



Composés formés au cours de la cuisson d'une matrice fromagère : contribution à la modélisation stoechio-cinétique multi-réponses de la réaction de Maillard

Emmanuel Bertrand

► To cite this version:

Emmanuel Bertrand. Composés formés au cours de la cuisson d'une matrice fromagère : contribution à la modélisation stoechio-cinétique multi-réponses de la réaction de Maillard. Génie des procédés. Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand 2), 2011. Français. NNT : . tel-01852777

HAL Id: tel-01852777

<https://amu.hal.science/tel-01852777>

Submitted on 2 Aug 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL - CLERMONT II

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES POUR L'INGÉNIEUR

Numéro d'ordre : D. U. : 2155 - Numéro EDSPIC : 531

Discipline : Génie des Procédés

Présentée et soutenue publiquement par

Emmanuel Bertrand

le 14 septembre 2011

**Composés formés au cours de la cuisson d'une
matrice fromagère : contribution à la modélisation
stoéchio-cinétique multi-réponses de la réaction de
Maillard**

DOCUMENT CONFIDENTIEL
jusqu'au 14 septembre 2016

JURY

M. André LEBERT
M. Francis COURTOIS
M. Thierry TALOU
Mme. Catherine BONAZZI
Mme. Anne-Sophie GUILLARD
Mme. Maud LAMBERT
M. Alain KONDOYAN
M. Jean-Louis BERDAGUE

Professeur, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand
Professeur, AgroParisTech, Massy
Ingénieur de Recherche, ENSIACET, Toulouse
Chargée de Recherche, INRA, Massy
Fromageries BEL DRAG., Vendôme
Fromageries BEL DRAG., Vendôme
Directeur de Recherche INRA, Clermont-Ferrand
Directeur de Recherche INRA, Clermont-Ferrand

Président de Jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Invitée
Invitée
Directeur de Thèse
Directeur de Thèse

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL - CLERMONT II

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES POUR L'INGÉNIEUR

Numéro d'ordre : D. U. : 2155 - Numéro EDSPIC : 531

Discipline : Génie des Procédés

Présentée et soutenue publiquement par

Emmanuel Bertrand

le 14 septembre 2011

**Composés formés au cours de la cuisson d'une
matrice fromagère : contribution à la modélisation
stoéchio-cinétique multi-réponses de la réaction de
Maillard**

DOCUMENT CONFIDENTIEL
jusqu'au 14 septembre 2016

JURY

M. André LEBERT
M. Francis COURTOIS
M. Thierry TALOU
Mme. Catherine BONAZZI
Mme. Anne-Sophie GUILLARD
Mme. Maud LAMBERT
M. Alain KONDOYAN
M. Jean-Louis BERDAGUE

Professeur, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand
Professeur, AgroParisTech, Massy
Ingénieur de Recherche, ENSIACET, Toulouse
Chargée de Recherche, INRA, Massy
Fromageries BEL DRAG., Vendôme
Fromageries BEL DRAG., Vendôme
Directeur de Recherche INRA, Clermont-Ferrand
Directeur de Recherche INRA, Clermont-Ferrand

Président de Jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Invitée
Invitée
Directeur de Thèse
Directeur de Thèse

à mes parents, à mes grands-parents.

Remerciements

Ce travail a fait l'objet d'une convention Cifre entre l'UR 370 Qualité des Produits Animaux du centre Inra de Clermont-Ferrand Theix et le Département Recherche Appliquée Groupe des Fromageries Bel situé à Vendôme. Je tiens à remercier Mademoiselle Marie-Hélène Chassagne, directrice du D.R.A.G., pour l'opportunité qui m'a été donnée de réaliser cette thèse, ainsi que pour le bon accueil qui m'a toujours été réservé à chacun de mes séjours passés à Vendôme.

Ce travail a été réalisé au sein de l'unité de recherche QuaPA, dans les équipes de « Typicité Aromatique et Authentification » (T2A) et « Couplage Transferts Transformations » (C2T). Je tiens à remercier Monsieur Jean-Pierre Renou, pour m'avoir accueilli dans son unité.

Je désire exprimer mes plus sincères remerciements au Professeur Francis Courtois et au Docteur Thierry Talou qui ont accepté de corriger et de rapporter ce travail. Je remercie également le Professeur André Lebert, et le Docteur Catherine Bonazzi qui me font l'honneur d'examiner ce travail de thèse.

Ma plus profonde gratitude va pour les Docteurs Jean-Louis Berdagué et Alain Kondjoyan qui ont assuré la co-direction scientifique de ce travail de thèse. Qu'ils soient remerciés à la hauteur de leur grande implication dans ce projet.

Je remercie également les Docteurs Anne-Sophie Guillard et Maud Lambert, qui ont toujours su apporter à nos discussions un éclairage applicatif et ont assuré l'encadrement industriel du projet.

Je remercie les Docteurs Catherine Bonazzi, Marie-Noëlle Maillard et Xuan Meyer pour leur grande implication au cours des réunions de comité de thèse qui ont permis de faire avancer ce projet. Que Marie-Noëlle Maillard et son équipe soient également remerciés pour la réalisation des mesures de l'indice de peroxyde. Que Xuan Meyer et Cédric Brandam soient aussi remerciés pour les réunions à Toulouse et leur grand secours dans la constitution d'un schéma réactionnel observable.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble des membres du projet Réactial, ainsi qu'à tous les collègues que j'ai pu fréquenter lors de mes séjours à Vendôme et à l'Inra. Je remercie en particulier Stéphane Portanguen et Frédéric Mercier, pour la réalisation des différents montages et leur contribution à la réalisation de certaines expérimentations. Ils ont toujours su rendre l'ambiance de travail agréable et apporter leur aide à chaque occasion.

J'ai une pensée particulière, pour les autres doctorants et stagiaires et tous les bons moments passés ensemble : Benoist, Guilhem, Jean-François, Samuel, Salem, Mustapha, Renata, Jérémy, Aurélie, Souleymane, Jérôme, Amandine, Jeanne, Marianne, Eléna, Julien, Julie, Elizabeth, Cyril, Mag et les autres.

Les derniers mots sont pour ma famille et Malo qui ont su m'encourager et me soutenir au cours de cette thèse.

Résumé

Le fromage fondu est issu de la seconde transformation du lait. Sa fabrication implique le mélange, le chauffage et la texturation de produits laitiers (fromage, beurre et poudres de lait) et non laitiers (agents émulsifiants, acide citrique et chlorure de sodium). Le résultat est un produit homogène, généralement tartinable et à la durée de conservation longue, souvent supérieure à 6 mois. Au cours de la fabrication et du stockage, les réactions d'oxydation des lipides, de caramélisation et de Maillard forment des composés odorants dont certains sont potentiellement indésirables pour la flaveur du produit. Dans le cadre du projet ANR-06-PNRA-023 Réactial, une démarche méthodologique a été mise en place afin : (i) d'identifier les marqueurs réactionnels précurseurs ou responsables des défauts de flaveur observés, (ii) de suivre l'évolution de ces marqueurs au cours des traitements thermiques appliqués, (iii) d'établir un schéma réactionnel observable en vue (iv) de la modélisation et de la prédiction de l'évolution des marqueurs réactionnels et indirectement de l'apparition de défauts de flaveur. Ceci a nécessité la mise au point d'une formulation de matrice de fromage fondu modèle ainsi que l'élaboration d'une cellule de traitement thermique. Différents couplages de chromatographie en phase gazeuse à l'olfactométrie ont été utilisés afin d'identifier les composés odorants. La chromatographie bidimensionnelle systématique couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol a permis une semi-quantification des composés traces et ultra-traces tandis que les précurseurs ont été quantifiés par chromatographie liquide haute performance. Les données ainsi obtenues ont permis l'écriture d'un schéma réactionnel observable qui a donné lieu à une modélisation stœchio-cinétique multi-réponses. Un ajustement des données expérimentales par le modèle a pu être réalisé malgré une quantification partielle des différents constituants.

Abstract

Processed cheese derives from a secondary milk processing step that involves mixing and heating dairy (cheese, butter and milk powders) and non-dairy products (emulsifiers). This processing yields a homogeneous product, usually spreadable, with a shelf-life often longer than 6 months. During processing and storage, lipid oxidation, caramelization and Maillard reactions occur and produce odour-active compounds. Some of them are potentially involved in the development of odour defects. As part of the ANR-06-PNRA-023 R_{ij} 1/2 actual project, a methodological approach was used in order to (i) identify key compounds responsible for the flavor defects observed, (ii) monitor the evolution of these markers during the heat treatment applied to the cheese matrix, (iii) establish an observable reaction scheme, (iv) model and predict the evolution of these compounds during thermal operations. To do this, a model cheese and its cooking cell were elaborated. Various couplings of gas chromatography with olfactometry were used to identify odorous compounds. Two-dimensional comprehensive chromatography allowed a semi-quantitation of trace and ultra-trace compounds, while precursors were quantitated by high performance liquid chromatography. An observable reaction scheme was extracted from these data and make the multi-response modelling step possible despite a partial quantitation of the volatile compounds.

Liste des communications

Publication scientifique

Bertrand, E., Machado-Maturana, E., Chevarin, C., Portanguen, S., Mercier, F., Abouelkaram, S., Tournayre, P., Guillard, A. S., Kondjoyan, A., Berdagué, J.L., Heat-induced volatiles and odor active compounds in a model processed cheese, *International Dairy Journal*, 2011.

doi :10.1016/j.idairyj.2011.04.007

Communications

Bertrand, E., Etude des réactions d'oxydation et de Maillard en relation avec les procédés appliqués à une matrice fromagère. *Journées de l'école doctorale Sciences Pour l'Ingénieur, Clermont-Ferrand, 2008*. Communication orale.

Bertrand, E., Chevarin, C., Portanguen, S., Tournayre, P., Abouelkaram, S., Kondjoyan, A., Guillard, A. S., Berdagué, J. L., Identification of odour active compounds generated in a processed cheese like model System. *Euro Food Chem XVth, Copenhagen, 4-8 juillet 2009*. Communication par poster

Table des matières

Page de couverture	i
Remerciements	vii
Résumé	ix
Abstract	xi
Liste des communications	xiii
Table des matières	xv
Table des figures	xxi
Liste des tableaux	xxiii
Introduction	1
I Synthèse bibliographique	5
Introduction de la synthèse bibliographique	5
1 Élaboration du fromage fondu	5
1.1 Composition du fromage fondu	5
1.1.1 La base fromagère	6
1.1.2 Les poudres de lait	9
1.1.3 La matière grasse laitière	11
1.1.4 Les agents émulsifiants	12
1.2 Procédés de fabrication du fromage fondu	13
1.2.1 Procédé de fabrication discontinu	14
1.2.2 Procédé de fabrication continu	16
1.2.3 Stockage des fromages fondus	18
2 Réactions se produisant au cours de la cuisson	18
2.1 Voies de dégradation des lipides	19

Table des matières

2.1.1	La voie hydrolytique	19
2.1.2	La voie oxydative	19
2.1.3	Facteurs affectant la réaction de l'oxydation des lipides	22
2.2	La réaction de Maillard	23
2.2.1	Formation du composé d'Amadori	23
2.2.2	Propagation de la réaction de Maillard	23
2.2.3	Spécificités de la dégradation de Strecker	25
2.2.4	Étape avancée de la réaction de Maillard	28
2.2.5	Étape finale de la réaction de Maillard	28
2.2.6	Approche conceptuelle de la réaction de Maillard . .	29
2.2.7	Facteurs affectant la réaction de Maillard	30
2.3	La caramélisation	34
2.4	Autres réactions	35
2.4.1	Dégradation des vitamines	35
2.4.2	Déamidation des caséines	36
3	Apports de la modélisation	36
3.1	Démarche de modélisation	36
3.2	Modélisation stœchio-cinétique multi-réponses	39
3.3	Modélisation des réactions d'oxydation des lipides	40
3.4	Modélisation des réactions de caramélisation	41
3.5	Modélisation des réactions de Maillard	41
3.6	Limitations de la modélisation stœchio-cinétique multi-réponses	42
	Conclusion de la synthèse bibliographique	43

II Matériels et Méthodes 45

	Introduction des Matériels et Méthodes	45
1	Formulation de la matrice fromagère modèle	46
1.1	Sélection des ingrédients	47
1.2	Protocole	47
1.2.1	Hydratation des caséines et poudres de lait	48
1.2.2	Émulsification de la matière grasse	48
1.3	Résultats obtenus	48
1.3.1	Composition de la matrice fromagère modèle	48
1.3.2	Texture de la matrice fromagère modèle	49
1.3.3	Évolution des globules gras au cours de la cuisson . .	52
1.3.4	Simplification de la fraction volatile initiale	53
2	Développement du système de cuisson	54
2.1	Présentation des objectifs	54
2.2	Système de cuisson initial	54
2.3	Améliorations apportées au système de cuisson	55
2.3.1	Définition du cahier des charges	55
2.3.2	Présentation du système de cuisson	57
2.4	Performances thermiques et étude de sensibilité du système de cuisson aux différents paramètres	59
2.4.1	Performances thermiques du système	59

	2.4.2	Étude expérimentale de la sensibilité aux différents paramètres	60
	2.4.3	Évaluation par simulation numérique de l'homogénéité et de la répétabilité des traitements thermiques.	62
	2.5	Conclusion sur le système de cuisson de laboratoire	67
3		Analyse des composés volatils	68
	3.1	Préparation de l'échantillon	68
	3.1.1	Espace de tête statique	69
	3.1.2	Espace de tête dynamique	75
	3.1.3	Comparaison entre espace de tête statique et dynamique	76
	3.2	Séparation des composés volatils	76
	3.2.1	Injection des composés volatils	76
	3.2.2	Séparation	77
	3.2.3	La chromatographie bidimensionnelle	79
	3.3	Détection des composés volatils et odorants	80
	3.3.1	Détection physique	80
	3.3.2	Détection physiologique	81
	3.4	Protocoles opératoires	85
	3.4.1	SH-SPME et GCxGC- <i>tof</i> MS	85
	3.4.2	GC-MS/O	86
	3.4.3	Identification des composés volatils et odorants	88
4		Outil d'aide à l'analyse des chromatogrammes bidimensionnels	89
	4.1	Objectifs	89
	4.2	Démarche	89
5		Analyse des composés non volatils	90
	5.1	Évaluation de l'indice de peroxyde	90
	5.1.1	Extraction de la matière grasse	90
	5.1.2	Détermination de l'indice de peroxyde de la matière grasse	91
	5.2	Détermination de la teneur en sucres	91
	5.3	Dosage des acides aminés libres	92
	5.4	Dosage de la furosine	92
	5.4.1	Préparation de l'échantillon	92
	5.4.2	Dosage	92
	5.5	Dosage des acides organiques	93
	5.6	Autres mesures	93
	5.6.1	Mesure du pH	93
	5.6.2	Détermination des extraits secs	93
	5.6.3	Mesures de couleur	94
6		Modélisation stœchio-cinétique multi-réponses	95
	6.1	Du schéma réactionnel aux équations différentielles ordinaires	95
	6.2	Outil de résolution numérique	97
	6.3	Paramétrisation	97
	6.3.1	Nombre de paramètres identifiables	97
	6.3.2	Constantes de vitesse	97

6.3.3	Coefficients de quantification apparents	98
6.4	Résolution numérique du système d'équations différentielles ordinaires.	99
6.5	Ajustement numérique des paramètres du modèle et estimation des incertitudes	100
6.5.1	Méthode du maximum de vraisemblance	100
6.5.2	Estimation des incertitudes	101
6.6	Représentativité du modèle stœchio-cinétique et validité de l'estimation des paramètres	102
Conclusion des Matériels et Méthodes		102
III Résultats et Discussions		105
Introduction des résultats et discussions		105
1	Recherche des marqueurs des traitements thermiques	106
1.1	Recherche des marqueurs sur des cuissons réalisées en pilote industriel	107
1.1.1	Démarche expérimentale	107
1.1.2	Résultats obtenus	108
1.1.3	Conclusion de l'étude	111
1.2	Recherche de marqueurs réactionnels sur des cuissons réalisées au laboratoire	113
1.2.1	Démarche expérimentale	113
1.2.2	Évolution de la composition au cours du chauffage	114
1.2.3	Evolution des marqueurs sélectionnés	119
1.3	Recherche des marqueurs odorants	121
1.3.1	Démarche expérimentale	121
1.3.2	Molécules identifiées	122
2	Des marqueurs des traitements thermiques au schéma réactionnel	125
2.1	Marqueurs de la réaction d'oxydation des lipides	126
2.2	Marqueurs de la réaction de Maillard	128
2.2.1	Bilan sur les constituants	128
2.2.2	Écriture d'un schéma réactionnel observable	129
3	Modélisation stœchio-cinétique	132
3.1	Récapitulatif des paramètres	132
3.2	Optimisation à température constante	133
3.3	Détermination de la loi de dépendance à la température	134
3.4	Optimisation à température variable	136
4	Validation et test du modèle stœchio-cinétique	144
Conclusion des Résultats et Discussions		146
Conclusions et Perspectives		149
Bibliographie		153

Annexes	173
Annexe 1 : Composés volatils identifiés dans les fromages fondus fabriqués en pilote industriel	176
Annexe 2 : Composés volatils identifiés dans la matrice fromagère modèle .	181
Annexe 3 : Écriture du schéma réactionnel	185
Annexe 4 : Communications	189

Table des figures

1	Processus de simplification d'un système réactionnel complexe.	2
I.1	Ingrédients autorisés pour la fabrication du fromage fondu.	6
I.2	Réactions se produisant au cours de l'affinage d'un fromage	7
I.3	Catabolisme de la leucine	8
I.4	Effet de l'affinage du Cheddar sur le fromage fondu obtenu	8
I.5	Chélation du calcium par les polyphosphates	12
I.6	Diagramme de fabrication du fromage fondu.	13
I.7	Représentation schématique d'un cutter	14
I.8	Barème thermique en procédé discontinu.	15
I.9	Destruction des micro-organismes du lait.	17
I.10	Barèmes thermiques et force stérilisatrice	17
I.11	Mécanismes de l'oxydation des lipides	19
I.12	Cinétique de l'oxydation des lipides.	22
I.13	Représentation schématique de la réaction de Maillard	24
I.14	Mécanisme de la dégradation de Strecker appliqué à la cystéine	25
I.15	Rôle de l'oxydation au cours de la dégradation de Strecker.	27
I.16	Représentation conceptuelle de la réaction de Maillard	29
I.17	Mutarotation du lactose	32
I.18	Effet du pH sur la cinétique de mutarotation du lactose	32
I.19	Addition nucléophile d'une amine sur une fonction carbonylée.	32
I.20	Influence du pH sur la réactivité de la lysine.	33
I.21	Influence de l'activité de l'eau sur les réactions	33
I.22	Dégradation des sucres au cours de la caramélisation	34
I.23	Dégradation thermique de la thiamine en thiazoles	36
I.24	Système S répondant à une entrée E par une sortie R	37
I.25	Rendements obtenus au cours de la réaction de Maillard	39
II.1	Distribution des globules gras selon le mode de préparation	50
II.2	Microscopie optique des fromages fondus commercial et modèle	51
II.3	Evolution de la surface interfaciale au cours de la cuisson	52
II.4	Profils chromatographiques des matrices fromagères	54

Table des figures

II.5	Système de cuisson de la matrice fromagère en bain d'huile	55
II.6	Contamination de la fraction volatile en bain d'huile	56
II.7	Système de cuisson de la matrice fromagère modèle	57
II.8	Enregistrement des températures d'une cuisson à 150°C	58
II.9	Effet de la distance du montage au jet de vapeur	61
II.10	Calibration du pyromètre infrarouge	62
II.11	Demi-coupe de la cellule de cuisson modélisée	63
II.12	Etude de sensibilité des paramètres du modèle thermique	65
II.13	Évaluation de l'homogénéité du traitement thermique	67
II.14	Représentation schématique d'une fibre SPME	74
II.15	Système de piégeage des composés volatils	75
II.16	Colonnes capillaires et colonnes remplies	77
II.17	Principe de la chromatographie bidimensionnelle	79
II.18	Schéma de principe du couplage GC/Olfactométrie	82
II.19	Schéma de principe du système GC-MS/O multi-voies	84
III.1	Recherche des marqueurs de traitement thermique	106
III.2	Composition des produits pilotes par rapport à l'objectif	108
III.3	Discrimination des produits pilotes selon leur formulation	110
III.4	Discrimination des produits pilotes selon l'étape de fabrication	111
III.5	Barèmes thermiques appliqués à la matrice fromagère modèle	113
III.6	Cinétiques de quatre marqueurs de la réaction de Maillard	117
III.7	Évolution de la fraction volatile au cours des traitements	120
III.8	Somme du signal olfactif par catégories de la matrice crue ou cuite	122
III.9	Aromagrammes de fromages fondus avant et après cuisson	123
III.10	Cinétiques de l'octanal	127
III.11	Schéma réactionnel observable de la réaction de Maillard	130
III.12	Ajustement du 5-méthylfurfural à 135°C	134
III.13	Ajustement des données expérimentales par le modèle stœchio-cinétique multi-réponses ; partie 1	137
III.14	Ajustement des données expérimentales par le modèle stœchio-cinétique multi-réponses ; partie 2	138
III.15	Ajustement des données expérimentales par le modèle stœchio-cinétique multi-réponses ; partie 3	139
III.16	Ajustement des données expérimentales par le modèle stœchio-cinétique multi-réponses ; partie 4	140
III.17	Ajustement des données expérimentales par le modèle stœchio-cinétique multi-réponses ; partie 5	141
III.18	Evolution de la pyrazine au cours des traitements de validation	144

Liste des tableaux

I.1	Protéines du lait de vache	10
I.2	Matière grasse du lait de vache	11
I.3	Contribution des produits de Maillard à la flaveur	26
II.1	Composition de la matrice fromagère modèle	48
II.2	Conditions opératoires de traitement thermique	59
II.3	Propriétés thermo-physiques des différents matériaux	63
II.4	Effet de la température sur le coefficient de partage air-eau	71
II.5	Propriétés des fibres SPME disponibles	74
II.6	Matrice des stoechiométries	95
III.1	Composés volatils identifiés dans la matrice fromagère modèle	115
III.2	Composés « odeurs actifs » identifiés dans le système modèle	124
III.3	Matrice des stoechiométries du schéma réactionnel apparent	131
III.4	Valeurs des constantes de quantification apparentes	133
III.5	Valeurs des constantes de vitesse	133
III.6	Valeurs initiales du facteur pré-exponentiel et de l'énergie d'activation	135
III.7	Valeurs optimisées du facteur pré-exponentiel et de l'énergie d'activation des 14 constantes de vitesse	142
III.8	Réactions élémentaires proposées pour l'élaboration du schéma réactionnel	186
III.9	Matrice des stoechiométries	187

Introduction

Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet ANR-06-PNRA-023 Réactial. L'objectif de ce projet est la prédiction et le contrôle de l'apparition ou de la disparition de marqueurs réactionnels au cours de la transformation et de la conservation des aliments. Il s'agit de mettre au point une démarche raisonnée permettant de limiter la disparition des composés d'impact nutritionnel positif et de limiter la formation des composés néoformés d'impact sanitaire ou organoleptique négatif. Ceci tout en favorisant la formation des composés aux propriétés désirées.

Les différents partenaires de ce projet sont : le laboratoire de Génie Chimique (Toulouse), l'UMR Ingénierie des Agropolymères et Technologies Émergentes (Montpellier), les Moulins Soufflet (Corbeil-Essonnes), le professeur van Boekel (Wageningen), l'UMR Génie Industriel Alimentaire (Massy), l'UMR Science de l'Aliment et de l'Emballage (Massy), l'UME Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale (Avignon), le Centre Technique de la Conservation des Produits Agricoles (Avignon), le Département Recherche Appliquée Groupe des Fromageries Bel (Vendôme) et l'UR Qualité des Produits Animaux (Theix).

Les données expérimentales ont été obtenues dans le cadre de quatre thèses, trois portant sur des produits alimentaires réels : une génoise, une sauce tomate et un fromage fondu. La dernière thèse portant sur la modélisation des couplages entre transferts d'oxygène et réactions d'oxydation dans une gélose modèle. Une approche méthodologique générale de type « génie de la réaction » a été développée et mise en œuvre dans chacun des projets en tenant compte de ses spécificités (Meyer *et al.*, 2009).

Les principaux paramètres à prendre en considération dans le cadre du travail sur la matrice fromagère sont :

- Un produit issu de matières premières d'origine laitière déjà transformées. Cette première transformation peut induire une variabilité importante de la qualité de ces matières premières.
- Un produit à longue durée de conservation au cours de laquelle des modifications physico-chimiques sont susceptibles de se produire en relation avec l'état du produit après sa fabrication.
- Le souhait de limiter l'apparition d'éventuels défauts de saveur au cours de la fabrication et du stockage du fromage fondu.

La méthodologie générale de ce travail est présentée en figure 1.

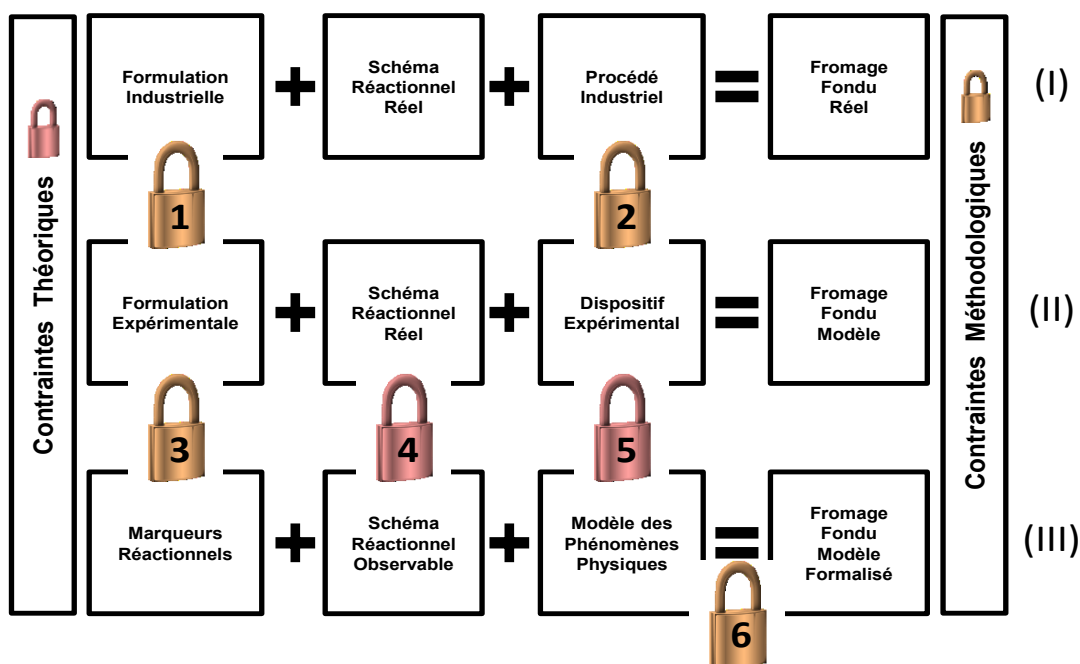


Fig. 1 – Processus de simplification d'un système réactionnel complexe appliqué au fromage fondu, adapté d'après Meyer *et al.* (2009).

Elle met en évidence 6 verrous théoriques et techniques en vue de la réalisation d'un modèle de prédiction de la disparition et de l'apparition des marqueurs réactionnels au cours de l'élaboration du fromage fondu en conditions industrielles.

Dans ce contexte, nos travaux ont porté sur la levée successive de chacun de ces verrous :

- Verrou n°1 : L'élaboration d'une matrice fromagère modèle simplifiée permettant de découpler les opérations unitaires de formulation, de texturation et de traitement thermique.
- Verrou n°2 : Le développement d'un système de cuisson de laboratoire permettant de réaliser de manière reproductible une gamme étendue de traitements thermiques tout en assurant une bonne homogénéité de température au sein

de l'échantillon. Ce système doit, de plus, être compatible avec les contraintes liées à l'analyse des composés volatils.

- Verrou n°3 : L'identification des marqueurs réactionnels et la quantification de ces marqueurs.
- Verrou n°4 : L'écriture d'un schéma réactionnel observable adapté à la matrice fromagère à partir des connaissances issues de la bibliographie et compatible avec les composés pour lesquels nous disposons d'un accès analytique.
- Verrou n°5 : Le développement d'un modèle thermique.
- Verrou n°6 : Le couplage des modèles chimiques et physiques et l'identification des différents paramètres.

Ce mémoire est présenté en trois parties. Il donne alors une lecture horizontale de la démarche mise en œuvre.

La partie bibliographique (I) présente l'état des lieux des connaissances actuelles en ce qui concerne l'élaboration du fromage fondu et les réactions s'y produisant. Elle est aussi l'occasion de faire le point sur l'apport des techniques de modélisation stœchio-cinétique multi-réponses dans le cadre de l'étude des réactions de Maillard et d'oxydation des lipides.

La partie méthodologique (II) présente les différents développements de formulation (verrou n°1), de dispositifs expérimentaux (verrou n°2) et analytiques (verrou n°3) qui ont été développés afin de permettre le travail sur un système modèle de fromage fondu.

La troisième partie (III) est consacrée à l'exposé des résultats et présente en particulier, l'identification des marqueurs réactionnels, l'élaboration d'un schéma réactionnel observable (verrou n°4) et le couplage de ce dernier avec le modèle thermique (verrous n°5 et 6). Enfin, la conclusion présente un bilan général des différents résultats obtenus et des perspectives ouvertes par ce travail de thèse.

Synthèse bibliographique

Introduction de la synthèse bibliographique

Mener à bien un tel projet nécessite le recours à de multiples disciplines telles que la science des aliments, le génie des procédés, la chimie analytique ou bien encore le génie de la réaction. Cette étude bibliographique se propose d'apporter les clés nécessaires à la compréhension des choix effectués dans le cadre de la démarche méthodologique mise en œuvre tout au long de ce travail de thèse. Nous aborderons ainsi les aspects relatifs à l'élaboration du fromage fondu et étudierons ensuite les réactions chimiques se produisant au cours de son élaboration. Enfin, l'apport des techniques de modélisation stœchio-cinétique dans la compréhension des mécanismes réactionnels mis en jeu ainsi que dans leur utilisation comme modèle de prédiction sera présenté.

1 Élaboration du fromage fondu

1.1 Composition du fromage fondu

La figure I.1 représente l'ensemble des ingrédients et additifs autorisés pour la fabrication du fromage fondu. Parmi eux, un certain nombre sont optionnels et ont pour rôle d'apporter une texture ou un arôme particulier au produit. Six ingrédients (trait plein) sont absolument essentiels. Il s'agit d'une base fromagère, de poudres de lait, d'une matière grasse d'origine laitière, de chlorure de sodium, d'eau et d'agents

émulsifiants (Caric, 2000; Commission du Codex Alimentarius, 1995). Nous nous proposons de présenter ici les différents ingrédients essentiels à la fabrication du fromage fondu.

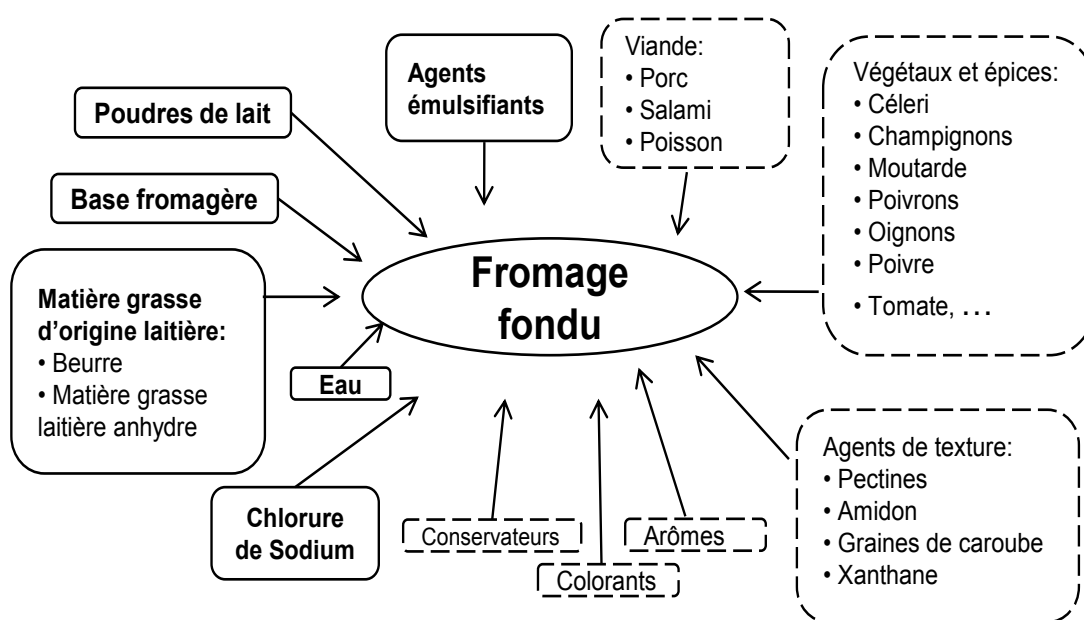


Fig. I.1 – Ingrédients autorisés pour la fabrication du fromage fondu d'après Caric (2000) et la Commission du Codex Alimentarius (1995).

(— : ingrédients de base ; - - - : ingrédients optionnels).

1.1.1 La base fromagère

Dans le cas du fromage fondu, la base fromagère est de plus en plus souvent réalisée spécifiquement pour être fondue. Il peut s'agir de Cheddar, Gouda, Emmental, Mozzarella ou de tout autre fromage utilisé seul ou en mélange. Pour les fromages frais fondus, la base fromagère utilisée est généralement un caillé fraîchement préparé. Les critères pris en compte pour la sélection de la base fromagère destinée à être fondue sont les suivants :

- la contribution à la flaveur du fromage fondu
- la contribution à la texture du fromage fondu
- les considérations nutritionnelles
- les considérations économiques et de marché

Le degré d'affinage de la base fromagère est l'un des paramètres particulièrement important. Il conditionne à la fois le profil aromatique, la teneur en certains sucres

et la texture du fromage fondu obtenu.

1.1.1.1 Contribution de la base fromagère à la composition aromatique du fromage fondu Les réactions microbiologiques se produisant au cours de l'affinage de la base fromagère sont à l'origine d'un certain nombre de composés volatils aux propriétés aromatisantes intéressantes pour le fromage fondu obtenu. La figure I.2 présente les origines biochimiques majeures de ces composés volatils. Il s'agit du catabolisme du lactose, de celui des lipides et de celui des protéines (McSweeney, 2004; Marilley et Casey, 2004).

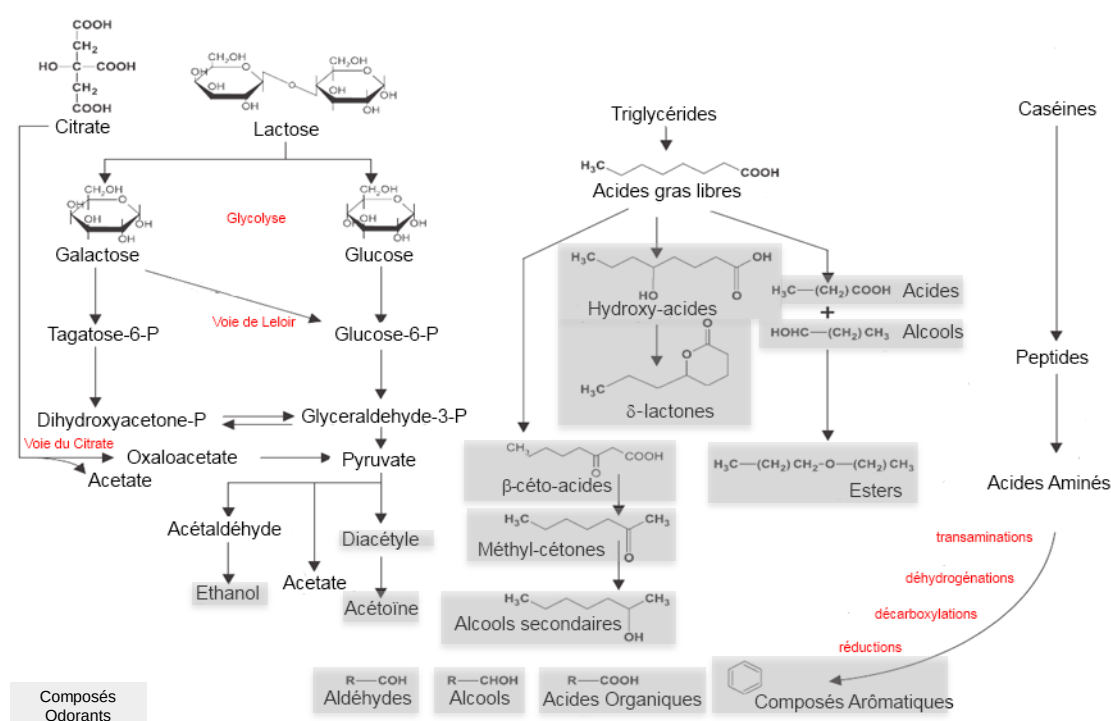


Fig. I.2 – Réactions microbiologiques se produisant au cours de l'affinage de la base fromagère d'après Marilley et Casey (2004).

Certains composés volatils peuvent également être obtenus par la réaction de Maillard comme, par exemple, la 2,3-butanedione, le 2-méthylpropanal et plus généralement les aldéhydes de Strecker, la 2,5-diméthylpyrazine et la tetraméthylpyrazine. D'autres composés peuvent également être obtenus par des réactions de dégradation thermique des lipides comme l'acide butanoïque ou les cétones méthylées. La figure I.3 présente le catabolisme de l'acide aminé leucine conduisant à la formation du 3-méthylbutanal. Il est également obtenu au cours de la dégradation de Strecker lorsque la leucine intervient dans la réaction.

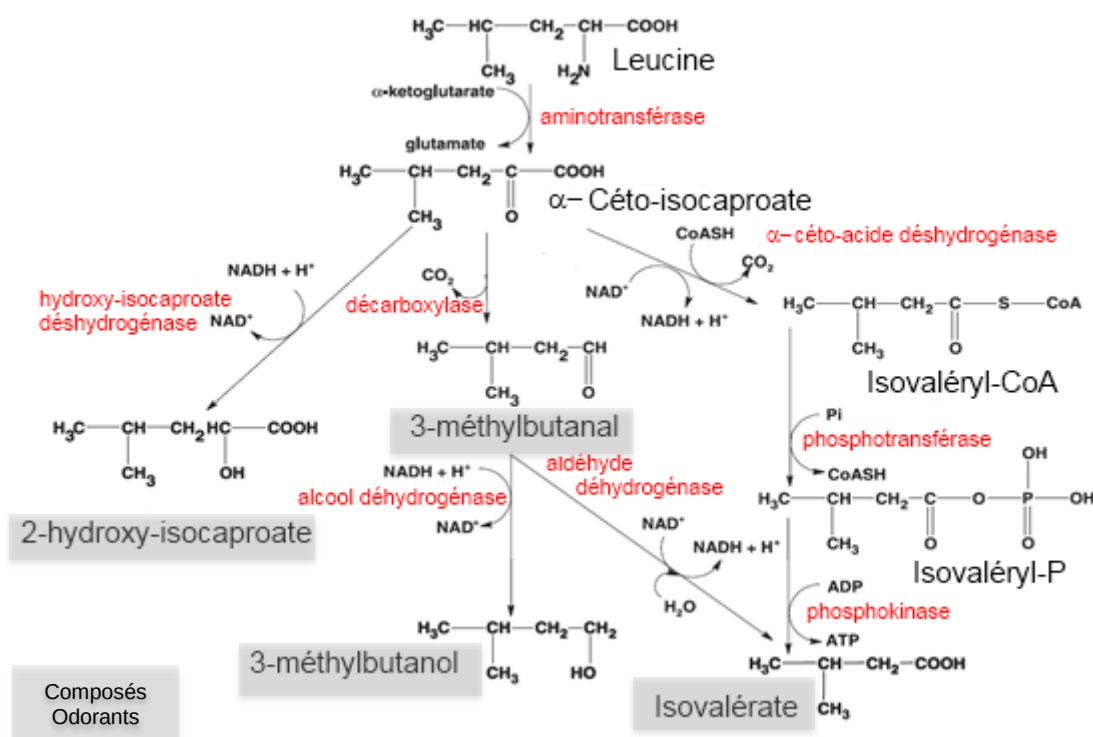


Fig. I.3 – Catabolisme de la leucine d'après Marilley et Casey (2004).

1.1.1.2 Contribution de la base fromagère à la texture du fromage fondu

La figure I.4 représente les photographies prises en microscopie confocale de 3 fromages fondus produits dans les mêmes conditions de fabrication à partir de fromage de Cheddar affiné pendant 7 (A), 28 (B) et 168 (C) jours respectivement.

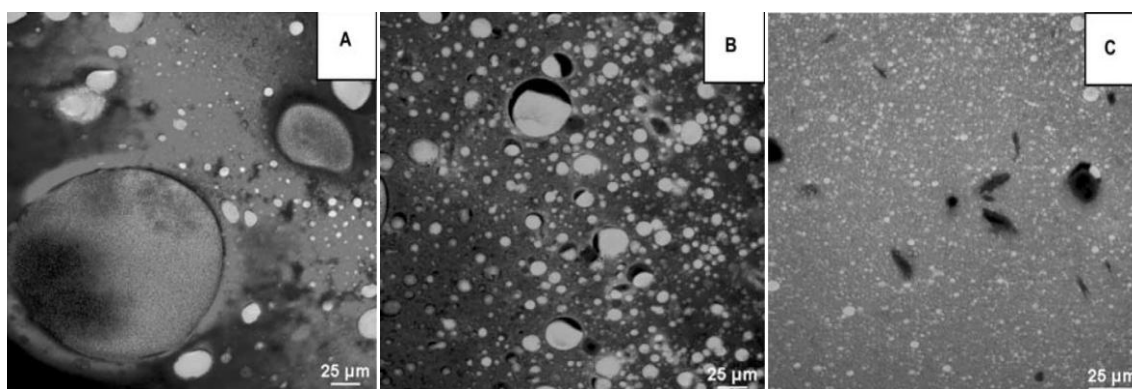


Fig. I.4 – Effet d'une durée d'affinage du Cheddar de 7 (A), 28 (B) et 168 (C) jours sur la microstructure du fromage fondu obtenu. Observations réalisées en microscopie confocale par Brickley *et al.* (2007).

Il est observé une réduction du diamètre moyen des globules gras de 120 μm pour le fromage fondu issu du Cheddar affiné 7 jours à 2 μm environ pour celui issu du Cheddar affiné 168 jours. L'affinage de la base fromagère se traduit par

une augmentation des petits peptides et des acides aminés libres. Ces derniers ont tendance à mieux stabiliser l'interface lipidique que les protéines (Brickley *et al.*, 2007).

1.1.1.3 Influence de la base fromagère sur la réaction de Maillard Bley *et al.* (1985a,b) mesurent l'intensité du brunissement non enzymatique par l'indice de couleur (ΔE) résultant de la différence de couleur entre des échantillons de fromages fondus issus de fabrications à partir de fromages de Cheddar, dont les conditions de fabrication et d'affinage sont différentes, et un échantillon de référence selon la formule I.1.

$$\Delta E = \frac{1}{2} \cdot (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2) \quad (\text{I.1})$$

Où ΔL est la différence de couleur entre le produit et la référence selon la luminance L (blanc à noir), Δa selon l'axe a (rouge à vert) et Δb selon l'axe b (jaune à bleu).

Les barèmes thermiques appliqués au cours de la fabrication du fromage fondu correspondent à ceux des systèmes discontinus : 80°C pendant quelques minutes. Cette étude permet de mettre en relation plusieurs facteurs tels que la durée d'affinage de la base fromagère, la teneur en lactose, la teneur en galactose, le ratio entre la teneur en sel et l'humidité relative et la vitesse de refroidissement du fromage fondu avec l'intensité du brunissement non enzymatique observée. Cette expérience démontre que le galactose provoque un brunissement plus important que le glucose et beaucoup plus important que le lactose. Il est montré qu'un temps de refroidissement écourté permet de limiter le phénomène de brunissement non enzymatique. L'effet de l'affinage de la base fromagère se traduit par un brunissement bien plus faible si les *starters* utilisés pour l'affinage du Cheddar sont capables de dégrader le galactose. Cet exemple met en évidence la possibilité de limiter la réaction de Maillard se produisant au cours de la fabrication du fromage fondu par la maîtrise du procédé de fabrication du fromage fondu et de celui des ingrédients entrant dans sa composition.

1.1.2 Les poudres de lait

Le tableau I.1 présente la composition en acides aminés des principales protéines du lait de vache. Les procédés technologiques utilisés permettent l'obtention de toute une gamme de poudres issues du lait à la composition et aux propriétés fonctionnelles très différentes. Une bonne description des procédés technologiques permettant l'obtention de ces différentes poudres de lait peut être trouvée dans le *Dairy Processing Handbook* (Bylund, 1995). Étant donné les différences de composition en acides aminés observées entre les caséines et les protéines sériques (β -lactoglobuline

Tab. I.1 — Composition en acides aminés des principales protéines du lait de vache. * représente les acides aminés essentiels pour l’homme adapté d’après Fox et McSweeney (1998) et Farrell *et al.* (2004).

acide aminé [nb de résidus]	caséine- α_{S1}	caséine- α_{S2}	caséine- κ	caséine- β	caséine- γ_1	caséine- γ_2	caséine- γ_3	β -lacto- globuline	α -lactal- bumine
aspartate	7	4	4	4	4	2	2	11	9
asparagine	8	14	7	5	3	1	1	5	12
thréonine *	5	15	14	9	8	4	4	8	7
sérine	8	6	12	11	10	7	7	7	7
sérine-phosphate	8	11	1	5	1	0	0	0	0
glutamate	24	25	12	18	11	4	4	16	8
glutamine	15	15	14	21	21	11	11	9	5
proline	17	10	20	35	34	21	21	8	2
glycine	9	2	2	5	4	2	2	3	6
alanine	9	8	15	5	5	2	2	14	3
cystéine	0	2	2	0	0	0	0	5	8
valine *	11	14	11	19	17	10	10	10	6
méthionine *	5	4	2	6	6	4	4	4	1
isoleucine *	11	11	13	10	7	3	3	10	8
leucine *	17	13	8	22	19	14	14	22	13
tyrosine	10	12	9	4	4	3	3	4	4
phénylalanine *	8	6	4	9	9	5	5	4	4
tryptophane *	2	2	1	1	1	1	1	2	4
lysine *	14	24	9	11	10	4	3	15	12
hystidine	5	3	3	5	5	4	3	2	3
arginine	6	6	5	4	2	2	2	3	1
nb de résidus	199	207	169	209	181	104	102	162	123
masse molaire	23612	25228	19005	23980	20520	11822	11557	18362	14174
teneur [$g \cdot L^{-1}$]	12 -15	3 - 4	2 - 4	9 - 11	traces	traces	traces	2 - 4	0,6 - 0,7

et α -lactalbumine), une sélection judicieuse du mélange des poudres de lait utilisées peut permettre de moduler le ratio entre les différents acides aminés.

Outre cet aspect, le traitement subi par les différentes protéines est particulièrement important. Généralement, l’obtention des poudres issues du lactosérum nécessite des traitements mécaniques et thermiques conséquents qui conduisent à une dénaturation de la structure des protéines sériques. Les groupements aminés latéraux issus de l’asparagine, de la glutamine, de la lysine et de l’arginine seront donc plus facilement accessibles et plus réactifs vis à vis de la réaction de Maillard. Si l’on souhaite minimiser cette réaction, il conviendra alors de sélectionner des poudres dites « low heat » ou même « extra low heat ». C’est à dire dont le procédé d’obtention permet de minimiser l’intensité du traitement thermique subi, soit un barème de traitement thermique équivalent à un traitement inférieur à 70°C pendant 15 secondes (Bylund, 1995). Sithole *et al.* (2005) étudient le brunissement non enzymatique se produisant au cours du stockage de poudres de lactosérum issues

de trois producteurs. Les vitesses de brunissement non enzymatique très différentes selon les producteurs montrent l'importance du procédé ayant permis l'obtention de ces poudres.

Les résultats obtenus par analyse sensorielle suggèrent que la durée de vie de ces poudres est davantage limitée par la dégradation de leurs propriétés fonctionnelles que par la flaveur et l'odeur qui ne sont pas significativement modifiées au cours des 19 mois de stockage à température ambiante (Thomas *et al.*, 2004).

1.1.3 La matière grasse laitière

1.1.3.1 La matière grasse du lait de vache Le tableau I.2 présente la composition du lait de vache en matière grasse.

Tab. I.2 – Principaux constituants de la matière grasse du lait de vache en pourcentage de la matière grasse totale selon la saisonnalité d'après Jensen (2002).

lipide	nom	été	hiver
	phospholipides	0,2	1
	cholestérol	0,2	0,4
C4 :0	acide butanoïque	2,8	3,1
C6 :0	acide caproïque	2,2	2,3
C12 :0	acide laurique	9,9	12,2
C14 :0	acide myristique	9,9	12,2
C14 :1	acide myristoléique	2,1	2,6
C16 :0	acide palmitique	3,1	3,3
C18 :0	acide stéarique	11,3	8
C18 :1	acide oléique	28,8	21,9
C18 :2	acide linoléique	1,4	1,2
C18 :3	acide linolénique	2,2	1,6

Les acides gras sont estérifiés en triglycérides, pour 97% d'entre eux, en diglycérides et en monoglycérides. La teneur en acides gras libres dans le lait est inférieure à 0,5%. Seuls les acides gras insaturés sont sensibles à l'oxydation. Les acides linoléiques et linoléniques sont les plus sensibles en raison de leur degré d'insaturation élevé (Jensen, 2002). Les phospholipides contiennent également des acides gras polyinsaturés. De plus, en raison de leurs bonnes propriétés émulsifiantes, ils se retrouvent à l'interface de l'émulsion, en position favorable à l'oxydation.

1.1.3.2 La matière grasse laitière utilisée pour la production de fromage fondu La matière grasse laitière utilisée peut être du beurre ou de la matière grasse laitière anhydre. La matière grasse laitière anhydre est obtenue par fusion puis centrifugation du beurre et conduit à un produit contenant plus de 99% de matière grasse.

Le beurre compte à ce jour plus de 230 composés volatils identifiés. Cependant, seul un petit nombre d'entre eux sont considérés comme des molécules odorantes clés pour la flaveur du beurre. Il s'agit essentiellement de la 2,3-butanedione à l'odeur de beurre caractéristique, de l'acide butanoïque à l'odeur de rance et de la δ -décàlactone à l'odeur de pêche (Mallia *et al.*, 2008).

1.1.4 Les agents émulsifiants

Les agents émulsifiants ont un rôle technologique majeur pour la fabrication du fromage fondu. Ils sont généralement composés d'un mélange de citrates, orthophosphates, pyrophosphates et polyphosphates (Caric, 2000). Leur rôle est de compléter les capacités émulsifiantes des protéines et fonctionne schématiquement de la manière suivante :

- séquestration du calcium lié aux caséines
- amélioration de la solubilité et de la dispersion des protéines
- régulation du pH du milieu
- amélioration de l'hydratation des caséines

Certains de ces constituants, en particulier les polyphosphates, ont de plus l'avantage de posséder des propriétés bactériostatiques. La figure I.5 schématise le principe de fonctionnement de ces agents émulsifiants.

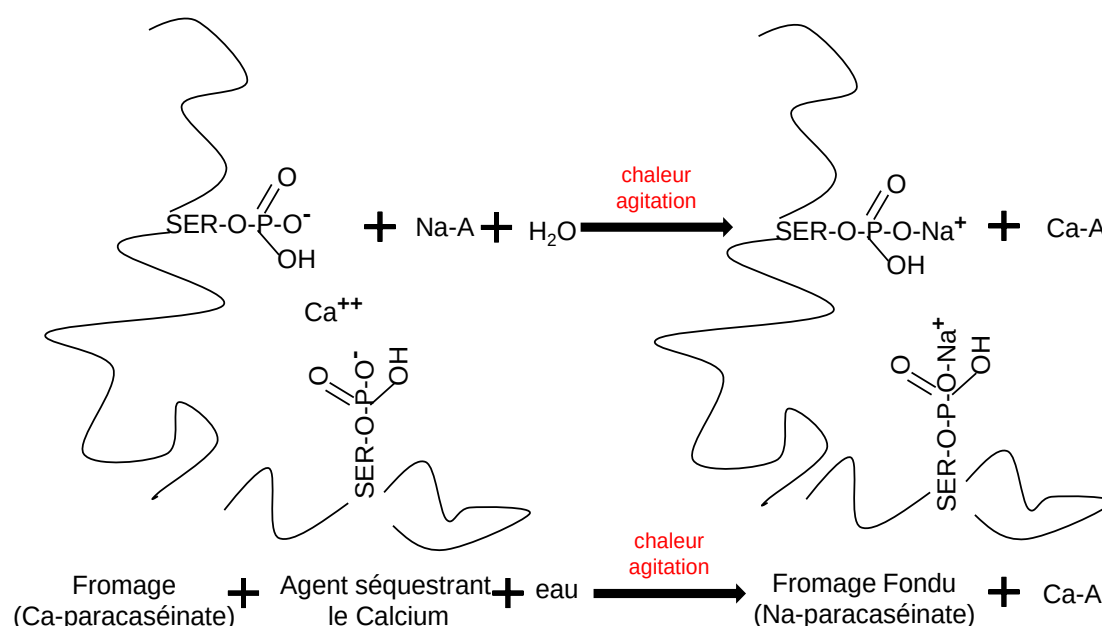


Fig. I.5 – Chélation du calcium par les polyphosphates au cours de la fabrication du fromage fondu d'après Caric (2000).

Le calcium contenu dans le complexe calcium-paracaséinate est ôté grâce aux propriétés d'échange d'ions des phosphates. Ceci a pour effet d'augmenter la solubilité des caséines dans l'eau et par conséquent, leurs propriétés émulsifiantes. Lorsque des températures plus élevées sont atteintes, des liaisons entre les peptides sont brisées et les anions des agents émulsifiants peuvent venir se lier aux protéines. Ceci a pour effet de les rendre plus hydrophiles. Les protéines fixent alors plus de molécules d'eau, ce qui se traduit par une augmentation de la viscosité du mélange. Il s'agit du phénomène de crémage (Panouille *et al.*, 2005).

1.2 Procédés de fabrication du fromage fondu

La fabrication du fromage fondu comporte de nombreuses opérations unitaires. Celles-ci sont représentées en figure I.6.

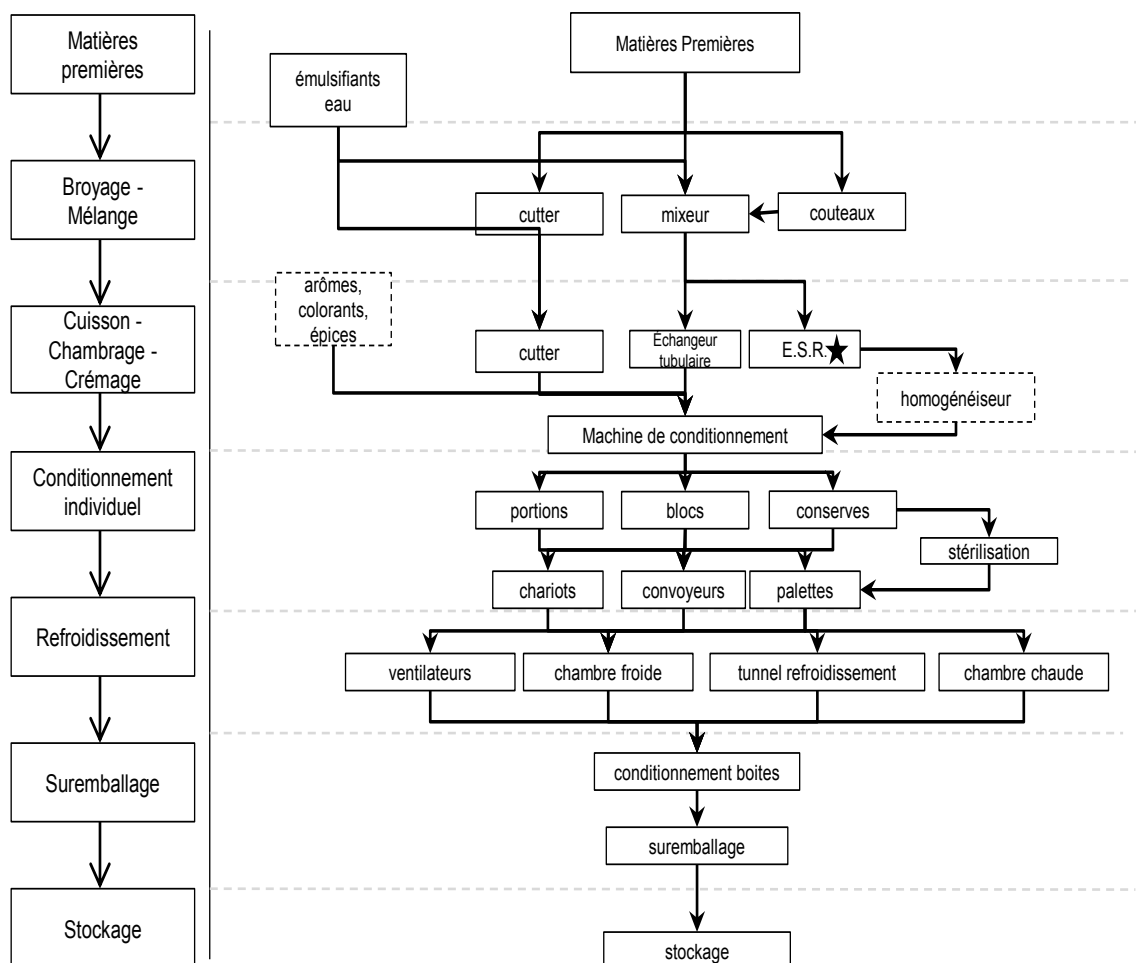


Fig. I.6 – Diagramme de fabrication du fromage fondu adapté d'après Caric (2000)

★ : échangeur à surface raclée.

L'ensemble de ces étapes peut être réduit à 5 opérations unitaires essentielles :

- le mélange des matières premières
- la cuisson et le chambrage (assurant la force stérilisatrice nécessaire à la bonne conservation microbiologique du produit)
- le crémage (permettant l'obtention de la texture souhaitée)
- le refroidissement
- les étapes de conditionnement

Les opérations thermiques sont particulièrement importantes pour les caractéristiques du produit obtenu. En effet, c'est au cours de ces étapes qu'interviennent des modifications physico-chimiques majeures vis à vis des réactions d'oxydation et de brunissement non enzymatique. Elles sont réalisées dans le cadre de procédés discontinus ou continus que nous allons présenter ci-dessous.

1.2.1 Procédé de fabrication discontinu

Le procédé de fabrication discontinu fait généralement appel à un appareil de type cutter. Un tel système est représenté schématiquement sur la figure I.7.

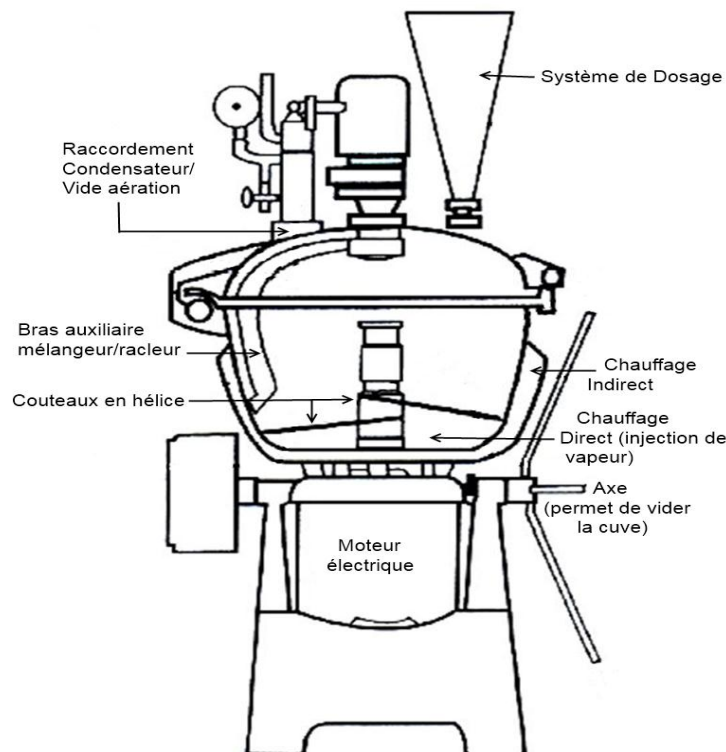


Fig. I.7 – Représentation schématique d'un cutter.

Un des premiers brevets pour un tel appareil est déposé aux États-Unis par Kraft (1916). Il s'agit d'une grande cuve de volume variable, fermée de manière étanche par un couvercle et équipée d'un système de couteaux permettant le broyage et le

mélange des différentes matières premières. Ce type de système permet d'assurer l'ensemble des opérations unitaires dans le même appareil. Il permet de porter, par injection de vapeur, le mélange des matières premières à 80°C pendant 15 minutes tout en le maintenant sous une agitation constante. Les améliorations apportées aux cutters actuels (injection de vapeur directe ou indirecte, vide partiel, ...) permettent d'atteindre rapidement des températures supérieures de l'ordre de 120 à 130°C.

La figure I.8 représente un barème thermique type utilisé pour la fabrication de fromage fondu.

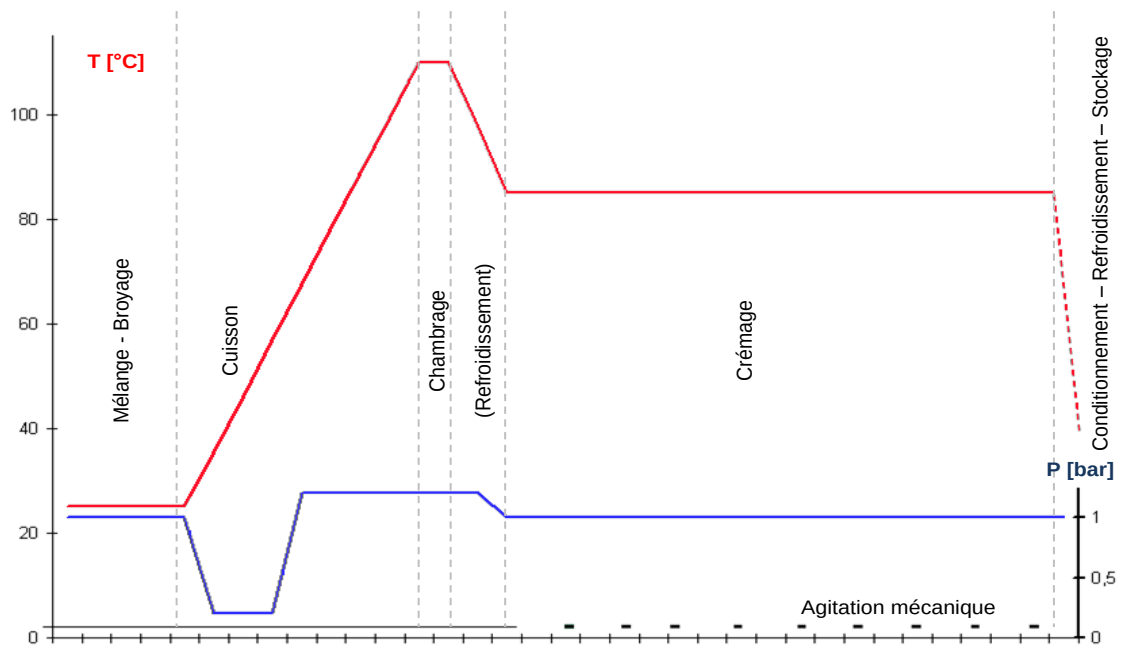


Fig. I.8 – Barème thermique classiquement utilisé en procédé de fabrication discontinu adapté d'après Caric (2000).

Les ingrédients sont d'abord broyés et mélangés. Ceci assure un contact proche entre les agents émulsifiants et les caséines. Le traitement thermique est appliqué sous un vide partiel par injection directe ou indirecte de vapeur. Le produit est maintenu en permanence sous agitation au cours de toute l'étape de cuisson. Il atteint au bout de 4 minutes environ une température comprise entre 90 et 130°C pour une période de 30 secondes à 15 minutes selon le type de fromage fondu désiré. Les traitements aux températures plus élevées (120°C pendant 1 minute par exemple) permettent d'assurer la force stérilisatrice nécessaire à la destruction des micro-organismes et des spores. Les barèmes exacts à appliquer peuvent être calculés à l'aide des paramètres de Bigelow ou de Weibull, une fois la nature et la quantité des micro-organismes présents déterminées (van Boekel, 2002; Vanasselt et Zwietering, 2006). Par exemple, les spores de *Bacillus cereus* peuvent parfois être présentes naturellement dans la

base fromagère initiale (Caric, 2000). La durée de ces traitements à température élevée doit rester aussi courte que possible afin de ne pas générer de défauts sensoriels liés à la réaction de Maillard se produisant à ces conditions de températures et de pH (cf partie 2.2.7 page 30). Dans ce cas cependant, le produit n'a pas atteint la texture désirée à l'issue de l'étape de cuisson. Une seconde étape de traitement thermique modéré à des températures allant de 80 à 90°C pendant 5 à 30 minutes environ est alors réalisée sous agitation partielle. Au cours de cette étape, l'action conjuguée des sels de fonte séquestrant le calcium et de la température va permettre l'obtention de la texture souhaitée grâce au phénomène de crémage présenté page 12. Le produit est alors prêt pour être conditionné sous différents formats et refroidi.

1.2.2 Procédé de fabrication continu

L'ensemble des opérations unitaires présentées précédemment dans le cadre du procédé de fabrication discontinu est repris et adapté à la production industrielle. Un certain nombre de brevets ont été déposés de manière à garantir chaque étape de la production industrielle, par exemple celui déposé par Eyles *et al.* (1996).

