 %.

2. Le levain d'affinage

Le levain d'affinage est constitué de deux espèces couramment utilisées dans la fabrication industrielle de fromages à pâte molle et à croûte lavée : une levure désacidifiante *Debaryomyces hansenii* (souche 304, UMR GMPA) et une bactérie de surface *Brevibacterium aurantiacum* (ATCC 9175).

2.1 *Debaryomyces hansenii* (souche 304, UMR GMPA)

Cette levure possède un aspect blanc crémeux ; elle se développe à la surface des fromages selon une reproduction végétative par bourgeonnement. *D. hansenii* peut également se présenter, dans certaines conditions de culture, sous forme de filaments. Sur certains milieux gélosés, elle développe des asques persistants contenant un ou deux ascospores rondes et rugueuses.

La préparation de la souche est réalisée à partir d'un aliquot congelé à – 20 °C. La méthode utilisée est celle décrite par Leclercq-Perlat *et al.* (1999). Toute cette préparation se fait stérilement, avec du matériel stérile et des milieux stérilisés. Une pré-culture est préparée dans 20 mL du bouillon "Yeast Extract Glucose" (Biokar, Paris, France) dans un erlenmeyer de 150 mL. L'incubation dure 2 à 4 jours à 25 °C sous une agitation de 150 tr/min. La culture proprement dite est réalisée sur un milieu liquide aux casaminoacides mimant un fromage dégraissé de 1 jour (**annexe I.A**). Ce milieu, réparti en volume de 200 mL dans des erlenmeyers de 1L, estensemencé à 1 % avec la préculture. La durée et les conditions d'incubation sont les mêmes que pour la préculture. Les cellules sont ensuite récupérées

stérilement par centrifugation en pots (9000 tr/min pendant 20 minutes à 15 °C). Après un lavage avec 50 mL d'eau physiologique (NaCl à 9 g/L), le culot est remis en suspension dans du lait glycérolé (**annexe I.B**), puis cette suspension est homogénéisée pendant 20 minutes avec un agitateur magnétique. La suspension cellulaire est alors répartie en tubes de 10 mL stériles et est conservée à – 20 °C pendant moins de 6 mois.

Régulièrement, un tube est décongelé, et le levain est dénombré sur milieu gélosé YEGC (**annexe I.C**) après une incubation de 2 jours (à 25 °C).

2.2 *Brevibacterium aurantiacum* (ATCC 9175)

Les cellules de *Brevibacterium aurantiacum* (ATCC 9175) sont toujours sous forme de bâtonnets plus ou moins réguliers chez les cultures jeunes, mais elles peuvent se raccourcir, voire se transformer en coccoïdes, lors de leur phase stationnaire. Cette souche polymorphe est particulièrement acido-sensible, non lipolytique et moyennement protéolytique (Lecocq *et al.*, 1996).

La préparation de ce levain est identique à celle décrite pour *D. hansenii*, sauf que la pré-culture est réalisée dans un bouillon cœur-cervelle BHI (**annexe I.D**) au lieu du bouillon "Yeast Extract Glucose".

La concentration en cellules viables est déterminée par dénombrement sur milieu gélosé aux lactates (Piton et Fontanier, 1990; Oumer *et al.*, 1996) (**annexe I.E**), après incubation à 25 °C entre 3 et 5 jours.

D. Préparation de la présure et du chlorure de calcium

1. Préparation de la présure

La présure utilisée (Chr Hansen) contient 520 mg de chymosine par litre. Le matin même de la fabrication, un aliquote stérile de 30 mL (quantité nécessaire pour 100 litres de

lait), congelé à - 20 °C et décongelé à 4 °C pendant la nuit, est mis dans l'enceinte jusqu'au moment de son utilisation.

2. Préparation du chlorure de calcium

Pour chaque fabrication, 10 g de chlorure de calcium sont mis en solution dans 100 mL d'eau milliQ avant d'être autoclavés à 121 °C pendant 30 minutes. Ils sont disposés dans l'enceinte de fabrication en même temps que les levains. L'addition de calcium permet de préserver les capacités de coagulation du lait malgré le traitement thermique.

E. Protocole de fabrication

Le soir précédant la fabrication, le pasteurisateur et la cuve de coagulation sont mis en chauffe respectivement à 98 °C et 38 °C. La température du bac de caillage est ramenée à 34 °C lorsque les 100 litres de lait ont été pasteurisés. Les vannes de sortie d'air sont ajustées de manière à obtenir une légère surpression (≈ 100 mm d'eau). Le thermostat de l'enceinte de fabrication est alors réglé pour maintenir une température de 28 ± 1 °C.

1. La pasteurisation

Le lait est pasteurisé pendant 30 secondes à 77 ± 1 °C dans un pasteurisateur à plaques Vicarb muni d'un chambreur tubulaire, puis il est refroidi à 34 ± 1 °C.

2. Ensemencement du lait et ajout du chlorure de calcium

L'ensemencement du lait avec les levains d'affinage (décongelés pendant une nuit à 4°C) et des bactéries lactiques a lieu lorsque le premier litre de lait est recueilli dans la cuve de coagulation. Cet instant est défini comme le temps zéro de l'essai. Par la suite, les temps sont toujours exprimés à partir de cet instant. Le chlorure de calcium (10 g/100 mL) stérile, est ajouté après le remplissage de la cuve. Sa concentration finale dans le lait est de 100 mg/L. Le pH initial du lait est de $6,55 \pm 0,05$. L'ensemencement du lait correspond à une

concentration de 1.10^4 UFC.mL⁻¹ pour *D. hansenii* et de 1.10^6 UFC.mL⁻¹ pour *B. aurantiacum*.

3. Emprésurage et raffermissement

Les bactéries lactiques assurent une pré-maturation du lait jusqu'à l'obtention d'un pH de $6,30 \pm 0,02$. Le pH est mesuré toutes les quinze minutes au moyen du pH-mètre après mélange avec une écumoire. L' emprésurage intervient lorsque ce pH est atteint (soit 60 à 110 minutes d'action des levains lactiques). La présure (30 mL) est alors ajoutée au lait. L'ensemble est alors soigneusement homogénéisé à l'aide d'une louche pendant environ une minute. Le temps de prise à 34 °C n'excède pas quinze minutes. Cette coagulation mixte est suivie d'un raffermissement d'une durée de 40 minutes.

4. Découpage du caillé et exsudation du lactosérum

Après le raffermissement, le découpage du caillé est effectué à l'aide d'un tranche caillé en acier inoxydable dont les mailles sont de 20 × 20 mm. Immédiatement, le sérum exsude des grains. Pendant 40 minutes, le lactosérum est soutiré en continu à l'aide d'une pompe péristaltique. Le volume total pompé est de l'ordre de 40 litres pour 100 L de lait. Cela permet de standardiser l'extrait sec à une valeur de 40 à 42 %.

5. Moulage et égouttage

A la fin de l'exsudation, le caillé est versé dans les moules à l'aide de deux pelles à caillé en acier inoxydable d'une capacité voisine de 2 kg. Les moules sont constitués de deux parties. D'une part, le moule proprement dit, regroupe 10 moules solidaires, de 110 mm de diamètre et de 77 mm de hauteur. D'autre part, la rehausse, de même diamètre et de 30 mm de haut, s'adapte sur chaque bloc de moules. Chaque ensemble (moule et rehausse) est posé sur une grille en acier inoxydable recouverte d'une grille en plastique dont les mailles font 1 x 1 millimètre. Le moulage est réalisé le plus rapidement possible (moins de quatre minutes)

pour que la quantité de caillé distribuée et son hydratation soient identiques d'un moule à l'autre. Vingt minutes après la distribution du caillé, les rehausses sont retirées, et les hauteurs des fromages sont égalisées, en retirant si nécessaire le caillé superflu à l'aide d'une spatule. Trente minutes après le moulage, les moules sont retournés une première fois. Cinq heures après le moulage, les moules sont à nouveau retournés. Avec 100 litres de lait, 45 fromages d'environ 300 grammes sont produits.

6. Démoulage et salage

Le démoulage a lieu 24 heures après le moulage. Le pH des fromages est alors de $4,7 \pm 0,1$, leur extrait sec est compris entre 40 et 42 %, le rapport de la concentration en calcium sur la matière sèche est de 0,35 à 0,40 %, et le pourcentage de matière grasse sur la matière sèche est de 46 ± 1 %.

Après nettoyage de la cuve de coagulation à l'eau stérile, la saumure stérile (250 g de NaCl par litre, pH = 5,5) est thermostatée à 14 ± 1 °C, pendant la nuit, par circulation d'eau froide dans la double enveloppe de la cuve de coagulation. Après démoulage, les fromages sont immergés dans la saumure pendant 25 minutes. Ensuite, les fromages sont égouttés sur une grille légèrement inclinée, pendant environ une heure, afin d'éliminer la solution saline résiduelle. La concentration moyenne en NaCl des fromages atteint $1,7 \pm 0,1$ %.

F. L'enceinte d'affinage

1. Description

Cette enceinte, représentée à la **figure II.2**, est utilisée pendant les 14 premiers jours d'affinage. Elle est placée dans une chambre frigorifique thermostatée (MA60 Dagard, France) d'un volume de 27 m^3 ($L = 4,0 \text{ m}$; $l = 2,8 \text{ m}$; $h = 2,4 \text{ m}$) afin de réguler sa température.



Figure II.2 : photographie de l'enceinte d'affinage des fromages.

D'un volume de 1 m^3 ($L = 1,80 \text{ m}$; $l = 0,85 \text{ m}$; $h = 0,66 \text{ m}$), elle permet de travailler sous des atmosphères gazeuses de composition définie. Lors de cette étude, elle a fonctionné avec un renouvellement permanent de l'atmosphère, réalisé par injection d'air filtré à un débit de $0,5 \text{ m}^3/\text{h}$, soit un renouvellement total de l'atmosphère toutes les deux heures. Elle est constituée de trois parties reliées entre elles en circuit fermé.

La première est **l'enceinte d'affinage** proprement dite. Elle contient des grilles en acier inoxydable sur lesquelles reposent les fromages, et un système de brassage de l'air constitué d'un axe muni de deux jeux de trois ailettes. Le renouvellement de l'atmosphère, par injection d'air, ainsi que le mouvement des ailettes sont à l'origine des différences de vitesse de l'air dans l'enceinte d'affinage. En effet, des mesures de cette vitesse, réalisées par des anémomètres à boules chaudes (modèle 8465, TSI, USA) selon la méthode décrite par Mirade *et al.* (2004) et représentées à la **figure II.3 (A)**, montrent que selon l'emplacement la vitesse de l'air varie entre 0 (zones mortes) et 44 cm.s^{-1} (au niveau des orifices d'entrée de l'air). Cependant, au niveau des grilles sur lesquelles reposent les fromages la vitesse de l'air est quasi homogène et reste proche de $0,1 \text{ cm.s}^{-1}$ comme l'indique la **figure II.3 (B)**.

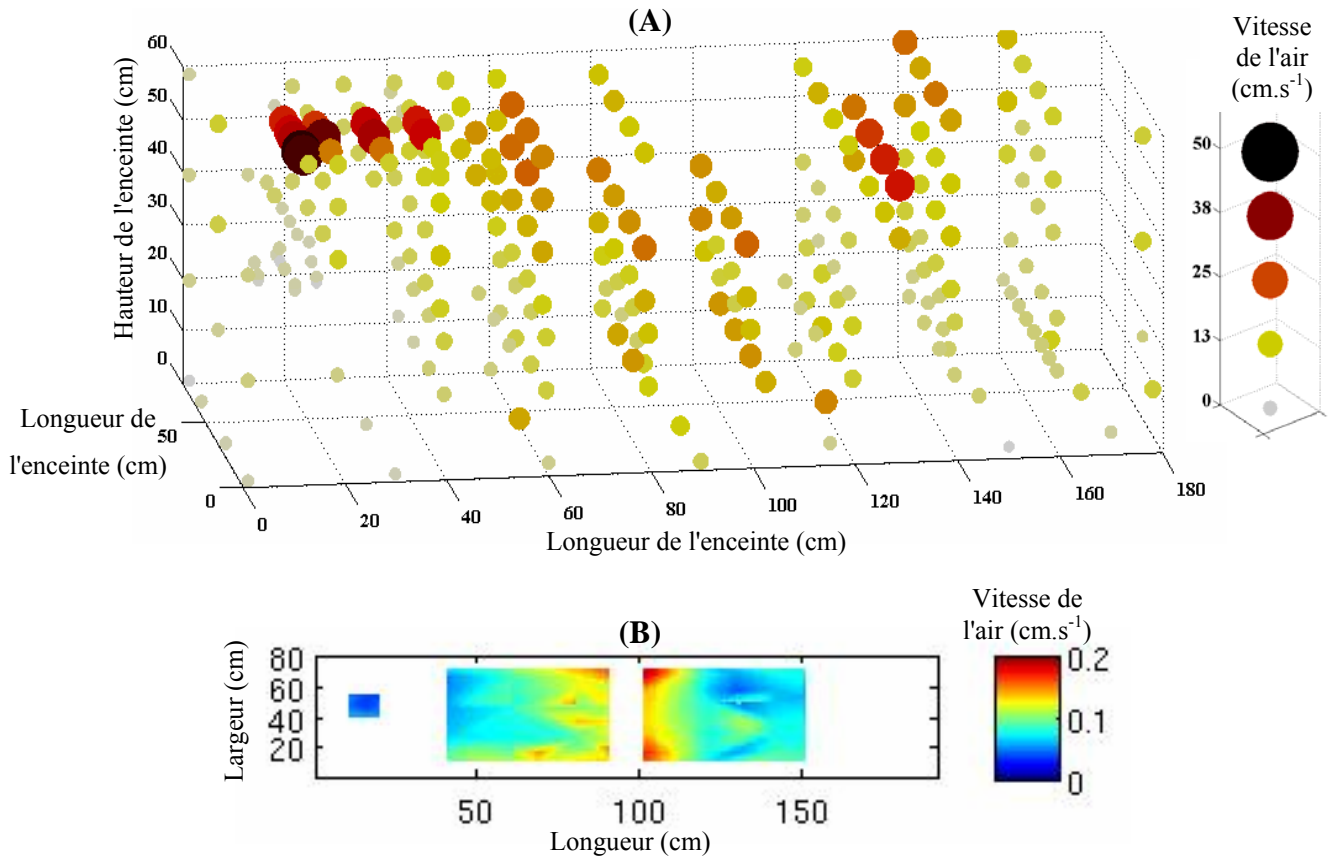


Figure II.3 : (A) distribution des vitesses de l'air mesurées dans l'enceinte d'affinage. (B) vitesse de l'air selon une coupe horizontale située au niveau des grilles sur lesquelles reposent les fromages

La deuxième partie est le **système de régulation de l'humidité relative**, représenté à la **figure II.4**. Ce système est constitué de trois solutions placées dans des réservoirs en verre (volume totale de 10 litres pour 7 litres de solution) au travers desquelles l'air barbotte. L'air, stérilisé par filtration, passe d'abord par le réservoir contenant de l'eau stérile (pré-humidification). Puis, il traverse un des deux réservoirs suivants. Le premier contient une solution de chlorure de potassium saturée (KCl) qui assure une humidité relative de l'air sortant de 85 %. Le second contient, soit une solution de nitrate de potassium saturée (KNO₃), qui assure une humidité relative de l'air sortant de 95%, soit une solution de sulfate de potassium saturée (K₂SO₄) qui assure une humidité relative de l'air sortant de 99 %. Le choix de la solution se fait en fonction du stade d'affinage et de l'humidité relative souhaitée dans

l'enceinte. Les réservoirs sont stérilisés à vide, de la même façon que les enceintes de fabrication et d'affinage. Les solutions sont autoclavées deux fois à 121 °C, pendant 30 min, avant d'être transférées stérilement dans les réservoirs. Afin d'éviter une contamination éventuelle des solutions salines, de l'azoture de sodium est rajouté à une concentration finale de 2.10^{-4} g/L. Le tout est relié à l'enceinte d'affinage au moyen de tuyaux souples.



Figure II.4 : photographie du système de régulation de l'humidité relative de l'enceinte d'affinage.

Enfin, la troisième partie est **le sas de transfert** qui permet le transfert aseptique des fromages de l'enceinte de fabrication à l'enceinte d'affinage. Sur une face, il se raccorde de façon étanche aux enceintes de fabrication puis d'affinage par une double porte. Le sas dispose également d'un hublot amovible et d'un gant en néoprène.

2. Mesures et contrôles effectués pendant l'affinage

2.1 Mesure de l'humidité relative et de la température de l'enceinte

L'humidité relative (RH) est mesurée à l'aide d'un hygromètre composé d'une sonde et d'un voltmètre. La sonde (Transmicor T141.02 0-100 % RH, CORECI SA, Prolabo) est étalonnée à 85 % avec une solution de chlorure de potassium (KCl) saturée (RH de 85 %) et à

99 % avec une solution de sulfate de potassium (K_2SO_4) saturée (RH de 99 %). Sur trois points du plan d'expériences, la sonde (Vaissala, HMP 243, Etoile International, Paris) a été testée après étalonnage avec les deux mêmes solutions. La régulation de l'humidité relative de l'enceinte d'affinage pendant les essais se fait par le système de solutions salines détaillé dans le chapitre précédent.

La température dans l'enceinte est mesurée par une sonde en platine (Pt 100 Ohms à 0 °C) reliée un transmetteur de signal (module ADAM 4017). Cette température n'est pas régulée directement dans la mesure où l'enceinte est placée dans une chambre froide, elle même contrôlée à la température d'affinage souhaitée.

2.2 Mesure du poids d'un fromage en continu

Une balance (Précica 9670M, France, précision = 0,01 g), aseptisée et tarée, a été préalablement placée dans l'enceinte d'affinage et reliée au logiciel d'acquisition. Pour chaque essai, un fromage est placé sur la balance afin de mesurer en ligne sa perte de poids pendant l'affinage en cave.

G. Protocole d'affinage

1. Affinage dans l'enceinte

Le transfert des fromages de l'enceinte de fabrication à celle d'affinage se fait aseptiquement grâce au sas amovible de transfert.

L'affinage des fromages de type Munster est conduit selon un plan d'expérience comportant 2 variables et trois niveaux :

- humidité relative = 85, 93 et 99 %
- température = 8, 12 et 16 °C.

Dans l'enceinte d'affinage, les fromages subissent un ressuyage (réalisé à 85 ± 1 % d'humidité relative et à une température de 12 ± 1 °C) lors du premier et du dernier jour de

séjour dans l'enceinte. Ils sont retournés au 6^{ème} jour. Pendant l'affinage en hâloir, des prélèvements sont réalisés aseptiquement en plaçant le fromage à prélever dans un sac stérile lequel est retiré de l'enceinte au moyen d'un mini-sas. Un prélèvement par jour est réalisé entre J1 et J14 (sauf à J5, J11 et J12).

2. Affinage sous emballage

Après le dernier ressuyage (entre J13 et J14), les fromages sont emballés dans du papier sulfurisé stérilisé aux UV (30 minutes par face), puis placés dans des boîtes en bois. L'affinage se poursuit alors en chambre froide à 4 °C jusqu'au 42^{ème} jour. Pendant cette période, un fromage est analysé chaque semaine (J20, J27, J35, J42). Notons toutefois que les modèles mathématiques proposés lors de ce travail ne prennent en considération que l'affinage conduit dans le hâloir, pendant les quatorze premiers jours.

II. Analyses effectuées sur le lait et les fromages

A. Analyses réalisées sur le lait

1. Dosage des matières grasses sur le lait entier

La méthode utilisée est celle préconisée par la norme AFNOR NF V04-214 (méthode gravimétrique décrite à l'**annexe I**).

2. Dénombrements microbiens sur le lait pasteurisé

La présence ou l'absence de levures, de bactéries d'affinage et de bactéries lactiques dans le lait pasteurisé sont vérifiées par détermination de leur concentration en cellules viables. Les cultures sont réalisées sur des milieux gélosés spécifiques, respectivement Yeast Extract Glucose au Chloramphénicol (YEGC), milieu au lactate et à l'amphotéricine (Piton et Fontanier, 1990) et MRS. La composition de ces milieux est précisée à l'**annexe II**.

B. Analyses réalisées sur les fromages

Les techniques d'échantillonnage des fromages varient d'un auteur à l'autre et sont souvent fonction du type de fromage étudié. Dans le cas d'un fromage à pâte molle, la méthode utilisée s'inspire de celle préconisée par Le Graët et Brûlé (1988). Ces auteurs séparent chaque fromage en 2 parties (surface et cœur).

1. Préparation des suspensions fromagères

Les suspensions fromagères sont utilisées pour effectuer les dénombrements microbiens et déterminer la concentration en ammonium libre. Elles sont réalisées par le mélange de 180 g d'eau physiologique stérile (NaCl à 9 g/L) thermostatée à 50 ± 2 °C et de 20 grammes de fromage broyé stérilement au mortier. Le mélange est homogénéisé à l'aide d'un homogénéisateur Stomacher® (Seward, Prolabo), à vitesse maximale, pendant 3 minutes. La solution obtenue est appelée "suspension fromagère au 1/10^{ème}".

Pour éviter les contaminations de l'échantillon, les préparations des dénombrements des micro-organismes sont effectuées à la flamme d'un bec Bunsen, avec du matériel flambé.

2. Détermination de la concentration en cellules viables

La méthode de dénombrement des suspensions fromagères est celle des dilutions successives décrite par Leclercq-Perlat *et al.* (1999). Les dilutions sont préparées avec des tubes contenant 9 mL d'eau physiologique stérile. La plage de dilution varie de 10^{-2} à 10^{-6} , les dilutions utilisées dans cette plage varient en fonction de l'avancement de l'affinage et des micro-organismes dénombrés. Pour chaque dilution, trois boîtes de Pétri sontensemencées en surface par 49,2 µL de suspension. L'ensemencement se fait sur des boîtes de 90 mm de diamètre, au moyen d'un ensementeur Spiral (Spiral plater, Interscience, France). Cette méthode permet de dénombrer les colonies sur la totalité de la boîte ou par secteur. La concentration moyenne en cellules viables est établie selon la **relation II.1** :

$$C(\text{UFC/g}) = \frac{(C_1 + C_2 + C_3) \times 10^{-d}}{3 \times V} \quad \text{relation II.1}$$

où C (UFC/g) est la concentration en Unité Formant Colonie (UFC) par gramme, d est la dilution par rapport au fromage, C_i est le nombre d'UFC pour la boîte i ($C_i = 1$ à 3) et V est le volume de la solutionensemencée (mL).

2.1 *Debaryomyces hansenii*

Ces levures sont cultivées sur le milieu Yeast Extract Glucose Chloamphénicol (YEGC). Avant dénombrement, les boîtes sont incubées 48 heures à 25 °C. Le chloramphénicol inhibe la croissance des bactéries (levains lactiques et *B. aurantiacum*).

2.2 *Brevibacterium aurantiacum*

Les dénombrements de *B. aurantiacum* sont effectués sur un milieu gélosé au lactate et à l'amphotéricine B (Piton et Fontanier, 1990; Oumer *et al.*, 1996). L'ajout d'un antifongique (amphotéricine B) est indispensable pour assurer l'élimination des flores fongiques qui poussent plus vite que *B. aurantiacum* à la surface des boîtes. Les boîtes sont incubées à 25 °C pendant 7 jours avant le dénombrement. Les colonies de la souche de *B. aurantiacum* utilisée sont de couleur orange.

3. Analyses physico-chimiques

3.1 Mesure du taux de matière sèche

Le taux de matière sèche est déterminé selon la norme AFNOR NF V04-282, 1985. La mesure est réalisée, en triple, pour chaque partie du fromage analysé. La prise d'essai de fromage est d'environ 2 grammes, pesés avec précision. Le séchage est obtenu au moyen d'un étuvage à 105 °C pendant 48 heures.

Le taux moyen de matière sèche est déterminé selon la **relation II.2** :

$$MS = \sum_{i=1}^{i=3} \frac{1}{3} \times \frac{M_{2i} - M_{0i}}{M_{1i} - M_{0i}} \times 100$$

relation II.2

MS est le taux de matière sèche du fromage (%); M_{0i} est le poids du cristallisateur, du sable et de la baguette (g); M_{1i} est le poids du cristallisateur du sable, de la baguette et du fromage humide (g); M_{2i} est le poids du cristallisateur, du sable, de la baguette et du fromage sec (g).

3.2 Détermination des concentrations en lactose et en lactates

Etant donné qu'il n'existe pas de normes pour doser les sucres et les lactates dans le fromage, la technique HPLC qui permet une identification directe et rapide de ces composés dans les produits laitiers est utilisée. Elle a été décrite par Leclercq-Perlat *et al.* (1999). Pour cela, la seule nécessité est d'obtenir un échantillon représentatif, limpide et exempt de matières et/ou de produits interférents.

3.2.1 La méthode HPLC

Un appareil HPLC Waters TCM (Millipore, France) équipé d'une pompe LC-6A (Shimadzu, Japon), d'un injecteur automatique (Waters), d'un intégrateur CR-3A (Shimadzu) et d'une colonne Aminex HPX 87H (Biorad Hercules, CA 94547, USA) est utilisé. La solution éluée est analysée par un détecteur à longueur d'onde variable Waters 490 (programmable multiwave detector) et un réfractomètre différentiel RID-6A (Shimadzu), tous deux connectés en série. Le volume d'échantillon injecté est de 20 μ L. Les analyses sont réalisées à 35 °C, avec une vitesse d'écoulement de 0,6 mL/min. La colonne de 7,8 mm de diamètre et de 300 mm de longueur est couplée à une pré-colonne Aminex HPX 87H de 50 mm. Cette colonne permet de séparer les acides organiques, les sucres et les alcools. La phase mobile est l'acide sulfurique 0,01 N. Un étalonnage interne est réalisé avec de l'acide propionique à 1 %.

3.2.2 Préparation des échantillons

La préparation des échantillons, à partir d'une suspension fromagère, varie d'un auteur à l'autre. Selon Leclercq-Perlat *et al.* (1999), dans le cas des fromages à pâte molle, la précipitation au TCA et la défécation de Carrez (AFNOR NF V04-213, 1971) sont les seules techniques qui permettent d'obtenir des échantillons reproductibles et limpides.

Quelle que soit la méthode de précipitation utilisée, la suspension fromagère est préparée avec 10 grammes de fromage finement broyé (selon l'état d'avancement de l'affinage), puis mis en contact avec 20 mL d'eau et laissée à 50 °C pendant une heure. L'ensemble est ensuite homogénéisé à l'aide d'un homogénéisateur Ultra-Turrax (25000 tr/min pendant 2 min). Ce protocole permet la migration des substrats carbonés des grains de caillés vers la solution aqueuse.

a) Défécation de Carrez

A la suspension fromagère préparée, trois solutions sont ajoutées successivement. La première (Carrez I) contient 150 grammes d'hexoferricyanate II de potassium ($K_4(Fe(CN)_6, 3H_2O)$) par litre. Le volume ajouté à l'échantillon est de 17 mL. La seconde (Carrez II) contient 240 grammes d'acétate de zinc ($Zn(CH_3COO)_2, H_2O$) par litre. Le volume ajouté à l'échantillon est de 17 mL. Enfin, la troisième solution est de l'hydroxyde de sodium 1 N. Le volume ajouté est de 3,3 mL. Après chaque addition, le mélange est vigoureusement agité et laissé à refroidir si nécessaire. Le poids de la suspension est ensuite mesuré. Après agitation, l'échantillon est laissé au repos une heure à température ambiante avant d'être filtré sur du papier Whatman 42.

b) Précipitation au TCA

La suspension fromagère au ½ est alors mise en présence de 10 mL d'acide trichloracétique (TCA) à 24 %, puis vigoureusement agitée. La solution est laissée au repos une heure avant d'être filtrée sur papier Whatman 42.

Pour le dosage des substrats carbonés, 0,5 mL de filtrat (TCA ou Carrez) à nouveau filtré sur un filtre minisart® de 0,22 µm (Sartorius, France) est réparti dans des vials de 1 mL et additionné de 0,5 mL d'étalon interne (acide propionique à 1 %).

III. Conduite des essais et traitement des données

A. Plan d'expériences

L'affinage des fromages a été étudiée à l'aide d'un plan d'expériences complet à deux facteurs et à trois niveaux, avec trois répétitions du point central. Au total onze fabrications, positionnées comme indiqué à la **figure II.5**, ont été réalisées. La température et l'humidité relative constituent les deux facteurs du plan d'expériences. Chacun d'eux prend trois valeurs : 8, 12 et 16 °C pour la température et 85, 93 et 99 % pour l'humidité relative. Tous ces essais ont été conduits avec un renouvellement permanent de l'atmosphère du hâloir.

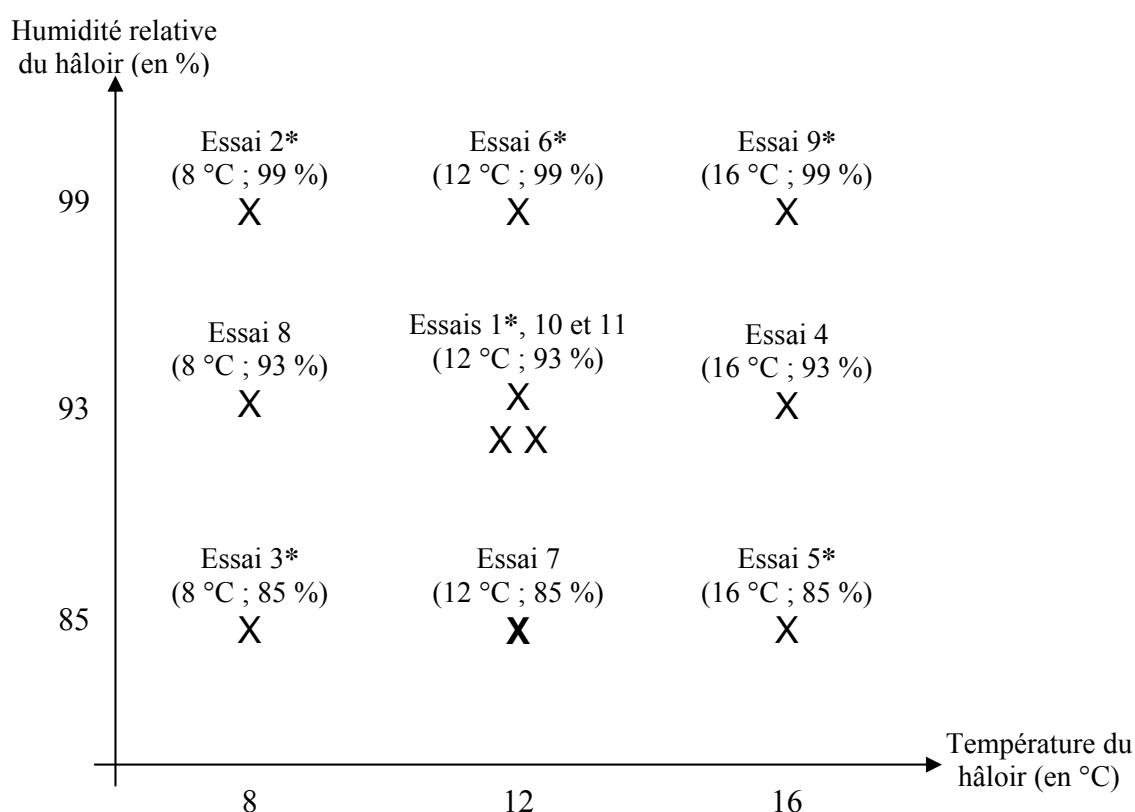


Figure II.5 : répartition des onze essais d'affinage réalisés selon un plan d'expérience à deux facteurs et à trois niveaux. * : essais d'apprentissage.

B. Constitution de la base de données

Les variables mesurés en ligne (poids du fromage) ainsi que les résultats des analyses des fromages (dénombrement de la flore d'affinage, concentration en lactose et en lactates, extrait sec) ont été récupérés afin de construire une base de données.