Les principes généraux demeurent très proches de ceux de la production discontinue. Les matières premières sont d'abord préparées et fondues. Des cuves de stockage intermédiaires peuvent s'avérer nécessaires de manière à garantir la continuité de la production. Ces cuves doivent être maintenues à une température supérieure à 80°C afin d'éviter toute reprise en gel du fromage fondu. Le temps de séjour dans ces cuves est variable mais peut aller jusqu'à une à deux heures. Le traitement thermique est effectué, dans le procédé présenté par Eyles *et al.*, à ultra haute température (UHT) par injection directe de vapeur et refroidissement flash. Dans ce cas, la proportion de vapeur d'eau incorporée à la matrice fromagère est libérée au cours du refroidissement. Le produit est ensuite soumis à une force de cisaillement permettant d'ajuster sa viscosité (Eyles *et al.*, 1996). Il est enfin conditionné en portions individuelles (Weber, 2000; Weber et Didiot, 2009) et sur-conditionné en boîtes. Selon les cas, il pourra être refroidi rapidement au stade de la portion en passant sous un tunnel de refroidissement ou sera refroidi plus lentement en chambre froide.

La figure I.9 présente l'effet du temps et de la température sur les cinétiques de destruction des micro-organismes et les changements physico-chimiques du lait. Il s'agit d'assurer une force stérilisatrice suffisante pour garantir la sécurité microbiologique du produit tout en minimisant les modifications physico-chimiques néfastes pour les propriétés sensorielles et nutritionnelles du produit. Dans ce cas, le domaine des traitements UHT s'avère être le plus performant des procédés thermiques comparés ici.

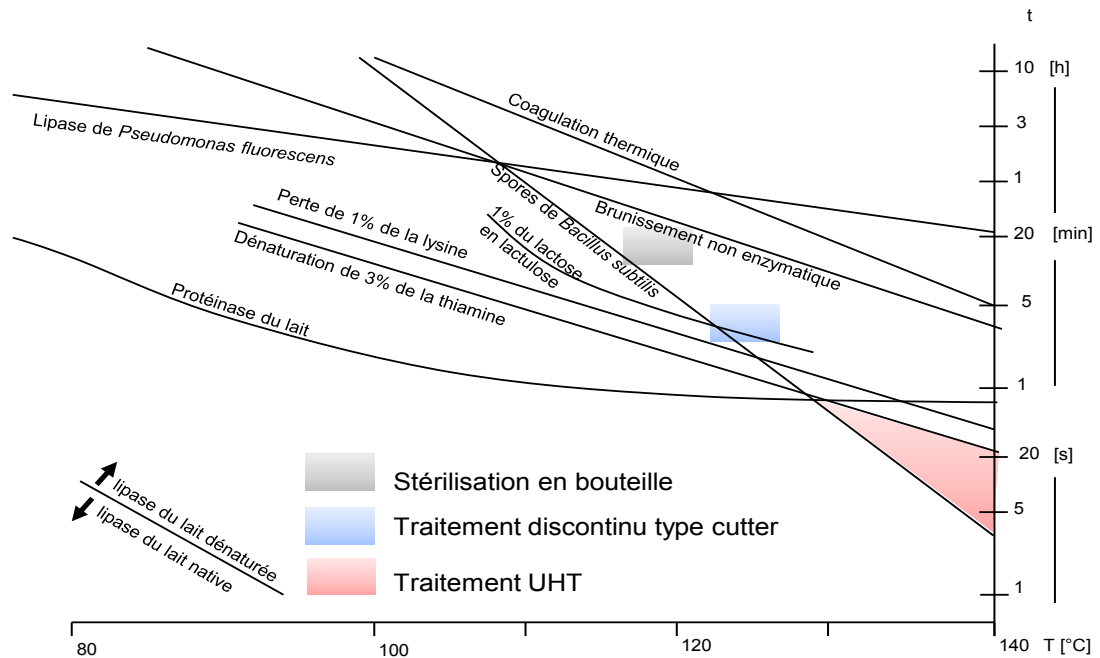


Fig. I.9 – Destruction des micro-organismes du lait et changements induits par la température adapté d'après Bylund (1995) et Fox et McSweeney (1998).

Les performances thermiques obtenues pour 3 procédés de stérilisation du lait sont comparées sur la figure I.10. Le traitement par injection directe de vapeur permet d'assurer le temps de séjour à haute température le plus court par rapport à celui des autres techniques de stérilisation.

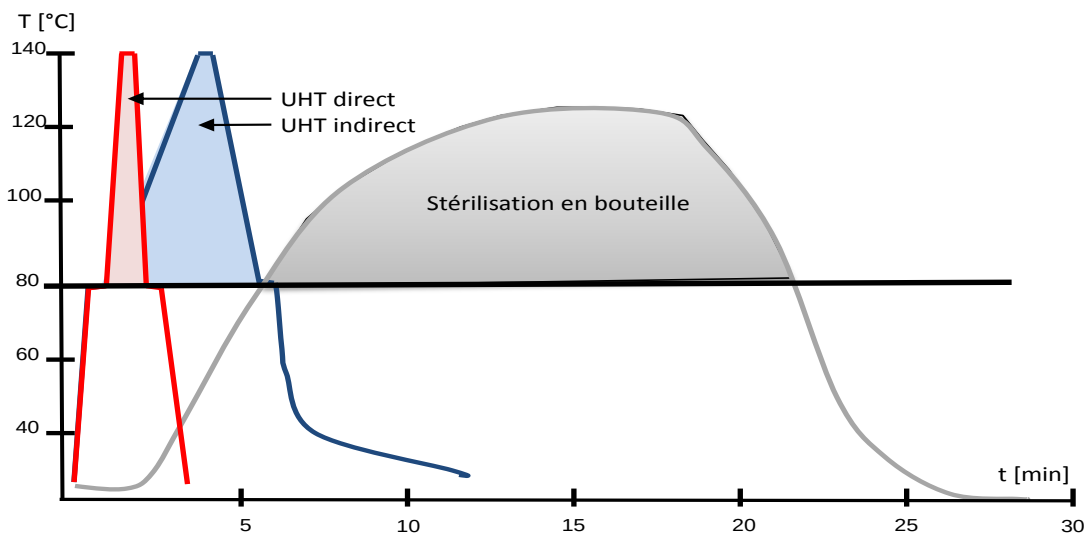


Fig. I.10 – Barèmes thermiques typiques en injection de vapeur directe, indirecte et en stérilisation en bouteille de lait utilisés pour obtenir la même force stérilisatrice (F), $F=40$, adapté d'après Bylund (1995) et Richardson (2001).

1.2.3 Stockage des fromages fondus

Le stockage s'effectue en conditions réfrigérées, pour les pays dits « matures » (Europe, Amérique du Nord, Japon), ou non réfrigérées dans le cas des pays « émergents ». Globalement les mêmes réactions chimiques, c'est à dire d'oxydation des lipides et de Maillard, se produisent à des vitesses de réaction plus faibles qu'au cours de la fabrication. Elles sont associées à un certain nombre de réactions physico-chimiques (Schär et Bosset, 2002). N'ayant pas abordé la problématique du stockage au cours de ce travail de thèse, nous ne détaillerons pas ces réactions.

2 Réactions se produisant au cours de la cuisson

Le fromage fondu subit au cours des étapes de fabrication et de stockage un certain nombre de modifications d'origine chimique, biochimique ou physico-chimique. Schär et Bosset (2002), proposent huit catégories d'altérations physico-chimiques pouvant se produire au cours de la fabrication et du stockage du fromage fondu. Il s'agit :

- des réactions induites par la lumière
- des réactions du brunissement non enzymatique
- des interactions avec l'emballage
- de l'hydrolyse des polyphosphates pendant le stockage
- des modifications de l'équilibre ionique
- de la formation de cristaux
- de la perte d'eau, conduisant à une variation de l'activité de l'eau
- des réactions induites par des enzymes thermo-résistantes

Certaines de ces réactions conduisent essentiellement à des modifications de la texture du fromage fondu au cours de son stockage alors que d'autres ont une influence significative sur l'évolution de la flaveur au cours de la fabrication et du stockage. D'un point de vue strictement réactionnel, elles correspondent à la dégradation des lipides, à la réaction de Maillard et à la réaction de caramélisation. La perte de vapeur d'eau en plus des modifications de texture peut également influencer les cinétiques réactionnelles. Dans le cas de fabrications du fromage fondu bien maîtrisées et permettant l'obtention de portions microbiologiquement stables, les réactions d'origine microbiologiques pouvant conduire à une altération de la composition aromatique du produit au cours de son cycle de vie ne se produisent pas. Nous ne les détaillerons donc pas.

2.1 Voies de dégradation des lipides

2.1.1 La voie hydrolytique

La voie hydrolytique correspond à l'hydrolyse des triglycérides en acides gras libres. La réaction est favorisée en milieu acide ou basique, par la chaleur et l'humidité. Elle peut être induite par le procédé de fabrication, par une agitation vigoureuse, par un chauffage ou un refroidissement brutal ainsi que par les procédés d'homogénéisation qui peuvent être responsables de détériorations de la membrane des globules gras. Le passage des acides gras de la forme triglycéride à la forme libre induit une augmentation de leur sensibilité à l'oxydation.

2.1.2 La voie oxydative

L'oxydation de la matière grasse comporte trois grandes étapes :

- l'initiation
- la propagation
- la terminaison

La figure I.11 synthétise l'ensemble des mécanismes réactionnels conduisant à l'oxydation des lipides.

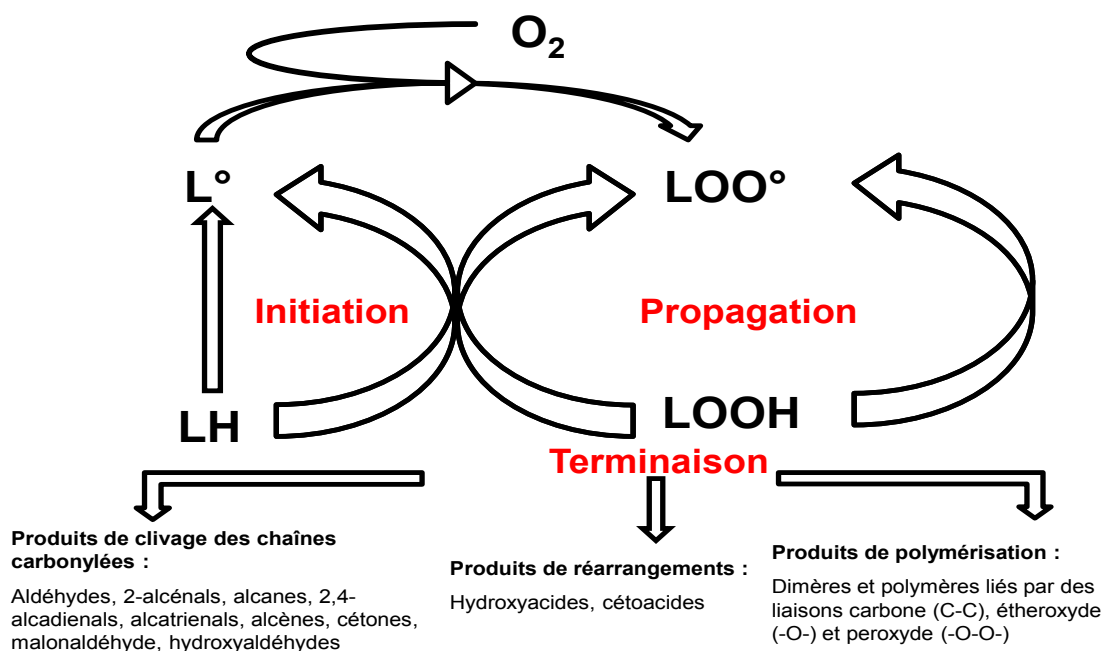


Fig. I.11 – Mécanismes de l'oxydation des lipides adapté d'après Eskin et Przybylski (2001).
LH : lipide insaturé, *L°* : radical lipidique, *LOO°* : radical peroxyde, *LOOH* : hydroperoxyde.

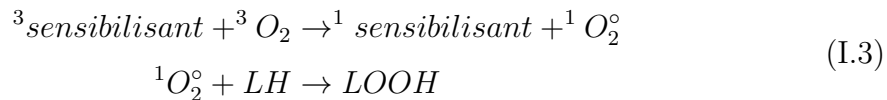
2.1.2.1 L'initiation Elle se produit selon trois voies et résulte de la formation de radicaux libres induits par :

- une auto-oxydation
- une oxydation induite par la lumière
- une oxydation enzymatique

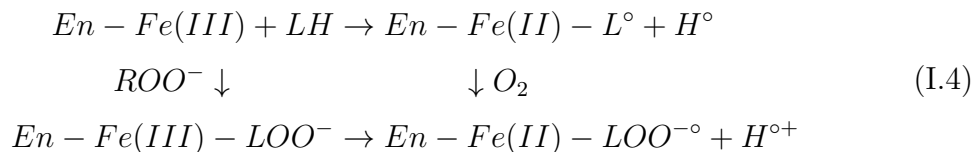
Au cours de l'auto-oxydation, les lipides insaturés LH perdent un hydrogène pour former un radical lipidique L° en présence d'un initiateur In (réaction I.2). Cette réaction est d'autant plus fréquente que le nombre d'insaturations est élevé.



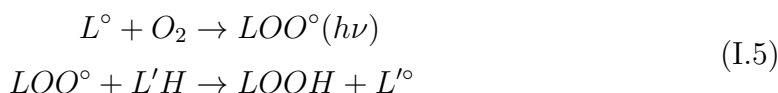
L'oxydation induite par la lumière implique la formation d'hydroperoxydes dans une réaction directe avec un singleton d'oxygène 1O_2 sans formation de radicaux lipidiques (réaction I.3). 1O_2 se forme par exemple par la réaction du dioxygène de l'air sur un sensibilisant comme la riboflavine (vitamine B2) ou la chlorophylle (Mortensen *et al.*, 2004). Dans le lait, la riboflavine est présente à des teneurs de 1 à 3 mg par litre (Causeret et Cirot, 1959). La lumière et en particulier les rayons ultraviolets peuvent être impliqués dans l'étape d'initiation par activation de la riboflavine. Un radical superoxyde $^1O_2^\circ$ est alors formé. Ce radical est 1450 fois plus réactif que 3O_2 . Il va réagir avec un lipide insaturé pour former des hydroperoxydes. Les hydroperoxydes produits par cette voie forment des composés cycliques plus facilement que ceux induits par la voie d'auto-oxydation.



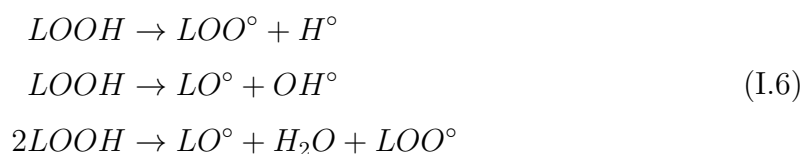
L'oxydation enzymatique est très importante dans le cas des arômes de fromages affinés. Les enzymes oxydatives agissent le plus fréquemment sur les acides gras insaturés libres. Elles catalysent la formation d'hydroperoxydes intermédiaires similaires à ceux formés par la voie non enzymatique. Cependant, les isomères produits sont régio- et stéréospécifiques. Le fer est un des éléments constitutifs des lipoxygénases. Il joue un rôle de catalyseur majeur dans le mécanisme de formation de l'hydroperoxyde (réaction I.4). Il peut éventuellement être apporté à l'aliment par le matériel utilisé lors de la fabrication ou du stockage.



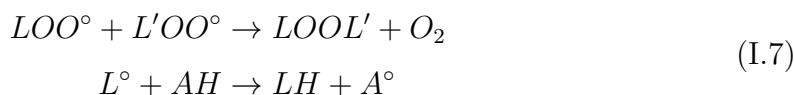
2.1.2.2 La propagation La propagation se déroule en deux étapes correspondant à la formation d'un hydroperoxyde (réaction I.5) et sa dégradation en radicaux libres (réaction I.6). Le radical lipidique L° réagit avec le dioxygène pour former un radical libre peroxyde LOO° . Cette réaction est favorisée en présence de lumière ($h\nu$). Le radical libre peroxyde réagit avec un autre lipide insaturé $L'H$ pour former un hydroperoxyde $LOOH$ et un nouveau radical lipidique L'° qui va à son tour poursuivre la propagation.



Cet hydroperoxyde instable $LOOH$ va ensuite se dégrader en de nouveaux radicaux libres.



2.1.2.3 La terminaison Les radicaux libres peroxydes réagissent entre eux pour former des produits non radicalaires (réaction I.7). Cette réaction de terminaison est favorisée dans un environnement où la pression partielle en oxygène est faible. La réaction de terminaison peut également avoir lieu par l'action d'antioxydants AH capables de générer des radicaux libres stabilisés par résonance et qui ne participeront pas à la réaction.



2.1.2.4 Produits secondaires issus de l'oxydation Les hydroperoxydes formés au cours de la réaction d'oxydation des lipides ne présentent ni odeur ni flaveur. En revanche, les composés issus de leur dégradation, présentés en figure I.11, comme les aldéhydes aliphatiques sont responsables des flaveurs issues de l'oxydation. Un grand nombre de composés volatils différents est obtenu tels que des cétones, des cétones méthylées, des aldéhydes aliphatiques, des alcools, des composés furaniques, des lactones,... Le pentanal et l'hexanal sont deux des produits majoritairement formés. Cependant, il s'agit de composés génériques et dont l'origine n'est pas spécifique du substrat. La figure I.12 représente schématiquement les cinétiques de dégradation des acides gras et d'apparition des composés issus de l'oxydation des lipides.

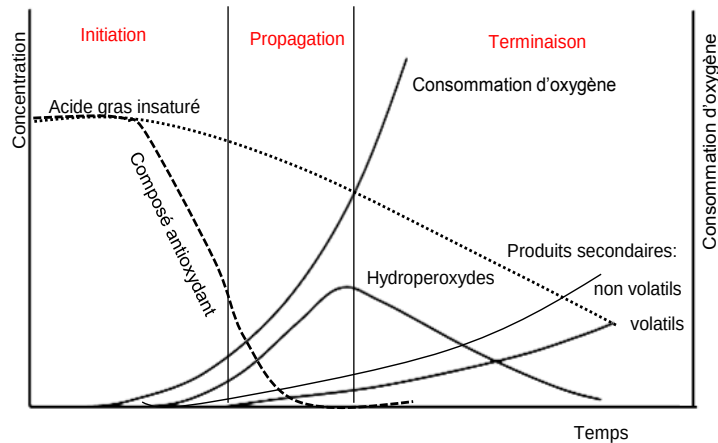


Fig. I.12 – Représentation schématique de la cinétique d'oxydation des lipides adapté d'après Labuza et Dugan (1971) et Kamal-Eldin *et al.* (2003).

2.1.3 Facteurs affectant la réaction de l'oxydation des lipides

Un grand nombre de facteurs peut influencer l'oxydation des lipides. Parmi eux, citons :

- la teneur en acides gras libres : ils sont plus facilement accessibles que s'ils sont estérifiés par le glycérol.
- la nature des acides gras : les acides gras à longue chaîne carbonée et poly-insaturés sont plus sensibles à l'oxydation.
- la pression partielle en oxygène : dans le cas de pressions partielles très faibles, le taux d'oxydation lui est approximativement proportionnel. Si l'apport de dioxygène est important, le taux d'oxydation devient indépendant de la pression partielle en oxygène.
- la température : la vitesse de la réaction d'oxydation augmente avec la température et la période d'induction se trouve considérablement diminuée.
- la teneur en eau : l'oxydation est minimale pour des activités de l'eau (a_w) comprises entre 0,3 et 0,5.
- la position des acides gras dans le triglycéride : son rôle n'a pas encore été démontré dans le cas de l'oxydation non enzymatique, cependant des projets de recherche sont en cours.
- la teneur en pro-oxydant : des métaux de transition tels que le fer, le cuivre ou l'aluminium peuvent être introduits par contact avec le matériel de transformation et favoriser l'oxydation.
- la teneur en antioxydants : les phénols, l'acide citrique sont des agents séquestrant des métaux. Le β -carotène, la vitamine E et les α -tocophérols peuvent

réagir avec les radicaux libres et ainsi former des composés moins réactifs mettant fin à l'étape de propagation.

- l'effet antioxydant de certains produits issus de la réaction de Maillard.
- l'effet inhibiteur ou activateur de l'oxydation des produits issus de l'oxydation d'un acide gras donné sur un autre acide gras.

2.2 La réaction de Maillard

La réaction de Maillard a été découverte en 1912 par le chimiste et médecin français Louis-Camille Maillard. Cette réaction fait partie, avec la caramélisation, des réactions de brunissement non enzymatique en raison de la formation de polymères nommés mélanoidines qui provoquent une couleur brune caractéristique lors des étapes avancées de cette réaction (Maillard, 1913). Ce n'est qu'en 1953 que Hodge propose un schéma de la réaction assez complet qui fait encore référence aujourd'hui. La figure I.13 qui schématise cette réaction en est largement inspirée. Pour des raisons de compréhension, le schéma de Hodge est généralement scindé en quatre étapes que nous nous proposons de présenter ici.

2.2.1 Formation du composé d'Amadori

La réaction se produit lorsque des fonctions amines, issues d'acides aminés libres ou de groupements aminés latéraux de peptides et protéines, se condensent avec les groupements carbonyles de sucres réducteurs pour former une base de Schiff. Dans le cas des protéines, les deux acides aminés basiques que sont la lysine et l'arginine sont principalement affectés en raison de la présence d'une fonction amine libre sur leur chaîne latérale. Il convient de noter que seule la forme linéaire du sucre réagit avec les composés aminés. La base de Schiff ainsi obtenue est en équilibre avec une N-glycosylamine comme indiqué sur la figure I.13. Cette N-glycosylamine va alors subir un réarrangement différent selon la nature du sucre réducteur initial intervenant dans la réaction : un aldose conduira à une aldosylamine puis à l'intermédiaire d'Amadori, un 1-amino-1-desoxycétose, alors qu'un cétose conduira à une cétylsylamine puis à l'intermédiaire de Heyns, un 2-amino-2-desoxyaldose. Cette deuxième réaction est irréversible et l'obtention des intermédiaires d'Amadori et de Heyns marque la fin de la première étape de la réaction de Maillard.

2.2.2 Propagation de la réaction de Maillard

La seconde étape de la réaction de Maillard ou étape dite « de propagation » est orientée selon les conditions de pH, de température et d'activité de l'eau. Dans le cas

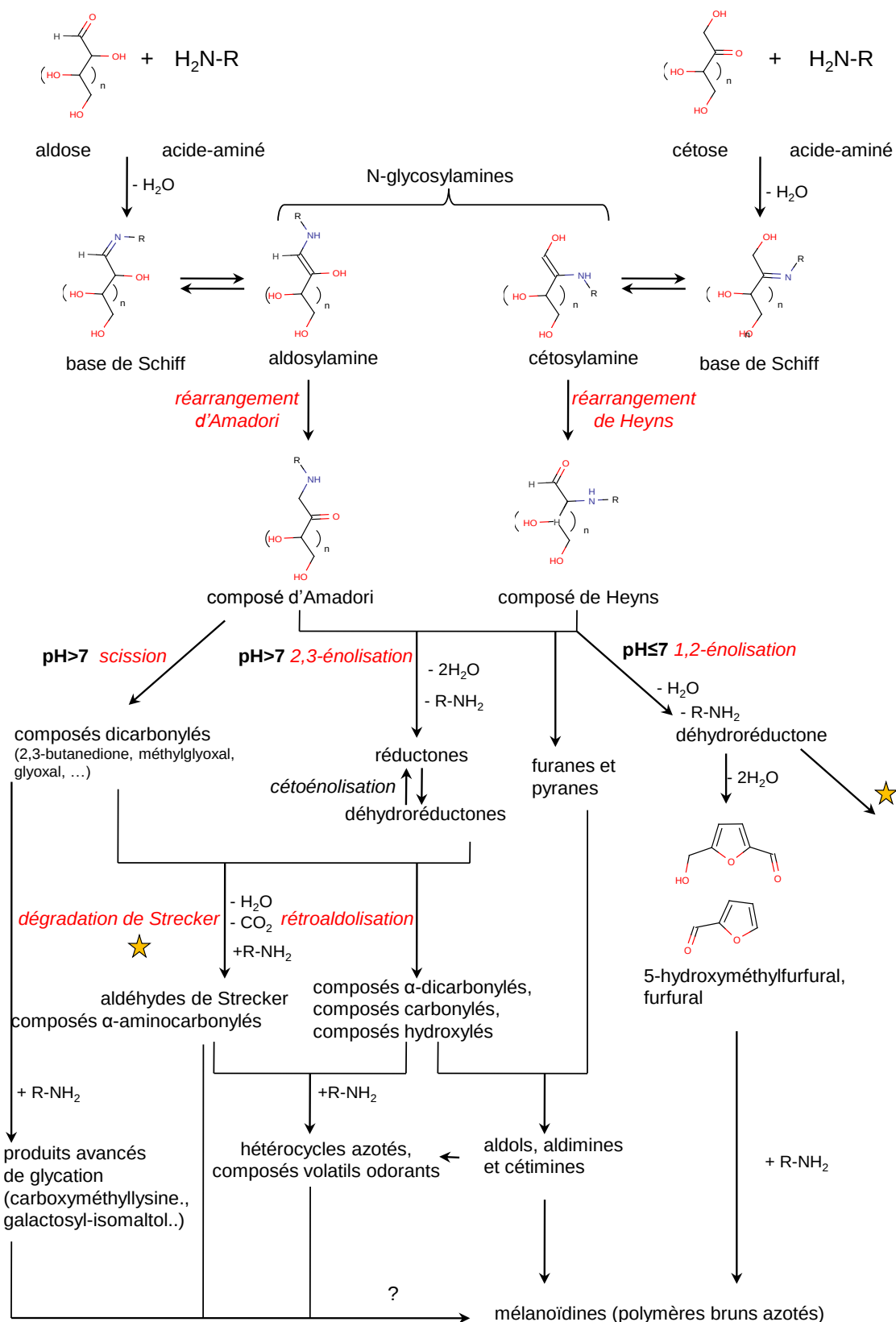


Fig. I.13 – Représentation schématique de la réaction de Maillard adapté de Hodge (1953)
(* renvoie à la dégradation de Strecker)

d'un pH basique, la voie majoritairement empruntée est la voie de 2,3-énolisation dite de déshydratation modérée car seules deux molécules d'eau sont perdues. Les produits de réarrangement sont favorisés conduisant à la formation des aminocétones et aldéhydes de Strecker. La scission des cétosamines et aldosesamines conduit à la formation de petites molécules dicarboxylées telles que la 2,3-butanedione, le méthylglyoxal ou encore le glyoxal. Ces composés sont très réactifs et vont conduire en présence de composés aminés à la formation des composés aromatiques hétérocycliques mais également aux composés avancés de glycation (AGE) comme la carboxyméthyllysine. Dans le cas d'un pH acide ou neutre, la voie majoritairement empruntée est cette fois la voie de 1,2-énolisation dite de déshydratation forte car trois molécules d'eau sont perdues. Elle conduit, après la perte d'une molécule d'eau, à la formation de réductones et déhydroréductones qui peuvent participer à la dégradation de Strecker. La perte de deux molécules d'eau supplémentaires conduit à la formation du 5-hydroxyméthylfurfural dans le cas des hexoses et au 2-furaldéhyde dans le cas des pentoses (Martins *et al.*, 2001).

2.2.3 Spécificités de la dégradation de Strecker

La dégradation de Strecker correspond à la condensation d'un acide aminé et d'un composé dicarboxylé provenant de la dégradation du produit d'Amadori ou de Heyns au cours de la réaction de Maillard. Les composés obtenus sont des aldéhydes volatils et des composés α -aminocarbonylés. La figure I.14 présente le mécanisme de la dégradation de Strecker appliqué à la cystéine.

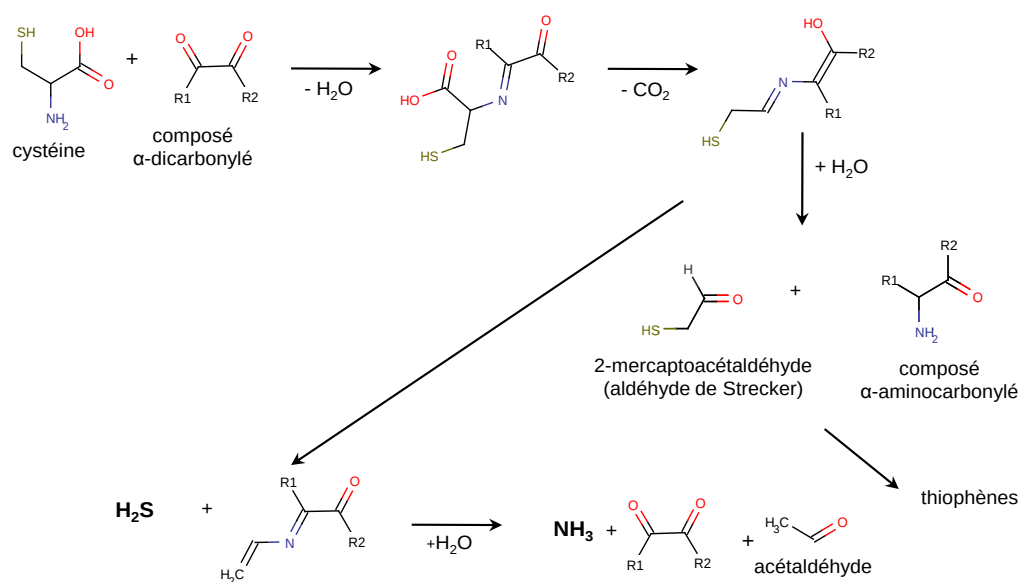


Fig. I.14 – Mécanisme de la dégradation de Strecker appliquée à la cystéine.

Ce mécanisme conduit à la formation de 2-mercaptoacétaldéhyde, mais également au développement de certaines réactions auxiliaires qui peuvent conduire à la formation de composés azotés ou soufrés susceptibles d’avoir une contribution importante à l’arôme du produit alimentaire étudié. La dégradation de Strecker appliquée à un autre acide aminé soufré, la méthionine, conduit à la formation de méthional qui en se dégradant va produire l’acroléine et le méthaneethiol. L’oxydation du méthaneethiol va conduire en la formation de sulfure de diméthyle, puis par dismutation à celle de disulfure de diméthyle et enfin de trisulfure de diméthyle. La nature de l’acide aminé intervenant a une grande influence sur les composés formés (Danehy, 1986). Le tableau I.3 présente un certain nombre de produits issus de la dégradation de Strecker et formés à partir de différents acides aminés, ainsi que leurs contributions possibles à la saveur du produit alimentaire.

Tab. I.3 – Contribution des produits issus de la dégradation de Strecker et des étapes avancées de la réaction de Maillard à la saveur.

[1] : Buttery *et al.* (1988), [2] : Fors (1983), [3] : Beal et Mottram (1994), [4] : Gomez *et al.* (1993).

Composé	Masse molaire moléculaire	Odeur	acide aminé d’origine	seuil de détection dans l’eau [ppb]	Référence
acétaldéhyde	44	fruité, yaourt	alanine	15-120	[1]
2-mercaptoacétaldéhyde	76	chou	cystéine	5-500	[2]
2-méthylpropanal	72	banane, malt, pomme de terre cuite	sérine, thréonine, valine	0,1-2,3	[2]
3-méthylbutanal	86	amande, fromage, chocolat, malt	leucine	0,2-2	[3]
2-méthylbutanal	86	amande, cacao, brûlé	isoleucine	1-10	[2,3]
méthional	104	pomme de terre cuite	méthionine	0,2	[2]
méthaneethiol	48	chou, œuf	méthionine	0,3-1	[2]
diméthyl disulfide	94	chou, soufre, essence	méthionine	0,16-12	[2]
diméthyl trisulfide	126	chou, gaz	méthionine	0,005-0,01	[1,2]
phénylacétaldéhyde	120	miel	phénylalanine	4	[1,4]
furanéol	128	fraise, caramel	proline	0,03	[2]
2-furaldéhyde	96	pain cuit	leucine, isoleucine	3000-23000	[2]
2-furanméthanol	98	brûlé		5000	[2]
5-méthylfurfural	110	amande, caramel, brûlé		-	[2]
maltol	126	caramel, pain cuit		35000	[2]
2,5-diméthylpyrazine	108	cacao, viande grillée	glycine, phénylalanine	800-1800	[2]
tétraméthylpyrazine	136	brûlé, grillé	sérine, thréonine, valine	1000-10000	[2]

Yaylayan (2003) montre que la dégradation de Strecker peut être perturbée par l’oxydation des composés α -dicarboxylés en composés α -hydroxy-dicarboxylés, comme la 2-hydroxy,propanone conduisant à la genèse de composés aromatiques différents et en particulier aux acides de Strecker plutôt qu’aux aldéhydes. Ceci est schématisé sur la figure I.15. En conditions oxydantes, la forme α -dicarboxylée est favorisée par rapport à la forme hydroxy-carboxylée, ce qui conduit à la formation de davantage de composés furaniques *via* la réaction de Maillard. Le ratio de formation de ces composés α -hydroxy-dicarboxylés est très influencé par les conditions de

fabrication et en particulier par la teneur en oxygène dissous.

Hofmann *et al.* (1999) étudient la contribution relative des composés α -hydroxy-dicarbonylés par rapport aux composés α -carbonylés vis à vis du brunissement. Ils mettent en évidence que la contribution au brunissement non enzymatique du composé hydroxy-dicarbonylé est plus importante que celle de son homologue dicarbonylé pour un nombre d'atomes de carbone supérieur à 3. Dans leur étude, le 2-oxopropanal conduit par exemple à un brunissement non enzymatique 256 fois plus important que l'hydroxy-2-propanone et la 2,3-butanedione à un brunissement 8 fois plus important que la 2-hydroxy-3-butanone. Cependant, le glycolaldéhyde a un brunissement 8 fois plus important que le glyoxal, ce qui est en contradiction avec l'analyse précédente pour les composés à plus de 2 atomes de carbone. Il est également mis en évidence que la contribution au brunissement non enzymatique diminue avec l'augmentation du nombre d'atomes de carbones. Dans ce contexte, il est conclu que la dégradation de Strecker joue un rôle important non seulement dans la génération des propriétés aromatiques du produit mais également sur son brunissement.

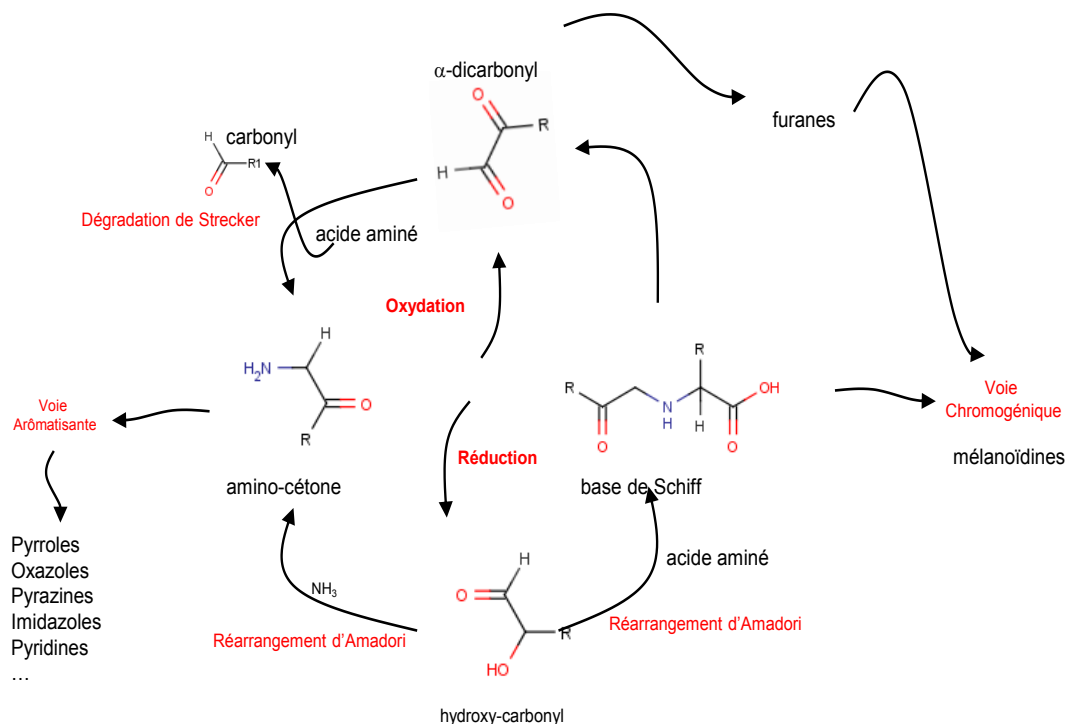


Fig. I.15 – Rôle de l'oxydation au cours de la dégradation de Strecker d'après Yaylayan (2003).

2.2.4 Étape avancée de la réaction de Maillard

La troisième étape ou « étape avancée » correspond à la formation des composés avancés de glycation. Elle correspond également à la formation de substances aromatiques et odorantes issues de la condensation des réductones, des dehydroréductones ou bien encore des composés α -aminodicarbonylés issus de la dégradation de Strecker. Les composés α -aminodicarbonylés formés peuvent par condensation conduire à la formation de pyrazines. La condensation de deux molécules de 3-amino-2-butanone issues de la dégradation de Strecker entre le diacétyl et la valine conduisent ainsi en la formation de tetraméthylpyrazine (Fox et McSweeney, 1998). van Boekel (1998) identifie la lysylpyrraline, la maltosine, le maltol, la β -pyrranone, la 3-furanone, la cyclopentenone, le galactosyl-isomaltol, l'acétylpyrrole, la pentosidine et la carboxylméthyllysine comme des composés avancés de glycation formés dans le lait chauffé. Cette étape est véritablement divergente car le nombre de composés formés est sans commune mesure avec le nombre de substrats initiaux de la réaction de Maillard.

2.2.5 Étape finale de la réaction de Maillard

Enfin, l'étape finale correspond à la polymérisation de ces substances en mélanoidines de haut poids moléculaire pouvant atteindre jusqu'à $100\,000\text{ g.mol}^{-1}$ et responsables du changement de couleur du produit. Il s'agit de composés insolubles dont les mécanismes de formation demeurent encore peu connus. Trois hypothèses ont été formulées pour les décrire.

Certains auteurs comme Tressl *et al.* (1998) proposent une structure comportant des motifs furaniques et pyrroliques pour les mélanoidines.

D'autres auteurs suggèrent que le motif principal des mélanoidines serait constitué des produits de dégradation des sucres issus de l'étape précoce de la réaction et qui se seraient polymérisés puis liés aux composés azotés (Kroh, 1994).

Hofmann (1998a,b) propose que des composés colorés de faible poids moléculaire puissent venir se lier aux protéines *via* les groupements aminés latéraux de la lysine, de l'arginine ou de la cystéine. Ses expériences de fractionnement montrent que seules les fractions de haut poids moléculaire ($> 50\,000\text{ g.mol}^{-1}$) sont responsables du brunissement observé. Il demeure très probable que les mélanoidines soient issues d'une combinaison des différentes structures présentées ci-dessus.

2.2.6 Approche conceptuelle de la réaction de Maillard

Étant donné la grande diversité des substances produites au cours de la réaction de Maillard d'une part, leurs positions d'intermédiaires réactionnels et la diversité des voies de formation de certains de ces composés d'autre part, il en résulte l'impossibilité de proposer un schéma réactionnel complet totalement satisfaisant d'un point de vue strictement mécanistique.

De ce fait, certains auteurs proposent plutôt qu'une approche déterministe, une classification des produits issus de la réaction de Maillard en groupes pouvant interagir de manière presque chaotique selon des processus réactionnels élémentaires et conduisant à des groupes dits « d'interaction » comme représenté sur la figure I.16 (Yaylayan, 1997).

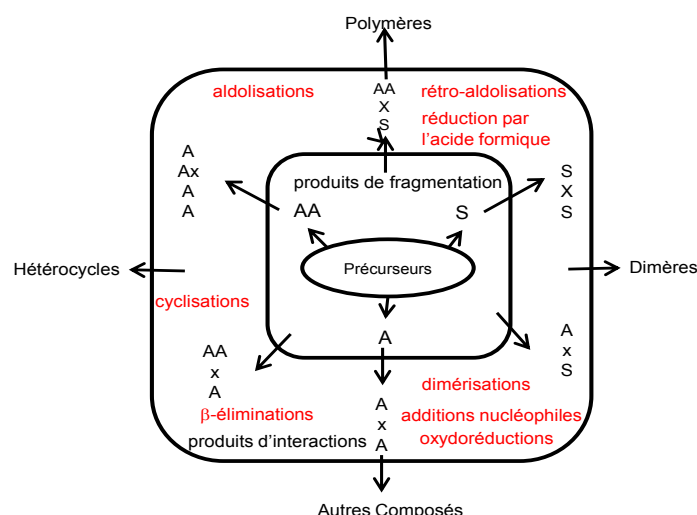


Fig. I.16 — Représentation conceptuelle de la réaction de Maillard d'après Yaylayan (1997)

AA : produits de fragmentation des acides aminés : acides aminés, amines, acides carboxyliques, alcanes, composés aromatiques, styrène, etc. **S** : produits de fragmentation des sucres : formaldéhyde, acide formique, glyoxal, acide acétique, glyceraldéhyde, pyruvaldéhyde, hydroxyacétone, dihydroxyacétone, 2,3-butanedione, 1-hydroxy-2-butanone, 2-hydroxybutanal, pentoses, pentuloses, furanones, pyranones, glucosones, déoxyglucosones, etc. **A** : produits de fragmentation des composés d'Amadori et de Heyns : glyceraldéhyde-ARP, etc.

Jousse *et al.* (2002) reprennent cette classification et propose un schéma réactionnel générique de la réaction de Maillard à partir duquel une approche de modélisation cinétique multi-réponses a permis, sur la base de données issues de la littérature, de déterminer les valeurs de « pseudo constantes de réaction » et les énergies d'activation correspondantes.

Pour appuyer nos propos, voici deux exemples montrant, pour le suivi d'un seul composé donné, les difficultés rencontrées. Les essais de suivi du devenir du carbone 13 introduits par Schieberle (2005) avec l'approche CAMOLA, pour « CARbone MODule LABelling », permettent d'élucider quels sont les précurseurs et les inter-

médiaires d'un composé donné issu de la réaction de Maillard. Il met par exemple en évidence que les conditions de traitement influencent fortement les mécanismes réactionnels conduisant à la formation du furanéol. Les résultats de Yaylayan et Keyhani (1999) dans un système modèle constitué de D-Glucose et L-Alanine marqués au carbone 13 suggèrent, dans leurs conditions opératoires, que la 2,3-butanedione provient à 30% de la fragmentation directe du glucose en glyoxal et 2,3-butanedione et pour 70% de la fragmentation du 3-déoxyglucosone en pyruvaldéhyde suivi d'une élongation se réalisant *via* l'intervention d'un acide aminé. En revanche, la 2,3-pentanedione proviendrait pour 10% de la fragmentation du glucose, les 90% restant étant issus de la réaction de Maillard. Ainsi de nombreux composés présentent des origines multiples. Il en résulte une grande difficulté pour décrire les voies réactionnelles suivies et une grande complexité des schémas réactionnels probables.

2.2.7 Facteurs affectant la réaction de Maillard

2.2.7.1 Réactivité des acides aminés La nature de l'acide aminé réagissant est d'importance. Ashoor et Zent (1984) mesurent le brunissement associé à chacun des acides aminés en présence de fructose, ribose et lactose à pH 9. Leurs résultats permettent de classer les acides aminés en trois groupes selon leur réactivité.

- les acides aminés provoquant le brunissement le plus intense : lysine, glycine, tryptophane et tyrosine
- les acides aminés provoquant un brunissement intermédiaire : proline, leucine, isoleucine, alanine, hydroxyproline, phénylalanine, méthionine, valine, glutamine, sérine et asparagine
- les acides aminés provoquant un brunissement très faible : histidine, thréonine, asparagine, arginine, glutamine et cystéine

Il est à noter, dans le cas des produits alimentaires, que ces acides aminés réagissent de manière conjointe et non individuellement. De plus, ils ne sont pas majoritairement sous leur forme libre. La source des fonctions aminées libres intervient donc. Dans le cas des peptides et des protéines, seule la fonction amine de l'acide aminé terminal, ou les fonctions aminées latérales de la lysine, de l'arginine et de l'histidine sont accessibles. Mais pour des raisons d'encombrement stérique, ces fonctions aminées latérales sont moins réactives que dans le cas des acides aminés libres.

2.2.7.2 Réactivité des sucres La nature du sucre réducteur intervient fortement. Il est généralement admis que les pentoses sont plus réactifs que les hexoses qui sont eux-mêmes plus réactifs que les diholosides (Pilar Buera *et al.*, 1987).

2.2.7.3 Température Le facteur influençant la réaction le plus évident est le couple temps, température. Il a été étudié par Maillard (1912) lui-même qui rapporte que la vitesse de la réaction augmente avec la température. La relation entre la température T et la constante de réaction k peut être décrite par la loi d'Arrhénius représentée en équation I.8.

$$k = k_0 \cdot \exp \frac{-E_a}{R \cdot T} \quad (\text{I.8})$$

avec k la constante de réaction, k_0 le facteur de fréquence, E_a l'énergie d'activation, R la constante du gaz parfait ($8,31 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) et T la température absolue (K).

Cependant, il s'agit d'une simplification. Martins *et al.* (2001) suggèrent qu'il est préférable d'utiliser la théorie du complexe activé développée par Eyring au sens où elle permet une analyse plus fine des mécanismes réactionnels.

$$k = \frac{k_b \cdot T}{h} \cdot \exp \frac{-\Delta G^\ddagger}{R \cdot T} = \frac{k_b \cdot T}{h} \cdot \exp \frac{-\Delta H^\ddagger}{R \cdot T} \exp \frac{-\Delta S^\ddagger}{R} \quad (\text{I.9})$$

où k_b est la constante de Boltzmann ($1,4 \cdot 10^{23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$), h la constante de Planck ($6,6 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$), R la constante des gaz parfaits, T la température absolue, $\Delta G^\ddagger$ l'énergie d'activation de Gibbs ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$), $\Delta H^\ddagger$ l'enthalpie d'activation et $\Delta S^\ddagger$ l'entropie d'activation. En effet, il devient alors possible, en plus de l'interprétation traditionnelle thermodynamique portant sur les valeurs des constantes de vitesse de réaction, d'interpréter les mécanismes réactionnels les plus probables au moyen des valeurs d'entropie et d'enthalpie ainsi déterminées.

2.2.7.4 pH Le pH influence la réaction de Maillard de deux manières. Il modifie d'une part la réactivité des sucres et d'autre part celle des acides aminés. En effet, la forme linéaire du sucre est la seule réactive car elle présente un groupement carbonyle réducteur accessible. Elle est obtenue au cours de la réaction de mutarotation du lactose, représentée sur la figure I.17, et se produit en permanence (Fox et McSweeney, 1998).

La vitesse de mutarotation du lactose est dépendante du pH. Elle est favorisée aux pH extrêmes comme cela est représenté sur la figure I.18 et en particulier en milieu alcalin (de Bruijn, 1986).

De manière similaire, la forme $R - NH_2$ de l'acide aminé est considérée comme la forme réactive. La première étape de la réaction de Maillard consiste en effet en l'addition nucléophile de la fonction amine sur un groupement carbonyle et n'est possible que grâce à la présence du doublet libre de l'azote. La figure I.19 présente le mécanisme de cette réaction.

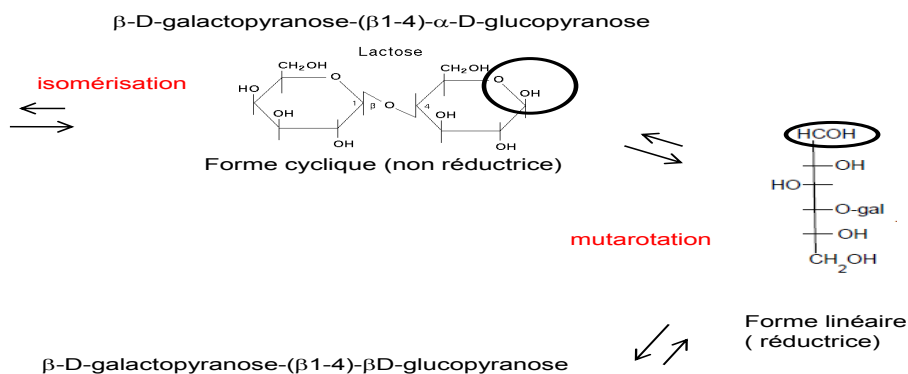


Fig. I.17 – Mutarotation du lactose en solution aqueuse d'après Fox et McSweeney (1998).

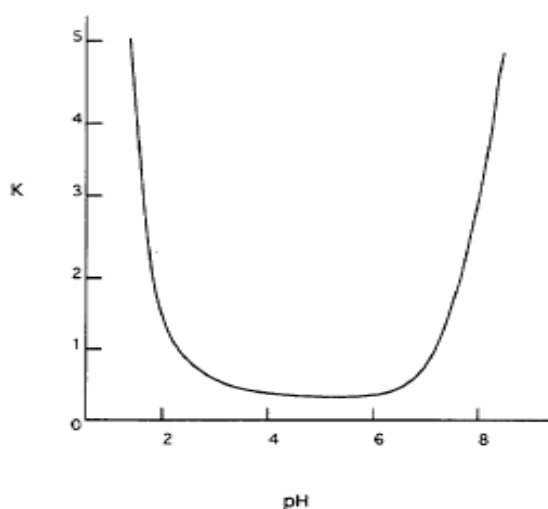


Fig. I.18 – Effet du pH sur la variation relative de la constante de vitesse de la réaction de mutarotation du lactose en solution aqueuse à 20°C, $K_{pH=2}$ étant la référence, d'après Fox et McSweeney (1998).

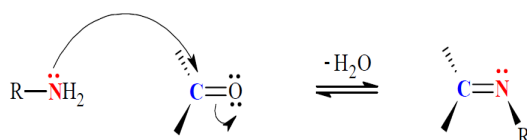


Fig. I.19 – Addition nucléophile d'une amine primaire sur une fonction carbonylée.

La figure I.20 représente la proportion des différentes formes de la lysine en fonction du pH. A pH 6 et à température ambiante, seule 0,05% de la glycine et environ 4% de la lysine sont sous cette forme. La forme réactive de l'acide aminé vis à vis de la première étape de la réaction de Maillard est donc favorisée aux pH alcalins. Il influence également les voies réactionnelles empruntées et donc les

composés d'arômes produits comme cela est représenté sur la figure I.13.

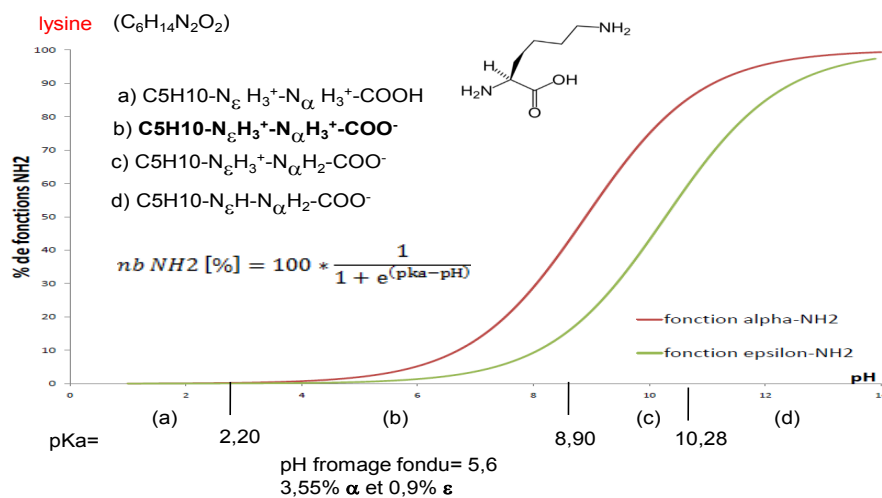


Fig. I.20 — Effet du pH sur la proportion de fonctions aminées de la lysine sous forme réactive en solution aqueuse à 20°C.

2.2.7.5 Activité de l'eau L'activité de l'eau (a_w) intervient également. La figure I.21 présente l'intensité du brunissement non enzymatique de poudres de lait en fonction de l'activité de l'eau.

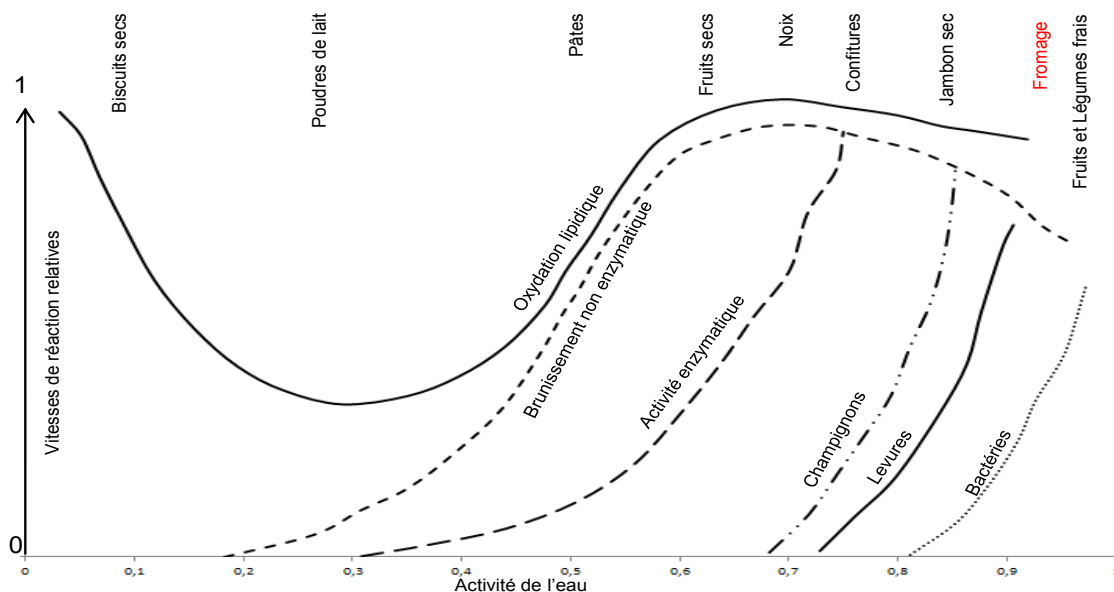


Fig. I.21 — Influence de l'activité de l'eau sur la réaction de Maillard et d'autres réactions adapté d'après Labuza et Dugan (1971) et Finley et Given (1986).

Pour les activités de l'eau très faibles, la solubilité des réactants est réduite ce qui explique que la réaction ne se produit pas. Pour les activités de l'eau élevées,

la première étape de déshydratation se trouve assez largement inhibée. On observe donc un maximum d'intensité du brunissement non enzymatique pour des activités de l'eau de l'ordre de 0,6 à 0,8. L'activité de l'eau du fromage fondu est de l'ordre de 0,9 à 0,95. Il est à noter que l'activité de l'eau modifie également les voies réactionnelles, ainsi dans le cas des poudres de lait soumises à un test de brunissement accéléré, Ferretti et Flanagan (1971) observent la présence d'une grande variété de pyrroles tels que le N-méthyl-2-formylpyrrole, le 5-méthyl-2-formylpyrrole, l'éthyl-2-formylpyrrole et le 2-acétylpyrrole. Ces pyrroles ne sont *a priori* pas retrouvés dans des produits laitiers d'activités de l'eau plus élevées.

2.3 La caramélisation

La réaction de caramélisation est décrite par Kroh (1994) comme la succession de six réactions conduisant à la dégradation des sucres réducteurs sans intervention de composés azotés. L'absence de composés azotés constitue la principale différence avec la réaction de Maillard. Elle se caractérise par la formation d'une couleur brune et de composés d'arômes typiques du caramel. La figure I.22 représente ces réactions.

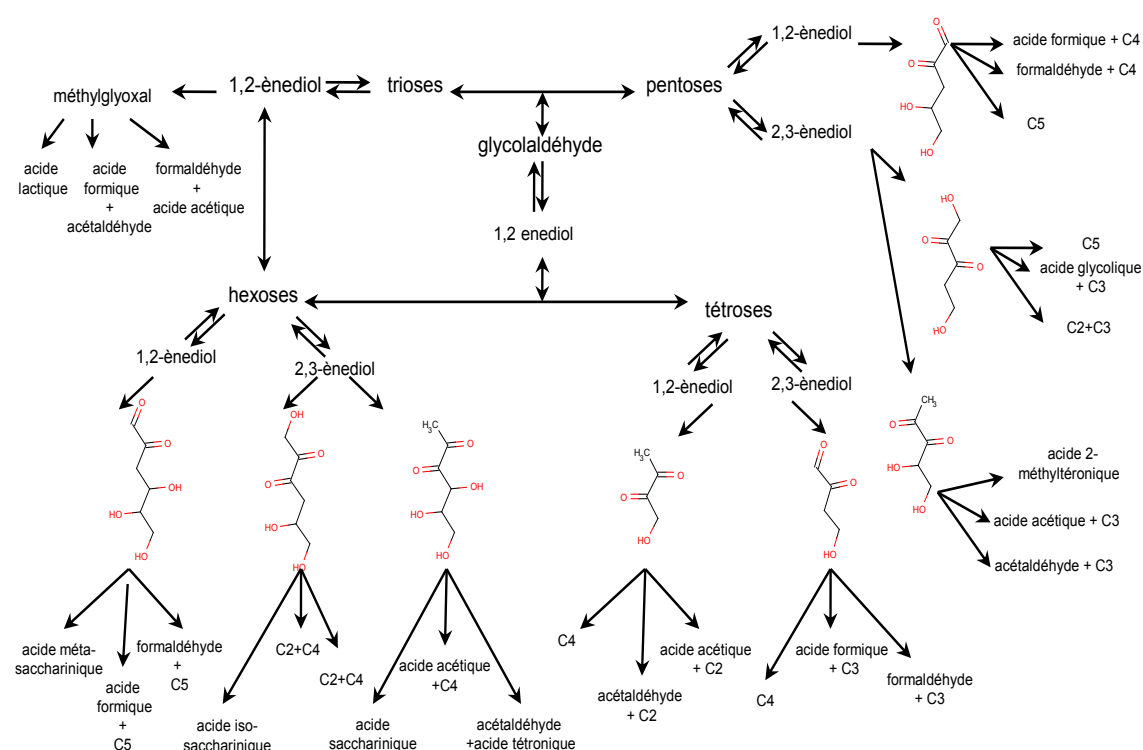


Fig. I.22 – Dégradation des sucres au cours de la caramélisation adapté d'après de Bruijn (1986).

La première étape consiste en une réaction de 1,2-énolisation du sucre réducteur ou bien encore appelée réarrangement de *Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein* du

nom des deux chercheurs qui l'ont mise en évidence dès 1885. Cette étape réversible est suivie d'une seconde énolisation non réversible puis de la β -élimination d'une molécule d'eau. La quatrième étape est le clivage dicarboxylé qui va conduire à la formation des acides carboxyliques (acide formique et acide acétique). Les deux dernières étapes sont la rétro-aldolisation et la condensation-aldolisation. Ceci conduit à la formation d'osuloses qui sont des composés α -dicarboxylés très réactifs et à la libération d'ions hydrogène causant une diminution du pH au cours du temps jusqu'à des valeurs de l'ordre de 4 à 5. Les osuloses conduisent ensuite à la formation de composés typiques de la couleur et de la saveur du caramel en particulier trois composés hétérocycliques oxygénés, le 5-hydroxyméthylfurfural, l'hydroxyméthylfuranone et l'hydroxyacétylefuranone sont formés au cours de la caramélisation du glucose (Coca *et al.*, 2004). La distinction entre la réaction de caramélisation et la réaction de Maillard est extrêmement délicate dès que l'on considère la présence de groupements aminés dans le milieu réactionnel. Cependant la formation de l'acide formique, comme présentée sur la figure I.22, semble être un indicateur pertinent de la voie de caramélisation en pareille situation. La réaction est favorisée à des températures élevées, généralement supérieures à 120 voire même 150°C suivant les sucres mis en jeu, et des conditions de pH extrêmes fortement basiques ($\text{pH} \geq 9$) ou acides ($\text{pH} \leq 3$) selon le degré d'avancement de la réaction (Kroh, 1994). Dans un milieu réactionnel modèle constitué d'un mélange équimolaire de glucose et de glycine tamponné à pH 6,8, Martins et van Boekel (2005) montrent que les températures de traitement supérieures à 120°C permettent de favoriser la voie de la caramélisation par rapport à la voie de la réaction de Maillard. Ces barèmes thermiques, sont supérieurs à ceux normalement rencontrés au cours de la fabrication des fromages fondus. De plus, le pH du fromage fondu, compris entre 4 et 7, n'est pas favorable à la réaction de caramélisation au cours des procédés de fabrication.

2.4 Autres réactions

2.4.1 Dégradation des vitamines

Au cours des traitements thermiques, on observe la dégradation des vitamines thermosensibles. La dégradation de la thiamine ou vitamine B1 conduit à la formation de différents composés d'arôme dont les thiazoles et les furanes. La figure I.23 en présente succinctement les mécanismes.

La dégradation thermique de l'acide ascorbique, ou vitamine C, peut conduire à la formation de furanéol, que l'on obtient également par les voies de réaction de Maillard et d'oxydation des lipides.

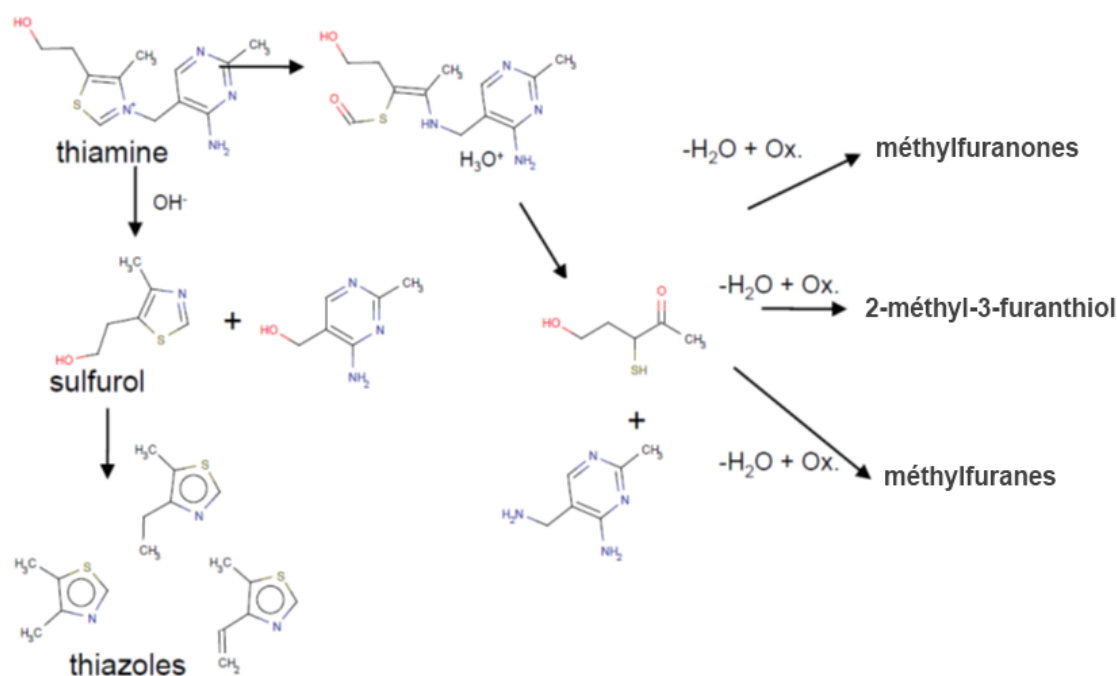


Fig. I.23 – Dégradation thermique de la thiamine en thiazoles et autres composés adapté d'après Cerny (2008).

2.4.2 Déamidation des caséines

Les traitements thermiques entraînent des phénomènes de dénaturation des protéines. La dégradation des caséines en petits peptides d'une part et la déamidation des groupements aminés latéraux des acides aminés asparagine et glutamine conduisent à l'augmentation de la teneur en azote non protéique (NPN). Ils peuvent être évalués en mesurant à la fois la teneur en NPN et en ammoniac. van Boekel (1999) a étudié les cinétiques de déamidation, déphosphorylation et dénaturation des caséines en systèmes modèles de β -caséine. Il établit un ordre de réaction de 1 par rapport à la concentration pour la déamidation et la dégradation des caséines en peptides.

3 Apports de la modélisation

3.1 Démarche de modélisation

La modélisation est le processus par lequel le modélisateur effectue une tentative d'approximer les phénomènes réels se produisant à l'intérieur d'un système (S), au moyen des connaissances théoriques et expérimentales dont il dispose.

Dans le cadre de ce travail de thèse, il s'agit de modéliser les réactions se produisant au cours de la cuisson de la matrice de fromage fondu, en vue d'établir un

modèle de prédiction de la formation ou de la disparition de certains composés issus de la réaction d'oxydation des lipides ou de la réaction de Maillard.

La figure I.24 représente de manière conceptuelle cette démarche.

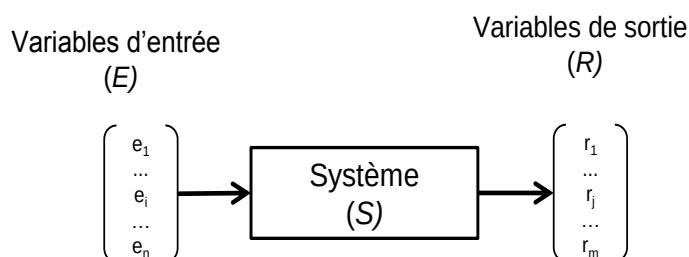


Fig. I.24 – Système S répondant à une entrée E par une sortie R d'après van Boekel (2009).