C. Modélisation et ajustement des paramètres

Lors de cette étude, trois modèles mathématiques ont été développés pour décrire l'affinage en cave. Le premier modèle décrit la croissance de *Debaryomyces hansenii* et l'évolution des concentrations en lactose et en lactate pendant l'affinage des fromages. Le deuxième modèle décrit la perte de poids et l'évolution de la matière sèche des fromages. Le troisième est un modèle généralisé qui intègre l'évolution de la flore d'affinage et qui permet de prédire la perte de poids et l'évolution de la matière sèche des fromages pendant l'affinage. Notons que les trois modèles prennent en compte les effets de la température et de l'humidité relative sur les phénomènes étudiés.

Ces modèles sont construits selon une approche mécanistique dynamique, basée sur des lois biologiques, biochimiques et physiques. Un soin particulier est porté aux mécanismes mis en jeu (transfert de matière, évaporation, croissance microbienne). Les modèles construits lors de ce travail sont présentés de façon détaillée dans les parties "Matériels et Méthodes" des trois chapitres de la section "Résultats et Discussions" de ce manuscrit. Le **tableau II.1** récapitule les phénomènes pris en compte, modèle par modèle.

Tableau II.1 : phénomènes pris en compte lors de la construction des modèles.

Modèle 1 : croissance de *Debaryomyces hansenii* et évolution des concentrations en lactose et en lactate en fonction de la température et de l'humidité relative du hâloir.

"modèle microbiologique"

- Le fromage est considéré comme un système à deux compartiments : cœur et surface.
 - *D. hansenii* consomme le lactose de surface pour sa croissance.
 - Au cœur, le lactose est, pour partie, transformé en lactate par les bactéries lactiques et, pour partie, diffuse vers la surface ; le lactate, produit par les bactéries lactiques à partir du lactose, diffuse vers la surface.
 - A la surface, le lactose est consommé par *D. hansenii* et par les bactéries lactiques ; le lactate est consommé par *D. hansenii* pour sa maintenance.
-

Modèle 2 : perte de poids et évolution de la matière sèche des fromages en fonction de la température et de l'humidité relative de l'affinage du hâloir. "modèle perte de poids"

- Le fromage est considéré comme un système à deux compartiments : cœur et surface.
 - La masse totale du fromage est la somme de sa masse sèche et de sa masse humide.
 - La masse humide diminue par l'évaporation de l'eau, et la masse sèche diminue, essentiellement, en raison de la transformation des substrats carbonés en CO₂ et en H₂O (qui s'évaporent).
-

Modèle 3 : influence de la croissance de *D. hansenii* et de l'évolution des concentrations en lactose et lactate sur la perte de poids et l'évolution de la matière sèche des fromages en fonction de la température et de l'humidité relative du hâloir. "modèle généralisé"

- Le fromage est considéré comme un système à deux compartiments : cœur et surface
 - L'évolution des concentrations en lactose et en lactate sont déterminées à partir de la croissance de *D. hansenii* (selon le modèle 1).
 - Tout comme le modèle 2, la masse humide diminue par l'évaporation de l'eau, et la masse sèche diminue, essentiellement, en raison de la transformation du lactose et du lactate en CO₂ et en H₂O, mais les concentrations de ces deux substrats sont calculées selon le modèle 1.
-

Les paramètres de ces modèles ont été déterminés grâce à un programme développé sous Matlab® R14 (The mathworks Inc., USA). Leurs valeurs sont calculées par un ajustement non-linéaire selon l'algorithme de Levenberg-Marquardt (chapitre III.C.4 de la section bibliographie) en considérant les données expérimentales de six essais (appelés essais de d'apprentissage, **figure II.5**), puis validés sur celles des cinq essais restants (dits essais de validation). Ceci permet de vérifier que, dans les limites du plan d'expérience, les résultats du modèle sont extrapolables à d'autres combinaisons de température et d'humidité relative.

Pour chaque modèle, un jeu de paramètres (vecteur de paramètres \vec{w} , chapitre III.C.4 de la section bibliographie) est proposé par le programme d'ajustement de sorte à obtenir la plus basse valeur de l'erreur résiduelle standard (RSE) entre les courbes expérimentales et celles simulées par le modèle selon la **relation II.3** :

$$RSE = \sqrt{\sum \frac{(sim - exp)^2}{n}} \quad \text{relation II.3}$$

sim et *exp* correspondent, respectivement, aux données simulées et aux données expérimentales et *n* est le nombre de mesures réalisées.

A la fin du processus d'optimisation des paramètres du modèle, le programme d'ajustement enregistre plusieurs résultats dans un fichier consultable. Ce fichier reprend non seulement les valeurs des paramètres optimisés mais aussi leurs matrices de covariance et des coefficients de corrélation qui permettent de déceler d'éventuelles corrélations entre les paramètres estimés. Les incertitudes relatives à ces paramètres sont exprimées par un intervalle de confiance à 95 % calculé en utilisant la matrice de covariance obtenue lors du processus d'ajustement (Bury, 1999).

Afin de juger l'importance de ces paramètres dans le modèle, une étude de sensibilité est réalisée. Elle consiste à observer l'effet d'une perturbation, appliquée à un paramètre sur la qualité de prédiction du modèle (Savageau, 1971). Ainsi, les valeurs des paramètres sont

incrémentées, une à une, de 10 % puis l'effet de chacune de ces perturbations sur l'erreur résiduelle standard des prédictions est noté. Ceci permet d'identifier les paramètres ayant le plus d'influence sur les résultats du modèle mais, surtout, de distinguer les phénomènes qui vont influencer fortement les résultats de ceux qui ont une incidence faible. On peut en déduire les grandeurs qu'il est important de connaître avec beaucoup de précision.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

I. Modélisation de la croissance de *Debaryomyces hansenii* et de la consommation des substrats carbonés durant la désacidification et l'affinage d'un fromage de type pâte molle croûte lavée (modèle microbiologique)

A. Résumé

Ce paragraphe traite de la construction et de la validation d'un modèle mécanistique décrivant la croissance de *Debaryomyces hansenii*, la conversion du lactose en lactate par les bactéries lactiques et le transfert de ces deux substrats carbonés du cœur vers la surface, durant l'affinage d'un fromage à pâte molle et à croûte lavée au sein d'un hâloir pilote. Ce modèle intègre les effets de la température et de l'humidité relative de la chambre d'affinage sur les paramètres cinétiques.

Afin de constituer une base de données servant à l'établissement et à la validation du modèle, des fabrications de fromages à pâte molle et à croûte lavée, de type Munster, ont été réalisées à échelle pilote et dans des conditions aseptiques. Les fromages ont étéensemencés par une flore lactique et une flore d'affinage composée d'une levure (*Debaryomyces hansenii* souche 304, UMR GMPA) et d'une bactérie (*Brevibacterium aurantiacum* ATCC 9175). Leur affinage, en hâloir pilote, a duré 14 jours et a été conduit selon un plan d'expérience complet correspondant à neuf combinaisons différentes de température (8, 12 et 16 °C) et d'humidité relative (85, 93, et 99 %).

Le modèle, composé de six équations d'état et de seize paramètres, considère le fromage comme un système à deux compartiments correspondant respectivement au cœur et à la surface. Il permet de prédire la croissance (en surface) de *D. hansenii* et l'évolution des concentrations en lactose et en lactate durant la phase de désacidification aussi bien au cœur qu'à la surface du fromage. La méthode de régression non linéaire, adoptée lors de cette étude,

a permis la détermination d'intervalles de confiance, assez réduits, lors de l'ajustement des paramètres du modèle. Les erreurs résiduelles standard (RSE) de ces prédictions sont satisfaisantes par comparaison avec l'écart type des trois essais répétés sous les conditions de température (12 °C) et d'humidité relative (93 %) correspondant au point central du plan d'expérience. Les essais ayant servi à l'ajustement des paramètres ont des erreurs résiduelles qui ne varient que de 2,9 à 12,8 % par rapport aux erreurs résiduelles calculées pour les essais ayant servi à la validation. Ceci montre que le modèle est capable, dans les limites du plan d'expérience, d'assurer des prédictions dans d'autres combinaisons de température et d'humidité relative. Les résultats obtenus permettent de soutenir l'hypothèse, avancée lors de la construction du modèle, selon laquelle *D. hansenii* consomme le lactose pour sa croissance et le lactate pour sa maintenance.

B. Publication n°1 : A model describing *Debaryomyces hansenii* growth and substrates consumption during a smear soft cheese deacidification and ripening

Accepté pour publication par le Journal of Dairy Science

**A Model Describing *Debaryomyces hansenii* Growth and Substrates Consumption
During a Smear Soft Cheese Deacidification and Ripening**

M.H. Riahi, I.C. Tréléa¹, D. Picque, M.-N. Leclercq-Perlat, A. Hélias, G. Corrieu
UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires
78850 Thiverval-Grignon, France

Interpretive Summary

**A Model Describing *Debaryomyces hansenii* Growth and Substrates Consumption
During a Smear Soft Cheese Deacidification and Ripening.** By Riahi et al., 2006.

Ripening is an important stage of cheesemaking during which the cheese acquires its organoleptic characteristics. At the beginning of this stage, yeasts neutralize the cheese curd allowing the development of other microorganisms producing flavors. This study proposed a mathematic model describing the growth of *Debaryomyces hansenii* (a yeast known for its curd neutralizing activity) as well as its lactose and lactate consumption during a smear soft cheese ripening. The model took into account the external temperature and relative humidity. The proposed predictions were validated on experiments carried out in an aseptic pilot scale ripening chamber.

Abstract

A mechanistic model describing *D. hansenii* growth, lactose conversion into lactate by the lactic acid bacteria as well as lactose and lactate transfer from the core towards the rind,

¹ Corresponding author: Email: trelea@grignon.inra.fr

during the first step (14 days) of the ripening of a smear soft cheese was established. The model included the effects of temperature and relative humidity of the ripening chamber on the kinetic parameters.

Experimental data were collected from experiments carried out in an aseptic pilot scale ripening chamber under nine different combinations of temperature (8, 12, and 16°C) and relative humidity (85, 93, and 99%) according to a complete experimental design.

The model considered the cheese as a system with two compartments (rind and core). It was composed of 6 state equations and 16 parameters. It succeeded in predicting *D. hansenii* growth and the lactose and lactate concentration evolution during the first step of ripening (curd deacidification) in core and rind. The non-linear data-fitting method allowed the determination of tight confidence intervals for the model parameters. The residual standard error (RSE) between model predictions and experimental data was close to the experimental standard deviation between repeated experiments.

Key words: Mechanistic models, curd deacidification, smear soft cheese ripening.

Introduction

Mathematical modeling techniques are being applied to food microbiology problems at an increasing rate. The main objective of these models is to describe microbial growth as a function of environmental process conditions. Such models can be directly used to optimize the process, or to improve product quality. According to the objectives, two main approaches to modeling may be adopted:

(1) Black box models (or data based modeling), this approach establishes models ensuring a statistical correlation of the experimental data without consideration of the phenomena involved.

(2) Mechanistic models based on the underlying biology, chemistry, and physics governing the considered process. Generally, these models employ ordinary or partial differential equations to describe dynamic behaviours, if they exist.

Several models, dealing with some aspects of the cheese ripening, were proposed. A summary of these models is presented below according to an increasing order of complexity.

Empiric models were adopted by several authors. Frau et al. (1999) evaluated the chemical characteristics of Mahon cheeses using principal component analyses (PCA). These authors have found statistical significant differences between cheeses in terms of moisture and non-protein nitrogen contents; these differences were found to be independent of the manufacturing methodology (industrial or traditional). On the contrary, a significant difference was observed for the ash and fat contents between industrial and traditional cheeses. Lues and Bekker (2002) used regression modeling to define the patterns of organic acids concentrations during cheddar cheese ripening. They had proposed nine equations giving the organic acid concentration according to the maturation time with a correlation coefficient (R^2) varying from 0.91 to 0.99. A collective representation of the production of organic acids during maturation was also given. Poveda et al. (2004) applied least squares

regression to predict the ripening time of Manchego cheeses based on some physicochemical parameters. They proposed an empirical equation with pH, water activity and dry matter values as parameters in order to predict the ripening time. Bonaïti et al. (2004) proposed polynomial models to quantify the effects of temperature and relative humidity on kinetic descriptors of curd deacidification by *Debaryomyces hansenii* during smear soft cheeses ripening. These authors showed that the best ripening conditions to achieve an optimum between deacidification and appearance of cheeses were 12°C and 95± 1% of relative humidity. Leclercq-Perlat et al. (2004a) established statistically significant relationships between the different microbiological and biochemical changes during camembert-type cheese ripening. They found that the microorganism concentrations were well correlated with the carbon substrates concentration in cheeses core and rind. Surface pH was significantly related to NH₃ concentration and to *Penicillium camemberti* growth. These empirical models may constitute a basis to build mechanistic models.

Artificial neuronal networks are used to describe complex nonlinear relationships between inputs and outputs, regardless of the underlying phenomena. This approach (also called black box) is more and more used in industrial contexts due to their ability to be easily integrated in a procedure of process control. Hongxu and Gunasekaran (1998) simulated the rheological characteristics of Swiss cheeses using composition and pH measurements as inputs of their model. Paquet et al. (2000) modeled the final pH of Cheddar cheeses from industrial production using ingredient compositions and other processing variables as inputs. In 2004, an artificial neural network model having as inputs several operating data and culture database was developed and enabled successful prediction of the final process time of the acidification step and the optimal timing for the rennet addition for successful cheeses production (Horiuchi *et al.*, 2004). Recently, Jimenez-Marquez et al. (2005) published a neural network

model based on cheesemaking knowledge to predict moisture at the end of the ripening stirred-curd Cheddar cheese.

Mechanistic models, in addition to their ability to simulate the behavior of the process, contribute to the understanding of the physical, chemical and biological phenomena involved. They are based on the underlying laws governing the process behavior. According to this approach, Biazar et al. (2003) proposed a kinetic model for the lactic acid production through submerged fermentation of whey using *Lactobacillus helveticus*. This model accounted for the effect of substrate limitation, substrate inhibition, and maintenance energy on the cell growth, substrate utilization, and lactic acid production during the fermentation process. Gerla and Rubiolo (2003) studied the diffusion phenomena during Pategras cheese ripening. They proposed a deterministic model predicting the effective diffusion coefficients of NaCl, lactic acid and water. Pajonk et al. (2003a) investigated the heat transfer which take place during the Emmental ripening. Values of thermal diffusivity, conductivity and specific heat were measured. Then, a heat transfer model was built according to physical laws and the experimental values previously determined. Recently, Aldarf et al. (2006) proposed a model simulating substrate and metabolite diffusion within a cheese-like medium in relation to *Penicillium camemberti* growth. They showed that limitations in carbonaceous substrate diffusion were not involved in the exponential growth, while nitrogen diffusion limitation accounted for the growth stop.

The aim of the present study was to develop a methodology that would contribute to the understanding of *Debaryomyces hansenii* growth and its lactose and lactate consumption during the deacidification step of a smear soft cheese ripening interacting with changing environmental factors. To meet this goal, a mechanistic model was build and validated based on experimental data. The adopted experimental approach consisted on manufacturing

Munster type cheeses at a pilot scale. Then, they were ripened during 14 days in a ripening chamber with a temperature and relative humidity regulation device.

Materials and Methods

Experiments

In this study, smear soft cheeses (Munster type) prepared from pasteurized milk, were inoculated with a commercial preparation of mesophilic lactic acid bacteria (CHN11, Chr Hansen, Arpajon, France). Two strains were used as ripening flora: *Debaryomyces hansenii* (304, GMPA collection) a yeast known for its curd neutralizing activity and *Brevibacterium aurantiacum* (ATCC 9175) a surface bacterium known as typical for soft smear cheeses (Ratray et Fox, 1999). The cheesemaking and the ripening were carried out under aseptic conditions as described by Bonaïti et al. (2004). Each cheese obtained weighed 300 ± 20 g; its diameter and its thickness were 110 and 30 mm, respectively. Temperature (θ) and relative humidity (RH) of the ripening chamber were measured using a combined sensor (Vaissala, Dewpoint transmitter HMP 243, Etoile International, Paris).

On the first day of ripening (d1), temperature and relative humidity of the ripening chamber remained constant at $12\pm 1^\circ\text{C}$ and $85\pm 2\%$, respectively. Then, from d2 to d14, they were fixed at defined values (8°C , 12°C , or 16°C) and (85%, 93%, or 99%) according to a complete factorial experimental design. The run carried out under the central conditions of the experimental design (12°C of temperature and 93% of relative humidity) was repeated three times. In this way, 11 runs were realized under 9 conditions of temperature and relative humidity (Table 1). Total renewal of the gaseous atmosphere (period for a total renewal = 2 h) was applied during all ripening process. On d6, the cheeses were turned. On d14 cheeses were wrapped and removed from the ripening chamber to carry on their ripening at 4°C till d42. In this study only the first fourteen days were considered, with a particular attention paid to the phenomenon of curd neutralization (deacidification). One cheese was sampled daily.

Concentrations of *Debaryomyces hansenii* total cells, lactose, and lactate were determined in the core as well as in the rind, as described by Bonaïti et al. (2004).

Cheese Compartments

Cheeses were divided into rind and core as shown in (Figure 1). The compartment volumes were noted V_C for the core and V_R for the rind. The volume fraction τ_C of the core was given by:

$$\tau_C = \frac{V_C}{V_R + V_C} = 0.66 \quad (1)$$

And the volume fraction of the rind τ_R was:

$$\tau_R = 1 - \tau_C = 0.34 \quad (2)$$

Basic Assumptions

Debaryomyces hansenii. As shown by Soulignac (1995) and reported by Leclercq-Perlat et al. (2004a), in liquid medium and aerobic conditions *D. hansenii* used simultaneously lactose and lactate as substrate. Moreover, its growth rate was higher in the presence of lactose than in a lactose-lactate mixture and much more than in the presence of lactate alone. Bonaïti et al. (2004) investigated *D. hansenii* growth on the rind (its concentration is 100 times higher in the rind than in the core) in relation to ripening time of a smear soft cheese as well as the evolution of lactose and of lactate concentrations in the rind and in the core of the same set of cheeses. Figure 2 summarizes the evolution of these concentrations. According to their results, a parallelism was noted between the *D. hansenii* growth and its substrate consumption as follows. *D. hansenii* growth can be roughly divided into four phases (Figure 2): the first one between d1 and d4 (exponential growth phase), the second one between d4 and d10 (growth deceleration phase), the third one between d10 and d14 (stationary phase). The fourth

phase was performed out of the ripening chamber, at 4°C after cheese wrapping, and was not considered in this study as previously indicated.

During phase I (from d1 to d4) it was assumed that *D. hansenii* used the lactose as carbon source for its growth. During the growth deceleration phase (from d4 to d10) there was no more lactose in the rind and the *D. hansenii* growth was slowed down. The growth rate was probably limited by lactose diffusion rate from core to rind. From d10 till d14 (stationary phase) *D. hansenii* growth stopped and there was no more lactose neither in rind nor in core. However, Lactate was continuously consumed by *D. hansenii*.

These observations lead to the assumption according to which *D. hansenii* used the lactose as carbon source for its growth and the lactate for its maintenance.

Lactic Acid Bacteria (LAB). LAB are present in the rind and in the core. It is assumed that their concentration remains constant during the cheese ripening (Lortal et Chapot-Chartier, 2005). Their main role during cheese ripening is the conversion of lactose into lactate.

Lactose. Lactose is converted into lactate by the LAB in the core and in the rind. It is also consumed by *D. hansenii* at the cheese surface. In addition, lactose is transferred from the core towards the rind due to a concentration gradient (Leclercq-Perlat *et al.*, 2000a).

Lactate. Lactate is produced by the LAB in the core and in the rind. It is transferred towards the rind due to a concentration gradient, where it is consumed by *D. hansenii*.

These assumptions allowed building a mechanistic model composed of five differential equations describing the evolution of *D. hansenii*, lactose and lactate concentrations in the rind and in the core during the ripening.

Model Equations

***D. hansenii* Concentration.** The growth rate of *D. Hansenii* was modeled by the classical Monod law, taking into account the fact that the limiting substrate was lactose, as discussed above:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \cdot \frac{Lo_R}{ks_{Lo(Dh)} + Lo_R} \cdot X \quad (3)$$

where μ_{\max} is the maximum specific growth rate of *D. hansenii* (d^{-1}), Lo_R is the lactose concentration in the rind (mmol/kg), $ks_{Lo(Dh)}$ is *D. hansenii* saturation constant for lactose (mmol/kg) and X is the total cell concentration of *D. hansenii* (10^8 .cfu/g).

Lactose Concentration. During ripening, the lactose concentration in the core depends on the amount transferred to the rind, and on the amount consumed by the LAB in this compartment (in the core the lactose consumption by *D. hansenii* is negligible compared to that of the LAB). The transfer rate of lactose from the core towards the rind was assumed proportional to the concentration difference between these two compartments. The lactose consumption by the LAB was described by a Monod-like model taking into account the fact that the LAB population was constant during ripening. So, the mass balance of lactose in the core gives:

$$\frac{dLo_C}{dt} = -\frac{K_{Lo} \cdot (Lo_C - Lo_R)}{\tau_C} - v_{\max} \cdot \frac{Lo_C}{ks_{Lo(LAB)} + Lo_C} \quad (4)$$

where K_{Lo} is the lactose transfer coefficient between the core and the rind (d^{-1}), τ_C is the volume fraction of the core (dimensionless), Lo_C is the lactose concentration in the core (mmol/kg), Lo_R is the lactose concentration in the rind (mmol/kg), v_{\max} is the LAB maximum specific lactose consumption rate (mmol/kg.d) and $ks_{Lo(LAB)}$ is the LAB saturation constant for lactose (mmol/kg).

Similarly to the core, the lactose concentration in the rind depends on the amount transferred from the core and on the amount consumed by the microorganisms evolving in the rind. In addition to the LAB, *D. hansenii* also uses lactose as substrate for its growth. So, the evolution rate of the lactose in the rind was described as follows:

$$\frac{dLo_R}{dt} = \frac{K_{Lo} \cdot (Lo_C - Lo_S)}{\tau_R} - v_{\max} \cdot \frac{Lo_R}{ks_{Lo(LAB)} + Lo_R} - \frac{1}{Y_{X/Lo}} \cdot \mu_{\max} \cdot \frac{Lo_R}{ks_{Lo(Dh)} + Lo_R} \cdot X \quad (5)$$

Where $Y_{X/Lo}$ is the yield coefficient for *D. hansenii* growth on lactose (10^8 .cfu/mmol).

It should be noted that the model equations (3 to 5) were applied to phases I through III mentioned in Figure 2. The differences between phases mainly arise because of different values of available lactose concentration: not limiting neither in the core nor in the rind in phase I, limiting in the rind only in phase II, and absence of lactose in phase III.

Lactate Concentration. The lactate concentration in the core depends on the amount transferred to the rind on one side, and on the amount produced by the LAB from lactose conversion on the other side. So, the evolution rate of the lactate in the core is described as:

$$\frac{dLa_C}{dt} = -\frac{K_{La} \cdot (La_C - La_R)}{\tau_C} + Y_{La/Lo} \cdot v_{\max} \cdot \frac{Lo_C}{ks_{Lo(LAB)} + Lo_C} \quad (6)$$

where $Y_{La/Lo}$ is the yield coefficient for lactose-lactate conversion (mmol of lactate /mmol of lactose).

In the rind, the lactate concentration, in addition to amount transferred from the core and to that produced by the LAB, depends on the amount consumed by *D. hansenii*. So, the evolution of the lactate in the rind in relation to time was written as:

$$\frac{dLa_R}{dt} = \frac{K_{La} \cdot (La_C - La_R)}{\tau_R} + Y_{La/Lo} \cdot v_{\max} \cdot \frac{Lo_R}{ks_{Lo(LAB)} + Lo_R} - m_{\max} \cdot \frac{La_R}{ks_{La} + La_R} \cdot X \quad (7)$$

Where m_{\max} is the maintenance coefficient (mmol/ 10^8 .cfu.d).

Temperature and Relative humidity Effects. To account for the effects of temperature and relative humidity on the kinetic parameters (μ_{\max} , ν_{\max} and m_{\max}) linear relationships of the following form were used:

$$P = P_{central} + \theta_p(\theta - 12) + RH_p(RH - 93) \quad (8)$$

The generic parameter P is one of μ_{\max} , ν_{\max} and m_{\max} ; $P_{central}$ is the parameter value of the parameter for runs carried out under the central conditions of the experimental design (12°C, 93%RH), θ_p is the effect of temperature on the considered parameter (1/°C) and RH_p is the effect of relative humidity (1/%).

Fitting the Model Parameters

The overall model has 16 parameters. Three of them were kinetic parameters (μ_{\max} , ν_{\max} , m_{\max}), six represented temperature and relative humidity effects on these kinetic parameters ($\theta_{\mu_{\max}}$, $\theta_{\nu_{\max}}$, $\theta_{m_{\max}}$, $RH_{\mu_{\max}}$, $RH_{\nu_{\max}}$, $RH_{m_{\max}}$), three described the substrate limitation ($ks_{Lo(Dh)}$, $ks_{Lo(LAB)}$, ks_{La}), two described the transfer of lactose and of lactate from the core towards the rind (K_{Lo} , K_{La}), and finally two represented the conversion yield of lactate from lactose and *D. hansenii* cell production yield from lactose ($Y_{La/Lo}$, $Y_{X/Lo}$) respectively.

The parameters were determined with a data-processing program developed under Matlab® R14 (The mathworks Inc., USA). Their values were calculated using a nonlinear least squares data-fitting by the Levenberg-Marquardt method (Marquardt, 1963) based on the experimental data of six out of the eleven runs (called calibration runs), then they were validated in the other five runs (called validation runs) (Table 1). The uncertainty on the parameter values was expressed by a confidence interval at 95% calculated using the so-called local information matrix (Bury, 1999) obtained during the model fitting process. The quality

of the fit was assessed by the residual standard error (**RSE**) between experimental and predicted data:

$$RSE = \sqrt{\sum \left(\frac{sim - exp}{n} \right)^2} \quad (9)$$

Where *sim* is the simulated data, *exp* is the experimental data and *n* is the number of samples.

In the special case of the saturation constants (ks_{La} , $ks_{Lo(LAB)}$, $ks_{Lo(Dh)}$) which can not be determined reliably in the case of batch fermentations (Bastin et Dochain, 1990), their values were set according to the literature.

Saturation constants were calculated by different methods for some lactic acid bacteria strains (Willem Schepers *et al.*, 2002; Biazar *et al.*, 2003) and some yeast strains (Ghaly et El-Taweel, 1997; Barba *et al.*, 2001; Ghaly *et al.*, 2005). All these authors reported that these constants were highly dependent on the microorganism strain and on the pH of the medium. Consequently, the saturation constants adopted for the present study were average values. The LAB saturation constant for lactose $ks_{Lo(LAB)}$ was set at 10 mmol/kg and the *D. hansenii* saturation constant for lactose $ks_{Lo(Dh)}$ and for lactate ks_{La} were both settled at 20 mmol/kg.

Results

Model Fitting

The fitted model parameters are given in Table 2 together with their 95% confidence intervals. These confidence intervals are quite small, indicating that model parameters can be determined accurately from the selected calibration runs. The RSE between experimental data and model predictions were calculated for each run. It appeared that the average RSE of the validation runs were close to those of the calibration runs (Table 3). This shows the generalization ability of the model to other combinations of operating conditions (within the domain explored by the experimental design) not used for calibration.

Since the saturation constants were fixed according to the literature, the influence of their values on the model predictions was assessed in Table 4. As explained by Bastin and Dochain (1990), it appeared that the exact knowledge of the saturation constants is not critical. Indeed, the effect of their modification by $\pm 90\%$ has a quite limited effect on the model predictions.

Growth of D. hansenii

Figure 3 shows the predicted and experimental growth curves of *D. hansenii* during ripening for the eleven runs of the experimental design. The model succeeded in simulating the three growth phases of *D. hansenii*: the exponential growth phase between d1 and d4, the decelerating growth phase between d4 and d10, and the stationary phase until d14. Whatever the run, the model predicted a *D. hansenii* concentration close to 7×10^9 cfu/g at d14. Except for runs (12°C ; 93%RH)a and (16°C ; 93%RH) the RSE between experimental data and predicted *D. hansenii* growth curves was contained between 0.09 and 0.53 log₁₀(cfu/g) which is acceptable for a microbial growth estimation. Moreover, the average RSE of the validation runs was smaller than standard deviation (SD) of the three repetitions of the run carried out under the central conditions of the experimental design (12°C ; 93%RH a, b and c) (Table 3).

For the runs carried out under the central conditions of the experimental design, the determined value of the maximum specific growth rate μ_{\max} was equal to 1.21 d⁻¹ (Table 2).

The response surface plots of the maximum specific growth rate of *D. hansenii* μ_{\max} (Figure 6A) showed significant positive effects of temperature and relative humidity on this parameter. Its highest value was obtained for the run (16°C ; 99%RH) and was equal to 1.64 d⁻¹, and its lowest value was 0.72 d⁻¹ obtained for the run (8°C ; 85%RH).

The LAB Activity

The LAB concentration was assumed constant during the ripening and the model described only their ability to convert lactose into lactate. According to the adopted data-fitting method

and for the runs carried out under the central conditions of the experimental design ν_{\max} was equal to 6.83 mmol/kg.d (Table 2). The response surface plots of the LAB maximum specific lactose consumption rate ν_{\max} (figure 6B) showed that temperature and relative humidity increase had positive effects on this parameter. However, the temperature has an effect more important on ν_{\max} than the relative humidity. Indeed, a variation of 14% of the relative humidity increased the ν_{\max} value only by 5%, whereas a variation of 8°C of the temperature increased the ν_{\max} value by 15%. The highest value of ν_{\max} was obtained for the run (16°C; 99%RH) and was close to 7.4 mmol/kg.d, and its lowest value was close to 6.2 mmol/kg.d obtained for the run (8°C ; 85%RH). The model also indicated that the yield coefficient for lactose-lactate conversion $Y_{La/Lo}$ of the LAB used in this study was 2.72 (Table 2).

Evolution of the Lactose Concentration

Figure 4 shows the evolution of the predicted and experimental lactose concentration in the rind and in the core during the ripening for the eleven runs. The lactose concentrations decreased quickly, regardless of the considered cheese compartment. Lactose was assimilated on the cheese rind and its concentration was negligible beyond d5. In the core the lactose concentration was higher than in the rind, but the overall changes were similar. Lactose concentrations in the cheese core became negligible on d10-13. The RSE calculated between experimental data and predicted lactose concentrations in the rind varied between 1.94 and 15.2 mmol/kg for a variation of the rind lactose concentration between 0 and 80 mmol/kg. In the core, it was noticed that the predictions of the runs (12°C ; 85%RH) and (12°C ; 99%RH) had the highest RSE 22.0 and 26.4 mmol/kg, respectively. For these two runs, between d5 and d10 the experimental data indicated a quasi constant value of the lactose concentration in the core. The model was not able to simulate this unusual phenomenon which remains unexplained. For the other runs, considering a variation of the lactose concentration between

0 and 140 mmol/kg, the values of RSE ranging between 4.29 and 15.6 mmol/kg were satisfactory, in spite of the fact that the average RSE of the validation runs was higher than the average standard deviation between the runs carried out under the central conditions of the experimental design (Table 3).

Evolution of the Lactate Concentration

Figure 5 shows the evolution of the predicted and experimental lactate concentration in the rind and in the core during the ripening for the eleven runs. In most cases, the model succeeded first in simulating the acidification phenomenon (lactate concentration increase) observed from d1 to d4, and secondly in predicting the lactate final concentrations. Lactate concentrations increased in the core and in the rind between d1 and d3. This acidification phenomenon was previously observed by Leclercq-Perlat et al. (2000a). On d3, the lactate concentration was maximal. Then, from d4 to d14 it decreased due to *D. hansenii* activity, the only microorganism able to metabolize lactate in the case of this study. Considering the overall variation of the lactate concentration (between 0 and 600 mmol/kg), the calculated RSE were satisfying. For the rind the RSE were ranging between 14.9 and 68.1 mmol/kg, and between 23.2 and 59.9 mmol/kg for the prediction of the lactate concentration in the core. It was noticed that it was always the run (12°C; 93%RH) which increased the average RSE of the model's predictions. Moreover, the average RSE of the validation runs was smaller than the SD between the three repetitions of the runs carried out under the central conditions of the experimental design (Table 3).

The maintenance coefficient m_{\max} (expressing the consumption of lactate by *D. hansenii*) was equal to 0.17 mmol/10⁸.cfu.day (Table 2) for the runs carried out under the central conditions of the experimental design. The response surface plots of m_{\max} (figure 6C) showed positive effects of temperature and relative humidity increase. However, the relative humidity effect on m_{\max} was more important than the temperature effect. Indeed, for runs carried out at 8°C a variation of 14% of the relative humidity (from 85 to 99%) increased the

m_{\max} value by more than 100 times according to relation (8) and as represented in the figure 6 ; whereas for runs carried out at 85% of relative humidity a variation of 8°C of the temperature (from 8 to 16°C) increased the m_{\max} value by 40 times according to the same relation (8). It was also noticed that for the run (8°C ; 85%RH) the value of m_{\max} was close to zero (0.002 mmol/10⁸.cfu.d) and that its highest value 0.31 mmol/10⁸.cfu.d was obtained for the run (16°C ; 99%RH).

Sensitivity of the Model Parameters

In order to evaluate the sensitivity of the model predictions with respect to the parameter values, these values were incremented by 10%. The effect of this modification on the average RSE of each simulation was shown in Table 5. For example, it appeared that a variation of 10% of the maximum specific growth rate of *D. hansenii* would improve the average RSE of *D. hansenii* concentration by 5.7% but would worsen by 11% the RSE of the lactose concentration in the rind. The same variation of the LAB specific lactose consumption rate v_{\max} mainly affected the estimation of lactose and lactate concentrations in the core, while the maintenance coefficient m_{\max} affected the estimation of the lactate concentrations in the core and in the rind. As expected, Table 5 also showed that the prediction of the lactate concentration is related to the consumption rate of lactose by the LAB (v_{\max}) and to the yield of lactose-lactate conversion ($Y_{La/Lo}$).

A variation of 10% of the lactose transfer coefficient K_{Lo} affected the prediction of *D. hansenii* growth and of lactose concentration in the core. The variation of the lactate transfer coefficient K_{La} only affected the values of lactate concentration in the rind.

Among the parameters expressing the effects of temperature and relative humidity, only $\theta_{m_{\max}}$ and $RH_{m_{\max}}$ changed the RSE of the lactate concentration in the core and in the rind significantly.

Discussion

The first days of ripening (d1 to d4) corresponded to the exponential growth phase of *D. hansenii*. During this phase *D. hansenii* used lactose as carbon source and its maximum specific growth rate μ_{\max} was 1.21 d^{-1} for the runs ripened under the central conditions of the experimental design (12°C ; 93%RH a, b, and c). This value was higher than the one given by Bonaïti et al. (2004), namely 0.81 d^{-1} (the value reported by these authors as μ_{\max} was in fact μ_{\max}/\log_{10}). The difference between these two values was due to the adopted determination method. The value reported by Bonaïti et al. (2004) represents an average growth rate calculated by linear regression between d2 and d4, while the value reported in this work is a theoretical maximal one, if no growth limitation was present (equation 3).

The *D. hansenii* growth was strongly influenced by the ripening temperature and relative humidity. Between the extreme points of the experimental design, the maximum specific growth rate value varied by almost two times.

Bonaïti et al. (2004) calculated the maximal lactose decrease rate (D_{LO}) by linear regression between d3 and d10. The D_{LO} was expressing the decrease in the lactose concentration in the core due to both LAB consumption and transfer to the surface what justify the fact that their D_{LO} value (9.5 mmol/kg.d) was 30% higher than the LAB maximum lactose consumption rate ν_{\max} calculated in the present study.

The commercial preparation of mesophilic lactic acid bacteria used in this study was a mixture of heterofermentative and homofermentative strains, which is consistent with the obtained $Y_{\text{La/La}}$ value (2.72). Indeed, if they were exclusively homofermentative (producing neither CO_2 nor ethanol), a lactose molecule would give four lactate molecules thus the value of $Y_{\text{La/La}}$ would be close to four. Similarly, it would be close to two if the strains were exclusively homofermentative.

Between d1 and d3, the lactate produced by the LAB was not entirely consumed by *D. hansenii* whose concentration was low in this period. Consequently the lactate concentration increased, and this evolution was well described by the model.

Concerning the final lactate concentration on d14, large differences between the runs were noticed. The differences seemed closely related to the relative humidity of the ripening chamber. Indeed, the lactate concentration was low (between 50 and 250 mmol/kg) for the runs carried out at 99% of relative humidity and high (between 380 and 400 mmol/kg) for the runs carried out at 85% of relative humidity. This was due to the positive influence of a high relative humidity on the metabolic activity of *D. hansenii* (Figure 6C) as reported by Payne and Bruce (2001).

For the runs carried out at 99% of relative humidity, for which *D. hansenii* metabolic activity was not limited by the hygrometry, it was observed that the lactate concentration on d14 was lower when the ripening temperature was higher: 297 mmol/kg in the rind for the run (8°C ; 99%RH) and 20 mmol/kg for the run (16°C ; 99%RH). This reflects the positive effect of a temperature increase on the metabolic activity of *D. hansenii*. The last two results confirm the results of Payne and Bruce (2001) which followed a four months incubations at 8 to 25°C of temperature and 93 to 100% of relative humidity and found that the maximum increase in viable *D. hansenii* cell count occurred at 100% relative humidity and 15°C.

The lactose transfer coefficient between the cheese compartments was nearly four times lower than the one of lactate (Table 3). This is probably linked to the difference between the molecular weight of lactose (342.3 g/mol) and of lactate (90.08 g/mol) and to interactions with the complex cheese matrix.

Conclusions

A mechanistic model describing the growth of *D. hansenii* and the lactic acid bacteria activity in relation to the substrate consumption, as well as the lactose and lactate transfer between the cheese core and rind was built and experimentally validated.

The model parameters could be determined with small confidence intervals. The model succeeded in predicting the *D. hansenii* growth as a function of the temperature and relative humidity of the ripening chamber and the evolution of lactose and lactate concentrations during ripening. It has also simulated the curd acidification during the three first days and the lactose and lactate final concentrations. The modeling residual standard errors (RSE) were satisfying when compared to the standard deviation of the repeated experiments. The average RSE of the validation runs were close to those of the calibration runs indicating the generalization ability of the model to other operating conditions within the experimental design limits.

The model parameters suggest that *D. hansenii* growth and lactic acid bacteria activity was influenced by both temperature and relative humidity of the ripening chamber. The assumption according to which the considered strain of *D. hansenii* consumed lactose for its growth and lactate for its maintenance appeared reasonable.

References

- Aldarf, M., Fourcade, F., Amrane, A. and Prigent, Y. 2006. Substrate and metabolite diffusion within model medium for soft cheese in relation to growth of *Penicillium camembertii*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33(8): 685-692.
- Barba, D., F. Beolchini, G. Del Re, G. Di Giacomo, and F. Veglio. 2001. Kinetic analysis of *Kluyveromyces lactis* fermentation on whey: batch and fed-batch operations. *Process Biochem.* 36(6):531-536.
- Bastin, G. and D. Dochain. 1990. Dynamic models for bioreactors. *in* On-line estimation and adaptative control of bioreactors. Elsevier, Amsterdam - Oxford - New York.

- Biazar, J., M. Tango, E. Babolian, and R. Islam. 2003. Solution of the kinetic modeling of lactic acid fermentation using Adomian decomposition method. *Appl. Math. Comput.* 144(2-3):433-439.
- Bonaïti, C., M. N. Leclercq-Perlat, E. Latrille, and G. Corrieu. 2004. Desacidification by *Debaryomyces hansenii* of smear soft cheeses ripened in controlled conditions : Influences of relative humidity and of temperature. *J. Dairy Sci.* 87(11):3976-3988.
- Bury, K. 1999. Continuous distributions. *in* Statistical distributions in engineering. Cambridge University Press, Cambridge (UK).
- Frau, M., S. Simal, A. Femenia, E. Sanjuan, and C. Rosselo. 1999. Use of principal component analysis to evaluate the physical properties of Mahon cheese. *Eur. food res. technol.* 210:73-76.
- Gerla, P. E. and A. C. Rubiolo. 2003. A model for determination of multicomponent diffusion coefficients in foods. *Journal of Food Engineering.* 56(4):401-410.
- Ghaly, A. E. and A. A. El-Taweel. 1997. Kinetic modelling of continuous production of ethanol from cheese whey. *Biomass and Bioenergy.* 12(6):461-472.
- Ghaly, A. E., M. Kamal, and L. R. Correia. 2005. Kinetic modelling of continuous submerged fermentation of cheese whey for single cell protein production. *Bioresour. Technol.* 96(10):1143-1152.
- Hongxu, N. and S. Gunasekaran. 1998. Food quality prediction with neural networks. *Food Technol.* 52(10):60-65.
- Horiuchi, J.-i., T. Shimada, H. Funahashi, K. Tada, M. Kobayashi, and T. Kanno. 2004. Artificial neural network model with a culture database for prediction of acidification step in cheese production. *Journal of Food Engineering.* 63(4):459-465.
- Jimenez-Marquez, S. A., J. Thibault, and C. Lacroix. 2005. Prediction of moisture in cheese of commercial production using neural networks. *Int. Dairy J.* 15(11):1156-1174.
- Leclercq-Perlat, M.-N., A. Oumer, J.-L. Bergere, H.-E. Spinnler, and G. Corrieu. 2000. Behavior of *Brevibacterium linens* and *Debaryomyces hansenii* as ripening Flora in controlled Production of smear soft cheese from Reconstituted Milk : Growth and substrate consumption. *J. Dairy Sci.* 83(2):1665-1673.
- Leclercq-Perlat, M. N., F. Buono, D. Lambert, H. E. Spinnler, and G. Corrieu. 2004. Controlled Production of Camembert-Type Cheeses : Part I. Microbiological and physicochemical evolutions. *J. Dairy Res.* 71(3):346-354.
- Lortal, S. and M.-P. Chapot-Chartier. 2005. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *Int. Dairy J.* 15(6-9):857-871.

- Lues, J. F. R. and A. C. M. Bekker. 2002. Mathematical Expressions for Organic Acids in Early Ripening of a Cheddar Cheese. *J. Food Compos. Anal.* 15(1):11-17.
- Marquardt, D. 1963. An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. *SIAM J. Appl. Math.* 11:431-441.
- Pajonk, A. S., R. Saurel, and J. Andrieu. 2003. Experimental study and modeling of effective NaCl diffusion coefficients values during Emmental cheese brining. *Journal of Food Engineering.* 60(3):307-313.
- Paquet, J., C. Lacroix, and J. Thibault. 2000. Modeling of pH and Acidity for Industrial Cheese Production. *J. Dairy Sci.* 83(11):2393-2409.
- Payne, C. and A. Bruce. 2001. The Yeast *Debaryomyces hansenii* as a Short-Term Biological Control Agent against Fungal Spoilage of Sawn *Pinus sylvestris* Timber. *Biological Control.* 22(1):22-28.
- Poveda, J. M., A. Garcia, P. J. Martin-Alvarez, and L. Cabezas. 2004. Application of partial least squares (PLS) regression to predict the ripening time of Manchego cheese. *Food Chem.* 84(1):29-33.
- Rattray, F. P. and P. F. Fox. 1999. Aspects of enzymology and biochemical properties of *Brevibacterium linens* relevant to cheese ripening : A review. *J. Dairy Sci.* 82(5):891-909.
- Soullignac, L. 1995. Propriétés des levures fromagères. Influence des sources de carbone utilisées sur leurs aptitudes à désacidifier les caillés et à former des composés d'arôme. PhD thesis, Institut National Agronomique de Paris-Grignon, France, INA-PG.
- Willem Schepers, A., J. Thibault, and C. Lacroix. 2002. *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part II: kinetic modeling and model validation. *Enzyme and Microbial Technology.* 30(2):187-194.

Table 1. A 2-factor, 3-level complete factorial experimental design (3^2) according to which runs were carried out in a regulated ripening chamber during 14 days

		Temperature		
		Low level	Medium level	High level
Relative humidity	High level	(8°C ; 99%RH) ⁽¹⁾	(12°C ; 99%RH) ⁽¹⁾	(16°C ; 99%RH) ⁽¹⁾
	Medium level		(12°C ; 93%RH) a ⁽¹⁾	
			(8°C ; 93%RH) ⁽²⁾	(12°C ; 93%RH) b ⁽²⁾
Low level			(12°C ; 93%RH) c ⁽²⁾	
		(8°C ; 85%RH) ⁽¹⁾	(12°C ; 85%RH) ⁽²⁾	(16°C ; 85%RH) ⁽¹⁾

⁽¹⁾: Calibration runs

⁽²⁾: Validation runs

a, b, and c represent three repetitions of the run carried out under the central conditions of the experimental design.

Table 2. Values of the parameters obtained by non linear regression and their confidence intervals at 95%

Parameter	value	Confidence intervals
μ_{\max}	1.21	[1.14 ; 1.28]
ν_{\max}	6.83	[6.33 ; 7.37]
m_{\max}	0.17	[0.15 ; 0.18]
K_{Lo}	0.08	[0.07 ; 0.09]
K_{La}	0.26	[0.22 ; 0.30]
$Y_{X/Lo}$	2.78	[2.50 ; 3.03]
$Y_{La/Lo}$	2.72	[2.48 ; 2.99]
$\theta_{\mu_{\max}}$	0.070	[0.069 ; 0.071]
$RH_{\mu_{\max}}$	0.026	[0.018 ; 0.034]
$\theta_{\nu_{\max}}$	0.12	[0.09 ; 0.14]
$RH_{\nu_{\max}}$	0.02	[0.01 ; 0.03]
$\theta_{m_{\max}}$	0.010	[0.009 ; 0.011]
$RH_{m_{\max}}$	0.016	[0.015 ; 0.017]

μ_{\max} = maximum specific growth rate of *D. hansenii* (d^{-1}), ν_{\max} = LAB maximum specific lactose consumption rate (mmol/kg.d), m_{\max} = Maintenance coefficient (mmol/ 10^8 .cfu.d), K_{Lo} = Lactose transfer coefficient between the core and the rind (d^{-1}), K_{La} = Lactate transfer coefficient between the core and the rind (d^{-1}), $Y_{La/Lo}$ = Yield coefficient for lactose-lactate conversion (mmol of lactate/mmol of lactose), $Y_{X/Lo}$ = Yield coefficient for *D. hansenii* on lactose (10^8 .cfu/mmol), $\theta_{\mu_{\max}}$, $\theta_{\nu_{\max}}$, $\theta_{m_{\max}}$ = Effects of the temperature on μ_{\max} , ν_{\max} and m_{\max} respectively ($1/^\circ C$), $RH_{\mu_{\max}}$, $RH_{\nu_{\max}}$ and $RH_{m_{\max}}$ = Effects of the relative humidity on μ_{\max} , ν_{\max} and m_{\max} respectively(1/%).

Table 3. Average residual standard error (RSE) of the calibration and validation runs together with the standard deviation (SD) between the repeated runs

	Average RSE of the calibration runs	Average RSE of the validation runs	SD between the repeated runs
<i>D. hansenii</i> growth (log10(cfu/g))	0.41 ± 0.04	0.47 ± 0.02	0.68 ± 0.02
Lactose concentration in the rind (mmol/kg)	6.99 ± 0.89	6.65 ± 0.55	4.51 ± 0.15
Lactose concentration in the core (mmol/kg)	12.58 ± 0.31	12.95 ± 0.46	5.40 ± 0.35
Lactate concentration in the rind (mmol/kg)	42.72 ± 1.53	34.82 ± 1.15	45.33 ± 1.28
Lactate concentration in the core (mmol/kg)	38.68 ± 1.94	36.20 ± 1.67	50.47 ± 2.22

Table 4. Influence of the saturation constants values on the model predictions. Nominal values of $ks_{Lo(Dh)}$, $ks_{Lo(LAB)}$ and ks_{La} were set at 20, 10 and 20 mmol/kg, respectively. The variations of the average RSE were established for a 90% increase and decrease of these 3 constants

Saturation constant	Value (mmol/kg)	Variations (in%) of the average RSE				
		<i>D. hansenii</i> growth	Lactose concentration (rind)	Lactose concentration (core)	Lactate concentration (rind)	Lactate concentration (core)
$ks_{Lo(Dh)}$	2	-2.1	0.5	0.3	0.7	-0.7
$ks_{Lo(LAB)}$	1	0.2	0.4	0.6	0.2	0.3
ks_{La}	2	0.0	0.0	1.0	0.2	-1.4
$ks_{Lo(Dh)}$	38	2.4	1.6	0.1	1.0	1.5
$ks_{Lo(LAB)}$	19	-0.9	1.0	-0.5	-0.4	0.8
ks_{La}	38	0.0	0.0	-1.0	1.4	2.5

ks_{La} = *D. hansenii* saturation constant for lactate (mmol/kg), $ks_{Lo(LAB)}$ = LAB saturation constant for lactose (mmol/kg), $ks_{Lo(Dh)}$ = *D. hansenii* saturation constant for lactose (mmol/kg).

Table 5. Effect of a 10% variation of the model parameters on the average RSE of the calculated simulations

Incremented parameter	Variations (in%) of the average RSE				
	<i>D. hansenii</i> concentration	Lactose concentration (rind)	Lactose concentration (core)	Lactate concentration (rind)	Lactate concentration (core)
μ_{\max}	-5.7 ⁽¹⁾	+11.0 ⁽¹⁾	+0.1	+0.3	-1.3
ν_{\max}	+1.7	-0.7	+2.3 ⁽¹⁾	+0.8	+3.7 ⁽¹⁾
m_{\max}	+0.0	+0.0	+0.3	-4.9 ⁽¹⁾	+4.6 ⁽¹⁾
K_{Lo}	-4.0 ⁽¹⁾	+0.3	+3.1 ⁽¹⁾	-0.6	-0.6
K_{La}	+0.2	-0.2	+0.1	-2.4 ⁽¹⁾	-0.8
$Y_{X/Lo}$	+10.8 ⁽¹⁾	+2.3 ⁽¹⁾	+0.2	-0.2	+0.9
$Y_{La/Lo}$	+0.0	+0.0	+0.3	-0.4	+8.5 ⁽¹⁾
$\theta_{\mu\max}$	-0.5	-0.5	+0.2	-1.2	-0.2
$RH_{\mu\max}$	+0.1	+0.2	+0.3	-1.1	+0.8
$\theta_{\nu\max}$	+0.9	+0.1	+0.7	-0.9	+1.5
$RH_{\nu\max}$	+0.0	+0.2	+0.3	-0.2	-0.7
$\theta_{m\max}$	+0.0	+0.0	+0.3	-3.1 ⁽¹⁾	-2.2 ⁽¹⁾
$RH_{m\max}$	+0.0	+0.0	+0.3	-2.7 ⁽¹⁾	+2.2 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ : Significant variation ($P < 0.05$)

μ_{\max} = maximum specific growth rate of *D. hansenii* (d^{-1}), ν_{\max} = LAB maximum specific lactose consumption rate (mmol/kg.d), m_{\max} = Maintenance coefficient (mmol/ 10^8 .cfu.d), K_{Lo} = Lactose transfer coefficient between the core and the rind (d^{-1}), K_{La} = Lactate transfer coefficient between the core and the rind (d^{-1}), $Y_{La/Lo}$ = Yield coefficient for lactose-lactate conversion (mmol of lactate/mmol of lactose), $Y_{X/Lo}$ = Yield coefficient for *D. hansenii* on lactose (10^8 .cfu/mmol), $\theta_{\mu\max}$, $\theta_{\nu\max}$, $\theta_{m\max}$ = Effects of the temperature on μ_{\max} , ν_{\max} and m_{\max} respectively ($1/^\circ C$), $RH_{\mu\max}$, $RH_{\nu\max}$ and $RH_{m\max}$ = Effects of the relative humidity on μ_{\max} , ν_{\max} and m_{\max} respectively (1/%).

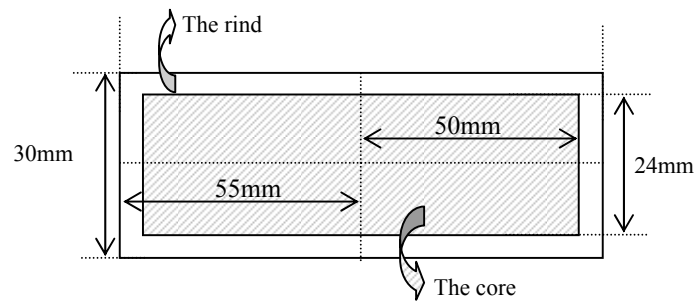


Figure 1. Schematic representation (definition and size) of the two cheese compartments

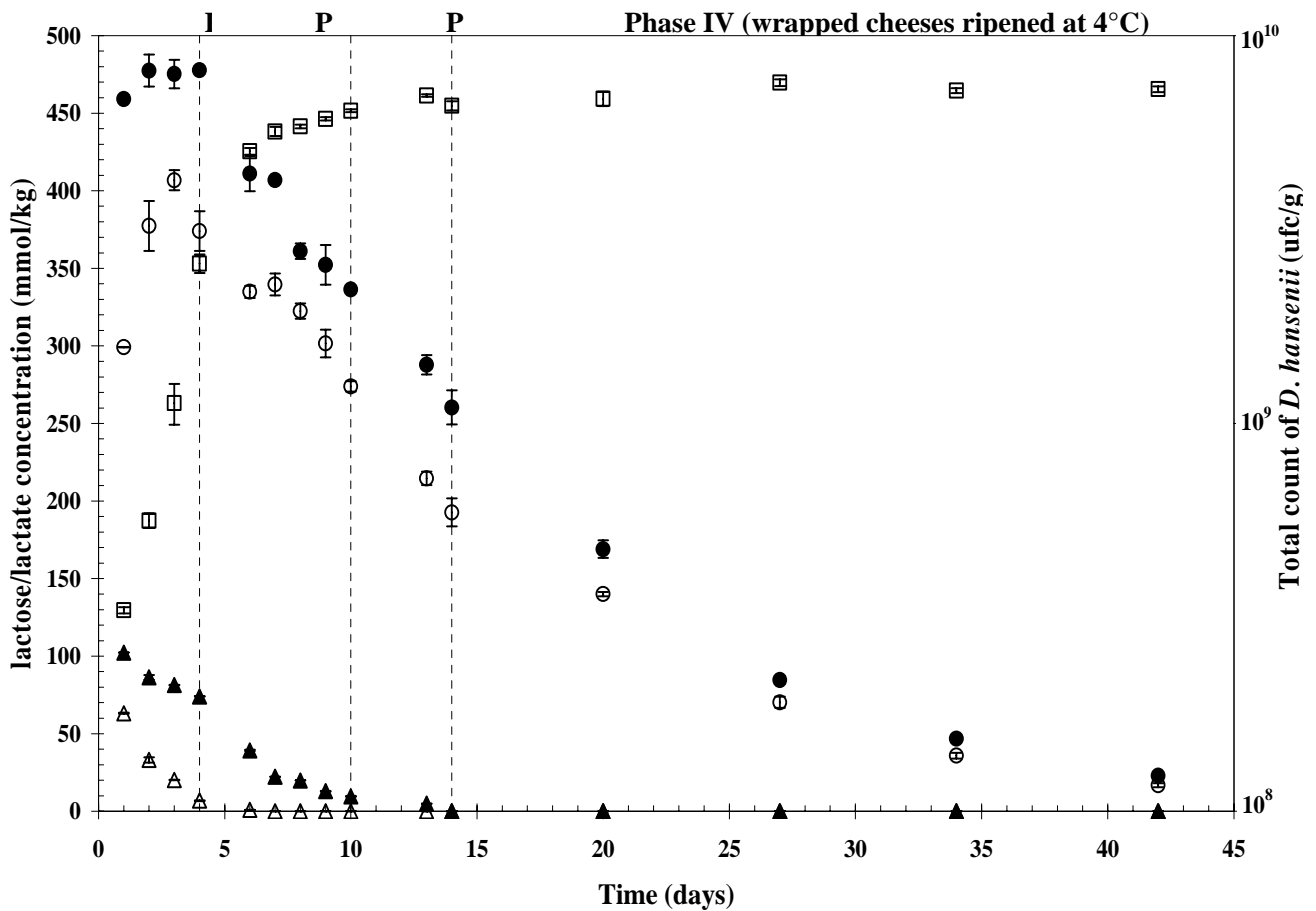


Figure 2. *D. hansenii* growth (\square), concentration of lactose in the rind (Δ) and in the core (\blacktriangle), and concentration of lactate in the rind (\circ) and in the core (\bullet) in relation to the ripening time of a smear soft cheese (Bonaïti *et al.*, 2004). The phases I (exponential growth of *D. hansenii*), II (growth deceleration) and III (stationary phase) were performed under controlled conditions of temperature and relative humidity in the ripening chamber. The phase IV concerned wrapped cheeses and was not considered in this study

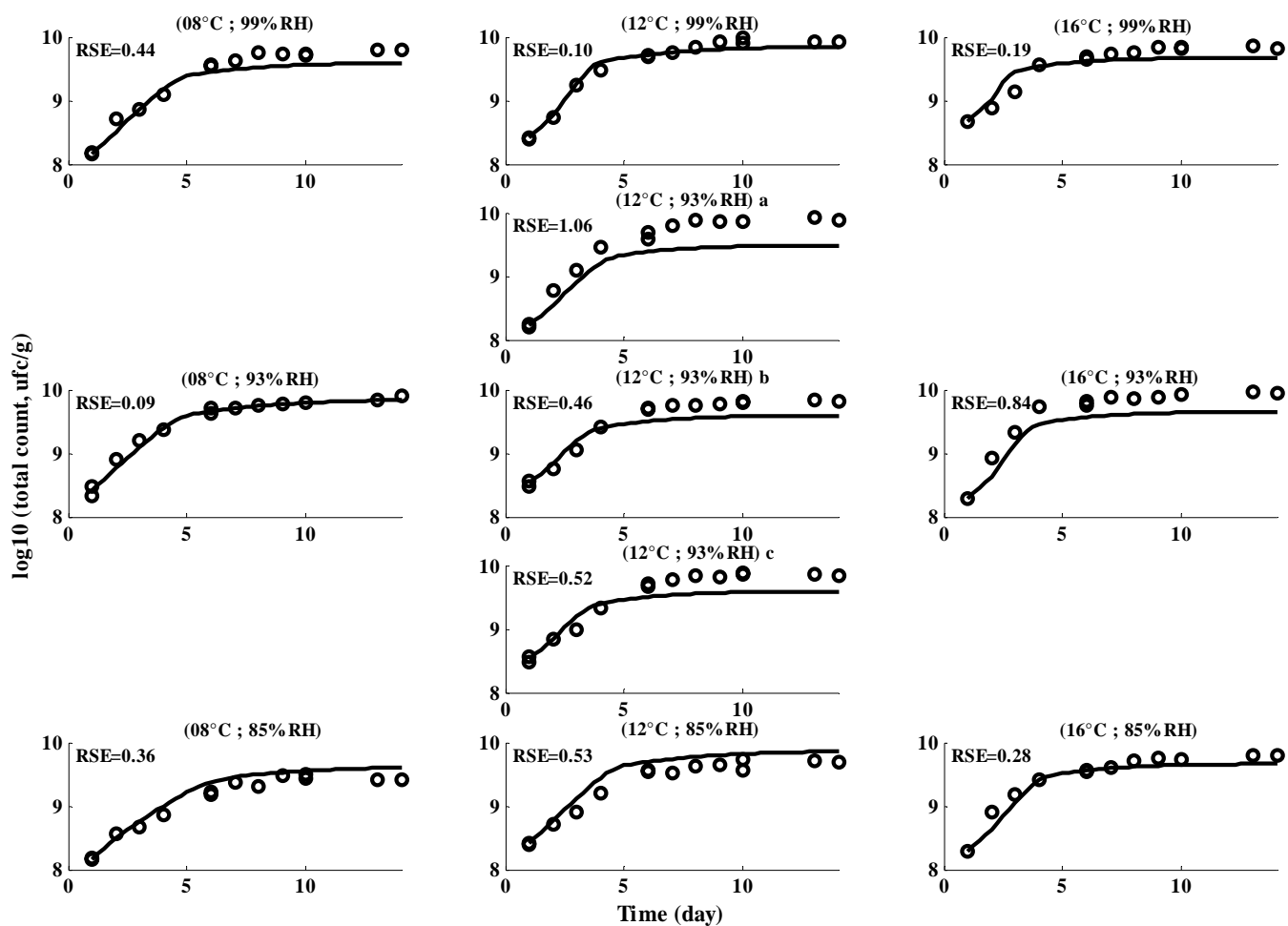


Figure 3. Experimental (○) and predicted (—) concentrations of *D. hansenii* in the rind versus ripening time according a 2-factor, 3-level experimental design. The residual standard error (RSE) in log₁₀(cfu/g) was reported for each run

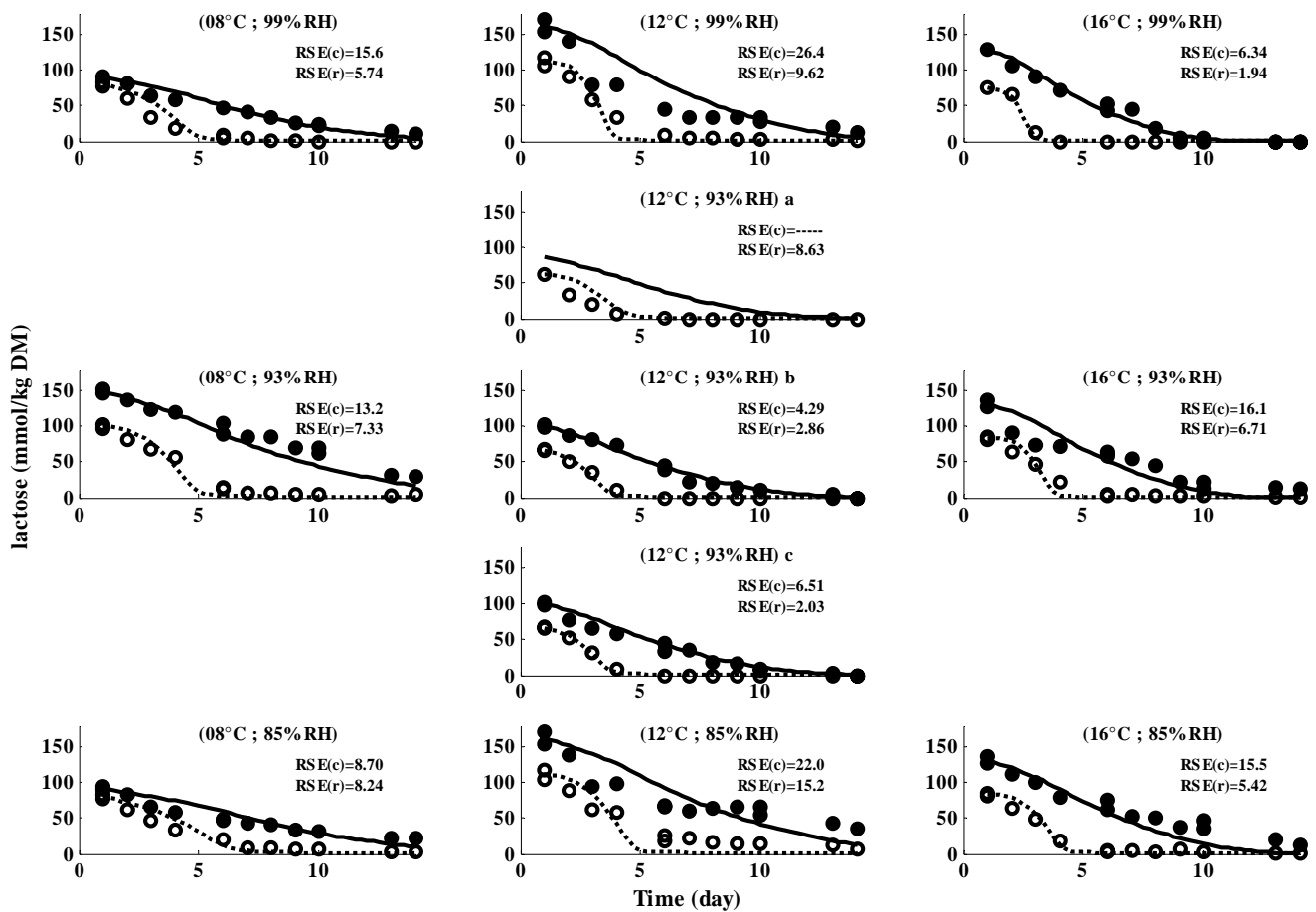


Figure 4. Experimental (●,○) and predicted (—,⋯) evolution of lactose concentration versus ripening time of a smear soft cheese according a 2-factor, 3-level experimental design in the rind (○, ⋯) and in the core compartment (●, —). For the run (12°C; 93% RH)a the experimental data of the core were not available. The residual standard error (RSE) in mmol/kg was reported for each run for the core (c) and for the rind (r) lactose concentrations