Un système (S) réagit à une entrée (E) en produisant une réponse (R) :

- le système est défini par des limites physiques. Il est caractérisé par un certain nombre de variables d'état : volume, pression, température, quantité de matière et de paramètres d'état : constantes de vitesse de réaction, capacité calorifique massique, ... Les valeurs numériques de l'ensemble de ces paramètres ne sont pas nécessairement connues par le modélisateur.
- Les variables d'entrée sont les actions de l'environnement sur le système. Il s'agit généralement des conditions opératoires. L'étude et la sélection de ces variables doivent être effectuées de manière rigoureuse car elles peuvent avoir un effet majeur sur la fiabilité du modèle. Le principe de parcimonie est généralement admis : le nombre de paramètres nécessaires pour décrire le système doit rester aussi faible que possible.
- Les variables de sortie sont les réponses, généralement quantitatives, que l'on cherche à modéliser. Elles peuvent selon les cas être accessibles expérimentalement ou non.

Dans ce contexte, il conviendra, lorsque cela est possible, d'effectuer une étude de sensibilité aux différents paramètres du modèle afin d'exclure de ce modèle les variables d'entrée qui n'ont qu'un effet négligeable sur la réponse produite par le système, et de connaître les sources d'erreurs potentielles.

Le processus de modélisation peut être effectué à partir de degrés de connaissances divers. Dans le cas où les principes physiques ou chimiques qui régissent le système sont bien connus, il devient possible de construire des modèles mécanistiques, empiriques et déterministes décrivant ces processus. Dans ce cas, le modèle

est dit de type « boîte blanche » et peut être exprimé de la sorte :

$$\nu = f((\theta, \xi)) + \epsilon \quad (\text{I.10})$$

avec :

- ν : les réponses mesurables du système
- θ : les paramètres du modèle
- ξ : les variables d'entrée contrôlables
- ϵ : l'erreur du modèle

Ce type de modèle peut alors être utilisé de trois manières complémentaires :

- Lorsque l'entrée (E) ainsi que la sortie (R) sont connues ou mesurées expérimentalement, la modélisation peut être utilisée de manière à obtenir des informations sur le système (S). Il s'agit alors d'ajuster les différents paramètres d'état du système. Dans le cas particulier de la modélisation stœchio-cinétique multi-réponses, ceci pourra permettre par exemple de discriminer plusieurs voies réactionnelles possibles.
- Lorsque le système (S) et l'entrée (E) sont connus, la modélisation permet alors de prédire la réponse du système (R) et d'estimer l'incertitude sur cette prédiction.
- Enfin, le modèle peut être utilisé à des fins d'optimisation lorsque le système (S) ainsi que la sortie souhaitée (R) sont connues. Il s'agit alors d'estimer les meilleures valeurs à appliquer aux paramètres d'entrée du modèle.

Cependant, nous sommes souvent confrontés aux situations suivantes :

- la connaissance théorique disponible sur les processus à modéliser et les paramètres d'état est réduite et de nature qualitative uniquement.
- les processus à modéliser sont extrêmement complexes.
- la détermination expérimentale de ces paramètres d'état est difficile ou même impossible à réaliser.

Il s'agit du cas de la matrice fromagère qui est un produit alimentaire réel. Le nombre de réactifs potentiels est relativement élevé et les réactions chimiques se produisant au cours des procédés de transformation nombreuses. De plus, nous ne disposons pas, pour ce type de matrice, d'un certain nombre de constantes physiques telles que la capacité calorifique massique, la conductivité thermique, ni de leurs lois de dépendance à la température et à la pression.

Dans une telle situation, le processus ne peut plus être approfondi sans l'application d'un grand nombre d'hypothèses simplificatrices. Il reste cependant possible d'utiliser les variables d'entrée et de sortie à des fins de modélisation en utilisant des méthodes de type « boîte noire ». C'est le cas par exemple des modèles de régres-

sion linéaire ou non-linéaire qui ne nécessitent aucune connaissance des phénomènes sous-jacents. C'est également le cas des problèmes de classification par analyse discriminante. Dans le cas de problèmes complexes, le recours à « l'intelligence artificielle » comme par exemple les réseaux de neurones peut également être envisagé.

3.2 Modélisation stœchio-cinétique multi-réponses

Dans le cadre du projet ANR Réactial, la décision a été prise de privilégier les modèles dit « mécanistiques », par rapport aux modèles de type « boîte noire ». Le choix a été motivé par le fait que seul ce type d'approche permet d'obtenir une meilleure connaissance des réactions chimiques se produisant réellement dans les matrices au cours des procédés de transformation. La démarche appliquée pour l'étude des réactions chimiques avec la méthode de modélisation stœchio-cinétique multi-réponses a été bien expliquée par van Boekel (2009). Elle sera reprise brièvement dans la partie des matériels et méthodes en page 95. Dans le cas de l'étude des cinétiques réactionnelles, les réactions d'ordre 0 sont souvent reportées. La cinétique de formation des mélanoïdines et de la couleur au cours de la réaction de Maillard dans les produits laitiers suit par exemple une telle loi (Morales et Jimenez-Perez, 1998). Cependant, il s'agit d'un ordre apparent traduisant généralement le fait que la quantité de produit formée est faible par rapport à la quantité de réactif initialement présente dans la matrice étudiée (van Boekel, 2001). Dans ce contexte, l'ordre 0 est la résultante de nombreuses constantes de réactions élémentaires. Ceci est particulièrement vrai lorsque l'on s'attache à l'étude des composés volatils et odorants formés au cours des traitements thermiques. La figure I.25 représente schématiquement la succession des réactions élémentaires et les rendements obtenus au cours des différentes étapes de la réaction de Maillard.

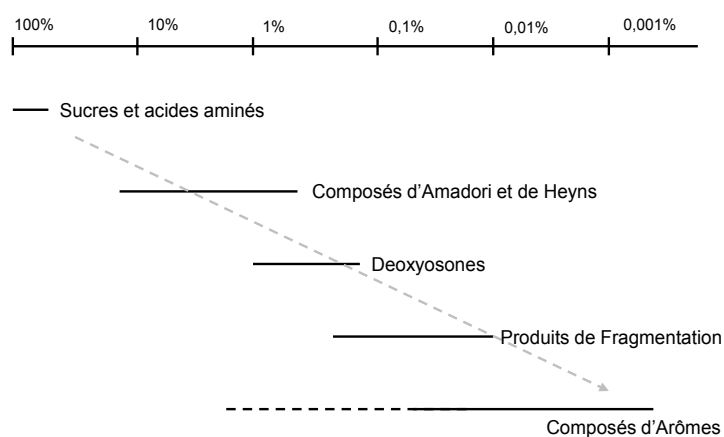


Fig. I.25 – Rendements obtenus au cours de la réaction de Maillard d'après Cerny (2008).

Les différents composés d'arômes sont formés dans des quantités de 100 à 10^6 fois inférieures à la teneur des sucres et acides aminés dont ils sont issus.

Ainsi, la modélisation stœchio-cinétique multi-réponses présente l'avantage d'approfondir les interconnexions existantes entre les réactions élémentaires successives. En effet, les voies réactionnelles probablement suivies peuvent être testées dans différents modèles et le modèle présentant le meilleur ajustement sera alors conservé.

De plus la précision ainsi obtenue sur les paramètres est généralement supérieure à celle obtenue par des modèles cinétiques simples (van Boekel, 2001). Enfin, des méthodes permettant l'estimation de l'incertitude sur les différents paramètres existent (Stewart *et al.*, 1992, 1998) et sont implémentées dans certains logiciels de modélisation stœchio-cinétique multi-réponses (Stewart et Caracotsios, 2010; The Mathworks, 2010, Simbiology toolbox).

3.3 Modélisation des réactions d'oxydation des lipides

Kanavouras et Coutelieris (2006) étudient la stabilité de l'huile d'olive au stockage dans différents matériaux. Trois réactions sont étudiées : la formation des radicaux libres de l'oxygène, la formation des hydroperoxydes et la formation de l'hexanal qui est alors considéré comme le produit principal formé au cours de la dégradation des hydroperoxydes. Cependant, seule, la formation de l'hexanal a pu être mesurée. Ce système chimique a été couplé à un modèle de diffusion unidirectionnel de l'oxygène et permet d'évaluer la quantité d'hexanal formée dans une bouteille d'huile d'olive au cours du stockage. La définition d'une teneur en hexanal critique au delà de laquelle l'huile n'est plus jugée satisfaisante pour le consommateur permet en outre d'estimer pour différentes conditions de stockage la probabilité que l'huile ne soit plus acceptable et d'évaluer ainsi les stratégies à mettre en œuvre pour sa meilleure conservation. Il a ainsi été démontré que des emballages opaques à la lumière permettent de multiplier par 3 environ la durée de conservation de l'huile. Cependant, étant donné que seul un composé a pu être mesuré, le modèle qui en découle ne peut pas être considéré comme multi-réponses. Il n'existe pas à notre connaissance, de modèle multi-réponses en ce qui concerne la réaction d'oxydation des lipides dans la littérature. Ceci est très probablement lié à la difficulté rencontrée pour mesurer avec une précision analytique suffisante les variations des précurseurs radicalaires et des acides gras insaturés ainsi que des intermédiaires hydroperoxydes. Cet exemple met en évidence que les contraintes analytiques sont l'un des verrous majeurs pouvant empêcher l'établissement de modèles stœchio-cinétique multi-réponses.

3.4 Modélisation des réactions de caramélisation

Quintas *et al.* (2007) présentent une modélisation multi-réponses de la réaction de caramélisation du saccharose. Le modèle obtenu est constitué d'un système de 8 équations différentielles ordinaires permettant de relier 6 composés : saccharose, fructose, glucose, 5-hydroxyméthylfurfural, 5-méthylfurfural et furfural. Tous les composés ont été quantifiés par HPLC. Les effets de la température et de l'activité de l'eau sont également pris en compte au moyen d'une loi d'Arrhénius et d'une loi de type exponentielle. Leur modèle permet d'ajuster de manière satisfaisante l'évolution de l'ensemble des composés mesurés au cours du temps, pendant un traitement de deux heures et demi à 140°C pour une teneur en eau de 25%. Cependant, il ne permet pas un ajustement correct de l'évolution de ces mêmes composés dans le cas d'un traitement à faible teneur en eau de l'ordre de 4%. Ils concluent dans le cas des faibles teneurs en eau, que d'autres voies réactionnelles, que celles présentées dans le modèle, sont probablement suivies. Ainsi, le schéma réactionnel présenté reste à étoffer avec d'autres réactions correspondantes à celles se produisant préférentiellement pour des activités de l'eau réduites.

3.5 Modélisation des réactions de Maillard

La réaction de Maillard a été modélisée dans le cadre d'études stœchio-cinétique multi-réponses pour des systèmes modèles simplifiés. Martins et van Boekel (2003, 2005) utilisent cette méthode dans le cadre d'un système modèle équimolaire de glucose et de glycine. De manière similaire Brands et van Boekel (2001, 2002) appliquent la même méthode dans le cas de systèmes modèles « caséine - monosaccharide » ou « caséine - disaccharide » (lactose, lactulose, maltose et saccharose). Cette étude s'avère particulièrement intéressante car le lactose et les caséines sont deux des ingrédients majoritaires de la matrice fromagère. Les traitements thermiques ont été effectués en bain d'huile à 120°C pour des durées allant de 0 à 40 minutes. Ils sont représentatifs des barèmes de stérilisation utilisés dans le cas de traitements en autoclave tels que ceux présentés en figure I.10. La première étape consiste en l'identification et en la quantification des produits issus de la réaction. Pour ce faire, les produits formés ont été suivis et quantifiés par différentes méthodes HPLC (spécifiques aux sucres et acides organiques, à la furosine et au méthylglyoxal) (Brands et van Boekel, 2001). Les teneurs en lysine et en mélanoidines ont été mesurées par des méthodes spectro-photométriques. Les molécules identifiées par HPLC sont :

- le lactose, le lactulose, le galactose et le tagatose
- l'acide formique (l'acide acétique n'a pas été observé bien qu'il soit détecté dans

le cas de systèmes caséines-monosaccharides (Brands et van Boekel, 2002))

- la lactulosyllysine
- le méthylglyoxal (apparemment non intégré au modèle multi-réponses)
- 4 composés hétérocycliques dont le 5-hydroxyméthylfurfural et le 2-furan-méthanol. Cependant, ces composés ne sont pas intégrés dans le modèle cinétique multi-réponses.

La recherche du meilleur ajustement des données expérimentales a permis de discriminer successivement 5 schémas réactionnels probables. Le dernier modèle a permis un ajustement tout à fait satisfaisant des données. Cependant, les composés intermédiaires et avancés de la réaction de Maillard (produits de dégradation du composé d'Amadori) ne sont pas détaillés mais exprimés comme des pseudo-constituants.

Un modèle similaire a également été récemment utilisé pour la prédiction de la formation de l'acrylamide (Knol *et al.*, 2005, 2010). Cette molécule se forme au cours de la réaction de Maillard, mais avec des substrats différents (à partir de l'asparagine) de ceux de notre étude. Pour cette raison, ces travaux ne sont pas détaillés davantage.

3.6 Limitations de la modélisation stœchio-cinétique multi-réponses

Les limitations de la modélisation stœchio-cinétique multi-réponses sont essentiellement liées à des considérations pratiques (van Boekel, 2009). Il faut pouvoir :

- disposer d'un accès analytique et quantifier un nombre important de composés d'intérêt. Ceci nécessite parfois un travail considérable et un temps important.
- introduire ces composés au sein d'un schéma réactionnel. Ce n'est pas toujours aisé en raison des origines souvent diverses des molécules suivies. Les composés furaniques présentent par exemple 4 origines distinctes parmi lesquelles l'oxydation des lipides et la réaction de Maillard (Limacher *et al.*, 2008). Dans le cas de systèmes modèles, leur origine peut facilement être déduite compte tenu de la composition initiale du système. Ce n'est pas toujours possible dans le cas de systèmes alimentaires réels. Dans ce cas, des travaux complémentaires de marquage afin d'identifier les voies réactionnelles sous-jacentes s'avèrent nécessaires. De plus, le schéma réactionnel serait alors considérablement complexifié et le nombre de paramètres du modèle augmenterait en conséquence.
- réaliser la résolution numérique du système. Le schéma réactionnel doit donc être structurellement identifiable et le nombre de paramètres à optimiser limité

afin que le système puisse converger en un temps raisonnable.

Pour toutes ces raisons, les composés non spécifiques sont souvent exclus des modèles multi-réponses. A ce jour, il n'existe aucune étude publiée appliquant la modélisation cinétique multi-réponses dans le cas d'aliments réels. De plus ce type d'étude se limite toujours au suivi de constituants quantifiés. Dans le cas de la réaction de Maillard, un grand nombre de composés volatils est formé au cours des étapes intermédiaires et avancées de la réaction. Ces composés ne sont jusqu'à présent pas intégrés dans les modèles cinétiques. Ils sont d'une part difficilement quantifiables et d'autre part intégrés dans un schéma réactionnel relativement complexe comme cela est présenté en figures I.13 et I.16. Dans ce contexte, la définition des objectifs du modèle multi-réponses à mettre en œuvre s'avère d'une importance cruciale, de manière à ne considérer que les constituants et les réactions essentiels à la résolution du problème posé.

Conclusion de la synthèse bibliographique

L'état des lieux des connaissances actuelles a permis de mettre en évidence une partie de l'information nécessaire à la levée des différents verrous méthodologiques et théoriques, présentés en introduction page 2, en vue de la réalisation d'un modèle stoechio-cinétique multi-réponses appliqué à l'élaboration du fromage fondu :

- Les opérations unitaires critiques dans le processus de fabrication du fromage fondu sont à la fois celles comprenant un traitement thermique à haute température pendant une durée limitée et celles comprenant un traitement thermique modéré mais pendant des durées prolongées.
- Les réactions chimiques se produisant au cours de la fabrication du fromage fondu ont été appréhendées.
- Nous avons également souligné l'absence de données issues des composés volatils dans l'élaboration des modèles stoechio-cinétique multi-réponses. Deux explications peuvent être avancées. Dans le cas de la réaction de Maillard, l'apparition des composés volatils correspond à une étape divergente du schéma réactionnel comprenant de multiples réactions comme cela est représenté sur la figure I.16 page 29. Dans le cas de la réaction d'oxydation des lipides, la difficulté réside plutôt dans l'impossibilité de mesurer avec une précision suffisante les différents intermédiaires réactionnels très réactifs.

Il s'agit maintenant de mettre en place les dispositifs expérimentaux qui vont permettre :

- de travailler à partir d'une formulation modèle simplifiée (comportant un

- nombre de précurseurs réduit par rapport à une formulation réelle).
- d’assurer la réalisation contrôlée et reproductible des traitements thermiques rencontrés à l’échelle industrielle (verrous n°1 et 2).
 - de confronter l’information théorique obtenue sur les schémas réactionnels à celle obtenue analytiquement en vue de l’écriture d’un schéma réactionnel observable (verrous n°3 et 4).

Introduction des Matériels et Méthodes

La synthèse bibliographique a mis en évidence l'existence potentielle de plusieurs réactions d'origine chimique au cours de l'élaboration et du stockage du fromage fondu. Cette partie se propose de présenter les outils et protocoles utilisés dans le but de répondre aux objectifs suivants :

- rendre possible le travail à l'échelle du laboratoire tout en respectant les contraintes liées aux propriétés de texture, aux barèmes thermiques et à l'analyse des composés volatils et non volatils.
- identifier les molécules d'intérêt réactionnel ou sensoriel spécifiques à la matrice de fromage fondu.
- permettre la quantification de ces molécules en vue de suivre l'avancement des réactions.

Travailler sur les composés volatils rend les possibilités de contamination par l'environnement particulièrement importantes. Elles sont, par exemple, liées à l'atmosphère du laboratoire, aux emballages ou encore à la verrerie utilisée. Afin de s'assurer que l'ensemble des constituants identifiés est bien issu des matières premières utilisées ou des réactions se produisant au cours des traitements qui leur ont été appliqués, une attention particulière a été portée sur la limitation des risques de contamination des échantillons utilisés pour l'analyse des composés volatils. Nous avons eu un recours systématique aux précautions suivantes :

- le même lot de matière première a été utilisé pour la totalité des expériences.

- l'ensemble des gaz et solvants utilisés est de pureté analytique.
- une attention particulière a été portée sur la limitation des risques de contamination des échantillons par les contaminants environnementaux tels que l'atmosphère du laboratoire, ou les différentes pièces en contact avec la matrice fromagère. Afin d'éliminer toute trace de composés volatils, la totalité de la verrerie ayant servi à la conservation des ingrédients, à la formulation de la matrice fromagère, à la réalisation des cuissons ou des différentes analyses a été nettoyée à l'aide d'une solution de RDS 50 à 5% puis rincée successivement trois fois à l'eau distillée, à l'éthanol et à l'acétone avant d'être placée dans une étuve à 150°C pendant au moins 4 heures.
- le système de cuisson a été systématiquement soumis au même protocole de conditionnement. Il n'a cependant pu être placé qu'une heure à l'étuve entre chaque cuisson, afin de pouvoir réaliser les cuissons successives en un temps raisonnable.
- enfin, l'ordre des expériences a été déterminé aléatoirement.

1 Formulation de la matrice fromagère modèle

Le choix de développer une matrice modèle a été retenu suite aux conclusions de l'étude réalisée en système pilote industriel présentée page 107. Les objectifs de cette matrice modèle sont :

- une simplification de l'état initial du système réactionnel (moins de composés volatils présents, à la fois en diversité et en quantité)
- un découplage des opérations unitaires de mélange et de cuisson permettant d'étudier les effets de la cuisson sur un produit de composition constante.
- un travail en système fermé assure un traitement facilité des bilans de matière : puisque aucun ajout ou retrait de matière est effectué, toutes les variations de concentration mesurées sont attribuables uniquement aux réactions se produisant dans la matrice fromagère modèle.

L'approche en système fermé n'est pas possible dans les conditions industrielles, où de l'eau est incorporée au cours des traitements thermiques soit sous forme de vapeur pour chauffer le produit, soit sous forme de liquide pour le refroidir. Dans le protocole de laboratoire, il n'y aura pas d'incorporation d'eau au cours de la cuisson.

1.1 Sélection des ingrédients

Dans le but de minimiser le nombre de composés volatils initialement présents dans la matrice fromagère modèle, nous avons remplacé certains ingrédients par d'autres ingrédients moins transformés. Ainsi, le fromage de Cheddar a été remplacé par des caséines micellaires natives. Ces caséines ont été achetées chez Ingredia (Saint Pol sur Ternoise, France). Le beurre a été substitué par de la matière grasse laitière anhydre en provenance de Campina (Belgique). Le perméat de lait remplace en partie certaines autres poudres de lait et provient de Bel Industries (Vendôme, France). Son mode d'obtention, par ultrafiltration, permet de minimiser les traitements de séchage ultérieurs nécessaires à l'obtention d'un produit sous forme de poudre.

Afin de limiter la variabilité des ingrédients utilisés au cours de ce travail, les différentes poudres ont été conditionnées dans des bouteilles en verre Schott, placées sous atmosphère protectrice d'azote et conservées à l'abri de la lumière à une température de -20°C . La matière grasse laitière a été emballée dans de l'aluminium, placée sous vide et conservée à -80°C .

1.2 Protocole

Les proportions des différents ingrédients ont été ajustées afin d'obtenir un produit à la teneur en matière grasse, en lactose, en matière azotée totale et en eau proche de celles des produits commerciaux.

Plusieurs modes de préparation ont été testés afin d'obtenir, à froid, une texture de produit acceptable. Il s'agit de :

- la préparation d'une formulation contenant fromage et beurre en système pilote discontinu avec un pré-chauffage modéré à 40°C .
- la préparation, à froid, d'une formulation contenant fromage et beurre obtenue par broyage et dispersion de la matière grasse à l'aide d'un ultraturrax T25 Janke and Kunkel (Staufen, Allemagne).
- la préparation, à froid, d'une formulation ne contenant ni fromage ni beurre.

Seul le dernier protocole, retenu pour la suite de l'étude est présenté ici. Il se décompose en deux étapes : l'hydratation des différentes poudres de lait et l'émulsification de la matière grasse. La première étape permet l'action des sels de fonte sur les caséines, ce qui conduit à la déstructuration de la micelle et à la réalisation d'un réseau protéique permettant l'obtention d'un gel. Les mécanismes se produisant au cours de cette étape sont présentés en figure I.5 page 12. Cette étape est nécessaire afin d'assurer la stabilisation des gouttelettes lipidiques par les protéines au cours de l'étape d'émulsification de la matière grasse.

1.2.1 Hydratation des caséines et poudres de lait

Tous les ingrédients à l'exception de la matière grasse laitière anhydre sont mélangés à l'aide d'un ultraturrax à 5000 rpm pendant 2 minutes. Le mélange est ensuite placé à l'obscurité à 4°C pendant 8 heures après avoir pris soin de remplir d'azote l'espace de tête du flacon afin de limiter les phénomènes d'oxydation.

1.2.2 Émulsification de la matière grasse

La matière grasse laitière est ensuite incorporée au mélange préparé précédemment. Le bécher contenant le mélange est placé dans un bain d'eau froide et l'ultraturrax fonctionne alternativement toutes les 10 secondes afin d'éviter un échauffement trop important de la matrice. L'émulsification s'effectue alors selon un barème d'agitation croissant :

- 5 minutes à 8000 rpm
- 3 minutes à 13500 rpm
- 2 minutes à 20500 rpm

De cette manière, la température du produit n'excède pas 40°C. L'ensemble est ensuite placé à l'obscurité sous atmosphère d'azote pendant une nuit au réfrigérateur avant d'être utilisé au cours de la journée suivante pour la réalisation des différentes cuissons.

1.3 Résultats obtenus

1.3.1 Composition de la matrice fromagère modèle

Le résultat final est une matrice fromagère modèle de couleur blanche, de texture uniforme, relativement visqueuse et de composition présentée dans le tableau II.1.

Tab. II.1 – Composition de la matrice fromagère modèle

Composition	[g/100g]
matière azotée totale	11,8
matière grasse	18,6
chlorure de sodium	0,2
lactose	6,1
eau	60
autres constitutants	3,3

1.3.2 Texture de la matrice fromagère modèle

Il nous est apparu souhaitable de s'approcher d'une texture proche de celle d'un produit commercial. En ce qui concerne les réactions d'oxydation, il nous a semblé important de comparer la distribution granulométrique de la matière grasse de la matrice fromagère modèle ainsi obtenue à celle d'un produit de fromage fondu commercial. Pour ce faire, deux méthodes ont été utilisées : la granulométrie laser et la microscopie optique.

1.3.2.1 Granulométrie laser de la matière grasse Une solution tampon contenant 4% de DodécylSulfate de Sodium (SDS), 35 mM d'Acide Ethylène Diamine Tétracétique (EDTA), 0,1 g.L⁻¹ de DiThioThréitol (DTT) et 50 mM d'Imidazole, ajustée à pH 8 au moyen d'une solution d'acide chlorhydrique 10 M est préparée. Un gramme de matrice fromagère est ensuite dilué dans 9 mL de solution tampon et agité à l'aide d'un barreau magnétique à 130 rpm sur une table d'agitation pendant 2 heures. Ce traitement permet de libérer les globules gras en :

- provoquant la dissociation des micelles de caséines suite à la chélation du calcium par l'EDTA.
- dissociant les agrégats protéiques par réduction des ponts disulfures au moyen du DTT.
- évitant la coalescence des globules gras ainsi libérés au moyen du SDS dont les propriétés tensio-actives créent des répulsions entre les globules gras.

La mesure s'effectue ensuite au moyen d'un granulomètre laser Malvern Mastersizer 2000s (Worcestershire, Royaume-Uni) qui grâce à une série de détecteurs optiques permet d'évaluer la taille des particules en les reliant à l'intensité du signal lumineux diffracté par les particules de matière grasse en suspension dans la cuve agitée selon un grand nombre d'angles de diffraction (Michalski *et al.*, 2001). Les distributions granulométriques des globules gras obtenus selon les trois modes de préparation discutés précédemment sont présentées en figure II.1.

Ces résultats montrent que :

- la préparation à froid en système pilote discontinu n'est pas adaptée puisqu'elle conduit à une distribution granulométrique hétérogène et très éloignée de celle du produit commercial (figure II.1, distribution granulométrique 2).
- la préparation à l'ultraturrax conduit à des distributions granulométriques homogènes, mono-modales et avec des diamètres de globules gras un peu plus fins mais du même ordre de grandeur que ceux observés dans le produit commercial (distributions granulométriques 1, 3 et 5).
- la préparation avec fromage conduit à des diamètres de globules gras un peu

plus fins que ceux observés dans la préparation sans fromage. Ceci est probablement lié au meilleur pouvoir émulsifiant des petits peptides davantage présents dans le fromage que dans les caséines natives (distributions granulométriques 3 et 5).

- une cuisson de 5 minutes à 80°C met en évidence un début de coalescence des globules gras. Cette coalescence est liée à l'absence de mécanisme d'agitation dans le système de cuisson de laboratoire (distributions granulométriques 3 et 4).

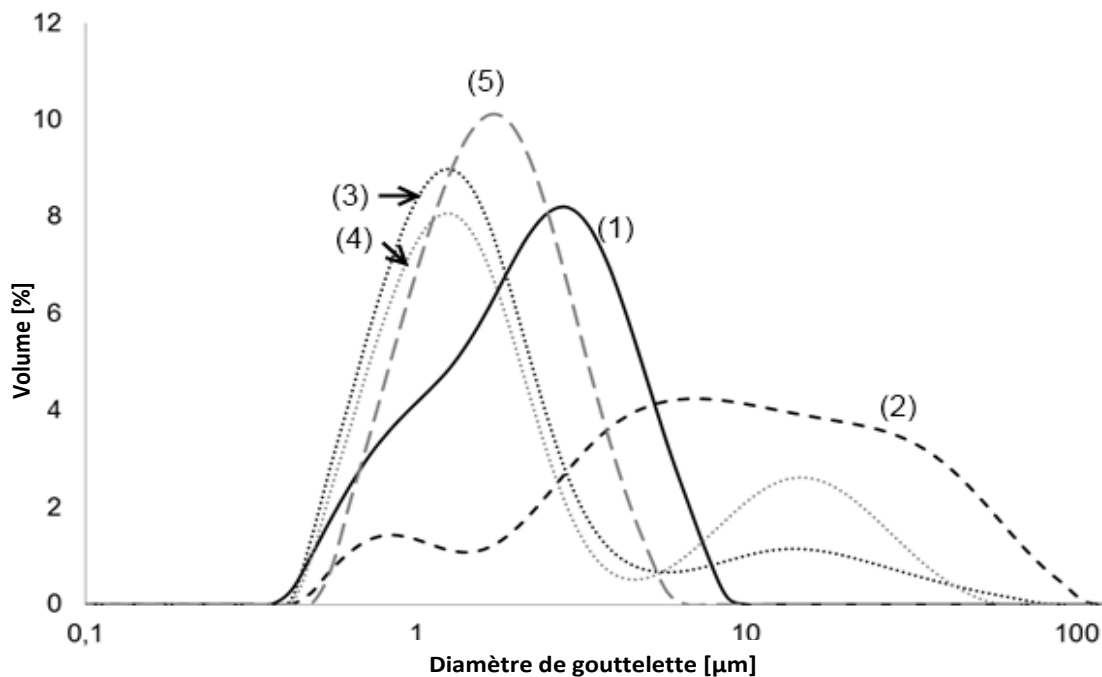


Fig. II.1 – Distributions volumiques des globules gras après 3 modes de préparation de la matrice fromagère modèle, mesurées au granulomètre laser.

(1) : fromage fondu commercial ; (2) : préparation en système pilote discontinu ; (3) : préparation à l'ultraturrax avec fromage ; (4) : préparation à l'ultraturrax avec fromage et cuit pendant 5 minutes à 80°C ; (5) : préparation à l'ultraturrax sans fromage.

Le risque méthodologique principal est de modifier la distribution granulométrique de la matière grasse en ré-émulsifiant les globules gras au cours de la préparation de l'échantillon. Pour vérifier la taille de ces globules gras et observer visuellement leur répartition, nous avons décidé de les croiser avec des observations de microscopie optique.

1.3.2.2 Microscopie optique L'échantillon de fromage fondu est cryo-fixé pendant 30 secondes dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide. Des coupes d'une épaisseur de 10 μm sont ensuite réalisées. La coloration des lipides est effectuée au rouge « Nile-red ». L'observation de la matrice fromagère modèle crue, présentée

en figure II.2, présente une distribution granulométrique modèle relativement plus hétérogène que celle du produit commercial.

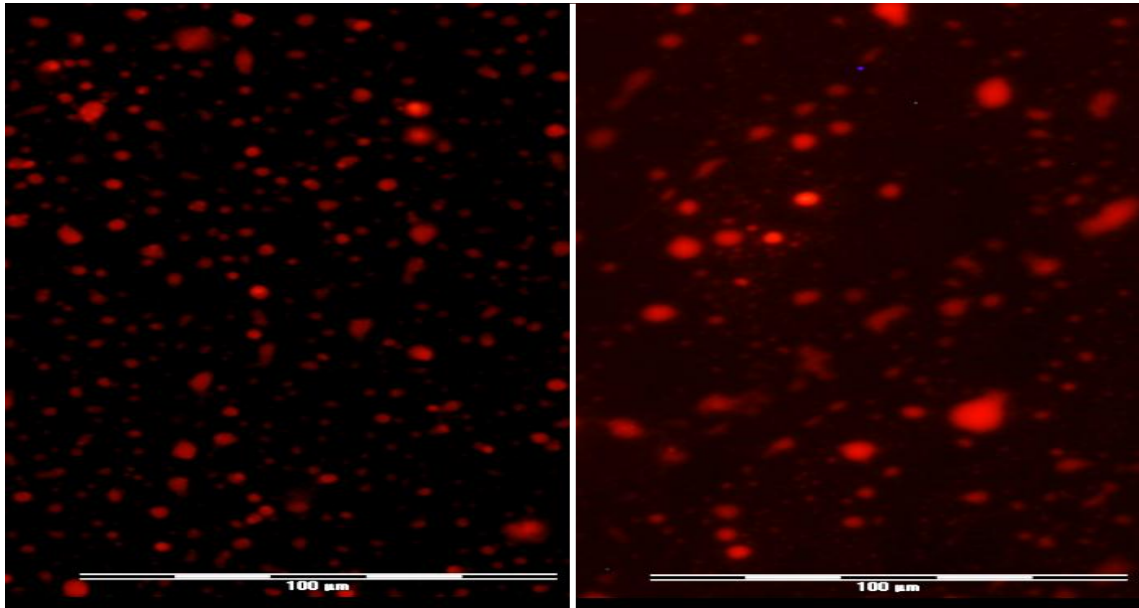


Fig. II.2 – Vue au microscope optique des globules gras, d'un fromage fondu commercial (à gauche) et de la matrice fromagère modèle crue (à droite).

Le ratio entre la phase lipidique et la phase aqueuse a été déterminé par analyse d'image au moyen de la toolbox Image Processing 7 de Matlab[®]. La connaissance du volume de la matière grasse émulsionnée et l'approximation de la géométrie des globules gras à des sphères, rend possible le calcul d'un diamètre moyen équivalent. Ce diamètre est de l'ordre de $2,5 \mu\text{m}$ pour le produit commercial contre $4,5 \mu\text{m}$ environ pour la formulation modèle crue. Les analyses de microscopie optique confirment donc l'ordre de grandeur des diamètres moyens des globules gras. Ils n'ont donc pas été ré-émulsionnés au cours de la préparation des échantillons pour la mesure de la granulométrie laser.

Le protocole de préparation de la matrice fromagère modèle crue permet donc d'obtenir une granulométrie de matière grasse, un peu plus grossière mais s'approchant de celle d'un produit commercial. Cependant, son évolution au cours de la cuisson s'effectue en sens inverse de celle du produit commercial. En effet, dans le cas du produit commercial l'émulsification est réalisée de manière simultanée à la cuisson. En revanche dans le cas de la formulation modèle, l'absence de mécanismes d'agitation au sein du système de cuisson de laboratoire conduit à la coalescence des globules gras. Ceci est susceptible de modifier les réactions d'oxydation des lipides et ainsi affecter la transposition des résultats issus des études en laboratoire vers le pilote industriel.

1.3.3 Évolution des globules gras au cours de la cuisson

Dans le procédé industriel, le produit est maintenu sous une agitation constante au cours des traitements et une émulsion est progressivement réalisée. Dans le cas du système modèle, l'émulsification est réalisée avant la cuisson et il n'y a pas d'agitation mécanique possible au cours de la cuisson. Il nous a semblé nécessaire d'évaluer la stabilité de la phase lipidique au cours de la cuisson, afin de vérifier que la matrice fromagère modèle, reste de ce point de vue représentative d'une matrice réelle.

La figure II.3 représente l'évolution de la surface interfaciale entre les globules gras et la phase aqueuse estimée à partir des mesures de granulométrie laser au cours des cuissons effectuées aux différentes températures.

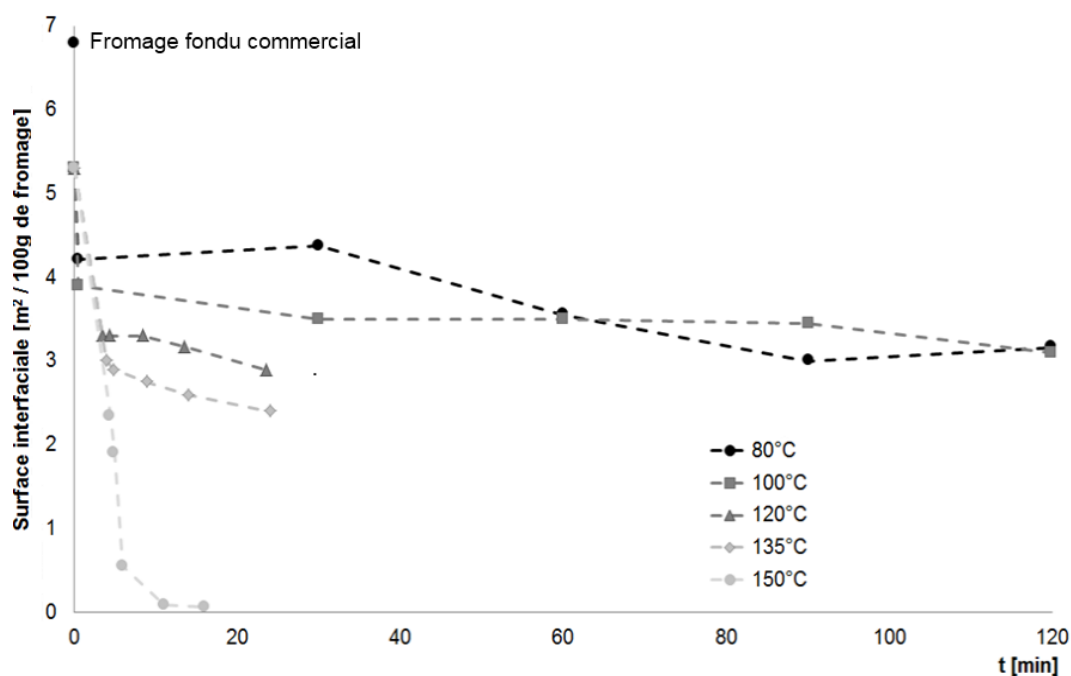


Fig. II.3 – Evolution de la surface interfaciale entre les globules gras et la phase aqueuse au cours de la cuisson de la matrice fromagère modèle. Les valeurs sont estimées à partir des mesures de granulométrie laser

Il apparaît une diminution très importante de cette surface interfaciale pour les traitements à haute température, et en particulier à 150°C. Cette diminution est liée à la coalescence des globules gras lors des traitements thermiques. Cette observation traduit un biais existant entre le système industriel et le modèle de laboratoire. Ce biais pourrait entraîner éventuellement des différences en particulier en ce qui concerne les réactions d'oxydation des lipides.

Cependant, la durée d'exposition de la matrice fromagère à ces températures (140 à 150°C) au cours des traitements industriels est très réduite, de l'ordre de quelques secondes. De plus, la solubilité de l'oxygène diminue fortement avec la température

et est inférieure à $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ dans l'eau à partir de 100°C (Benson et Krause, 1984). La teneur en oxygène dissous dans la matrice fromagère modèle au cours des traitements à haute température devrait normalement être très faible. Il ne devrait donc pas y avoir d'oxydation des lipides à ces températures, ou très peu.

Dans ces conditions, nous avons considéré que la matrice fromagère simplifiée est un bon modèle d'étude, représentatif d'une matrice réelle. Dans le cas de l'étude de l'oxydation des lipides au cours des traitements thermiques extrêmes (supérieurs à 135°C), il conviendra une interprétation prudente des résultats. Dans le cas, où l'on souhaiterait prendre en compte la coalescence des globules gras au cours des traitements thermiques, il devrait être possible d'introduire un modèle de diffusion de l'oxygène de la phase aqueuse vers la phase lipidique qui intégrerait l'évolution de la surface interfaciale. Il existe en effet dans la littérature des valeurs de diffusivité de l'oxygène dans l'huile ($0,78 - 1,06 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ à 20°C) et dans l'eau ($2,48 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ à 20°C). Cependant, la diffusivité de l'oxygène est variable selon la nature de l'huile et les éventuelles insaturations (Pénicaud *et al.*, 2010). Il s'agit donc d'une démarche complexe pour laquelle les incertitudes sur les valeurs de diffusivité de l'oxygène restent importantes. Pour cette raison, ces corrections n'ont pas été effectuées dans le cadre de ce travail.

1.3.4 Simplification de la fraction volatile initiale

Les analyses de chromatographie bidimensionnelle, présentées en figure II.4, montrent un signal analytique épuré pour la matrice fromagère modèle crue par rapport aux analyses réalisées sur les produits fabriqués en pilote industriel.

Ainsi, l'intégration automatique des chromatogrammes obtenus par le logiciel Chromatof[®] met en évidence environ 40% de composés volatils en moins dans la matrice fromagère modèle par rapport aux formulations pilotes. De plus, l'étude détaillée de ces chromatogrammes montre que la teneur de certains des composés d'intérêt pour l'étude des réactions de Maillard ou d'oxydation des lipides dans le mélange des matières premières était, dans le cas des produits pilotes, suffisamment élevée pour que le signal obtenu par spectrométrie de masse soit saturé. Ceci s'explique car le fromage fondu est élaboré à partir de produits déjà transformés comme les poudres de lait et le fromage de Cheddar par exemple. Dans de telles conditions, il devient extrêmement difficile de mettre en évidence une augmentation de la teneur de ces composés au cours des traitements thermiques subis par la matrice. La nouvelle formulation permet ainsi de mieux suivre leurs évolutions au cours des traitements.

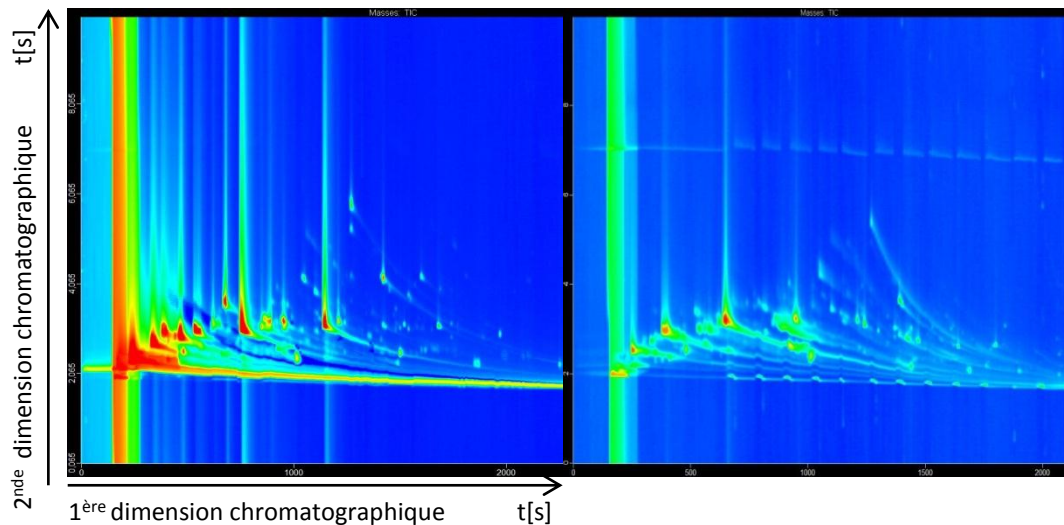


Fig. II.4 – Profils chromatographiques obtenus au cours de l’analyse d’une matrice fromagère pilote (à gauche) et modèle (à droite) ayant subi un traitement thermique comparable. L’intensité du pic chromatographique est représentée selon une échelle de couleur autoadaptative allant de bleu (pas de signal) à rouge (intensité maximale)

2 Développement du système de cuisson

2.1 Présentation des objectifs

L’un des objectifs expérimentaux de ce travail de thèse, est de déterminer les valeurs des constantes de vitesse des différentes cinétiques réactionnelles. Pour ce faire, une tentative de découplage des opérations de transfert de chaleur vis à vis des cinétiques réactionnelles a été entreprise. Ainsi, un système adapté à la cuisson d’une faible quantité de fromage en couche mince a été développé. Idéalement, la matrice fromagère modèle pourrait alors être considérée comme un volume élémentaire dV soumis en tout point aux mêmes conditions de température et de pression. Une attention particulière a été apportée pour assurer des cinétiques de montée en température et de refroidissement les plus rapides possibles afin que le traitement thermique puisse être assimilé à un signal créneau. Dans ce cas, l’inertie de chauffage et de refroidissement sur la variation des teneurs des différents constituants mesurés sera négligeable par rapport à l’effet du plateau de température étudié. Ceci permettra un accès expérimental aux valeurs des constantes de vitesse de réaction à la température du plateau considéré.

2.2 Système de cuisson initial

Ce système est présenté en figure II.5. Il permet de porter 2 grammes de matrice fromagère à une température de 120°C en 35 secondes. La température était enre-

gistrée au moyen d'un thermocouple placé au centre de la couche mince de fromage.

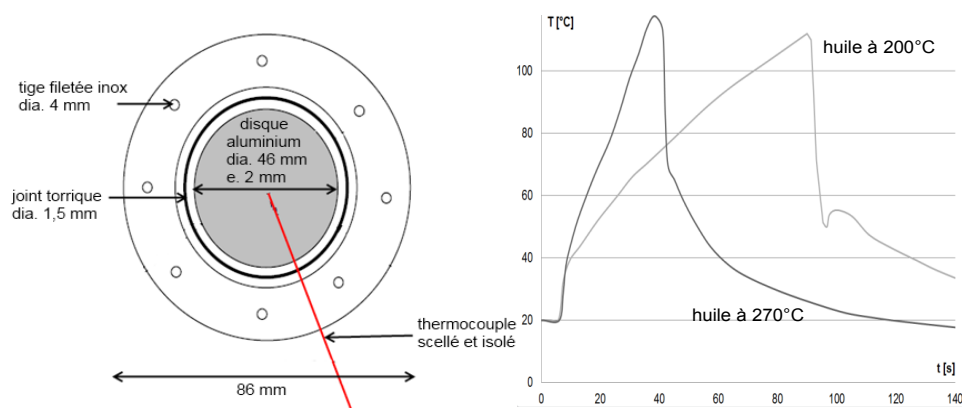


Fig. II.5 – Schéma du premier système de cuisson de la matrice fromagère modèle en bain d'huile et cinétiques de montée en température obtenues pour une température d'huile de 200°C (en gris) et 270°C (en noir).

Cependant, la masse de fromage cuite s'est avérée insuffisante pour réaliser l'ensemble des dosages nécessaires. La zone d'insertion du thermocouple s'est révélée très fragile, nécessitant un changement très fréquent de ce thermocouple et induisant une perte d'étanchéité du système pour des températures supérieures à 120°C. Enfin, l'huile et le joint torique en polymère élastique se sont révélés des sources redoutables de contamination de la fraction volatile au cours des différentes cuissons. De surcroît, le joint torique s'est avéré piéger les composés volatils au cours du refroidissement du système pour les relarguer dans le fromage au cours de la cuisson suivante. Dans ces conditions, le changement de joint devait alors être systématique. Ceci est visible sur les chromatogrammes présentés sur la figure II.6.

Avec une telle contamination, toute identification des composés volatils formés au cours de la cuisson de la matrice fromagère modèle était impossible.

2.3 Améliorations apportées au système de cuisson

2.3.1 Définition du cahier des charges

Le nouveau système de cuisson a été conçu de façon à répondre à des contraintes thermiques ou liées à l'analyse des différents composés et en particulier des composés volatils. Les contraintes thermiques identifiées sont les suivantes :

- traiter une quantité de fromage d'au moins 10 grammes, afin de permettre la réalisation des différentes analyses.

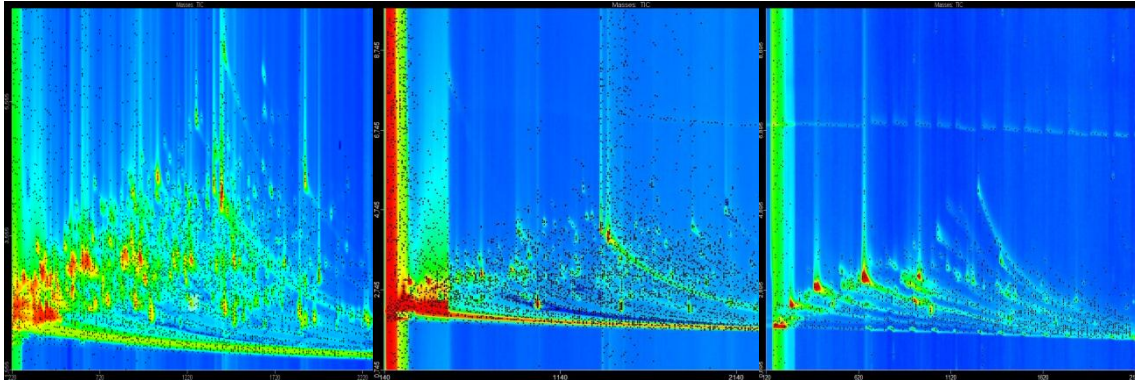


Fig. II.6 – Chromatogrammes obtenus après la contamination de la matrice fromagère crue par 10 μL d’huile de cuisson (à gauche) ou par contact avec le joint torique (au centre). Le chromatogramme de la matrice fromagère crue est présenté à droite.

- atteindre le plus rapidement possible une température comprise entre 80 et 150°C, sans incorporation d’eau qui entraînerait une dilution des constituants et rendrait plus difficile les bilans de matière nécessaires à la modélisation cinétique. Cette gamme de température correspond aux températures rencontrées dans les différentes installations industrielles (figure I.8 page 15).
- permettre le maintien de cette température pendant une durée déterminée.
- assurer un refroidissement rapide afin de stopper quasi-instantanément les réactions.

Une attention particulière a été portée sur les contraintes liées aux composés volatils :

- le système doit être parfaitement étanche afin d’assurer la conservation de la totalité de la fraction volatile dans l’échantillon. En effet, au cours des refroidissements de type flash, pratiqués dans certains procédés industriels, une fraction de l’eau du produit est évaporée, ce qui est susceptible de provoquer une extraction préférentielle d’une partie des composés volatils hors de la matrice.
- le fluide caloporteur utilisé ne doit pas être susceptible de contaminer la fraction volatile.
- La cellule de cuisson (en contact avec la matrice fromagère) doit être complètement lavable et étuvable, afin de ne pas induire de contaminations entre les cuissons successives.
- L’échantillon de fromage ne doit pas être contaminé par des composés volatils issus de la gaine du thermocouple, ou de la colle utilisée pour sa fixation.

2.3.2 Présentation du système de cuisson

Le système de cuisson est constitué de deux parties. Il s'agit d'une cellule de cuisson fonctionnant en système fermé, destinée à recevoir la matrice fromagère modèle et d'un banc de cuisson instrumenté constitué d'un jet de vapeur surchauffée et d'un jet d'air sec utilisés respectivement pour chauffer et maintenir le fromage à la température désirée. Les deux parties sont représentées sur la figure II.7.

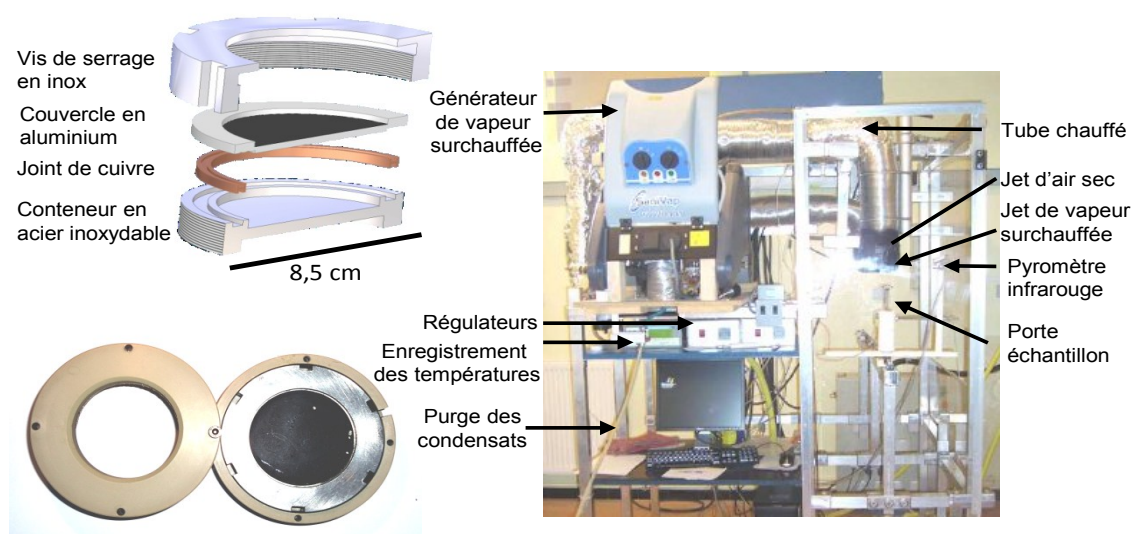


Fig. II.7 – Système de cuisson de la matrice fromagère modèle constitué d'une cellule de cuisson (à gauche en haut) placée dans un support isolant (à gauche en bas) et d'un banc de cuisson instrumenté (à droite).

Kondjoyan et Portanguen (2008) donnent une description détaillée des performances du banc de vapeur. Les matériaux utilisés pour la conception de la cellule de cuisson (acier inoxydable, aluminium, joint de cuivre) ont été choisis afin de ne pas contaminer la matrice fromagère au cours des traitements thermiques et de permettre un nettoyage aisé entre deux cuissons successives. Le « design » de la cellule de cuisson est tel que le joint de cuivre ne se retrouve pas en contact direct avec la matrice fromagère. En revanche, ce n'est pas le cas du couvercle en aluminium. Bien qu'il puisse promouvoir l'oxydation des lipides, il a tout de même été conservé afin de garantir un transfert thermique efficace. L'huile précédemment utilisée comme fluide caloporteur a été remplacée par les jets de vapeur surchauffée et d'air sec. En effet, elle était susceptible de contaminer la matrice fromagère lors de l'ouverture de la cellule de cuisson. De plus son élimination avant la cuisson suivante s'avérait extrêmement difficile. Afin de ne pas contaminer l'échantillon de fromage par des

composés issus de la gaine du thermocouple ou de la colle utilisée pour sa fixation, deux cellules de cuisson distinctes ont été construites. La première, équipée d'un thermocouple a permis l'identification des conditions opératoires qui ont été utilisées ultérieurement avec la cellule sans thermocouple.

Neuf grammes de fromage exactement ont été placés au centre de la cellule de cuisson et un système de vis de purge permettait d'éliminer l'excédent de fromage au cours de la fermeture de la cellule. Ceci garantissait le meilleur contact possible entre le couvercle d'aluminium et la matrice fromagère.

Les traitements thermiques aux températures inférieures ou égales à 100°C ont été réalisés en bains thermostatés. Les traitements thermiques aux températures supérieures à 100°C ont été réalisés à la seconde près en 5 étapes successives. Le déroulement d'un traitement thermique type est représenté sur la figure II.8.

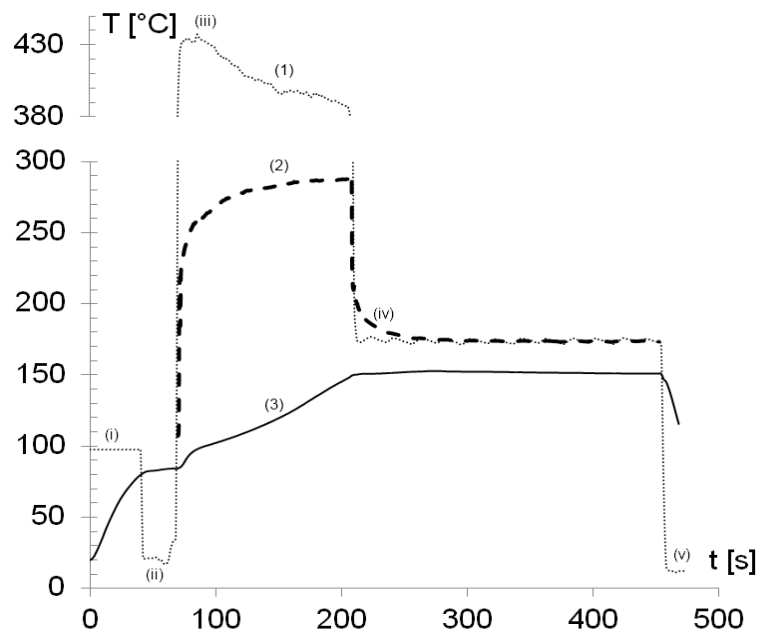


Fig. II.8 – Enregistrement des températures au cours d'une cuisson de la matrice fromagère modèle à 150°C. Les températures mesurées sont : (1) : température de jet ; (2) : température de surface du couvercle de la cellule de cuisson mesurée par le pyromètre infrarouge ; (3) : température au centre de la matrice fromagère modèle. Les 5 étapes du traitement thermique sont : (i) : traitement en bain d'eau bouillante ; (ii) : transfert vers le banc de vapeur ; (iii) : traitement sous le jet de vapeur ; (iv) : traitement sous le jet d'air sec ; (v) : refroidissement.

- (i) la cellule était immergée dans un bain d'eau bouillante pendant 40 secondes,
- (ii) elle était alors retirée du bain d'eau bouillante, séchée, placée dans son support isolant en PEEK (PolyEtherEtherKétone) et positionnée sous le jet de vapeur surchauffée en 30 secondes exactement,
- (iii) elle était soumise au jet de vapeur surchauffée,

- (iv) elle était maintenue à la température de plateau sous le jet d'air sec,
- (v) et était enfin refroidie dans un bain d'eau glacée

La durée de traitement sous les jets de vapeur et d'air sec, ainsi que la température de consigne du jet d'air sec dépendent du traitement thermique à appliquer. Ces conditions ont été déterminées expérimentalement à l'aide de la cellule de cuisson équipée d'un thermocouple et sont présentées dans le tableau II.2.

Tab. II.2 – Durées de traitement sous le jet de vapeur surchauffée et températures de consigne du jet d'air sec à appliquer pour la réalisation des différents barèmes thermiques. La température de vapeur surchauffée de consigne étant fixée à la valeur de 550°C et la distance du système de cuisson à la buse du jet de vapeur fixée à 36 mm.

Température de plateau cible [°C]	Durée de traitement sous le jet de vapeur [s]	Température de consigne du jet d'air sec [°C]
120	80	150
135	110	175
150	140	220

Les températures opératoires : température du bain d'eau bouillante, du jet de vapeur et du jet d'air sec ont été enregistrées au moyen de thermocouples de type K. La température à la surface du couvercle de la cellule de cuisson était suivie par pyrométrie infrarouge.

2.4 Performances thermiques et étude de sensibilité du système de cuisson aux différents paramètres

Il nous a semblé souhaitable de caractériser les performances du système de cuisson en ce qui concerne :

- l'inertie de la cellule de cuisson, c'est à dire la capacité du système à réchauffer et refroidir la matrice fromagère modèle aussi rapidement que possible.
- la répétabilité des traitements thermiques entre les cuissons successives.
- l'homogénéité du traitement thermique au sein de la couche mince de fromage.

Nous avons eu recours à la fois à une évaluation expérimentale et numérique de l'effet de certains des paramètres du système de cuisson.

2.4.1 Performances thermiques du système

La cinétique de montée en température la plus rapide obtenue, présentée en figure II.8, permet de passer de 20 à 150°C en 210 secondes, dont 140 secondes à des températures supérieures à 80°C. Le système de cuisson développé permet donc de réaliser des cinétiques de montée en température plus rapides que celles des systèmes pilotes discontinus.

Le refroidissement en bain de glace permet quant à lui de refroidir la matrice fromagère modèle de 150 à 80°C en 5 secondes environ et à 20°C en 40 secondes.

Dans ces conditions, il a été considéré que la période de refroidissement (5 secondes à des températures supérieures à 80°C) était suffisamment courte par rapport à la durée des plateaux (de 1 à 30 minutes) pour considérer son effet sur les réactions comme négligeable. En revanche, ce n'est pas le cas de la période de montée en température (2 minutes et 10 secondes à des températures supérieures à 80°C). Cette dernière devra donc être prise en considération lors de la détermination des valeurs des constantes de vitesse aux températures de plateau les plus élevées, au risque de les sous-estimer.

2.4.2 Étude expérimentale de la sensibilité aux différents paramètres

Dans le cas des traitements aux températures inférieures à 100°C, le contrôle de la température du bain thermostaté, le contrôle du niveau d'eau et de l'ébullition du bain d'eau bouillante ainsi que le contrôle de la durée des traitements assure une température de la matrice fromagère reproductible à $\pm 1^\circ\text{C}$. Dans le cas des traitements aux températures supérieures, il convient en outre de s'assurer de la température des différents jets, ainsi que du positionnement de la cellule de cuisson sous ces derniers. Dans le cadre de nos expériences, la température de contrôle du tube surchauffant la vapeur était fixée à 550°C.

2.4.2.1 Effet de la distance de la cellule de cuisson au jet de vapeur Le jet de vapeur se refroidit en se mélangeant à l'air ambiant au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la buse. De plus l'hétérogénéité au sein du jet de vapeur tend alors à augmenter. Cette étude ne peut être effectuée numériquement car elle nécessiterait des informations complémentaires sur la dispersion du jet de vapeur à la sortie de la buse. La figure II.9 représente l'effet d'une variation de la distance entre la buse de vapeur surchauffée et la cellule de cuisson sur la température mesurée au centre de la matrice fromagère modèle.

Une augmentation de 1 mm de la distance entre la sortie du jet de vapeur et la surface de la cellule de cuisson entraîne une diminution moyenne de 1°C de la température au centre de la matrice fromagère modèle en fin de traitement. Afin d'assurer la répétabilité du traitement thermique, une cale de 36 mm de hauteur a été réalisée. Elle permet de contrôler la distance entre le jet de vapeur et la cellule de cuisson tout en assurant la température de jet la plus élevée possible et le moyen de mesurer la température de surface de la cellule de cuisson par pyrométrie infrarouge.

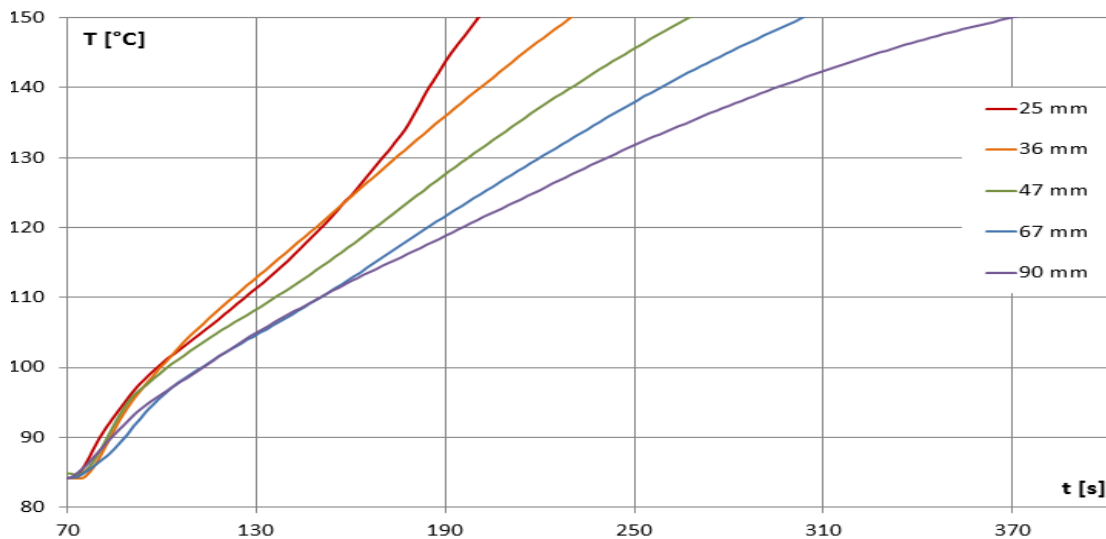


Fig. II.9 – Effet de la distance entre la surface de la cellule de cuisson et la buse du jet de vapeur sur la température mesurée au centre de la matrice fromagère.

2.4.2.2 Contrôle de la température de la cellule de cuisson La température du jet de vapeur varie malgré le contrôle précis de la température du tube. Ceci est lié à des variations de la température interne du tube occasionnées par la présence de condensats. Afin de s'assurer de la répétabilité des expériences, la température du jet arrivant sur l'échantillon et celle du couvercle de la cellule de cuisson étaient mesurées tout au long de l'expérience par une sonde de température de type K et un pyromètre infrarouge respectivement. Ces contrôles étaient d'autant plus importants que la cellule de cuisson utilisée pour chauffer la matrice fromagère n'était pas équipée d'un thermocouple en raison des risques de contamination de la matrice par des composés volatils issus de la gaine du thermocouple ou de la colle ayant servi à fixer ce dernier. Le couvercle de la cellule de cuisson était peint en noir mat afin que son émissivité soit maximale. La calibration du pyromètre a été effectuée sous les jets de vapeur et d'air sec en comparant à l'équilibre, les valeurs des températures mesurées à la surface de la cellule de cuisson par le pyromètre à celles obtenues à partir d'un thermocouple de type K placé au contact de la surface et isolé. Les résultats sont présentés sur la figure II.10. Grâce à ces étalonnages, la température en surface du couvercle de la cellule de cuisson a pu être déterminée au cours des expériences ultérieures avec une incertitude de $\pm 6^\circ\text{C}$. Le pyromètre infrarouge effectuant une mesure moyenne sur un spot de 2 cm de diamètre, un pointeur laser permettait de localiser ce spot au centre du couvercle de la cellule de cuisson. Ceci s'est avéré très important compte tenu des fortes hétérogénéités de température existantes au sein du jet de vapeur surchauffée et pouvant entraîner des erreurs de mesure de l'ordre de 25 à 30°C.

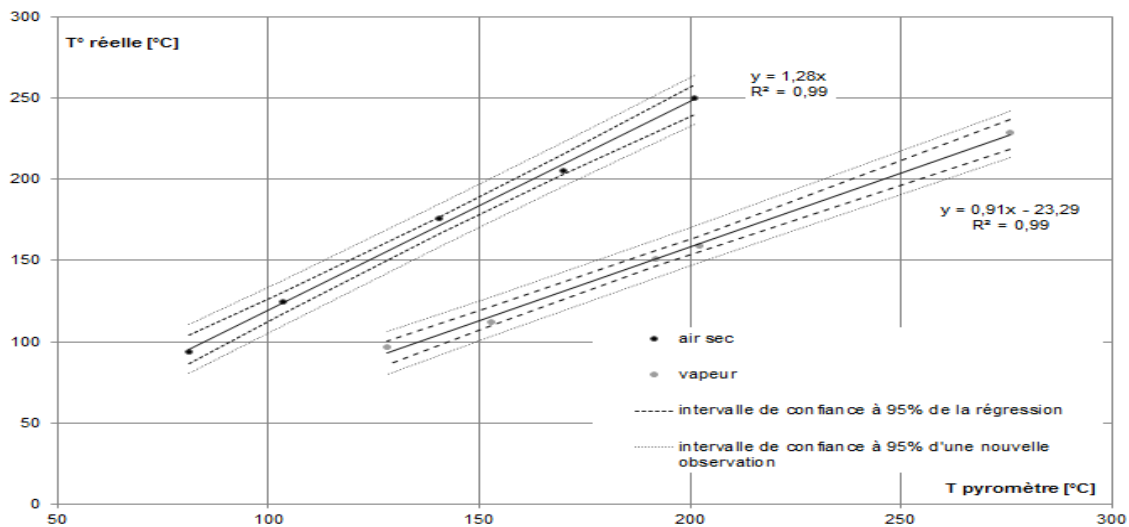


Fig. II.10 – Droites de calibration du pyromètre infrarouge sous les jets d'air sec et de vapeur surchauffée.