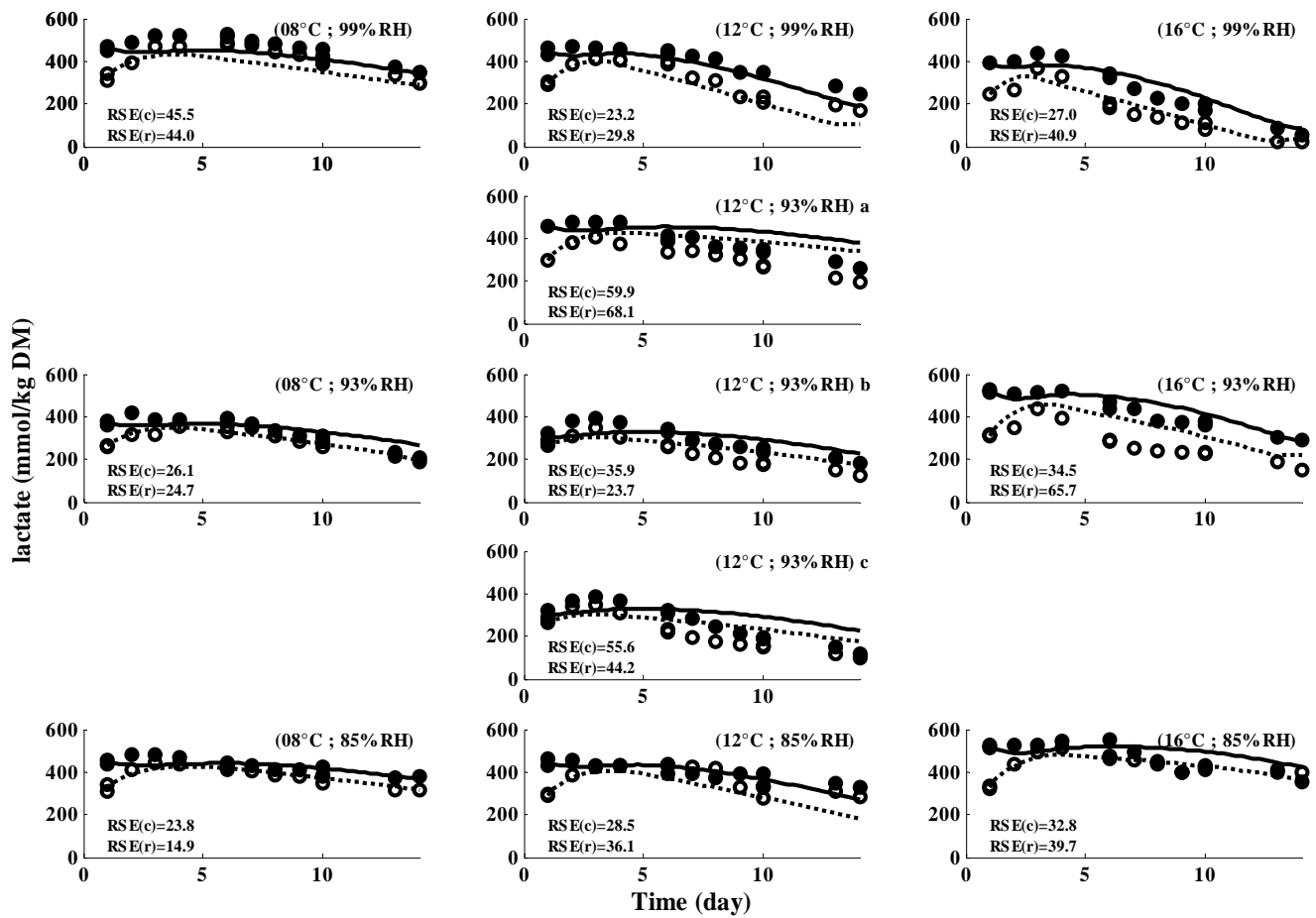


Figure 5. Experimental (●○) and predicted (— ···) evolution of lactate concentration versus ripening time of a smear soft cheese according a 2-factor, 3-level experimental design in rind (○ ···) and in core compartment (● —). The residual standard error (RSE) in mmol/kg was reported for each run for the core (c) and for the rind (r) lactate concentrations

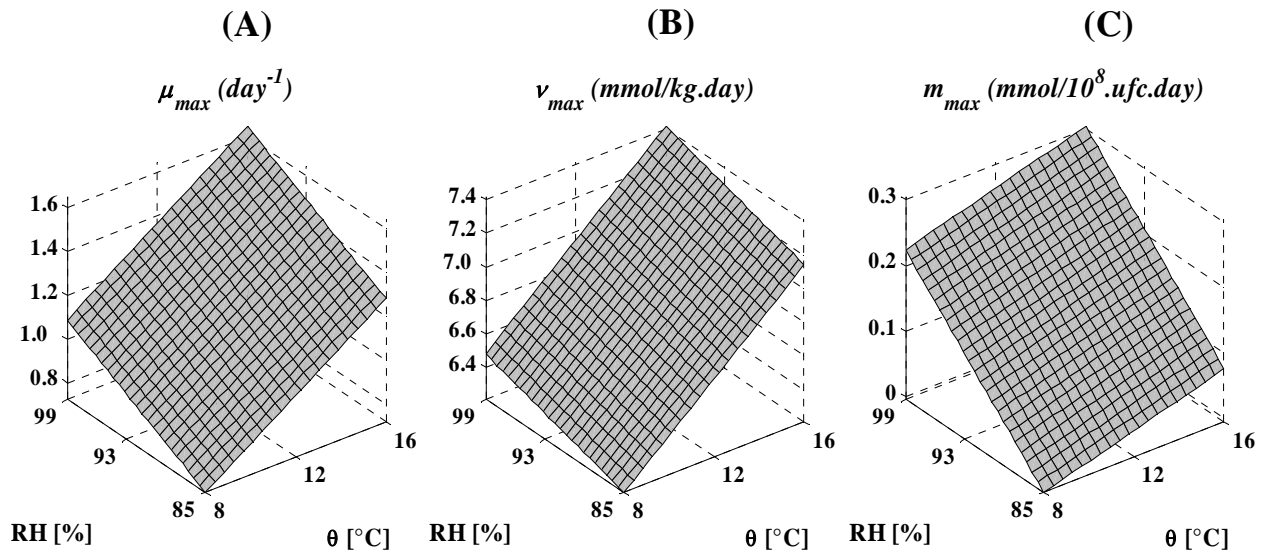


Figure 6. Response surface plots of the kinetic model parameters as a function of temperature (θ) and relative humidity (RH). (A) = μ_{max} : maximum specific growth rate of *D. hansenii* (1/day), (B) = v_{max} : maximum specific lactose consumption rate of lactic acid bacteria (mmol/kg.day), (C) = m_{max} : Lactate maintenance coefficient of *D. hansenii* (mmol/10 8 .cfu.day)

II. Modélisation de la perte de poids et de l'évolution de la matière sèche durant l'affinage d'un fromage de type pâte molle croûte lavée (modèle perte de poids)

A. Résumé

Un modèle mécanistique capable de prédire, pendant l'affinage d'un fromage à pâte molle et à croûte lavée de type Munster, la perte de poids et l'évolution de la teneur en matière sèche au cœur et à la surface a été développé lors de cette étude.

Les données expérimentales proviennent d'essais de fabrication et d'affinage de fromages réalisés à l'échelle pilote et d'une manière aseptique. Ces fromages ont étéensemencés, en plus des bactéries lactiques, par une flore d'affinage composée d'une levure *Debaryomyces hansenii* et d'une bactérie *Brevibacterium aurantiacum*. Leur affinage en hâloir a été conduit sous neuf combinaisons différentes de température (8, 12 et 16 °C) et d'humidité relative (85, 93 et 99 %) selon un plan d'expérience complet. Pour chaque essai, 16 échantillons ont été analysés à de diverses étapes de l'affinage.

Le modèle décrit dans cet article est composé de quatre paramètres ajustables et ses équations d'état tiennent compte de la perte d'eau par évaporation, du transfert de l'eau du cœur vers la surface du fromage et de la perte de masse par dégagement du CO₂. Ce modèle est parvenu à prédire la perte de poids et l'évolution de la teneur en matière sèche, en cœur et en surface, avec des erreurs résiduelles standard moyennes proches de la précision des mesures expérimentales, pour toutes les conditions de température et d'humidité relative testées. Les résultats expérimentaux montrent que la perte de poids est plus sensible aux variations de l'humidité relative qu'à celles de la température de la chambre d'affinage. Les paramètres de ce modèle suggèrent que l'activité de l'eau à la surface des fromages peut être considérée comme

quasi constante et proche de 1. Les résultats obtenus avec ce modèle montrent aussi que les hypothèses avancées, selon lesquelles le lactose et le lactate sont complètement oxydés en CO_2 et en O_2 et l'oxygène atmosphérique ne contribue pas à la perte de poids, sont justifiées.

B. Publication n°2 : Model for changes in weight and dry matter during the ripening of a smear soft cheese under controlled temperature and relative humidity

Accepté pour publication par l' International Dairy Journal

M.H. Riahi, I.C. Tréléa*, M.-N. Leclercq-Perlat, D. Picque, G. Corrieu

Unité Mixte de Recherche Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (UMR GMPA)
F-78850 Thiverval-Grignon, France

Abstract

A model predicting the weight loss and the dry matter increase in the core and in the rind of a French smear soft cheese (Munster type) has been developed. Experimental data have been collected from experiments carried out in an aseptic pilot scale ripening chamber under nine different combinations of temperature (8, 12 and 16°C) and of relative humidity (85, 93 and 99%) according to a complete experimental design. For each run 16 samples have been analyzed at various ripening stages. The model took into account the water loss by evaporation, the water transfer from the core to the surface and the mass loss due to the CO₂ release. The cheese weight loss was more influenced by the relative humidity than by the temperature. The model was able to account for the experimental weight loss as well as the rind and the core dry matter, with accuracy acceptable for practical use.

Keywords: Dynamic modelling; Smear soft cheeses; Ripening; Weight loss; Dry matter

1. Introduction

It is generally admitted that the cheese ripening process implies weight loss due to both dehydration and CO₂ release. During dehydration, water is vaporised from the cheese surface to the ripening chamber atmosphere. Several studies have been carried out on the state of water and its disposability in the cheese matrix. Geurts et al.(1974) have studied the water binding to milk protein by several methods (particularly sorption isotherms). They have found that cheeses were able to bind 0.10 to 0.15 g water/g protein. This binding capacity was hardly affected by pH and salt content. Van Vliet & Walstra (1994) have studied the effects of pH and temperature on the casein aggregates structure by rheometry and NMR. They have showed that the structure of the casein aggregates determined the easiness with which water could be removed from casein. This result was confirmed by a recent study (Hinrichs et al., 2004) carried out on fresh cheeses in order to detect changes of their water-holding capacity using the non-destructive low resolution nuclear magnetic resonance (LR-NMR). These authors found a high correlation between the cheese mechanical consistency (state of the casein network) and the water retention capacity.

In cheeses, the water is transferred from the wet surface to the air by evaporation. This phenomenon is governed by the difference between the partial vapour pressure at the cheese surface and the partial vapour pressure in the air. This difference depends on the relative humidity of the air and on the water activity at the cheese surface. Generally, for a given temperature, the water activity of the cheese surface depends on the water content, which is related to the salt concentration as shown by Hardy (1997). Due to the principles of molecular transport, a certain time was required (6-8 days for a soft cheese) for the achievement of a uniform profile of salt concentration throughout the cheese (Gomes et al., 1998). Consequently, water activity of the cheese surface was not constant during the first days of

ripening and a model was needed in order to describe its profile. The sorption isotherm, which represents graphically the water activity (a_w) against the water content (X) at constant temperature, is a common way of presenting the relationship between these two parameters (McLaughlin & Magee, 1998). Numerous mathematical models were proposed, such as the Guggenheim–Anderson–de Boer (GAB), Brunauer-Emmett-Teller (BET) (Wang & Brennan, 1991). The GAB model was reported to be the best for fitting sorption isotherm data for the majority of food products under a_w levels of approximately 0.9 (Tsami et al., 1998). However, above 0.9 the water activity was seldom accurately measured or studied (Esteban et al., 1991).

The water evaporation from the cheese surface generates the transfer of water from the core towards the surface by molecular diffusion (Karahadian & Lindsay, 1985). Several studies have dealt with the mobility of water and its diffusion profile in the curd. Payne & Morison (1999) developed a theoretical model of salt and water diffusion in Gouda cheeses during brine salting, based upon the Maxwell–Stefan multi-component diffusion equation. The equation used was able to take into account diffusive interactions between salt, water and the cheese matrix. This model was used to predict changes in the salt and moisture profiles, and dimensions of the cheese. The best solutions were obtained when the diffusivities were made functions of porosity and salt concentration. According to Simal et al. (2001), high humidity led to a lower drying rate. Thus, a diffusive model was developed assuming that the external resistance to mass transfer could not be neglected in these cases and solved by a finite difference method. The external mass transfer coefficient was estimated from the literature. This mathematical model was used to identify water and salt effective diffusivity coefficients by using experimental data of ripening experiments carried out on parallelepiped Mahon cheeses.

In addition to the water loss, the release of CO_2 resulting mainly from glycolysis and

proteolysis, represents a significant part of the global weight loss of cheeses. During the cheese making phase, lactose is essentially converted into lactic acid (lactate) by the lactic acid bacteria. Lactate is then metabolized by yeasts, which initially dominate the surface microflora, to CO₂ and H₂O. This consumption of lactate causes an increase of the cheese surface pH. When the lactate is exhausted, coryneform bacteria metabolize amino acids, released from the caseins (McSweeney & Sousa, 2000). Proteolysis plays an important role in the development of textural changes in the cheese curd, due to breakdown of the protein network, decrease in a_w through water binding by liberated carboxyl and amino groups, and increase in pH.

Mass yield is an important element affecting the economy of the cheese industry. The most pertinent factor of the cheese yield is the final moisture content (Emmons, 1991). This factor is influenced by ripening temperature and relative humidity (Weissenfluh & Puhon, 1987; Macedo et al., 1997).

Modelling and predicting the cheese moisture and weight loss is thus the first step in the control of cheese yield. The aim of this study was to build a mathematical model in order to calculate the weight loss and the dry matter during the ripening of a model smear soft cheese, considering the effect of temperature and of relative humidity in the ripening chamber. The model took into account both water loss due to evaporation and carbon loss due to CO₂ release.

2. Material and methods

2.1. Experiments

Model cheeses were prepared from pasteurised milk inoculated with *Debaryomyces hansenii* (304, GMPA) and *Brevibacterium aurantiacum* (ATCC 9175) under aseptic conditions as described by Leclercq-Perlat et al. (2000). Each cheese obtained weighed 300±20g, its

diameter and its thickness were 110mm and 30 mm, respectively.

The temperature (θ) and the relative humidity (RH) of the ripening chamber were measured using a combined sensor (Vaissala, Dewpoint transmitter HMP 243, Etoile International, Paris). For each ripening run, the weight of one cheese was continuously measured by a balance (Précisa 9670M, Paris, France, accuracy 0.01g), in order to follow on-line the changes during ripening in chamber (volume = 1 m³).

On the first ripening day (d1), the temperature and the relative humidity of the ripening chamber remained constant at 12±1°C and 85±2%, respectively. Then, from d2 to d14, they were fixed at a defined values (8°C, 12°C or 16°C) and (85%, 93% or 99%) according to the experimental design. Total renewal of the gaseous atmosphere (period for a total renewal = 2 h) was performed during all ripening process. On d6, the cheeses were turned. On d14, the temperature and the relative humidity were changed to 12°C and 85 %, respectively. Cheeses were wrapped on d15 and then ripened at 4°C until d42. Between d2 and d14, a cheese was taken daily for analysis (dry matter, pH, lactose and lactate concentrations) as described by Bonaïti et al. (2004). Between d15 and d42, a cheese was analyzed every four or five days. Thus, for each run sixteen cheeses were analyzed.

2.2. Model

a. Compartments of a cheese

In order to calculate the weight loss and the dry matter in the rind and in the core, cheeses were divided into external compartment (rind, noted E) and central compartment (core, noted C) as shown in Figure 1. This division corresponds to the way the cheese was cut for analysis. Compartments were considered as cylinders with volumes V_E and V_C respectively. The radius and the height of the external compartment were R_E and h_E respectively, whereas

R_C) and h_C were those of the central one. The volume fraction (τ_C) of the central compartment was given by:

$$\tau_C = \frac{V_C}{V_C + V_E} = 0.66 \quad (1)$$

And the volume fraction of the external compartment was:

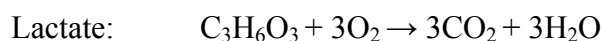
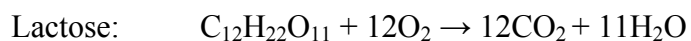
$$\tau_E = 1 - \tau_C = 0.34 \quad (2)$$

b. Evolution of the cheese weight in time

On the first day of ripening (d1), the cheese had a total mass ($m(1)$) which was the sum of a dry mass ($mD(1)$) and of a wet mass ($mW(1)$). During ripening, $mW(t)$ decreased due to the water evaporation, and $mD(t)$ decreased because of the transformation of carbon into CO_2 and water (called “metabolic water” in contrast to the whey water already present in cheese).

c. Evolution of the dry mass in time

On the beginning of ripening phase, the main sources of carbon present in the curd were lactose and lactate. By taking into account the initial concentrations of lactose and of lactate and by admitting that their decomposition into CO_2 and H_2O was total, it could be noted that carbon loss formed an important part of the total weight loss. Indeed, the degradation of one mole of lactose produced twelve moles of CO_2 , and one mole of lactate gave three moles of CO_2 :



The initial concentration of lactose (LO) and of lactate (LT) in cheeses allowed the calculation of the weight of the released CO_2 . According to these equations, it was observed that there are

as many oxygen atoms coming from the atmosphere as oxygen atoms contained in the CO₂ molecule. Therefore, it was assumed that the oxygen atoms of the CO₂ molecules did not contribute to the cheese weight loss. Moreover, these degradation reactions brought a surplus of “metabolic water” (eleven moles by lactose decomposition reaction and three moles by lactate one). This water surplus was also taken into consideration. Therefore, the degradation of one mole of lactose generated 144g of carbon and 198g of H₂O, and one mole of lactate gave 36g of carbon and 54g of H₂O. These data served to calculate the production yields. The production yield of carbon from lactate (Y_{CLT}) was obtained by dividing the carbon mass (generated by one mole of lactate) by the molecular weight of lactate $Y_{CLT}=36/90$. Similarly, the production yield of carbon from lactose (Y_{CLO}) was equal to 144/342, the production yield of H₂O from lactate ($Y_{H_2O/LT}$) was equal to 54/90 and the production yield of H₂O from lactose ($Y_{H_2O/LO}$) was equal to 198/342.

The cheese density was considered homogeneous at the beginning of the ripening (d1); thus the volume fraction was equal to the mass fraction. In this way, the mass of each compartment was calculated. The initial dry mass in the external compartment was:

$$mD_E(1) = \tau_E \cdot m(1) \cdot \frac{DM_E(1)}{100} \quad (3)$$

where $DM_E(1)$ was the dry matter of the external compartment on d1. Then the variation of the dry mass of the external compartment ($mD_E(t)$) was expressed in terms of variations of lactose and lactate concentrations and the corresponding yields, as follows:

$$mD_E(t) = mD_E(1) - [mD_E(1)(Y_{CLO} + Y_{H_2O/LO})(LO_E(1) - LO_E(t))] - [mD_E(1)(Y_{CLT} + Y_{H_2O/LT})(LT_E(1) - LT_E(t))] \quad (4)$$

In the central compartment, the initial dry mass ($mD_C(1)$) and its variation in time ($mD_C(t)$) were similar to those of the external compartment by replacing the subscript letter E by C in the equations (3) and (4).

d. Water exchange between compartments

As mentioned in the introduction, water content variations during ripening were due to two mechanisms: the evaporation of water at the curd surface and its migration from the central compartment towards the external compartment. X denoted the water content and was defined by:

$$X = \frac{mW}{mW + mD} \quad (5)$$

The initial mass of water in the central compartment on d1 was given by:

$$mW_C(1) = \tau_C \cdot m(1) \frac{(100 - DM_C(1))}{100} \quad (6)$$

In order to determine the mass of water transferred from the central compartment towards the external compartment, a mass balance was established:

$$\frac{d mW_C(t)}{dt} = -S_C \cdot K_C \cdot (X_C(t) - X_E(t)) \quad (7)$$

Where (S_C) was the surface of the contact zone between the central and the external compartment and (K_C) represented the water transfer coefficient between the two compartments.

The initial water mass in the external compartment on d1 was:

$$mW_E(1) = \tau_E \cdot m(1) \frac{(100 - DM_E(1))}{100} \quad (8)$$

The evolution of this mass in time included the loss of water exchanged between the external compartment and the air, as well as the mass of water brought by diffusion from the central to the external compartment. Thus, the mass balance was given by:

$$\frac{d m W_E(t)}{dt} = S_C \cdot K_C \cdot (X_C(t) - X_E(t)) - S_E \cdot K_E \cdot (P_E - P_A) \quad (9)$$

where (S_E) was the surface of the contact zone between the external compartment and the air, and (K_E) was the water transfer coefficient between the curd and the air.

The partial vapour pressure (P_E) associated to the external compartment was a function of two parameters: (i) the mean water activity of the external compartment (a_w) which depended on the temperature and on the water content of this compartment (X_E) ; (ii) the saturating vapour pressure (P_{vapSat}) which also depended on the temperature. This could be written as:

$$P_E = a_w \cdot P_{vapSat} \quad (10)$$

The partial vapour pressure in the air (P_A) was a function of the relative humidity (RH) and the saturating vapour pressure (P_{vapSat}) which depended on the temperature of the air. This could be written as:

$$P_A = \left(\frac{RH}{100} \right) \cdot P_{vapSat} \quad (11)$$

Independently of the run, it was verified experimentally that after two hours the temperature of the cheese surface was equal, within measurement uncertainty, to the atmospheric one, noted (θ) . The saturating vapour pressure was modelled by the equation given by Mascarenhas et al. (1997):

$$P_{\text{vapSat}} = \exp\left(27.4658 - \frac{5750.38}{\theta + 273.15}\right) \cdot (1 - 0.0045 \cdot \theta) \quad (12)$$

The profile of the cheese surface water activity was modelled using the GAB equation. It described the equilibrium moisture content (X) as a function of (a_w):

$$X = \frac{C \cdot k \cdot x_0 \cdot a_w}{(1 - k \cdot a_w) \cdot (1 - k \cdot a_w + C \cdot k \cdot a_w)} \quad (13)$$

where (x_0) was described in the literature as the monolayer water content and (C) and (k) were GAB model constants. By assuming $C = 1$ (this parameter had little influences on a_w in the considered range of 0.9 -1) the equation (13) became:

$$a_w = \frac{X}{k \cdot x_0 + k \cdot X} \quad (14)$$

Finally, the model had 4 unknown parameters (K_E , K_C , x_0 and k). They were estimated with a data-processing program developed under Matlab® R11 (The MathWorks Inc., USA). The parameter values were calculated using a nonlinear data-fitting method based on the dry matter measurements of four runs (99%RH;8°C), (99%RH;16°C), (85%RH;8°C) and (85%RH;16°C). An average residue was also calculated expressing the global difference between the model and the experimental data. The parameters were optimized in order to obtain the lowest value of this average residue. Then, the calculated parameters were applied to all the other runs for validation.

e. Model validation

Model validation was based on the comparison of the measured dry matter and the relative weight loss with the calculated ones. The total mass of the cheese (m) was calculated as the sum of the masses two compartments, which in turn include water and dry masses:

$$m(t) = m_C(t) + m_E(t) = (mD_C(t) + mW_C(t)) + (mD_E(t) + mW_E(t)) \quad (15)$$

The relative weight loss Δm was calculated according to the following equation:

$$\Delta m = \frac{m(t)}{m(1)} \cdot 100 \quad (16)$$

The dry matter of the central compartment $DM_C(t)$ was obtained by:

$$DM_C(t) = \frac{mD_C(t)}{mD_C(t) + mW_C(t)} \cdot 100 \quad (17)$$

The dry matter of the external compartment $DM_E(t)$ was calculated in a similar way.

3. Results and discussion

The four model parameters (K_E , K_C , x_0 and k) were fitted to the experimental dry matter data of runs (99%RH;8°C), (99%RH;16°C), (85%RH;8°C) and (85%RH;16°C). The resulting values, together with their 95% confidence intervals are reported in Table 1.

It appears from Table 1 that k is not significantly different from 1 and x_0 is not significantly different from 0. According to equation 14, this means that the water activity of the cheese remains nearly constant and close to 1. This result is in apparent disagreement with those of the literature, in particular, those of Marcos et al. (1981). These authors showed that, for camembert and brie cheeses the water activity followed a profile related to the NaCl concentration according to: $a_w = 1 - 0.00565 \cdot [\text{NaCl}]$. By applying this equation to our cheeses,

which had an average NaCl concentration of 1.8 g/100g of cheese, one gets $a_w = 0.990$. This disagreement is probably due to the fact that the experiments considered in this study were not specifically designed for an accurate determination of the water activity. The result $a_w \approx 1$ obtained in this paper should be interpreted in the sense that, as far as the dry matter and the weight loss are concerned, the simplifying assumption $a_w = 1$ remains reasonable taking into account the accuracy of the measurements. The difference of cheese-making technologies used (smear soft cheese in the present case and mould-ripened cheese in the study of Marcos et al. (1981)) also make direct comparisons difficult.

The value of water transfer coefficient between the external compartment and the air was $K_E = 1.13 \cdot 10^{-8} \text{ kg.m}^{-2}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$, which is comparable, but significantly lower, than e.g. the value found by (Mirade et al., 2004) of $4 \cdot 10^{-8} \text{ kg.m}^{-2}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$ for an air velocity of 0.1 ms^{-1} . The air velocity in the considered ripening chamber could not be measured exactly being too low, but was certainly lower than 0.05 ms^{-1} . Another explanation of the lower value of K_E is that (Mirade et al., 2004) used plaster moulds instead of real cheeses.

The water transfer coefficient between the central and the external compartment (K_C) depended on the geometry and the definition of the cheese compartments. Thus, its value could not be compared to other values of the literature.

Figure 2 shows the comparison between experimental and predicted dry matter in the external compartment during the first 15 days of ripening under different values of temperatures and of relative humidity. The accuracy of the relative humidity sensor ($\pm 2 \% RH$) was taken into account so the model predictions for each run were calculated for the specified relative humidity with $\pm 2 \% RH$, limited to 100% for the runs at 99% RH.

The analysis of the experimental data showed that the evolution of the rind dry matter in time was strongly dependent on the relative air humidity. For the three runs carried out under a high relative humidity (99%), the rind dry matter was almost constant. It increased by 3% for the run (99%RH;12°C) and by 0% for the run (99%RH;16°C), between d1 and d14. However, for the runs carried out under a low relative humidity (85%), the rind dry matter increased by 26% for the run (85%RH;12°C) and by 19% for the run (85%RH;16°C), during the same period. This reflects the fact that the water flux is proportional to the driving force, which is the difference between the vapour pressure at the cheese surface, and the vapour pressure of water in the air, which in turn depends on the relative humidity (equation 11).

It was also observed that the dry matter increased until d15 and remained nearly constant afterwards (data not shown). This was due to the wrapping on d15. During this period, there was no more water exchange between the cheese surface and the air (Desobry & Hardy, 1994). The model took into account this phenomenon by considering the water transfer coefficient between the cheese and the air (K_E) equal to zero beyond d15. The model succeeded in describing both the evolution phase (d1-d15) and the constant phase (d15-d41).

The overall accuracy of the model was expressed as the residual standard deviation between experimental and computed values. Its value (3.1% in dry matter units) was close to the experimental accuracy which was limited by the cheese heterogeneity in the ripening chamber.

The behaviour of the core dry matter was similar to that of the rind (data not shown), even if the values reached on d15 were lower. Rind dry matter ranged between 40 and 65%, whereas that of the core was between 39 and 58%.

Figure 3 shows the relative weight loss during ripening of smear soft cheeses under different

values of temperature and of relative humidity. As for the dry matter, the accuracy of the relative humidity sensor ($\pm 2\%$ RH) was taken into consideration.

The experiments performed during this study, in particular those concerning the on-line measurements of the cheese weight loss, showed that this loss depended more on relative humidity than on temperature. For the runs carried out under same relative humidity but various temperatures, the final weight loss was only different by 3 to 6%. On the other hand, for runs carried out at the same temperature but at different values of relative humidity, the final weight loss (on d15) varied between 12 and 13%. This phenomenon was due to the fact that the relative humidity acted directly on the evaporation rate and thus on the mass of the water loss, whereas the temperature influenced mainly the kinetics of the enzymatic reactions leading to the CO₂ release, and consequently it acted on the mass of carbon loss. By taking into account both the contribution of the carbon loss (20%) and of the water loss (80%) on the total weight loss, the predominance of the relative humidity effect on the total weight loss was justified.

The analysis of the experimental results also showed that the run (93%RH;12°C) had an unexpected behaviour. Normally, its weight loss values should range between those observed for the runs carried out under 93% of relative humidity (93%RH;8°C) and (93%RH;16°C), as well as between those of runs undertaken under 12°C (85%RH;12°C) and (99%RH;12°C). But for this run, this was not the case. An experimental error was therefore the most likely explanation for this unexpected result.

Regarding the model aptitude to predict the weight loss according to temperature and to relative humidity conditions, a large majority of experiments were contained in the predicted range (Figure 3), except for the run (93%RH;12°C) which was anomalous as discussed before. It was also observed that all the experimental curves were close to the lower values

given by the model. This could be due to the omission of other metabolic pathways (proteolysis and lipolysis) in the equations describing the weight loss by CO₂ release. Generally, the discrepancy between the predicted and experimental data began on d5. At this time, the surface pH was close to 5.5, which favoured the action of peptidases and lipases (Bonaïti et al., 2004) leading to a higher CO₂ release.

4. Conclusion

A dynamic model predicting changes in weight loss and dry matter during ripening was built, deriving from the physical laws of water transfer and the main biochemical carbon oxidation pathways. It took into account the loss of water by evaporation, the water transfer from the internal to external compartment and the mass loss due to CO₂ release.

The model was able to predict both weight loss and dry matter in the rind as well as in the core with an average residue close to the experimental measurement accuracy, whatever the ripening conditions of temperature and of relative humidity tested. According to the parameter values, the cheese surface water activity could be considered as nearly constant and close to one. The results showed that the assumption concerning the total decomposition of lactose and lactate into CO₂ and O₂ appeared reasonable.

The experimental data showed that the cheese weight loss was more influenced by the relative humidity of the ripening chamber than by its temperature.

The model accuracy could probably be enhanced in the following ways: (i) by taking into consideration the contribution of the proteolysis and lipolysis to the weight loss, (ii) by extending the study to several locations in the ripening chamber in order to take into account possible lack of homogeneity of temperature, relative humidity and air velocity.

References

- Bonaïti, C., Leclercq-Perlat, M. N., Latrille, E. & Corrieu, G. 2004. Desacidification by *Debaryomyces hansenii* of smear soft cheeses ripened in controlled conditions: Influences of relative humidity and of temperature. *Journal of Dairy Science* 87:3976-3988.
- Desobry, S. & Hardy, J. 1994. Camembert cheese water loss through absorbent packaging. *Journal of Food Science* 59:986-989.
- Emmons, D. B. 1991. Economic importance of cheese yield. *In* Factors affecting the yield of cheese. Brussels (Belgium), International Dairy Federation. Special issue no. 9301:10-11.
- Esteban, M. A., Marcos, A., Alcalá, M. & Gomez, R. 1991. Calculation of water activity in surface mould-ripened soft cheeses from their chemical composition. *Food Chemistry* 40:147-157.
- Geurts, T. J., Walstra, P. & Mulder, H. 1974. Water binding to milk protein, with particular reference to cheese. *Netherlands Milk Dairy Journal* 28:64-72.
- Gomes, A. M. P., Vieira, M. M. & Malcata, F. X. 1998. Survival of probiotic microbial strains in a cheese matrix during ripening: Simulation of rates of salt diffusion and microorganism survival. *Journal of Food Engineering* 36:281-301.
- Hardy, J. 1997. L'activité de l'eau et le salage. *In* Le fromage. Paris, Lavoisier Tec & Doc: 62-84.
- Hinrichs, R., Gotz, J., Noll, M., Wolfschoon, A., Eibel, H. & Weisser, H. 2004. Characterisation of the water-holding capacity of fresh cheese samples by means of low resolution nuclear magnetic resonance. *Food Research International* 37:667-676.
- Karahadian, C. & Lindsay, R. C. 1985. Factors controlling texture in mold surface-ripened cheeses. *Journal of Dairy Science* 68:92-93.
- Leclercq-Perlat, M.-N., Oumer, A., Bergere, J.-L., Spinnler, H.-E. & Corrieu, G. 2000. Behavior of *Brevibacterium linens* and *Debaryomyces hansenii* as ripening Flora in controlled Production of smear soft cheese from Reconstituted Milk: Growth and substrate consumption. *Journal of Dairy Science* 83:1665-1673.

- Macedo, A. C., Malcata, F. X. & Oliveira, J. C. 1997. Effect of production factors and ripening conditions on the characteristics of Serra cheese. *International Journal of Food Science and Technology* 32:501-511.
- Marcos, A., Alcalá, M., Leon, F., Fernandez-Salguero, J. & Esteban, M. A. 1981. Water activity and chemical composition of cheese. *Journal of Dairy Science* 64:622-626.
- Mascarenhas, W. J., H. U. Akay, & M. J. Pikal. 1997. A computational model for finite element analysis of the freeze-drying process. *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering*. 148(1-2):105-124.
- McLaughlin, C. P. & Magee, T. R. A. 1998. The determination of sorption isotherm and the isosteric heats of sorption for potatoes. *Journal of Food Engineering* 35:267-280.
- McSweeney, P. L. H. & Sousa, M. J. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening : A review. *Le lait* 80:293-324.
- Mirade, P. S., Rougier, T., Kondjoyan, A., Daudin, J. D., Picque, D. & Corrieu, G. 2004. Caractérisation de l'aéraulique d'un hâloir de fromagerie et des échanges air-produit. *Le lait* 84:483-500.
- Payne, M. R. & Morison, K. R. 1999. A multi-component approach to salt and water diffusion in cheese. *International Dairy Journal* 9:887-894.
- Simal, S., Sanchez, E. S., Bon, J., Femenia, A. & Rossello, C. 2001. Water and salt diffusion during cheese ripening: effect of the external and internal resistances to mass transfer. *Journal of Food Engineering* 48:269-275.
- Tsami, E., Krokida, M. K. & Drouzas, A. E. 1998. Effect of drying method on the sorption characteristics of model fruit powders. *Journal of Food Engineering* 38:381-392.
- van Vliet, T. & Walstra, P. 1994. Water in casein gels; How to get it out or keep it in. *Journal of Food Engineering* 22:75-88.
- Wang, N. & Brennan, J. G. 1991. Moisture sorption isotherm characteristics of potatoes at four temperatures. *Journal of Food Engineering* 14:269-287.
- Weissenfluh, A. V. & Puhán, Z. 1987. Einfluss der klimatischen bedingungen im reifungsraum auf das wachstum von *Penicilium camembertii* und die qualität von camembert. *Schweiz. Milchw. Forschung* 16:37-44.

Table 1. Values of the model parameters obtained by non linear regression.

	K_C (kg m ⁻² s ⁻¹)	K_E (kg m ⁻² s ⁻¹ Pa ⁻¹)	k (dimensionless)	x_0 (dimensionless)
Fitted value	2.66 10 ⁻⁵	1.13 10 ⁻⁸	1.000	0.002
95% confidence interval	[2.50 10 ⁻⁵ ; 2.82 10 ⁻⁵]	[1.08 10 ⁻⁸ ; 1.18 10 ⁻⁸]	[0.995 ; 1.005]	[-0.023 ; 0.023]

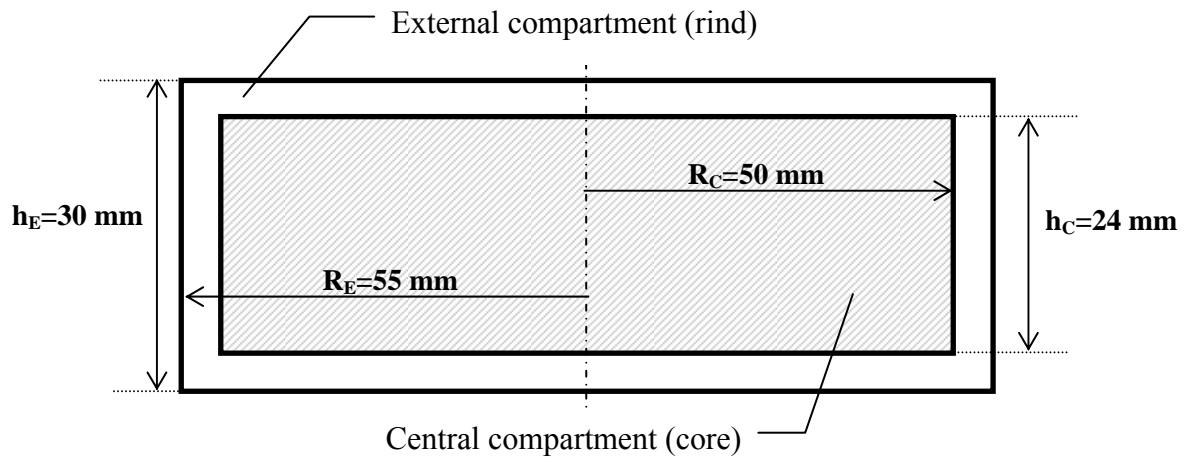


Figure 1. Schematic representation (definition and size) of the two cheese compartments: the core and the rind.

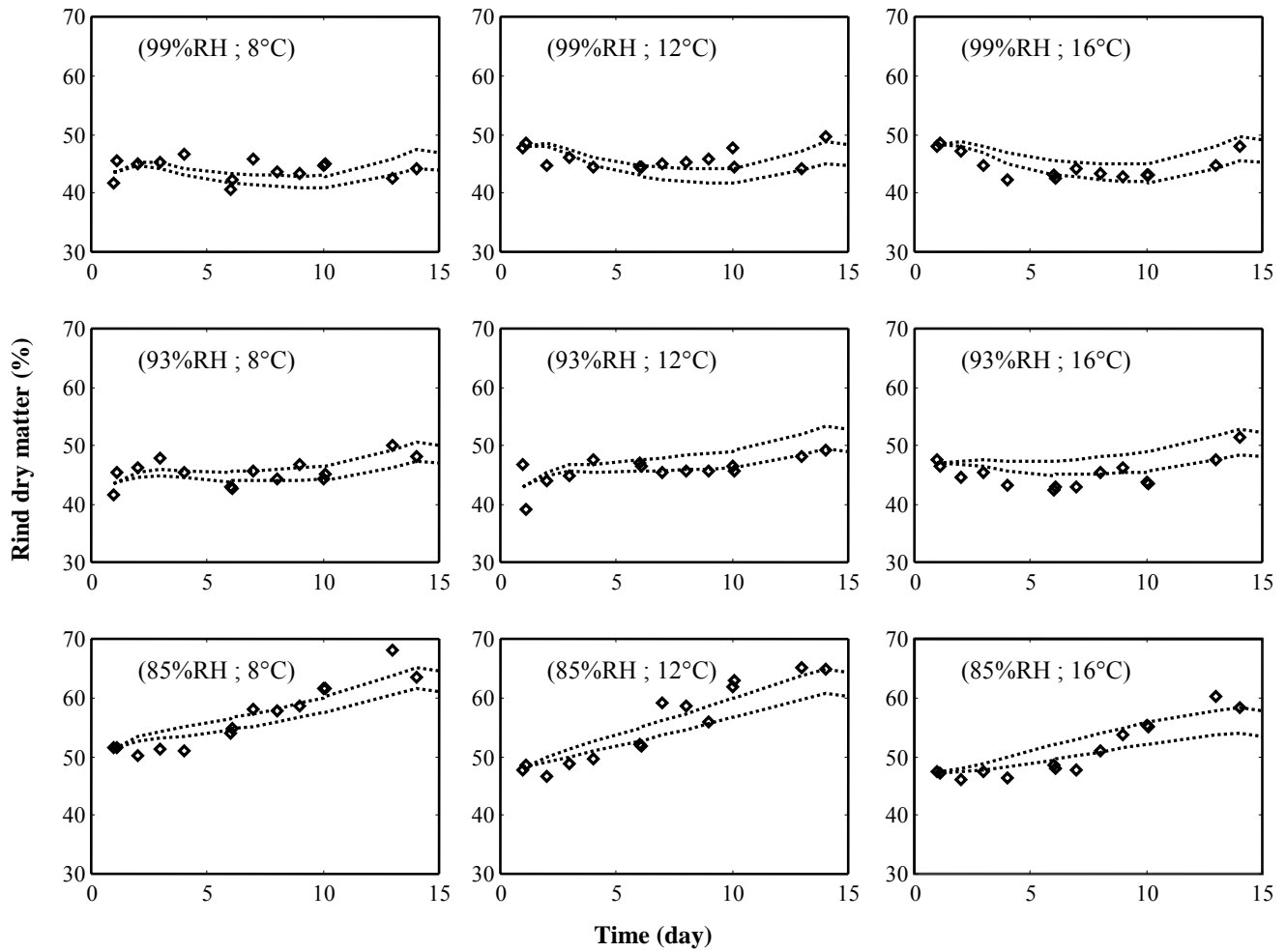


Figure 2. Comparison between experimental (\diamond) and predicted (\cdots) dry matter, in the external compartment of cheeses (the rind) ripened under different temperatures (8°C, 12°C, 16°C) and relative humidities (85%, 93%, 99%). The two dotted curves represent the calculated values for the specified relative humidity $\pm 2\%$, corresponding to the sensor accuracy.

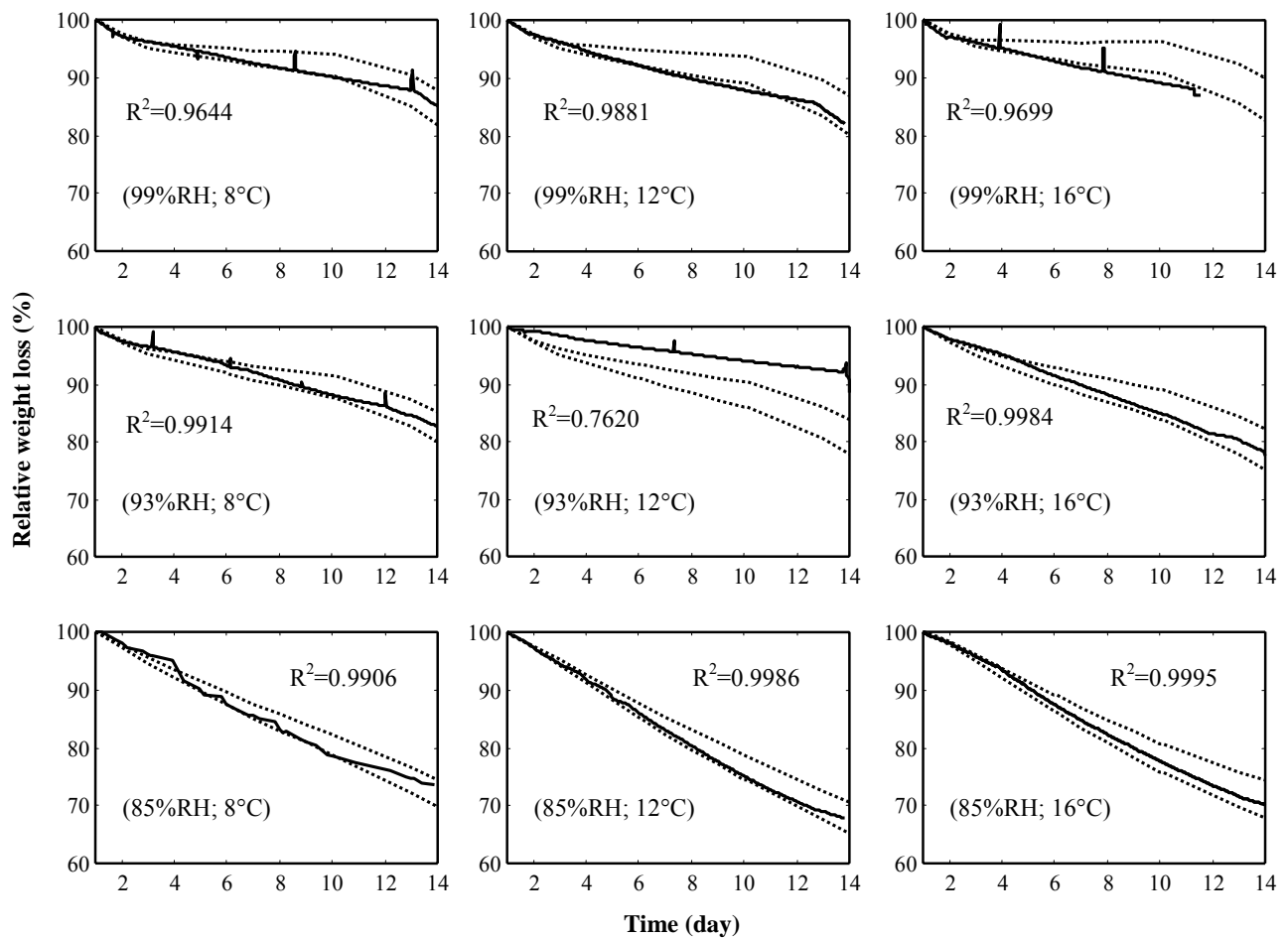


Figure 3. Comparison between experimental (—) and predicted (···) relative weight loss of cheeses ripened under different temperatures (8°C, 12°C, 16°C) and relative humidities (85%, 93%, 99%). The two dotted curves represent the calculated values for the specified relative humidity $\pm 2\%$ corresponding to the sensor accuracy.

III. Modélisation de la perte de poids et de l'évolution de la matière sèche durant l'affinage d'un fromage à pâte molle et à croûte lavée en prenant en compte la croissance de *D. hansenii* et sa consommation des substrats carbonés (modèle généralisé)

A. Introduction

La principale limite du modèle "perte de poids", décrit précédemment (paragraphe II), est liée au fait qu'il est nécessaire d'introduire les valeurs expérimentales des concentrations en lactose et en lactate afin de calculer la perte de poids due au dégagement du dioxyde de carbone. Cette limite constitue un obstacle si l'on projette d'intégrer ce modèle dans un outil informatique visant la prédiction de la perte de poids des fromages dès le début de l'affinage.

De son côté, le modèle "microbiologique" (paragraphe I) est capable de prédire l'évolution de la croissance de *D. hansenii* ainsi que les concentrations en lactose et en lactate durant l'affinage des fromages. Ce modèle calcule ces concentrations à partir de leurs valeurs initiales, déterminées par dosage d'un échantillon prélevé au premier jour d'affinage, mais il ne donne aucune indication sur la perte de poids ou l'évolution de la matière sèche.

Le modèle "généralisé", présenté ci-dessous, a pour objectif de pallier aux limites des deux modèles décrits précédemment. En effet, il décrit, d'une part, la croissance de *D. hansenii*, la consommation du lactose et du lactate ainsi que le transfert de ces deux substrats carbonés du cœur vers la surface, selon les équations du "modèle microbiologique", et d'autre part, la diminution de la masse humide (mW), par évaporation d'eau, et de la masse sèche (mD), par la transformation des substrats carbonés en eau et en gaz carbonique, selon les équations du modèle "perte de poids".

B. Construction du modèle

1. Structure du modèle

Les entrées et les sorties du modèle "généralisé" sont représentées à la **figure III.1**.

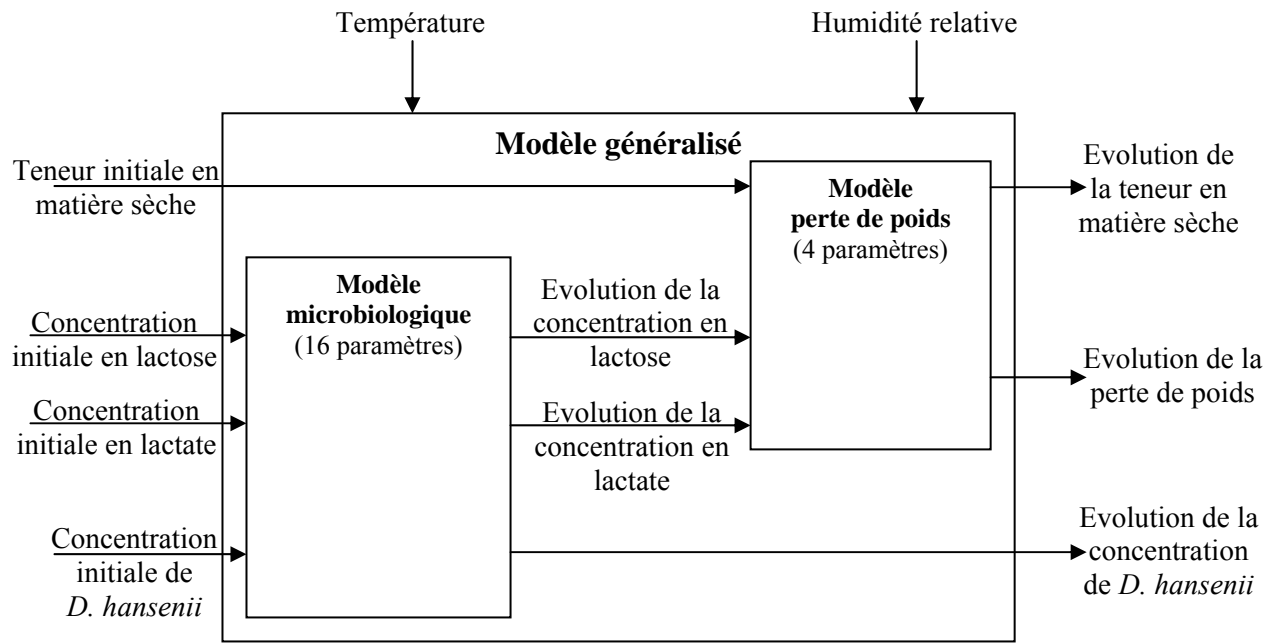


Figure III.1 : représentation schématique des entrées et des sorties du modèle "généralisé"

Les entrées du modèle "généralisé" sont :

- la teneur initiale en matière sèche, qui servira à calculer l'évolution de cette grandeur, en fonction de la température et de l'humidité relative du hâloir, en utilisant les équations et les valeurs des paramètres du modèle "perte de poids",
- la concentration de *D. hansenii* au début de l'affinage, qui servira à déterminer l'évolution de cette population, en fonction de la température et de l'humidité relative du hâloir, en utilisant les équations et les valeurs des paramètres du modèle "microbiologique",
- Les concentrations initiales en lactose et en lactate, qui permettront de calculer l'évolution, au cours de l'affinage, de ces concentrations par le modèle "microbiologique". Les

évolutions de ces concentrations constitueront les entrées du modèle "perte de poids" pour calculer l'évolution de la perte du poids en fonction de la température et de l'humidité relative du hâloir.

2. Les hypothèses retenues

Toutes les hypothèses décrites aux paragraphes I et II du présent chapitre restent valables pour la construction du modèle "généralisé". Elles concernent :

- la séparation du fromage en deux compartiments (cœur et surface), représentés par la **figure 1** de la publication n°1 et la **figure 1** de la publication n°2,
- la croissance de *D. hansenii* qui se fait par consommation de lactose et sa maintenance qui se fait en métabolisant le lactate,
- la concentration constante des bactéries lactiques durant l'affinage,
- la diffusion du lactose et du lactate du cœur vers la surface,
- la perte de poids de la matière humide (par évaporation) et la perte de poids de la matière sèche (par dégagement du dioxyde de carbone).

3. Les équations du modèle

Il convient de noter que le modèle "généralisé" n'apporte aucune nouvelle équation et n'utilise que celles décrites aux paragraphes I et II. Ces équations seront rappelées ci-dessous. L'originalité de ce nouveau modèle réside dans le fait de combiner les deux modèles précédents ("microbiologique" et "perte de poids"), selon le schéma présenté à la **figure III.1** afin de constituer un outil de prédiction plus performant.

3.1 Evolution de la concentration en *D. hansenii* au cours de l'affinage

La croissance de *D. hansenii* est décrite par l'équation de Monod (1942) en considérant le lactose comme substrat limitant, d'où la **relation III.1** :

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \cdot \frac{Lo_R}{ks_{Lo(Dh)} + Lo_R} \cdot X \quad \text{relation III.1}$$

μ_{\max} est le taux spécifique de croissance de *D. hansenii* (jour⁻¹), Lo_R est la concentration en lactose à la surface (mmol/kg), $ks_{Lo(Dh)}$ est la constante de saturation de *D. hansenii* pour le lactose (mmol/kg) et X est la concentration totale en cellules de *D. hansenii* (10⁸.cfu/g).

3.2 Evolution de la concentration en lactose au cours de l'affinage

Comme il a été discuté au paragraphe II, au cœur du fromage, la concentration en lactose décroît en fonction de la quantité transférée vers la surface (selon une différence de concentration) et de la quantité consommée par les bactéries lactiques. Cela se traduit, mathématiquement, par la **relation III.2** :

$$\frac{dLo_C}{dt} = -\frac{K_{Lo} \cdot (Lo_C - Lo_R)}{\tau_C} - v_{\max} \cdot \frac{Lo_C}{ks_{Lo(LAB)} + Lo_C} \quad \text{relation III.2}$$

K_{Lo} est le coefficient de transfert du lactose entre le cœur et la surface (jour⁻¹), τ_C est la fraction volumique du cœur (adimensionnelle), Lo_C est la concentration en lactose au cœur (mmol/kg), Lo_R est la concentration en lactose à la surface (mmol/kg), v_{\max} est le taux spécifique de consommation du lactose par les bactéries lactiques (mmol/kg.jour) et $ks_{Lo(LAB)}$ est la constante de saturation des bactéries lactiques pour le lactose.

A la surface, la concentration en lactose dépend de la quantité transférée depuis le cœur et des quantités consommées par les bactéries lactiques et par *D. hansenii*.

$$\frac{dLo_R}{dt} = \frac{K_{Lo} \cdot (Lo_C - Lo_S)}{\tau_R} - v_{\max} \cdot \frac{Lo_R}{ks_{Lo(LAB)} + Lo_R} - \frac{1}{Y_{X/Lo}} \cdot \mu_{\max} \cdot \frac{Lo_R}{ks_{Lo(Dh)} + Lo_R} \cdot X \quad \text{relation III.3}$$

$Y_{X/Lo}$ est le rendement de croissance de *D. hansenii* sur le lactose (10⁸.cfu/mmol).

3.3 Evolution de la concentration en lactate au cours de l'affinage

Au cœur du fromage, les bactéries lactiques transforment le lactose en lactate. L'évolution de la concentration en lactate au cours du temps dépend donc de la quantité ainsi produite et de celle transférée vers la surface sous l'effet d'une différence de concentration, comme le décrit la **relation III.4** :

$$\frac{dLa_C}{dt} = -\frac{K_{La} \cdot (La_C - La_R)}{\tau_C} + Y_{La/Lo} \cdot v_{\max} \cdot \frac{Lo_C}{k_{S_{Lo(LAB)}} + Lo_C} \quad \text{relation III.4}$$

$Y_{La/Lo}$ est le rendement de conversion du lactose en lactate par les bactéries lactiques (mmol de lactate/mmol de lactose).

A la surface, la concentration en lactate dépend, de la quantité qui parvient du cœur par transfert, de celle produite par les bactéries lactiques se trouvant à la surface et de celle consommée par *D. hansenii* pour sa maintenance, selon la **relation III.5** :

$$\frac{dLa_R}{dt} = \frac{K_{La} \cdot (La_C - La_R)}{\tau_R} + Y_{La/Lo} \cdot v_{\max} \cdot \frac{Lo_R}{k_{S_{Lo(LAB)}} + Lo_R} - m_{\max} \cdot \frac{La_R}{k_{S_{La}} + La_R} \cdot X \quad \text{relation III.5}$$

m_{\max} est le coefficient de maintenance *D. hansenii* sur lactate (mmol/10⁸.cfu.jour).

3.4 Evolution de la teneur en matière sèche et de la perte de poids

Rappelons que, comme décrit dans le chapitre II, la masse totale du fromage est la somme d'une masse sèche et d'une masse humide.

3.4.1 La masse sèche

La masse sèche initiale (jour 1) de la surface ($mD_R(1)$) est calculée à partir de la valeur de la teneur en matière sèche initiale à la surface ($DM_R(1)$) selon la **relation III.7** :

$$mD_R(1) = \tau_R \cdot m(1) \cdot \frac{DM_R(1)}{100} \quad \text{relation III.7}$$

τ_R est la fraction volumique du compartiment externe (surface) et $m(1)$ est la masse initiale du fromage. L'évolution de la masse sèche de la surface au cours de l'affinage ($mD_R(t)$) est donnée par la **relation III.8** :

$$mD_R(t) = mD_R(1) - \left[mD_R(1)(Y_{C/Lo} + Y_{H_2O/Lo})(L_{O_R}(1) - L_{O_R}(t)) \right] - \left[mD_R(1)(Y_{C/La} + Y_{H_2O/La})(L_{A_R}(1) - L_{A_R}(t)) \right] \quad \text{relation III.8}$$

$Y_{C/Lo}$ est le rendement de production de CO_2 à partir du lactose (seule la masse du carbone est prise en compte pour la perte de poids car l'oxygène provient de l'air ambiant), $Y_{H_2O/Lo}$ est le rendement de production d'eau "métabolique" à partir du lactose (par opposition à l'eau du lactosérum pré-existante dans la matrice), $L_{O_R}(1)$ est la concentration initiale en lactose, $L_{O_R}(t)$ est la concentration en lactose au cours de l'affinage (calculée à partir de la **relation III.3**). $Y_{C/La}$, $Y_{H_2O/La}$, $L_{A_R}(1)$ et $L_{A_R}(t)$ sont des grandeurs analogues mais relatives au lactate ($L_{A_R}(t)$ est calculée à partir de la **relation III.5**).

Au cœur du fromage, la masse sèche initiale ($mD_C(1)$) et sa variation au cours du temps ($mD_C(t)$) se calculent de la même façon qu'à la surface. Il est à préciser que la détermination de $mD_C(t)$ par le modèle généralisé nécessite l'utilisation des concentrations en lactose ($L_{O_C}(t)$; **relation III.2**) et en lactate ($L_{A_C}(t)$; **relation III.4**).

3.4.2 La masse humide

La masse humide initiale au coeur ($mW_C(1)$) est calculée à partir de la valeur de la teneur en matière sèche initiale au cœur du fromage ($DM_C(1)$), selon la **relation III.9** :

$$mW_C(1) = \tau_C \cdot m(1) \frac{(100 - DM_C(1))}{100} \quad \text{relation III.9}$$

L'évolution de la masse humide au cœur ($mW_C(t)$) dépend de la quantité d'eau transférée du cœur vers la surface sous l'effet d'une différence de concentration, conformément à la **relation III.10** :

$$\frac{d m W_C(t)}{dt} = -S_C \cdot K_C \cdot (X_{e_C}(t) - X_{e_R}(t)) \quad \text{relation III.10}$$

S_C est la surface de la zone de contact entre les compartiments interne (cœur) et externe (surface), K_C est le coefficient de transfert d'eau entre le cœur et la surface, X_{e_C} est la teneur en eau du cœur et X_{e_R} est la teneur en eau de la surface.

A la surface, la masse humide dépend de la quantité d'eau qui provient du cœur et de celle qui se dégage par évaporation selon la **relation III.11** :

$$\frac{d m W_R(t)}{dt} = S_C \cdot K_C \cdot (X_C(t) - X_R(t)) - S_R \cdot K_R \cdot (P_R - P_A) \quad \text{relation III.11}$$

S_R est la surface de la zone de contact entre la surface du fromage et l'air, K_R est le coefficient de transfert d'eau entre la surface et l'air, P_R est la pression partielle de la vapeur à la surface et P_A est la pression partielle de la vapeur dans l'air.

La pression partielle de la vapeur dans l'air (P_A) dépend de l'humidité relative (RH) du hâloir et de la pression de la vapeur saturante (P_{vapSat}) selon la **relation III.12** :

$$P_A = \left(\frac{RH}{100} \right) \cdot P_{vapSat} \quad \text{relation III.12}$$

La relation utilisée (Mascarenhas *et al.*, 1997), dans ce travail, pour déterminer la pression de la vapeur saturante est traduite par la **relation III.13** :

$$P_{vapSat} = \exp\left(27,4658 - \frac{5750,38}{\theta + 273,15} \right) \cdot (1 - 0,0045 \cdot \theta) \quad \text{relation III.13}$$

Quant à la pression partielle de la vapeur à la surface (P_R), elle dépend de l'activité de l'eau à la surface du fromage et de la pression de la vapeur saturante, selon la relation **III.14** :

$$P_R = a_w \cdot P_{vapSat} \quad \text{relation III.14}$$

Comme il a été montré précédemment (paragraphe II) l'activité de l'eau à la surface du fromage sera traduite par une forme simplifiée du modèle GAB (Guggenheim, 1966), adaptée à des produits dont l'activité de l'eau est élevée, selon la **relation III.15** :

$$a_w = \frac{Xe}{k \cdot x_0 - k \cdot Xe} \quad \text{relation III.15}$$

Xe est la teneur en eau de la surface, k et x_0 sont les constantes du modèle GAB.

Le modèle généralisé est donc capable de simuler la teneur en matière sèche à la surface et au cœur du fromage selon les relations suivantes :

$$DM_R(t) = \frac{mD_R(t)}{mD_R(t) + mW_R(t)} \cdot 100 \quad \text{relation III.16}$$

$$DM_C(t) = \frac{mD_C(t)}{mD_C(t) + mW_C(t)} \cdot 100 \quad \text{relation III.17}$$

ainsi que la perte relative de poids selon la **relation III.18** :

$$\Delta m = \frac{mW(t) + mD(t)}{m(1)} \cdot 100 \quad \text{relation III.18}$$

3.5 Effet de la température et de l'humidité relative

Afin de déterminer les effets de la température et de l'humidité relative sur les paramètres cinétiques (μ_{\max} , ν_{\max} et m_{\max}), des relations linéaires ont été employées sous la forme présentée par la **relation III.19** :

$$P = P_{central} + \theta_p(\theta - 12) + RH_p(RH - 93) \quad \text{relation III.19}$$

P est un paramètre cinétique représentant μ_{\max} , ν_{\max} ou m_{\max} ; $P_{central}$ est la valeur du paramètre dans les conditions du point central du plan d'expérience (12°C, 93%RH), θ_p (1/°C) et RH_p (1/%) sont les effets respectifs de la température et de l'humidité relative sur le paramètre cinétique considéré.

4. Les paramètres du modèle

Le modèle généralisé est composé de vingt paramètres, seize intervenant dans le modèle "microbiologique" et quatre dans le modèle "perte de poids". Ces paramètres vont être utilisés avec les valeurs identifiées lors de l'établissement de ces deux modèles et présentées aux paragraphes I et II (**tableau III.1**).