2.4.3 Évaluation par simulation numérique de l'homogénéité et de la répétabilité des traitements thermiques.

Étant donné que la cellule est fermée, sous pression et qu'elle ne contient qu'une couche mince de produit, il est difficile de mesurer l'homogénéité du traitement thermique et d'observer l'effet d'une variation des conditions expérimentales sur l'évolution de la température au sein de la matrice fromagère. La simulation numérique a donc été utilisée comme une tentative d'accès à ces données difficiles à mesurer.

2.4.3.1 Partie 1 : Développement du modèle Le problème consiste à déterminer les transferts de chaleur par conduction dans un matériau composite soumis à des conditions aux limites variables sur ses faces supérieures et inférieures. Ces conditions aux limites sont données par les températures relevées expérimentalement. Étant donné l'incertitude existante sur la mesure de la température de surface du couvercle de la cellule de cuisson lors de son traitement sous le jet de vapeur, nous avons préféré utiliser directement la température du jet de vapeur dans le cadre de la simulation numérique. Les propriétés de symétrie axiale de la cellule de cuisson ont permis de travailler sur un système à deux dimensions seulement. La géométrie du système est représentée en figure II.11. Les contacts entre les différents matériaux ont été considérés comme parfaits. L'échauffement de la matrice fromagère modèle conduit certainement à des mouvements convectifs à l'intérieur de la cellule de cuisson. Ils n'ont pas été pris en compte. Les valeurs des propriétés thermo-physiques de la matrice fromagère ne sont donc que des valeurs apparentes qui intègrent ces phénomènes complexes.

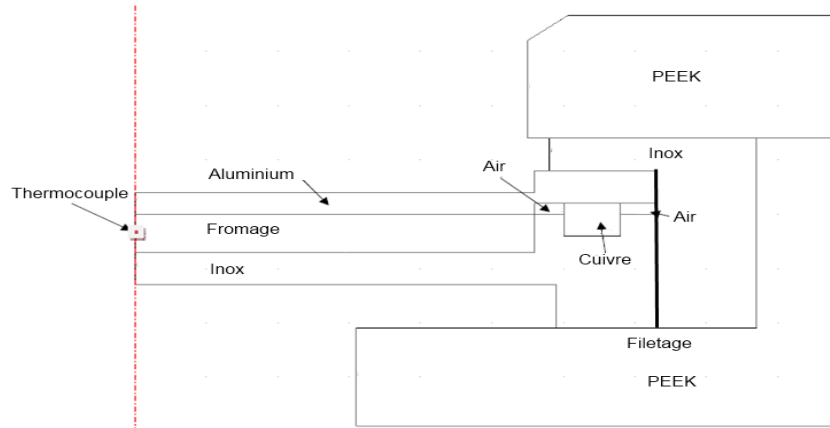


Fig. II.11 – Demi-coupe de la cellule de cuisson modélisée en symétrie axiale

2.4.3.1.1 Propriétés thermo-physiques des différents matériaux Les propriétés thermo-physiques des matériaux sont issues de la littérature (Geankopolis, 2003) et ont été implémentées dans les bases de données du logiciel Comsol Multiphysics version 3.4. Elles sont données dans le tableau II.3. La masse volumique du fromage fondu (ρ) a été mesurée expérimentalement, alors que les valeurs de sa conductivité thermique (λ) et de sa capacité calorifique massique à pression constante (C_p) ont été ajustées numériquement.

Tab. II.3 – Propriétés thermo-physiques des différents matériaux. *Les valeurs en italiques sont des estimations*

	$\lambda [W \cdot m^{-1} \cdot K^{-1}]$	$\rho [kg \cdot m^{-3}]$	$C_p [J \cdot kg^{-1} \cdot K^{-1}]$
Aluminium	200	270	900
Inox	17	7820	460
Cuivre	386	8950	385
Air	f(T)	f(T)	f(T)
PEEK	0,25	1320	1340
Fromage	<i>0.6</i>	1023	<i>3800</i>

2.4.3.1.2 Coefficients de transfert thermiques considérés Les coefficients de transfert sont caractéristiques de l'étape de traitement considérée. Ils représentent successivement :

- de la convection forcée en bain d'eau bouillante (étape 1 caractérisée par un coefficient de transfert h_1).
- de la convection libre dans l'air lors de la phase de transfert du système de cuisson du bain d'eau bouillante vers le banc thermique (étape 2 caractérisée par un coefficient de transfert h_2).

- de la convection forcée lors du traitement par les différents jets (étape 3 caractérisée par un coefficient de transfert h_3).

La valeur du coefficient de transfert h_1 , correspondant au traitement dans le bain d'eau bouillante, a été évaluée à l'aide d'un cylindre d'aluminium de taille comparable à celle de la cellule de cuisson. La valeur obtenue de $2000 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{K}^{-1}$ correspond aux valeurs les plus faibles citées par la littérature pour les coefficients de transfert en régime d'ébullition. Les valeurs de h_2 et h_3 ont été ajustées numériquement. On obtient $55 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{K}^{-1}$ pour h_2 et $135 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{K}^{-1}$ pour h_3 . Afin d'éviter que le traitement sous le jet de vapeur surchauffée ne serve d'abord à évaporer l'eau résiduelle restant sur le montage avant de le réchauffer, ce dernier est méticuleusement essuyé. Ceci explique une valeur apparente de h_2 relativement élevée par rapport aux données de la littérature pour de la convection libre dans l'air. En effet, cette valeur apparente prend en compte également un petit transfert thermique par conduction au moment où la cellule est séchée. La valeur de h_3 correspond aux valeurs déjà mesurées pour d'autres produits soumis au jet de vapeur surchauffée (Kondjoyan et Portanguen, 2008).

2.4.3.1.3 Résolution numérique La résolution numérique a été effectuée en intégrant numériquement la loi de Fourier à l'aide de la méthode de Newton (méthode de résolution par éléments finis) au moyen du logiciel Comsol Multiphysics® version 3.4.

2.4.3.2 Partie 2 : Etude de sensibilité aux différents paramètres du modèle Une étude de sensibilité a été effectuée par rapport à la valeur des différents paramètres du modèle. Elle est présentée en figure II.12. Nous avons étudié en particulier les effets dus aux variations de la conductivité thermique du fromage, des coefficients de transfert thermique en bain d'eau bouillante et sous le jet de vapeur et de la température de la vapeur surchauffée impactant la surface de la cellule de cuisson.

2.4.3.2.1 Effet de la conductivité thermique du fromage (λ_{fromage}) Une variation de la conductivité thermique du fromage ne conduit qu'à une faible variation de la température simulée au centre de la matrice fromagère.

2.4.3.2.2 Effet des coefficients de transfert thermique (h_1 et h_3) Le doublement de la valeur mesurée au moyen du cylindre d'aluminium pour le coefficient de transfert thermique h_1 entraîne une augmentation de 4°C à l'issue du

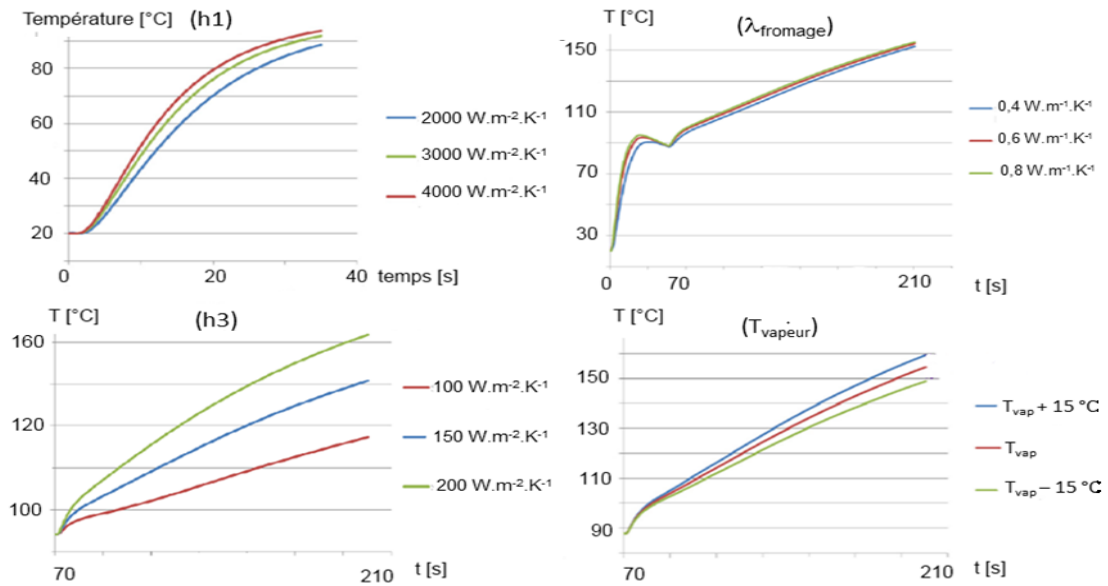


Fig. II.12 – Etude de sensibilité des paramètres du modèle thermique
(h1) Effet d'une variation du coefficient de transfert thermique $h1$ sur la cinétique de montée en température dans le bain d'eau bouillante.
(h3) Effet d'une variation du coefficient de transfert thermique $h3$ sur la cinétique de montée en température lors du traitement sous le jet de vapeur.
($λ$) Effet d'une variation de la conductivité thermique apparente de la matrice fromagère $λ$ sur la cinétique de montée en température au cours de la cuisson.
(T_{vap}) Effet d'une variation de $15°C$ de la température du jet de vapeur surchauffée sur la cinétique de montée en température lors du traitement sous le jet de vapeur.

traitement en bain d'eau bouillante. La variation du coefficient de transfert $h3$ induit des variations très importantes (de l'ordre de $15°C$) de la température mesurée à cœur de la matrice fromagère en fin de traitement sous le jet de vapeur. Il s'agit donc d'un des paramètres critiques.

2.4.3.2.3 Effet de la température du jet de vapeur Une variation de $±15°C$ de la température du jet de vapeur induit une variation de $±5°C$ de la température estimée par le modèle au centre de la matrice fromagère à la fin du traitement sous le jet de vapeur.

2.4.3.3 Partie 3 : Utilisation de la simulation pour la caractérisation du fonctionnement du système de cuisson Le modèle et les valeurs des paramètres discutés précédemment permettent de représenter l'évolution de la température au centre de la matrice fromagère. Il est alors possible d'utiliser ce modèle pour mieux comprendre les effets de certains paramètres opératoires sur le fonctionnement du système de cuisson.

2.4.3.3.1 Effet de la durée des différentes étapes de traitement thermique Des variations de la durée des différentes étapes du traitement thermique ont été introduites dans le modèle. Les résultats obtenus montrent que l'écart de température observé sur la température finale de cuisson reste inférieur à 1°C lorsque ces variations ne dépassent pas 2 à 3 secondes. Un bon chronométrage de ces étapes par l'opérateur permet donc d'assurer la répétabilité du traitement.

2.4.3.3.2 Effet des coefficients de transfert thermique La faible influence du coefficient de transfert thermique h_1 suggère que le traitement en bain d'eau bouillante est répétable à condition de surveiller le niveau et l'ébullition de l'eau du bain.

En revanche, les résultats présentent une grande sensibilité à la valeur du coefficient de transfert thermique h_3 . Ceci justifie les précautions prises pour contrôler la température du tube surchauffant la vapeur, limiter la présence de condensats dans le tube, contrôler la distance entre la cellule de cuisson et la buse du jet de vapeur et le positionnement de la cellule de cuisson à l'aplomb du jet de vapeur.

2.4.3.3.3 Effet de la température du jet de vapeur (T_{vap}) Malgré ces précautions, les variations de la température interne du tube de surchauffe de la vapeur, combinées à la présence de condensats peuvent conduire expérimentalement à des variations de $\pm 15^\circ\text{C}$ de la température du jet de vapeur surchauffée impactant la cellule de cuisson. Une telle variation implique une variation de $\pm 5^\circ\text{C}$ sur la température au centre de la matrice fromagère à la fin du traitement sous le jet de vapeur. Le contrôle de la température du jet et de celle du couvercle de cuisson permettent d'annuler et de recommencer l'expérience au cas où la variation observée serait trop importante.

2.4.3.4 Partie 4 : Evaluation de l'homogénéité du traitement thermique

Le modèle permet d'évaluer l'homogénéité de la température au cours du traitement thermique au sein de la couche mince de fromage. Cette homogénéité est représentée en figure II.13. En considérant que le transfert thermique dans la matrice est uniquement conductif, on constate un écart maximal entre la température du fromage en contact avec la face supérieure de la cellule de cuisson et la température du fromage en contact avec la face inférieure est de l'ordre de 15°C. Cependant, dans la pratique, les hétérogénéités sont certainement réduites en raison de l'existence de mouvements convectifs dans la matrice qui tendent à homogénéiser la température au sein du produit. Lors du maintien de la température de 150°C sous le jet d'air sec, cet écart se réduit à 5°C au bout de 5 minutes environ.

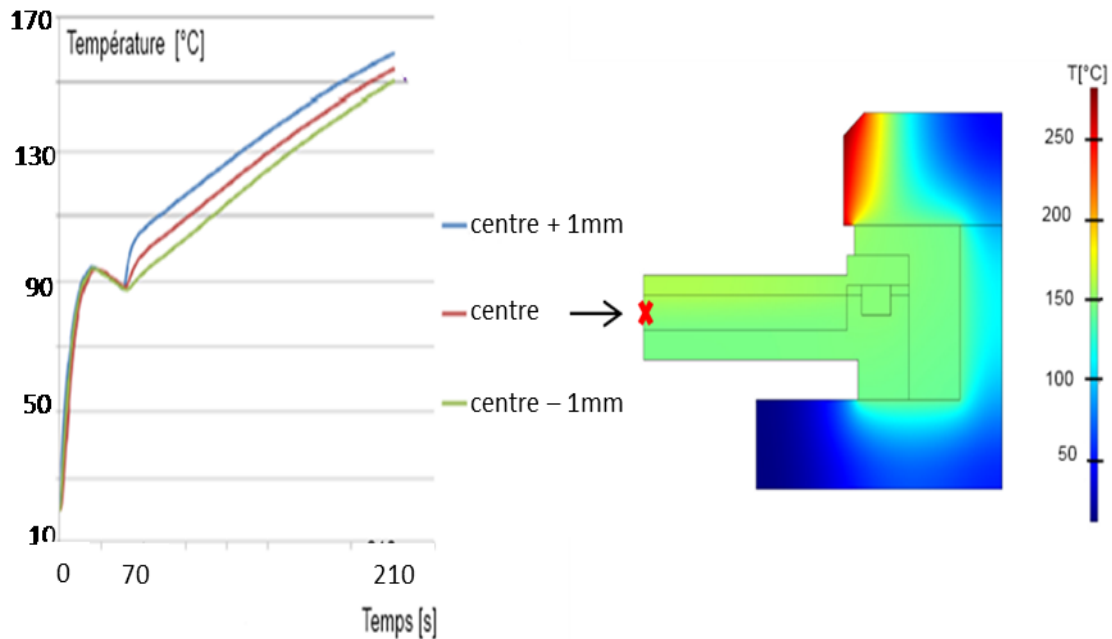


Fig. II.13 – Évaluation de l'homogénéité de traitement thermique au cours de la cuisson et des champs de températures simulées en fin de traitement sous le jet de vapeur surchauffée.

2.5 Conclusion sur le système de cuisson de laboratoire

Le nouveau système de cuisson développé permet de répondre aux différentes contraintes liées à l'analyse des composés volatils. Il s'agit en particulier de rester étanche jusqu'à 150°C et de ne pas contaminer la matrice fromagère en cours de cuisson. Ce système permet de simuler les conditions de température existantes dans des systèmes pilotes discontinus mais non celles des systèmes industriels continus dont le principe est l'injection directe de vapeur. Les variations de température existantes au cours du chauffage devront être prises en compte lors de l'interprétation de l'avancée des réactions biochimiques et lors de la détermination des valeurs des constantes de réaction.

Les paramètres critiques pour la répétabilité du traitement thermique sont le positionnement exact de la cellule de cuisson sous le jet de vapeur ainsi que la température de ce dernier.

Bien que le produit soit traité sous la forme d'une couche mince de 3,5 mm d'épaisseur, la simulation numérique montre qu'il existe des écarts de température de l'ordre de 15°C à la fin du traitement sous le jet de vapeur entre les couches de produits situées en contact avec la partie supérieure ou inférieure de la cellule de cuisson. Il s'agit toutefois d'un écart maximum simulé. Dans la pratique, cette différence est certainement moindre en raison de l'existence de mouvements convectifs

dans la matrice qui tendent à homogénéiser la température du produit.

Pour les études ultérieures, nous avons considéré un écart de température entre deux niveaux de température suffisamment important, c'est à dire de 15°C. Nous avons aussi bien ré-homogénéisé la matrice avant de l'aliquoter pour les différentes analyses. Dans ces conditions, les résultats obtenus seront exprimés en fonction du traitement thermique moyen subi par la matrice fromagère modèle.

Dans le cadre de la conception d'une nouvelle cellule de cuisson, il serait envisageable d'améliorer l'homogénéité du traitement thermique en :

- réduisant l'épaisseur de la couche mince de fromage. Ceci est cependant exclu en raison de la quantité de fromage nécessaire pour la réalisation des différentes analyses.
- appliquant le jet de vapeur sur les deux faces de la cellule de cuisson.
- développant une cellule de cuisson permettant l'agitation de la matrice fromagère.

3 Analyse des composés volatils

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) constitue la méthode de choix pour l'analyse des composés volatils. Elle est réalisée en trois étapes successives :

- La préparation de l'échantillon et l'extraction des composés volatils.
- La séparation au moyen d'une colonne chromatographique.
- La détection et l'identification des analytes à l'aide d'un détecteur tel qu'un spectromètre de masse (SM).

La détermination des composés inconnus nécessite le recours à au moins deux formes indépendantes d'identification. Ces méthodes utilisent les propriétés physiques de la molécule étudiée. Il s'agit par exemple de son affinité pour la phase stationnaire conduisant à un temps de rétention plus ou moins long caractéristique de la molécule, ou bien encore de son spectre de fragmentation par ionisation par impact électronique. Dans le cas de composés odorants, l'odeur de la molécule inconnue peut également être comparée à celle de composés de référence. Un consensus autour de ces critères s'est peu à peu établi afin de garantir la qualité des identifications dans les travaux de recherche (Molyneux et Schieberle, 2007).

3.1 Préparation de l'échantillon

Nous avons utilisé les techniques de l'espace de tête statique (static headspace, SH) pour l'identification des composés volatils et celles de l'espace de tête dynamique

(dynamic headspace, DH) dans le cadre de la recherche des composés odorants. Ces techniques présentent l'avantage de nécessiter une préparation de l'échantillon réduite par rapport aux techniques classiques d'extraction par solvant ou par hydro-distillation. En revanche, elles ne permettent pas de récupérer un extrait exploitable ultérieurement (Kolb, 1999).

3.1.1 Espace de tête statique

Dans le cas de l'espace de tête statique, l'échantillon est placé dans un vial fermé par un septum. En théorie, pour une pression et une température constantes, le système va atteindre un équilibre thermodynamique au bout d'un temps infiniment long (t_∞). L'énergie de Gibbs (G) est alors minimale : $dG = -SdT + VdP = 0$. A cet équilibre, les potentiels chimiques des différents constituants entre la phase gazeuse et la matrice sont égaux.

3.1.1.1 Définition du coefficient de partage Le coefficient de partage, ou volatilité absolue, entre la phase gazeuse (g) et la matrice (m) pour le constituant i ($K_{g/m}^i$) est défini comme le ratio des fractions molaires du constituant de la phase gazeuse (y_i) et de la matrice (x_i) selon l'équation II.1. Il permet de relier la concentration des composés volatils de l'espace de tête à celle de l'échantillon.

$$K_{g/m}^i = \frac{y_i}{x_i} \quad (\text{II.1})$$

La pression partielle du constituant i dans la phase gazeuse en équilibre avec la matrice peut être déterminée à l'aide de la loi de Raoult généralisée selon l'équation II.2 (Lide, 2003).

$$p_i = \gamma_i \cdot x_i \cdot P_i^0(T) \quad (\text{II.2})$$

avec :

- p_i la pression partielle du constituant i dans la phase gazeuse.
- γ_i le coefficient d'activité. Il tient compte de la non idéalité de la matrice en considérant les interactions entre les constituants au sein du mélange.
- x_i la fraction molaire du constituant i dans la matrice.
- $P_i^0(T)$ la pression de vapeur saturante du constituant i .

Les pressions de vapeur saturante peuvent être approximées au moyen des équations d'état pour les fluides réels selon l'expression de van der Waals (1910) ou avec les améliorations proposées par Redlich et Kwong (1949) ou par Peng et Robinson (1976). Les coefficients d'activité des différents constituants peuvent également être approximés à l'aide de plusieurs modèles théoriques comme par exemple les modèles

de Wilson (1964), NRTL (Renon et Prausnitz, 1968) ou UNIQUAC. Cependant, dans le cas des systèmes alimentaires, la plupart des paramètres nécessaires à l'utilisation de ces modèles ne sont pas connus.

Dans l'hypothèse où les fractions molaires des constituants dans la matrice sont très faibles, $x_i < 10^{-5}$, il devient possible d'appliquer les hypothèses de la dilution infinie. Dans ce cas, les composés volatils interagissent avec la matrice indépendamment les uns des autres. Le coefficient d'activité γ_i peut alors être considéré comme constant et prend une valeur maximale notée γ_i^∞ et appelée coefficient d'activité à dilution infinie qui résulte uniquement des interactions du composé i avec la matrice. Le coefficient de partage est alors défini par l'équation II.3

$$K_{g/m}^i = \frac{\gamma_i^\infty \cdot P_i^0(T)}{x_i} \quad (\text{II.3})$$

La détermination de ce coefficient de partage pour chacun des constituants i permet d'accéder aux fractions molaires x_i dans la matrice. Plusieurs techniques expérimentales dynamiques ou statiques permettent d'accéder à la valeur de ce coefficient. Notons par exemple la méthode dynamique de la dilution exponentielle (Duhem et Vidal, 1978) et la méthode statique de variation du rapport des volumes de phase (Phase Ratio Variation, PRV) proposée par Ettre *et al.* (1993) ou encore la méthode de partitionnement à l'équilibre dans des systèmes fermés (Equilibrium Partitioning in Closed Systems, EPICS) proposée par Gossett (1987). Ces deux dernières méthodes sont particulièrement appréciables car leur conception permet de s'affranchir de l'étalonnage du détecteur (dans la limite toutefois de son domaine de linéarité). En pratique, l'équilibre thermodynamique n'est jamais atteint, et il devient alors très important pour l'expérimentateur de contrôler à la fois la température et la durée du piégeage.

3.1.1.2 Facteurs influençant le coefficient de partage Le coefficient de partage peut être influencé par plusieurs facteurs que nous allons présenter ici.

3.1.1.2.1 Effet de la concentration du constituant Dans le domaine de la dilution infinie, le coefficient de partage est indépendant de la concentration du constituant considéré. Il augmente ensuite de manière non linéaire avec la concentration du constituant dans la phase liquide (Lazzara et Deen, 2004).

3.1.1.2.2 Effet de la température Une élévation de la température du système induit une augmentation du coefficient de partage air-matrice. Elle est liée à

l'augmentation conjuguée du coefficient d'activité et de la pression de vapeur saturante. La pression de vapeur saturante apporte cependant l'essentiel de la contribution à l'augmentation du coefficient de partage. Le tableau II.4 présente l'augmentation du coefficient de partage de quelques composés dans un système air-eau en fonction de la température.

Tab. II.4 – Effet de la température sur le coefficient de partage air-eau de quelques composés d'arôme d'après Jouquand *et al.* (2004)

Composé d'arôme	60 ° C	70 ° C	80 ° C
hexanal	833 ± 20	1270 ± 50	1890 ± 200
2-octanone	746 ± 40	1200 ± 190	1850 ± 150
butanoate d'éthyle	800 ± 16	1240 ± 60	1670 ± 70
2-heptanone	390 ± 16	714 ± 34	1030 ± 20
2-hexanone	190 ± 16	435 ± 36	599 ± 30
t-2-hexenal	213 ± 10	276 ± 20	334 ± 10
2-butanone	100 ± 6	163 ± 5	236 ± 2
1-hexanol	85 ± 6	133 ± 5	202 ± 2

En pratique, augmenter la température de piégeage permet de favoriser l'extraction des composés volatils vers l'espace de tête. Il convient pour notre étude de choisir un couple temps-température de piégeage permettant un bon compromis entre une qualité d'extraction des composés volatils satisfaisante sans modifier de manière trop importante le niveau de traitement thermique subi par la matrice modèle.

3.1.1.2.3 Effet de la composition de la matrice La plupart des composés d'arôme sont hydrophobes. La présence de matière grasse dans la matrice, ce qui est le cas de la matrice fromagère, va induire une rétention de ces composés dans la matrice. Le coefficient de partage se trouve alors fortement diminué (Nongonierma *et al.*, 2006). Dans le cas de matrices émulsionnées, la fraction de matière grasse présente dans la matrice et la distribution de la taille des globules lipidiques ont une grande influence sur le coefficient de partage du produit (van Ruth *et al.*, 2002). Le coefficient de partage du milieu émulsionné peut être approximé au moyen de la relation II.4 (Buttery *et al.*, 1973).

$$\frac{1}{K_{g/m}^i} = \frac{x_e}{K_{g/eau}^i} + \frac{x_{mg}}{K_{g/mg}^i} \quad (\text{II.4})$$

avec :

- $K_{g/m}^i$ le coefficient de partage gaz-matrice calculé pour le constituant i.
- $K_{g/eau}^i$ le coefficient de partage gaz-eau du constituant i.
- $K_{g/mg}^i$ le coefficient de partage gaz-matière grasse du constituant i.

- x_e et x_{mg} les fractions massiques d'eau et de matière grasse dans l'émulsion.

Les protéines peuvent générer des interactions spécifiques avec les composés d'arôme. Il s'agit de liaisons hydrophobes ou électrostatiques réversibles ou bien encore de liaisons irréversibles. Ces interactions ont particulièrement bien été étudiées en ce qui concerne les β -lactoglobulines (Jouenne et Crouzet, 2000; Tavel *et al.*, 2008) et les caséines (Landy *et al.*, 1995). De manière générale, l'augmentation de la teneur en protéines dans la matrice tend à diminuer non linéairement le coefficient de partage air-matrice (Guichard, 2002). La teneur en sucre semble avoir un effet variable sur le coefficient de partage (Nahon *et al.*, 2000).

3.1.1.2.4 Effet de la texture de la matrice La structure et la texture de la matrice peuvent être modifiées, en faisant varier les proportions entre les différents ingrédients, au cours de la cuisson, ce qui aura pour effet de provoquer une dénaturation partielle des protéines et des globules gras. L'application d'un traitement mécanique permet aussi une modification de la texture. Les deux premières méthodes induisent systématiquement des variations de la teneur des composés volatils liées à l'apport de composés volatils par les matières premières ou à la formation de nouveaux composés par le traitement thermique. Ces études doivent donc être réalisées avec précaution. Dans le cas du brassage mécanique de yaourt, Paci Kora (2004) met en évidence une augmentation de l'ordre de 30% du coefficient de partage air-yaourt de la γ -octalactone et émet l'hypothèse qu'un site de fixation de cette molécule par le réseau caséique a été modifié par l'agitation mécanique.

3.1.1.3 Problème de la quantification Rappelons que la matrice fromagère modèle est constituée d'une micro-émulsion de globules gras stabilisée par un réseau protéique dissous dans une phase aqueuse. Au cours des traitements thermiques, des phénomènes de coalescence des globules gras ainsi que des modifications importantes de la structure des protéines ont été mises en évidence. Afin de quantifier précisément les teneurs des constituants d'intérêt, il faudrait pouvoir déterminer l'évolution de leurs coefficients de partage respectifs au cours des traitements. Or ce coefficient est amené à varier en raison des modifications des concentrations des constituants, des interactions nouvelles entre constituants et des modifications de textures se produisant au cours de la cuisson. Une alternative consisterait à établir pour chaque constituant des courbes étalons à partir de l'ajout du constituant marqué dans la matrice avant analyse. Cependant, l'un ou l'autre des travaux devraient être réalisés pour chacune des textures observées. Ceci s'avère être un travail très long et fastidieux. De plus, les dérives intensitives liées au spectromètre de masse

rendent obligatoire l'établissement de nouvelles calibrations chaque quinze jours ou presque. Dans ce contexte, le temps nécessaire à la réalisation des courbes étalons serait supérieur à celui pendant lequel elles peuvent être considérées comme valides. Ce qui est donc matériellement impossible. Pour cette raison, une telle quantification des composés volatils n'a pas été effectuée dans le cadre de ce travail de thèse, et nous avons travaillé uniquement à partir des unités arbitraires de surface des pics chromatographiques.

3.1.1.4 Prélèvement de l'espace de tête Le prélèvement de l'espace de tête peut être, par exemple, réalisé de manière statique à l'aide d'une seringue ou d'une fibre de micro-extraction en phase solide (SPME) ou de manière dynamique au moyen d'un piège équipé d'une résine adsorbante.

3.1.1.4.1 Prélèvement d'un espace de tête statique à l'aide d'une seringue Dans ce cas, le nombre n_i de molécules injectées à l'entrée de la colonne chromatographique est directement proportionnel au volume prélevé. Cependant cette méthode manque de sensibilité en raison de l'absence de système de préconcentration des analytes avant injection.

3.1.1.4.2 Prélèvement par micro-extraction en phase solide La microextraction en phase solide (Solid Phase Micro-Extraction, SPME) développée par Arthur et Pawliszyn (1990) permet d'extraire des composés volatils en phase gazeuse ou non-volatils en phase liquide. Une fibre de silice sert de support à un ou plusieurs polymères qui vont permettre par absorption et/ou adsorption de réaliser une préconcentration des composés volatils avant injection par désorption thermique. La fibre est protégée par une gaine d'acier inoxydable et un support permet son utilisation de manière automatique. Le point critique de cette technique d'extraction est la grande fragilité des polymères ainsi que l'hétérogénéité des réponses observées entre fibres. La figure II.14 présente schématiquement le principe de fonctionnement d'une fibre SPME.

De nombreuses phases stationnaires ont été développées et commercialisées de façon à répondre à une grande variété d'applications présentées dans le tableau II.5 (Sigma-Aldrich Supelco, 1999, 2001).

La fibre *a priori* la plus adaptée à notre étude est la DVB/CAR/PDMS. Cependant le revêtement composite s'est avéré très fragile, la fibre vieillissait mal et trop rapidement à la succession des analyses. Pour cette raison, nous nous sommes tournés vers la fibre CAR/PDMS qui bien que présentant un profil chromatographique un peu moins riche s'est avérée beaucoup plus robuste à l'usage.

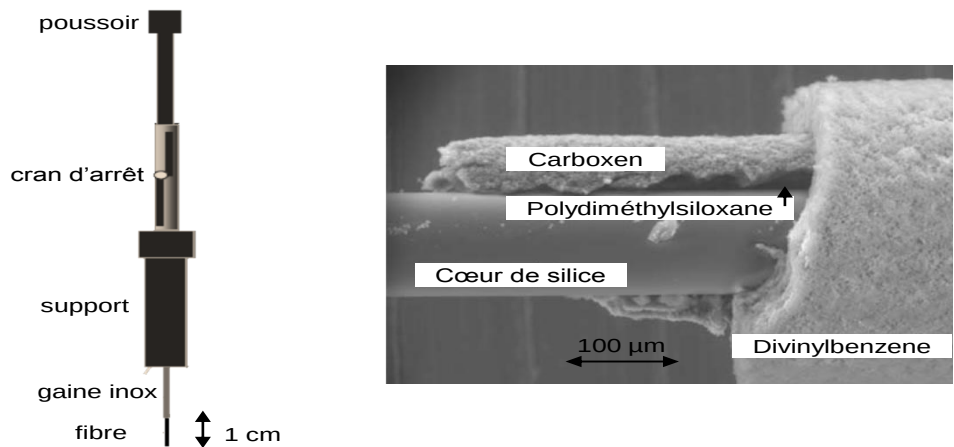


Fig. II.14 – Représentation schématique d’une fibre SPME et image au microscope électronique à balayage d’une fibre SPME DVB/CAR/PDMS ayant servie à la réalisation de 5 analyses de vin blanc par GC-MS d’après Bianco *et al.* (2009).

Tab. II.5 – Propriétés des fibres SPME disponibles (Sigma-Aldrich Supelco, 1999, 2001)

phase stationnaire	épaisseur de film [μm]	Tmax [$^{\circ}C$]	Application
Polydiméthylsiloxane	7	340	volatils
(PDMS)	30	280	semi-volatils, apolaires
	100	280	haut poids moléculaire, apolaires
Polyacrylate	85	320	semi-volatils, polaires
(PA)			
Polydiméthylsiloxane / Divinylbenzene	60 ou 65	270	volatils, amines
(PDMS/DVB)			
Carboxen / Polydiméthylsiloxane	75 ou 85	320	volatils, faible poids moleculaire
(CAR/PDMS)			
Carbowax / Divinylbenzene	65 ou 70	260	alcools, polaires
(CW/DVB)			
Carbowax / Templated Resin	50		HPLC
(CW/TPR)			
Divinylbenzene / Carboxen / Polydiméthylsiloxane	30 ou 50	270	volatils et semi-volatils
(DVB/CAR/PDMS)			

3.1.1.4.3 Système de prélèvement modifié des composés volatils La matrice fromagère est très visqueuse et adhère facilement aux parois du vial. Pour cette raison, il ne nous a pas été possible de contrôler parfaitement la surface d’échange entre la matrice et l’espace de tête du vial. Ceci a entraîné un problème de reproductibilité entre les analyses successives. Le coefficient de variation de l’aire du pic chromatographique mesurée pour un triplicat d’analyses sur la matrice fromagère modèle crue allant de 60 à 230% suivant les composés considérés. Nous avons donc

construit un nouveau système permettant de contrôler parfaitement cette surface d'échange. Il est représenté en figure II.15.

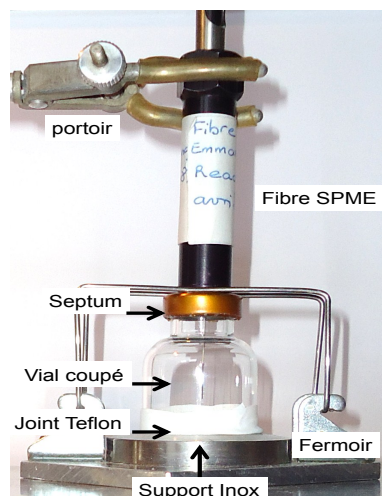


Fig. II.15 — Photographie du système de piégeage des composés volatils développé afin de contrôler la surface d'échange entre la matrice fromagère et l'espace de tête.

L'étanchéité est assurée à l'aide d'un morceau de ruban de Téflon préalablement conditionné à l'étuve (1 journée à 150°C). Les quelques composés volatils désorbés par le Téflon conditionné ont été identifiés. N'étant pas naturellement présents dans la matrice crue ni dans la matrice cuite, ils ne nous ont pas posé de problèmes. Le principal inconvénient du nouveau système est qu'il ne permet pas l'utilisation d'un passeur automatique. L'ensemble des extractions de composés volatils a donc été réalisé manuellement dans une étuve thermostatée. Les nouveaux coefficients de variation de l'aire du pic chromatographique dans les mêmes conditions analytiques étaient alors de 5 à 60% suivant les composés considérés.

3.1.2 Espace de tête dynamique

Les techniques d'espace de tête dynamique permettent le déplacement de l'équilibre thermodynamique en faveur de l'espace de tête. Pour cela, un gaz vecteur inerte entraîne les composés désorbés de l'échantillon vers un piège garni d'un polymère poreux qui va les concentrer par adsorption. Le polymère peut être de type Tenax-TA. Ses propriétés sont un volume poreux de $2,4 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, un diamètre moyen de pore de 200 nm conduisant à une surface interfaciale de $35 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Il présente des propriétés d'interactions polaires et de van der Waals plus faibles que les polymères de type Chromosorb 106 et Porapak N. Il a de plus, une meilleure stabilité à la température. Ceci en fait un polymère bien adapté afin d'obtenir un profil chromatographique équilibré entre volatils et semi-volatils (Schneider et Goss, 2009). Le

rendement d'extraction et la représentativité de l'information sont ainsi améliorés, notamment en ce qui concerne les systèmes d'espace de tête dynamique de type « Purge and Trap » (Contarini et Pavolo, 2002). Du fait du caractère dynamique, les méthodes nécessaires à la quantification des composés présents dans la matrice sont plus complexes à mettre en œuvre que dans le cas de l'espace de tête statique.

3.1.3 Comparaison entre espace de tête statique et dynamique

Les deux techniques sont souvent mises en opposition (Elmore *et al.*, 1997). Bien que les techniques de l'espace de tête dynamique de type « Purge and Trap » semblent piéger une diversité de composés un peu plus importante que les techniques SPME, elles ne piègent pas non plus toutes les molécules collectées par cette dernière. En outre, les techniques SPME sont beaucoup plus faciles à automatiser et moins onéreuses à mettre en œuvre que celles de l'espace de tête dynamique (Contarini et Pavolo, 2002). Pour ces raisons, il s'agit avant tout de techniques complémentaires dont le choix doit se faire de manière réfléchie. Dans le cas du travail de thèse, la SPME a été utilisée systématiquement sauf pour les analyses olfactométriques pour lesquelles, le système « Purge and Trap » a été préféré. D'autres techniques plus récentes permettent également l'extraction des composés volatils. L'extraction par sorption de l'espace de tête sur barreau (headspace sorptive extraction, HSSE) permet l'extraction des composés volatils de matrices gazeuses Bicchì *et al.* (2008). La même technique peut également être appliquée en phase liquide (Stir Bar Sorptive Extraction, SBSE) Plutowska et Wardencki (2008). Il s'agit en fait d'une variation de la SPME où la sorption des composés est effectuée sur un polymère épais déposé sur un barreau de verre. Ceci permet d'augmenter la sensibilité de la technique analytique grâce au volume plus important de polymère. En revanche, un dispositif spécifique de désorption thermique est alors nécessaire en vue de réaliser l'injection. La micro-extraction dynamique en phase solide (solid phase dynamic extraction, SPDE) est une évolution de la SPME. Le polymère actif est déposé à l'intérieur d'une aiguille, rendant le dispositif plus robuste. Les mouvements successifs d'un piston permettent une concentration progressive sur le polymère (Bicchì *et al.*, 2004).

3.2 Séparation des composés volatils

3.2.1 Injection des composés volatils

L'injecteur doit permettre d'assurer l'interface entre l'échantillon et la colonne chromatographique. Dans le cas d'échantillons solides ou liquides, il doit également en assurer la vaporisation. L'injecteur pour liquide est le plus fréquemment uti-

lisé. Cependant, il en existe une large variété adaptés aux différentes applications (Tranchant, 1982). Dans notre étude, nous avons utilisé un injecteur de type « split-splitless » adapté à la SPME (volume mort de l'injecteur réduit) en mode sans division. Ceci permet d'injecter la quasi totalité du mélange gaz vecteur et composés volatils en tête de colonne chromatographique. De cette manière, nous nous assurons qu'il n'y a pas d'injection différentielle des différents composés volatils comme ce pourrait être éventuellement le cas en mode split.

3.2.2 Séparation

3.2.2.1 La colonne de séparation On distingue deux types de colonnes, les colonnes remplies et les colonnes capillaires (Poole et Poole, 2008; Tranchant, 1982). Elles sont représentées en figure II.16.

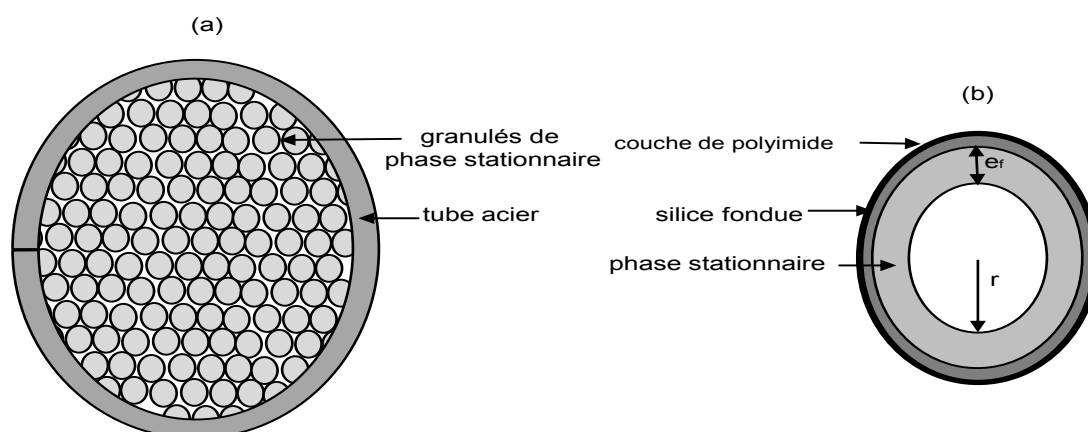


Fig. II.16 – Colonne remplie (a) et colonne capillaire (b). e_f est l'épaisseur de film de la phase stationnaire et r le rayon interne de la colonne

Les dimensions caractéristiques de la colonne, le type de gaz vecteur ainsi que le débit de ce dernier doivent être sélectionnés de façon à obtenir la hauteur équivalente de plateau théorique (height equivalent to a theoretical plate, HETP) minimale garantissant ainsi la meilleure séparation possible. Ceci peut être effectué au moyen de l'équation de van Deemter *et al.* (1956) pour les colonnes remplies ou de Golay (1981) dans le cas des colonnes capillaires. Dans le cas de la chromatographie bi-dimensionnelle, l'optimisation de la séparation s'avère beaucoup plus complexe en raison de la juxtaposition de deux colonnes aux propriétés différentes. Cependant, des stratégies d'optimisation des séparations commencent également à être élaborées (Dorman *et al.*, 2008). La séparation en mode isotherme permet une résolution bien meilleure que celle en programmation de température. Cependant, la seconde

méthode est généralement préférée car elle permet des durées d'analyse beaucoup plus courtes (Blumberg et Klee, 2001).

3.2.2.2 Calcul des indices de rétention linéaire Le temps de rétention d'un composé volatil pour une phase stationnaire donnée est l'une des grandeurs caractéristiques permettant son identification. Il s'agit d'un indice relatif très fortement dépendant de l'appareillage et des conditions analytiques. Afin de disposer d'un indice universel ne dépendant que de la nature de la phase stationnaire, Kovats (1958) a développé un indice de rétention en mode isotherme basé sur la comparaison du temps de rétention du composé inconnu i à celui des n -alcanes contenant z et $z+1$ atomes de carbone qui encadrent le composé i . Cet indice a ensuite été adapté par van den Dool et Kratz (1963) aux séparations réalisées en programmation de température et est toujours utilisé aujourd'hui. Il s'obtient à l'aide de la formule II.5 :

$$ri(i) = 100 \cdot \frac{rt_i - rt_z}{rt_{z+1} - rt_z} + 100 \cdot n_z \quad (\text{II.5})$$

avec :

- $ri(i)$ l'indice de rétention du composé i
- rt_i le temps de rétention du composé i
- rt_z le temps de rétention de l'alcane z
- n_z le nombre d'atomes de carbone de l'alcane z

Dans le cas où tous les n -alcanes nécessaires au calcul des indices de rétention ne sont pas naturellement présents dans l'échantillon analysé, il est aisé de les co-injecter au moyen d'une solution contenant ces alcanes. Un certain nombre de bases de données d'indices de rétention pour les principales phases stationnaires utilisées ont depuis été publiées (Kondjoyan et Berdagué, 1996). Il a été récemment entrepris une tentative d'unification de l'ensemble de ces données (Babushok *et al.*, 2007). Dans le cas où l'indice de rétention de l'analyte recherché ne figurerait pas dans ces bases, il est possible d'établir une estimation à partir de la connaissance de certaines de ses propriétés physiques. La corrélation quadratique établie par Goodner (2008) est particulièrement intéressante car elle ne fait intervenir que deux paramètres : la température d'ébullition (t_B) et le coefficient de partage octanol-eau (K_{OW}). De plus, ces paramètres peuvent être trouvés dans des tables (Lide, 2003). Enfin, lorsque ces paramètres ne sont pas disponibles, une estimation grossière peut être obtenue à l'aide de la méthode de contribution des groupes (Stein *et al.*, 2007). Dans le but de minimiser le risque d'erreur en raison de possibles co-élutions entre composés, il est recommandé de déterminer les indices de rétention de l'analyte sur deux colonnes chromatographiques dont les polarités de la phase stationnaire sont très différentes

(d'Acampora Zellner *et al.*, 2008a). Cependant, ayant eu recours à la chromatographie bidimensionnelle, nous nous sommes contentés d'un indice de rétention pour la première dimension chromatographique (sur colonne capillaire de type DB5).

3.2.3 La chromatographie bidimensionnelle

Afin d'améliorer le pouvoir séparatif de la chromatographie en phase gazeuse, il est possible d'ajouter à la sortie de la colonne chromatographique un dispositif permettant d'associer une seconde colonne aux propriétés différentes. Suivant le dispositif, il s'agira de chromatographie bidimensionnelle de type « heart-cut » ou de chromatographie bidimensionnelle totale. Un tel dispositif est présenté sur la figure II.17.

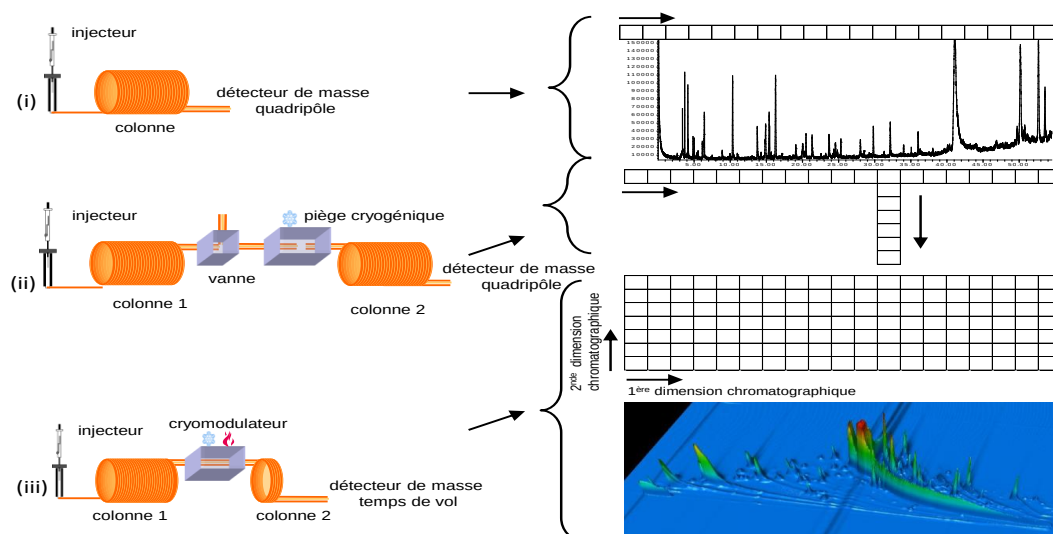


Fig. II.17 — Principe de la chromatographie bidimensionnelle de type heartcut ou totale.
(i) chromatographie conventionnelle ; (ii) chromatographie bidimensionnelle de type heartcut ; (iii) chromatographie bidimensionnelle totale

Dans le cas de la chromatographie bidimensionnelle de type « heart-cut », un système de vannes permet de dévier les effluents situés dans une zone temporelle d'intérêt, de préférence réduite, vers un piège cryogénique. Les molécules ainsi condensées seront ensuite séparées au moyen de la seconde colonne chromatographique (Eyres *et al.*, 2007). La capacité de séparation d'un tel système est égale à la somme des capacités de séparation de chacune des colonnes utilisées.

Pour la chromatographie bidimensionnelle totale, un cryomodulateur permet d'injecter de façon discontinue la totalité des effluents issus de la première colonne chromatographique en tête de la seconde colonne. Le cycle caractérisé par le piégeage des composés volatils dans le cryomodulateur et leur thermo-désorption vers la seconde colonne chromatographique est appelé une modulation. Un tel cycle a

une durée typique de l'ordre de 4 à 10 secondes. Pour ce faire, un tel système nécessite une seconde colonne chromatographique courte et rapide, capable de réaliser sa séparation en un temps inférieur à celui d'une modulation. Un détecteur à haute fréquence d'acquisition doit être utilisé afin de ne pas perdre l'information séparative ainsi obtenue. Pour cette raison, les détecteurs de masse à temps de vol sont fréquemment préférés aux détecteurs quadripôlaire pour ce type d'application. L'exploitation de la grande quantité de données ainsi obtenue s'avère être un travail long et fastidieux principalement en raison du caractère discontinu du signal qu'il convient de reconstituer de manière à obtenir le chromatogramme bidimensionnel (Peters *et al.*, 2007a,b). En théorie, la capacité de séparation de ce système est le produit des capacités de séparation de chacune des colonnes utilisées. Il est en réalité inférieur d'environ 50% en raison des problèmes de résistance à l'écoulement du gaz vecteur induits par la seconde colonne chromatographique (Blumberg, 2003; Blumberg *et al.*, 2008). La technique a été développée dans le courant des années 1970 (Bertsch, 1978) et les premières applications commerciales (Phillips, 1992) ont été rendues possibles au début des années 1990 grâce à l'amélioration des colonnes capillaires.

3.3 Détection des composés volatils et odorants

Les détecteurs analysent les effluents en sortie de la colonne chromatographique et transforment l'information transmise par ces derniers en un signal électrique qui sera enregistré sous la forme d'un chromatogramme.

3.3.1 Détection physique

Parmi les détecteurs, nous pouvons distinguer les détecteurs universels qui assurent une réponse quel que soit le type d'analytes le traversant (catharomètre, détecteur à ionisation de flamme) et les détecteurs spécifiques d'une ou plusieurs familles de molécules. Les détecteurs spécifiques comme par exemple les détecteurs de type FPD (flame photometric detector) ou PFPD (pulsed flame photometric detector) présentent un intérêt évident pour l'identification et la quantification des composés soufrés. Cependant, nous n'avons pas eu recours à ce type de détecteurs au cours de ce travail de thèse. Pour cette raison, nous ne les présenterons pas.

3.3.1.1 Le spectromètre de masse Le spectromètre de masse permet en plus de l'obtention d'un signal intensitif lié à la quantité de fragments moléculaires lui parvenant, l'obtention d'informations structurales, permettant l'identification de la

molécule. La molécule arrivant dans la source du spectromètre de masse est fragmentée par un impact électronique (IE) ou une ionisation chimique (IC). Un système physique va alors permettre le classement et la mesure de ces fragments en fonction de leur ratio m/z (m : masse du fragment considéré ; z : charge du fragment considéré). Dans le cas du spectromètre de masse à quadripôle (q-MS), les ions vont être plus ou moins déviés en fonction de ce rapport m/z par un champ électro-magnétique généré par le quadripôle. Dans le cas du spectromètre de masse à temps de vol (tof-MS), le fragment est d'abord accéléré par un potentiel électrique avant de parcourir un tube de vol sous vide d'air poussé couplé à un système nommé réflectron qui permet la focalisation temporelle des fragments ionisés. On obtient alors un spectre de masse caractéristique de la molécule très similaire à celui obtenu par un spectromètre de masse de type quadripolaire. L'utilisation de bases de données permet alors la tentative d'identification. Le principal avantage du spectromètre de masse à temps de vol est sa fréquence d'acquisition élevée jusqu'à 500 scans par seconde contre 50 à 60 pour un système quadripolaire. En revanche, son coût est environ 5 à 6 fois supérieur à celui du quadripôle, ce qui en fait un détecteur réservé aux applications nécessitant un système d'acquisition à haute fréquence.

3.3.2 Détection physiologique

3.3.2.1 Principe L'utilisation du nez humain comme détecteur rend possible l'obtention d'informations concernant l'odeur, l'intensité et la durée de perception des analytes parvenant en sortie de colonne chromatographique. Cette approche permet de ne focaliser les efforts d'identification des molécules que sur les composés odorants. C'est dans cette optique qu'ont été élaborées les techniques de couplage de la chromatographie en phase gazeuse à l'olfactométrie. Le principe de ce couplage est représenté en figure II.18.

Un diviseur d'effluents dirige une partie des effluents chromatographiques vers un détecteur physique, généralement un spectromètre de masse, alors que l'autre partie est dirigée vers un terminal d'olfaction. Dans cet exemple, 4 composés en mélange sont séparés par chromatographie en phase gazeuse et détectés par spectrométrie de masse. Parmi ces 4 composés, seul un composé odorant est perçu par le flaireur au niveau du terminal d'olfaction. Ceci permet l'obtention quasi synchrone des informations chromatographiques et olfactométriques.

3.3.2.2 Méthodes Plusieurs méthodes ont été développées afin d'exploiter au mieux les informations obtenues à l'aide de ces couplages :

- Les méthodes de dilution permettent d'évaluer l'activité odorante relative d'un

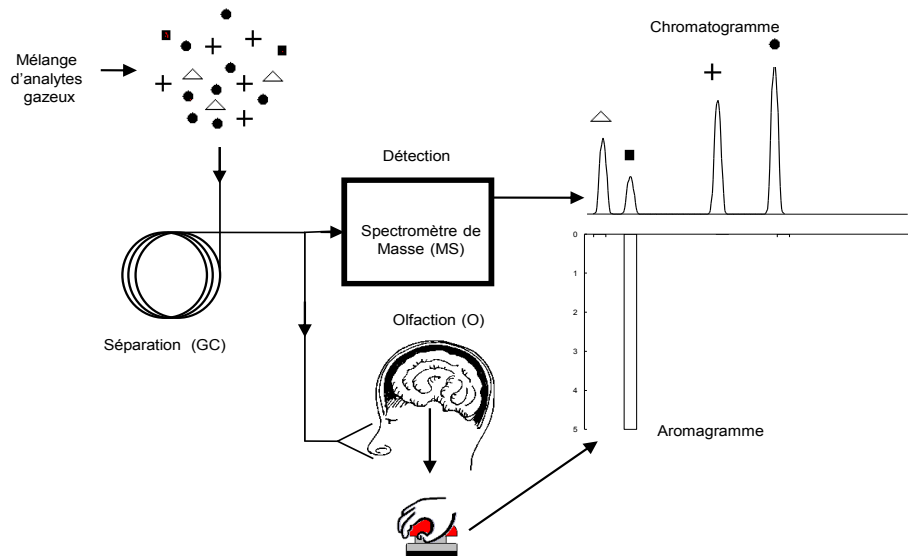


Fig. II.18 – Schéma de principe du couplage GC-MS/Olfactométrie d’après Berdagué et Tournayre (2002)

composé dans le mélange. Pour cela, une série de dilutions successives est analysée jusqu’à ce que plus aucun signal ne soit perçu par le panel. Il s’agit des méthodes AEDA (Aroma Extract Dilution Analysis) proposées par Ullrich et Grosch (1987) et CHARM (Combined Hedonic of Aromatic Response) proposée par Acree (1984).

- Les méthodes de fréquence de détection font appel à un panel de de 8 à 12 flaireurs (Pollien *et al.*, 1997). En théorie, plus le nombre de juges détectant une odeur est élevé, plus l’activité odorante relative de la molécule considérée est élevée. Cependant, cette hypothèse n’est pas toujours vérifiée (Delahunty *et al.*, 2006).
- Il existe plusieurs déclinaisons des méthodes d’intensité. Par exemple la méthode OSME (Odour Specific Magnitude Estimation) (Miranda-Lopez *et al.*, 1992) ou encore la méthode FSCM (Finger Span Cross Modality) proposée par Etievant *et al.* (1999). Toutes ont en commun de demander au juge de décrire la nature de l’odeur perçue et d’en évaluer l’intensité sur une échelle précédemment définie. L’intensité peut être définie instantanément au moyen d’un curseur ou à *posteriori* au cours de la description de l’odeur. Cependant, la fatigue olfactive rencontrée par les juges en cours d’analyse peut rendre les intensités des composés perçus en fin d’analyse inférieures à celles des composés perçus en début de séance. Pour cette raison, il est recommandé de ne pas dépasser 30 à 35 minutes pour les séances d’olfaction. De plus, un entraî-

nement important des juges peut s'avérer nécessaire de manière à diminuer la dispersion des réponses entre juges.

Chacune de ces méthodes présentent leurs avantages et inconvénients et ont fait l'objet d'une synthèse bibliographique par van Ruth (2001).

Nous avons utilisé dans le cadre de ce travail de thèse une méthode hybride développée au laboratoire (Berdagué et Tournayre, 2002). Il s'agit de la méthode VIDEO-Sniff (Vocabulary-Intensity-Duration of Elementary Odours by Sniffing). Elle associe les méthodes d'intensité à celles de fréquence de détection. Pour ce faire, il est demandé à chaque flaireur qui détecte une odeur :

- de la signaler par pression sur un bouton poussoir aussi longtemps que l'odeur est perçue.
- de décrire oralement la nature de l'odeur perçue
- d'évaluer son intensité sur une échelle de 1 (très faible) à 5 (très forte).

L'ensemble de ces données est collecté au moyen du logiciel AcquiSniff[®] sous la forme d'un aromagramme individuel (Berdagué et Tournayre, 2002; Tournayre, 2005). Ce logiciel facilite également le traitement des données en permettant d'associer chaque descripteur olfactif à une catégorie, ce qui permet un aperçu visuel des informations sémantiques relatives à la description des odeurs.

3.3.2.3 Limites Deux reproches principaux sont cependant faits aux techniques d'olfactométrie :

- la nécessité de recourir à un panel de juges suffisamment large. Un consensus s'est établi autour d'un nombre de 8 à 12 juges afin d'obtenir des résultats suffisamment reproductibles (d'Acampora Zellner *et al.*, 2008b). Ceci rend la technique très délicate et coûteuse à mettre en place, car elle nécessite alors la réalisation d'autant d'analyses que de juges, sans compter les répétitions.
- la possibilité de co-élutions entre composés les odorants induit un risque d'attribuer l'odeur perçue au mauvais composé volatil. Ce risque est d'autant plus important que le signal produit par certains composés odorants est parfois très faible voir totalement absent dans le chromatogramme.

3.3.2.4 Le système GC-MS/8W-O Afin de remédier à ces difficultés techniques, un système d'olfactométrie multi-voies a été développé au laboratoire et permet à 8 juges d'évaluer simultanément les odeurs perçues à la sortie de 8 ports d'olfactions (Tournayre *et al.*, 2006; Berdagué *et al.*, 2007). Il est présenté figure II.19. Il permet d'assurer des conditions d'analyse rigoureusement identiques pour tous les juges. De plus le produit analysé est dans le même état de fraîcheur pour tous

les juges. Un tel système permet ainsi d'obtenir une vision d'ensemble robuste du « paysage odeur actif » des matrices étudiées.

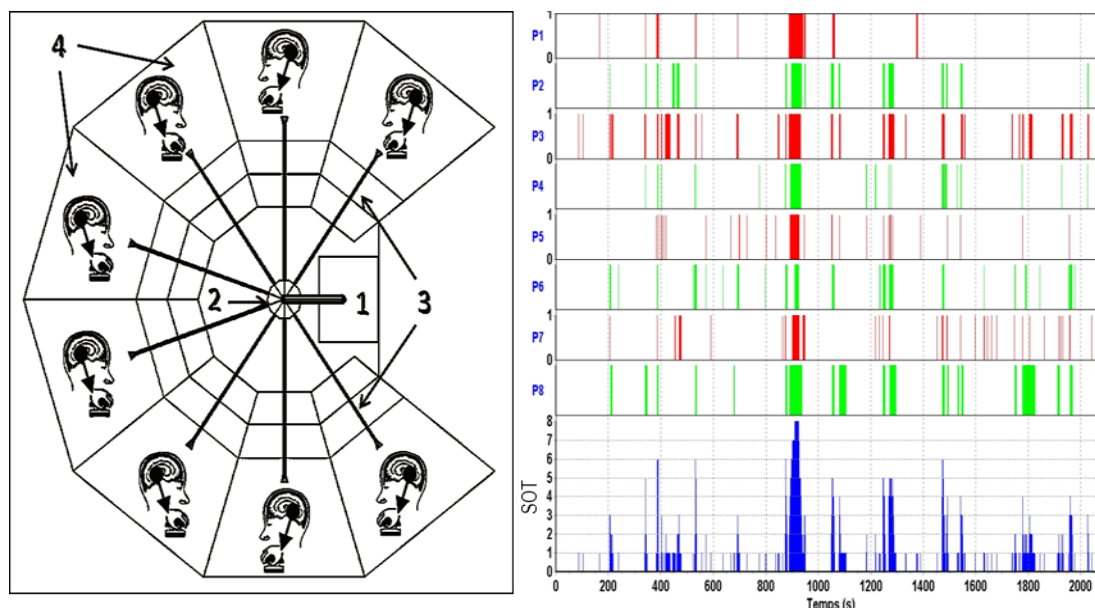


Fig. II.19 – Schéma de principe du système GC-MS/O-multi-voies d'après Berdagué *et al.* (2007) (1 : GC-MS ; 2 : Diviseur d'effluents ; 3 : 8 lignes de transfert ; 4 : 8 box de sniffing individuels). Et données issues de la détection des 8 flaireurs commulées en un signal olfactif total (SOT) d'un échantillon de fromage fondu commercial.

Nous avons utilisé ce système, associé à la méthode VIDEO-Sniff et au logiciel AcquiSniff[®] afin de déterminer quelles sont les molécules odorantes significativement influencées par le niveau de traitement thermique subi par la matrice fromagère modèle.

3.3.2.5 Le système GC-GC-MS/O De manière analogue aux réserves émises en ce qui concerne parfois le manque de résolution de la chromatographie conventionnelle, l'attribution d'une odeur perçue au port d'olfaction à un composé du chromatogramme peut s'avérer délicate. En effet, une odeur peut très bien être attribuée au pic majoritaire du chromatogramme alors qu'il s'agit en fait d'un pic minoritaire, voire absent, qui est responsable de l'odeur perçue par les juges. Le système multi-voies ne permet pas de lever sans ambiguïté ces interrogations. C'est pour cette raison que les couplages de l'olfactométrie à des systèmes de chromatographie bidimensionnelle de type « heart-cut » ont été développés. Nous avons utilisé un tel système afin d'élucider la zone odorante empyreumatique complexe située à la fin de l'aromagramme du fromage fondu.

3.4 Protocoles opératoires

3.4.1 Micro-extraction en phase solide couplée à la chromatographie bidimensionnelle et à la spectrométrie de masse à temps de vol (SH-SPME et GCxGC-*tof*MS)

3.4.1.1 Protocole d'extraction des composés volatils Une fibre SPME 75 μm Carboxen/PDMS (Supelco Bellefonte, Pennsylvanie, États-Unis) a été sélectionnée et conditionnée selon les recommandations du fabricant pendant 1 heure à 300°C. Pour chaque échantillon, une masse de 1,5 grammes de fromage fondu a été placée dans le système de piégeage des composés volatils modifié, présenté en page 75, et pré-incubé pendant 30 minutes à 60°C. La fibre a ensuite été exposée à l'espace de tête pendant 30 minutes à 60°C et été désorbée thermiquement pendant 1 minute à 280°C. L'injection a été effectuée en mode splitless sur un chromatographe 6890N (Agilent, Massy, France) intégré dans un système GCxGC-*tof*MS LECO Pegasus. La première séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne capillaire de type SPB-5 (5% diphényl-, 95% diméthylpolysiloxane, longueur 30 m $\times$ diamètre interne 0,32 mm $\times$ épaisseur de film 1 μm ; Supelco, St-Germain-en-Laye, France). La seconde séparation a été réalisée sur une colonne capillaire de type DB-17 (50% diméthyl, 50% diphénylpolysiloxane, longueur 2,50 m $\times$ diamètre interne 0,178 mm $\times$ épaisseur de film 0,30 μm ; J & W, Folsom, États-Unis). La programmation de la température du four était la suivante : un palier de 5 minutes à 40°C suivi de trois rampes successives de 4°C $\cdot\text{min}^{-1}$ jusqu'à 10°C, de 8°C $\cdot\text{min}^{-1}$ jusqu'à 20°C et de 16°C $\cdot\text{min}^{-1}$ jusqu'à 230°C. Un plateau final de 5 minutes à 230°C était alors maintenu. La température du four de la seconde colonne chromatographique était systématiquement maintenue à une température de 15°C supérieure à celle de la première colonne. La durée de la cryo-modulation était fixée à 7 secondes.

La température de la ligne de transfert était de 250°C et la température de la source d'ions de 200°C. La tension du détecteur était fixée à 1600 V. Les fragments de masse ont été enregistrés pour des ratio de m/z compris entre 33 et 230 à une fréquence de 200 scans $\cdot\text{min}^{-1}$. Le traitement des chromatogrammes bidimensionnels a été réalisé à l'aide du logiciel Leco Chromatof[®] version 3.32 avec un ratio de signal sur bruit fixé à une valeur de 10.

3.4.1.2 Évaluation du risque de formation d'artéfacts Choisir le bon barème d'extraction des composés volatils en SPME est toujours une étape délicate. Il s'agit de trouver un compromis entre l'obtention d'un signal analytique satisfaisant (une température trop basse ne permet pas une désorption suffisante des composés

volatils de la matrice, particulièrement dans une matrice grasse) et le risque de générer des artéfacts. Une température de 30°C ne permet pas de piéger et de désorber en quantités suffisantes pour être analysés par SPME-GCxGC-*tof*MS des composés volatils néoformés lors de la cuisson tels que le maltol, le furanéol ou les pyrazines qui sont présents à l'état de traces dans la matrice fromagère modèle. Dans ces conditions, nous avons choisi un barème d'extraction des composés volatils qui est un compromis entre une bonne désorption des composés volatils de la matrice et une formation d'artéfacts la plus réduite possible. L'espace de tête est généré par pré-incubation pendant 30 min à 60°C puis piégé sur la fibre pendant 30 min à 60°C également. Il s'agit d'un barème relativement courant dans le domaine de l'analyse des produits alimentaires par SPME (Kataoka *et al.*, 2000).

Afin de valider ces conditions d'analyse et d'estimer l'effet d'un traitement thermique de 1h à 60°C, induit par le protocole de piégeage des composés volatils sur la fibre SPME, nous avons comparé les résultats d'analyse par SPME-GCxGC-*tof*MS :

- d'une matrice crue extraite à 60°C pendant 1 heure ce qui conduit à un traitement thermique total de 60°C pendant 1 heure.
- à ceux d'une matrice cuite à 60°C pendant 1 heure et extraite à 60°C pendant 1 heure ce qui conduit à une durée de cuisson totale à 60°C de 2 heures.

La différence entre ces deux cuissons nous a permis d'estimer l'effet d'une cuisson de 1 heure à 60°C liée à la dérive observationnelle possible et attribuable au protocole analytique d'extraction et de piégeage des composés volatils.

Les effets observés d'une heure de cuisson à 60°C sont mineurs : il n'y a pas de nouveaux composés formés. Seules les teneurs de trois composés, le 2-méthylpropanal, le 3-méthylbutanal et le furfural, sont significativement affectées. Cependant, la variation observée pour ces composés est inférieure à 2% de leur variation totale dans la gamme des températures explorées. En l'absence d'effets notoires, ce protocole d'extraction a donc été validé.

3.4.2 Analyses par chromatographie en phase gazeuse associée à l'olfactométrie (GC-MS/O)

3.4.2.1 Extraction des composés volatils 2 g d'échantillon ont été mélangés rapidement avec 8 g de sulfate de sodium anhydre (Fluka, pureté : > 99%) dans un mortier. Les composés volatils ont alors été extraits par la technique de l'espace de tête dynamique (Tekmar, Cincinnati, Ohio, États-Unis). Un aliquot de 3 grammes de ce mélange a été placé sur de la laine de verre désactivée au fond d'un extracteur en Pyrex (réf. M3, Maillères, Aubière, France). L'extraction a été réalisée à 30°C pendant 60 minutes au moyen d'un flux d'hélium de 40 ml·min⁻¹ (Air Liquide, He/U

pureté : 99,995%). Deux cartouches ont été successivement purgées. La première pendant 45 minutes et la seconde pendant 15 minutes de manière à compenser la perte des composés les plus volatils lors de piégeage de longue durée (Canac-Arteaga *et al.*, 2000). Le piège garni de Tenax TA 60-80 mesh adsorbant (Supelco Bellefonte, Pennsylvanie, États-Unis) est maintenu à 30°C. Une étape de purge de 3 minutes a été réalisée de manière à éliminer les molécules d'eau pouvant perturber l'analyse (Canac-Arteaga *et al.*, 2000). Les composés volatils ont été thermo-désorbés du piège Tenax en le portant à 180°C pendant 10 minutes et envoyés vers la zone de cryo-focalisation refroidie à -150°C par de l'azote liquide.

3.4.2.2 Sélection et entraînement des juges Les juges d'olfaction (3 hommes et 5 femmes âgés de 25 à 35 ans) ont été sélectionnés pour leur capacité à détecter et décrire correctement les odeurs. Ils ont été entraînés au cours de trois séances d'olfactométrie réalisées sur le système d'olfaction multi-voies. L'huile d'olive a été choisie pour la complexité de son aromagramme favorisant l'entraînement et la sélection des juges. Elle présente en effet un grand nombre de composés odorants et dont la gamme d'intensité odorante et les durées des pics odorants sont extrêmement variées. De plus, une grande diversité de notes aromatiques est présente dans cette matrice.

3.4.2.3 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et à l'olfaction multi-voies (GC-MS/8W-O) Les composés volatils ont été injectés en chauffant la zone de cryo-focalisation à 180°C pendant 2 minutes. La séparation s'effectue sur un chromatographe Agilent 4890D (Agilent, Massy, France) équipé d'une colonne capillaire RTX-5 (5% diphényl-, 95% diméthylpolysiloxane, longueur 60 m × diamètre interne 0,53 mm × épaisseur de film 1,50 μm ; Restek, Evry, France) soumise à un débit d'hélium constant de 8 mL·min⁻¹ (Air Liquide, He/U pureté : 99,995%). La température du four était de 40°C pendant 5 minutes suivie d'une rampe de montée en température de 4°C·min⁻¹ jusqu'à 205°C et de 5 autres minutes à 205°C. Les 8 juges ont évalué simultanément la durée (en appuyant sur un bouton poussoir), l'intensité (sur une échelle de 0 à 5) et la nature des odeurs perçues à la sortie des 8 ports d'olfaction individuels (Berdagué *et al.*, 2007).

3.4.2.4 Chromatographie en phase gazeuse couplée à l'olfactométrie (GC-MS/O et GC-GC-MS/O) Afin d'identifier les composés odeur-actifs présents dans chacune des zones des deux aromagrammes obtenus par le panel de 8 flaireurs, nous avons eu recours au système d'olfactométrie mono-voie conçu pour

fonctionner dans deux configurations distinctes. Une configuration classique de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et à l'olfactométrie (GC-MS/O) a permis de localiser les zones d'intérêt identifiées précédemment par le système d'olfactométrie multi-voies (GC-MS/8W-O). Une configuration de chromatographie bidimensionnelle de type « heart-cut » couplée à la spectrométrie de masse et à l'olfactométrie (GC-GC-MS/O) a rendu possible l'exploration détaillée de ces zones odorantes complexes.

Les analyses de GC-MS/O et GC-GC-MS/O ont été réalisées par les deux juges qui avaient réalisés les meilleures performances au cours de la sélection sur le GC-MS/8W-O.

3.4.2.5 Acquisition et traitement des données de GC-O Un enregistrement numérique des éléments de vocabulaire, d'intensité et de persistance des odeurs a été lancé à l'injection des composés volatils dans la colonne chromatographique. La fréquence d'enregistrement est de $1 \text{ scan} \cdot \text{s}^{-1}$ tout au long des 35 minutes d'olfaction. Les données ont été analysées à l'aide de la méthode VIDEO-Sniff au moyen du logiciel AcquiSniff[®] en divisant le signal olfactif total en n classes olfactives selon la méthode proposée par Berdagué et Tournayre (2002), présentée page 83. Le signal olfactif total des aromagrammes (SOT) a été exprimé comme le produit des intensités moyennes par le nombre de détections ($SOT_{Int-Det}$) de façon à localiser les zones odorantes communément et intensément perçues par les flaireurs (Berdagué *et al.*, 2007).

3.4.3 Identification des composés volatils et odorants

Une identification fiable des composés volatils et odorants a été réalisé en croisant les données obtenues sur les différents systèmes GC-MS/8W-O, GC-MS/O, GC-GC-MS/O et GCxGC-*tof*MS. Les spectres de fragmentation des composés ont été comparés à ceux issus de bases de données (NIST/EPA/NIH 2005 v2.0d, Gaithersburg, États-Unis ; Wiley 275K, 1996 ; Masslib 1999 : MSP Köfel, Koeniz, Suisse). Les indices de rétention linéaires ont été comparés à ceux issus de bases de données (Kondjoyan et Berdagué, 1996, Saint Genès Champanelle, France ; NIST/EPA/NIH 2005 v2.0d, Gaithersburg, États-Unis). En ce qui concerne l'identification des composés odeur-actifs, nous avons également eu recours à des bases de données d'odeur (Acree et Arn, 2006; Mottram, 2006) ainsi qu'à la comparaison olfactive avec les composés purs de référence.

4 Outil d'aide à l'analyse des chromatogrammes bidimensionnels

4.1 Objectifs

La chromatographie bidimensionnelle systématique est un système à haute résolution qui génère une quantité de données très importante. Le temps nécessaire à l'analyse exhaustive des données contenues dans un seul chromatogramme devient alors extrêmement élevé, et peut dépasser un mois. De plus l'intégration manuelle d'un composé dans un chromatogramme nécessite :

- de s'assurer de la bonne identification du composé pour chacune des modulations
- d'intégrer le composé pour chaque modulation (généralement 4 mais parfois 10 ou 15 modulations)
- de calculer la somme des intégrations

Il s'agit d'un travail bien plus fastidieux que dans le cas de la chromatographie conventionnelle. Il convient alors de développer des stratégies permettant, de faciliter et d'automatiser autant que possible le travail de l'analyste (Shellie *et al.*, 2002).

4.2 Démarche

Nous avons développé une approche basée sur la très bonne reproductibilité des temps de rétention des analytes selon les deux dimensions du chromatogramme. Les données chromatographiques sont d'abord traitées de façon automatique par le logiciel Leco Chromatof[®] version 3.32 avec un seuil de signal sur bruit très faible (de 10). Au cours de cette opération, les aires de pics chromatographiques sont calculées à partir du fragment de masse que le logiciel considère comme présentant le moins de co-élutions. Les composés volatils ne sont alors pratiquement jamais intégrés avec le même fragment de masse. Pour chaque chromatogramme, une liste de l'ensemble des composés est obtenue. Le programme que nous avons développé sous Matlab, permet :

- de superposer l'ensemble de ces données, afin d'apporter de la robustesse à l'identification.
- d'éliminer les mauvaises identifications induites par le traitement automatique des données (trainées, effet mémoire) en ne conservant que les composés identifiés au même temps de rétention sur les deux dimensions chromatographiques et présents dans un nombre de chromatogrammes fixé par l'analyste.
- de sélectionner le fragment d'intégration le plus fréquemment utilisé pour le

calcul des aires chromatographiques lors du traitement automatique afin de limiter le nombre des intégrations manuelles à réaliser.

- de recalculer l’aire du pic chromatographique sur le fragment d’intégration le plus fréquemment utilisé pour tous les chromatogrammes.
- dans le cas où un composé donné n’a pas été automatiquement identifié dans l’un des chromatogrammes, de le rechercher dans la zone d’élution préalablement déterminée selon son spectre de masse, afin de s’assurer qu’il est véritablement absent de ce chromatogramme et qu’il ne s’agit pas d’une mauvaise identification.

Grâce au logiciel développé, les vérifications à effectuer manuellement sont ainsi considérablement réduites. Avec ce programme, la liste des composés potentiellement présents dans les analyses a ainsi été réduite de 7000 pics chromatographiques à 500 environ. Nous avons ainsi pu établir la liste des composés volatils présents dans la matrice fromagère en une à deux journées seulement.

5 Analyse des composés non volatils

Compte tenu des contraintes expérimentales liées au système de cuisson : une faible quantité de fromage disponible après cuisson et un temps nécessaire à la réalisation des cuissons supplémentaires relativement important, les analyses de l’indice de peroxyde, des sucres, des acides aminés libres et des acides organiques ont été réalisées sans répétition sur des quantités réduites d’échantillon.

5.1 Évaluation de l’indice de peroxyde

La mesure de l’indice de peroxyde de la matière grasse extraite des fromages fondus a été effectuée par l’équipe CaliPro de l’UMR Génial (Massy, France) dans le cadre du projet Réactial.

5.1.1 Extraction de la matière grasse

Il s’agit d’obtenir un rendement d’extraction suffisamment important pour disposer de la quantité de matière grasse nécessaire à la mesure de l’indice de peroxyde (normalement 2 g) et considérer que la matière grasse extraite est représentative de celle du fromage fondu. La matière grasse a été extraite par un extracteur ASE 350 Dionex à 110°C et 1500 psi par un mélange de solvant hexane - isopropanol (3/2, v/v) selon les recommandations du fabricant (Dionex, 2004, Application note 345). Les solvants ont ensuite été évaporés par un multivapor P-12 Buchi et les dernières

traces éliminées par un flux d'azote. Avec cette méthode, environ 0,5 g de matière grasse est récupéré. Compte tenu de la teneur en matière grasse du fromage fondu de 20%, le rendement d'extraction moyen a été évalué à 85%. Nous avons donc considéré que la matière grasse extraite est représentative de celle du fromage fondu.

5.1.2 Détermination de l'indice de peroxyde de la matière grasse

L'indice de peroxyde permet l'évaluation de l'état d'oxydation de la matière grasse. Il correspond au nombre de μg d'oxygène actif par g de corps gras. La méthode de dosage a été adaptée de la méthode officielle de l'AOCS (AOCS, 2000, Cd 8-53) pour tenir compte des spécificités de la matière grasse laitière et particulièrement de la température élevée de son point de fusion. Les extraits sont fluidifiés dans un bain-marie à 50°C puis 0,2 g environ de matière grasse est pesé précisément et placé dans les tubes du titrateur automatique Metrohm 814 USB Sample Processor. 25 mL de solution acide acétique glacial / 1-décanol (3/2, v/v) placé à 50°C au bain-marie est ajouté à l'échantillon. L'ensemble est placé sous agitation jusqu'à dissolution complète de la matière grasse. 1 mL de la solution saturée d'iodure de potassium (8,5 g d'iodure de potassium dans 5 mL d'eau distillée bouillie) est ensuite incorporé et agité pendant une minute précisément. Après 5 minutes de repos à l'obscurité, 75 mL d'eau distillée est ajoutée et la solution titrée par le thiosulfate de sodium à 0,01 N. L'indice de peroxyde (IP) est alors déterminé contre un dosage à blanc par le logiciel Tiamo[®] selon la formule II.6.

$$IP = 8000 \cdot N \cdot \frac{V - V_0}{m} [\mu\text{g } O_2 / \text{g } mg] \quad (\text{II.6})$$

avec

- V : le volume versé de la solution de thiosulfate de sodium en mL
- V_0 : le volume versé du dosage à blanc en mL
- N : la normalité de la solution de thiosulfate de sodium
- m : la masse exacte de la matière grasse en g

5.2 Détermination de la teneur en sucres

La mesure de la teneur en sucres a été effectuée par le laboratoire d'analyses du centre de recherche des Fromageries Bel (Vendôme, France) selon une méthode adaptée de Rocklin et Pohl (1983). 2 g d'échantillon ont été dissous dans 100 mL d'eau osmosée. 2 mL d'acide acétique (10%, v/v) ont été ajoutés et le pH de la solution ajusté à 4,6 à l'aide d'environ 2 mL d'acétate de sodium 1 M. La séparation a été effectuée par chromatographie liquide haute performance sur colonne échangeuse

d'anions. La teneur en sucres, exprimée en grammes pour 100 grammes de fromage, était alors déterminée au moyen d'un détecteur ampérométrique pulsé.

5.3 Dosage des acides aminés libres

La teneur en acides aminés libres a été évaluée par le laboratoire Agrobio-Rennes (Vezin-Le-Coquet, France) selon les méthodes de référence AFNOR, XP V 18-113 et AFNOR, XP V 18-114 pour le tryptophane. Il s'agit d'un dosage nécessitant une séparation par chromatographie liquide haute performance sur colonne échangeuse d'ions associée à une détection colorimétrique à 440 nm (pour les imines) et 570 nm après réaction avec la ninhydrine. Elle est exprimée en grammes d'acide aminé libre pour 100 grammes de fromage.

5.4 Dosage de la furosine

5.4.1 Préparation de l'échantillon

La furosine a été mesurée selon la méthode de référence ISO (2004, DIS 18329). Un échantillon de fromage fondu contenant entre 40 et 50 mg de fromage est hydrolysé par 8 mL d'une solution d'acide chlorhydrique 8 M à 110°C pendant 23 heures. L'hydrolysate obtenu est filtré sur papier Whatman type 40. La teneur en azote total est ensuite déterminée sur 2 mL d'hydrolysate selon la méthode de Kjeldhal ISO (2001, DIS 8968-1). La teneur en protéines est alors déterminée en multipliant la teneur en azote par 6,38. Une colonne d'extraction en phase solide de type C18 - 500 mg est conditionnée en éluant successivement 5 mL de méthanol puis 10 mL d'eau distillée. 0,5 mL d'hydrolysate est ensuite introduit dans la colonne et élué à l'aide de 3 mL d'acide chlorhydrique 3 M.

5.4.2 Dosage

Le dosage est effectué par chromatographie liquide haute performance en phase inverse par paire d'ions. La séparation s'effectue à un débit de 1 mL·min⁻¹ à l'aide d'une élution par gradient d'un mélange d'une solution d'acide trifluoroacétique à 0,1% (solution A) et d'une solution d'eau, d'acétonitrile et d'acide trifluoroacétique (80; 20; 0,1, solution B). La proportion des solvants passe linéairement de 95% de A, 5% de B à 35% de A et 65 % de B en 15 minutes. La colonne est ensuite reconditionnée pendant 8 minutes avec les proportions de solvants initiales. La détection est réalisée au moyen d'un détecteur à barrettes de diodes et l'absorbance à 280 nm est utilisée pour la quantification. La teneur en furosine est alors déterminée par com-

paraison avec le signal obtenu pour une solution étalon de furosine selon la formule suivante :

$$f = \frac{A_f}{V} \cdot \frac{C_e}{A_e} \cdot \frac{d}{r} \cdot \frac{M}{10} \cdot \frac{8}{4 \cdot m} \quad (\text{II.7})$$

avec :

- f la teneur en furosine exprimée en mg pour 100 g de protéines
- V le volume en μL de solution injectée en tête de colonne ($V = 50 \mu\text{L}$)
- A_f l'aire du pic chromatographique obtenue pour l'échantillon à analyser
- C_e la quantité absolue (en pmoles) de furosine contenue dans le volume de solution étalon injectée
- A_e l'aire du pic chromatographique obtenue pour la solution étalon
- d le facteur de dilution au cours de l'extraction en phase solide ($d = 6$)
- r le taux de récupération au cours de la micro-extraction en phase solide ($r = 0,95$)
- M la masse molaire moléculaire de la furosine ($M = 254 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
- m la teneur en protéines dans 2 mg d'hydrolysats exprimée en mg

5.5 Dosage des acides organiques

La teneur en acides organiques a été effectuée par le laboratoire d'analyses du centre de recherche des Fromageries Bel. 2 g de fromage fondu sont broyés pendant 1 minute et hydrolysés pendant 15 minutes dans 100 mL de solution d'acide sulfurique 0,01 N à 50°C. La solution ainsi obtenue est ensuite filtrée sur papier Whatman 44 puis microfiltrée à 0,45 μm . Les acides organiques présents dans la solution ainsi obtenue sont séparés par chromatographie liquide haute performance sur une colonne d'exclusion ionique. La détection s'effectue alors par conductimétrie.

5.6 Autres mesures

5.6.1 Mesure du pH

Le pH a été mesuré immédiatement après la cuisson dans l'échantillon refroidi à 20°C au moyen d'un pH-mètre Mettler Toledo MA 235 équipé d'une sonde pénétrométrique.

5.6.2 Détermination des extraits secs

Les extraits secs ont été déterminés par pesée après dessiccation à l'étuve à 102°C selon la méthode de référence de FIL-IDF (1982, 4A 1-2).

5.6.3 Mesures de couleur

5.6.3.1 Évaluation de la couleur La couleur a été mesurée dans l'espace colorimétrique CIE Lab sur la face supérieure du fromage fondu modèle à l'aide d'un spectrocolorimètre Konica-Minolta CM-2500d. 5 mesures ont été effectuées en mode de réflexion spéculaire exclue (SCE) avec un angle de visée de 10° et un illuminant D65 (type lumière du jour). Le résultat moyen a été conservé. Les indices colorimétriques (ΔE) et chromatiques (ΔC) ont été respectivement déterminés par rapport à la matrice fromagère modèle non cuite à l'aide des formules suivantes :

$$\Delta E = \sqrt{(L_0 - L)^2 + (a_0 - a)^2 + (b_0 - b)^2} \quad (\text{II.8})$$

$$\Delta C = \sqrt{(a_0 - a)^2 + (b_0 - b)^2} \quad (\text{II.9})$$

avec :

- L la luminance (0 (noir) < L < 100 (blanc))
- a la composante rouge (-120 (vert) < a < 120 (rouge))
- b la composante jaune (-120 (jaune) < b < 120 (bleu))
- L_0 , a_0 et b_0 les valeurs de la matrice fromagère modèle non cuite

5.6.3.2 Corrélation avec la formation des mélanoidines Les expériences de dialyse menées par Hofmann (1998b) ont permis d'établir dans les systèmes « sucre-caséine » que le développement de la couleur est presque exclusivement obtenu par la formation de liaisons entre des oligomères protéiques et des produits de faibles poids moléculaires issus de la réaction de Maillard. Brands *et al.* (2002) ont étudié la quantification des mélanoidines formées au cours de la cuisson d'un système glucose-caséine et fructose-caséine. Ils démontrent que le coefficient d'extinction molaire des mélanoidines formés n'est pas significativement différent dans les deux systèmes. Les produits de faibles poids moléculaires issus de la réaction de Maillard à partir de ces deux sucres, sont en effet de nature très proches. Ce sont ces produits qui vont venir se fixer sur le squelette protéique pour former les mélanoidines. Dans ce cas, les mélanoidines s'enrichissent progressivement en composés non azotés et le ratio carbone / azote des mélanoidines va augmenter progressivement (Brands *et al.*, 2002). Morales et Jimenez-Perez (1998) ont étudié la formation de la couleur dans un système glucose-caséine et lactose-caséine. En comparant les résultats obtenus dans ces deux études, nous avons pu estimer un coefficient chromatique (C_c) permettant d'évaluer la variation de Chroma (ΔC) en fonction du nombre de moles de carbone

(n_c) fixées sur les protéines (équation II.10).

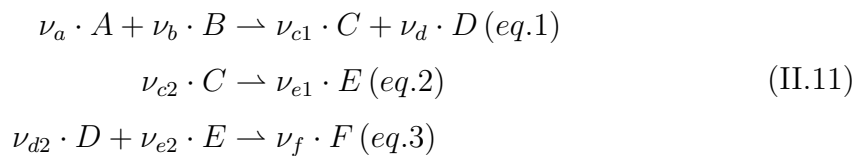
$$\Delta C = C_c \times n_c \quad (\text{II.10})$$

Cette relation n'est toutefois valable que dans la zone de réponse linéaire de l'indice chromatique, c'est à dire pour une valeur d'indice chromatique inférieure à 25-30. Dans ce cas, la valeur de C_c estimée est de l'ordre de $1,3 \cdot 10^9 \text{ mol}^{-1}$. Étant donné que les milieux étudiés entre ces études ne sont pas rigoureusement identiques, de même que notre matrice modèle, il s'agit d'une estimation grossière et des travaux complémentaires de quantification seraient à réaliser de façon à prendre en compte les spécificités de la matrice fromagère modèle. Cependant, cette valeur pourra servir de valeur initiale dans le travail d'identification des paramètres du modèle et pourra ensuite être ajustée afin de prédire l'évolution de l'indice chromatique de la matrice fromagère au cours des traitements.

6 Modélisation stœchio-cinétique multi-réponses

6.1 Du schéma réactionnel aux équations différentielles ordinaires

Considérons le schéma réactionnel représenté par les trois équations stœchiométriques suivantes :



Dans ce cas, ν_a représente par exemple le nombre de moles de la molécule A impliqué dans la réaction. Par convention, les réactifs consommés pendant la réaction sont comptés négativement et les produits formés positivement.

Le schéma réactionnel est formalisé sous forme d'un bilan de matière dans la matrice des stœchiométries présentée dans le tableau II.6.

Tab. II.6 – Bilan de matière formalisé sous la forme d'une matrice des stœchiométries

réaction	A	B	C	D	E	F
1	- ν_a	- ν_b	ν_{c1}	ν_{d1}	0	0
2	0	0	- ν_{c2}	0	ν_{e1}	0
3	0	0	0	- ν_{d2}	- ν_{e2}	ν_f

De façon générale, le système d'équation de j réactions comprenant i constituants est équilibré si quelle que soit la réaction j considérée :

$$\sum_{i=1}^n \nu_{ij} \cdot A_{ij} = 0 \quad (\text{II.12})$$

La vitesse de réaction r_1 de l'équation 1 est donnée par :

$$r_1 = -\frac{1}{\nu_a} \frac{d[A]}{dt} = -\frac{1}{\nu_b} \frac{d[B]}{dt} = \frac{1}{\nu_c} \frac{d[C]}{dt} = \frac{1}{\nu_d} \frac{d[D]}{dt} \quad (\text{II.13})$$

D'après le principe d'action des masses, la vitesse de réaction d'une réaction élémentaire est de plus proportionnelle au produit des concentrations des réactifs. La vitesse de consommation du composé A est ainsi donnée par

$$r_A = -\frac{1}{\nu_a} \frac{d[A]}{dt} = -\frac{1}{\nu_a} \cdot k_1 \prod_{i=1}^n c_i^{\nu_i} = -k_1 \cdot [A]^{\nu_a} \cdot [B]^{\nu_b} \quad (\text{II.14})$$

avec k_1 la constante de vitesse de la réaction 1.

La lecture horizontale de la matrice des stœchiométries permet de déduire instantanément les vitesses de chacune des réactions à partir des équations II.13 et II.14 :

$$\begin{aligned} r_1 &= k_1 \cdot [A]^{\nu_a} \cdot [B]^{\nu_b} \\ r_2 &= k_2 \cdot [C]^{\nu_{c2}} \\ r_3 &= k_3 \cdot [D]^{\nu_{d2}} \cdot [E]^{\nu_{e2}} \end{aligned} \quad (\text{II.15})$$

Alors que la lecture verticale permet de déduire la variation de chaque constituant au cours du temps et d'établir le système des équations différentielles ordinaires à résoudre présenté en équation II.16.

$$\begin{aligned} \frac{d[A]}{dt} &= -\nu_a \cdot r_1 + 0 \cdot r_2 + 0 \cdot r_3 = -\nu_a \cdot k_1 \cdot [A]^{\nu_a} \cdot [B]^{\nu_b} \\ \frac{d[B]}{dt} &= -\nu_b \cdot r_1 + 0 \cdot r_2 + 0 \cdot r_3 = -\nu_b \cdot k_1 \cdot [A]^{\nu_a} \cdot [B]^{\nu_b} \\ &\dots \\ \frac{d[E]}{dt} &= 0 \cdot r_1 + \nu_{e1} \cdot r_2 - \nu_{e2} \cdot r_3 = \nu_{e1} \cdot k_2 \cdot [C]^{\nu_{c2}} - \nu_{e2} \cdot k_3 \cdot [D]^{\nu_{d2}} \cdot [E]^{\nu_{e2}} \\ \frac{d[F]}{dt} &= 0 \cdot r_1 + 0 \cdot r_2 + \nu_f \cdot r_3 = \nu_f \cdot k_3 \cdot [D]^{\nu_{d2}} \cdot [E]^{\nu_{e2}} \end{aligned} \quad (\text{II.16})$$

L'avantage de cette représentation est que la stœchiométrie des réactions peut être vérifiée facilement. Ainsi, aucune erreur ne peut être faite avec les coefficients stœ-

chiométriques dans l'écriture des constantes de vitesse, y compris lors de la programmation, puisque ceux-ci sont recherchés de façon générique directement dans la matrice des stœchiométries.

6.2 Outil de résolution numérique

Les modèles présentés dans ce mémoire ont été développés à l'aide du logiciel **Matlab R2009a**[®] (The MathWorks, MA, Etats-Unis) équipé des boîtes à outils d'optimisation et de statistiques associées.

6.3 Paramétrisation

6.3.1 Nombre de paramètres identifiables

Soit un modèle $M(\theta)$ dont on cherche à déterminer les paramètres θ . On dit que le modèle est structurellement globalement identifiable si et seulement si $M(\theta) = M(\theta')$ implique que $\theta = \theta'$. Ce sera le cas du modèle stœchio-cinétique multi-réponses, si et seulement si le rang de la matrice des stœchiométries est supérieur ou égal au nombre de paramètres du modèle.

6.3.2 Constantes de vitesse

Les constantes de vitesse d'une réaction chimique sont généralement dépendantes de la température. Le plus souvent une loi d'Arrhénius est utilisée pour décrire cette dépendance selon l'équation II.17.

$$k_T = k_0 \cdot \exp \frac{-E_a}{R \cdot T} \quad (\text{II.17})$$

avec :

- k_T la valeur de la constante de vitesse à la température T exprimée en s^{-1} (pour une réaction d'ordre 1)
- k_0 le facteur pré-exponentiel exprimé en s^{-1} (pour une réaction d'ordre 1)
- E_a l'énergie d'activation exprimée en $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$
- R la constante des gaz parfaits exprimée en $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
- T la température exprimée en K

Cependant, le schéma réactionnel proposé est uniquement apparent. En effet, toutes les réactions ne sont pas nécessairement élémentaires. De plus, les données ne sont pas quantifiées. Les constantes de vitesse identifiées seront donc également apparentes et devront prendre en considération les variations des coefficients de partage des composés volatils de la matrice fromagère vers l'espace de tête lors de l'analyse.

Ces variations peuvent être liées aux modifications de texture de la matrice induites au cours de la cuisson par exemple.

Dans ces conditions, nous ne disposons initialement ni de l'information relative aux lois de dépendance à la température des différentes constantes de vitesse, ni de valeurs initiales suffisamment réalistes pour permettre d'initialiser l'optimisation numérique.

L'idée consistera alors à rechercher pour chaque température de plateau considérée (80, 100, 120, 135 et 150°C) les valeurs de chacune de ces constantes de vitesse. Ceci nécessitera 5 optimisations indépendantes (une par température).

Dans le cas où l'une des constantes de vitesse k_i suivrait une loi de dépendance à la température caractéristique, cette loi serait alors incorporée au modèle et un reparamétrage effectué. Dans le cas d'une loi d'Arrhénius, la constante de vitesse k_i serait ainsi fonction du facteur pré-exponentiel k_{i0} et de l'énergie d'activation E^{ai} . Une dernière optimisation sera alors effectuée. Au cours de celle-ci, la température expérimentale à cœur de la matrice fromagère sera donnée comme variable d'entrée. Puisque la cellule de cuisson servant à la réalisation des différentes analyses n'est pas équipée d'un thermocouple, il s'agit en réalité d'une température expérimentale estimée. Cette estimation est réalisée au moyen du modèle de simulation numérique des traitements thermiques présenté précédemment en page 62. Pour chaque niveau de température, une cinétique de température moyenne est ainsi obtenue à partir des estimations réalisées pour les 3 répétitions de la cuisson la plus longue de la température considérée.

6.3.3 Coefficients de quantification apparents

Nous ne disposons pas, pour les composés volatils, de données expérimentales quantifiées mais seulement semi-quantifiées. Ceci s'explique par les challenges analytiques que constituent :

- la quantification des mélanoidines présentée page 94
- la quantification de petites molécules dans une matrice aux propriétés de texture variables présenté page 70.

Nous avons donc ajouté le coefficient chromatique apparent (C_c) au modèle afin de pouvoir ajuster à notre expérience la valeur déterminée à partir des données issues de la littérature page 95.

Il faudrait également ajouter pour chaque composé volatil (i), un coefficient de quantification global apparent ($K_{p/m}^i$) permettant de passer des données semi-quantifiées (aire de pic chromatographique p du composé i) aux données quantifiées (teneur du composé i dans la matrice m) nécessaires au modèle.

Ceci conduirait à ajouter autant de paramètres supplémentaires au modèle que de composés volatils. Dans de telles conditions, il est évident que le modèle ne serait plus globalement identifiable.

Il convient alors de formuler des hypothèses, sur les coefficients de quantification apparents de chacun des composés volatils analysés par SPME afin de réduire le nombre de paramètres supplémentaires. Les conditions d'analyses étant identiques pour tous les échantillons, il n'y a pas d'effet de la température sur les coefficients de partage et donc sur les coefficients de quantification apparents non plus. Nous avons, en première approximation, émis l'hypothèse que tous les composés volatils ont un seul et unique coefficient de quantification global apparent K et que ce dernier est constant quelle que soit la texture de la matrice fromagère au moment de son analyse.

Même s'il s'agit d'une hypothèse grossière qui pré-suppose que tous les composés volatils ont le même coefficient de partage et qu'ils réagissent de manière similaire lors de la fragmentation et de l'analyse dans le spectromètre de masse, K n'est pas susceptible de varier d'un grand nombre d'ordre de grandeur. Cette hypothèse permet d'initier le travail de modélisation qui nécessite des données quantifiées.

6.4 Résolution numérique du système d'équations différentielles ordinaires.

La résolution du système d'équations différentielles ordinaires est assurée au moyen d'une discrétisation temporelle du système. Elle est réalisée directement par le solveur de Matlab sélectionné. Nous avons d'abord essayé d'utiliser le solveur ode45. Cependant, lorsque les variations de température étaient introduites, la durée de calcul devenait rédhibitoire et le système ne convergeait pas en un temps raisonnable. Dans notre étude, le système est d'abord placé en régime transitoire au cours de la cinétique de montée en température. Pendant cette période, la discrétisation temporelle s'effectue avec des pas de temps très faibles. Dans ce cas, la résolution du système nécessite le recours à des échelles de temps très différentes. Pour cette raison, le solveur ode15s qui est un solveur adapté aux systèmes raides, apparemment plus adapté à la résolution de ce type d'équations, lui a été préféré (Shampine et Reichelt, 1997; Shampine *et al.*, 1999).

6.5 Ajustement numérique des paramètres du modèle et estimation des incertitudes

Il s'agit de l'étape d'optimisation à proprement parler. Au cours de cette étape, un algorithme va permettre, en minimisant une fonction appelée « critère d'optimisation », d'ajuster la valeur des différents paramètres de manière à ce que les données issues du calcul se rapprochent le plus possible des données expérimentales.

Le choix du critère d'optimisation prend donc une importance capitale. Nous avons choisi de considérer la méthode du maximum de vraisemblance (Myung, 2003) présentée ci-dessous. Elle présente l'avantage de permettre le calcul des incertitudes associées à chaque paramètre optimisé. Compte tenu du nombre de paramètres à optimiser, nous avons choisi de réaliser une optimisation sous contraintes, afin de pouvoir restreindre le domaine dans lequel cette optimisation est effectuée. De plus, il s'agit d'effectuer une optimisation sous contraintes de positivité. En effet, les valeurs des constantes de vitesse et d'énergie d'activation que nous cherchons à déterminer sont nécessairement positives. Pour cela, nous avons utilisé la fonction `fmincon` de Matlab qui permet entre autre de borner les composantes du vecteur de paramètres θ que l'on cherche à optimiser. L'utilisation de cette fonction restreint le choix des algorithmes à utiliser pour la minimisation du critère d'optimisation. Nous en avons testé deux qui sont les algorithmes du point intérieur « interior point algorithm » (Nemirovski et Todd, 2008) et de l'activation des contraintes, « active-set algorithm » (Rakowska *et al.*, 1991).

6.5.1 Méthode du maximum de vraisemblance

La méthode du maximum de vraisemblance est issue des théories de l'inférence Bayésienne.

En pratique, on dispose d'un ensemble $\{X_1, X_2, \dots, X_n\}$ de mesures expérimentales et d'un ensemble $\{Y_1(\theta), Y_2(\theta), \dots, Y_n(\theta)\}$ de données simulées au moyen d'un modèle comportant un ensemble de paramètres θ . L'estimation a pour objectif de trouver les valeurs possibles de θ qui permettent d'ajuster au mieux les données simulées aux données expérimentales.

On considère que la différence observée entre X_i et Y_i représente une erreur. Dans le cas hypothétique où le modèle décrit la réalité, cette erreur représenterait uniquement une erreur de mesure expérimentale. La probabilité d'observer Y_i sachant la valeur des paramètres θ est donnée par :

$$P(Y_i/\theta) = f_i(Y_i - X_i) \quad (\text{II.18})$$

où f_i représente la densité de probabilité de l'erreur pour la mesure i .

On suppose également que les erreurs de mesure sont indépendantes les unes des autres. Dans ce cas, la probabilité d'observer l'ensemble des erreurs est égale au produit des probabilités individuelles. La fonction de vraisemblance associée $L(\theta)$ est alors définie par :

$$L(\theta) = \prod_{i=1}^n f_i(Y_i(\theta) - X_i) \quad (\text{II.19})$$

On admet que les erreurs sont aléatoires et à moyenne nulle. Dans ce cas, la densité de probabilité f_i suit une distribution normale de moyenne (m) nulle et d'écart type (σ_i). La fonction de vraisemblance s'exprime alors :

$$L(\theta) = \prod_{i=1}^n \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_i^2}} \cdot \exp\left(-\frac{(Y_i(\theta) - X_i - m)^2}{2\sigma_i^2}\right) \quad (\text{II.20})$$

Dans le cas où toutes les erreurs ont la même variance σ^2 , la maximisation de la fonction de vraisemblance logarithmique définie par $l(\theta) = \log(L(\theta))$ conduit alors à minimiser la différence entre les données au sens des moindres carrés.

$$l(\theta) = \log(L(\theta)) = -\frac{n}{2}\log(\sigma^2) - \frac{n}{2}\log(2\pi) - \frac{1}{2\sigma^2} \sum_{i=1}^n (Y_i(\theta) - X_i)^2 \quad (\text{II.21})$$

$l(\theta)$ est bien maximale lorsque la somme du carré des écarts $\sum_{i=1}^n (Y_i(\theta) - X_i)^2$ est la plus faible.

6.5.2 Estimation des incertitudes

Le coefficient de la matrice d'information de Fischer I d'indice (i,j) est défini par :

$$I_{(i,j)}(\theta) = -\frac{\partial^2}{\partial\theta_i\partial\theta_j} l(\theta) = -H_{(i,j)}(\theta) \quad (\text{II.22})$$

où $H(\theta)$ représente la matrice Hessienne de θ .

La matrice de covariance des paramètres estimés V est alors l'inverse de la matrice d'information : $V=I^{-1}$

L'erreur standard de chaque paramètre (σ_{θ_i}) peut être estimée à partir de la matrice de covariance des paramètres estimés selon la formule :

$$\sigma_{\hat{\theta}_i} = \sqrt{\text{cov}(\hat{\theta}_i, \hat{\theta}_i)} \quad (\text{II.23})$$

Dans ces conditions, l'intervalle de confiance peut être estimé à l'aide de la table

des valeurs critiques de Student, suivant l'équation :

$$IC(\hat{\theta}_i) = \hat{\theta}_i \pm t_{(1-\alpha/2),\nu} \cdot \sigma_{\hat{\theta}_i} \quad (\text{II.24})$$

avec :

- α le niveau de confiance associé à l'estimation de l'intervalle de confiance. Par exemple $\alpha = 0,95$.
- ν le nombre de degrés de liberté du système correspondant au nombre de données expérimentales moins le nombre de paramètres estimés moins le nombre de relations entre paramètres.
- $t_{(1-\alpha/2),\nu}$ la valeur critique de t déterminée dans la table de Student.

6.6 Représentativité du modèle stœchio-cinétique et validité de l'estimation des paramètres

Une fois le vecteur de paramètres θ optimisé, il convient de vérifier que les résidus soient normalement distribués. Dans ce cas, cela confirme que l'erreur expérimentale est aléatoire. Le cas échéant, cela pourrait indiquer la présence d'une éventuelle erreur systématique ou inciter à remettre en cause le modèle. De manière analogue, un intervalle de confiance large sur l'un des paramètres ajustés signifierait qu'il existe une incertitude importante sur ce paramètre. Cela pourrait également indiquer que ce paramètre n'est pas indépendant d'autres paramètres du modèle, ou bien qu'il n'a que peu d'influence sur les prédictions réalisées par le modèle établi. Dans les deux cas, ceci invite à reconsidérer la paramétrisation du modèle, de manière à rendre ce paramètre indépendant des autres, ou à le supprimer du modèle.

Conclusion des Matériels et Méthodes

Au cours de cette partie, nous avons présenté les développements méthodologiques apportés afin de faire face à des challenges de nature :

- méthodologiques (verrous 1 et 2 de la figure 1) rencontrés au cours de la cuisson d'une matrice fromagère. Il est en effet difficile en conditions industrielles de bien appréhender les effets du traitement thermique sur l'évolution des constituants volatils et odorants d'une matrice de fromage fondu en raison, de la variabilité et de la complexité des matières premières utilisées, des procédés de cuisson par injection directe de vapeur, ou de refroidissement flash.
- analytiques liés à la problématique de l'analyse des composés volatils traces et ultra-traces dans une matrice alimentaire, et en particulier des composés

odorants (verrou 3).

- liés à la modélisation stœchio-cinétique multi-réponses (verrou 4) de systèmes réactionnels très complexes appliqués à un produit alimentaire réel, et en particulier lorsque les données à modéliser ne peuvent pas véritablement être quantifiées.

Dans ce contexte, nous avons développé et présenté des réponses originales pour :

- la mise au point d'une formulation de matrice fromagère modèle et de son mode de préparation à froid, qui permet d'assurer la dissociation des étapes de formulation et de cuisson de la matrice fromagère tout en conservant une texture de produit comparable à celle d'un produit industriel.
- la réalisation d'un système de cuisson clos, assurant des cinétiques de traitement thermique comparables aux conditions industrielles. Il permet d'explorer un domaine thermique élargi par rapport aux conditions industrielles, tout en étant respectueux de la fraction volatile.
- l'utilisation des systèmes de chromatographie bidimensionnelle de type « heart-cut » ou totale, et la mise en place d'outils informatiques permettant une exploitation rationnelle et rapide des données obtenues.
- l'adaptation des techniques de modélisation stœchio-cinétique multi-réponses appliquées à des systèmes réactionnels complexes mis en œuvre sur des analyses non quantifiées de composés volatils et l'utilisation des méthodes numériques d'optimisation permettant de déterminer les valeurs apparentes des paramètres cinétiques considérés.

Résultats et Discussions

Introduction des Résultats et Discussions

Les développements méthodologiques présentés précédemment ont permis de lever au moins partiellement les verrous liés aux contraintes analytiques et méthodologiques (verrous n°1 et 2). Il a ainsi été possible d'identifier des marqueurs des principales familles de composés volatils se formant au cours des traitements thermiques appliqués à une matrice fromagère.

Dans ce contexte, nous présenterons la mise en œuvre des expérimentations, visant à identifier les marqueurs des traitements thermiques (verrou n°3) appliqués à la matrice fromagère. Nous présenterons ensuite, la construction du schéma réactionnel résultant de la confrontation des marqueurs des traitements thermiques avec les connaissances théoriques issues de la littérature sur la réaction de l'oxydation des lipides et sur la réaction de Maillard (verrous n°3 et 4). Nous aborderons enfin, la modélisation proprement dite, consistant en l'identification des différents paramètres du modèle à partir des variations des marqueurs réactionnels mesurées expérimentalement.

1 Recherche des marqueurs des traitements thermiques

La démarche de modélisation souhaitée dans le cadre du projet Réactial implique l'identification de marqueurs réactionnels qui pourront être suivis tout au long du procédé de fabrication. Un bon marqueur de réaction est alors défini comme un composé impliqué, en tant que substrat, intermédiaire réactionnel ou produit dans la réaction considérée. Il permet par sa spécificité de suivre une voie réactionnelle. D'un point de vue pratique, son dosage doit être réalisable avec une précision suffisante et sa teneur doit significativement varier dans le domaine expérimental considéré. Les composés qui présentent en outre, un intérêt d'ordre organoleptique, nutritionnel ou sanitaire permettent d'introduire dans la modélisation une réponse de nature qualitative. La figure III.1 représente schématiquement la démarche mise en œuvre afin d'identifier les composés volatils marqueurs des traitements thermiques.

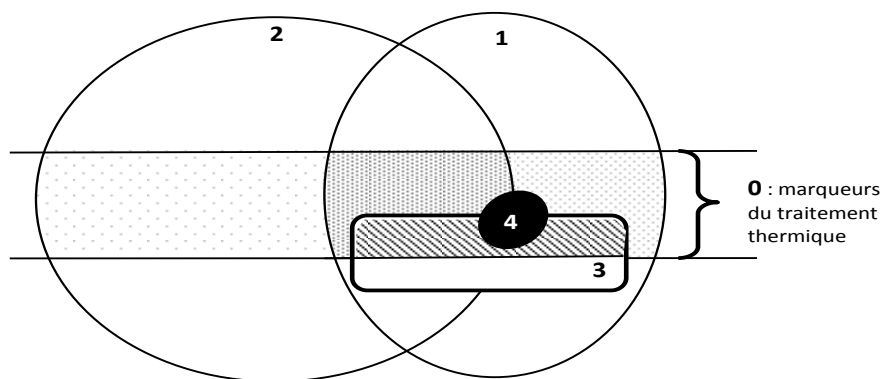


Fig. III.1 – Démarche expérimentale mise en œuvre pour la recherche des marqueurs des traitements thermiques. Pour être retenu, un marqueur doit satisfaire à plusieurs conditions :

- 0 : être significativement affecté ($p < 0,05$) par le traitement thermique.
- 1 : appartenir à la fraction volatile de la formulation modèle simplifiée.
- 2 : si possible appartenir à la fraction volatile des formulations réelles.
- 3 : si possible appartenir à la fraction odorante active.
- 4 : être intégrable dans un schéma réactionnel connu.

Il s'agit de croiser les composés volatils influencés par les traitements thermiques appliqués à des produits pilotes fabriqués dans le but de favoriser l'apparition de défauts liés aux réactions de Maillard et d'oxydation des lipides à ceux obtenus à partir d'une formulation modèle simplifiée. Les molécules présentant un intérêt organoleptique vis à vis de l'apparition de défauts de flaveur se produisant au cours des

traitements thermiques appliqués à la matrice fromagère ont également été recherchés. Enfin, les molécules ainsi retenues doivent, sur la base des connaissances issues de la littérature, pouvoir être intégrées dans un schéma réactionnel de la réaction de Maillard ou de l'oxydation des lipides.

1.1 Recherche des marqueurs sur des cuissons réalisées en pilote industriel

1.1.1 Démarche expérimentale

Nous avons tout d'abord essayé d'identifier les marqueurs de traitements thermiques directement sur des produits obtenus en système pilote discontinu. Ceci présentait l'avantage de pouvoir commencer l'identification des marqueurs réactionnels parallèlement à la mise au point du système de cuisson de laboratoire. Cependant, le traitement thermique en système pilote discontinu implique l'injection directe de vapeur d'eau. Ceci peut conduire à la formation de points chauds, jusqu'à 140°C, au niveau des buses d'injection de vapeur. De tels points chauds pourraient induire la formation de composés volatils néoformés qui ne se produiraient pas aux températures normalement considérées. Afin de minimiser ce risque, nous avons décidé de travailler en utilisant un barème thermique identique pour toutes les fabrications. Dans le but de favoriser la formation des produits issus des réactions de Maillard ou de l'oxydation des lipides, seule la composition de la matrice fromagère a été amenée à varier.

1.1.1.1 Formulations réalisées 3 formulations différentes ont été réalisées. Une formulation témoin (**T**). Une formulation enrichie en lactose et matière azotée totale, grâce à des teneurs en Cheddar et poudres de lait écrémées plus importantes que le témoin afin de favoriser la formation des produits issus de la réaction de Maillard (**L⁺M⁺**). Enfin, une formulation enrichie en matière grasse, grâce à des teneurs en Cheddar et beurre plus importantes que le témoin, afin de favoriser l'obtention des produits d'oxydation des lipides (**G⁺**).

Dans le but d'évaluer l'importance de la qualité initiale des matières premières, chaque formulation a été complétée par une formulation dont les poudres de lait ont été préalablement placées dans une étuve à 37°C pendant 5 mois (**L⁺M⁺ple**) et une formulation dont le beurre a été placé dans une étuve à 20°C pendant 3 semaines (**G⁺b**). Les teneurs en eau, en lactose, en matière azotée totale, en matière grasse et en chlorure de sodium de chacun des produits réalisés ont été analysées.

Les produits fabriqués ont été jugés conformes aux objectifs de formulation présentés en figure III.2.

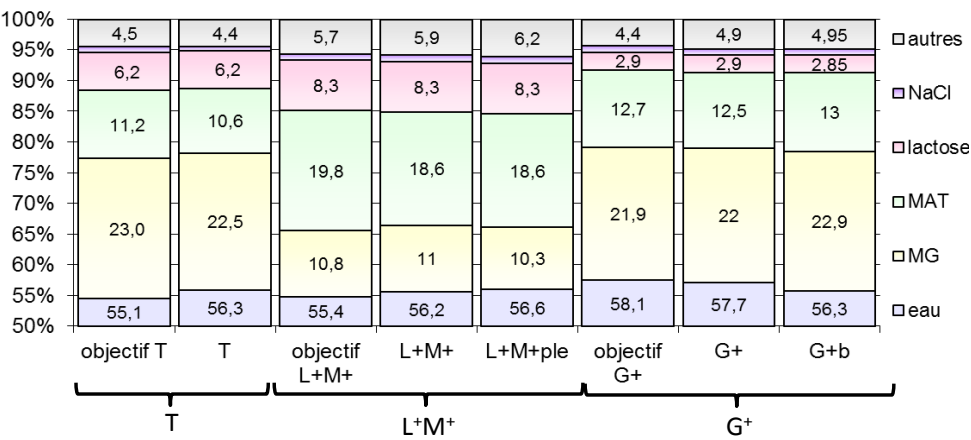


Fig. III.2 – Composition des différents produits pilotes par rapport à l’objectif de formulation : **T** : formulation témoin; **L⁺M⁺** : formulation enrichie en Cheddar et poudres de lait et visant à favoriser la réaction de Maillard; **L⁺M⁺ple** : formulation visant à favoriser la réaction de Maillard et dont les poudres de lait ont été placées à l’étuve à 37°C pendant 5 mois; **G⁺** : formulation enrichie en Cheddar et beurre et visant à favoriser la réaction d’oxydation des lipides; **G⁺b** : formulation visant à favoriser la réaction d’oxydation des lipides et dont le beurre a été placé pendant 3 semaines à 20°C; La teneur en NaCl est inférieure à 1%.

1.1.1.2 Barème thermique employé Un procédé de fabrication en système pilote discontinu classique a été utilisé. Le barème thermique appliqué comportait une phase de montée en température de 20°C à 120°C en 4 minutes 30 environ, d’un chambrage à 120°C maintenu pendant 30 secondes et enfin d’une étape de texturation, malaxage à 85-90°C pendant 10 minutes.

Au cours de la fabrication et du stockage de ces fromages fondus, 3 prélèvements successifs ont été réalisés sur : le mélange des matières premières (**mp**), le produit fini (**pf**) et le produit stocké pendant 1 mois à 37°C (**ps**).

1.1.2 Résultats obtenus

1.1.2.1 Identification des composés volatils Les analyses ont été effectuées conformément au protocole décrit page 85. L’analyse automatique des chromatogrammes obtenus conduit à la proposition de 7 000 à 11 000 structures selon les produits considérés. L’outil d’aide à l’analyse des lots de chromatogrammes bidimensionnels présenté page 89 a été utilisé et a permis d’identifier avec fiabilité plus de 400 composés volatils. 209 d’entre eux ont été systématiquement intégrés. La liste exhaustive de ces 209 molécules est donnée en annexe 1. Afin de tenter de s’af-

franchir de la dilution des composés dans la matrice imposée par l'injection directe de vapeur au cours des traitements thermiques, les données ont été corrigées par rapport à l'extrait sec de l'échantillon analysé.

1.1.2.2 Influence du traitement thermique et de la formulation Une analyse de variance à deux facteurs a été réalisée selon le modèle présenté ci-dessous.

$$X_{i,j} = \mu + F_i + P_j + \epsilon \quad (\text{III.1})$$

- $X_{i,j}$ représente l'effet observé sur la matrice fromagère soumise à la formulation F_i et prélevée au cours de l'étape P_j du procédé de fabrication.
- F_i représente la formulation de la matrice, $F_i \in \{T, L^+M^+, G^+\}$.
- P_j représente le degré d'avancement lors du prélèvement au cours du procédé de fabrication, $P_j \in \{\text{mp, pf, ps}\}$.

L'effet des interactions n'a pas été étudié en raison de l'absence de répétitions pour cette expérience. De plus, les différences observées entre les matrices fromagères L^+M^+ et L^+M^{+ple} ainsi qu'entre G^+ et G^{+b} étant finalement minimales, seuls trois niveaux ont été réalisés pour le facteur formulation. Une vision multivariée de l'évolution de la composition au cours des traitements a été obtenue par une analyse en composantes principales réalisée à partir de l'ensemble des composés volatils significativement affectés par la formulation ou par l'avancement du procédé de fabrication. Tous les calculs ont été faits à partir de données centrées réduites.

La figure III.3 présente la projection des matrices fromagères et des composés volatils affectés par la formulation ($p < 0,05$) sur les composantes principales 1 et 2.

Les résultats mettent en évidence 16 composés volatils significativement influencés par la formulation quel que soit le degré d'avancement du traitement thermique ($p < 0,05$). Ces composés permettent de séparer correctement les matrices fromagères selon leur formulation. La teneur de ces composés dans la matrice varie donc principalement selon les modifications de formulation réalisées. En particulier, le 1-méthyl,1H-pyrrole est susceptible de se former au cours de la réaction de Maillard qui se produit lors du stockage des poudres de lait (Ferretti et Flanagan, 1971). Nous observons que sa teneur est la plus importante dans le produit dont les poudres ont été placées à l'étuve à 37°C pendant 5 mois.

La figure III.4 présente la projection suivant les composantes principales 1 et 2 des matrices fromagères et des composés volatils affectés par l'avancement du procédé de fabrication.

Dans ce cas, 78 composés volatils sont significativement influencés par le degré d'avancement du traitement thermique ($p < 0,05$). Ces composés permettent de dis-

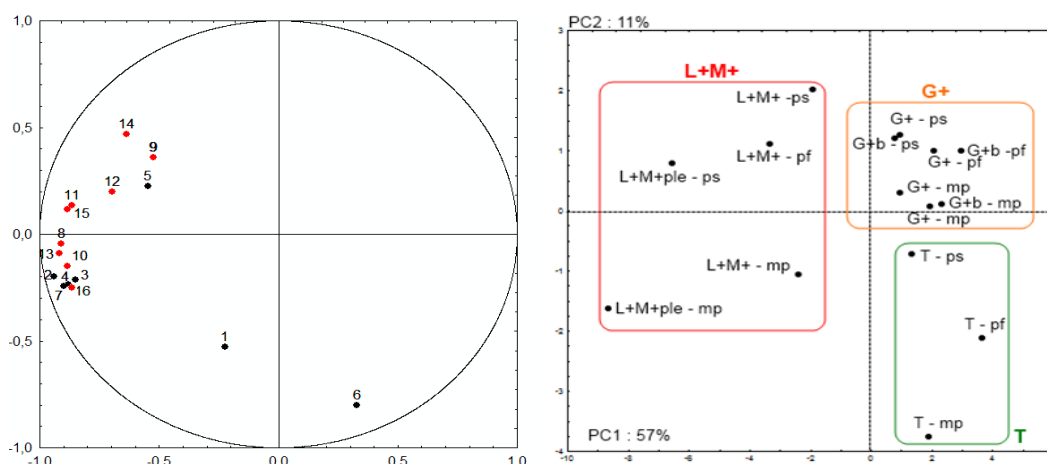


Fig. III.3 – Analyse en composantes principales PC1 *vs* PC2 de toutes les variables (à gauche) influencées par la formulation ($p<0,05$) et de tous les échantillons (à droite). PC1 et PC2 sont responsables respectivement de 57% et 11% de la variance totale. Les identifiants des échantillons représentent l'avancement au cours du procédé de fabrication : mp : le mélange des matières premières ; pf : le produit fini ; ps : le produit stocké. Les numéros de variables représentent les composés volatils selon la liste ci-dessous : Composés issus de la dégradation des lipides (points noirs) : 1 : 3-méthylbutanol ; 2 : acide 2-méthylbutanoïque ; 3 : acide hexanoïque ; 4 : méthyl thiolacétate ; 5 : nonanal ; 6 : acide penta-noïque. Composés issus de la réaction de Maillard (points rouges) : 7 : 1-méthyl,1H-pyrrole ; 8 : 2-méthylbutanal ; 9 : 5-méthyl,2(3H)-furanone ; 10 : dihydro-3-méthyl,2(3H)-furanone ; 11 : 2,5-diméthylpyrazine ; 12 : 2H-pyran-2-one ; 13 : tétrahydro,2H-pyran-2-one ; 14 : benzèneacétaldéhyde ; 15 : méthylpyrazine ; 16 : pyridine.

criminer correctement les matrices fromagères selon le traitement thermique qu'elles ont subi.

La projection des composés volatils sur le cercle des corrélations est porteuse de nombreuses informations. Les variables se répartissent en deux catégories : à gauche du cercle de corrélation, celles dont la teneur augmente au cours de l'avancement du procédé de fabrication et à droite celles dont la teneur diminue. 18 des 78 composés volatils (points verts, indice de 60 à 78) influencés par le traitement sont des contaminants environnementaux, présents uniquement à l'état de traces dans les analyses. Leur désorption est plus importante dans la matrice crue que dans le produit fini. Tous les esters d'acides gras présents dans la matrice fromagère crue (variables 27 à 34 et 38) et probablement issus du fromage de Cheddar utilisé, disparaissent au cours de l'étape de cuisson. Ils ont probablement été hydrolysés. Les produits issus de l'oxydation des lipides (variables 1 à 23) et ceux issus de la réaction de Maillard (variables 39 à 59) sont positionnés de manière similaire sur le cercle des corrélations. Il sont en général, en quantités plus importantes dans le produit fini que dans le mélange des matières premières et en quantité encore plus importantes dans le produit stocké, ce qui montre bien l'importance du procédé de fabrication pour ces constituants. En revanche, leurs dispersions importantes sur le cercle des corrélations ne permet pas d'extraire des groupes de constituants pouvant être considérés

comme marqueurs de voies réactionnelles.

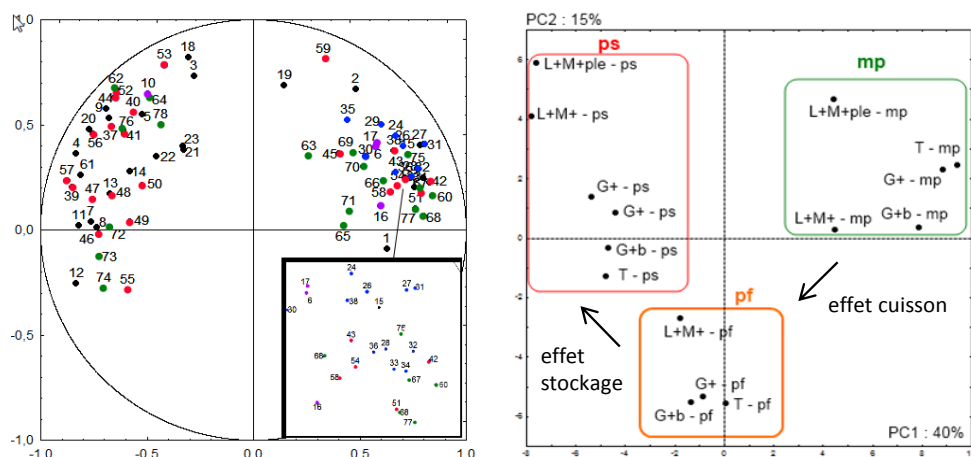


Fig. III.4 – Analyse en composantes principales PC1 *vs* PC2 de toutes les variables (à gauche) influencées par l'avancement du procédé de fabrication ($p < 0,05$) et de tous les échantillons (à droite). PC1 et PC2 sont responsables respectivement de 40% et 15% de la variance totale. Les identifiants d'échantillons représentent les différentes formulations selon la liste suivante : T : formulation témoin ; L⁺M⁺ : formulation enrichie en Cheddar et poudres de lait ; L⁺M⁺ple : formulation enrichie en Cheddar et poudres de lait étuvées ; G⁺ : formulation enrichie en Cheddar et beurre ; G⁺beurre : formulation enrichie en Cheddar et beurre étuvé.

Les numéros de variables représentent les composés volatils selon la liste ci-dessous : Composés issus de l'oxydation (points noirs) : 1 : 2-buténal ; 2 : 3-méthyl,2-buténal ; 3 : 2-cyclohexen-1-one ; 4 : 4-méthyl,2-heptanone ; 5 : 2-hexanone ; 7 : 2-nonanone ; 8 : 2-pentanone ; 9 : 3-méthyl,2-pentanone ; 11 : 2-undécanone ; 12 : 3-hepten-2-one ; 13 : 3-méthyl,3-heptène ; 14 : 3-hexène-2-one ; 15 : 3-hexène ; 18 : cyclohexanone ; 19 : cyclopentanone ; 20 : furane ; 21 : 2-éthylfurane ; 22 : 2-propylfurane ; 23 : heptanal ;

Composés issus de l'hydrolyse des acides gras (points bleus) : 24 : acide octanoïque ; 25 : acide hexanoïque ; 26 : acide butanoïque ; 27 : éthanoate de butyle ; 28 : éthanoate d'hexyle ; 29 : 2,3-diméthylbutanoate d'éthyle ; 30 : 3-méthylbutanoate d'éthyle ; 31 : 3-méthylbutanoate de butyle ; 32 : butanoate de propyle ; 33 : hexanoate d'éthyle ; 34 : octanoate d'éthyle ; 35 : acide propanoïque ; 36 : 2-hydroxypropanoate d'éthyle ; 37 : acide 2-méthylpropanoïque ; 38 : propanoate de propyle ; Composés issus de la fragmentation des sucres (points violets) : 6 : 2-hydroxy-3-pentanone ; 10 : 1-hydroxy,2-propanone ; 16 : 3-hydroxy,3-butanone ; 17 : 3-hydroxy,3-méthyl-2-butanone ;

Composés issus de la réaction de Maillard (points rouges) : 39 : 3-méthylthiophène ; 40 : 2(5H)-furanone ; 41 : furfural ; 42 : tétrahydro-6-méthyl,2H-pyran-2-one ; 43 : tétrahydro-6-propyl,2H-pyran-2-one ; 44 : dihydro-2-méthyl,3(2H)-furanone ; 45 : diméthyldisulfide ; 46 : diméthyltrisulfide ; 47 : diméthyltrisulfide ; 48 : 1-1H-pyrazole,éthanone ; 49 : méthane-thiol ; 50 : oxazole ; 51 : méthional ; 52 : pyrazine ; 53 : méthylpyrazine ; 54 : 2,4-diméthylquinoline ; 55 : méthyl, méthane-thiosulfonate ; 56 : thiazole ; 57 : thiophène ; 58 : 2-méthylthiophène ; 59 : 3-méthyl,2,5-furanedione ; Contaminants environnementaux (points verts) : 60 : toluène ; 61 : 3-méthyl, 3-propoxy, butyne ; 62 : 1-chloro, 2-méthyl-propanol ; 63 : acétonitrile ; 64 : acétophénone ; 65 : disulfure de carbone ; 66 : tétrachlorométhane ; 67 : propylcyclohexane ; 68 : 2-butoxyéthanol ; 69 : éthylbenzène ; 70 : bromo, dichloro-méthane ; 71 : dibromo, chloro-méthane ; 72 : tribromo-méthane ; 73 : 2-isopropényltoluène ; 74 : 3,4-diméthylphénol ; 75 : phényléthanol ; 76 : styrène ; 77 : tétrachloroéthylène ; 78 : vinylfuran

1.1.3 Conclusion de l'étude

Les résultats obtenus par la projection des matrices fromagères sur le plan factoriel montrent que la fraction volatile contient potentiellement l'information nécessaire à la discrimination des matrices fromagères quel que soit leur formulation et le degré d'avancement du procédé de fabrication. Par conséquent, il est envisageable

de considérer la fraction volatile comme un moyen d'authentifier les procédés et les barèmes thermiques appliqués lors de la cuisson d'une matrice fromagère.

En revanche, l'étape d'identification des marqueurs réactionnels à l'échelle du pilote industriel discontinu a mis en évidence plusieurs verrous. Les ingrédients déjà transformés tels que le Cheddar, le beurre ou les poudres de lait induisent un apport de composés volatils initiaux non négligeables. Ces apports sont, pour certains composés, susceptibles de saturer le détecteur du spectromètre de masse. Dans ces conditions, il n'est pas possible de mesurer une évolution significative de ces composés au cours des traitements thermiques appliqués à la matrice fromagère.

La simultanéité des opérations de mélange et de cuisson par injection de vapeur d'eau induit des modifications de texture et de composition importantes. La teneur en eau augmente ainsi d'environ 20% au cours du procédé de fabrication. Dans ces conditions, les différences observées entre les observations sont dues à un ensemble de phénomènes complexes (traitements thermiques, dilution liée à l'injection directe de vapeur d'eau, désorption différentielle des composés volatils liée aux modifications de la matrice...). Les marqueurs identifiés ne peuvent donc pas être attribués à la variation de leur teneur induite par les réactions se produisant dans la matrice fromagère modèle au cours des traitements thermiques.

Enfin, notons que les quantités de matières premières importantes et la durée nécessaire à la mise en œuvre d'une seule expérience en système pilote discontinu, en font un outil peu flexible lorsqu'il s'agit de réaliser de nombreux traitements thermiques différents et de surcroît relativement onéreux.

Pour la suite de l'étude, nous avons donc pris la décision de développer une matrice fromagère modèle associée à un système de cuisson de laboratoire. La nouvelle matrice permettra de suivre l'avancement des réactions à composition constante sans subir la dilution de la matrice liée à l'injection de vapeur d'eau au cours du traitement thermique. De plus, l'utilisation de matières premières sélectionnées pour avoir subi un traitement thermique le plus modéré possible permettra de diminuer la teneur de certains des composés volatils d'intérêt et rendra possible le suivi de leurs évolutions au cours des traitements. Le développement de la matrice fromagère modèle et du système de cuisson associé ayant déjà été présentés précédemment, nous allons maintenant présenter les résultats d'identification des marqueurs des traitements thermiques à partir du système de cuisson de laboratoire.

1.2 Recherche de marqueurs réactionnels sur des cuissons réalisées au laboratoire

1.2.1 Démarche expérimentale

Contrairement à l'étude en système pilote, la formulation est cette fois maintenue constante et seuls les traitements thermiques sont amenés à varier. L'ensemble des cuissons réalisées est présenté sur la figure III.5.