Tableau III.1 : les paramètres du modèle "généralisé" et leurs valeurs

Paramètres et valeurs associées	Intervalles de confiance à 95 %
<u>Paramètres du modèle microbiologique</u>	
$\mu_{\max} = 1,21$ (jour ⁻¹)	[1,14 ; 1,28]
$ks_{Lo(Dh)} = 20$ (mmol/kg)	—
$ks_{La} = 20$ (mmol/kg)	—
$v_{\max} = 6,83$ (mmol/kg.jour)	[6,33 ; 7,37]
$ks_{Lo(LAB)} = 10$ (mmol/kg)	—
$m_{\max} = 0,17$ (mmol/10 ⁸ .cfu. jour)	[0,15 ; 0,18]
$K_{Lo} = 0,08$ (jour ⁻¹)	[0,07 ; 0,09]
$K_{La} = 0,26$ (jour ⁻¹)	[0,22 ; 0,30]
$Y_{X/Lo} = 2,78$ (10 ⁸ .cfu/mmol)	[2,50 ; 3,03]
$Y_{La/Lo} = 2,72$ (mmol de lactate/mmol de lactose)	[2,48 ; 2,99]
$\theta_{\mu \max} = 0,070$ (1/°C)	[0,069 ; 0,071]
$RH_{\mu \max} = 0,026$ (1/%)	[0,018 ; 0,034]
$\theta_{v \max} = 0,12$ (1/°C)	[0,09 ; 0,14]
$RH_{v \max} = 0,02$ (1/%)	[0,01 ; 0,03]
$\theta_{m \max} = 0,010$ (1/°C)	[0,009 ; 0,011]
$RH_{m \max} = 0,016$ (1/%)	[0,015 ; 0,017]
<u>Paramètres du modèle perte de poids</u>	
$K_R = 1,13.10^{-8}$ (kg.m ⁻² .s ⁻¹)	[1,08 10 ⁻⁸ ; 1,18 10 ⁻⁸]
$K_C = 2,66.10^{-5}$ (kg.m ⁻² .s ⁻¹ .Pa ⁻¹)	[2,50 10 ⁻⁵ ; 2,82 10 ⁻⁵]
$k = 1,00$ (adimensionnel)	[0,995 ; 1,005]
$x_0 = 0,002$ (adimensionnel)	[-0,023 ; 0,023]

Les paramètres du modèle "microbiologique" sont ajustés uniquement sur la base de valeurs initiales mesurées ($Lo(1)$, $La(1)$, $X(1)$, θ et RH). En l'absence de nouvelles mesures, une deuxième optimisation de ces paramètres n'apporterait pas plus de précision aux prédictions du modèle. Les paramètres du modèle "perte de poids" ont été ajustés, au paragraphe II, sur la base des valeurs des concentrations en lactose et en lactate déterminées expérimentalement. Mais, dans le modèle "généralisé", elles sont remplacées par des valeurs calculées. Ces dernières ne sont pas complètement identiques aux valeurs mesurées. Les paramètres du modèle "perte de poids" peuvent donc, théoriquement, prendre d'autres valeurs que celles identifiées auparavant permettant d'atteindre un optimum global pour le modèle "généralisé". Le travail de réidentification de ces quatre paramètres a conduit à de nouvelles valeurs qui restent situées dans les intervalles de confiance observés au **tableau III.1**. Il a donc été décidé de garder les premières valeurs, sans ajustement, afin de tester la robustesse du modèle "généralisé" soumis aux petites erreurs de prédiction des concentrations en lactose et en lactate.

C. Résultats et discussions

Les évolutions des teneurs en matière sèche, à la surface et au cœur des fromages, ainsi que les pertes relatives de poids durant l'affinage, calculées par le modèle "généralisé", seront présentées et comparées à celles calculées par le modèle "perte de poids". Afin d'évaluer la qualité des prédictions de ces deux modèles, les erreurs résiduels standard ont été calculées pour chaque essai. Dans les trois figures qui suivent, les résultats du modèle généralisé, ainsi que leurs erreurs résiduelles standard (RSE3) sont présentées avec la couleur bleue alors que les résultats du modèle perte de poids et leurs erreurs résiduelles standard (RSE2) sont présentées avec la couleur rouge. Il est à noter que les deux modèles prennent en considération l'incertitude sur la mesure de l'humidité relative estimée à $\pm 2\%$. Leurs

prédictions sont donc traduites sous la forme de deux courbes qui correspondent aux valeurs calculées en considérant la valeur de consigne de l'humidité relative plus au moins 2 % sauf pour les essais réalisés à 99 % d'humidité relative dont la borne supérieure est limitée à 100 %. La **figure III.2** présente de l'évolution de la teneur en matière sèche, à la surface des fromages au cours de l'affinage, mesurée expérimentalement, ainsi que les prédictions de cette teneur établies avec les deux modèles.

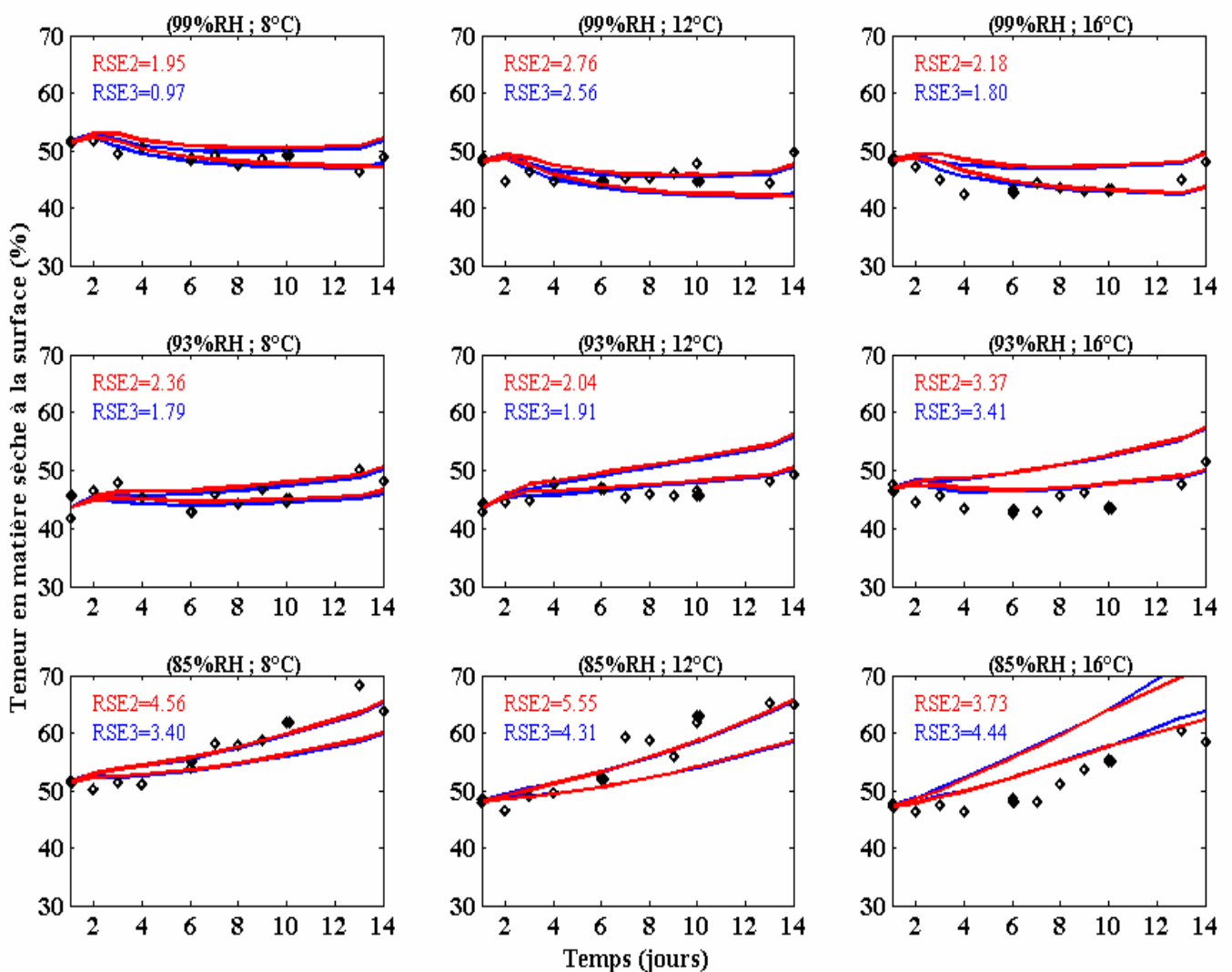


Figure III.2 : évolution de la teneur en matière sèche à la surface des fromages. Comparaison entre les résultats expérimentaux (\diamond) et les prédictions du modèle "perte de poids" (trait plein rouge) et du modèle "généralisé" (trait plein bleu). Les erreurs résiduelles standard du modèle "perte de poids" (RSE2) et du modèle "généralisé" (RSE3) ont été calculées pour chaque essai.

Tout comme le modèle "perte de poids", le modèle "généralisé" assure une bonne approximation de l'évolution de la teneur en matière sèche à la surface des fromages au cours de l'affinage. Le modèle "généralisé" représente notamment, le fait que plus l'atmosphère est sèche plus l'évolution de la teneur en matière sèche est rapide et importante. Ce qui confirme que l'évaporation de l'eau à la surface des fromages est proportionnelle à la différence entre la pression de la pression de la vapeur à cette surface et la pression de la vapeur dans l'air qui dépend de l'humidité relative des hâloirs (**relation III.12**).

L'étude des erreurs résiduelles, calculées pour les deux modèles, montre que, mis à part les essais (85% ; 16°C) et (93% ; 16°C), les prédictions du modèle généralisé présentent des RSE plus basses que celles du modèle de perte de poids. La moyenne des erreurs résiduelles des prédictions du modèle généralisé (2,73) présente une amélioration de l'ordre de 14 % par rapport à celle calculée pour les prédictions du modèle perte de poids (3,17). Théoriquement, le modèle généralisé ne devrait pas conduire à des résultats meilleurs que ceux obtenus avec le modèle perte de poids. Ceci pour deux raisons :

- le modèle "généralisé" utilise les équations et les valeurs des paramètres du modèle "perte de poids", sans aucun ajustement supplémentaire,
- les concentrations en lactose et en lactate, qui sont fournies au modèle généralisé, ne sont qu'une approximation de la réalité, générée par le modèle microbiologique.

Donc, en faisant abstraction des erreurs affectant les valeurs expérimentales, si le modèle microbiologique donne une bonne approximation de la concentration en lactose et en lactate, les prédictions du modèle généralisé devrait être, au mieux, aussi précises que celles fournies par le modèle perte de poids qui utilise les valeurs expérimentales des concentrations en lactose et en lactate.

Cette amélioration du RSE est probablement due à un effet de lissage du modèle microbiologique sur les valeurs de concentration en lactose et lactate (**figures 4 et 5** de la publication n°1), ce lissage minimise l'effet des erreurs affectant les valeurs expérimentales. En effet, il a été noté dans au paragraphe I que le modèle "microbiologique" n'arrive pas à simuler les variations de la concentration en lactose lorsque, probablement du fait d'erreurs expérimentales, une évolution anormale est observée. A titre d'exemple, l'obtention de concentrations en lactose constantes entre J5 et J10.

La **figure III.3** présente les résultats expérimentaux de l'évolution de la teneur en matière sèche, au cœur des fromages, au cours de l'affinage, ainsi que les prédictions établies avec les deux modèles. Encore plus que sur la teneur en matière sèche à la surface, les évolutions prédites par les modèles présentent une grande similarité (courbes quasiment confondues sur l'ensemble des essais). L'évolution de la teneur en matière sèche au cœur est similaire à celle observée à la surface mais avec des valeurs plus basses. En effet, la teneur en matière sèche à la surface varie entre 40 et 65 %, selon les essais, alors qu'elle se situe entre 39 et 58 % au cœur. En plus, il a été observé que les essais affinés à 85 % d'humidité relative avaient une teneur en matière sèche plus élevée que ceux réalisés à 93 et 99 %. L'humidité relative agit indirectement sur la teneur en matière sèche au cœur du fromage. En effet, l'évaporation de l'eau à la surface, qui dépend de l'humidité relative de l'atmosphère, crée un gradient de concentration entre la surface et le cœur. Ce gradient (force motrice du transfert de l'eau du cœur vers la surface) est d'autant plus grand que l'évaporation est importante et, donc, que la différence entre l'humidité relative du hâloir et l'activité de l'eau à la surface des fromages est importante. L'analyse des erreurs résiduelles standard montre que la moyenne des erreurs calculées pour le modèle généralisé (2,13) présente une amélioration d'environ 18 % par rapport à la moyenne des erreurs calculées pour le modèle perte de poids (2,59). Ce

gain, déjà observé sur la teneur en matière sèche à la surface des fromages, est expliqué par les mêmes hypothèses (lissage des concentrations des substrats).

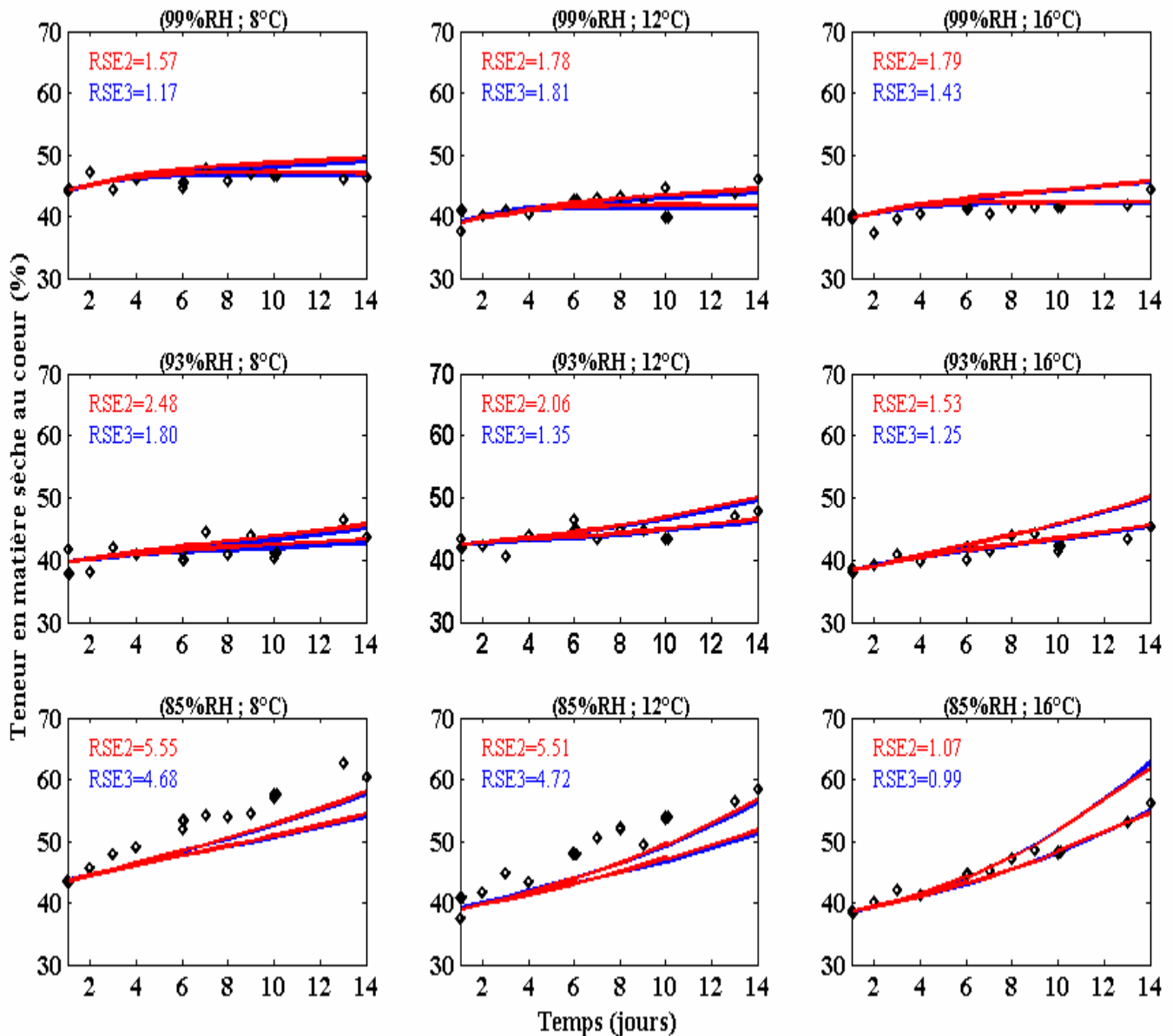


Figure III.3 : évolution de la teneur en matière sèche au cœur des fromages. Comparaison entre les résultats expérimentaux (\diamond) et les prédictions du modèle "perte de poids" (trait plein rouge) et du modèle "généralisé" (trait plein bleu). Les erreurs résiduelles standard du modèle "perte de poids" (RSE2) et du modèle "généralisé" (RSE3) ont été calculées pour chaque essai.

La **figure III.4** représente l'évolution de la perte relative du poids d'un fromage au cours de l'affinage, enregistrée en ligne, ainsi que les prédictions de cette perte calculées avec le modèle "perte de poids" et le modèle "généralisé". Ces résultats montrent que la prédiction de la perte de poids émanant du modèle "généralisé" enveloppe, entre ses deux bornes, la majorité des courbes expérimentales. Ce modèle montre aussi sa capacité à reproduire correctement les cinétiques de perte de poids telles que décrites au paragraphe II. En particulier, les vitesses de perte de poids plus importantes, pendant le premier et le dernier jour d'affinage correspondant au ressuyage des fromages sous une humidité relative de 85 %, sont bien mises en évidence. Cependant, l'analyse des erreurs résiduelles standard montre que mis à part les essais (85% ; 12°C) et (93% ; 12°C) les prédictions du modèle "perte de poids" sont plus proches des résultats expérimentaux que celles du modèle "généralisé". Contrairement aux résultats obtenus lors de la prédiction des teneurs en matière sèche, la moyenne des erreurs résiduelles standard calculé lors de la prédiction de la perte de poids passe de 2,97, pour le modèle de perte de poids, à 3,31 pour le modèle généralisé soit une légère dégradation de l'ordre de 12 %.

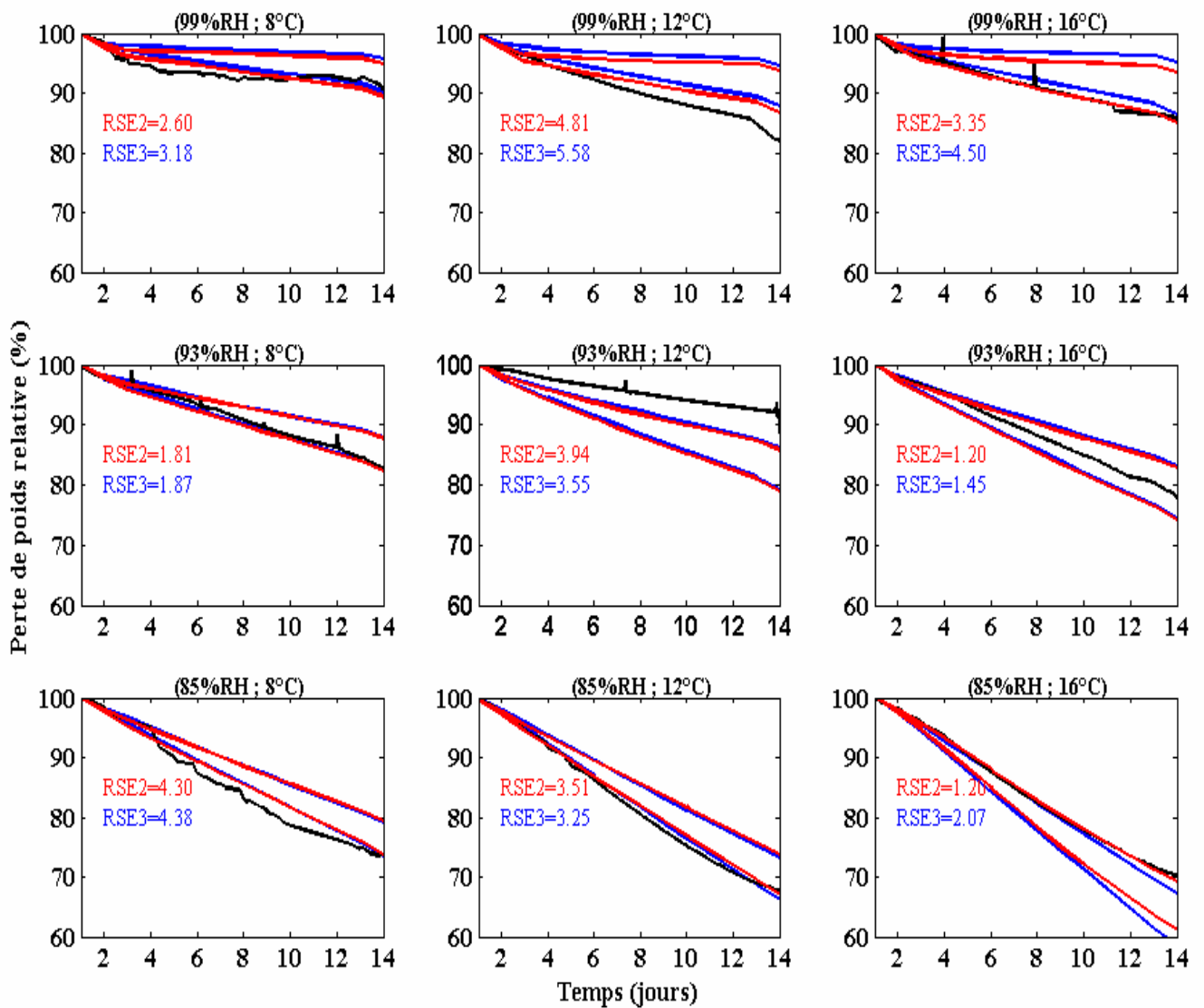


Figure III.4 : évolution de la perte relative du poids d'un fromage au cours de l'affinage. Comparaison entre les résultats expérimentaux mesurés, en ligne, avec une balance (trait plein noir) et les prédictions du modèle "perte de poids" (trait plein rouge) et du modèle "généralisé" (trait plein bleu). Les erreurs résiduelles standard du modèle "perte de poids" (RSE2) et du modèle "généralisé" (RSE3) ont été calculées pour chaque essai.

D. Conclusion

Le modèle généralisé est capable de prédire, dès le début de l'affinage, la croissance de *D. hansenii*, la perte de poids, les évolutions des concentrations en substrat (lactose, lactate), à

cœur et en surface et la teneur en matière sèche du fromage en fonction de la température et de l'humidité relative de la chambre d'affinage.

Les simulations de l'évolution de la teneur en matière sèche à la surface et au cœur, réalisées avec ce modèle, présentent une amélioration de leurs erreurs résiduelles standard moyennes par rapport à celles observées avec le modèle de perte de poids (respectivement de l'ordre de 14 et 18 %). Cependant, tout comme le modèle "perte de poids" (paragraphe II), le modèle "généralisé" a tendance à sous estimer la perte de poids subie par les fromages. Cette observation peut être expliquée par le fait que ces deux modèles ne prennent pas en compte des voies métaboliques autre que l'oxydation du lactose et du lactate. La protéolyse et la lipolyse sont ainsi ignorées. Autre hypothèse, qui peut être complémentaire, le réchauffement local du fromage (sous l'effet de la chaleur de respiration), susceptible d'accélérer l'évaporation de l'eau à la surface, est négligé. Des travaux complémentaires, dans ces deux directions, seraient indispensables pour essayer de conforter ces hypothèses.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

L'affinage résulte principalement de l'action de différents micro-organismes qui participent à la transformation du caillé en fromage. L'évolution et l'activité de cette flore sont très influencées par les conditions d'affinage (température, humidité relative et composition gazeuse des hâloirs). L'objectif principal de cette étude visait à développer des modèles mathématiques capables de prédire l'évolution d'une levure désacidifiante (*Debaryomyces hansenii*), la consommation des substrats carbonés (lactose, lactate) et la perte de poids au cours de l'affinage de fromages modèles à pâte molle et à croûte lavée de type Munster. Pour accroître l'intérêt de ces modèles, l'effet des conditions de température et d'humidité relative de l'atmosphère de l'enceinte d'affinage, de taille pilote (1 m³), a été intégré.

La première étape du travail a consisté à établir une base de données expérimentales indispensable pour l'établissement et la validation des modèles mathématiques. Cette base comporte les résultats des analyses microbiologiques et biochimiques, réalisées sur des échantillons de fromage, ainsi que les valeurs des conditions opératoires d'affinage. Les fromages ont été ensemencés, en plus de la flore lactique, par une flore d'affinage composée d'une levure (*Debaryomyces hansenii* souche 304, UMR GMPA) et d'une bactérie de surface (*Brevibacterium aurantiacum* ATCC 9175). L'affinage en hâloir pilote de ces fromages est limité à 14 jours et il est conduit selon un plan d'expérience à deux facteurs (température et humidité relative) et à trois niveaux (respectivement 8, 12, 16° C et 85, 93, 99 %).

Lors de la deuxième étape, une approche mécanistique dynamique est adoptée pour construire les modèles mathématiques. Ceci permet non seulement de déterminer les grandeurs biologiques mais aussi les paramètres cinétiques et de transfert de matière du processus. Trois modèles mathématiques ont été développés. Le premier modèle (dit modèle

"microbiologique") décrit la croissance de *Debaryomyces hansenii* et l'évolution des concentrations en lactose et en lactate pendant l'affinage des fromages. Le deuxième modèle (dit modèle "perte de poids") décrit la perte de poids et l'évolution de la matière sèche des fromages. Le troisième est un modèle généralisé qui permet de prédire la perte de poids et l'évolution de la matière sèche des fromages pendant l'affinage en intégrant l'évolution de la flore d'affinage et des substrats.

Le modèle microbiologique a réussi à prédire, en fonction de la température et de l'humidité relative du hâloir, la croissance en surface de *D. hansenii* et l'évolution des concentrations en lactose et en lactate, aussi bien au cœur qu'à la surface des fromages, durant l'affinage. Les erreurs résiduelles standard (RSE) de ces prédictions sont satisfaisantes par comparaison avec l'écart type des trois essais répétés sous les conditions de température (12 °C) et d'humidité relative (93 %) correspondant au point central du plan d'expérience. En effet, elles sont du même ordre que les écarts types observés sur les trois essais répétés. De plus, les essais ayant servi à l'ajustement des paramètres ont des erreurs résiduelles qui ne varient que de 2,9 à 12,8 % par rapport aux erreurs résiduelles calculées pour les essais ayant servi à la validation. Ceci montre que le modèle est capable, dans les limites du plan d'expérience, de donner des prédictions dans d'autres combinaisons de température et d'humidité relative. Les valeurs des paramètres, obtenues par régression non linéaire, suggèrent que l'activité des bactéries lactiques et la croissance de *D. hansenii* sont influencées par la température et l'humidité relative. Les résultats de ce volet de l'étude permettent de soutenir l'hypothèse, avancée lors de la construction du modèle, selon laquelle *D. hansenii* consomme le lactose pour sa croissance et le lactate pour sa maintenance.

Concernant le deuxième modèle, il est parvenu à prédire la perte de poids et l'évolution de la teneur en matière sèche, en cœur et en surface, avec des erreurs résiduelles

standard moyennes proches de la précision des mesures expérimentales, pour toutes les conditions de température et d'humidité relative testées. Les résultats expérimentaux montrent que la perte de poids est plus sensible aux variations de l'humidité relative qu'à celles de la température de la chambre d'affinage. Les paramètres de ce modèle suggèrent que l'activité de l'eau à la surface des fromages peut être considérée comme quasi constante et proche de 1. Les résultats obtenus avec ce modèle montrent aussi que les hypothèses avancées, selon lesquelles le lactose et le lactate sont complètement oxydés en CO_2 et en O_2 et que l'oxygène atmosphérique ne contribue pas à la perte de poids, sont justifiées. Cependant, ce modèle doit être renseigné par les résultats expérimentaux correspondant aux concentrations en lactose et en lactate mesurées à différents moments de l'affinage. Ceci constitue un obstacle pour l'intégration de ce modèle dans un outil capable de prédire, dès le début de l'affinage, le déroulement de celui-ci et, par exemple, le poids et la teneur en matière sèche finaux.

Le modèle généralisé a été construit pour pallier à cette limite en combinant les deux modèles précédents. Avec 20 paramètres identifiés, il est capable de prédire, dès le début de l'affinage, la croissance de *D. hansenii*, la perte de poids et les évolutions des concentrations, à cœur et en surface, du lactose et du lactate ainsi que la teneur en matière sèche du fromage en fonction de la température et de l'humidité relative de la chambre d'affinage. Les simulations de l'évolution de la teneur en matière sèche, à la surface et au cœur, réalisées avec ce modèle, présentent une amélioration de leurs erreurs résiduelles standard moyennes par rapport à celles observées avec le modèle de perte de poids (respectivement de l'ordre de 14 et de 18 %). En revanche, pour la perte de poids, les erreurs résiduelles enregistrées pour le modèle généralisé présentent une légère dégradation de l'ordre de 12 % par rapport à celles observées avec le modèle de perte de poids.

Ce travail constitue, à notre connaissance, une des premières tentatives pour décrire, de façon détaillée, la dynamique des phénomènes microbiologiques et physico-chimiques caractéristiques de la première phase (désacidification) de l'affinage de fromages de type pâte molle croûte lavée. Néanmoins, certains points restent à améliorer ou à développer.

Ainsi, l'enregistrement en ligne des valeurs réelles de la température et de l'humidité relative du hâloir pourrait améliorer la précision des modèles. En effet, ces modèles sont établis en considérant les valeurs des points de consigne de ces deux variables. Ils ne prennent donc pas en compte certaines perturbations comme les cycles de dégivrage de la chambre froide ou celles pouvant affecter le système de régulation de l'humidité relative.

Il a été noté que, tout comme le modèle de perte de poids, le modèle généralisé a tendance à sous estimer la perte de poids mesurée. Il serait judicieux d'examiner comment prendre en considération, lors de futurs travaux de modélisation, la contribution de la protéolyse et de la lipolyse dans la perte de poids. Ceci présente une difficulté non négligeable mais pourrait faire l'objet d'une évaluation globale dont l'intérêt est évident. Toujours concernant la sous-estimation de la perte de poids, le développement de capteurs sensibles à de faibles variations de la température rend possible l'exploration de l'effet du "réchauffement local" du fromage dû à la respiration, susceptible d'accélérer l'évaporation de l'eau à la surface des fromages.

Enfin, il serait intéressant d'étudier, en conservant l'approche décrite dans ce travail, les influences respectives de la vitesse de l'air (aéraulique) et de la composition gazeuse de l'atmosphère du hâloir sur la croissance de la flore d'affinage et la perte de poids. D'abord pour une flore simplifiée, comme c'est le cas de la présente étude, puis sur des populations microbiennes plus diversifiées et proches des écosystèmes microbiens rencontrés en fromagerie.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Al Otaibi, M. M. and Wilbey, A. 2004. Effects of temperature and salt on maturation of white-salted cheese. *International Journal of Dairy Technology* 57: 57-63.
- Aldarf, M., Fourcade, F., Amrane, A. and Prigent, Y. 2006. Substrate and metabolite diffusion within model medium for soft cheese in relation to growth of *Penicillium camembertii*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33(8): 685-692.
- Arfi, K., Amarita, F., Spinnler, H.E. and Bonnarne, P. 2003. Catabolism of volatile sulfur compounds precursors by *Brevibacterium linens* and *Geotrichum candidum*, two microorganisms of the cheese ecosystem. *Journal of Biotechnology* 105(3): 245-253.
- Ashenafi, M. 1989. Proteolytic, lipolytic and fermentative properties of yeasts isolated from Ayib, a traditional ethiopian cottage cheese. *Ethiopian Journal of Science* 12(2): 1989-1999.
- Bachmann, H. P. 1997. High ammonia content delays smear development of cheese. *Agrarforschung* 4(10): 407-410.
- Barba, D., Beolchini, F., Del Re, G., Di Giacomo, G. and Veglio, F. 2001. Kinetic analysis of *Kluyveromyces lactis* fermentation on whey: batch and fed-batch operations. *Process Biochemistry* 36(6): 531-536.
- Barnett, J.A., Payne, R.W. and Yarrow, D. 1990. A guide to identifying and classifying yeasts. Cambridge University Press, Cambridge.
- Baroiller, C. and Schmidt, J.L. 1990. Contribution à l'étude de l'origine des levures du fromage de camembert. *Le lait* 70: 67-84.
- Bastin, G. and Dochain, D. 1990. Dynamic models for bioreactors. *In On-line estimation and adaptative control of bioreactors* Elsevier. Amsterdam - Oxford - New York.
- Bergère, J.-L. and Lenoir, J. 1997. Les accidents de fromagerie et les défauts des fromages. *In Le fromage*. Eck, A. et Gillis, J.-C. Lavoisier Tec & Doc. Paris. p.509-541.
- Bertsekas, D.P. 1997. Nonlinear programming. *Journal of the Operational Research Society* 48(3): 334-344.