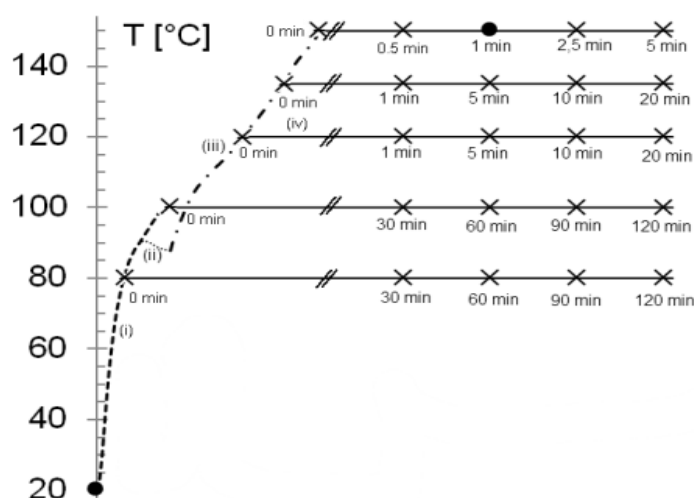


Fig. III.5 – Aperçu de la stratégie expérimentale ». Les nombres représentent le temps passé à la température du plateau. Les matrices fromagères ayant subies les barèmes thermiques (X) ont été analysées par micro-extraction en phase solide associée à la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol. Les matrices fromagères ayant subies les barèmes thermiques (•) ont aussi été analysées au moyen de la chromatographie en phase gazeuse couplée à l'olfactométrie multi-voies et à la spectrométrie de masse.

Chaque condition de cuisson est réalisée en triple à partir de matrices fraîchement formulées pour chacune des cuissons. En raison du nombre très important de composés volatils identifiables par la chromatographie bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse, tout composé volatil devait être présent dans les trois répétitions d'au moins un traitement thermique expérimental pour être retenu dans la suite de l'étude. 346 composés ont ainsi pu être identifiés. Un grand nombre de ces composés n'était pas spécifiques (alcane ramifiés, alcènes, terpènes...) des réactions que nous souhaitons étudier et n'ont pas été retenus. Seule une liste de 107 molécules est présentée en annexe 2 à la page 184.

Pour sélectionner les composés volatils significativement influencés par les traitements thermiques appliqués, une analyse de la variance selon le modèle suivant a

été réalisée pour l'ensemble des composés volatils retenus dans l'étude :

$$X_{i,n} = \mu + T_i + \epsilon_n \quad (\text{III.2})$$

avec :

- i , les 25 niveaux de traitement thermique
- n , les 3 répétitions
- $X_{i,n}$, la valeur observée pour le traitement thermique i de la répétition n appliqué à la matrice fromagère modèle
- μ , l'effet moyen observé
- T_i , l'effet du traitement thermique i
- ϵ_n , le résidu

Afin d'obtenir une vision multivariée de l'évolution de la fraction volatile au cours des cuissons, une analyse en composantes principales a été réalisée à partir de 78 échantillons (75 matrices cuites et 3 matrices non cuites) d'un sous ensemble de composés significativement influencés par les traitements thermiques et reconnus dans la littérature comme marqueurs des réactions de Maillard, des réactions de caramélisation ou encore des réactions d'oxydation des lipides. Pour s'affranchir des écarts d'abondance entre composés (de plus de 5 ordres de grandeur), les calculs ont été faits à partir de données centrées réduites (Statistica 8, Tulsa - OK, USA).

1.2.2 Évolution de la composition au cours du chauffage

Une synthèse par classes de composition et de structure des 346 composés volatils identifiés par les analyses de GCxGC-*tofMS*, tous traitements thermiques confondus, est présentée dans le tableau III.1. Seules 81 structures ont été significativement influencées par le traitement thermique appliqué à la matrice fromagère modèle ($p < 0,01$). Ces structures proviennent majoritairement de la dégradation des lipides, impliquant des réactions d'hydrolyse et d'oxydation, de la dégradation des acides aminés, impliquant en particulier la réaction de Maillard, et de la dégradation des glucides, incluant les réactions de caramélisation possibles sans intervention d'un acide aminé. L'hydrolyse des triglycérides est responsable de l'augmentation des acides gras libres (de C2 à C9) en fonction de l'intensité des traitements thermiques. L'oxydation des lipides est à l'origine de la majorité des structures aliphatiques non ramifiées de type alcanes, alcènes, alcynes, aldéhydes, cétones, alcools et acides. 196 de ces structures ont été identifiées. Parmi elles, les aldéhydes aliphatiques (de C3 à C12) et les cétones méthylées (de C6 à C11) augmentent avec l'intensité du traitement thermique. Contarini et Pavolo (2002), considèrent ces composés comme

III.1 Recherche des marqueurs des traitements thermiques

Tab. III.1 – Représentation synthétique des structures identifiées par micro-extraction en phase solide couplée la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle-spectrométrie de masse à temps de vol dans la matrice fromagère modèle

Éléments (Nombre)	Structures	Fonctions
CH (117)	Aliphatique	94 (alcane :48 ; alcène :44 ; alcyne :2)
	Terpène	10 (mono- :7 ; di- :3)
	Benzénique	11 (alkyl)
	Naphtalène	1
CHO (149)	Aliphatique	102 (aldéhyde :24 ; cétone :28 ; alcool :23 ; ester :15 ; acide :12)
	Cycloalcane-ène	4 (cétone :3 ; alcool :1)
	Lactone	18
	Oxirane	2
	Furane	19 (alkyl :9 ; aldéhyde :3 ; cétone :2 ; 2H/4H :5)
	Pyrane	3 (cétone)
	Benzénique	6 (aldéhyde :2 ; alcool :3 ; acide :1)
	Naphtalène	2 (alcool :1 ; cétone :1)
	Benzofurane	1
	Benzopyrane	1 (cétone)
	Benzoquinone	1
CHS (10)	Aliphatique	5 (sulfide :4 ; thiol :1)
	Thiophène	3
	Thiirane	2
CHN (22)	Aliphatique	9 (nitrile)
	Benzénique	1 (nitrile)
	Pyrrole	2
	Pyrazine	5 (alkyl :3)
	Hydrazine	2
	Pyridazine	2
	Tétrazole	1
CHBr, Cl, F (27)	Aliphatique	24 (Cl :10 ; Br :11 ; F :3)
	Benzénique	3 (Br)
CHNS (3)	Thiazole	3 (alkyl)
CHON (7)	Aliphatique	3 (amide :2 ; nitrile :1)
	Benzénique	2 (nitrile :1 ; amine :1)
	Furane	1 (nitrile)
	Oxazole	1 (alkyl)
CHOS (11)	Aliphatique	7 (aldéhyde :1 ; thiol :4 ; ester :2)
	Furane	2 (thiol)
	Thiophène	2 (méthoxy :1 ; carboxaldéhyde :1)

de bons marqueurs des traitements thermiques du lait (pasteurisé, UHT direct et UHT en bouteille) ainsi que de leurs durées et de leurs températures de stockage. Les différents alcools (de C1 à C9) ont eu des évolutions différentes et difficiles à relier aux traitements thermiques appliqués. Les esters identifiés dans la matrice crue sont issus d'estérifications entre des acides de C2 à C6 et des alcools de C1 à C4. Ils se sont progressivement hydrolysés en fonction de l'intensité des traitements thermiques en libérant des acides gras à courtes chaînes dont l'origine principale reste cependant l'hydrolyse thermique des triglycérides (Belitz *et al.*, 2009). Les alkyl-furanes (du méthyl- au pentyl-furane) sont majoritairement issus de l'auto-oxydation des lipides. Lors des cuissons, leur teneur a augmenté régulièrement avec l'intensité des traitements thermiques appliqués. Selon Limacher *et al.* (2008), le furane et le méthyl-furane peuvent cependant provenir également de la réaction de Maillard. Lors du dosage des acides aminés libres, des teneurs moyennes faibles de l'ordre de 9 mg pour 100 g ont été observées dans la matrice crue. Il s'agit de teneurs voisines de la limite de quantification de la méthode d'analyse des acides aminés par HPLC utilisée. Deux types de comportements ont cependant pu être relevés : (i) celui de l'acide glutamique dont les teneurs augmentent avec la durée de chauffage pour les cuissons à 80 et 100°C et diminuent pour les cuissons à 120, 135 et 150°C et (ii) ceux de la glycine, proline, arginine, alanine, valine, cystéine, isoleucine, leucine et lysine dont les teneurs augmentent avec la durée de chauffage à toutes les températures de cuisson. L'augmentation des teneurs en acides aminés en fonction de l'intensité des barèmes de cuisson s'explique probablement par une hydrolyse partielle des protéines. Les acides aminés libres vont réagir avec les glucides au cours des premières étapes de la réaction de Maillard pour former les composés d'Amadori. Parmi ces composés, la lactulosyllysine (formée à partir du lactose et de la lysine) a été déterminée après une hydrolyse acide par la mesure des teneurs en furosine. Ces teneurs ont augmenté régulièrement avec la température entre 80 et 120°C. Elles sont représentées en figure III.6.

Une diminution de la teneur en furosine a été observée à partir de 135°C. Celle-ci s'est accélérée à 150°C. Cela signifie que la lactulosyllysine a une balance massique positive à des températures inférieures à 135°C puis négative au delà. Ceci est cohérent avec les travaux de Berg et van Boekel (1994) et de Morales et Jimenez-Perez (1998) qui ont déterminés la température de 130°C comme valeur seuil de dégradation de la lactulosyllysine au cours des traitements thermiques du lait. D'une manière générale les composés d'Amadori formés à partir des différents sucres (lactose et galactose principalement) et acides aminés vont contribuer à la formation d'intermédiaires réactionnels communs aux réactions de caramélisation et aux réac-

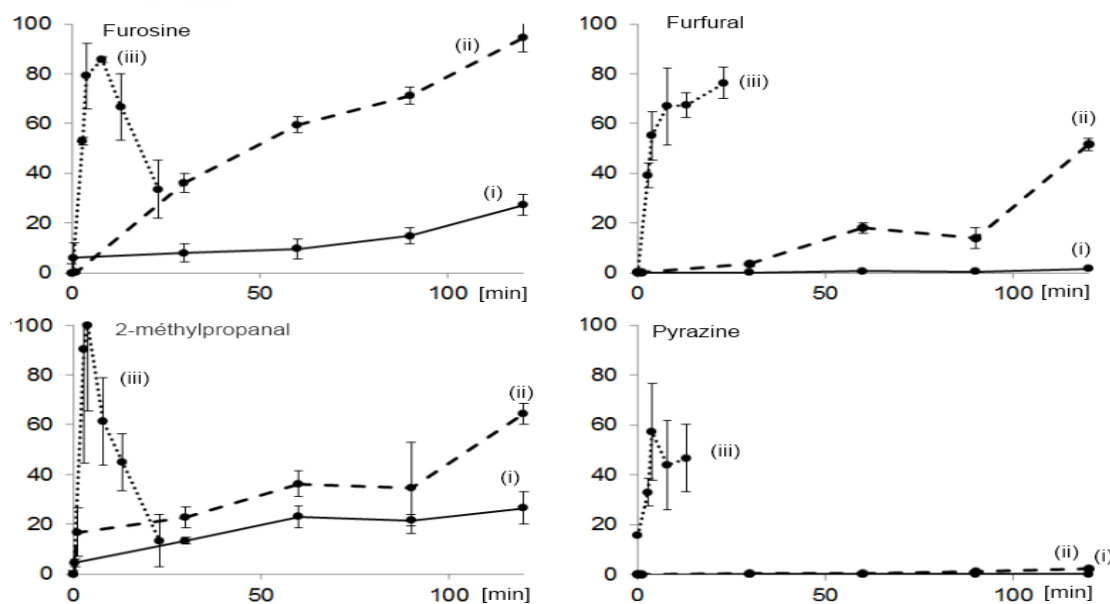


Fig. III.6 — Cinétiques mesurées pour quatre marqueurs de la réaction de Maillard à (i) 80, (ii) 120 et (iii) 150°C. Les données sont exprimées en unités arbitraires de surface de l'aire du pic chromatographique et les barres d'erreurs représentent l'écart type de 3 répétitions.

tions de Maillard nommées « déoxyosones » (Hodge, 1953). La fission des déoxyosones va conduire à l'apparition de composés dicarbonylés qui expliquent majoritairement l'augmentation des teneurs en 2,3-butanedione, 2,3-pentanedione et 3-hydroxy,2-butanone dans les matrices lors des cuissons à 80, 100 et 120°C. Pour les températures supérieures, ces composés décroissent indiquant une consommation importante orientée très probablement vers la formation des produits de condensation de la réaction de Maillard. Cette consommation est d'autant plus rapide que la température est élevée (figure III.6). En effet, les dicétones vont réagir avec des acides aminés pour former des aldéhydes de Strecker et des α -aminocétones. Les principaux aldéhydes de Strecker que nous avons observés sont le 2-méthylpropanal (figure III.6), le 2-méthylbutanal, le 3-méthylbutanal et le méthional qui sont respectivement issus de la dégradation de la valine, de l'isoleucine, de la leucine et de la méthionine (Belitz *et al.*, 2009). La formation précoce, dès 80°C des produits issus de la dégradation de Strecker peut s'expliquer par la présence de composés carbonylés déjà présents dans la matière première. Ce n'est pas le cas des systèmes modèles binaires constitués par un sucre en mélange avec un acide aminé en milieu liquide et qui nécessitent d'abord la formation de ces composés carbonylés pour initier les dégradations de Strecker (Hodge, 1953). C'est la condensation de deux α -aminocétones (formées en même temps que les aldéhydes de Strecker) qui va conduire à la production de composés hétérocycliques comme les pyrazines.

Parmi les composés hétérocycliques azotés, les pyrazines que nous avons identifiées (pyrazine, 2-méthylpyrazine, 2,5-diméthylpyrazine, 2,6-diméthylpyrazine, éthénylpyrazine et tétraméthylpyrazine) sont des produits caractéristiques des réactions de Maillard (Huang *et al.*, 1989). Il en est de même pour les autres composés hétérocycliques azotés (pyridazine, tétrazole, oxazole) qui ne sont pas détectés ou présents en très faibles quantités dans la matrice fromagère crue. Leurs évolutions en fonction des traitements thermiques étaient parfaitement colinéaires et nous avons choisi de ne présenter que celle de la pyrazine (figure III.6) qui montre clairement que ces structures apparaissent systématiquement après cuisson entre 135 et 150°C. Aucune alkyl-pyrazine à longue chaîne (propyl, butyl, pentyl) spécifique d'interactions entre les produits issus de la réaction de Maillard et ceux issus de l'oxydation des lipides (Hidalgo et Zamora, 2000; Whitfield, 1992) n'a été détectée. Les pyrroles sont déjà présents dans la matrice fromagère crue et leur teneur n'a pas été significativement influencée par les traitements thermiques appliqués. Ces composés se formeraient dans les poudres de lait (Ferretti et Flanagan, 1971) qui ont de très faibles teneurs en eau par rapport à la matrice fromagère. La réaction de Maillard appliquée aux acides aminés soufrés conduit à la formation des aldéhydes de Strecker soufrés tel que le méthional depuis la méthionine et le 2-mercaptoacétaldéhyde à partir de la cystéine. Leur réactivité induit de nombreuses réactions de dégradation et de condensation secondaires. La méthionine est l'acide aminé soufré le plus abondant dans les caséines (Fox et McSweeney, 1998). Ainsi, le méthional est à l'origine de la formation de méthanethiol (Belitz *et al.*, 2009). Ce dernier pouvant aussi être formé directement à partir de la méthionine au cours des traitements thermiques. Le méthanethiol est à son tour oxydé en diméthyldisulfide, lequel peut conduire par dismutation à la formation de diméthylsulfide et de diméthyltrisulfide. Le mercaptoacétaldéhyde contribuera à la formation des thiophènes. La formation de composés soufrés n'est pas uniquement attribuable à ces deux acides aminés mais également à une vitamine très réactive, la thiamine, dont la dégradation thermique induit la formation de thiazole et probablement de furfurylméthylsulfide.

Dans la matrice modèle, le principal sucre est le lactose : diholoside constitué de glucose et de galactose. Dans la matrice non cuite, les teneurs en lactose étaient de 6,5 g pour 100 g et celles en galactose et en glucose voisines de zéro. Lors du chauffage, les teneurs en lactose ont diminué jusqu'à des valeurs comprises entre 3,50 et 5,50 g pour 100 g tandis que les teneurs en galactose ont atteint des valeurs comprises entre 0,02 et 0,45 g pour 100 g. En revanche, aucune trace de glucose n'a été détectée. L'absence de détection du glucose peut s'expliquer de deux manières. Soit celui-ci est très rapidement dégradé après hydrolyse thermique du lactose, soit

lors de la formation du composé d'Amadori (formé à partir du lactose et d'un acide aminé), c'est la partie glucose du lactose qui va réagir et être prioritairement dégradée. Le glucose ne se forme alors pas. Lors du chauffage, les sucres vont produire des dicétones à courte chaîne telles que la 2,3-butanedione ou la 2,3-pentanedione (Yaylayan et Keyhani, 1999). Des hétérocycles comme le furfurylalcool et le furfural (Patton, 1955), le furanéol et le maltol (van Boekel, 1998) sont issus des réactions de dégradation du lactose. Cependant, le furfural, le furanéol et le maltol peuvent également provenir de la réaction de Maillard. La transformation du lactose selon le réarrangement de Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein peut conduire à la formation du furfurylalcool au cours des premières étapes de la réaction de caramélisation (Patton, 1955). Pour la formation du furfural, deux mécanismes possibles ont été identifiés. Le premier implique la formation du 4-déoxyglucosone par la voie de 2,3 émolisation du lactose et sa dégradation en acide formique et 3-déoxyribose conduisant ensuite à la formation de furfural, selon un mécanisme typique de la caramélisation (Berg et van Boekel, 1994). Le second mécanisme nécessite la formation du 3-déoxyosone (*via* les réactions de Maillard ou de caramélisation) puis sa déshydratation en 5-hydroxyméthylfurfural. La dégradation de ce dernier conduit entre autre au 5-méthylfurfural et au furfural (Kroh, 1994). Bien que le 5-hydroxyméthylfurfural ne soit pas détecté dans nos analyses car très peu volatil, la présence de 5-méthylfurfural à partir de 135°C suggère que cette réaction a bien lieu. La température de 135°C qui correspond également à la température seuil de dégradation de la lactulosyl-lysine laisse supposer que le 5-hydroxyméthylfurfural et donc le furfural seraient formés au cours de la réaction de Maillard. L'utilisation de précurseurs marqués serait nécessaire pour déterminer dans le système modèle, la contribution relative de la caramélisation et de la réaction de Maillard dans la formation du furfural et du 5-hydroxyméthylfurfural au cours des traitements. Les 27 résidus halogénés détectés n'ont pas présenté de variations significatives de leurs intensités au cours des traitements subis par la matrice, ce qui signifie qu'ils sont stables au cours des traitements thermiques. Ils peuvent être considérés comme des contaminants environnementaux classiquement concentrés dans la phase lipidique de nombreux produits animaux.

1.2.3 Evolution des marqueurs sélectionnés

L'Analyse en Composantes Principales (ACP) a été réalisée à partir de 27 des 81 composés significativement influencés ($p < 0,001$) par le traitement thermique et reconnus dans la littérature comme des marqueurs des réactions d'oxydation des acides gras, de Maillard, ou de caramélisation. Elle a permis d'obtenir une vision multivariée de l'évolution de la composition de la fraction volatile des matrices au cours des

25 traitements thermiques appliqués (5 niveaux de température, 5 durées de traitement et 3 répétitions) et est représentée en figure III.7. Pour faciliter la description des évolutions observées, celles-ci sont présentées par niveaux de température. Pour chacun des niveaux de température (figure III.7 : B80°C à B150°C), l'incidence de la montée en température sur l'évolution de la composition a été visualisée par un tracé plein (allant de la matrice crue à la température cible) et l'incidence de la durée des traitements par un tracé pointillé.

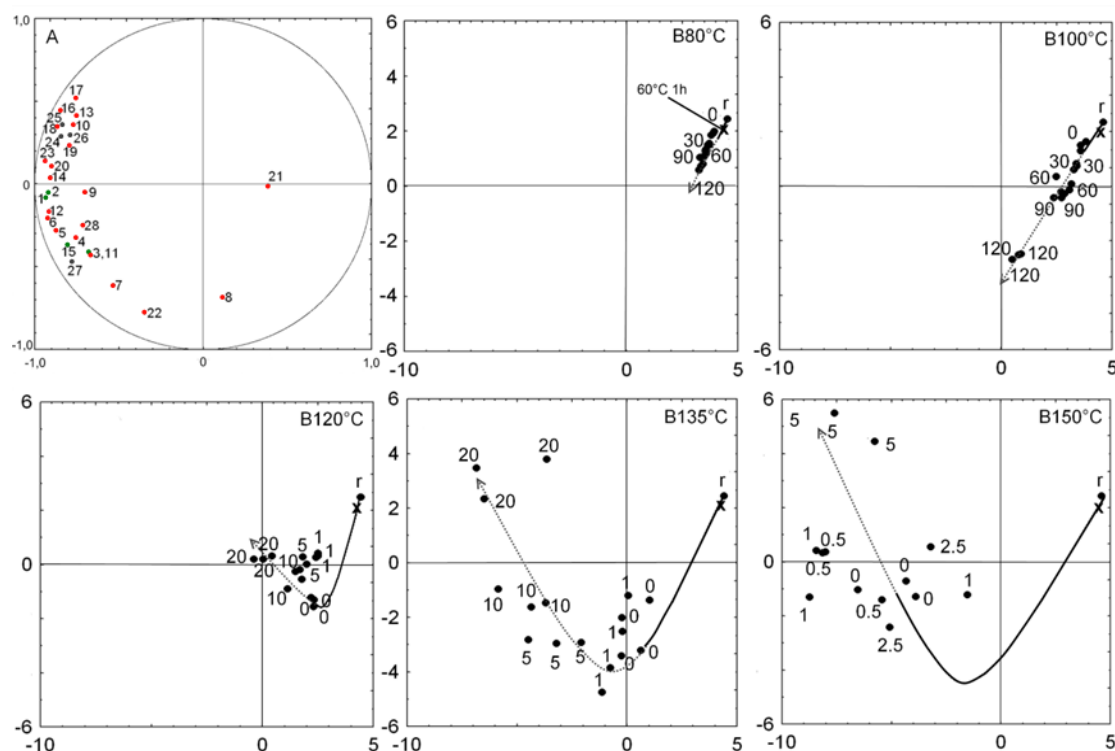


Fig. III.7 – Analyse en composantes principales PC1 vs PC2 de toutes les variables (A) et échantillons (B80°C, B100°C, B120°C, B135°C, B150°C). PC1 and PC2 sont responsables de 60% et 13,4% de la variance totale respectivement. 'r' représente la matrice crue (extraite une heure à 60°C) et 'X' représente la matrice cuite pendant une heure à 60°C (et extraite une heure supplémentaire à 60°C). Les numéros représentent le temps passé à la température souhaitée en minutes comme cela est représenté sur la figure III.5. Le tracé plein représente l'évolution de la fraction volatile au cours de la période de chauffage, alors que le tracé pointillé représente l'évolution de la fraction volatile au cours du maintien de la température. Les numéros de variables représentent les composés selon la liste présentée ci-dessous. Sont représentés en noir les composés issus de l'oxydation des lipides, en vert ceux issus de la dégradation des sucres et en rouge les composés issus de la réaction de Maillard.
 1 : 3-hydroxy-2-butanone ; 2 : 2-cyclopentèn-1,4-dione ; 3 : 2,3-butanedione ; 4 : 2 méthylpropanal ; 5 : benzaldéhyde ; 6 : 2-méthylbutanal ; 7 : 3-méthylbutanal ; 8 : méthional ; 9 : diméthylsulfide ; 10 : diméthyldisulfide ; 11 : thiazole ; 12 : thiophène ; 13 : diméthyltrisulfide, 14 : furfural, 15 : furfuryl alcohol ; 16 : pyrazine, 17 : 2-méthylpyrazine, 18 : 2,5 diméthyl pyrazine, 19 : éthénylpyrazine ; 20 : 2-éthylpyrazine ; 21 : 5-méthylfurfural ; 22 : isomaltol ; 23 : maltol ; 24 : 2-éthylfurane ; 25 : hexanal ; 26 : octanal ; 27 : nonanal.

L'étude du plan principal de l'ACP montre que la phase de montée en température de la matrice jusqu'à 135°C induit un glissement de la composition (figure III.7 : tracé plein) significativement corrélée aux variables présentes dans le quadrant du

cercle des corrélations de coordonnées $[-1, -1]$ (figure III.7 A). Ce glissement correspond à la formation d'un produit de fragmentation des sucres : le diacétyle (en équilibre redox avec l'acétoine), de plusieurs aldéhydes de Strecker (variables 4 à 7) à l'exception du méthional (variable 8) et de plusieurs composés soufrés (sulfides : variables 9, 10 et 13, thiazole et thiophène : variables 11 et 12). Lors de la montée en température à 150°C, on observe une rupture de l'évolution de la composition significativement corrélée aux variables 14 et 15 et à toutes celles présentes dans le quadrant du cercle des corrélations de coordonnées $[-1, 1]$. Ce glissement correspond à la formation de marqueurs des réactions de caramélisation et de Maillard (furfural, furfurylalcool, 5-méthylfurfural, maltol, isomaltol ainsi que 5 pyrazines (variables 14 à 23). La durée des traitements thermiques induit des effets différents selon les températures. Ainsi, pour des températures finales de 80 et 100°C, on observe quelle que soit la durée, une évolution limitée de la composition (figure III.7 : tracé pointillé) qui correspond à une augmentation des teneurs en diacétyle, aldéhydes de Strecker et sulfides. Pour les températures finales de 120, 135 et 150°C, l'évolution de la composition reflète la formation des produits avancés des réactions de caramélisation et de Maillard (variables 14 à 23). Cette formation s'accélère d'autant plus que la température de traitement est élevée. La dispersion entre les triplicats très importante aux températures élevées peut avoir deux explications. L'une est liée à la difficulté du contrôle expérimental des traitements pour les températures les plus élevées (erreur de $\pm 4^\circ\text{C}$ à 150°C contre $\pm 1^\circ\text{C}$ à 80 ou 100°C). L'autre est certainement attribuable à l'action conjointe d'une accélération de la réactivité et de la complexification des réactions (démontrée par l'augmentation du nombre de composés formés à 150°C).

1.3 Recherche des marqueurs odorants

1.3.1 Démarche expérimentale

Au cours des deux premières études, nous avons identifié les composés volatils dont l'intensité varie en fonction des barèmes de traitements thermiques appliqués à la matrice fromagère réelle ou modèle. Cependant, seule une petite partie de ces composés est effectivement responsable de l'odeur caractéristique du fromage fondu. Afin d'identifier les molécules « odeurs actives », ainsi que celles responsables de l'apparition de défauts de trop cuit, nous avons eu recours aux techniques de chromatographie en phase gazeuse couplées à l'olfactométrie. Les produits analysés correspondent à une matrice fromagère modèle crue et à une matrice ayant subi un traitement thermique de 1 minute à 150°C. Une étude préliminaire a montré que ce traitement permettait de mettre en évidence autant de composés odorants que le

traitement thermique le plus extrême (150°C pendant 10 minutes) tout en limitant la persistance de certaines odeurs au niveau du port d'olfaction.

1.3.2 Molécules identifiées

Les analyses olfactométriques ont permis de mettre en évidence une trentaine de zones odorantes représentées sur la figure III.9.

Le vocabulaire descriptif de ces zones odorantes a été réparti dans dix catégories olfactives : « acide - alcool », « animal », « beurré - fromagé - laitier », « terreux - sous-bois », « empyreumatique », « fruité - floral », « vert - végétal », « plastique - chimique », « soufre - gaz » et « non déterminé ». La liste des molécules odorantes identifiées ainsi que l'odeur majoritairement perçue par les flaireurs est donnée dans le tableau III.2. Dans ces conditions, les différences significatives observées entre les aromagrammes ont été uniquement attribuées aux réactions chimiques induites par le traitement thermique. Parmi les 16 principales zones odorantes de la matrice fromagère crue (zones : 2, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 22, 23, 24, 27 et 29 de la figure III.9), seules 10 ont une intensité supérieure à 1 (sur une échelle de 5). Les aldéhydes, les mono-cétones, les alcools et la γ -decalactone sont probablement originaires de l'oxydation des acides gras de la matière grasse laitière anhydre (tableau III.2). Après cuisson, l'aromagramme de la matrice fromagère a été modifié de manière importante. En effet, une augmentation générale de l'intensité odorante des différentes catégories olfactives est observée (figure III.8) puisque 19 molécules odorantes ont alors une intensité supérieure à 1 (figure III.9).

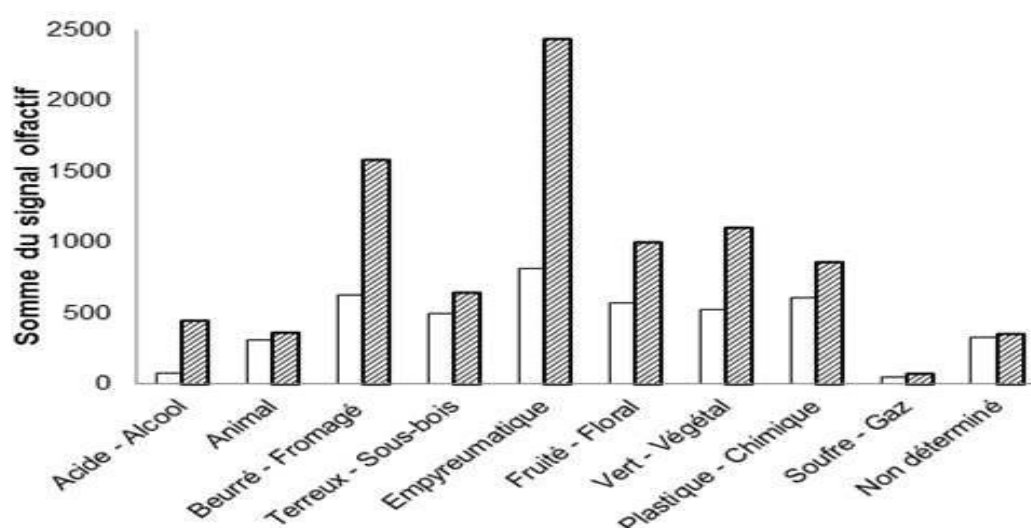


Fig. III.8 — Somme du signal olfactif par catégories pour la matrice crue (barres blanches) et la matrice cuite à 150°C pendant 1 minute (barres grises).

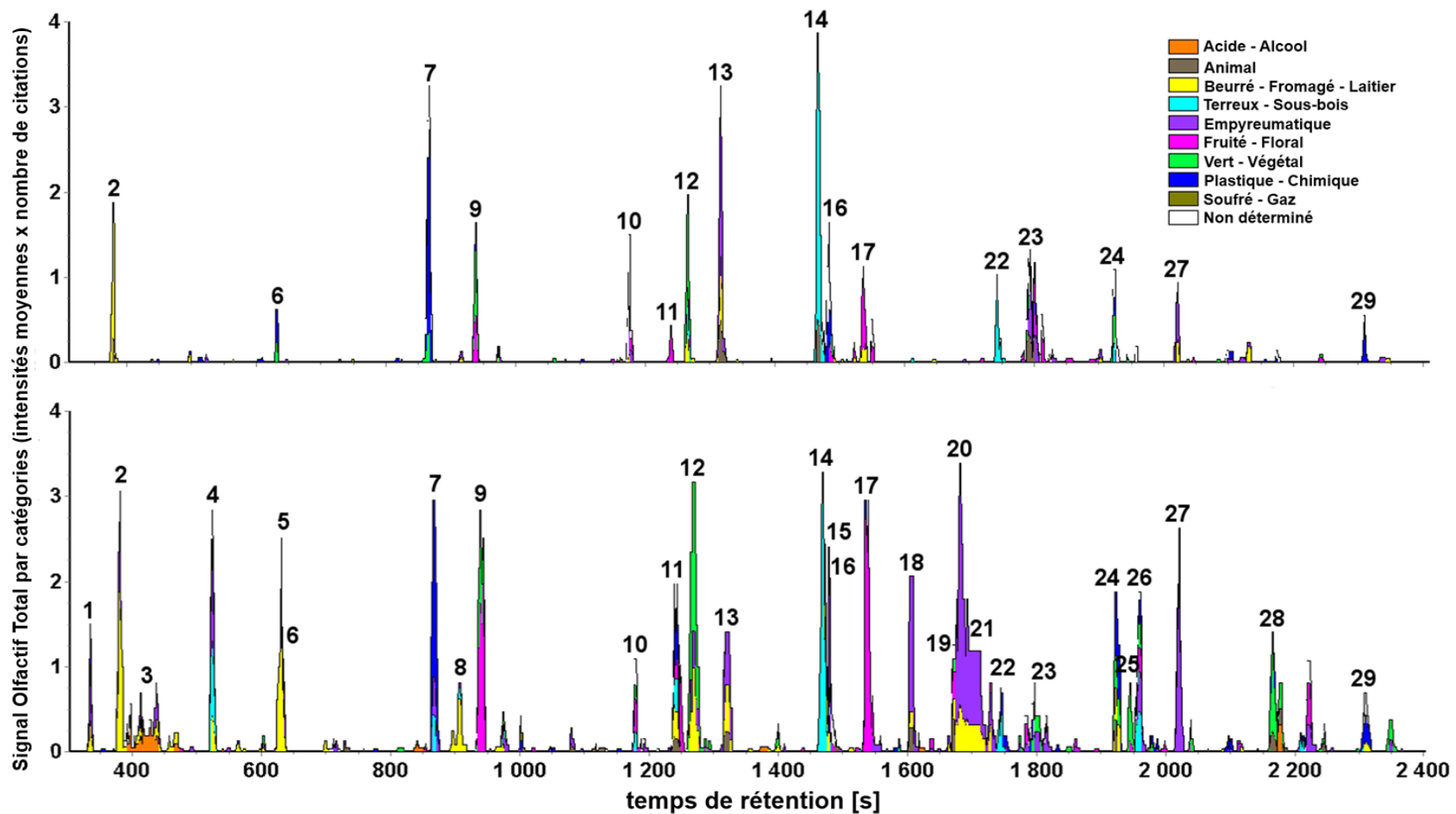


Fig. III.9 – Aromagrammes de fromages fondus obtenus avant (en haut) et après un traitement thermique de 1 minute à 150°C (en bas). Le signal olfactif total par catégories est exprimé comme le produit moyen du nombre de détections et des intensités des 8 aromagrammes individuels ($SOT_{Int \times Det}$). Il met en évidence les zones odorantes communément et intensément perçues par les 8 flaireurs. Les numéros renvoient au tableau III.2.

Tab. III.2 — Composés « odeurs actifs » identifiés dans le système modèle. ^a pic de la figure III.9, ^b temps de rétention de l’odeur, ^c indice de rétention pour la colonne capillaire DB-5, ^d fiabilité de l’identification : a, spectre de masse, indice de rétention et odeur identiques à celle du composé pur ; b, spectre de masse, indice de rétention et odeur en accord avec la littérature ; c, tentative d’identification par le spectre de masse ; d, tentative d’identification avec l’indice de rétention ; ^e principaux descripteurs, ^f origine chimique : R.M. : réaction de Maillard ; O.L. : oxydation des lipides ; L. : lipolyse ; O : autre ; ^g significativité du test-t cr. < cu. : intensité perçue significativement plus forte pour l’échantillon cuit que cru.

Numéro du pic ^a	Temps de rétention ^b [s]	Nom	IRL ^c	Fiabilité ^d	Descripteur ^e	Origine ^f	t test ^g
1	330	2-méthylpropanal	552	a	chocolat, fromage, beurre	R.M.	cr.<cu.**
2	385	2,3-butanedione	581	a	beurre	O.	cr.<cu.*
3	412	acide acétique	595	a	vinaigre	R.M.	cr.<cu.*
4	524	3-méthylbutanal	648	a	chocolat, fromage	R.M.	cr.<cu.***
5	620	2,3-pentanedione	689	a	beurre, yaourt	R.M.	cr.<cu.*
6	629	pentanal	693	a	herbe, orange	O.L.	n.s.
7	861	1-hexen-3-one	780	b	plastique, chimique	O.L.	n.s.
8	895	acide butanoïque	792	a	fromage, vomé	L.	cr.<cu.*
9	933	hexanal	804	a	herbe, pomme verte	O.L.	cr.<cu.***
10	1173	n.i. pyrazine	882	d	plastique, chimique, empyreumatique	L.	n.s.
11	1249	heptanal	902	a	citron, fruité	O.L.	cr.<cu.**
12	1260	méthional	910	a	pomme de terre	R.M.	cr.<cu.***
13	1309	-	926	-	empyreumatique	-	cr.>cu.*
14	1469	1-octen-3-one	980	a	champignon	O.L.	cr.>cu.*
15	1472	diméthyltrisulfide	981	a	soufre, gaz, choux	O.	cr.<cu.*
16	1478	1,5-octadiène-3-one	985	d	plastique, chimique	O.L.	n.s.
17	1531	octanal	1002	a	citron, orange	O.L.	cr.<cu.*
18	1596	2-acétylpyrazine	1038	b	empyreumatique	R.M.	cr.<cu.***
19	1668	phénylacétaldéhyde	1055	b	floral	R.M.	n.s.
20	1673	2,5-diméthyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (Furanéol)	1056	a	caramel, empyreumatique	R.M.	cr.<cu.***
21	1676	3-hydroxy-2-méthyl-4H-pyran-4-one (Maltol)	1057	a	empyreumatique	R.M.	cr.<cu.***
22	1745	1-nonen-3-ol	1077	b	champignon	O.L.	n.s.
23	1790	nonanal	1107	a	herbe coupée, cuir	O.L.	n.s.
24	1920	-	-	-	chimique	-	n.s.
25	1940	2-oxepanone	1179	b	végétal	O.L.	n.s.
26	1958	-	-	-	plastique, chimique	-	n.s.
27	2013	furfurylméthyldisulfide	1223	c	jambon sec, empyreumatique	O.	n.s.
28	2156	-	-	-	vert, végétal	-	cr.<cu.**
29	2320	γ-décalactone	1450	c	pomme de terre, punaise, chimique	O.L.	n.s.

Sur un plan qualitatif, la cuisson a fortement amplifié les catégories « beurré - fromagé - laitier », « empyreumatique » et à moindre titre les catégories « fruité - floral » et « vert - végétal ». Ces modifications résultent de l'augmentation de l'intensité odorante de molécules déjà présentes dans la matrice crue (zones 2, 9, 11, 17 de la figure III.9) parmi lesquelles l'hexanal et l'octanal (zones 9 et 17 respectivement) sont les principales responsables des notes « fruitées - florales » perçues par les flai-reurs. Elles résultent également de l'apparition de 13 nouveaux composés odorants (zones 1, 3, 4, 5, 8, 15, 18, 19, 20, 21, 25, 26, 28 ; figure III.9). Parmi ceux-ci, quatre sont majoritairement responsables de l'augmentation des odeurs « beurré - fromagé - laitier ». Il s'agit du 2-méthylpropanal (zone 1), de la 2,3-butanedione (zone 2), de la 2,3-pentanedione (zone 5) et de l'acide butanoïque (zone 8). Cinq molécules sont responsables de la note « empyreumatique » dont 3 contribuent majoritaire-ment à l'augmentation de cette note après cuisson. Il s'agit de la 2-acétylpyrazine (zone 18), du furanéol (zone 20) et du maltol (zone 21). Les deux autres molécules, une pyrazine et une molécule non identifiée (zones 10 et 13), ont été perçues moins intensément après cuisson. L'intensité plus forte des notes « vert - végétal » est due à la production après cuisson de méthional (odeur de pomme de terre, zone 12) de diméthyltrisulfide (gaz, choux, zone 15) et d'une molécule non identifiée (zone 28).

D'autres composés soufrés comme le méthane-thiol, le diméthylsulfide et le di-méthyl-disulfide n'ont pas été perçus, probablement en raison de seuils de détection plus élevés que ceux des composés soufrés précédemment cités. Le flairage direct des matrices fromagères indique que lors de l'application des barèmes thermiques extrêmes, les notes empyreumatiques prennent l'avantage sur les notes beurrées, fruitées et végétales. Ceci suggère qu'au cours de la cuisson, les produits de la ré-action de Maillard affectent davantage l'odeur du fromage cuit que les composés issus de l'oxydation des acides gras. Le furanéol et le maltol peuvent être considérés comme les principaux responsables des défauts de « trop cuit » rencontrés dans les fromages fondus. En effet, pour les cuissons supérieures à 135°C durant 5 minutes, l'odeur de ces composés commence à être perceptible lors du flairage des produits cuits et masque peu à peu l'odeur initiale du produit.

2 Des marqueurs des traitements thermiques au schéma réactionnel

Afin de passer des marqueurs des traitements thermiques à leur mise en relation dans un schéma réactionnel, il convient de confronter les marqueurs identifiés avec les connaissances théoriques dont nous disposons.

2.1 Marqueurs de la réaction d'oxydation des lipides

Rappelons que le schéma réactionnel théorique ainsi que la représentation schématique de l'évolution des différents constituants impliqués dans la réaction d'oxydation des lipides ont été présentés en figures I.11 et I.12 en pages 19 et 22 respectivement.

Les spécificités de la matière grasse laitière, présentées dans le tableau I.2 page 11, et particulièrement sa faible teneur en acides gras poly-insaturés (inférieure à 3%), font que cette dernière est relativement peu sensible à l'oxydation. De plus, il est généralement reconnu que les traitements thermiques traditionnellement appliqués au lait (pasteurisation, traitement UHT) ne causent que des variations très faibles de la teneur des différents acides gras (Fox et McSweeney, 1998). Cette teneur peut être mesurée selon plusieurs méthodes de dosage (Jensen, 2002), comme par exemple par chromatographie en phase gazeuse couplée à la détection par ionisation de flamme après une estérification préalable des acides gras. Cependant ces méthodes présentent une précision de l'ordre de 0,01 à 0,1 g pour 100 g de matière grasse, insuffisante en comparaison des variations des produits finaux volatils issus de la réaction de l'ordre de 1 à 1000 μg pour 100 g de matière grasse. Pour cette raison, nous n'avons pas effectué de mesures systématiques des acides gras au cours des cuissons.

Une alternative consisterait à suivre le devenir de substances lipidiques plus réactives comme les phospholipides (Gallier *et al.*, 2010). Cependant, les produits finaux de réaction formés au cours de l'oxydation de ces derniers sont essentiellement non volatils et ne peuvent, par conséquent, pas être associés à d'éventuels défauts de flaveur se produisant au cours de la cuisson des fromages fondus. Pour cette raison, cette voie n'a pas été explorée. Par conséquent, nous ne disposons pas de mesures des substrats pour l'étude de la réaction d'oxydation des lipides.

Deux méthodes complémentaires ont été tentées afin de suivre les intermédiaires de réaction. La mesure des diènes conjugués manquait de sensibilité, très probablement en raison de la teneur très faible en acides gras poly-insaturés de la matrice fromagère modèle. La mesure de l'indice de peroxyde, s'est avérée extrêmement délicate. En effet, un coefficient de variation élevé de l'ordre de 69% a été ainsi mesuré alors qu'il est généralement inférieur à 10% pour ce type de dosage. Cependant ce coefficient de variation élevé s'explique par les difficultés techniques rencontrées qui sont :

- la quantité de matière grasse disponible après l'extraction, de l'ordre de 0,8 gramme insuffisante, malgré un rendement d'extraction supérieur à 85%.
- le point de fusion élevé de la matière grasse, lié à la longueur des acides gras et à leurs faibles teneurs en insaturations, rendant nécessaire la fluidification

de la matière grasse dans un bain-marie à 50°C avant le dosage.

Plusieurs informations peuvent malgré tout être tirées. Les mesures réalisées indiquent une teneur en peroxydes très faible de la matière grasse quel que soit le traitement thermique considéré (de 0,01 à 4,34 mmol.kg⁻¹). A 80 et 100°C, la teneur en peroxydes semble augmenter au cours du temps alors qu'elle diminue aux traitements à 135 et 150°C. Ce résultat est cohérent avec la sensibilité reconnue des peroxydes à la chaleur.

Étant donné l'incertitude existante sur les valeurs mesurées et le nombre de points expérimentaux restreints disponibles, les mesures d'indice de peroxyde n'ont pas été incluses dans le modèle.

Seuls les produits volatils ont réellement pu être suivis au cours du temps. La figure III.10 représente par exemple l'évolution relative de la teneur en octanal au cours des traitements. Les autres aldéhydes aliphatiques suivis présentent des profils similaires.

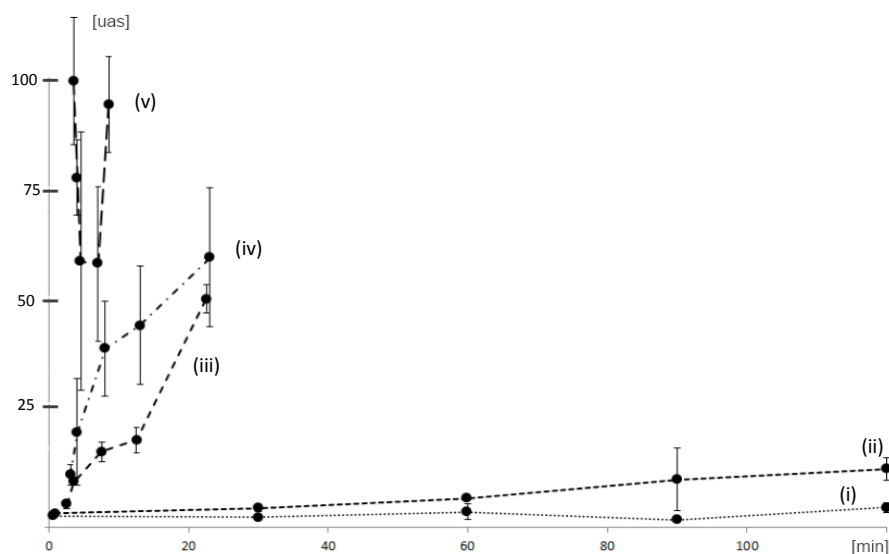


Fig. III.10 — Cinétiques mesurées pour l'octanal à 80 (i), 100 (ii), 120 (iii), 135 (iv) et 150°C (v). Données exprimées en unités arbitraires de surface de l'aire du pic chromatographique. Les barres d'erreurs représentent l'écart type pour les 3 répétitions.

Étant donné que seuls des produits finaux de la réaction d'oxydation des lipides ont pu être mesurés, un modèle stœchio-cinétique multi-réponses des réactions d'oxydation des lipides ne peut être établi pour la matrice fromagère modèle. Afin de rendre possible le travail de modélisation de la réaction de l'oxydation des lipides, il conviendrait de mettre en place des méthodes de dosage suffisamment précises des acides gras et de réduire la variation observée dans les dosages de l'indice de peroxyde. Bien plus qu'un problème strictement analytique, c'est l'ensemble de la

démarche expérimentale qui serait entièrement à revoir. En effet, la modification du système de cuisson s'avère nécessaire afin de :

- disposer d'une quantité de fromage après cuisson suffisante pour permettre le dosage des peroxydes sur une quantité de matière grasse extraite suffisante.
- réaliser de véritables cinétiques et non plus des cinétiques reconstituées à partir de cuissons multiples, en rendant possible les prélèvements successifs. De cette manière, le prélèvement réalisé à l'instant $t+1$ aurait subi jusqu'à l'instant t rigoureusement le même traitement thermique que le prélèvement réalisé à l'instant t .
- minimiser les variations des teneurs des constituants observées aux températures élevées en partie liées à la répétabilité moyenne des traitements thermiques.
- réaliser toutes les observations à partir de la même formulation initiale (et donc le même jour).

Dans ce contexte, nous avons préféré focaliser nos efforts de modélisation vis à vis de la réaction de Maillard pour laquelle nous disposons de davantage de constituants mesurés à tous les stades d'avancement de la réaction.

2.2 Marqueurs de la réaction de Maillard

Rappelons que le schéma réactionnel théorique de la réaction de Maillard a été présenté en figure I.13 page 24.

2.2.1 Bilan sur les constituants

La première étape de la réaction fait réagir une fonction aminée $R-NH_2$ avec le groupement carbonyle d'un sucre réducteur. La fonction $R-NH_2$ est ensuite relarguée lors de la dégradation du composé d'Amadori en déoxyosone. Il s'agit en quelque sorte d'un catalyseur. De plus, il est reconnu dans la littérature que la formation du composé d'Amadori fait intervenir une quantité inférieure à 5% des fonctions aminées disponibles. Pour ces deux raisons, nous avons choisi de ne pas mesurer systématiquement les groupements aminés totaux et considéré que les fonctions aminées étaient présentes en quantités suffisantes et non limitantes vis à vis de la réaction de Maillard.

Les évolutions au cours des traitements thermiques des autres constituants sélectionnés pour le modèle ont été décrites précédemment. La difficulté est maintenant de parvenir à incorporer ces constituants dans un schéma réactionnel apparent dont la stœchiométrie de toutes les réactions devra être équilibrée.

2.2.2 Écriture d'un schéma réactionnel observable

A partir des marqueurs des traitements thermiques identifiés précédemment 40 réactions élémentaires intervenant au cours de la réaction de Maillard ont pu être écrites et équilibrées. Ces 40 réactions sont présentées en annexe 3.

Il est possible d'écrire autant de réactions de dégradation de Strecker qu'il y a d'aldéhydes de Strecker identifiés (c'est à dire 5). Dans un but de simplification, une seule de ces réactions a été conservée dans le schéma réactionnel apparent. Elle conduit à la formation du 2-méthylbutanal à partir de l'isoleucine. La condensation de deux aminocétone issues de cette dégradation de Strecker conduira à la formation de la pyrazine. De même, nous avons choisi de ne conserver qu'une pyrazine.

Afin de pouvoir modéliser les mélanoidines, il a été considéré que ces dernières étaient le plus probablement formées à partir de molécules carbonylées venant se fixer sur un squelette de caséine comme le suggère Hofmann (1998b). Nous avons émis l'hypothèse que des molécules de maltol, d'isomaltol, de furfural, de 5-méthylfurfural, de 2,3-butanedione et de 2-méthylbutanal venaient se fixer en proportions équimolaires pour former les mélanoidines.

Grâce à ces choix, il a été possible d'élaborer un schéma réactionnel observable, présenté sur la figure III.11. Il est constitué de 14 équations équilibrées mettant en relation 25 constituants (6 constituants quantifiés directement dans la matrice, 7 constituants volatils, 1 mesure de couleur liée à la formation des mélanoidines et 11 constituants non mesurés). Le tableau III.3 présente les 14 réactions conservées et les stoechiométries qui leur sont associées.

Le rang de la matrice des stoechiométries, calculé uniquement à partir des constituants dosés, étant de 14, nous pouvons théoriquement déterminer la valeur de 14 paramètres associés aux 14 réactions du schéma réactionnel.

Il apparaît clairement que le schéma réactionnel observable présenté est étroitement lié :

- au choix des techniques analytiques mises en œuvre (l'utilisation de la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse aurait par exemple certainement conduit à la sélection de marqueurs différents).
- à la capacité du modélisateur à interconnecter les marqueurs réactionnels dans des réactions chimiques équilibrées.

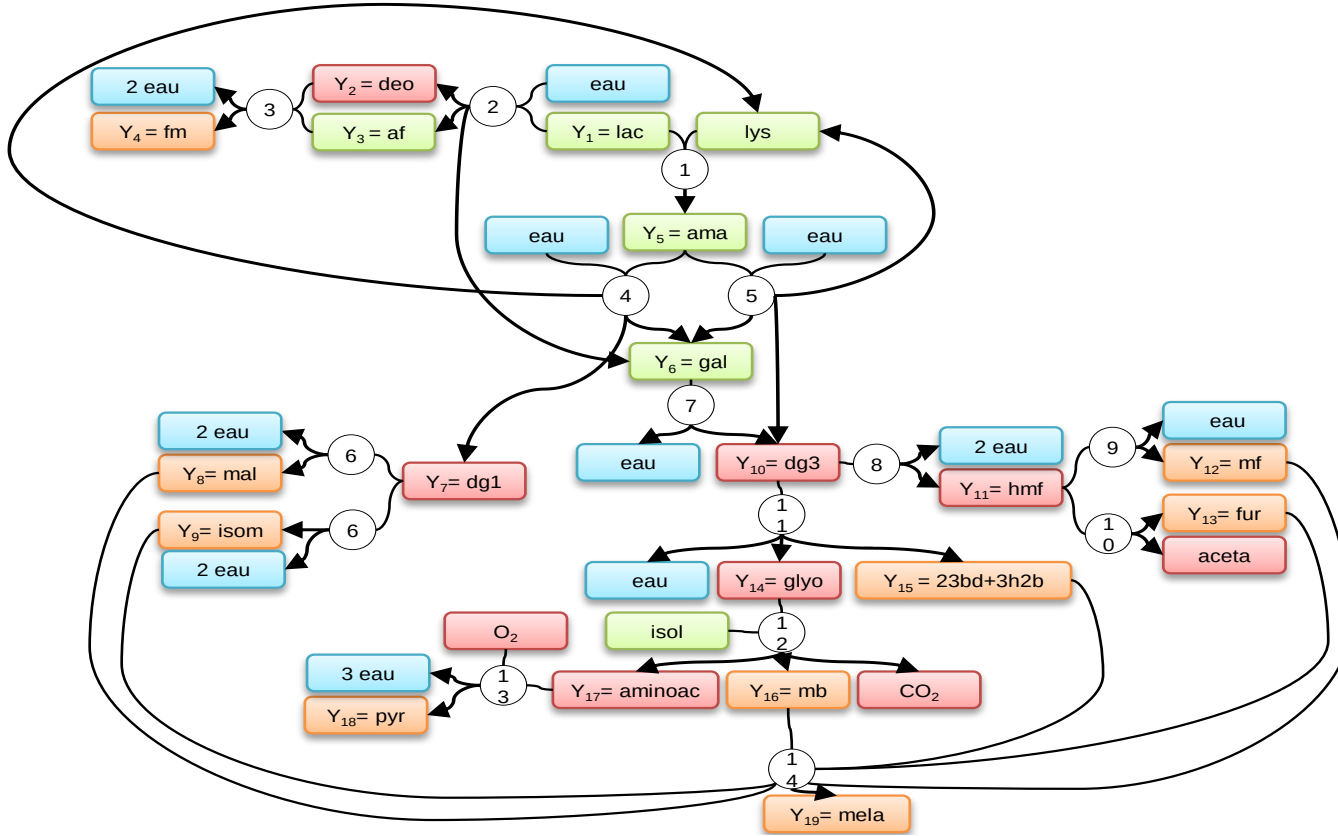


Fig. III.11 – Schéma réactionnel observable de la réaction de Maillard appliquée à la matrice fromagère modèle.

Les numéros représentent la réaction considérée et dont l'écriture est donnée dans le tableau III.3. La couleur verte représente les constituants quantifiés dans la matrice fromagère, la couleur orange, les constituants semi-quantifiés par l'analyse des composés volatils, ou par la mesure de couleur. Les constituants qui ne sont pas quantifiés sont représentés par la couleur rouge. Les différents constituants sont : Y₁ lac : lactose ; Y₂ deo : déoxyribose ; Y₃ af : acide formique ; Y₄ fm : furfurylalcool ; Y₅ ama : lactulosyllysine (mesurée par l'intermédiaire de la furosine) ; Y₆ gal : galactose ; Y₇ : dg1 : 1-déoxyglucosone ; Y₈ : mal : maltol ; Y₉ : isom : isomaltol ; Y₁₀ : dg3 : 3-déoxyglucosone ; Y₁₁ : hmf : 5-hydroxyméthylfurfural ; Y₁₂ : mf : 5-méthylfurfural ; Y₁₃ : fur : furfural ; Y₁₄ : glyo : glyoxal ; Y₁₅ : 23bd+3h2b : 2,3-butanedione en équilibre rédox avec la 3-hydroxy,2-butanone ; Y₁₆ : mb : méthylbutanal ; Y₁₇ : aminoac : amino-cétone ; Y₁₈ : pyr : pyrazine ; Y₁₉ : mela : mélanoidines ; lys : lysine ; isol : isoleucine ; aceta : acétaldéhyde ;

Tab. III.3 – Matrice des stœchiométries du schéma réactionnel apparent. Les différents constituants sont : Y₁ lac : lactose; Y₂ deo : déoxyribose; Y₃ af : acide formique; Y₄ fm : furfurylalcool; Y₅ ama : lactulosyllysine (mesurée par l'intermédiaire de la furosine); Y₆ : gal : galactose; Y₇ : dg1 : 1-déoxyglucosone; Y₈ : mal : maltol; Y₉ : isom : isomaltol; Y₁₀ : dg3 : 3-déoxyglucosone; Y₁₁ : hmf : 5-hydroxyméthylfurfural; Y₁₂ : mf : 5-méthylfurfural; Y₁₃ : fur : furfural; Y₁₄ : glyo : glyoxal; Y₁₅ : 23bd+3h2b : 2,3-butanedione en équilibre rédox avec la 3-hydroxy,2-butanone; Y₁₆ : mb : méthylbutanal; Y₁₇ : aminoc : amino-cétone; Y₁₈ : pyr : pyrazine; Y₁₉ : mela : mélanoidines; lys : lysine; isol : isoleucine; aceta : acétaldéhyde;

n°	réaction	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	Y10	Y11	Y12	Y13	Y14	Y15	Y16	Y17	Y18	Y19						
		lac	deo	af	fm	ama	gal	dg1	mal	isom	dg3	hmf	mf	fur	glyo	23bd	mb	aminoc	pyr	mela	lys	isol	aceta	eau	co ₂	o ₂
1	lys+ lac → amad + eau	-1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	1	0	0
2	lac → deo + af + gal + eau	-1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0
3	deo → fm + 2 eau	0	-1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
4	amad + eau → dg1 + lys + gal	0	0	0	0	-1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	-1	0	0
5	amad + eau → dg3 + lys + gal	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	-1	0	0
6	dg1 → mal + 2 eau	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
6b	dg1 → isom+ 2 eau	0	0	0	0	0	0	-1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
7	gal → dg3+ eau	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
8	dg3→ hmf + 2 eau	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
9	hmf→ mf+ eau	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
10	hmf → fur + aceta	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
11	dg3 → 23bd + glyo + eau	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
12	isol + glyo → mb +co2 + aminoc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	1	1	0	0	0	-1	0	0	1	0	0
13	2 aminoc + 0,5 o2 → pyr+3 eau	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-2	1	0	0	0	0	3	0	-0,5
14	mélanoïdines	0	0	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	-1	-1	0	-1	-1	0	0	1	0	0	0	0	0	0

3 Modélisation stœchio-cinétique

Pour mémoire, le coefficient de quantification apparent K permet de convertir les unités arbitraires de surface mesurées pour les composés volatils en moles. Sa définition est présentée en page 98. Au cours de ce travail, il ne nous a pas été possible d'ajuster correctement les données expérimentales du furfurylalcool et de la pyrazine avec une seule valeur de coefficient de quantification apparent K . Le mauvais ajustement de ces deux composés peut être lié à un schéma réactionnel incomplet ou localement erroné. Cependant, puisque les données expérimentales ne sont pas toutes quantifiées, le modèle stœchio-cinétique multi-réponses ne permet pas de trancher. En outre, il s'agit des deux composés les plus polaires présents dans le schéma réactionnel. Ceci peut justifier que ces composés présentent un coefficient de partage éloigné de celui des autres composés volatils et donc également un coefficient de quantification apparent K_i éloigné de K . Le retour d'expérience nous a fait ajouter deux coefficients de quantification apparents distincts (K_{fme}) et (K_{pyr}) pour le furfurylalcool et la pyrazine.

3.1 Récapitulatif des paramètres

Pour l'optimisation à température constante, 18 paramètres sont à identifier :

- 14 constantes de vitesse ($k_{T=cste}$, une pour chaque réaction), dont la valeur variera en fonction de la température du plateau expérimental considéré.
- 4 coefficients de quantification apparents. En faisant, l'hypothèse que la texture de la matrice n'influence ni la désorption des composés volatils ni la mesure de couleur à la surface de l'échantillon, la valeur de ces coefficients devra être constante quelles que soient les conditions de cuisson. La valeur de ces 4 paramètres a été choisie empiriquement de manière à ce qu'une fois exprimée en moles, les teneurs des différents constituants soient compatibles avec l'ordre de grandeur des rendements théoriques de la réaction de Maillard.

Une fois ces 4 coefficients fixés, les 14 paramètres restants du modèle pourront théoriquement être identifiés. Il ne s'agira cependant que de valeurs apparentes étroitement liées au choix réalisé pour les 4 coefficients de quantification apparents. Le tableau III.4 représente les valeurs fixées pour chacun de ces 4 coefficients.

Pour l'optimisation prenant en compte la cinétique de montée en température, au plus 28 paramètres seront à identifier : les 14 constantes de vitesse seront exprimées au moyen d'au plus 14 facteurs pré-exponentiels et de 14 énergies d'activation (en supposant que chaque constante de vitesse suivent une loi d'Arrhénius).

Tab. III.4 – Valeurs des constantes de quantification apparentes K permettant de convertir les unités arbitraires de surface en moles de composés volatils et l'indice chromatique C_c en moles de composés dicarbonylés fixées aux mélanoidines

Constante	Valeur
K	10^{11}
K_{fme}	$25 \cdot K$
K_{pyr}	$1,5 \cdot K$
C_c	10^{11}

3.2 Optimisation à température constante

Afin de déterminer quelle est la loi de dépendance de chaque constante de vitesse vis à vis de la température, nous avons effectué l'optimisation à température constante à partir des données obtenues à 80, 100, 120, 135 et 150°C. Pour ce faire, nous avons négligé l'effet de la montée en température par rapport à l'effet du plateau de température. Ceci est justifié dans le cas des cinétiques à 80 et 100°C pour lesquelles, la durée de montée en température (35 et 50 secondes respectivement) est très inférieure à la durée de plateau (jusqu'à deux heures). En revanche, dans le cas des cinétiques à 120, 135 et 150°C, ceci peut conduire à une sous-estimation de la valeur de la constante de vitesse déterminée. Puisqu'il s'agit seulement de déterminer l'ordre de grandeur des valeurs qui serviront à initialiser l'optimisation à température variable, nous avons considéré que cette sous-estimation était acceptable. En effet, elle sera corrigée au cours de l'optimisation à température variable. Le tableau III.5 représente les valeurs des 14 constantes de vitesse obtenues à chaque température.

Tab. III.5 – Valeurs des constantes de vitesse apparentes à 80, 100, 120, 135 et 150°C.

Constante	80 ° C	100 ° C	120 ° C	135 ° C	150 ° C
k_1	$1,95 \cdot 10^{-5}$	$2,15 \cdot 10^{-5}$	$2,00 \cdot 10^{-4}$	$2,34 \cdot 10^{-4}$	$5,06 \cdot 10^{-4}$
k_2	$3,03 \cdot 10^{-8}$	$8,00 \cdot 10^{-8}$	$2,00 \cdot 10^{-6}$	$4,55 \cdot 10^{-6}$	$1,37 \cdot 10^{-5}$
k_3	$3,74 \cdot 10^{-5}$	$2,00 \cdot 10^{-4}$	$2,82 \cdot 10^{-4}$	$2,82 \cdot 10^{-4}$	$6,26 \cdot 10^{-4}$
k_4	$7,27 \cdot 10^{-6}$	$1,30 \cdot 10^{-5}$	$1,00 \cdot 10^{-3}$	$1,26 \cdot 10^{-3}$	$2,61 \cdot 10^{-3}$
k_5	$3,43 \cdot 10^{-4}$	$9,80 \cdot 10^{-4}$	$3,00 \cdot 10^{-3}$	$3,61 \cdot 10^{-3}$	$7,97 \cdot 10^{-3}$
k_6	$1,64 \cdot 10^{-8}$	$4,00 \cdot 10^{-7}$	$5,00 \cdot 10^{-6}$	$2,77 \cdot 10^{-5}$	$1,23 \cdot 10^{-3}$
k_7	$8,46 \cdot 10^{-5}$	$8,4 \cdot 10^{-4}$	$1,79 \cdot 10^{-3}$	$1,79 \cdot 10^{-3}$	$7,00 \cdot 10^{-3}$
k_8	$3,43 \cdot 10^{-3}$	$5,11 \cdot 10^{-3}$	$1,00 \cdot 10^{-2}$	$1,00 \cdot 10^{-2}$	$1,00 \cdot 10^{-2}$
k_9	$1,29 \cdot 10^{-9}$	$2,41 \cdot 10^{-8}$	$3,96 \cdot 10^{-6}$	$2,41 \cdot 10^{-5}$	$5,44 \cdot 10^{-5}$
k_{10}	$4,22 \cdot 10^{-7}$	$1,45 \cdot 10^{-5}$	$1,62 \cdot 10^{-4}$	$2,12 \cdot 10^{-4}$	$7,18 \cdot 10^{-4}$
k_{11}	$3,76 \cdot 10^{-7}$	$5,50 \cdot 10^{-6}$	$1,17 \cdot 10^{-4}$	$2,33 \cdot 10^{-4}$	$2,72 \cdot 10^{-4}$
k_{12}	$3,38 \cdot 10^{-5}$	$1,72 \cdot 10^{-4}$	$3,49 \cdot 10^{-4}$	$9,16 \cdot 10^{-4}$	$2,18 \cdot 10^{-3}$
k_{13}	$1,55 \cdot 10^{-7}$	$3,68 \cdot 10^{-5}$	$1,00 \cdot 10^{-3}$	$2,19 \cdot 10^{-3}$	$1,00 \cdot 10^{-2}$
k_{14}	$2,78 \cdot 10^{-5}$	$4,80 \cdot 10^{-7}$	$2,23 \cdot 10^{-4}$	$1,62 \cdot 10^{-3}$	$3,48 \cdot 10^{-3}$

3.3 Détermination de la loi de dépendance à la température

La linéarisation de la loi d'Arrhénus conduit à l'équation III.3 :

$$\ln(k) = \frac{-E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln(k_0) \quad (\text{III.3})$$

Si la constante de vitesse considérée suit une loi d'Arrhénus, la représentation de $\ln(k)$ en fonction de $\frac{1}{T}$ donnera donc une droite de pente $\frac{-E_a}{R}$ et d'ordonnée à l'origine $\ln(k_0)$. Avec 5 observations, le degré de liberté est égal à 3. Ce sera donc le cas si la valeur absolue du coefficient de corrélation de Pearson (r) associée à la droite de régression est supérieure à 0,88 ($p < 0,05$). De plus les incertitudes existantes sur la pente et l'ordonnée à l'origine de la droite estimée peuvent également être déterminées. Ceci conduit alors à une estimation de l'incertitude du facteur pré-exponentiel et de l'énergie d'activation associée à chacune des constantes de vitesse considérées. La figure III.12 présente le résultat obtenu pour l'ajustement du 5-méthylfurfural à 135°C et la régression linéaire de k_9 correspondant à la formation de ce composé. Le tableau III.6 représente les valeurs obtenues pour le facteur pré-exponentiel et l'énergie d'activation des 14 constantes de vitesse du schéma réactionnel. Toutes les réactions considérées étant d'ordre 1, le facteur pré-exponentiel est exprimé en s^{-1} .

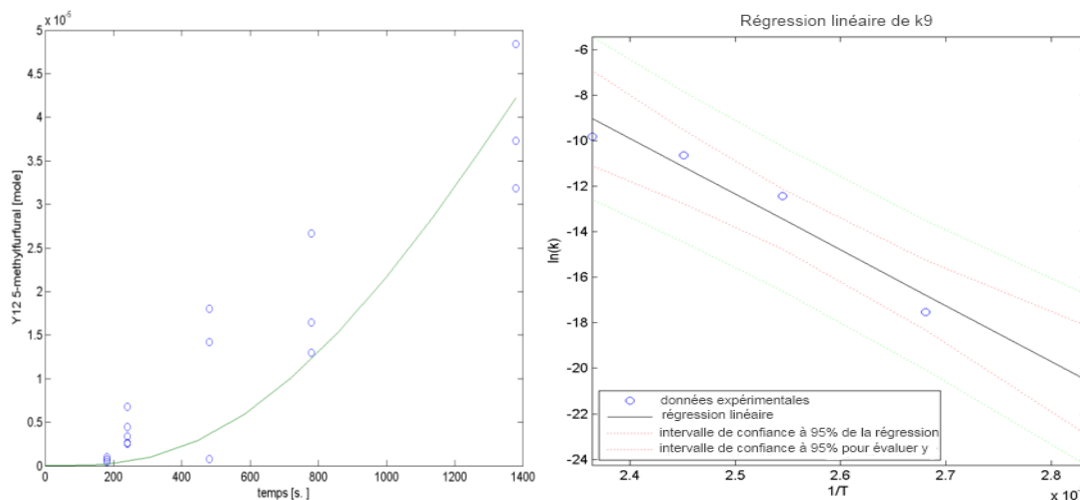


Fig. III.12 – Ajustement du 5-méthylfurfural à 135°C par le modèle (à gauche) et linéarisation de la loi d'Arrhénus appliquée à la constante de vitesse k_9 (à droite).

Les valeurs du coefficient de corrélation montrent que toutes les constantes de vitesse, excepté celle liée à la réaction de formation des mélanoidines (k_{14}), suivent une loi d'Arrhénus dont nous avons pu estimer les paramètres.

La constante de vitesse k_{14} ne suit pas la loi d'Arrhénus probablement en raison

Tab. III.6 – Valeurs du facteur pré-exponentiel (k_0) et de l'énergie d'activation (E_a) déterminées à partir des valeurs des constantes de vitesse obtenues aux différentes températures.

constante	r	k_0 borne inf	k_0 [s ⁻¹]	k_0 borne sup	E_a borne inf	E_a [kJ·mol ⁻¹]	E_a borne sup
1	-0,933	$2,27 \cdot 10^{-1}$	$3,18 \cdot 10^4$	$4,45 \cdot 10^9$	25	63	101
2	-0,975	$7,12 \cdot 10^3$	$3,01 \cdot 10^9$	$1,27 \cdot 10^{15}$	74	116	158
3	-0,915	$1,31 \cdot 10^{-2}$	$1,50 \cdot 10^2$	$1,72 \cdot 10^6$	13	44	74
4	-0,929	$1,77 \cdot 10^2$	$1,41 \cdot 10^{12}$	$1,12 \cdot 10^{22}$	44	118	191
5	-0,989	$8,06 \cdot 10^2$	$4,14 \cdot 10^4$	$2,12 \cdot 10^6$	42	54	67
6	-0,981	$8,69 \cdot 10^{11}$	$5,765 \cdot 10^{19}$	$3,82 \cdot 10^{27}$	129	187	245
7	-0,941	$1,16 \cdot 10^1$	$2,33 \cdot 10^6$	$4,65 \cdot 10^{11}$	30	69	109
8	-0,919	$5,80 \cdot 10^{-2}$	4,52	$3,52 \cdot 10^2$	7	21	35
9	-0,981	$3,14 \cdot 10^{12}$	$1,62 \cdot 10^{21}$	$8,36 \cdot 10^{29}$	139	204	268
10	-0,966	$3,93 \cdot 10^5$	$8,12 \cdot 10^{12}$	$1,68 \cdot 10^{20}$	74	128	183
11	-0,959	$2,07 \cdot 10^4$	$1,39 \cdot 10^{12}$	$9,33 \cdot 10^{19}$	66	124	182
12	-0,992	$1,44 \cdot 10^4$	$1,19 \cdot 10^6$	$9,84 \cdot 10^7$	57	71	85
13	-0,967	$1,78 \cdot 10^{11}$	$1,08 \cdot 10^{22}$	$6,53 \cdot 10^{32}$	112	192	272
14	-0,676	0	$2,01 \cdot 10^{12}$	$1,35 \cdot 10^{38}$	0	121	313

de difficultés analytiques. En effet, la mesure de l'indice chromatique sature dans le cas des traitements à hautes températures. A cet égard une quantification des mélanoidines par spectrophotométrie, comme cela a été réalisé par Brands *et al.* (2002), aurait certainement été plus appropriée puisque cette méthode permet d'éviter la saturation du détecteur par une dilution des échantillons dans le cas de densités optiques trop élevées. Afin d'améliorer l'ajustement des mélanoidines par le modèle, il conviendrait :

- de décrire la dépendance de k_{14} à la température par une loi empirique. Cependant, cette méthode ne permet alors plus de comparer les résultats obtenus à ceux d'autres études.
- de juxtaposer à la loi d'Arrhénius une fonction de pénalité permettant de prendre en compte la saturation liée au détecteur. Ceci nécessiterait d'identifier au moins un paramètre supplémentaire, représentatif de la fonction de saturation du détecteur.

Dans le but de garder le modèle, aussi simple que possible, la loi d'Arrhénius pour la constante de vitesse k_{14} a malgré tout été conservée.

Notons que le passage au logarithme lors de la linéarisation provoque une perte de la normalité de la distribution de l'estimateur de la pente autour de sa valeur moyenne. Dans ce cas, les bornes estimées à partir de la table de Student ne seront pas exactes. Cette méthode permet cependant d'obtenir un ordre de grandeur des bornes des différents paramètres. Afin de prendre en considération ce problème, une marge supplémentaire de 50% a été appliquée pour la définition des bornes servant à l'initialisation de l'optimisation à température variable.

3.4 Optimisation à température variable

L'optimisation a été réalisée en introduisant les lois d'Arrhénius pour chacune des 14 constantes de vitesse. Les valeurs initiales et les bornes de l'optimisation des 28 paramètres ont été fixées à partir des valeurs estimées dans le tableau III.6.

L'optimisation du modèle à toutes les températures s'est avérée extrêmement délicate, en raison d'une relative instabilité du modèle. Ceci est probablement lié au fait que les paramètres ne sont pas réellement indépendants puisque le facteur pré-exponentiel et l'énergie d'activation d'une constante de vitesse sont par exemple liés par la loi d'Arrhénius. Il n'est pas exclu que la solution proposée soit issue d'un minimum local. Afin de minimiser la dépendance existante entre le facteur pré-exponentiel et l'énergie d'activation, van Boekel (2009) suggère l'utilisation d'une loi d'Arrhénius reparamétrée. Dans ce cas, il devient cependant difficile de comparer les valeurs des paramètres identifiées à celles de données issues de la littérature, ces données étant très réduites et nous n'en avons pas trouvé pour les réactions chimiques qui nous intéressent plus particulièrement.

Les figures III.13 à III.17 représentent l'ajustement des données expérimentales après optimisation pour chaque constituant du modèle.

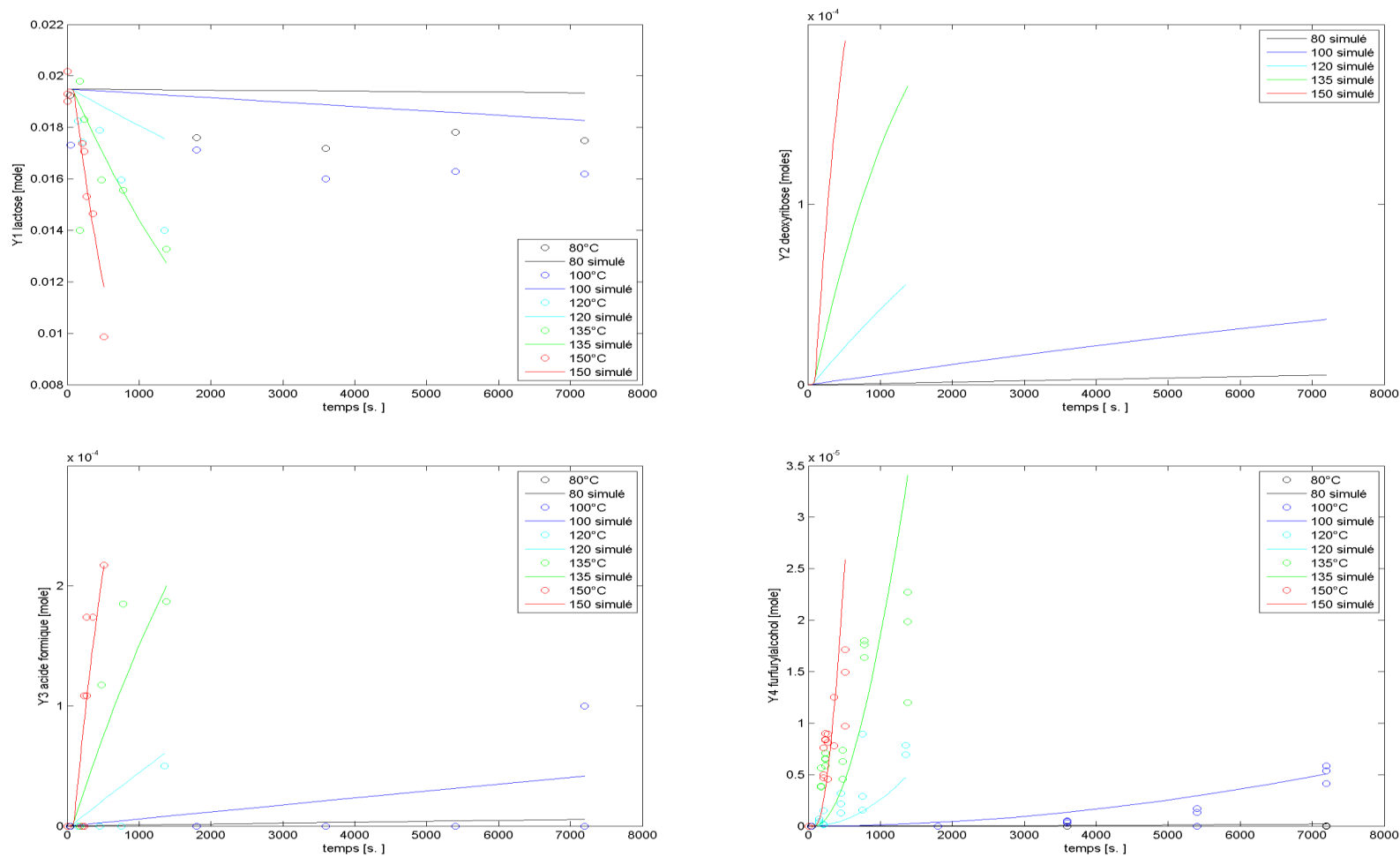


Fig. III.13 – Ajustement des données expérimentales par le modèle stœchio-cinétique multi-réponses pour les valeurs de paramètres données dans le tableau III.7

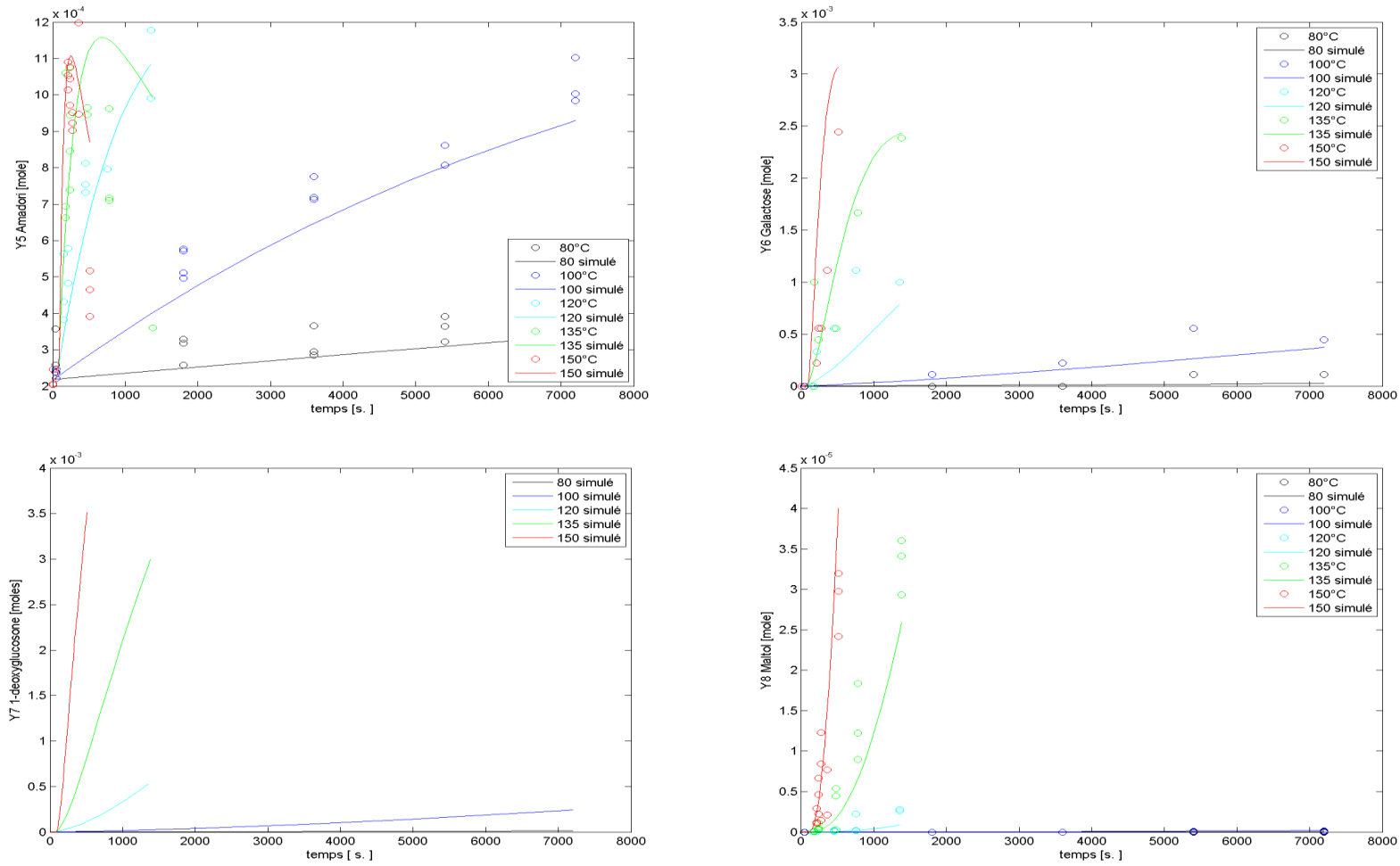


Fig. III.14 – Ajustement des données expérimentales par le modèle stœchio-cinétique multi-réponses pour les valeurs de paramètres données dans le tableau III.7 (suite)

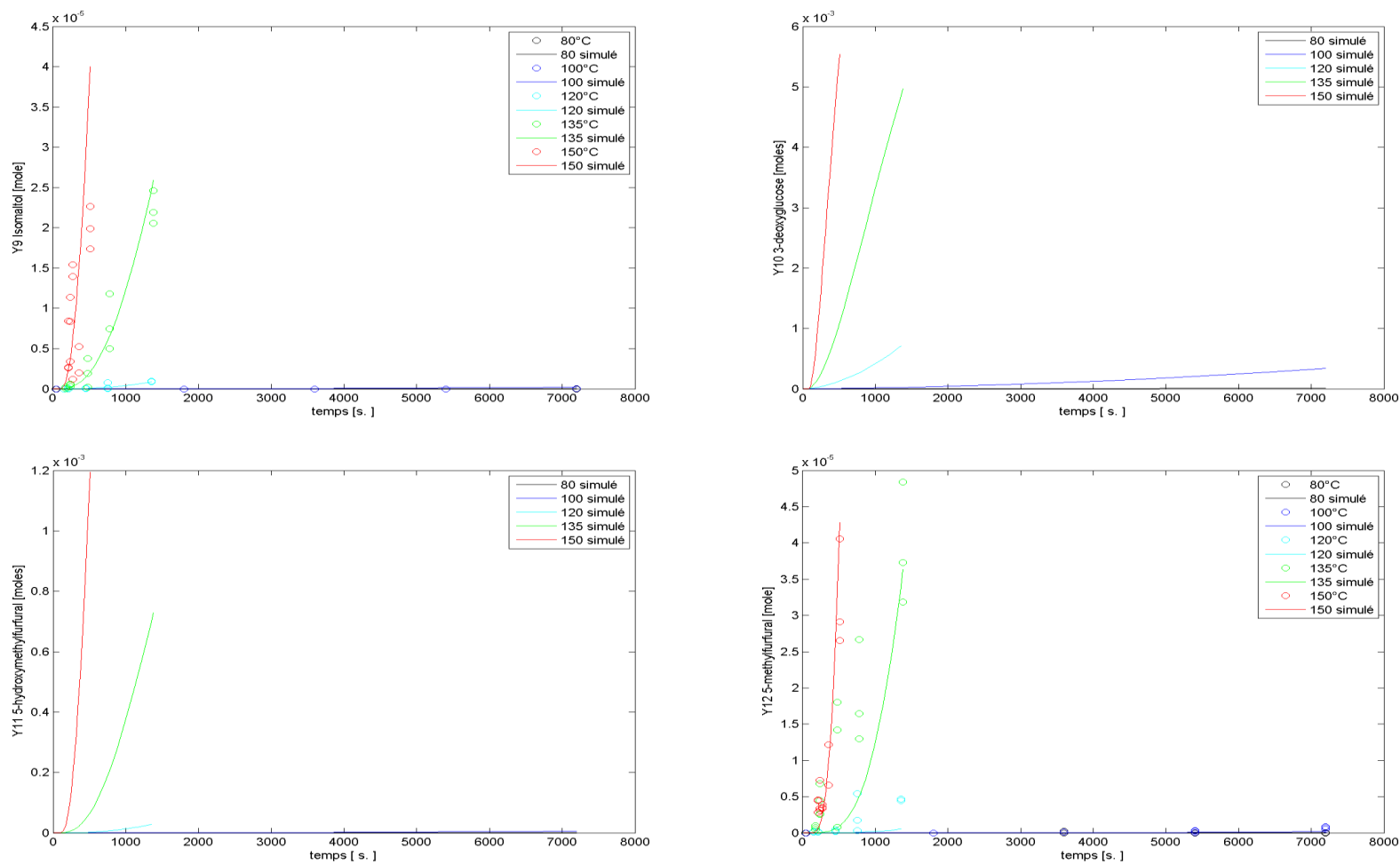


Fig. III.15 – Ajustement des données expérimentales par le modèle stœchio-cinétique multi-réponses pour les valeurs de paramètres données dans le tableau III.7 (suite)

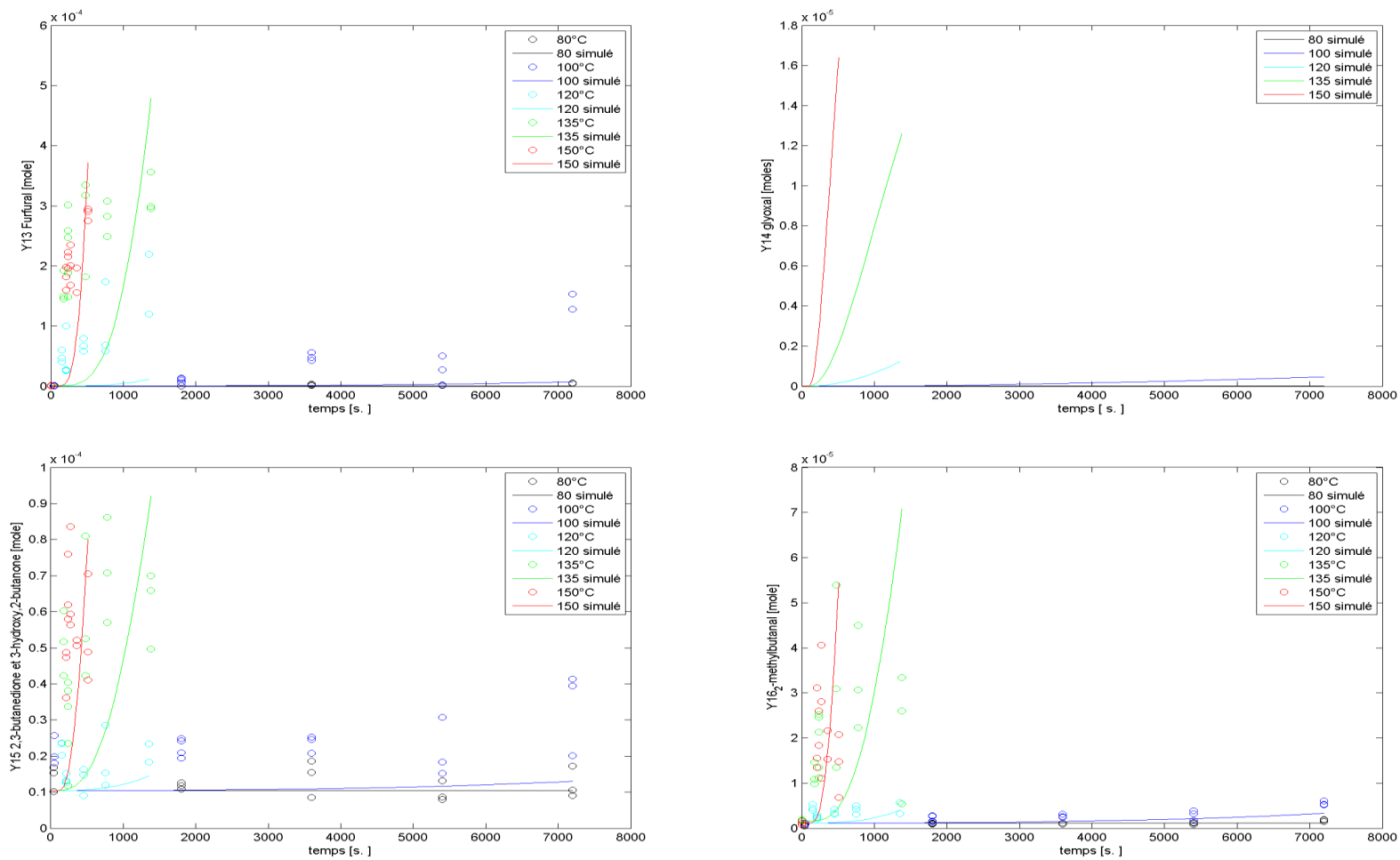


Fig. III.16 – Ajustement des données expérimentales par le modèle stœchio-cinétique multi-réponses pour les valeurs de paramètres données dans le tableau III.7 (suite)

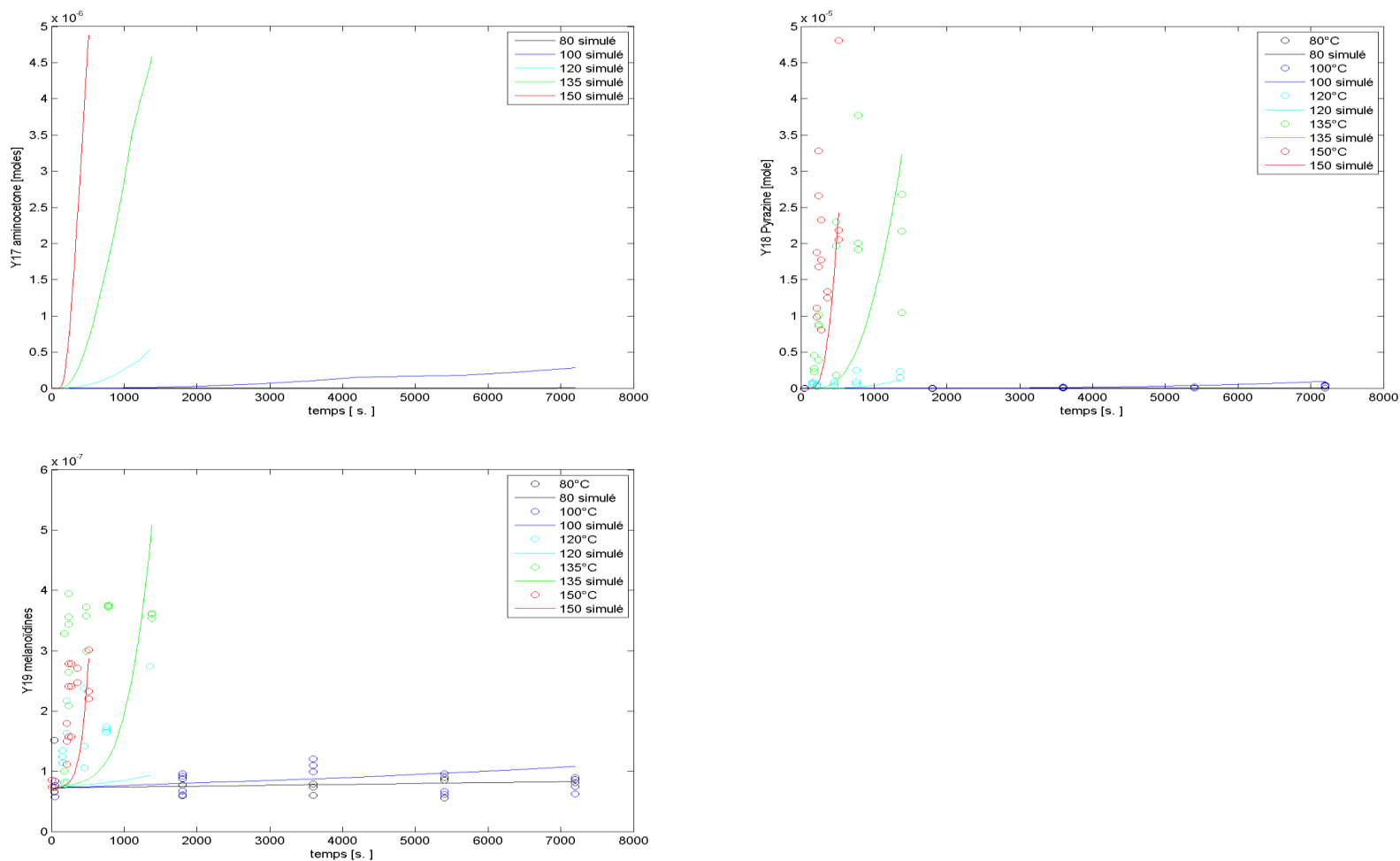


Fig. III.17 – Ajustement des données expérimentales par le modèle stœchio-cinétique multi-réponses pour les valeurs de paramètres données dans le tableau III.7 (fin)

Les données expérimentales apparaissent, de manière générale, relativement bien ajustées par le modèle. Cependant, un examen attentif montre que le lactose, le furfural et la 2,3-butanedione ne sont pas correctement ajustés à 80 et 100°C. Ce manque d'ajustement peut être lié à un schéma réactionnel localement erroné ou incomplet. Un des intérêts de la modélisation stœchio-cinétique multi-réponses est de permettre de sélectionner, parmi plusieurs schémas réactionnels probables, celui présentant le meilleur ajustement des données expérimentales. Dans le cas du schéma que nous avons présenté, les composés volatils n'ont pas pu être quantifiés mais seulement semi-quantifiés. Dans ce cas, le nombre de degrés de liberté existant sur les paramètres du modèle est trop important et il est possible d'ajuster le modèle à l'aide d'un choix de 4 paramètres de quantification apparents différents conduisant à un jeu de 28 valeurs optimisées également complètement différents. Dans une telle situation, la modélisation stœchio-cinétique multi-réponses perd son caractère discriminant pour sélectionner le schéma réactionnel le plus performant parmi plusieurs schémas candidats.

Afin de valider les voies réactionnelles, réellement suivies au cours des traitements thermiques appliqués à la matrice fromagère modèle, il conviendrait de réaliser des expériences de suivi du devenir de précurseurs marqués au carbone 13 ou des expériences de dopage des matrices.

Le tableau III.7 présente les valeurs optimisées de chacun des 28 paramètres et l'incertitude qui leur est associée.

Tab. III.7 – Valeurs du facteur pré-exponentiel (k_0) et de l'énergie d'activation (E_a) optimisées à partir des données expérimentales à toutes les températures pour les 14 constantes de vitesse.

constante	borne inférieure	k_0 [s ⁻¹]	borne supérieure	borne inférieure	E_a [kJ·mol ⁻¹]	borne supérieure
1	$3,06 \cdot 10^{12}$	$3,15 \cdot 10^{12}$	$3,24 \cdot 10^{12}$	124,9	125,0	125,1
2	$2,19 \cdot 10^{10}$	$2,20 \cdot 10^{10}$	$2,21 \cdot 10^{10}$	119,9	120,0	120,1
3	$2,49 \cdot 10^5$	$2,50 \cdot 10^5$	$2,51 \cdot 10^5$	69,9	70,0	70,1
4	$2,88 \cdot 10^{13}$	$1,00 \cdot 10^{14}$	$1,71 \cdot 10^{14}$	104,4	130,0	155,6
5	$8,70 \cdot 10^{13}$	$9,00 \cdot 10^{13}$	$9,30 \cdot 10^{13}$	102,9	130,0	157,1
6	$3,28 \cdot 10^{11}$	$1,10 \cdot 10^{12}$	$1,87 \cdot 10^{12}$	106,4	132,0	157,6
7	0	$3,40 \cdot 10^9$	$3,60 \cdot 10^{10}$	66,0	96,0	126,0
8	0	$1,00 \cdot 10^{12}$	$3,16 \cdot 10^{12}$	0,0	120,0	298,5
9	0	$2,00 \cdot 10^6$	$6,31 \cdot 10^6$	0,0	80,0	265,6
10	0	$2,00 \cdot 10^2$	$9,56 \cdot 10^2$	32,2	40,0	47,8
11	0	$5,00 \cdot 10^5$	$3,53 \cdot 10^6$	21,9	80,0	138,1
12	0	$5,00 \cdot 10^5$	$3,89 \cdot 10^6$	13,3	60,0	106,7
13	0	$1,20 \cdot 10^8$	$9,39 \cdot 10^8$	32,8	80,0	127,2
14	0	$1,00 \cdot 10^2$	$1,37 \cdot 10^4$	0	60,0	122,5

La matrice d'information de Fischer, dont le calcul a été présenté en équation II.22 page 101, est utilisée pour le calcul des incertitudes sur les différents

paramètres. La valeur du conditionnement de la matrice d'information élevée (en 10^{20}) indique que le calcul des incertitudes n'est pas très fiable. Ce calcul conduit à des valeurs très variables selon les constituants.

Afin de diminuer l'incertitude existante sur les différents paramètres, il conviendrait d'augmenter en conséquence le nombre de points expérimentaux. Parallèlement aux 4 thèses réalisées dans le cadre du projet Réactial, une boîte à outils statistiques a été développée. Elle permet de sélectionner itérativement les cinétiques (en régime dynamique) les plus pertinentes à réaliser tout en effectuant le nombre d'essais le plus réduit possible (Goujot et Courtois, 2009; Goujot *et al.*, 2011). Ce travail, qui prend tout son sens dans la réflexion sur la stratégie expérimentale à mettre en œuvre dans le cas d'études stœchio-cinétiques qui nécessitent l'obtention d'un grand nombre de données expérimentales fastidieuses à acquérir, pourrait être utilisé afin de minimiser le nombre d'expériences à réaliser.

Une alternative consisterait à utiliser d'autres méthodes d'évaluation de l'incertitude comme par exemple la méthode de Monte-Carlo par chaînes de Markov (Brooks, 1998).

Il est observé que les incertitudes sont beaucoup plus importantes pour les constantes de vitesse k_6 à k_{14} qui correspondent à des réactions pour lesquelles les constituants mesurés ne sont pas quantifiés.

En outre, certains composés intermédiaires non mesurés, comme par exemple le 2-déoxyribose, le 1- et le 3-déoxyglucosone ou encore le 5-hydroxyméthylfurfural, jouent un rôle de tampon dans le schéma réactionnel. En effet, les constantes de vitesse des réactions associées à ces constituants (8, 9 et 10) ne sont dans ce cas ajustées que par rapport aux constituants les suivants ou les précédents.

En ce sens, la possibilité de doser ces constituants apporterait davantage de robustesse au schéma réactionnel et réduirait les incertitudes des différents paramètres identifiés.

Une alternative serait de supprimer les constituants non mesurés du schéma réactionnel. Ce qui se traduirait alors par l'écriture de réactions apparentes qui ne seraient plus élémentaires et dont les constantes de vitesse ne suivraient probablement plus la loi d'Arrhénius.

Jousse *et al.* (2002) obtiennent une énergie d'activation de $128,8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour la formation du composé d'Amadori. La valeur que nous avons estimée de $125 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ est du même ordre de grandeur. Il s'avère en revanche impossible de trouver des informations dans la littérature pour les autres énergies d'activation correspondantes aux réactions qui ont été étudiées. Ceci est probablement lié au challenge constitué par la quantification des composés volatils rendant difficile la démarche de modéli-

sation stœchio-cinétique multi-réponses appliquée aux composés volatils.

4 Validation et test du modèle stœchio-cinétique

Pour des raisons de disponibilité du matériel, les expériences ont été réalisées avant que la modélisation du schéma réactionnel ne soit finalisée. Nous avons choisi de nous rapprocher du barème thermique utilisé dans le cadre de la recherche des marqueurs des traitements thermiques sur les cuissons réalisées en pilote industriel. Le barème que nous avons appliqué comprenait :

- une montée en température de 20 à 120°C réalisée en 4 minutes et 30 secondes.
- un maintien de la température à 120°C pendant une minute.
- une étape de traitement thermique à 80°C pendant 1 heure.

La figure III.18 représente l'évolution de la pyrazine au cours de la cinétique de cuisson de validation.

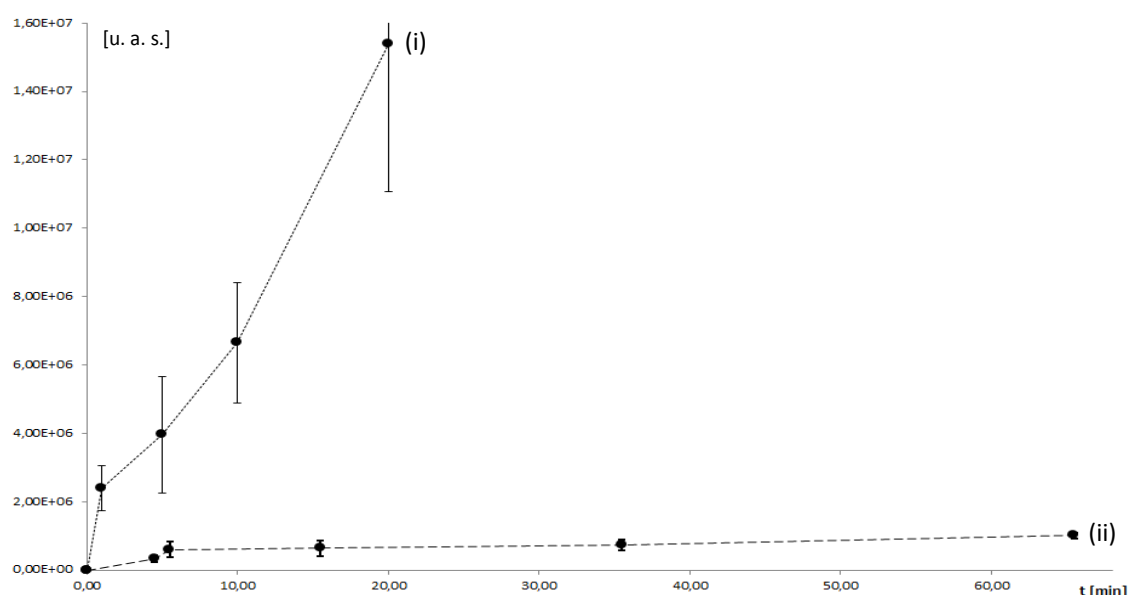


Fig. III.18 – Evolution de la pyrazine au cours (i) du traitement thermique de 20 minutes à 120°C réalisé précédemment et (ii) du traitement thermique de validation. Les données sont exprimées en unités arbitraires de surface de l'aire du pic chromatographique. Les barres d'erreurs représentent l'écart type obtenu à partir de trois répétitions.

Suite à la rupture du filament du spectromètre de masse, des opérations de maintenance sur la source du spectromètre de masse ont été nécessaires. Les expériences de validation n'ont ainsi pas pu être réalisées dans les mêmes conditions analytiques que celles ayant servi à l'élaboration du modèle. Avec cette nouvelle configuration qui présentait une sensibilité instrumentale différente, il n'a pas été possible de pré-

dire correctement les données expérimentales à l'aide des valeurs des constantes de vitesse déterminées précédemment.

Afin de tenter d'ajuster malgré tout les données issues des expériences de validation, nous avons réalisé une ultime optimisation portant uniquement sur les 4 paramètres servant à prendre en compte le fait que les données ne soient pas quantifiées (K , K_{fme} , K_{pyr} et C_c). Malgré cela, les données n'ont pas pu être correctement ajustées. Ceci très probablement lié au fait que les valeurs de constantes de vitesse et celles des énergies d'activation apparentes déterminées au cours du travail d'optimisation à températures variables, sont étroitement liées au choix des 4 paramètres servant à la quantification. (L'optimisation de l'ensemble des paramètres permet effectivement d'ajuster les données expérimentales. Mais ce résultat ne saurait en aucun cas être considéré comme une validation et n'est pour cette raison pas présenté.)

D'autres méthodes de validation ont été envisagées. Le travail d'optimisation pourrait par exemple être effectué à partir d'un sous-ensemble des données expérimentales (par exemple les deux tiers). Le sous-ensemble restant servant à la validation. Cependant, l'optimisation sur l'ensemble des données était déjà très délicate en raison de la grande instabilité du système liée au nombre réduit d'observations par rapport au nombre de paramètres à identifier. Pour cette raison, ce type de validation, réduisant le nombre d'observations disponibles pour la réalisation de l'optimisation a été rejeté. Une validation de type « leave one out » sur les valeurs moyennes permettrait cependant de limiter la réduction du sous-ensemble des données servant à la validation. Elle n'a pour le moment pas encore été effectuée.

Notons, que les variations observées dans les conditions de traitements thermiques réalisées pour l'obtention des données de validation sont relativement faibles. Ceci indique que les barèmes thermiques choisis pour valider le modèle ne sont pas optimaux. Dans, ces conditions, il n'est pas possible de conclure quant à la validité du modèle stœchio-cinétique multi-réponses.

De plus, il apparaît clairement que le modèle stœchio-cinétique multi-réponses proposé n'est pas suffisamment robuste. Les interrogations sont alors ouvertes en ce qui concerne l'intérêt d'un modèle de prédiction qui n'est utilisable que dans une configuration analytique très précise. Dans ce contexte, la mise en place de méthodes permettant de quantifier les composés volatils dans des matrices dont les propriétés de désorption des composés volatils varient en fonction des traitements qui leur sont appliqués apparaît plus que jamais comme un challenge analytique majeur.

Conclusion des Résultats et Discussions

Les résultats présentés mettent en évidence plusieurs éléments.

- La fraction volatile contient l'information nécessaire permettant de suivre l'évolution chimique de la composition d'un fromage fondu au cours de son procédé de fabrication réel.
- Dans le cas des formulations de laboratoire, il a été possible d'identifier et de suivre un grand nombre de composés volatils (et non volatils) marqueurs du traitement thermique. En particulier, le rôle clé du réarrangement d'Ama-dori dans la réaction de Maillard a été établi. La lactulosyllysine est, en effet, un intermédiaire réactionnel relativement stable. Elle ne se dégrade que très peu à des températures inférieures à 120°C. Au delà de cette température, il a été possible de suivre et d'identifier les produits issus de sa dégradation, et également les composés odorants, en particulier le maltol et le furanéol, potentiellement responsables de l'apparition de défauts de « trop cuit ».
- En ce sens, les procédés industriels semblent déjà relativement bien optimisés puisque les durées passées à des températures supérieures à 120°C sont aussi réduites que possible. Ceci n'exclut pas que des défauts organoleptiques puissent éventuellement apparaître en raison de composés non volatils.
- Les difficultés rencontrées pour doser les intermédiaires réactionnels comme les hydroperoxydes associés à l'oxydation des lipides ont rendu impossible le travail de modélisation stœchio-cinétique multi-réponses pour la réaction d'oxydation des lipides puisque seul des produits finaux ont pu être mesurés. En revanche, il a été possible de modéliser avec succès les variations des teneurs des marqueurs sélectionnés de la réaction de Maillard à l'aide de cette méthode. Il s'agit, à notre connaissance, de l'une des premières fois que ce travail de modélisation stœchio-cinétique multi-réponses est effectué à partir d'une matrice alimentaire réelle.
- L'impossibilité de quantifier un nombre important de composés volatils dans une matrice dont les propriétés de texture varient fortement au cours des traitements réduit fortement l'intérêt de l'utilisation d'un modèle stœchio-cinétique. En effet, dans ces conditions, il est délicat de tester les performances des différents schémas réactionnels envisageables.
- Afin de réduire les incertitudes existantes sur le schéma réactionnel, un travail de suivi du devenir de précurseurs marqués au carbone 13 serait à envisager.
- Dans le but de réduire les incertitudes expérimentales, il conviendrait de revoir entièrement la démarche de réalisation des cinétiques et en particulier de permettre la réalisation des différentes analyses avec les quantités d'échantillons

spécifiées dans les différents protocoles, garantissant une erreur de mesure réduite. Pour cela, la capacité du système de cuisson de laboratoire devrait être augmentée à 40 grammes au moins. Il serait également souhaitable que ce système assure le maintien de la matrice fromagère sous une agitation constante et permette également la réalisation de l'ensemble des prélèvements de fromage au cours de la même cinétique de traitement thermique. Ainsi, de véritables cinétiques pourraient être réalisées et non pas des cinétiques reconstituées à partir de cuissons multiples. Le développement d'un tel système demeure cependant une gageure compte tenu des barèmes thermiques à appliquer ainsi que des contraintes spécifiques liées à l'analyse des composés volatils.

Pour conclure, la quantification des composés volatils dans une matrice aux propriétés de texture variables au cours des traitements, demeure le point critique majeur, qui une fois levé permettrait de disposer de toutes les informations nécessaires à la modélisation stœchio-cinétique multi-réponses qui soient susceptibles d'être utilisées pour sélectionner le schéma réactionnel le plus performant parmi plusieurs schémas envisageables.

Conclusions et Perspectives

Ce travail de thèse a permis de lever un certain nombre de verrous pour la réalisation d'un modèle stœchio-cinétique multi-réponses appliqué à une matrice fromagère en vue de prédire les teneurs en lactose, galactose, lactulosyllysine ainsi que la formation de certains composés volatils au cours de l'avancement de la réaction de Maillard. Il s'agit d'un travail pionnier, comme l'ensemble des autres travaux réalisés dans le cadre du projet ANR Réactial. Ce projet est en effet à notre connaissance une des premières tentatives d'application de la modélisation stœchio-cinétique multi-réponses à des produits alimentaires de la vie quotidienne. Dans le cas du travail sur la matrice fromagère, une attention particulière a été portée sur les composés volatils potentiellement à l'origine de l'apparition de défauts de flaveur au cours de la cuisson. Dans ce contexte, des outils méthodologiques ont été développés. Ils permettent de formuler une matrice fromagère modèle simplifiée, de réaliser des traitements thermiques dans une cellule de cuisson respectueuse de la fraction volatile et limitant le risque de contaminations. L'identification et le suivi des composés volatils formés au cours de ces traitements ont été réalisés à l'aide de différents couplages de chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse et à l'olfactométrie. Certains des constituants identifiés ont pu être mis en relation dans un schéma réactionnel qui a donné lieu à une modélisation stœchio-cinétique multi-réponses.

Les résultats que nous avons obtenus permettent pour la première fois d'accéder aux valeurs des énergies d'activation et des paramètres pré-exponentiels associés aux réactions de formation des composés volatils. Etant donné le nombre réduit de données expérimentales disponibles, les paramètres que nous avons estimés présentent une incertitude élevée. Ces résultats mettent en évidence l'importance du choix des conditions expérimentales pour réaliser une bonne identification des différents para-

mètres du modèle. Le modèle présenté n'est pas actuellement transférable vers les équipements industriels. Il permet cependant de montrer que les barèmes appliqués en conditions industrielles sont déjà relativement bien adaptés pour réduire le risque de formation de défauts de « trop cuit » puisqu'ils minimisent le temps passé à des températures supérieures à 120°C à partir de laquelle des produits odorants de la réaction de Maillard, dont le maltol et le furanéol, se forment.

Avant d'envisager le transfert d'un tel modèle, des travaux complémentaires devront être réalisés. Pour ce faire, 4 points critiques successifs ont été identifiés. Il s'agit de l'amélioration du système de cuisson, des protocoles analytiques, de la planification expérimentale et de la modélisation proprement dite.

L'amélioration du système de cuisson est indispensable. En effet, l'acquisition de données expérimentales s'est avérée longue et fastidieuse. Au total, ce sont près de 400 cuissons qui ont été nécessaires afin de permettre la réalisation de l'ensemble des analyses. A très court terme, il serait envisageable de développer et d'utiliser un système de cuisson permettant de travailler sur une quantité de fromage plus importante (et garantissant la possibilité de réaliser les dosages des différents constituants avec des quantités de fromage suffisantes). Ce système devra être maintenu sous agitation au cours des traitements (afin de réduire l'hétérogénéité de traitement thermique). Il devra également offrir la possibilité de réaliser des prélèvements successifs au cours d'un même traitement thermique. Dans ce contexte, de véritables cinétiques seront alors obtenues et non plus des cinétiques reconstituées à partir multiples cuissons indépendantes. A moyen terme, le modèle pourra être complété en introduisant l'effet de nouveaux paramètres comme le pH, l'activité de l'eau, la concentration initiale des différents réactifs, ou encore la pression partielle en oxygène.

La quantification des composés volatils dans une matrice polyphasique dont les propriétés physico-chimiques sont modifiées au cours des traitements appliqués reste le principal verrou si l'on désire tirer pleinement parti d'un modèle stœchio-cinétique multiréponses. En effet, l'absence de quantification altère le caractère discriminant de la modélisation stœchio-cinétique multi-réponses, permettant de sélectionner le modèle réactionnel ajustant le mieux les données expérimentales. Les méthodes analytiques utilisées pour le suivi des différents constituants devront être améliorées dans le but de parvenir à un schéma dont les voies réactionnelles sont validées. En l'absence de méthodes quantitatives de dosage des composés volatils, la validation des voies réactionnelles pourrait, par exemple, être effectuée par le suivi du carbone 13, issu de précurseurs marqués, dans les différents intermédiaires réactionnels. D'autre

part, la mise au point de méthodes de dosage de certains composés intermédiaires que nous n'avons pas pu doser dans ce travail, tels que les déoxyglucosones ou le 5-hydroxyméthylfurfural permettrait également de renforcer le schéma réactionnel considéré.

La mise en œuvre d'outils récents de planification expérimentale permettra, une fois le schéma réactionnel validé, de sélectionner les expériences les plus pertinentes pour réduire les incertitudes observées sur les paramètres du modèle. En effet, parallèlement aux 4 thèses réalisées dans le cadre du projet Réactial, une boîte à outils statistiques a été développée. Elle permet de sélectionner itérativement les cinétiques les plus pertinentes à réaliser tout en effectuant le nombre d'essais le plus réduit possible. Ce travail, prend tout son sens dans la réflexion sur la stratégie expérimentale à mettre en œuvre dans le cas d'études stœchio-cinétiques qui nécessitent l'obtention d'un grand nombre de données expérimentales fastidieuses à acquérir.

En ce qui concerne la modélisation stœchio-cinétique multi-réponses, celle-ci sera performante dans le cas de données quantifiées. Si la quantification s'avère impossible, il conviendra d'envisager d'autres approches de modélisation. Les étapes de validation et de test du modèle devront être mieux anticipées. Si possible, les cuissons et les analyses nécessaires aux étapes d'apprentissage, de validation et de test devront être réalisées simultanément afin de s'affranchir des risques de dérives instrumentales et particulièrement de celles des spectromètres de masse.

A beaucoup plus long terme et une fois solutionnés l'ensemble des points critiques précédemment discutés, la transférabilité du modèle vers les industriels pourra être abordée. D'autre part, le couplage du modèle réactionnel chimique avec un modèle multi-physique pourrait être envisagé, afin de déterminer quelles sont les zones sensibles d'un échangeur de chaleur, ou de toute autre opération unitaire de traitement thermique, vis à vis de la formation de certains composés. La géométrie la plus adaptée pourrait alors être proposée. Le modèle développé pourrait aussi être adapté à la réalisation d'études de l'évolution des marqueurs réactionnels au cours du stockage. Pour cela, il conviendra de valider les mécanismes réactionnels se produisant aux basses températures (de 4 à 60°C). Un modèle combiné associant toute l'histoire thermique du produit de sa fabrication à sa consommation pourrait alors être développé.

Bibliographie

ACREE, T. (1984).

A procedure for the sensory analysis of gas chromatographic effluents.
Food Chemistry, 14(4):273–286.

82

ACREE, T. et ARN, H. (2006).

Flavornet, a compilation of aroma compounds found in human odor space. gas chromatography - olfactometry (GCO) of natural products.
[http ://www.flavornet.org/index.html](http://www.flavornet.org/index.html).

88

AFNOR (2005a).

Alimentation des animaux - détermination de la teneur en acides aminés.
Norme Française, XP V. 18-113.

92

AFNOR (2005b).

Alimentation des animaux - détermination de la teneur en tryptophane.
Norme Française, XP V. 18-114.

92

AOCS (2000).

Peroxide value, acetic acid-chloroform method.

In FIRESTONE, D., éditeur : *Official methods and recommended practices of the AOCS, section C : commercial fats and oils, 5th ed.*, pages cd 8–53. AOCS Press, Champaign, IL.

91

ARTHUR, C. L. et PAWLISZYN, J. (1990).

Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers.
Analytical Chemistry, 62(19):2145–2148.

73

ASHOOR, S. H. et ZENT, J. B. (1984).

Maillard browning of common amino-acids and sugars.

- Journal of Food Science*, 49(4):1206–1207.
30
- BABUSHOK, V. I., LINSTROM, P. J., REED, J. J., ZENKEVICH, I. G., BROWN, R. L., MALLARD, W. G. et STEIN, S. E. (2007).
Development of a database of gas chromatographic retention properties of organic compounds.
Journal of Chromatography A, 1157(1-2):414–421.
78
- BALAGIANNIS, D. P., PARKER, J. K., PYLE, D. L., DESFORGES, N., WEDZICHA, B. L. et MOTTRAM, D. S. (2009).
Kinetic modeling of the generation of 2-and 3-Methylbutanal in a heated extract of beef liver.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(21):9916–9922.
186
- BEAL, A. D. et MOTTRAM, D. S. (1994).
Compounds contributing to the characteristic aroma of malted barley.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42(12):2880–2884.
26
- BELITZ, H. D., GROSCH, W. et SCHIEBERLE, P. (2009).
Food chemistry 4th revised and extended edition.
Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, Germany.
116, 117, 118, 186
- BENSON, B. B. et KRAUSE, D. (1984).
The concentration and isotopic fractionation of oxygen dissolved in freshwater and seawater in equilibrium with the atmosphere.
Limnology and Oceanography Journal, 29(3):620–632.
53
- BERDAGUÉ, J. L. et TOURNAYRE, P. (2002).
The "Video-Sniff" method, a new approach for the Vocabulary-Intensity-Duration" study of "Elementary odours" perceived by gas-chromatography-olfaction.
In LE QUÉRÉ, J. L. et ETIEVANT, P. X., éditeurs : *Flavor research at the dawn of the 21st century*, pages 514–519. Editions Tec & Doc, Paris, France.
82, 83, 88
- BERDAGUÉ, J. L., TOURNAYRE, P. et CAMBOU, S. (2007).
Novel multi-gas chromatography-olfactometry device and software for the identification of odour-active compounds.
Journal of Chromatography A, 1146(1):85–92.
83, 84, 87, 88
- BERG, H. E. et VAN BOEKEL, M. A. J. S. (1994).
Degradation of lactose during heating of milk. 1. reaction pathways.
Netherlands Milk and Dairy Journal, 48:157–175.
116, 119, 186

- BERTSCH, W. (1978).
Methods in high resolution gas chromatography. two-dimensional techniques.
Journal of High Resolution Chromatography, 1(2):85–90.
80
- BIANCO, G., NOVARIO, G., ZIANNI, R. et CATALDI, T. (2009).
Comparison of two SPME fibers for the extraction of some off-flavor cork-taint compounds in bottled wines investigated by GC-HRMS.
Analytical and Bioanalytical Chemistry, 393(8):2019–2027.
74
- BICCHI, C., CORDERO, C., LIBERTO, E., RUBIOLO, P. et SGORBINI, B. (2004).
Automated headspace solid-phase dynamic extraction to analyse the volatile fraction of food matrices.
Journal of Chromatography A, 1024(1-2):217–226.
76
- BICCHI, C., CORDERO, C., LIBERTO, E., SGORBINI, B. et RUBIOLO, P. (2008).
Headspace sampling of the volatile fraction of vegetable matrices.
Journal of Chromatography A, 1184(1-2):220–233.
76
- BLEY, M., JOHNSON, M. E. et OLSON, N. F. (1985a).
Factors affecting non-enzymatic browning of process cheese.
Journal of Dairy Science, 68:555–561.
9
- BLEY, M., JOHNSON, M. E. et OLSON, N. F. (1985b).
Predictive test for the tendency of cheddar cheese to brown after processing.
Journal of Dairy Science, 68:2517–2520.
9
- BLUMBERG, L. M. (2003).
Comprehensive two-dimensional gas chromatography : metrics, potentials, limits.
Journal of Chromatography A, 985(1-2):29–38.
80
- BLUMBERG, L. M., DAVID, F., KLEE, M. S. et SANDRA, P. (2008).
Comparison of one-dimensional and comprehensive two-dimensional separations by gas chromatography.
Journal of Chromatography A, 1188(1):2–16.
80
- BLUMBERG, L. M. et KLEE, M. S. (2001).
Quantitative comparison of performance of isothermal and temperature-programmed gas chromatography.
Journal of Chromatography A, 933(1-2):13–26.
78
- BRANDS, C. M. J. et VAN BOEKEL, M. A. J. S. (2001).
Reactions of monosaccharides during heating of sugar-casein systems : building of a reaction network model.

- Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10):4667–4675.
41, 186
- BRANDS, C. M. J. et VAN BOEKEL, M. A. J. S. (2002).
Kinetic modeling of reactions in heated monosaccharide-casein systems.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(23):6725–6739.
41, 42
- BRANDS, C. M. J., WEDZICHA, B. L. et VAN BOEKEL, M. A. J. S. (2002).
Quantification of melanoidin concentration in sugar-casein systems.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(5):1178–1183.
94, 135
- BRICKLEY, C. A., AUTY, M. A. E., PIRAINO, P. et MCSWEENEY, P. L. H. (2007).
The effect of natural cheddar cheese ripening on the functional and textural properties of the processed cheese manufactured therefrom.
Journal of Food Science, 72(9):C483–C490.
8, 9
- BROOKS, S. (1998).
Markov chain monte carlo method and its application.
Journal of the Royal Statistical Society : Series D (The Statistician), 47(1):69–100.
143
- BUTTERY, R. G., GUADAGNI, D. G. et LING, L. C. (1973).
Flavor compounds. volatilities in vegetable oil and oil-water mixtures. estimation of odor thresholds.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 21(2):198–201.
71
- BUTTERY, R. G., TURNBAUGH, J. G. et LING, L. C. (1988).
Contribution of volatiles to rice aroma.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 36(5):1006–1009.
26
- BYLUND, G. (1995).
Dairy processing handbook.
Tetra Pak Processing Systems, Lund, Sweden.
9, 10, 17
- CAMMERER, B., WEDZICHA, B. et KROH, L. (1999).
Nonenzymatic browning reactions of retro-aldol degradation products of carbohydrates.
European Food Research and Technology, 209(3-4):261–265.
186
- CANAC-ARTEAGA, D., VIALON, C. et BERDAGUE, J. (2000).
Analytical artifacts caused by the presence of water vapor in the headspace of food products.
Analisis, 28(6):550–556.
87

- CARIC, M. (2000).
Processed cheese.
In FRANCIS, F. J., éditeur : *Encyclopedia of Food Science and Technology second edition*,
pages 1973–1987. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
6, 12, 13, 15, 16
- CAUSERET, J. et CIROT, E. (1959).
Ebullition domestique et teneur en riboflavine du lait de vache.
Le Lait, 39(383-384):159–165.
20
- CERNY, C. (2008).
The aroma side of the maillard reaction.
Annals of the New York Academy of Sciences, 1126(1):66–71.
36, 39
- COCA, M., GARCIA, M. T., ALINK, G., PENA, M. et GARCIA, J. A. (2004).
Study of coloured components formed in sugar beet processing.
Food Chemistry, 86:421–433.
35
- COMMISSION DU CODEX ALIMENTARIUS (1995).
Norme général codex pour les additifs alimentaires.
Codex Alimentarius, Codex Stan 192-1995:22–23.
6
- CONTARINI, G. et PAVOLO, M. (2002).
Volatile fraction of milk : comparison between purge and trap and solid phase microextraction techniques.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(25):7350–7355.
76, 114
- D'ACAMPORA ZELLNER, B., BICCHI, C., DUGO, P., RUBIOLO, P. et DUGO, G. (2008a).
Linear retention indices in gas chromatographic analysis : a review.
Flavour and Fragrance Journal, 23(5):297–314.
79
- D'ACAMPORA ZELLNER, B., DUGO, P., DUGO, G. et MONDELLO, L. (2008b).
Gas chromatography-olfactometry in food flavour analysis.
Journal of Chromatography A, 1186(1-2):123–143.
83
- DANEHY, J. P. (1986).
Maillard reactions : nonenzymatic browning in food systems with special reference to the development of flavor.
Advances in Food Research, 30:77–138.
26, 186
- DE BRUIJN, J. M. (1986).
Monosaccharides in alkaline medium : isomerization, degradation, oligomerization.
Thèse de doctorat, University of Delft, The Netherlands.
31, 34

- DELAHUNTY, C. M., EYRES, G. et DUFOUR, J. P. (2006).
Gas chromatography-olfactometry.
Journal of Separation Science, 29(14):2107–2125.
82
- DIONEX (2004).
Extraction of fat from dairy products (cheese, butter and liquid milks) using accelerated solvent extraction (ASE).
Dionex Application Notes, 345.
90
- DORMAN, F. L., SCHETTLER, P. D., VOGT, L. A. et COCHRAN, J. W. (2008).
Using computer modeling to predict and optimize separations for comprehensive two-dimensional gas chromatography.
Journal of Chromatography A, 1186:196–201.
77
- DUHEM, P. et VIDAL, J. (1978).
Extension of the dilutor method to measurement of high activity coefficients at infinite dilution.
Fluid Phase Equilibria, 2(3):231–235.
70
- ELMORE, J. S., ERBAHADIR, M. A. et MOTTRAM, D. S. (1997).
Comparison of dynamic headspace concentration on tenax with solid phase microextraction for the analysis of aroma volatiles.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45(7):2638–2641.
76
- ESKIN, N. A. M. et PRZYBYLSKI, R. (2001).
Antioxidant and shelf life of foods.
In ESKIN, N. A. M. et ROBINSON, D. S., éditeurs : *Food shelf life stability, chemical, biochemical and microbiological changes*. CRC Press LLC, Boca Raton, FL.
19
- ETIEVANT, P. X., CALLEMENT, G., ALTIERI, D., ISSANCHOU, S. et COQUIBUS, N. (1999).
Odor intensity evaluation in gas chromatography-olfactometry by finger span method.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(4):1673–1680.
82
- ETTRE, L. S., WELTER, C. et KOLB, B. (1993).
Determination of gas-liquid partition coefficients by automatic equilibrium headspace-gas chromatography utilizing the phase ratio variation method.
Chromatographia, 35(1-2):73–84.
70
- EYLES, C. T., ANBARCI, A., NASSAUER, J. S. et SIMBURGER, S. (1996).
Process for continuous production of processed cheese. WO 96/01567.
16
- EYRES, G., MARRIOTT, P. J. et DUFOUR, J. P. (2007).

- The combination of gas chromatography-olfactometry and multidimensional gas chromatography for the characterisation of essential oils.
Journal of Chromatography A, 1150(1-2):70–77.
79
- FARRELL, H. M., JIMENEZ-FLORES, R., BLECK, G. T., BROWN, E. M., BUTLER, J. E., CREAMER, L. K., ARTHUR, C. L., HOLLAR, C. M., NG-KWAI-HANG, K. F. et SWAIS-GOOD, H. E. (2004).
Nomenclature of the proteins of cows' milk - sixth revision.
Journal of Dairy Science, 87(6):1641–1674.
10
- FERRETTI, A. et FLANAGAN, V. P. (1971).
Volatile constituents of whey powder subjected to accelerated browning.
Journal of Dairy Science, 54(12):1764–1768.
34, 109, 118
- FIL-IDF (1982).
Fromages et fromages fondus. détermination de l'extrait sec total.
Norme de la fédération des industries laitières, 4 A 162:1–2.
93
- FINLEY, J. W. et GIVEN, P. (1986).
Technological necessity of antioxidants in the food industry.
Food and Chemical Toxicology, 24(10-11):999–1006.
33
- FORS, S. (1983).
Sensory properties of volatile maillard reaction products and related compounds : a literature review.
In WALLER, G. R. et FEATHER, M. S., éditeurs : *The Maillard Reaction in Foods and Nutrition*, volume 215 de *ACS Symposium Series*, pages 185–286. American Chemical Society, Washington, DC.
26
- FOX, P. J. et MCSWEENEY, P. L. H. (1998).
Dairy chemistry and biochemistry.
Blackie Academic and Professional, London , UK.
10, 17, 28, 31, 32, 118, 126
- FRIEDMAN, M. (1996).
Food browning and its prevention : An overview.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44(3):631–653.
186
- GALLIER, S., GRAGSON, D., CABRAL, C., JIMENEZ-FLORES, R. et EVERETT, D. W. (2010).
Composition and fatty acid distribution of bovine milk phospholipids from processed milk products.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(19):10503–10511.
126

- GEANKOPLIS, C. (2003).
Transport processes and separation process principles : (includes unit operations).
Pearson Education International, Upper Saddle River N.J., 4th ed. édition.
63
- GOLAY, M. J. E. (1981).
The height equivalent to a theoretical plate of retentionless rectangular tubes.
Journal of Chromatography A, 216:1–8.
77
- GOMEZ, E., LEDBETTER, C. A. et HARTSELL, P. L. (1993).
Volatile compounds in apricot, plum, and their interspecific hybrids.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41(10):1669–1676.
26
- GOODNER, K. L. (2008).
Practical retention index models of OV-101, DB-1, DB-5, and DB-Wax for flavor and fragrance compounds.
Lwt-Food Science and Technology, 41(6):951–958.
78
- GOSSETT, J. M. (1987).
Measurement of henry's law constants for c1 and c2 chlorinated hydrocarbons.
Environmental Science and Technology, 21(2):202–208.
70
- GOUJOT, D. et COURTOIS, F. (2009).
Vers une stratégie expérimentale optimale pour identifier un modèle de séchage d'aliment.
In XIIème Congrès de la Société Française de Génie des Procédés (SFGP).
143
- GOUJOT, D., M., Meyer, X. et COURTOIS, F. (2011).
Optimal design of experiments for the modelling of food processes.
In 11th International Congress On Engineering And Food ICEF.
143
- GUICHARD, E. (2002).
Interactions between flavor compounds and food ingredients and their influence on flavor perception.
Food Reviews International, 18(1):49–70.
72
- HIDALGO, F. J. et ZAMORA, R. (2000).
The role of lipids in non-enzymatic browning.
Grasas y Aceites, 51:35–49.
118
- HODGE, J. E. (1953).
Chemistry of browning reactions in model systems.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1:928–943.
24, 117, 186

HOFMANN, T. (1998a).

Studies on melanoidin-type colorants generated from the maillard reaction of protein-bound lysine and furan-2-carboxaldehyde, chemical characterisation of a red coloured domain.

European Food Research and Technology, 206(4):251–258.

28

HOFMANN, T. (1998b).

Studies on the relationship between molecular weight and the color potency of fractions obtained by thermal treatment of glucose/amino acid and glucose/protein solutions by using ultracentrifugation and color dilution techniques.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(10):3891–3895.