- Besancon, X., Smet, C., Chabalier, C., Rivemale, M., Reverbel, J. P., Ratomahenina, R. and Galzy, P. 1992. Study of surface yeast flora of Roquefort cheese. *International Journal of Food Microbiology* 17(1): 9-18.
- Biazar, J., Tango, M., Babolian, E. and Islam, R. 2003. Solution of the kinetic modeling of lactic acid fermentation using Adomian decomposition method. *Applied Mathematics and Computation* 144(2-3): 433-439.
- Bloës-Breton, S. and Bergère, J.-C. (1994). Potentiel aromatique de bactéries corynéformes fromagères autres que *Brevibacterium linens*. Colloque des 9 et 10 Mars 1994, Paris, Société Française de Microbiologie.
- Bockelman, W., Krusch, U., Engel, G., Klijn, N., Smit, G. and Heller, J. 1997. The microflora of Tilsit cheese. Part 1. Variability of the smear flora. *Nahrung* 41: 208-212.
- Bockelmann, W., Fuehr, C., Martin, D. and Heller, K. 1997. Color development by red-smear surface bacteria. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 49(4): 285-292.
- Bockelmann, W., Willems, K.P., Neve, H. and Heller, K.H. 2005. Cultures for the ripening of smear cheeses. *International Dairy Journal* 15(6-9): 719-732.
- Bonaïti, C., Leclercq-Perlat, M. N., Latrille, E. and Corrieu, G. 2004. Desacidification by *Debaryomyces hansenii* of smear soft cheeses ripened in controlled conditions : Influences of relative humidity and of temperature. *Journal of Dairy Science* 87(11): 3976-3988.
- Botton, B. 1991. La physiologie des levures. *In* Biotechnologie des levures Masson éditions. Paris. p.97-169.
- Boyaval, P. and Desmazeaud, M. 1983. Le point des connaissances sur *Brevibacterium linens*. *Le Lait* 63: 187-216.
- Brennan, N.M., Ward, A.C., Beresford, T.P., Fox, P. F., Goodfellow, M. and Cogan, T.M. 2002. Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 68(2): 820-830.
- Brûlé, G., Lenoir, J. and Remeuf, F. 1997. La micelle de caséine et la coagulation du lait. *In* Le fromage. Eck, A. et Gillis, J.-C. Lavoisier, Tec & Doc. Paris. p.7-39.
- Bury, Karl. 1999. Continuous distributions. *In* Statistical distributions in engineering Cambridge University Press. Cambridge (UK).

- C.N.I.E.L. 2005. L'économie laitière en chiffres. Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière, Paris.
- Cantéri, G. 1997. Les levains lactiques. *In* Le fromage. Eck, A. et Gillis, J.-C. Lavoisier Tec & Doc. Paris. p.175-195.
- Carrera, J. and Neuman, S.P. 1986. Estimation of aquifer parameters under transient and steady state conditions : 2. Uniqueness, stability, and solution algorithms. *Water Resources Research* 22(2): 211-227.
- Champagne, C.P., Soullignac, L., Marcotte, M. and Innocent, J.P. 2003. Texture et évolution du pH de fromages de type Brie entreposés en atmosphère contrôlée. *Le lait* 83: 145-151.
- Choisy, C., Desmazeaud, M., Gripon, J.-C., Lambert, G. and Lenoir, J. 1997a. La biochimie de l'affinage. *In* Le fromage. Eck, A. et Gillis, J.-C. Lavoisier Tec & Doc. Paris. p.86-153.
- Choisy, C., Desmazeaud, M., Gueguen, M., Lenoir, J., Schmidt, J.-L. and Tourneur, C. 1997b. Les phénomènes microbiens. *In* Le fromage. Eck, A. et Gillis, J.-C. Lavoisier Tec & Doc. Paris. p.377-446.
- Collins, Yvonne F., McSweeney, Paul L. H. and Wilkinson, Martin G. 2003. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal* 13(11): 841-866.
- Corsetti, A., Rossi, J. and Gobbetti, M. 2001. Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 69(1-2): 1-10.
- Cuer, A., Dauphin, G., Kergomard, A., Dumont, J.P. and Adda, J. 1979. Production of S-methylthioacetate by *Brevibacterium linens*. *Applied and Environmental Microbiology* 38(2): 332-334.
- Dako, E., El Soda, M., Vuilleumard, J. -C. and Simard, R. E. 1995. Autolytic properties and aminopeptidase activities of lactic acid bacteria. *Food Research International* 28(5): 503-509.
- Dellaglio, F., De Roissart, H., Torriani, S., Curk, M.C. and Janssens, D. 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *In* Bactéries Lactiques : Aspects

fondamentaux et technologiques. De Roissart, H. et Luquet, F. M. Loriga. Paris. Volume 1, p.25-70.

Eberl, H., Morgenroth, E., Noguera, D., Picioreau, C., Rittmann, B., Van Loosdrecht, M. and Wanner, O. 2006. Model selection. *In* Mathematical modeling of biofilms IWA Publishing. Hove, UK. p.11-41.

El Soda, M. A. 1993. The role of lactic acid bacteria in accelerated cheese ripening. *FEMS Microbiology Reviews* 12(1-3): 239-251.

Eliskases-Lechner, F. and Ginzinger, W. 1995. The bacterial flora of surface-ripened cheeses with special regard to coryneforms. *Le Lait* 75: 571-584.

Fadda, M. E., Cosentino, S., Deplano, M. and Palmas, F. 2001. Yeast populations in Sardinian feta cheese. *International Journal of Food Microbiology* 69(1-2): 153-156.

Farkye, N. Y., Madkor, S. A. and Atkins, H. G. 1995. Proteolytic abilities of some lactic acid bacteria in a model cheese system. *International Dairy Journal* 5(7): 715-725.

Fiedler, F., Schäffler, M. and Stackebrandt, E. 1981. Biochemical and nucleic acid hybridisation studies on *Brevibacterium linens* and related strains. *Archives of microbiology* 129(1): 85-93.

Fox, P. F. and Wallace, J. M. 1997. Formation of flavor compounds in cheese. *Advances in Applied Microbiology* 45: 17-85.

Fox, P.F., Law, J., Mc Sweeney, P.L.H. and Wallace, J. 1993. Biochemistry of cheese ripening. *In* Cheese : chemistry, physics and microbiology Fox (ed). London. vol1, p.389-438.

Frau, M., Simal, S., Femenia, A., Sanjuan, E. and Rosselo, C. 1999. Use of principal component analysis to evaluate the physical properties of Mahon cheese. *European Food Research Technology* 210: 73-76.

Gavriš, E. Y., Vrauzova, V.I., Potekhina, N.V., Karasev, S.G., Poltnikova, E.G., Altyntseva, O.V., Korosteleva, L.V. and Evtushenko, L.I. 2004. Three new species of Brevibacteria, *Brevibacterium antiquum* sp. nov., *Brevibacterium aurantiacum* sp. nov., *Brevibacterium permense* sp. nov. *Microbiology* 73(2): 176-183.

- Gerla, P. E. and Rubiolo, A. C. 2003. A model for determination of multicomponent diffusion coefficients in foods. *Journal of Food Engineering* 56(4): 401-410.
- Geurts, T. J., Walstra, P. and Mulder, H. 1974. Water binding to milk protein, with particular reference to cheese. *Netherlands milk dairy journal* 28: 64-72.
- Ghaly, A. E. and El-Taweel, A. A. 1997. Kinetic modelling of continuous production of ethanol from cheese whey. *Biomass and Bioenergy* 12(6): 461-472.
- Ghaly, A. E., Kamal, M. and Correia, L. R. 2005. Kinetic modelling of continuous submerged fermentation of cheese whey for single cell protein production. *Bioresource Technology* 96(10): 1143-1152.
- Gobbetti, M., Lanciotti, R., De Angelis, M., Rosaria Corbo, M., Massini, R. and Fox, P. F. 1999. Study of the effects of temperature, pH, NaCl, and aw on the proteolytic and lipolytic activities of cheese-related lactic acid bacteria by quadratic response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology* 25(10): 795-809.
- Guéguen, M. 1995. Les levures, agents indispensables en industries agro-alimentaires. *Bulltein de la Société Française de Microbiologie* 10: 273-278.
- Guéguen, M. and Schmidt, J.L. 1992. Les levures et *Geotricum candidum*. In *Les groupes microbiens d'intérêt laitiers*. Eds J. Hermier, J. L. F. W. INRA-CEPIL. Paris.
- Guggenheim, E.A. 1966. *Application of Statistical Mechanics*. Clarendon Press, Oxford.
- Hardy, J. 1997. L'activité de l'eau et le salage. In *Le fromage Lavoisier Tec & Doc*. Paris. p.62-84.
- Hassouna, M. and Guizani, N. 1995. Evolution de la flore microbienne et des caractéristiques physico-chimiques au cours de la maturation du fromage tunisien de type Camembert fabriqué avec du lait pasteurisé. *Microbiologie, hygiène alimentaire* 7(18): 14-23.
- Holland, R., Liu, S.-Q., Crow, V.L., Delabre, M.-L., Lubbers, M., Bennett, M. and Norris, G. 2005. Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: Milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. *International Dairy Journal* 15(6-9): 711-718.
- Hongxu, N. and Gunasekaran, S. . 1998. Food quality prediction with neural networks. *Food Technology* 52(10): 60-65.

- Horiuchi, J., Shimada, T., Funahashi, H., Tada, K., Kobayashi, M. and Kanno, T. 2004. Artificial neural network model with a culture database for prediction of acidification step in cheese production. *Journal of Food Engineering* 63(4): 459-465.
- Iglesias, H. A. and Chirife, Jorge. 1995. An alternative to the Guggenheim, Anderson and De Boer model for the mathematical description of moisture sorption isotherms of foods. *Food Research International* 28(3): 317-321.
- Irlinger, F., 2000. Caractérisation phénotypique et moléculaire de la diversité des bactéries d'intérêt technologique, de la surface des fromages. Thèse de Doctorat. Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris. 172 pages.
- Jacobsen, T. and Poulsen, O. M. 1995. Comparison of lipases from different strains of the fungus *Geotrichum candidum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1257(2): 96-102.
- Jimenez-Marquez, S.A., Thibault, J. and Lacroix, C. 2005. Prediction of moisture in cheese of commercial production using neural networks. *International Dairy Journal* 15(11): 1156-1174.
- Kohl, W., Achenbach, H. and Reichenbach, H. 1983. The pigments of *Brevibacterium linens*: Aromatic carotenoids. *Phytochemistry* 22(1): 207-210.
- Kujawski, M., Cichosz, G., Podhajna, E. and Sańko, B. 2003. Effect of ripening temperature on proteolysis and organoleptic properties of Edam-type cheese. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* 6(1): 143-153.
- Law, J. and Haandrikman, A. 1997. Proteolytic Enzymes of Lactic Acid Bacteria. *International Dairy Journal* 7(1): 1-11.
- Le Graët, Y. and Brûlé, G. 1988. Migration des macro et oligo-éléments dans un fromage à pâte molle de type Camembert. *Le lait* 68(2): 219-234.
- Le Graët, Y., Brûlé, G., Maubois, J.L. and Oeuvarard, G. 1986. Répartition et évolution des éléments minéraux au cours de l'affinage des fromages à pâte cuite type Beaufort. *Le Lait* 66: 391-404.

- Le Graët, Y., Lepienne, A., Brûlé, G. and Ducruet, P. 1983. Migration du calcium et des phosphates inorganiques dans les fromages à pâte molle de type Camembert au cours de l'affinage. *Le Lait* 66: 317-332.
- Leclercq-Perlat, M.-N., Oumer, A., Bergere, J.-L., Spinnler, H.-E. and Corrieu, G. 1999. Growth of *Debryomyces hansenii* on a bacterial surface-ripened soft cheese. *Journal of Dairy Research* 66: 271-281.
- Leclercq-Perlat, M.-N., Oumer, A., Bergere, J.-L., Spinnler, H.-E. and Corrieu, G. 2000a. Behavior of *Brevibacterium linens* and *Debaryomyces hansenii* as ripening Flora in controlled Production of smear soft cheese from Reconstituted Milk : Growth and substrate consumption. *Journal of Dairy Science* 83(2): 1665-1673.
- Leclercq-Perlat, M.-N., Oumer, A., Buono, F., Spinnler, H.-E. and Corrieu, G. 2000b. Behavior of *Brevibacterium linens* and *Debaryomyces hansenii* as ripening Flora in controlled Production of smear soft cheese from Reconstituted Milk : Protein degradation. *Journal of Dairy Science* 83: 1674-1683.
- Leclercq-Perlat, M. N., Buono, F., Lambert, D., Spinnler, H. E. and Corrieu, G. 2004a. Controlled Production of Camembert-Type Cheeses : Part I. Microbiological and physicochemical evolutions. *Journal of Dairy Research* 71(3): 346-354.
- Leclercq-Perlat, M. N., Corrieu, G. and Spinnler, H. E. 2004b. The color of *Brevibacterium linens* depends on the yeast used for cheese desacidification. *Journal of Dairy Science* 87(5): 1536-1544.
- Leclercq-Perlat, M. N., Picque, D., Riahi, H. and Corrieu, G. 2006. Microbiological and Biochemical Aspects of Camembert-Type Cheeses Depend on Atmospheric Composition in the Ripening Chamber. *Journal of Dairy Science* 89(8): 3260-3273.
- Lecocq, J., Gueguen, M. and Coiffier, O. 1996. Importance de l'association *Geotrichum candidum*-*Brevibacterium linens* pour l'affinage de fromages à croûte lavée. *Science des Aliments* 16(3): 317-327.
- Lenoir, J., Lambert, G., Schmidt, J.L. and Tourneur, C. 1985. La maîtrise du bioréacteur fromage. *Biofutur* 41: 23-50.
- Lortal, S. and Chapot-Chartier, M.-P. 2005. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal* 15(6-9): 857-871.

- Lues, J. F. R. and Bekker, A. C. M. 2002. Mathematical Expressions for Organic Acids in Early Ripening of a Cheddar Cheese. *Journal of Food Composition and Analysis* 15(1): 11-17.
- Marcos, A. 1993. Water activity in cheese in relation to composition, stability and safety. *In Cheese : Chemistry, physics and microbiology*. Fox, P. F. Chapman & Hall. London. Vol.1, p.141-191.
- Marcos, A., Alcalá, M., Leon, F., Fernández-Salguero, J. and Esteban, M.A. 1981. Water activity and chemical composition of cheese. *Journal of Dairy Science* 64: 622-626.
- Marcos, A. and Esteban, M.A. 1982. Nomograph for predicting water activity of soft cheese. *Journal of Dairy Science* 65: 1795-1797.
- Marquardt, D. 1963. An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. *SIAM J. Appl. Math* 11: 431-441.
- Mascarenhas, W. J., Akay, H. U. and Pikal, M. J. 1997. A computational model for finite element analysis of the freeze-drying process. *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering* 148(1-2): 105-124.
- Masoud, W. and Jakobsen, M. 2003. Surface ripened cheeses: the effects of *Debaryomyces hansenii*, NaCl and pH on the intensity of pigmentation produced by *Brevibacterium linens* and *Corynebacterium flavescens*. *International Dairy Journal* 13(2-3): 231-237.
- Mathlouthi, M. 2001. Water content, water activity, water structure and the stability of foodstuffs. *Food Control* 12(7): 409-417.
- Mc Sweeney, P. L. H. 2004. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology* 57(2-3): 127-144.
- Mc Sweeney, P. L. H. and Sousa, M. J. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening : A review. *Le lait* 80: 293-324.
- McSweeney, Paul L H. 2004. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology* 57(2-3): 127-144.
- Mirade, P. S., Rougier, T., Kondjoyan, A., Daudin, J. D., Picque, D. and Corrieu, G. 2004. Caractérisation de l'aéroulque d'un hâloir de fromagerie et des échanges air-produit. *Le lait* 84: 483-500.

- Molimard, P. and Spinnler, H. E. 1996. Review: Compounds involved in the flavor of surface mold ripened cheeses: origins and properties. *Journal of Dairy Science* 79: 169-184.
- Monod, J. 1942. Recherche sur la croissance des cultures bactériennes. Hermann et C^{ie}, Paris.
- Motta, A.S. and Brandelli, A. 2002. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology* 92(1): 63-70.
- National Research Council 1990. Groundwater Models : Scientific and Regulatory Applications. National Academies Press, Washington, DC.
- Noomen, A. 1983. Proteolysis in cheese: sources and consequences. *Netherlands Milk & Dairy Journal* 37(1/2): 96-97.
- Olson, N. F. 1990. The impact of lactic acid bacteria on cheese flavor. *FEMS Microbiology Letters* 87(1-2): 131-147.
- Oumer, A., 1997. Dynamique d'évolution des flores microbiennes d'un fromage à pâte molle et à croûte lavée en relation avec quelques aspects physico-chimiques et biochimiques. Thèse de Doctorat. Institut National Agronomique, Paris. 148 pages.
- Oumer, A., Leclercq-Perlat, M. N., Bergere, J. L. and Corrieu, G. 1996. Mise au point d'une méthode de mesure de la concentration totale en cellules de *Brevibacterium linens* à la surface d'un fromage à pâte molle et à croûte lavée. *Le Lait* 76(4): 389-404.
- Pajonk, A. S., Saurel, R. and Andrieu, J. 2003a. Experimental study and modeling of effective NaCl diffusion coefficients values during Emmental cheese brining. *Journal of Food Engineering* 60(3): 307-313.
- Pajonk, A. S., Saurel, R., Andrieu, J., Laurent, P. and Blanc, D. 2003b. Heat transfer study and modeling during Emmental ripening. *Journal of Food Engineering* 57(3): 249-255.
- Paquet, J., Lacroix, C. and Thibault, J. 2000. Modeling of pH and Acidity for Industrial Cheese Production. *Journal of Dairy Science* 83(11): 2393-2409.
- Payne, C. and Bruce, A. 2001. The Yeast *Debaryomyces hansenii* as a Short-Term Biological Control Agent against Fungal Spoilage of Sawn *Pinus sylvestris* Timber. *Biological Control* 22(1): 22-28.

- Peyrin, F., Kondjoyan, A. and Daudin, J. D. 1995. Analyse des difficultés de mesure de la vitesse de l'air dans les industries agro-alimentaires. *Industries Alimentaires et Agricoles* 112(10): 728-735.
- Picque, D., Leclercq-Perlat, M. N. and Corrieu, G. 2006. Effects of Atmospheric Composition on Respiratory Behavior, Weight Loss, and Appearance of Camembert-Type Cheeses During Chamber Ripening. *Journal of Dairy Science* 89(8): 3250-3259.
- Piton, C. and Fontanier, C. 1990. Caractérisation d'une collection de souches de bactéries corynéformes de la morge du gruyère de comté. *Le Lait* 70(5-6): 383-398.
- Poveda, J. M., Garcia, A., Martin-Alvarez, P. J. and Cabezas, L. 2004. Application of partial least squares (PLS) regression to predict the ripening time of Manchego cheese. *Food Chemistry* 84(1): 29-33.
- Ramet, J.P. 1985. La fromagerie et les variétés de fromages du bassin Méditerranéen. *Etude FAO Production et santé animale* 48, Rome.
- Ramet, J.P. 1997. Technologie comparée des différents types de caillé. *In Le fromage*. Eck, A. et Gillis, J.-C. Lavoisier Tec & Doc. Paris. p.334-364.
- Ratray, F.P. and Fox, P.F. 1999. Aspects of enzymology and biochemical properties of *Brevibacterium linens* relevant to cheese ripening : A review. *Journal of Dairy Science* 82(5): 891-909.
- Richard, J. and Zadi, H. 1983. Inventaire de la flore bactérienne dominante des Camemberts fabriqués avec du lait cru *Le lait* 63: 25-42.
- Roger, B., Desobry, S. and Hardy, J. 1998. Respiration of *Penicillium camemberti* during ripening and cold storage of semi soft cheese. *Le lait* 78: 241-250.
- Roostita, R. and Fleet, G. H. 1996. The occurrence and growth of yeasts in Camembert and Blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 28(3): 393-404.
- Rosso, L., Bajard, S., Flandrois, J. P., Lahellec, C., Fournaud, J. and Veit, P. 1996. Differential growth of *listeria monocytogenes* at 4 and 8°C : Consequences for the shelf life of chilled products. *Journal of Food Protection* 59(9): 944-949.
- Savageau, M. A. 1971. Parameter Sensitivity as a Criterion for Evaluating and Comparing the Performance of Biochemical Systems. *Nature* 229(5286): 542-544.

- Scott, W.J. 1953. Water relations of *Staphylococcus aureus* at 30 degrees C. Australian Journal of Biology and Science 6(4): 549-564.
- Sorensen, B. B. and Jakobsen, M. 1997. The combined effects of temperature, pH and NaCl on growth of *Debaryomyces hansenii* analysed by flow cytometry and predictive microbiology. International Journal of Food Microbiology 34: 209-220.
- Soullignac, L., 1995. Propriétés des levures fromagères. Influence des sources de carbone utilisées sur leurs aptitudes à désacidifier les caillés et à former des composés d'arôme. These de Doctorat. Institut National Agronomique de Paris-Grignon, Paris. 202 pages.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A. and Ward-Rainey, N. L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. International Journal of Systematic Bacteriology 47(2): 479-491.
- Urbach, G. 1995. Contribution of Lactic Acid Bacteria to Flavour Compound Formation in Dairy Products. International Dairy Journal 5(8): 877-903.
- Valance, C., 1996. Amélioration des qualités organoleptiques du Munster par sélection de la flore d'affinage. Thèse de Doctorat. Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris. 180 pages.
- Valdès-Stauber, N., Scherer, S. and Seiler, H. 1997. Identification of yeasts and coryneform bacteria from the surface microflora of brick cheeses. International Journal of Food Microbiology 34: 115-129.
- van den Tempel, T. and Jakobsen, M. 1998. Yeasts Associated with Danablu. International Dairy Journal 8(1): 25-31.
- van den Tempel, T. and Nielsen, M. S. 2000. Effects of atmospheric conditions, NaCl and pH on growth and interactions between moulds and yeasts related to blue cheese production. International Journal of Food Microbiology 57(3): 193-199.
- Vassal, L., Monnet, V., Le Bars, D., Roux, C. and Gripon, J-C. 1986. Relation entre le pH, la composition chimique et texture des fromages de type Camembert. Le Lait 64(397-417):
- Viljoen, B. C., Khoury, A. R. and Hattingh, A. 2003. Seasonal diversity of yeasts associated with white-surface mould-ripened cheeses. Food Research International 36(3): 275-283.

Walter, E. and Pronzato, L. 1994. Identification of parametric models. Communications and Control Engineering Series, Springer-Verlag, Berlin.

Weimer, B., Dias, B. and Ummadi, M. 1997. Influence of NaCl and pH on intracellular enzymes that influence cheddar cheese ripening. *Le Lait* 77: 383-398.

Weissenfluh, A.V. and Puhan, Z. 1987. Einfluss der klimatischen bedingungen im reifungsraum auf das wachstum von *Penicilium camembertii* und die qualität von Camembert. *Schweiz. Milchw. Forschung* 16(2): 37-44.

Willem Schepers, A., Thibault, J. and Lacroix, C. 2002. *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part II: kinetic modeling and model validation. *Enzyme and Microbial Technology* 30(2): 187-194.

Wolf, W., Spiess, W.E.L. and Jung, G. 1985. Properties of water in foods in relation to food quality and stability. *In* Standardization of isotherm measurments. Simatos, D. et Multon, J. Martinus Nijhoff Publishers. The Netherlands. p.661-679.

ANNEXE I

Détermination de la teneur en matières grasses : méthode acido- butyrométrique

Pour le lait : Norme AFNOR NF V04-210 (décembre 1971)

1 : Objet et domaine d'application

La présente norme a pour objet de décrire la méthode acido-butyrométrique (*) de détermination de la teneur en matières grasses du lait. La capacité de la pipette à lait et les corrections à appliquer si le lait n'a pas la teneur en matière grasse moyenne, ne sont pas spécifiées, mais des directives sont données sur la manière de déterminer ces deux points (voir annexes B).

La méthode est applicable au lait entier et au lait partiellement écrémé.

Avec de légères modifications dont les détails sont donnés, elle est également applicable :

- a) au lait écrémé
- b) au lait contenant des conservateurs.

Elle n'est pas applicable au lait ayant subi un traitement d'homogénéisation.

2 : Définition

La méthode acido-butyrométrique est une technique conventionnelle qui, lorsqu'elle est appliquée à un lait entier, de teneur en matière grasse exprimée en grammes pour 100 grammes de lait ou 100 mL de lait – selon le volume de lait délivré par la pipette à lait utilisée – qui est la même que celle, ou équivalente, à celle obtenue par une méthode de référence gravimétrique (**).

Note :

Des déterminations comparatives périodiques par la méthode acido-butyrométrique et par une méthode de référence doivent être faites en vue de vérifier si chacun des réactifs et si la technique acido-butyrométrique utilisée satisfont aux exigences de l'Annexe B (Paragraphe 2). Pour cela, il faut appliquer les spécifications du paragraphe 8.3.2.

3 : Principe

Après dissolution des protéines par addition d'acide sulfurique, séparation de la matière grasse du lait par centrifugation, dans un butyromètre, la séparation étant favorisée par l'addition d'une petite quantité d'alcool amylique.

Obtention de la teneur en matière grasse (en grammes pour 100 g ou 100 mL de lait) par lecture directe sur l'échelle butyrométrique.

(*) Méthode dite de Gerber

(**) Norme NF V04-214 : « lait – Détermination de la teneur en matière grasse (méthode par extraction éthéro – ammoniacale) ».

4 : Réactifs

4.1 Acide sulfurique concentré, densité = $1,820 \pm 0,005$ g/mL, incolore ou à peine ambré, ne contenant aucune impureté pouvant agir sur le résultat.

4.2 Alcool amylique (voir annexe A) de densité = $0,813 \pm 0,005$ g/mL, intervalle de distillation $130 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$.

5 : Appareillage

5.1 Butyromètre à lait, conforme à la norme NF B 32-521, muni d'un bouchon approprié. Utiliser le type de butyromètre dont l'échelle correspond le mieux à la teneur en matière grasse supposée de l'échantillon.

5.2 Pipette à lait à un trait, dont le volume sera fixé en fonction du mode d'expression des résultats.

Avec la pipette de 11 mL, NF B 35-523, l'échelle du butyromètre donnera directement le résultat en grammes de matière grasse pour 100 mL de lait.

5.3 Pipette ou système automatique permettant de délivrer $10,0 \text{ mL} \pm 0,2 \text{ mL}$ d'acide sulfurique (4.1).

5.4 Pipette ou système automatique permettant de délivrer $1,0 \text{ mL} \pm 0,05 \text{ mL}$ d'alcool amylique (4.2).

5.5 Centrifugeuse dans laquelle les butyromètres peuvent être placés, munie d'un indicateur de vitesse donnant le nombre de tours à la minute à ± 50 tr/min. maximum près.

La centrifugeuse utilisée doit être telle que la température du contenu des butyromètres, après centrifugation (paragraphe 7.4) soit comprise entre 30 et 50 °C. L'utilisation d'une centrifugeuse chauffante est néanmoins exclue.

La centrifugeuse, lorsqu'elle est chargée, doit être capable d'exercer en 2 minutes une force centrifuge de $350 \text{ g} \pm 50 \text{ g}$ à l'extrémité du bouchon des butyromètres. Une telle force centrifuge peut être obtenue avec des centrifugeuses ayant un rayon effectif suivant (distance horizontale entre l'axe de la centrifugeuse et l'extrémité extérieure des bouchons des butyromètres) et fonctionnant à la vitesse indiquée :

Rayon effectif (mm)	Tours par minute (± 70 tr/min)
240	1140
245	1130
250	1120
255	1110
260	1100
265	1090
270	1080
275	1070
300	1020
325	980

Note : La force centrifuge à l'extrémité du rayon d'une centrifugeuse est donnée par la formule : $1,12 \cdot 10^{-6} \times R \times N^2$

où R est le rayon horizontal effectif, en millimètres, et N la vitesse de rotation en tours par minutes.

5.6 Bain d'eau maintenu à une température de $65 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ et permettant de maintenir les butyromètres en position verticale, les échelles étant entièrement immergées.

5.7 Thermomètre approprié, destiné à vérifier la température du bain d'eau.

6 : Echantillonnage

Effectuer l'échantillonnage conformément à la norme NF V 04-202 « Lait – Echantillonnage en vue de l'analyse chimique et physique. ».

7 : Mode Opérateur

7.1 Préparation de l'échantillon

Opérer conformément à la norme NF V 04-203 « Lait – Préparation de l'échantillon en vue de l'analyse chimique et physique. ».

7.2 Préparation du butyromètre et prise d'essai

A l'aide d'une pipette ou d'un système automatique (5.3), en opérant de façon que l'acide ne mouille pas le col du butyromètre on n'entraîne pas d'air, mesurer 10 mL d'acide sulfurique (4.1) et les introduire dans le butyromètre (5.2).

Retourner doucement trois ou quatre fois le récipient contenant l'échantillon préparé (7.1), prélever immédiatement à la pipette à lait (5.2) le volume fixé de lait et le verser dans le butyromètre sans mouiller le col de celui-ci, de façon qu'il forme une couche au-dessus de l'acide.

A l'aide de la pipette ou d'un système automatique (5.4), mesurer 1 mL d'alcool amylique (4.2) et l'introduire dans le butyromètre sans mouiller le col du butyromètre ni mélanger les liquides.

Bien boucher le butyromètre sans perturber son contenu. Lorsqu'un bouchon biconique est utilisé, l'enfoncer jusqu'à ce que la partie la plus large soit au moins au niveau du haut du col. Lorsqu'un bouchon de sécurité est utilisé, l'enfoncer jusqu'à ce que le bourrelet soit en contact avec le col du butyromètre.

7.3 Dissolution des protéines

Agiter et retourner le butyromètre, convenablement protégé pour la casse ou de perte de bouchon, jusqu'à ce que son contenu soit complètement mélangé, et jusqu'à ce que les protéines soient entièrement dissoutes, c'est à dire jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de particules blanches.

7.4 Centrifugation

Placer immédiatement le butyromètre dans la centrifugeuse (5.5). Amener la centrifugeuse à la vitesse requise en 2 minutes, puis maintenir cette vitesse pendant 4 minutes.

7.5 Lecture

Retirer le butyromètre en ajustant le bouchon, si nécessaire, pour amener la colonne de matière grasse dans la zone de l'échelle. Placer le butyromètre, le bouchon dirigé vers le bas, dans un bain d'eau à $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (5.6), pendant 3 à 5 minutes ; le niveau d'eau doit être au-dessus du sommet de la colonne de matière grasse.

Enlever le butyromètre du bain d'eau, le bouchon étant dirigé vers le bas, et ajuster soigneusement le bouchon pour amener l'extrémité inférieure de la colonne grasse avec le minimum de mouvement de cette colonne devant le repère le plus proche, de préférence un trait - repère principal.

Lorsqu'un bouchon solide est utilisé, opérer en tirant dessus et non en l'enfonçant de force dans le col.

Lorsqu'un bouchon de sécurité est utilisé, insérer la clé et appliquer une pression suffisante pour amener la colonne dans la position désirée.

Noter le trait – repère (A) correspondant à l'extrémité inférieure de la colonne de matière grasse, puis, en ayant soin de ne pas bouger celle-ci, aussi rapidement que possible (en moins de 10 secondes), noter le trait – repère au haut de la colonne de matière grasse coïncidant avec le point le plus bas du ménisque (B).

Effectuer la lecture à la moitié du plus petit échelon près.

Lorsqu'un fait les lectures, le butyromètre doit être maintenu verticalement et, si on ne dispose pas d'un appareil de lecture automatique, l'œil doit être au niveau du point de lecture.

Note : Si la matière grasse est trouble ou de couleur foncée, ou s'il y a un dépôt noir ou blanc au bas de la colonne de matière grasse, la valeur obtenue pour la teneur en matière grasse ne sera pas exacte.

Si une vérification du résultat obtenu est nécessaire, replacer le butyromètre dans le bain d'eau pendant 3 à 5 minutes, puis le retirer et faire les lectures comme indiqué au paragraphe ci-dessus.

8 : Expression des résultats

8.1 Mode de calcul

La teneur en matière grasse du lait est :

$$B - A$$

où A est la lecture faite à l'extrémité inférieure de la colonne de matière grasse et B est la lecture faite à l'extrémité supérieure de la colonne de matière grasse.

La teneur en matière grasse est exprimée, soit en grammes pour 100 g de lait, soit en grammes pour 100 mL de lait selon que la capacité de la pipette à lait a été choisie pour le premier ou le second mode d'expression des résultats considérés.

8.2 Répétabilité

La différence entre les résultats obtenus pour deux déterminations effectuées simultanément ou rapidement l'une après l'autre, sans tenir compte de l'erreur d'échelle des butyromètres, ne doit pas être supérieure à la valeur correspondant au plus petit échelon de l'échelle du butyromètre, c'est à dire 0,05 %, 0,1 % ou 0,2 % de matière grasse (voir norme NF B 35-521).

Lorsqu'on applique des corrections pour les erreurs d'échelle, la différence entre deux déterminations ne doit pas être supérieure à la moitié du plus petit échelon.

8.3 Correction des résultats

8.3.1 Si la valeur obtenue est en dehors des tolérances pour lesquelles la pipette à lait utilisée a donné des résultats en accord avec la méthode de référence, utiliser, si on le désire, les corrections appropriées (annexe B).

8.3.2 Si pour des cas particuliers, on désire obtenir une teneur en matière grasse aussi sûre que possible, par la méthode acido-butyrométrique, utiliser un butyromètre dont les erreurs d'échelle ont été déterminées.

Corriger les lectures pour les erreurs d'échelle et ensuite, si nécessaire, appliquer les corrections comme décrit ci-dessus au paragraphe 8.3.1.

9 : Cas des laits écrémés

Choisir un butyromètre gradué de 0 à 4 %

Répéter la centrifugation au moins une fois.

10 : Cas des laits contenant des conservateurs

Opérer comme au chapitre 7, mais pour la préparation de l'échantillon (7.1), il est parfois nécessaire de réchauffer légèrement à 35 °C – 40 °C afin de permettre la dispersion complète de la couche de crème.

De plus, en particulier pour le lait formolé, la dissolution des protéines (7.3) peut présenter quelques difficultés. Dans ce cas, placer le butyromètre, le bouchon dirigé vers le bas, dans le bain d'eau, en agitant et en retournant de temps en temps le butyromètre jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de particules blanches.

Le reste du mode opératoire étant sans changement.

11 : Procès – verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai doit indiquer la méthode utilisée et préciser, en particulier, la capacité de la pipette à lait et l'échelle du butyromètre ; il doit indiquer le résultat obtenu ainsi que son mode d'expression et si ce résultat a été corrigé selon l'une des procédures décrites au paragraphe 8.3.

Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente norme ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur les résultats, et notamment toute observation indiquant si le résultat est d'une exactitude douteuse (par exemple voir note du paragraphe 7.5).

Le procès-verbal d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

Annexe A : Spécifications de l'alcool amylique

A.1. Composition

L'alcool amylique (4.2) doit être composé d'au moins 98 % en volume d'alcools primaires : méthyl-3-butanol-1 (alcool iso-amylique) (point d'ébullition de 131,4 °C) et méthyl-2-propanol-1 (alcool amylique) (point d'ébullition de 128,0 °C). Les seules impuretés tolérées sont le méthyl-2-propanol-1 (alcool iso-butylique) et le butanol-1

Il doit être exempt de tous composés pouvant avoir une influence sur le résultat donné par la méthode acido-butyrométrique, tels que les alcools amyliques secondaires, le méthyl-2-butanol-2 (alcool amylique tertiaire), le furfuraldéhyde, le pétrole et les dérivés du benzène. Seules des traces d'eau peuvent être tolérées.

A.2. Aspect physique

L'alcool amylique doit être clair et incolore.

A.3. Masse volumique

La masse volumique de l'alcool amylique doit être de 0,808 à 0,818 g/mL à 20 °C.

A.4. Furfuraldéhyde et autres impuretés organiques

Un mélange de 5 mL de réactif et de 5 mL d'acide sulfurique (4.1) doit avoir au plus une couleur jaune ou légèrement brune.

ANNEXE II

Composition des milieux de préparation et de dénombrement des micro-organismes.

A. Milieu liquide aux casaminoacides

B. Préparation du lait glycérolé :

C. Milieu Yeast Extract Glucose Chloramphénicol (YECG)

D. Bouillon cœur – cerveau ou "Brait Heart Infusion (BHI)"

E. Milieu gélosé aux lactates (Piton et Fontanier 1990)

F. Milieu gélosé de Man, Rogosa et Sharpe (MRS)

Sauf précision contraire, l'ensemble des ingrédients et des milieux de culture utilisés lors de ce travail provient de VWR (Paris, France).

A. Milieu liquide aux casaminoacides :

Ce milieu a la composition suivante :

- Trypcase	= 10,0 g
- Casaminoacides	= 5,0 g
- Extrait de levure	= 5,0 g
- DL Lactate de sodium à 60 %	= 30,0 mL
- K ₂ HPO ₄ anhydre	= 2,5 g
- NaCl	= 5,0 g
- Eau milliQ	= qsp 1000 mL

Le pH de ce milieu est ajusté à 5,5 avant autoclavage à 121 °C pendant 20 min.

B. Préparation du lait glycérolé :

10 g de lait "skim milk" sont dissous dans 1 L d'eau milliQ (qsp). Après dissolution complète, ce lait est autoclavé à 110 °C pendant 10 min. En parallèle, du glycérol est autoclavé à 120 °C pendant 15 min. Au moment de l'utilisation, le glycérol est additionné au lait à raison de 10 mL pour 100 mL de lait, puis homogénéisé par agitation magnétique.

C. Milieu Yeast Extract Glucose Chloramphénicol (YECG) :

55 g de milieu déshydraté sont dissous dans un 1 L d'eau milliQ. Ce milieu a la composition suivante :

- Extrait de levure	= 5 g
- Glucose	= 20 g
- Chloramphénicol	= 0,1 g
- Gélose de type E	= 18 g

Avant autoclavage pendant 15 minutes à 121 °C, le pH de ce milieu est ajusté à 5,5.

D. Bouillon cœur – cerveau ou "Brait Heart Infusion" (BHI) :

Nous utilisons le milieu commercialisé par Biokar (Paris, France) dont la composition est précisée ci-dessous. 37 g de milieu déshydraté sont dissous dans 1 L d'eau milliQ.

- Extrait de cœur - cerveau	= 17,5 g
- Peptone pancréatique de gélatine	= 20,0 g
- Chlorure de sodium	= 5,0 g

- Phosphate di sodique = 2,5 g
- Glucose = 2,0 g

Avant autoclavage à 121 °C pendant 15 min, le pH est ajusté à 7,4. Après stérilisation, si nécessaire, pour empêcher la croissance des moisissures et des levures, de l'amphotéricine B stérilisé par filtration (0,22 µm) est ajoutée au milieu à raison de 50 mg/L (Piton, 1988).

E. Milieu gélosé aux DL lactates (Piton et Fontanier 1990) :

Ce milieu a la composition suivante :

- Tryptone = 10,0 g
- Extrait de levure = 5,0 g
- DL Lactate de sodium à 60 % = 5,0 mL
- NaCl = 30,0 g
- Gélose de type E (Biokar) = 18,0 g
- Eau milliQ = qsp 1 000 mL

Le pH de ce milieu est ajusté à 7 avant autoclavage à 121 °C pendant 20 minutes. Après autoclavage, le milieu est maintenu en surfusion à 48-50 °C et de l'amphotéricine B (Sigma) stérilisé par filtration (0,22 µm) est ajouté à raison de 50 mg/L.

F. Milieu gélosé de Man, Rogosa et Sharpe (MRS) :

La composition de ce milieu est précisée ci-dessous. 55 g de milieu déshydraté sont dissous dans 1 L d'eau milliQ.

- Polypeptone = 10 g
- Extrait de levure = 5 g
- Extrait de viande = 10 g
- Glucose = 20 g
- Phosphate di potassique = 2 g
- Acétate de sodium = 5 g
- Citrate d'ammonium = 2 g
- Sulfate de magnésium = 0,2 g
- Sulfate de manganèse = 0,05 g
- Tween 80 = 1,08 g
- Gélose bactériologique = 15 g

Avant autoclavage à 121 °C pendant 15 min, le pH est ajusté à 6,4.

Valorisation des compétences : un nouveau chapitre de la thèse

Doctorant : Haythem RIAHI

Ecole doctorale : ABIES (Paris)

"Mentor" : Eric Birlouez

Sujet de la thèse :

Modélisation de phénomènes microbiologiques, biochimiques et physico-chimiques
intervenant lors de l'affinage d'un fromage de type pâte molle croûte lavée

Laboratoire d'accueil : Laboratoire de Génie et de Microbiologie des Procédés Alimentaire
(INRA de Grignon 78850)

Directeur de thèse : Pr. Georges Corrieu

Date de soutenance : 19 Décembre 2006

1. Contexte et enjeux de ma thèse

Depuis une quinzaine d'années, les industries agroalimentaires évoluent dans un contexte dominé par les problèmes de sécurité alimentaire et sont confrontées à des consommateurs de plus en plus exigeants. Or, la maîtrise de la qualité des aliments transformés passe par la capacité à mesurer, au fur et à mesure de leur élaboration, les grandeurs physico-chimiques qui traduisent les propriétés des produits en cours de fabrication et celles des agents biologiques de transformation (comme les bactéries responsables de l'affinage des fromages). Parallèlement, l'évaluation en temps réel des performances des procédés de transformation peut permettre d'optimiser ces derniers et d'améliorer la productivité.

Si un grand nombre d'analyses microbiologiques et biochimiques ainsi que de mesures physiques et chimiques sont aujourd'hui réalisables, de multiples verrous technologiques subsistent lorsqu'il s'agit de caractériser les produits alimentaires et les procédés de transformation au cours du processus de fabrication. C'est notamment le cas dans le domaine des fermentations où les grandeurs biologiques et les caractéristiques des réactions microbiologiques et biochimiques sont très difficiles à déterminer en temps réel, alors même que celles-ci conditionnent fortement la qualité des produits et la productivité des procédés. Ainsi, dans l'industrie fromagère par exemple, la maîtrise de la qualité des produits finis est étroitement liée au contrôle des conditions opératoires : température, humidité relative et composition gazeuse de l'atmosphère des caves d'affinage. Il est donc essentiel d'accroître les connaissances qui permettront d'améliorer les moyens de mesure et de contrôle des procédés mis en oeuvre.

Dans ce contexte, ma thèse avait pour objectif de modéliser les phénomènes microbiologiques, biochimiques et physico-chimiques ayant lieu lors de l'affinage des fromages à pâte molle. En contribuant à une meilleure maîtrise de la qualité des produits alimentaires et au développement de procédés de fabrication reproductibles, sûrs et

performants, mon travail de recherche s'inscrivait dans un faisceau d'enjeux non seulement scientifiques et technologiques, mais aussi économiques.

L'équipe d'accueil

L'Unité Mixte de Recherche Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (UMR GMPA) de l'INRA de Grignon (78) s'intéresse à la thématique énoncée ci-dessus et l'aborde selon deux approches conduites en parallèle. La première vise le développement de capteurs et de systèmes de mesure "en ligne". Ceci concerne plus particulièrement la fabrication fromagère : suivi de la coagulation du lait, du raffermissement des caillés, de l'égouttage des fromages, de l'analyse de la composition gazeuse des hâloirs d'affinage. La seconde approche implique la conception et la mise en place de méthodes de mesures indirectes basées sur le concept de "capteurs-logiciel" : il s'agit d'associer des mesures classiques bien maîtrisées à des modèles mathématiques afin d'estimer et/ou de prédire des grandeurs clefs caractéristiques des produits et des procédés, grandeurs qui ne peuvent être mesurées directement.

Ma thèse s'inscrivait dans cette deuxième voie de recherche : elle avait pour principal objectif de développer des modèles mathématiques capables de prédire, en fonction des conditions de température et d'humidité relative, la perte de poids des fromages durant l'affinage, ainsi que l'évolution de la flore d'affinage et sa consommation de lactose et de lactate.

Encadrement

Mon projet de thèse se situant au croisement de nombreuses disciplines, des spécialistes des différents domaines concernés ont été sollicités pour leur expertise scientifique. J'ai ainsi bénéficié de l'appui des personnes suivantes :

- Dr. Cristian Tréléa Maître de conférence à l'INA P-G pour l'aspect modélisation des procédés biologiques ainsi que pour la programmation sous Matlab.

- Dr. Daniel Picque Ingénieur de recherche à l'INRA pour le volet pilotage et contrôle de l'affinage.
- Dr. Marie-Noëlle Leclercq-Perlat Chargée de recherche à l'INRA pour l'aspect fabrication fromagère et microbiologie de l'affinage.
- La thèse a été placée sous la direction pédagogique du Pr. Georges Corrieu, Professeur à l'INA P-G et directeur de l'UMR GMPA.

Partenariat

Au moment du lancement de ce projet, il avait été prévu de le réaliser avec les seuls moyens matériels et humains de l'UMR GMPA de l'INRA de Grignon. Sur le plan financier, ce travail a été entièrement supporté par l'INRA et n'a bénéficié de la contribution d'aucun autre organisme public ou privé. Cela présentait l'avantage de ne pas être soumis à des clauses de confidentialité ou à des restrictions sur la publication des résultats. Sur le plan scientifique, ce travail de thèse ne faisait partie d'aucun grand projet réunissant plusieurs partenaires. Ceci est dû, en grande partie, à l'originalité de l'approche scientifique adoptée et au nombre très restreint de laboratoires français travaillant sur cette thématique. Cependant, au cours du projet, j'ai identifié et pu établir une collaboration ponctuelle avec le laboratoire du Génie des Procédés de la Station de Recherches sur la Viande de l'INRA (centre de Theix). En effet, bien que cette équipe travaille sur les produits carnés, j'ai fait appel à leur expertise et à leurs équipements pour nous aider à caractériser la vitesse de circulation du flux d'air dans les chambres d'affinage des fromages.

Motivations personnelles

Afin de réaliser mon projet professionnel (l'accompagnement scientifique et technique d'entreprises innovantes dans le secteur des biotechnologies) j'ai choisi d'approfondir ma formation initiale d'ingénieur en réalisant un DEA puis un Doctorat. Pour ce dernier, j'ai tenu à choisir un sujet qui soit proche des problématiques concrètes de l'industrie alimentaire tout en faisant appel à des méthodes et des technologies de pointe.

2. Déroulement et coût du projet

Préparation et cadrage du projet

Au démarrage de mon travail de thèse, j'ai procédé à une évaluation sommaire des facteurs de succès et des facteurs de risque du projet. Cette étude consistait principalement à identifier les difficultés potentielles et à imaginer des mesures visant à prévenir ces risques et/ou à en diminuer l'impact négatif sur le projet. Cette démarche n'a pas été très fructueuse pour plusieurs raisons, parmi lesquelles on peut citer :

- la difficulté à estimer *a priori* le temps nécessaire à la réalisation de certaines tâches, notamment celles qui n'avaient encore jamais été conduites au sein du laboratoire,
- la chronologie de réalisation des différents volets de mon travail de recherche n'a pu être optimisée : en effet, elle dépendait fortement de la disponibilité du matériel d'analyse et des installations technologiques, facteur sur lequel nous avons peu de maîtrise.
- La mise en place de mesures préventives ou correctives pour surmonter les risques de panne ou d'indisponibilité du matériel se heurtait au fait que les installations nécessaires ne sont présentes que dans un nombre très limité de laboratoires.

Conduite du projet

Afin de définir la stratégie de recherche à adopter et de déterminer les pistes à explorer, j'ai rédigé un document de travail décrivant les objectifs, les approches envisagées et le temps prévisionnel alloué à chaque étape. Ce programme de travail a constitué ma ligne directrice durant les trois années et une base pour discuter avec mon équipe d'encadrement des stratégies et approches à retenir.

Cependant, ce document n'est pas resté figé et a fait l'objet de plusieurs modifications et réajustements tout au long des trois années de la thèse. Ces réajustements ont été dictés par les résultats obtenus et par les discussions que j'ai eues avec mes encadrants.

Le suivi du projet de thèse et l'évaluation des résultats obtenus ont été réalisés au travers de :

- réunions de travail hebdomadaires avec le (ou les) encadrant(s) directement impliqué(s) dans le travail en cours ;
- bilans mensuels avec l'ensemble des encadrants pour rendre compte de l'état d'avancement du projet ;
- rapports annuels présentant les résultats obtenus et définissant les perspectives futures.

Problèmes rencontrés et solutions apportées

Les difficultés rencontrées lors de ce projet peuvent être classées en deux catégories :

des problèmes liés à la stratégie adoptée : ils sont principalement dus au fait que, lors de la définition des objectifs de la thèse, le facteur temps été très sous-estimé et que la hiérarchisation de ces objectifs n'était pas optimisée. Ces problèmes nous ont obligés à abandonner certains volets (notamment la production de composés d'arôme) et à réduire le champ d'étude (nous sommes limités aux fromages à pâte molle et à croûte lavée).

des problèmes liés à la disponibilité du matériel et des installations : les appareils d'analyse et les installations technologiques dont nous disposons à l'UMR GMPA sont très sollicités par les différentes équipes de recherche, ce qui induit des créneaux d'exploitation réduits et, surtout, des risques de pannes élevés. Face à ces problèmes, et notamment lorsque les appareils d'analyse tombaient en panne, j'ai contacté d'autres laboratoires disposant des mêmes équipements afin de pouvoir faire mes analyses chez eux. Cependant, cette démarche a rarement été fructueuse en raison de la faible disponibilité de ce type d'instruments.

Evaluation du coût du projet

Le financement de ce projet a été assuré par l'**INRA** qui m'a accordé une bourse de thèse. Diverses dépenses connexes ont été à la charge du laboratoire d'accueil. Trois grands postes de dépenses peuvent être distingués :

Les ressources humaines : en plus de ma bourse de thèse, ce poste intègre le coût salarial de mes quatre encadrants. Pour calculer celui-ci, j'ai calculé le salaire net mensuel moyen que j'ai majoré de 25 % pour avoir le salaire brut mensuel moyen. Le temps moyen consacré par chacun d'entre eux à mon projet de recherche été estimé à 10 %. Trois techniciens se sont également mobilisés sur ma thèse, à hauteur de 10 % de leur temps de travail total. Les dépenses administratives ont été évaluées par mon laboratoire d'accueil à 1300 euros (moyenne estimée pour un travail de thèse). Précisons que les coûts salariaux reportés dans le **Tableau 1** ont été calculés en multipliant les salaires bruts par le coefficient 1,6 correspondant aux charges patronales.

Le matériel : en dehors des équipements informatiques nécessaires au travail de modélisation mathématique, neuf fabrications de fromages à pâte molle de type Munster ont été réalisées et affinées sur la plate-forme technologique du laboratoire LGMPA. Ces fabrications ont représenté des coûts spécifiques supplémentaires. En outre, les fromages ont fait l'objet d'analyses biochimiques et microbiologiques (autre source de dépenses), en vue de construire la base de données qui a permis la validation des modèles mathématiques.

La formation : lors de mon projet de thèse, j'ai suivi 120 heures de formation proposées par l'Ecole doctorale ABIES ; j'ai également participé aux "Doctoriales" (financées par l'Ecole doctorale) et bénéficié d'un accompagnement personnalisé pour réaliser ce Nouveau Chapitre de la Thèse (co-financé par ABIES et l'Association Bernard Grégory).

Tableau 1 : récapitulatif du coût de la thèse.

Ressources humaines				
	Salaire brut mensuel moyen	Coût salarial mensuel moyen	Temps consacré au projet	
Doctorant	839 €	1.342 €	36 mois	48.326 €
Encadrants (4)	3.500 €	5.600 €	4 x 3,6 mois (10 %)	80.640 €
Techniciens (3)	1.588 €	2.541 €	3 x 3,6 mois (10 %)	27.443 €
Administration				1.300 €
Sous-total				157.709 €
Matériel				
Informatique				1.300 €
Consommables				2.500 €
Exploitation de la plate-forme technologique				11.800 €
Analyses microbiologiques et chimiques				1.350 €
Sous-total				16.950 €
Formation				
Participation à des sessions ABIES				3.600 €
Doctoriales				150 €
NCT				1.500 €
Déplacements				195 €
Sous-total				5.445 €
TOTAL :				180.104 €

3. Compétences et savoir-faire mobilisés

Domaines d'expertise scientifique et compétences pratiques

Le principal objectif de ma thèse consistait à construire des **modèles mathématiques** décrivant les réactions microbiologiques et biochimiques ayant lieu lors de l'affinage des fromages à pâte molle. Pour y parvenir, plutôt qu'une approche de type « boîte noire » j'ai choisi d'adopter une approche dite « mécanistique ». Cette dernière est basée sur les lois fondamentales de biologie, de chimie et de physique régissant le fonctionnement du système à modéliser. Cette démarche permettait de satisfaire deux exigences. L'une d'entre elles était de nature « académique » : **expliquer les phénomènes biologiques et physiques** qui se

déroulent lors de l'affinage ; l'autre était une exigence pratique : les modèles de ce type peuvent en effet être utilisés au sein de « **capteurs-logiciels** » pour la mesure indirecte de grandeurs biologiques.

Afin de réaliser cet objectif, j'ai réalisé une **étude bibliographique** exhaustive sur trois domaines : la flore d'affinage et ses potentiels enzymatiques, les phénomènes de transfert ayant lieu dans le fromage lors de l'affinage et, enfin, les différentes approches de modélisation des systèmes biologiques.

J'ai également acquis **des connaissances pratiques** relatives aux procédés de fabrication et à la conduite de l'affinage des fromages à pâte molle (en les recueillant directement auprès d'industriels du secteur).

Cette thèse m'a en outre permis de mieux maîtriser la programmation informatique et, plus particulièrement, de manipuler MatLab, un langage de programmation largement utilisé en calcul scientifique. Ce travail de modélisation m'a ainsi permis d'élargir l'éventail des compétences dont m'avait doté ma formation initiale d'ingénieur en Bio-industries. Cette expérience de thèse m'a montré que je disposais de bonnes capacités à appliquer mes connaissances et compétences scientifiques à des domaines et secteurs variés.

Compétences de gestion de projet

Cette formation par la recherche m'a permis de me rendre compte de très près de la manière dont se pilote un projet scientifique, depuis l'idée jusqu'aux résultats, en passant par l'établissement de partenariats, la réadaptation des objectifs initiaux, etc. Elle m'a permis de développer certaines compétences spécifiques de gestion de projet, telles que :

- la capacité à déterminer, de façon précise, des objectifs à atteindre et, si nécessaire, à les « réajuster »,
- l'anticipation des risques potentiels et l'élaboration de stratégies pour les maîtriser,

- la détermination des grandes étapes du projet, la planification des tâches à réaliser et l'utilisation d'outils tels que les diagrammes de GANTT,
- la rédaction de comptes-rendus et de rapports d'activité,
- l'organisation et l'animation de réunions.

J'ai dû aussi prendre en charge la gestion d'un pilote de fabrication et d'affinage de fromages. Avant le lancement de chaque campagne de fabrication, un grand effort d'organisation devait être fourni. Il fallait prendre en considération de nombreux paramètres tels que l'approvisionnement en lait cru, la disponibilité des agents techniques, l'étalonnage et la vérification de l'appareillage du pilote, ou encore la réservation du matériel nécessaire aux analyses microbiologiques et chimiques.

Compétences méthodologiques

Après avoir acquis des connaissances sur le sujet par mes recherches bibliographiques et les discussions avec les gens du métier (les fromagers d'une part, les modélisateurs d'autre part), il m'a fallu **synthétiser ces informations** afin de réaliser l'adéquation entre la méthode choisie (les modèles mécanistiques dynamiques) et son contexte d'application (l'affinage industriel des fromages de type Munster). Ceci était nécessaire pour définir clairement la problématique et les moyens à mettre en œuvre pour la traiter. J'ai dû aussi **justifier mes choix** et convaincre mes encadrants de la pertinence de mon approche.

Comme tout travail de recherche, ce projet a fourni des résultats qu'il a fallu présenter par écrit (rapports, articles, manuscrit de thèse). J'ai ainsi pu perfectionner mes **compétences rédactionnelles** en français et en anglais.

A chaque fois que je présentais mes résultats ou que je parlais de mon sujet de recherche, j'ai été confronté à un auditoire hétérogène allant du maître affineur à l'informaticien en passant par le microbiologiste. Chaque domaine possédant son propre

vocabulaire, il m'a fallu **adapter mon discours** à ces différents interlocuteurs tout en évitant de tomber dans le superficiel.

Relations humaines et encadrement

Lors de ma thèse, j'ai eu la chance d'**encadrer** deux stagiaires de niveau maîtrise. J'ai donc été confronté au transfert de connaissances scientifiques et, plus encore, à des personnalités variées et aux interactions humaines. Il m'a fallu transmettre à ces deux étudiants des méthodes de travail mais aussi les rassurer face à leurs sujets d'étude. Ce fut aussi l'occasion pour moi d'apprendre à évaluer les travaux d'autres personnes.

4. Résultats et impact de ma thèse

J'ai valorisé mon travail de recherche par la rédaction de trois articles qui ont été soumis à des revues scientifiques à comité de lecture. Par ce travail de modélisation, j'ai contribué à la formalisation des connaissances relatives à l'influence des conditions opératoires sur la qualité du produit fini lors de l'affinage des fromages à pâte molle. Mes travaux ont également débouché sur la conception d'un outil informatique pouvant s'intégrer dans un module plus complet de gestion automatique de l'affinage.

Suite à cette thèse et à d'autres travaux réalisés au sein de l'UMR GMMPA un nouveau projet est actuellement en phase de démarrage. Il s'agit de la conception d'un hâloir pilote capable de gérer automatiquement l'affinage de fromages à pâte molle.

5. Perspectives de valorisation, pistes professionnelles envisagées

Parvenu aujourd'hui au terme de ma thèse, mes souhaits d'insertion professionnelle sont relativement précis. J'ai construit mon parcours de formation en fonction d'un projet professionnel qui s'est progressivement orienté vers la valorisation des produits de la recherche et l'accompagnement d'entreprises innovantes du secteur des biotechnologies. Le bilan de mes compétences m'a permis de prendre conscience que ma formation scientifique

devait être renforcée dans les disciplines managériales. J'ai donc participé, au cours de ma thèse, à des formations axées sur la création d'entreprises innovantes. Ceci m'a appris à réaliser des analyses du contexte concurrentiel, à identifier les partenariats stratégiques et à rédiger des "business plans" nécessaires à la levée de fonds. Lors de ma recherche d'emploi, j'axerai en priorité mes candidatures en direction des cabinets privés de conseil en stratégie et des services de valorisation de la recherche des organismes nationaux de recherche ou des universités.

Modeling of microbiological, biochemical and physicochemical phenomena taking place during the ripening of a smear soft cheese

ABSTRACT

This study aimed to develop mathematical models able to predict the growth of a yeast (known for its desacidification activity), the consumption of the carbonaceous substrates (lactose, lactate) and the weight loss during the ripening of a Munster type cheese.

In order to build a data base used for the establishment and the validation of the models, smear soft cheeses (Munster type) were manufactured at a pilot scale and under aseptic conditions. This base is made of the results of microbiological and biochemical analyses as well as the ripening conditions values. The cheeses were seeded, in addition to the lactic flora, by a ripening flora composed of a yeast (*Debaryomyces hansenii* 304, GMPA) and of a surface bacteria (*Brevibacterium aurantiacum* ATCC 9175). The ripening of these cheeses was limited to fourteen days and was carried out according to a two factors (temperature and relative humidity) and three levels (respectively 8, 12, 16° C and 85, 93, 99%) experimental design. Three mathematical models were built according to a dynamic mechanistic approach.

The first model (called "microbiological") succeeded in predicting, according to the temperature and of the relative humidity conditions, the growth of *D. hansenii* and the evolution of lactate and the lactose concentrations during ripening. The residual standard errors (RSE) of these predictions are satisfactory by comparison with the standard deviation of the three repeated runs carried out under the conditions of the experimental design central point. The result given by this model supports the assumption according to which *D. hansenii* consumes lactose for its growth and lactate for its maintenance.

The second model (called "weight loss") managed to predict the weight loss and the evolution of the dry matter content, with average standard residual errors close to the experimental measurements accuracy. The result obtained with this model shows that the advanced assumptions, according to which the lactose and the lactate are completely oxidized to CO₂ and O₂ and to which atmospheric oxygen does not contribute to the loss of weight, are justified.

The third model (called "generalized") was built by combining the two preceding ones. This model is able to predict, since the beginning of the ripening, the growth of *D. hansenii*, the loss of weight and the evolutions of the concentrations of lactose and lactate as well as the dry matter content of cheese according to the temperature and the relative humidity of the ripening chamber.

Modélisation de phénomènes microbiologiques, biochimiques et physico-chimiques intervenant lors de l'affinage d'un fromage de type pâte molle croûte lavée

RÉSUMÉ

L'objectif de cette étude visait à développer des modèles mathématiques capables de prédire la croissance d'une levure désacidifiante, la consommation des substrats carbonés (lactose, lactate) et la perte de poids au cours de l'affinage de fromages de type Munster.

Afin de constituer une base de données servant à l'établissement et à la validation des modèles, des fabrications de fromages à pâte molle et à croûte lavée de type Munster ont été réalisées à échelle pilote et dans des conditions aseptiques. Cette base comporte les résultats des analyses microbiologiques et biochimiques ainsi que les conditions opératoires d'affinage. Les fromages ont étéensemencés, en plus de la flore lactique, par une flore d'affinage composée d'une levure (*Debaryomyces hansenii* 304, GMPA) et d'une bactérie de surface (*Brevibacterium aurantiacum* ATCC 9175). L'affinage de ces fromages est limité à 14 jours et il est conduit selon un plan d'expérience à deux facteurs (température et humidité relative) et à trois niveaux (respectivement 8, 12, 16° C et 85, 93, 99 %).

Trois modèles mathématiques ont été construits selon une approche mécanistique dynamique. Le premier modèle (dit "microbiologique") a réussi à prédire, en fonction de la température et de l'humidité relative du hâloir, la croissance de *D. hansenii* et l'évolution des concentrations en lactose et en lactate durant l'affinage. Les erreurs résiduelles standard (RSE) de ces prédictions sont satisfaisantes par comparaison avec l'écart type des trois essais répétés sous les conditions du point central du plan d'expérience. Les résultats de ce modèle permettent de soutenir l'hypothèse selon laquelle *D. hansenii* consomme le lactose pour sa croissance et le lactate pour sa maintenance.

Le deuxième modèle (dit "perte de poids") est parvenu à prédire la perte de poids et l'évolution de la teneur en matière sèche, avec des erreurs résiduelles standard moyennes proches de la précision des mesures expérimentales. Les résultats obtenus avec ce modèle montrent que les hypothèses avancées, selon lesquelles le lactose et le lactate sont complètement oxydés en CO₂ et en O₂ et que l'oxygène atmosphérique ne contribue pas à la perte de poids, sont justifiées.

Le troisième modèle (dit "généralisé") a été construit en combinant les deux modèles précédents. Il est capable de prédire, dès le début de l'affinage, en fonction de la température et de l'humidité relative de la chambre d'affinage, la croissance de *D. hansenii*, la perte de poids et les évolutions des concentrations en lactose et lactate ainsi que la teneur en matière sèche du fromage.