28, 94, 129, 186

HOFMANN, T., BORS, W. et STETTMAIER, K. (1999).

Studies on radical intermediates in the early stage of the nonenzymatic browning reaction of carbohydrates and amino acids.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(2):379–390.

27

HOHNO, H. et ADACHI, S. (1982).

Disaccharide formation in thermal degradation of lactose.

Journal of Dairy Science, 65(8):1421–1427.

186

HOLLNAGEL, A. et KROH, L. (2002).

3-Deoxypentosulose. an alpha-dicarbonyl compound predominating in nonenzymatic browning of oligosaccharides in aqueous solution.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(6):1659–1664.

186

HUANG, T. C., BRUECHERT, L. J. et HO, C. T. (1989).

Kinetics of pyrazine formation in amino acid-glucose systems.

Journal of Food Science, 54:1611–1614.

118

ISO (2001).

Détermination de la teneur en azote - partie 1 : méthode kjeldahl.

Norme ISO, 8968-1.

92

ISO (2004).

Détermination de la teneur en furosine, méthode par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse par paire d'ions.

Norme ISO, 18329.

92

JENSEN, R. G. (2002).

The composition of bovine milk lipids : January 1995 to december 2000.

Journal of Dairy Science, 85(2):295–350.

11, 126

- JOUENNE, E. et CROUZET, J. (2000).
Determination of apparent binding constants for aroma compounds with beta- lactoglobulin by dynamic coupled column liquid chromatography.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(11):5396–5400.
72
- JOUQUAND, C., DUCRUET, V. et GIAMPAOLI, P. (2004).
Partition coefficients of aroma compounds in polysaccharide solutions by the phase ratio variation method.
Food Chemistry, 85(3):467–474.
71
- JOUSSE, F., JONGEN, T., AGTEROF, W., RUSSELL, S. et BRAAT, P. (2002).
Simplified kinetic scheme of flavor formation by the maillard reaction.
Journal of Food Science, 67(7):2534–2542.
29, 143
- KAMAL-ELDIN, A., MÄKINEN, M. et LAMPI, A. M. (2003).
The challenging contribution of hydroperoxides to the lipid oxidation mechanism.
In KAMAL-ELDIN, A., éditeur : *Lipid oxydation pathways*, pages 6–41. AOCS Press, Champaign, Illinois.
22
- KANAVOURAS, A. et COUTELIERIS, F. A. (2006).
Shelf-life predictions for packaged olive oil based on simulations.
Food Chemistry, 96(1):48–55.
40
- KATAOKA, H., LORD, H. L. et PAWLISZYN, J. (2000).
Applications of solid-phase microextraction in food analysis.
Journal of Chromatography A, 880(1-2):35–62.
86
- KNOL, J. J., LINSSEN, J. P. H. et VAN BOEKEL, M. A. J. S. (2010).
Unravelling the kinetics of the formation of acrylamide in the maillard reaction of fructose and asparagine by multiresponse modelling.
Food Chemistry, 120(4):1047–1057.
42
- KNOL, J. J., VAN LOON, W. A. M., LINSSEN, J. P. H., RUCK, A. L., VAN BOEKEL, M. A. J. S. et VORAGEN, A. G. J. (2005).
Toward a kinetic model for acrylamide formation in a glucose-asparagine reaction system.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(15):6133–6139.
42
- KOLB, B. (1999).
Headspace sampling with capillary columns.
Journal of Chromatography A, 842(1-2):163–205.
69

- KONDJOYAN, A. et PORTANGUEN, S. (2008).
Prediction of surface and "under surface" temperatures on poultry muscles and poultry skins subjected to jets of superheated steam.
Food Research International, 41(1):16–30.
57, 64
- KONDJOYAN, N. et BERDAGUÉ, J. L. (1996).
A compilation of relative retention indices for the analysis of aromatic compounds.
édition du Laboratoire Flaveur, Saint Genès Champanelle, France.
78, 88
- KOVATS, E. (1958).
Gas-chromatographische charakterisierung organischer verbindungen. teil 1 : retention-sindices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone.
Helvetica Chimica Acta, 41(7):1915–1932.
78
- KRAFT, J. L. (1916).
Process of sterilising cheese and an improved product produced by such process. US patent n° 9102/16.
14
- KROH, L. W. (1994).
Caramelisation in food and beverages.
Food Chemistry, 51(4):373–379.
28, 34, 35, 119, 186
- LABUZA, T. P. et DUGAN, L. R. (1971).
Kinetics of lipid oxidation in foods.
Critical Reviews in Food Technology, 2(3):355–405.
22, 33
- LANDY, P., DRUAUX, C. et VOILLEY, A. (1995).
Retention of aroma compounds by proteins in aqueous-solution.
Food Chemistry, 54(4):387–392.
72
- LAZZARA, M. J. et DEEN, W. M. (2004).
Effects of concentration on the partitioning of macromolecule mixtures in agarose gels.
Journal of Colloid and Interface Science, 272(2):288–297.
70
- LIDE, D. R., éditeur (2003).
Handbook of chemistry and physics 84th edition.
CRC Press LLC, Boca Raton, FL.
69, 78
- LIMACHER, A., KERLER, J., DAVIDEK, T., SCHMALZRIED, F. et BLANK, I. (2008).
Formation of furan and methylfuran by maillard-type reactions in model systems and food.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(10):3639–3647.
42, 116

- MAILLARD, L. C. (1912).
Action des acides aminés sur les sucres. formation des mélanoidines par voie méthodique.
Comptes rendus de l'académie des sciences, 154:66–68.
31
- MAILLARD, L. C. (1913).
Genèse des matières protéiques et des matières humiques. Action de la glycérine et des sucres sur les acides alpha-aminés.
Masson et Cie, Paris, France.
23
- MALLIA, S., ESCHER, F. et SCHLICHTERLE-CERNY, H. (2008).
Aroma-active compounds of butter : a review.
European Food Research and Technology, 226(3):315–325.
12
- MARILLEY, L. et CASEY, M. G. (2004).
Flavours of cheese products : metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains.
International Journal of Food Microbiology, 90(2):139–159.
7, 8
- MARTINS, S. I. F. S., JONGEN, W. M. F. et VAN BOEKEL, M. A. J. S. (2001).
A review of maillard reaction in food and implications to kinetic modelling.
Trends in Food Science and Technology, 11(9-10):364–373.
25, 31
- MARTINS, S. I. F. S. et VAN BOEKEL, M. A. J. S. (2003).
Kinetic modelling of amadori N-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-glycine degradation pathways.
part II - kinetic analysis.
Carbohydrate Research, 338(16):1665–1678.
41, 186
- MARTINS, S. I. F. S. et VAN BOEKEL, M. A. J. S. (2005).
Kinetics of the glucose/glycine maillard reaction pathways : influences of pH and reactant initial concentrations.
Food Chemistry, 92(3):437–448.
35, 41
- McSWEENEY, P. L. H. (2004).
Biochemistry of cheese ripening.
International Journal of Dairy Technology, 57(2-3):127–144.
7
- MEYER, X. M., BRANDAM, C., DUFOUR, C., MAILLARD, M. N. et BONAZZI, C. (2009).
Approche méthodologique pour l'étude de systèmes relationnels activés lors de l'élaboration des aliments.
In Récents Progrès en Génie des Procédés, volume 98, pages 345 – 356. Editions Tec & Doc, Paris, France.
1, 2

- MICHALSKI, M. C., BRIARD, V. et MICHEL, F. (2001).
Optical parameters of milk fat globules for laser light scattering measurements.
Le Lait, 81(6):787–796.
49
- MIRANDA-LOPEZ, R., LIBBEY, L. M., WATSON, B. T. et MCDANIEL, M. R. (1992).
Odor analysis of pinot noir wines from grapes of different maturities by a gas chromatography-olfactometry technique (Osme).
Journal of Food Science, 57(4):985–993.
82
- MOLYNEUX, R. J. et SCHIEBERLE, P. (2007).
Compound identification : a journal of agricultural and food chemistry perspective.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(12):4625–4629.
68
- MORALES, F. J. et JIMENEZ-PEREZ, S. (1998).
Study of hydroxymethylfurfural formation from acid degradation of the amadori product in milk-resembling systems.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(10):3885–3890.
39, 94, 116, 186
- MORTENSEN, G., BERTELSEN, G., MORTENSEN, B. K. et STAPELFELDT, H. (2004).
Light-induced changes in packaged cheeses - a review.
International Dairy Journal, 14(2):85–102.
20
- MOTTRAM, R. (2006).
The LRI and odour database.
<http://www.odour.org.uk/information.html>.
88
- MYUNG, I. (2003).
Tutorial on maximum likelihood estimation.
Journal of Mathematical Psychology, 47(1):90–100.
100
- NAHON, D. F., HARRISON, M. et ROOZEN, J. P. (2000).
Modeling flavor release from aqueous sucrose solutions, using mass transfer and partition coefficients.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(4):1278–1284.
72
- NEMIROVSKI, A. S. et TODD, M. J. (2008).
Interior-point methods for optimization.
Acta Numerica, 17:191–234.
100
- NONGONIERMA, A. B., SPRINGETT, M., LE QUERE, J. L., CAYOT, P. et VOILLEY, A. (2006).
Flavour release at gas/matrix interfaces of stirred yoghurt models.
International Dairy Journal, 16(2):102–110.

71

PACI KORA, E. (2004).

Interactions physico-chimiques et sensorielles dans le yaourt brassé aromatisé : quels impacts respectifs sur la perception de la texture et de la flaveur.

Thèse de doctorat, Institut National Agronomique Paris Grignon, école doctorale Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement, Santé.

72

PANOUILLE, M., DURAND, D., NICOLAI, T., LARQUET, E. et BOISSET, N. (2005).

Aggregation and gelation of micellar casein particles.

Journal of Colloid and Interface Science, 287(1):85–93.

13

PATTON, S. (1955).

Browning and associated changes in milk and its products, a review.

Journal of Dairy Science, 38(5):457–478.

119, 186

PENG, D. Y. et ROBINSON, D. B. (1976).

A new two-constant equation of state.

Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals, 15(1):59–64.

69

PÉNICAUD, C., GUILBERT, S., PEYRON, S., GONTARD, N. et GUILLARD, V. (2010).

Oxygen transfer in foods using oxygen luminescence sensors : Influence of oxygen partial pressure and food nature and composition.

Food Chemistry, 123(4):1275–1281.

53

PETERS, S., VIVO-TRUYOLS, G., MARRIOTT, P. J. et SCHOENMAKERS, P. J. (2007a).

Development of a resolution metric for comprehensive two-dimensional chromatography.

Journal of Chromatography A, 1146(2):232–241.

80

PETERS, S., VIVO-TRUYOLS, G., MARRIOTT, P. J. et SCHOENMAKERS, P. J. (2007b).

Development of an algorithm for peak detection in comprehensive two-dimensional chromatography.

Journal of Chromatography A, 1156(1-2):14–24.

80

PHILLIPS, J. B. (1992).

Chromatographic technique and apparatus. WO1992/13622.

80

PILAR BUERA, M. D., CHIRIFE, J., RESNIK, S. L. et WETSLER, G. (1987).

Nonenzymatic browning in liquid model systems oh high water activity kinetics of color changes due to maillard reaction between different single sugars and glycine and comparison with caramelization browning.

Journal of Food Science, 52(4):1063–1067.

30

- PLUTOWSKA, B. et WARDENCKI, W. (2008).
Application of gas chromatography-olfactometry (GC-O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages - a review.
Food Chemistry, 107(1):449–463.
76
- POLLIEN, P., OTT, A., MONTIGON, F., BAUMGARTNER, M., MUNOZ-BOX, R. et CHAIN-TREAU, A. (1997).
Hyphenated headspace-gas chromatography-sniffing technique : screening of impact odorants and quantitative aromagram comparisons.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45(7):2630–2637.
82
- POOLE, C. F. et POOLE, S. K. (2008).
Separation characteristics of wall-coated open-tubular columns for gas chromatography.
Journal of Chromatography A, 1184(1-2):254–280.
77
- PRIPIS-NICOLAU, L., de REVEL, G., BERTRAND, A. et MAUJEAN, A. (2000).
Formation of flavor components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48:3761–3766.
186
- QUINTAS, M., GUIMARAES, C., BAYLINA, J., BRANDAO, T. R. S. et SILVA, C. L. M. (2007).
Multiresponse modelling of the caramelisation reaction.
Innovative Food Science and Emerging Technologies, 8(2):306–315.
41
- RAKOWSKA, J., HAFTKA, R. T. et WATSON, L. T. (1991).
An active set algorithm for tracing parametrized optima.
Structural Optimization, 3(1):29–44.
100
- REDLICH, O. et KWONG, J. N. S. (1949).
On the thermodynamics of solutions. v. an equation of state. fugacities of gaseous solutions.
Chemical Reviews, 44(1):233–244.
69
- RENON, H. et PRAUSNITZ, J. M. (1968).
Local compositions in thermodynamic excess functions for liquid mixtures.
AIChE Journal, 14(1):135–144.
70
- RICHARDSON, P., éditeur (2001).
Thermal technologies in food processing.
CRC Press LLC, Boca Raton, FL.
17
- ROCKLIN, R. D. et POHL, C. A. (1983).

- Determination of carbohydrates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection.
Journal of Liquid Chromatography, 6(9):1577–1590.
91
- SCHÄR, W. et BOSSET, J. O. (2002).
Chemical and physico-chemical changes in processed cheese and ready-made fondue during storage. a review.
LWT - Food Science and Technology, 35(1):15–20.
18
- SCHIEBERLE, P. (2005).
The carbon module labeling (CAMOLA) technique - a useful tool for identifying transient intermediates in the formation of maillard-type target molecules.
Annals of the New York Academy of Sciences, 1043:236–248.
29
- SCHNEIDER, M. et GOSS, K. U. (2009).
Systematic investigation of the sorption properties of tenax TA, chromosorb 106, porapak n, and carbopak f.
Analytical Chemistry, 81(8):3017–3021.
75
- SHAMPINE, L. F. et REICHEL, M. W. (1997).
The MATLAB ODE suite.
SIAM Journal on Scientific Computing, 18(1):1–22.
99
- SHAMPINE, L. F., REICHEL, M. W. et KIERZENKA, J. A. (1999).
Solving index-1 DAEs in MATLAB and simulink.
SIAM Review, 41(3):538–552.
99
- SHELLIE, R. A., XIE, L. L. et MARRIOTT, P. J. (2002).
Retention time reproducibility in comprehensive two-dimensional gas chromatography using cryogenic modulation - an intralaboratory study.
Journal of Chromatography A, 968(1-2):161–170.
89
- SIGMA-ALDRICH SUPELCO (1999).
Data sheet on solid phase microextraction fiber assemblies.
Sigma-Aldrich Supelco.
73, 74
- SIGMA-ALDRICH SUPELCO (2001).
Solid phase microextraction application guide 5th edition.
Sigma-Aldrich Supelco.
73, 74
- SITHOLE, R., MCDANIEL, M. R. et GODDIK, L. M. (2005).
Rate of maillard browning in sweet whey powder.
Journal of Dairy Science, 88(5):1636–1645.

10

STEIN, S. E., BABUSHOK, V. I., BROWN, R. L. et LINSTROM, P. J. (2007).

Estimation of Kovats retention indices using group contributions.

Journal of Chemical Information and Modeling, 47(3):975–980.

78

STEWART, W. E. et CARACOTSIS, M. (2010).

Athena visual studio.

www.athenavisual.com.

40

STEWART, W. E., CARACOTSIS, M. et SØRENSEN, J. P. (1992).

Parameter estimation from multiresponse data.

AIChE Journal, 38(5):641–650.

40

STEWART, W. E., SHON, Y. et BOX, G. E. P. (1998).

Discrimination and goodness of fit of multiresponse mechanistic models.

AIChE Journal, 44(6):1404–1412.

40

TAVEL, L., ANDRIOT, I., MOREAU, C. et GUICHARD, E. (2008).

Interactions between beta-lactoglobulin and aroma compounds : different binding behaviors as a function of ligand structure.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(21):10208–10217.

72

THE MATHWORKS (2010).

Matlab simbiology toolbox.

www.mathworks.com/products/simbiology.

40

THOMAS, M. E. C., SHÄR, J., DESOBRY-BANON, S. et DESOBRY, S. (2004).

Milk powders ageing effect on physical and functional properties.

Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 44:297–322.

11

TOURNAYRE, P. (2005).

AcquiSniff software : registered trademark no. 023166185.

http://www4.inra.fr/cepia_eng/Food-quality/Softwares/AcquiSniff.

83

TOURNAYRE, P., CAMBOU, S., CORNU, A., KONDOYAN, N. et BERDAGUÉ, J. L. (2006).

Recent advances in food quality assessment. a novel eight-way GC-Olfactometer (8W-GC-O).

In IUFoST - XIIIth World Congress of Food Science & Technology - September 17-21, 2006 - Nantes.

83

TRANCHANT, J., éditeur (1982).

Manuel Pratique de Chromatographie en phase gazeuse.

Masson, Paris, France.
77

TRESSL, R., WONDRAK, G. T., GARBE, L. A., KRUGER, R. P. et REWICKI, D. (1998).
Pentoses and hexoses as sources of new melanoidin-like maillard polymers.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(5):1765–1776.
28, 186

ULLRICH, F. et GROSCH, W. (1987).
Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation
of linoleic acid.
Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung, 184(4):277–282.
82

VAN BOEKEL, M. A. J. S. (1998).
Effect of heating on maillard reactions in milk.
Food Chemistry, 62(4):403–414.
28

VAN BOEKEL, M. A. J. S. (1999).
Heat-induced deamidation, dephosphorylation and breakdown of caseinate.
International Dairy Journal, 9(3-6):237–241.
36

VAN BOEKEL, M. A. J. S. (2001).
Kinetic aspects of the maillard reaction : a critical review.
Nahrung-Food, 45(3):150–159.
39, 40

VAN BOEKEL, M. A. J. S. (2002).
On the use of the weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative
cells.
International Journal of Food Microbiology, 74(1-2):139–159.
15

VAN BOEKEL, M. A. J. S. (2009).
Kinetic modeling of reactions in foods.
Taylor & Francis, Boca Raton, FL.
37, 39, 42, 136

VAN DEEMTER, J. J., ZUIDERWEG, F. J. et KLINKENBERG, A. (1956).
Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of non-ideality in chro-
matography.
Chemical Engineering Science, 5(6):271–289.
77

VAN DEN DOOL, H. et KRATZ, P. (1963).
A generalization of the retention index system including linear temperature programmed
gas-liquid partition chromatography.
Journal of Chromatography A, 11:463–471.
78

VAN DER WAALS, J. D. (1910).

The equation of state for gases and liquids, nobel lecture.

In Nobel Lectures, physics 1901-1921,.

69

VAN RUTH, S. (2001).

Evaluation of three gas chromatography-olfactometry methods : comparison of odour intensity-concentration relationships of eight volatile compounds with sensory headspace data.

Food Chemistry, 74(3):341–347.

83

VAN RUTH, S. M., KING, C. et GIANNOULI, P. (2002).

Influence of lipid fraction, emulsifier fraction, and mean particle diameter of oil-in-water emulsions on the release of 20 aroma compounds.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(8):2365–2371.

71

VANASSETT, E. et ZWIETERING, M. (2006).

A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens.

International Journal of Food Microbiology, 107(1):73–82.

15

WEBER, J. C. (2000).

Atmospheric package for pasty products. WO 00/17064.

16

WEBER, J. C. et DIDIOT, L. (2009).

Method for packaging a pasty product in a easily opened, sealed packaging made of plastic material. WO 2009/092966 a1.

16

WEENEN, H. (1998).

Reactive intermediates and carbohydrate fragmentation in maillard chemistry.

Food Chemistry, 62(4):393–401.

186

WHITFIELD, F. B. (1992).

Volatiles from interactions of maillard reactions and lipids.

Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 31:1 –58.

118, 186

WILSON, G. M. (1964).

Vapor-Liquid equilibrium. XI. a new expression for the excess free energy of mixing.

Journal of the American Chemical Society, 86(2):127–130.

70

YAYLAYAN, V., KEYHANI, A. et WNOROWSKI, A. (2000).

Formation of sugar-specific reactive intermediates from c-13-labeled l-serines.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(3):636–641.

186

YAYLAYAN, V. A. (1997).

Classification of the maillard reaction : a conceptual approach.

Trends in Food Science and Technology, 8(1):13–18.

29

YAYLAYAN, V. A. (2003).

Recent advances in the chemistry of strecker degradation and amadori rearrangement : implications to aroma and color formation.

Food Science and Technology Research, 9(1):1–6.

26, 27

YAYLAYAN, V. A. et KEYHANI, A. (1999).

Origin of 2,3-pentanedione and 2,3-butanedione in D-glucose/L-alanine maillard model systems.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(8):3280–3284.

30, 119, 186

Annexes

**Annexe 1 : Liste des composés volatils identifiés
dans les fromages fondus fabriqués en pilote
industriel**

Composés volatils des fromages fondus fabriqués en pilote industriel

CAS	Molécule	D1 [s]	D2 [s]	Fragment	IK calculé	IK littérature
75-07-0	Acetaldehyde	190	2,2	60	<500	400(DB1)
107-01-7	2-Butene	200	2,1	67	<500	4115(DB1)
74-93-1	Methanethiol	210	2,2	100	<500	430(DB1)
74-83-9	Methane, bromo-	220	2,2	96	<500	414(DB1)
74-97-5	Methane, bromochloro-	220	2,2	88	<500	598(DB1)
75-00-3	Ethyl Chloride	220	2,2	91	<500	426(DB1)
64-17-5	Ethyl alcohol	230	2,8	163	<500	440(DB1)
67-64-1	Acetone	250	2,5	79	<500	470(DB1)
75-05-8	Acetonitrile	250	2,8	105	<500	
563-45-1	1-Butene, 3-methyl-	260	2,2	72	<500	462(DB1)
110-00-9	Furan	260	2,4	91	<500	492(DB1)
75-18-3	dimethylsulfide	290	2,6	62	515	516
75-09-2	Methylene Chloride	300	2,7	90		531
	1,4-Pentadiene	310	2,4	70		
75-15-0	Carbon disulfide	320	2,7	76	515	533
78-84-2	Propanal, 2-methyl-	340	2,7	48	524	551
107-83-5	Pentane, 2-methyl-	350	2,2	57		559
78-85-3	2-Propenal, 2-methyl	360	2,8	70	549	
420-12-2	Thiirane	370	3	74		589
107-12-0	Propanenitrile	370	3,3	74		574
96-14-0	Pentane, 3-methyl-	380	2,3	54		579
431-03-8	2,3-Butanedione	380	3,1	86	571	584
123-72-8	Butanal	390	2,9	57		595
71-23-8	1-Propanol	400	2,7	95	600,11	
78-93-3	2-Butanone	400	3	88	600,23	603
78-92-2	2-Butanol	410	2,8	57	604	617
534-22-5	Furan, 2-methyl-	420	2,8	81	607,84	622
592-41-6	3-Hexene	440	2,4	112	615,38	614
1073-43-1	Thiirane, methyl-	440	2,9	73	615,57	619
141-78-6	Ethyl Acetate	440	3	45	615,61	614
1489-53-8	1,2,3-Trifluorobenzene	450	2,6	86	619,31	
67-66-3	Trichloromethane	450	2,9	94	619,42	621
78-82-0	Isobutyronitrile	460	3,3	111	623,42	626
64-19-7	acide acétique	470	2,6	60		
109-99-9	Furan, tetrahydro-	480	3	71	631	623
	Betazole	510	2,6	72	642,38	
592-57-4	1,3-Cyclohexadiene	520	2,7	98	646,27	649
4786-20-3	2-Butenenitrile	520	3,5	82	646,57	661
107-06-2	Ethane, 1,2-dichloro-	530	3,2	155	650,3	630(DB1)
4170-30-3	2-Butenal	530	3,3	54	650,34	657
592-45-0	1,4-Hexadiene	540	2,6	79	653,92	
590-86-3	Butanal, 3-methyl-	540	3	57	654,07	652
96-17-3	Butanal, 2-methyl-	560	3	71	661,77	665
56-23-5	Carbon Tetrachloride	570	2,9	83	665,57	661
71-43-2	Benzene	570	3,1	105	665,65	664
96-47-9	Furan, tetrahydro-2-methyl-	580	3	96	669,46	678
110-02-1	Thiophene	580	3,3	97	669,57	674
109-74-0	Butanenitrile	580	3,6	43	669,69	686
616-25-1	1-Penten-3-ol	610	3	59	681	685

Annexes

CAS	Molécule	D1 [s]	D2 [s]	Fragment	IK calculé	IK littérature
	Eucalyptol	620	2	68	684,46	
107-87-9	2-Pentanone	620	3,1	70	684,88	680
600-14-6	2,3-Pentanedione	640	3,2	72	692,61	700
110-62-3	Pentanal	650	3,2	58	696	697
79-01-6	trichloroethylene	660	3	83	700,2	702,1
24653-75-6	mercaptoacetone	660	3,4	90	700	
3208-16-0	furan, 2-ethyl-	670	2,9	82	703,62	707
75-27-4	Methane, bromodichloro-	680	3,5	173	707,27	
513-86-0	2-Butanone, 3-hydroxy	680	3,7	88	707	713
108-87	Cyclohexane, methyl-	740	2,6	55	727,64	719,7
1487-18-9	Vinylfuran	740	3,1		727,82	725
625-28-5	Butanenitrile, 3-methyl-	740	3,5	60	727,95	731
109-65-9	Butane, 1-bromo-	750	3	41	731,23	
763-32-6	3-Buten-1-ol, 3-methyl-	750	3,2	56	731,3	725
290-37-9	Pyrazine	750	4	119	731,57	731
123-51-3	1-Butanol, 3-methyl-	760	3	70	734,68	729
288-47-1	Thiazole	760	4	59	735,02	742
625-33-2	3-Penten-2-one, (E)-	770	3,5	83	738,3	721
108-03-2	Propane, 1-nitro-	770	3,7	54	738,37	
497-03-0	2-Butenal, 2-methyl	780	3,4	55	745	
96-54-8	1H-Pyrrole, 1-methyl-	780	3,6	55	741,78	750
624-92-0	Disulfide, dimethyl	800	3,5	82	748,64	744
109-97-7	1H-Pyrrole	820	3,9	67	756	751
144-62-7	Oxalic acid	830	2	111	758,46	
105-46-4	Acetic acid, 1-methylpropyl ester	840	2,9	73	762,22	
71-41-0	1-Pentanol	850	3,1	57	765,74	763
108-88-3	Toluene	860	3,3	130	769,25	771
16681-77-9	1H-Tetrazole, 1-methyl-	870	4,4	57	773,08	
497-23-4	2(5H)-Furanone	870	5,5	98	908,84	
107-92-6	acide butanoïque	880	3,1	60	776	775
109-49-9	5-Hexen-2-one	880	3,3	43	776,15	
	Thiophene, 2 methyl	880	3,45	191		
110-58-8	Pentanenitrile	880	3,7	60	776,29	778
616-44-4	Thiophene, 3-methyl-	900	3,4	91	783,08	783
120-92-3	cyclopentanone	920	4	98	790,18	791
4229-91-8	Furan, 2-propyl-	930	3	71	793,28	798
591-78-6	2-Hexanone	930	3,1	55	793,32	793
66-25-1	Hexanal	950	3,2	73	800,24	800
105-54-4	Butanoic acid, ethyl ester	960	3	42	803,5	802
617-90-3	2-Furancarbonitrile	960	3,9	93	804	
14919-01-8	3-Octene	980	2,6	69	810,04	814
209-73-22	2-Octene, (Z)-	980	2,6	86	810,04	808
2346-81-8	3-Chlorohexane	980	2,8	97	810,1	
123-86-4	Acetic acid, butyl ester	990	3	70	813,5	912
617-92-5	1H-Pyrrole, 1-ethyl- (CAS)	990	3,6	95	818	
498-60-2	3-Furaldehyde	990	4,1	95	835	
127-18-4	Tetrachloroethylene	1000	3,1	71	816,87	817
109-08-0	Pyrazine, methyl-	1020	3,9	80	823,8	825
1002-33-1	1,3-Octadiene	1030	2,7	67	826,74	827

Composés volatils des fromages fondus fabriqués en pilote industriel

CAS	Molécule	D1 [s]	D2 [s]	Fragment	IK calculé	IK littérature
815-57-6	2,4-Pentanedione, 3-methyl-	1030	3,1	59	826,87	
98-01-1	2-Furancarboxaldehyde	1040	4,3	96	835	
109-97-7	Pyrrole	1050	3,1	104	833,54	750
3188-00-9	3(2H)-Furanone, dihydro-2-methyl-	1050	3,6	68	833,7	830
930-30-3	2-Cyclopenten-1-one	1050	4,4	96	833,97	834
629-05-4	Butane, 1-nitro-	1070	3,7	78	840,4	840
1120-72-5	Cyclopentanone, 2-methyl-	1080	3,7	57	843,74	843
116-53-0	acide butanoïque 2 méthyl	1090	3,1	74	842	
20662-84-4	Oxazole, trimethyl-	1090	3,4	91	846,97	846
503-74-2	Butanoic acid, 3-methyl-	1100	3,0	60	831	
108-31-6	2,5-Furandione	1100	4,9	54	857	
505-57-7	2-Hexenal	1110	3,5	55	855	855
108-90-7	Benzene, chloro-	1110	3,5	92	853,67	850
98-00-0	2-Furanmethanol	1110	3,9	58	853,8	851
	2-(2-Propenyl)-furan	1120	3,3	108	859	
75135-41-0	Furan, 2-(2-propenyl)-	1120	3,3	91	856,93	
111-55-7	1,2-Ethanediol, diacetate	1140	4	86	863,83	864
100-41-4	Ethylbenzene	1150	3,3	64	866,93	
591-12-8	2(3H)-Furanone, 5-methyl-	1150	4,2	56	867,23	835(DB1)
872-55-9	Thiophene, 2-ethyl-	1160	3,4	114	870,3	871
67-68-5	1-Nonen-3-ol	1170	3	86	873,5	
	o-Xylene	1170	3,2	54	873,57	
	p-Xylene	1170	3,2	80	873,57	
289-80-5	Pyridazine	1170	4,2	78	873,9	
	Dimethyl Sulfoxide	1170	4,5	126	874	820
16839-97-7	Thiophene, 2-methoxy-	1180	3,7	97	877,07	
109-96-6	1H-pyrrole 2,5dihydro	1180	4,6	68		
108-95-2	Phenol	1190	4,1	72	880,53	
110-43-0	2-heptanone	1210	3,2	71	890	890
75-25-2	Methane, tribromo-	1210	4,2	47	887,23	892
930-60-9	2-Cyclopentene-1,4-dione	1210	4,4	110	887,3	
4466-24-4	2-butylfuran	1220	2,9	81	897	894
100-42-2	Styrene	1230	3,5	166	893,67	895,2
108-94-1	Cyclohexanone	1230	4	69	893,83	894
539-82-2	Pentanoic acid, ethyl ester	1240	3	66	896,83	902
111-71-7	heptanal	1240	3,1	70	896	900
3637-61-4	Cyclopentanemethanol	1240	3,3	55	896,93	
13493-97-5	furfuryl formate	1250	3,6	81	905	
3268-49-3	Propanal, 3-(methylthio)- =methional	1260	4,2	41	904,5	903
4488-48-6	2,4-Hexadienal,	1270	3,5	81	914	908
108-50-9	2,6-dimethylpyrazine	1270	3,55	42	914	914
13925-00-3	éthylpyrazine	1270	3,6	107	914	913
3859-41-4	1,3-Cyclopentanedione	1270	4,5	54	908,46	
96-48-0	2(3H)-Furanone, dihydro-	1270	4,9	56	915	915
628-63-7	Acetic acid, pentyl ester	1280	3	194	911,73	912
123-32-0	Pyrazine, 2,5-dimethyl-	1280	3,7	106	911,99	908
1192-62-7	Ethanone, 1-(2-furanyl)-	1280	4	43	912,11	911
106-51-4	p-Benzoquinone	1300	4,5	58	919,99	
930-68-7	2-Cyclohexen-1-one	1330	3,9	67	942	

Annexes

CAS	Molécule	D1 [s]	D2 [s]	Fragment	IK calculé	IK littérature
4177-16-6	Pyrazine, ethenyl-	1330	4	94	931,33	926
1119-44-4	3-Hepten-2-one	1340	3,4	84	934,94	
108-86-1	Benzene, bromo-	1350	3,8	112	938,94	934
591-11-7	2(5H)-Furanone, 5-methyl-	1350	4,8	86	939,33	
67-71-0	dimethylsulfone	1360	4,3	79		
109-52-4	Pentanoic acid	1380	2,7	88	950,05	911
142-62-1	acide hexanoïque	1390	2,9	60	973	970
108-29-2	2(3H)-Furanone, dihydro-5-methyl-	1390	4,7	84	954,67	950
	Camphene	1400	3	76	957,86	
18829-55-5	2-Heptenal	1400	3,3	100	957,97	963
620-02-0	2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-	1420	4,1	81	965,97	962
100-52-7	Benzaldehyde	1420	4,2	78	966,01	960
3420-59-5	Ethanone, 1-(3-hydroxy-2-furanyl)	1430	3,3	111	987	981
22122-36-7	3-Methyl-2(5H)-furanone	1430	4,0	69	987	
585-25-1	2,3-Octanedione	1440	2,7	71	991	
1004-29-1	Furan, 2-butyltetrahydro-	1440	3,1	81	973,27	981
111-13-7	2-Octanone	1450	2,8	58	984	982
95-63-6	Benzene, 1,2,4-trimethyl-	1450	3,2	158	977,16	988
623-17-6	2-Furanmethanol, acetate	1450	3,2	81	996	
504-31-4	2H-Pyran-2-one	1450	5	81	977,85	978
3658-80-8	Dimethyl trisulfide	1460	4,1	94	981,35	984
124-13-0	octanal	1470	2,8	57	1006	1004
	furfurylmethylsulfide	1480	3,2	128	1012	
98-83-9	à-Methylstyrene	1480	3,5	106	988,8	
3777-69-3	Furan, 2-pentyl-	1500	3	81	996,3	991
123-66-0	Hexanoic acid, ethyl ester	1510	3	68	1000,14	1002
22047-25-2	acetylpyrazine	1510	3,3	122	1030	1031
271-89-6	Benzofuran	1530	3,9	82	1008,18	1005
98-03-3	2-Thiophenecarboxaldehyde	1530	4,6	100	1008,45	1026
3194-15-8	1-Propanone, 1-(2-furanyl)-	1540	4	93	1012,07	1008
3393-45-1	5,6-Dihydro-2H-pyran-2-one	1540	4,1	69	1048	
7399-49-7	o-Isopropenyltoluene	1560	3,3	46	1019,49	
	Ethanol, 2-nitro-	1570	1,8	95	1022,76	
	acide heptanoïque	1570	2,7	60	1060	1070
1072-83-9	Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)	1580	3,4	109	1071	
104-76-7	1-Hexanol, 2-ethyl-	1590	3	123	1030,92	1033
	nonanal	1640	2,6	57	1105	1101
823-22-3	2H-Pyran-2-one, tetrahydro-6-methyl	1640	3,7	70	1108	1084
122-78-1	Benzeneacetaldehyde	1640	4,2	118	1050,61	1049
118-71-8	4H-Pyran-4-one, 3-hydroxy-2-methyl-	1670	3,3	126	1129	1112
5069-23-8	Thiophene, 2,5-diethyl-	1680	2,5	97	1065,34	
	acetophenone	1700	4,2	118		
3208-32-0	Tetrahydrofuran, 2-hexyl-	1710	3,1	85	1077,11	
1197-40-6	Furan, 2,2'-methylenebis-	1730	3,8	71	1085,07	1086
15009-91-3	Pyridine, 2-nitro-	1740	2	67	1088,23	
124-07-2	acide octanoïque	1740	2,6	60		
13678-51-8	Furan, 2-(2-furanylmethyl)-5-methyl-	1750	2,9	162	1186	1195

**Annexe 2 : Liste des composés volatils originaires
des réactions de Maillard, de caramélisation ou de
l'oxydation des lipides identifiés dans la matrice
fromagère modèle**

Composés volatils de la matrice fromagère modèle

CAS	Molécule	D1 [s]	D2 [s]	Fragment	IK calculé	IK littérature
74-93-1	Methanethiol	220	2,4	47	nd	415 (DB1)
110-00-9	Furan	270	2,5	68	nd	492 (DB1)
75-18-3	dimethylsulfide = methane thiobis	290	2,6	62	515	
75-15-0	Carbon disulfide	320	2,7	76	515	533
78-84-2	propanal,2-methyl	330	2,8	0	524	551
78-85-3	2-Propenal, 2-methyl- =methacroleine	360	2,8	70	549	
431-03-8	2,3-Butanedione	380	3,1	86	571	584
534-22-5	Furan, 2-methyl-	430	2,8	82	607	622
109-99-9	Furan, tetrahydro-	480	3,0	71	625	623
4170-30-3	2-Butenal	530	3,4	70	646	
590-86-3	Butanal, 3-methyl-	540	3,0	71	650	652
96-17-3	Butanal, 2-methyl-	560	3,0	57	659	665
110-02-1	Thiophene	590	3,3	58	671	674
107-87-9	2-Pentanone	620	3,2	86	684	680
600-14-6	2,3-Pentanedione	640	3,2	100	692	700
110-62-3	Pentanal	650	3,2	58	696	697
64-19-7	acide acétique	470	2,6	60		
24653-75-6	mercaptoacetone	660	3,4	90	700	
3208-16-0	Furan, 2-ethyl-	670	3,0	81	704	707
513-86-0	2-Butanone, 3-hydroxy-	680	3,7	88	707	713
290-37-9	Pyrazine	760	3,9	80	735	731
288-47-1	Thiazole	760	4,1	85	735	742
3102-33-8	3-Penten-2-one, (E)-	770	3,5	69	738	
624-92-0	disulfide dimethyl	780	3,6	94	742	
497-03-0	2-Butenal, 2-methyl-, (E)-	780	3,4	55	745	
109-97-7	1H-Pyrrole	820	3,9	67	756	751
616-44-4	Thiophene, 3-methyl-	880	3,4	97	776	783
107-92-6	acide butanoïque	880	3,1	60	776	775
497-23-4	2(5H)-furanone	870	4,4	84		
1115-11-3	3-méthyl,2butenal	910	3,5	84	787	783
591-78-6	2-hexanone	920	3,2	100	791	793
120-92-3	Cyclopentanone	920	4,0	55	790	791
4229-91-8	Furan, 2-propyl-	930	3,0	81	793	793
66-25-1	Hexanal	950	3,2	56	800	800
617-90-3	2-Furancarbonitrile	960	3,9	93	804	
3188-00-9	3(2H)-Furanone, dihydro-2-methyl-	970	4	100		804
617-92-5	1H-Pyrrole, 1-ethyl-	990	3,6	95	818	
109-08-0	2-methyl pyrazine	1030	4,0	94	828	825
503-74-2	Butanoic acid, 3-methyl-	1100	3,0	60	831	
930-30-3	2-Cyclopenten-1-one	1050	4,7	82	835	834
98-01-1	2-Furancarboxaldehyde	1040	4,3	96	835	
498-60-2	3-Furaldehyde	990	4,1	95	835	
116-53-0	acide butanoïque 2 méthyl	1090	3,1	74	842	
1120-72-5	Cyclopentanone, 2-methyl-	1080	3,8	98	845	843
505-57-7	2-Hexenal	1110	3,5	55	855	855
108-31-6	2,5-Furandione = maléicanhydride	1100	4,9	54	857	
0-00-0	2-(2-Propenyl)-furan	1120	3,3	108	859	
98-00-0	2-Furanmethanol	1110	4,1	98	859	
111-55-7	1,2ethandioldiacetate	1140	4,0	86		864
591-12-8	2(3H)furanone,5methyl	1170	4,2	55		
109-96-6	1Hpyrrole 2,5dihydro	1180	4,6	68		
	pentanoic acid	1170	3,1	60		
930-60-9	4-Cyclopentene-1,3-dione	1180	4,8	51	880	
110-43-0	2-heptanone	1210	3,2	71	890	885
4466-24-4	2-butylfuran	1220	2,9	81	897	894
100-42-5	Styrene	1230	3,5	104	897	895
108-94-1	Cyclohexanone	1230	3,9	56	897	894
111-71-7	heptanal	1240	3,1	70	900	900

Annexes

CAS	Molécule	D1 [s]	D2 [s]	Fragment	IK calculé	IK littérature
13493-97-5	furfuryl formate	1250	3,6	81	905	
3268-49-3	3méthylthiopropenal =methional	1250	4,0	4,06	903	
4488-48-6	2,4-Hexadienal	1270	3,5	81	914	908
13925-00-3	éthylpyrazine	1270	3,6	107	914	913
108-50-9	2,6-dimethylpyrazine	1270	3,55	42	914	914
1192-62-7	ethanone1,2furanyl =furylmethylcetone	1270	3,8	95	914	
96-48-0	2(3H)-Furanone, dihydro	1270	4,9	56	915	915
4177-16-6	ethenylpyrazine	1320	3,6	106		
930-68-7	2-Cyclohexen-1-one	1330	3,9	67	942	
591-12-8	2(5H)furanone 5methyl	1340	4,2	83	946	
67-71-0	dimethylsulfone	1360	4,3	79		
108-29-2	2(3H)-Furanone, dihydro-5-methyl	1370	4,0	85	960	
18829-55-5	2-Heptenal	1380	3,0	83	964	953
142-62-1	acide hexanoïque	1390	2,9	60	973	970
620-02-0	2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-	1400	3,5	53/110	973	962
100-52-7	benzaldehyde	1400	3,5	106	973	960
504-31-4	2H-Pyran-2-one	1420	4,1	68	983	978
3420-59-5	Ethanone, 1-(3-hydroxy-2-furanyl) = isomaltol	1430	3,3	111	987	981
22122-36-7	3-Methyl-2(5H)-furanone	1430	4,0	69	987	
585-25-1	2,3-Octanedione	1440	2,7	71	991	
3658-80-8	Trisulfide, dimethyl	1440	3,3	126	991	984
111-13-7	2-Octanone	1450	2,8	58	996	
623-17-6	2-Furanmethanol, acetate	1450	3,2	81	996	
3777-69-3	Furan, 2-pentyl-	1460	2,7	81	1000	991
124-13-0	octanal	1470	2,8	57	1006	1004
1438-91-1	2-methylthiomethylfuran	1470	3,3	81		
	3methylcyclopentanone	1470	3,5	112	1007	
0-00-0	2-Furfurylmethylsulfide	1480	3,2	128	1012	
98-03-3	2-Thiophenecarboxaldehyde	1480	3,7	112	1013	1026
22047-25-2	acetylpyrazine	1510	3,3	122	1030	1031
3393-45-1	5,6-Dihydro-2H-pyran-2-one	1540	4,1	69	1048	
122-78-1	Benzeneacetaldehyde	1550	3,3	91	1054	1049
	acide heptanoïque	1570	2,7	60	1060	1070
1072-83-9	Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-	1580	3,4	109	1071	
821-55-6	2-Nonanone	1620	2,6	58	1094	1096
	nonanal	1640	2,6	57	1105	1101
823-22-3	2H-Pyran-2-one, tetrahydro-6-methyl-	1640	3,7	70	1108	1084
118-71-8	4H-Pyran-4-one, 3-hydroxy-2-methyl= maltol	1670	3,3	126	1129	1112
124-07-2	acide octanoïque	1740	2,6	60		
13678-51-8	Furan, 2-(2-furanylmethyl)-5-methyl-	1750	2,9	162	1186	1195
1438-94-4	1H-Pyrrole, 1-(2-furanylmethyl)-	1760	3,2	121	1193	1182
112-31-2	décanal	1780	2,6	57	1210	
0-00-0	furfurylmethyldisulfide	1810	3,1	81	1234	1230
112-05-0	Nonanoic acid	1870	2,5	60	1283	
112-44-7	undecanal	1900	2,5	57		
	dodecanal	2010	2,4	57		
147-47-7	Quinoline, 1,2-dihydro-2,2,4-trimethyl-	2070	2,7	158	1489	
1198-37-4	Quinoline, 2,4-dimethyl-	2080	2,9	157	1501	973

Annexe 3 : Ecriture du schéma réactionnel observable

Tab. III.8 – Ensemble des réactions élémentaires proposées pour l'élaboration du schéma réactionnel

N°	Abbrev.	Nom	Réactions	Références
1	hydro_1	hydrolyse du lactose	$\text{lactose} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{glucose} + \text{galactose}$	(Hohno et Adachi, 1982)
2	iso_1	isomérisation du lactose	$\text{lactose} \rightarrow 1\text{-déoxysone (1-DG)} + \text{galactose}$	(Hohno et Adachi, 1982)
3	hydro_2	formation du déoxyribose	$\text{lactose} \rightarrow \text{C5-déoxyribose} + \text{acide formique} + \text{galactose} + \text{H}_2\text{O}$	(Berg et van Boekel, 1994; Patton, 1955)
4	hydro_3	formation de ribose	$\text{lactose} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ribose} + \text{galactose} + \text{acétaldéhyde}$	(Berg et van Boekel, 1994)
5	lys_1	formation de amadori_1	$\text{lysine} + \text{lactose} \rightarrow \text{amadori 1} + \text{H}_2\text{O}$	(Friedman, 1996; Hodge, 1953; Morales et Jimenez-Perez, 1998)
6	lys_2	formation de amadori_2	$\text{lysine} + \text{galactose} \rightarrow \text{amadori 2} + \text{H}_2\text{O}$	(Berg et van Boekel, 1994)
7	lys_3	formation de amadori_3	$\text{lysine} + \text{ribose} \rightarrow \text{amadori 3} + \text{H}_2\text{O}$	(Berg et van Boekel, 1994)
8	amad_1.1	dégradation_amadori_1.1	$\text{amadori 1} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 1\text{-DG} + \text{lysine} + \text{galactose}$	(Berg et van Boekel, 1994)
9	amad_1.2	dégradation_amadori_1.2	$\text{amadori 1} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{-DG} + \text{lysine} + \text{galactose}$	(Berg et van Boekel, 1994)
10	amad_2.1	dégradation_amadori_2.1	$\text{amadori 2} \rightarrow 1\text{-DG} + \text{lysine}$	(Belitz <i>et al.</i> , 2009, chapitre 4)
11	amad_2.2	dégradation_amadori_2.2	$\text{amadori 2} \rightarrow 3\text{-DG} + \text{lysine}$	(Belitz <i>et al.</i> , 2009, chapitre 4)
12	amad_3.1	dégradation_amadori_3.1	$\text{amadori 3} \rightarrow 1\text{-DP} + \text{lysine}$	(Berg et van Boekel, 1994)
13	amad_3.2	dégradation_amadori_3.2	$\text{amadori 3} \rightarrow 3\text{-DP} + \text{lysine}$	(Tressl <i>et al.</i> , 1998; Hollnagel et Kroh, 2002)
14	cara_1	dégradation_galactose_1	$\text{galactose} \rightarrow 1\text{-DG} + \text{H}_2\text{O}$	(Kroh, 1994)
15	cara_2	dégradation_galactose_2	$\text{galactose} \rightarrow 3\text{ DG} + \text{H}_2\text{O}$	(Kroh, 1994)
16	mal_1	formation du maltol	$1\text{-DG} \rightarrow \text{maltol} + 2\text{ H}_2\text{O}$	(Belitz <i>et al.</i> , 2009, chapitre 4)
17	iso_1	formation de l'isomaltol	$1\text{-DG} \rightarrow \text{isomaltol} + 2\text{ H}_2\text{O}$	(Belitz <i>et al.</i> , 2009, chapitre 4)
18	ace	retro-aldolisation_1	$1\text{-DG} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{acide acétique} + 2,3,4\text{-hydroxybutanal}$	(Brands et van Boekel, 2001)
19	for	formation de l'acide formique	$3\text{-DG} \rightarrow \text{acide formique} + \text{C5-deoxypentose} + \text{H}_2\text{O}$	(Brands et van Boekel, 2001; Martins et van Boekel, 2003)
20	hmf	formation du 5-hmf	$3\text{-DG} \rightarrow 5\text{-hmf} + 2\text{ H}_2\text{O}$	(Kroh, 1994; Morales et Jimenez-Perez, 1998)
21	fur_1	dégradation_5-hmf_1	$5\text{-hmf} \rightarrow \text{furfural} + \text{acétaldéhyde}$	(Kroh, 1994)
22	fur_2	formation de furfural par 3-DP	$3\text{-DP} \rightarrow \text{furfural} + 2\text{ H}_2\text{O}$	(Tressl <i>et al.</i> , 1998)
23	cara_3	formation de furaméthanol	$\text{C5-déoxyribose} \rightarrow 2\text{-furanmethanol} + 2\text{ H}_2\text{O}$	(Patton, 1955)
24	carbo_1	formation_hydroxybutanone	$2,3\text{-butanedione} \rightarrow 3\text{-hydroxy,2-butanone} + 2\text{H}$	(Yaylayan et Keyhani, 1999)
25	carbo_2	formation_butanedione	$3\text{-DG} \rightarrow 2,3\text{-butanedione} + \text{glyoxal} + \text{H}_2\text{O}$	(Yaylayan et Keyhani, 1999; Cammerer <i>et al.</i> , 1999)
26	streck_1	dégradation_de_strecker	$\text{isoleucine} + \text{glyoxal} \rightarrow 2\text{-méthylbutanal} + \text{CO}_2 + \alpha\text{-aminocétone}$	(Whitfield, 1992; Balagiannis <i>et al.</i> , 2009)
27	streck_2	dégradation_de_strecker	$\text{leucine} + \text{glyoxal} \rightarrow 3\text{-méthylbutanal} + \text{CO}_2 + \alpha\text{-aminocétone}$	(Balagiannis <i>et al.</i> , 2009);
28	streck_3	dégradation_de_strecker	$\text{phénylalanine} + \text{glyoxal} \rightarrow \text{benzaldéhyde} + \text{CO}_2 + \alpha\text{-aminocétone}$	(Danehy, 1986)
29	streck_4	dégradation_de_strecker	$\text{valine} + \text{glyoxal} \rightarrow 2\text{-méthylpropanal} + \text{CO}_2 + \alpha\text{-aminocétone}$	(Danehy, 1986)
30	streck_5	dégradation_de_strecker	$\text{méthionine} + \text{glyoxal} \rightarrow \text{méthional} + \text{CO}_2 + \alpha\text{-aminocétone}$	(Belitz <i>et al.</i> , 2009)
31	pyr_1	formation_pyrazine	$2\text{C}_2\text{H}_5\text{ON} + 1/2\text{ O}_2 \rightarrow \text{pyrazine} + 3\text{ H}_2\text{O}$	(Danehy, 1986)
32	pyr_2	formation_pyrazine	$\rightarrow 2\text{-méthylpyrazine}$	(Pripis-Nicolau <i>et al.</i> , 2000; Yaylayan <i>et al.</i> , 2000)
33	pyr_3	formation_pyrazine	$\rightarrow 2,5\text{- ou } 2,6\text{-diméthylpyrazine}$	Pripis-Nicolau <i>et al.</i> (2000); Yaylayan <i>et al.</i> (2000)
34	pyr_4	formation_pyrazine	$\rightarrow \text{éthylpyrazine}$	(Pripis-Nicolau <i>et al.</i> , 2000; Yaylayan <i>et al.</i> , 2000)
35	pyr_5	formation_pyrazine	$\rightarrow \text{éthénylpyrazine}$	(Pripis-Nicolau <i>et al.</i> , 2000; Yaylayan <i>et al.</i> , 2000)
36	méla	formation_mélanoïdines	$\rightarrow \text{mélanoïdines}$	(Hofmann, 1998b)
37	fur_3	dégradation_5hmf_2	$5\text{-hmf} \rightarrow 5\text{-méthylfurfural} + \text{H}_2\text{O}$	(Kroh, 1994; Hofmann, 1998b)
38	fiss	rétro-aldolisation_2	$3\text{-DG} \rightarrow \text{glycéraldéhyde} + \text{pyruvaldéhyde}$	(Yaylayan et Keyhani, 1999; Weenen, 1998)
39	penta_1	formation de 2,3-pentanedione	$\text{pyruvaldéhyde} + \text{alanine} \rightarrow 2,3\text{-pentanedione} + \text{NH}_3 + \text{CO}_2$	(Yaylayan et Keyhani, 1999)
40	penta_2	formation de 2,3-pentanedione	$\text{glycéréldéhyde} + \text{alanine} \rightarrow 2,3\text{-pentanedione} + \text{NH}_3 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	(Yaylayan et Keyhani, 1999)

Tab. III.9 – Matrice des stœchiométries

[illegible]

Écriture du schéma réactionnel

Annexes 4 : Communications



Contents lists available at ScienceDirect

International Dairy Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/idaairyj

Heat-induced volatiles and odour-active compounds in a model cheese

Emmanuel Bertrand^{a,b}, Elizabeth Machado-Maturana^a, Cyril Chevarin^a, Stéphane Portanguen^a, Frederic Mercier^a, Pascal Tournayre^a, Saïd Abouelkaram^a, Anne-Sophie Guillard^b, Alain Kondjoyan^a, Jean-Louis Berdagué^{a,*}

^a Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UR 370 QuaPA, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

^b Fromageries Bel S.A., 7 boulevard de l'Industrie, 41100 Vendôme, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 September 2010

Received in revised form

14 April 2011

Accepted 17 April 2011

ABSTRACT

The aim of this work was to identify and characterize the volatile compounds formed during the cooking of a model cheese. Particular attention was paid to the generation of the odour-active volatile fraction, which can contribute to the sensory characteristics of cheeses. To this end we used various analytical methods including two-dimensional gas chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry and chromatography–olfactometry. The changes observed in the volatile fraction enabled us to follow several markers of lipid oxidation, caramelization and Maillard reaction mechanisms during cooking. Maltol and furaneol, though present in only trace amounts, gave rise to “overcooked” odour defects in the cheese matrices.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Processed cheese derives from a secondary milk processing step that involves mixing and heating cheese products such as Gouda, Cheddar or Emmental with other materials, both dairy (butter and milk powders) and non-dairy (emulsifiers). This processing yields a homogeneous product, usually spreadable, with a shelf-life often longer than 6 months (Caric, 2000; Kapoor & Metzger, 2008). The thermal and mechanical settings required to obtain a microbiologically safe processed cheese with a texture that is acceptable to the consumer are well known to industrial operators. The thermal settings required to destroy microorganisms and spores are calculated from the parameters of Bigelow and Weibull (van Boekel, 2002).

Numerous studies have provided extensive knowledge of the mechanisms that underlie the denaturing and rearrangement of caseins by emulsifying salts to give a desired texture (Lee, Buwalda, Euston, Foegeding, & McKenna, 2003; Panouille, Durand, Nicolai, Larquet, & Boisset, 2005; Pitkowski, Nicolai, & Durand, 2008). The application of certain thermal settings can cause colour defects linked to the Maillard reaction (Bley, Johnson, & Olson, 1985a, 1985b). By contrast, the effect of thermal settings on the time course of the volatile fraction of processed cheeses is still under-researched, despite the importance of this effect giving rise to

aroma defects, particularly the “overcooked” aroma. The exact conditions under which aroma defects can arise depend on both product composition and the time–temperature settings applied, and they can appear either after the heat treatment or later during storage. Although industrial operators know that an “overcooked” defect can appear above 115 °C, there has been no work on the time course of changes in the volatile fraction, with identification of the substances involved in the appearance of aroma defects, during the cooking of processed cheeses.

The aim of this work was to study the mechanisms responsible for the changes in the volatile fraction induced by the cooking of processed cheeses. To follow the change of the volatile fraction and to make the identification of odour-active markers easier, we (i) developed a simplified model cheese formulation, (ii) designed a laboratory heating system to screen a broader temperature range than that found under industrial conditions, and (iii) analyzed the volatile fraction by comprehensive gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry (GC × GC–tofMS) and various gas chromatography mass spectrometry–olfactometry couplings (GC–MS/O).

2. Materials and methods

2.1. Composition and formulation of the model cheese

2.1.1. Raw materials

Micellar casein and milk permeate were purchased from Ingredia (St-Pol-sur-Ternoise, France) and were carefully selected

* Corresponding author. Tel.: +33 (0) 473 62 41 91; fax: +33 (0) 473 62 47 31.
E-mail address: Berdague@clermont.inra.fr (J.-L. Berdagué).

for having undergone low-heat treatment during processing. Anhydrous milk fat was obtained from Campina (Amersfoort, Netherlands). Sodium chloride and citric acid were both obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA) and were of analytical grade (purity > 99.5%). Deionized water and a mixture of sodium polyphosphates were also used for the formulation. The final composition for 100 g of cheese matrix was: water (60 g), fat (20 g), protein (12 g), lactose (6 g) and some minor constituents including NaCl and citric acid.

2.1.2. Composition

Traditionally, when processed cheese is made, the heating and mixing of the different ingredients are carried out simultaneously. To control the heat treatment variables as closely as possible and to ensure consistent treatment, we elected to separate these two operations. To do this we needed a raw model cheese matrix with both composition and texture close to the finished product. Micellar caseinate, milk permeate, sodium chloride, citric acid and deionized water were left overnight in the dark at 4 °C in a closed 200 mL glass bottle. The headspace was filled with nitrogen to protect the matrix from oxidation. Anhydrous milk fat was then emulsified using a Janke and Kunkel (Staufen, Germany) T25 Ultraturrax at 20,500 rpm for 10 min. The device was turned on and off alternately every 10 s and the bottle was cooled in a cold water bath to prevent heating. The temperature was shown not to exceed 40 °C during the emulsification step, and the pH was finally adjusted to pH 5.8 using sodium chloride and citric acid.

Laser granulometry analyses carried out with a Malvern Mastersizer 2000 particle size analyzer (Malvern, Worcestershire, UK) showed that the model cheese matrix thus obtained displayed a pre-cooking particle size distribution comparable to that of a commercial product (data not shown).

2.2. Heating system

The heating system was designed to heat the cheese sample to a temperature in the range 80–150 °C as fast as possible, and hold the desired temperature for a set time. The cooked sample was rapidly cooled in an ice bath to quench chemical reactions. As we were working on volatile compounds, it was most important that, (i) thermal exchanges should not involve any direct addition or removal of water, as is usually the case in most industrial processes, (ii) neither the device materials nor the heating media should form undesirable compounds during the introduction of the sample into the device, the thermal processing or the removal of the sample; this would adulterate the volatile fraction and so distort the results, and (iii) all parts of the device in contact with the cheese sample should be fully washable for the same reason.

To meet these criteria, a metal heating cell was built, schematically represented in Fig. 1, hermetically enclosing a thin 3.5 mm layer of sample. The sample container was made of stainless steel to prevent the formation of undesirable compounds. For the lid, a compromise was made; aluminium was chosen to ensure high heat diffusivity despite the risk that it might promote lipid oxidation. The cell was made gas-tight with a copper seal in order to keep all the volatile components in the cheese matrix. A release screw allowed an excess of cheese to be removed from the cell upon closure and so ensured a good thermal contact between the cheese and the lid.

The thermal treatment, represented in Fig. 2, consisted of five successive steps in which the cell was (a) immersed in boiling water for 40 s, (b) removed from the bath and placed under the first steam jet for a transition period of 30 s, (c) subjected to this superheated steam jet, (d) maintained at the target temperature using a hot air jet, and (e) cooled in an ice bath. The operating temperatures

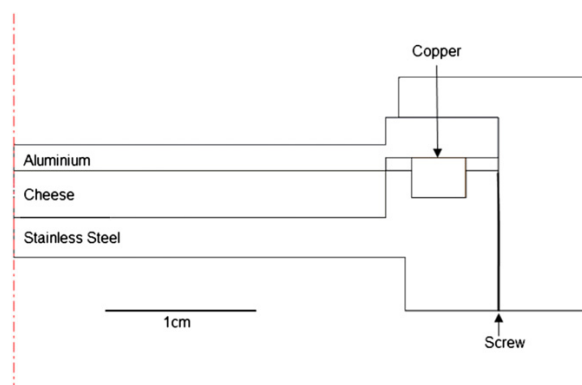


Fig. 1. Schematic section of cooking cell subjected to five successive steps of heat treatment. The cell contained a thin layer of cheese 3.5 mm thick. The materials were chosen to (i) control the heat treatment and ensure high gas-tightness during treatment, (ii) limit the transfer of undesirable volatile compounds from the cooking cell to the cheese matrix, and (iii) be easy to clean.

(baths, superheated steam and hot air jets) were recorded throughout the experiment using calibrated thermocouples. The surface temperature of the lid (black-painted) was measured with a calibrated infrared pyrometer while exposed to the superheated steam and hot air jets. The cheese temperature was previously determined with a type K thermocouple placed at the centre of the cheese matrix. It was later removed during the experiments to prevent any contamination of the volatile fraction by the probe. Details of the steam and hot air jets generators and of the infrared pyrometer calibration can be found in Kondjoyan and Portanguen (2008).

The thermal treatments were numerically simulated using the Comsol Multiphysics version 3.5. Software (Burlington, MA, USA). The superheated steam jet treatment proved to be the most

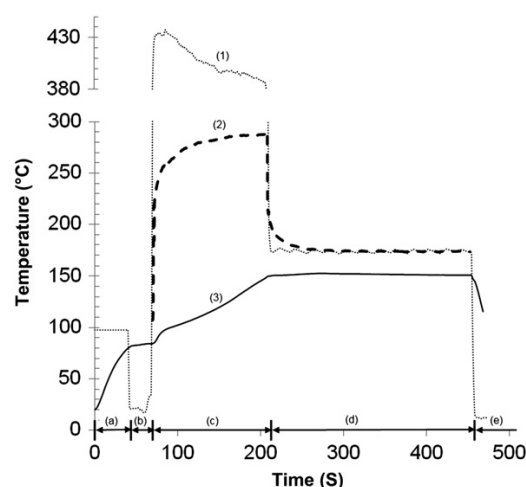


Fig. 2. Temperature recording during heat treatment: dotted line, temperature of the heating fluid in contact with the cooking cell; dashed line, temperature of the lid measured by infrared pyrometry; solid line, temperature recorded at the centre of the cheese layer. Along the x-axis the segments a–e denote times relating to: a, temperature rise by treatment in a boiling water bath; b, transfer of cell under steam jet; c, temperature rise by treatment under the superheated steam jet; d, temperature hold by treatment under a dry air jet; e, treatment in an ice bath. All the heat treatment schedules are given in Fig. 3.

sensitive step. Numerical simulations of the conduction inside the device indicated that the temperature differential between the top surface of the cheese in contact with the lid, and the bottom surface in contact with the container, could reach 15 °C for a 3.5 min treatment. However, the true differential was certainly much lower owing to free convection movements inside the cheese, and its average value over the entire superheated steam jet period was only about 4 °C. Some differentials of about 15 °C were recorded in the superheated steam jet. Heat conduction simulations showed that this difference led to a variation of ± 5 °C (3.3% relative error) at the sample core. Control of the temperature of the steam jet and the duration of each of the different steps thus enabled us to obtain reproducible experimental heating conditions, while at the same time limiting the temperature gradient inside the cheese layer.

2.3. Assay of non-volatile compounds

2.3.1. Determination of sugar contents

The method was adapted from that of Rocklin and Pohl (1983). Briefly, 2 g of processed cheese were dissolved in 100 mL of deionized water; 2 mL of acetic acid (10%, v/v) was added and the pH of the solution was adjusted to 4.6 with about 2 mL of 1 M sodium acetate. The sugar content was then determined by ion exchange HPLC and detected by amperometry.

2.3.2. Determination of free amino acid content

The free amino acid contents of the cheeses were measured by the Agrobio-Rennes laboratory (Vezin-Le-Coquet, France) according to French standards (AFNOR XP V 18-113, January 1998 and AFNOR XPV 18-114, January 1998 for tryptophan).

2.3.3. Determination of furosine content

Furosine is a non-volatile compound that is an indirect marker of lactulosyllysine, an Amadori compound formed from lactose and lysine. The furosine content was determined by ion-pair reversed-phase HPLC and detection at 280 nm using the reference method (ISO:DIS 18329 Standard, 2004).

2.4. Static headspace solid-phase micro-extraction coupled to comprehensive gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry

A 75 μ m solid-phase micro-extraction (SPME) Carboxen/polydimethyl-siloxane (PDMS) fibre (Supelco Bellefonte, PA, USA) was used for the static headspace extraction of volatiles from the processed cheese sample. The fibre was conditioned before analysis according to the manufacturer's recommendations. For each sample, 1.5 g of processed cheese was placed in a sealed 20 mL vial and pre-incubated for 30 min at 60 °C. The SPME needle was then exposed to the cheese headspace for 30 min at 60 °C and the volatiles were thermally desorbed from the fibre in the liner of the GC injection port for 1 min at 280 °C. These analytical conditions are frequently used to analyze food products (Kataoka, Lord, & Pawliszyn, 2000) and are a compromise between better extraction of volatiles (the heaviest or the most polar) and limited occurrence of artifacts. In this regard, we checked that the extraction of the volatile components over 1 h (30 min of pre-incubation + 30 min of extraction) at 60 °C did not induce any cooking that might distort the interpretation of results. For this purpose we compared (i) the effect of extraction for 1 h at 60 °C on a raw matrix 'r' with (ii) the effect of extraction for 1 h at 60 °C on a matrix 'X' already cooked for 1 h at 60 °C. These conditions were validated based on the absence of any noteworthy effect (see Fig. 5).

Splitless injection was carried out with an SPME Combipal autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland) on a 6890N chromatograph (Agilent, Massy, France) integrated in a GC $\times$ GC–toFMS LECO Pegasus instrument (LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA). The first chromatographic separation was carried out on an SPB-5 capillary column (5% diphenyl-, 95% dimethylpolysiloxane, length 30 m $\times$ internal diameter 0.32 mm $\times$ film thickness 1 μ m; Supelco, St-Germain-en-Laye, France). The second separation was carried out on a DB-17 capillary column (50% dimethyl-, 50% diphenylpolysiloxane, length 2.50 m $\times$ internal diameter 0.178 mm $\times$ film thickness 0.30 μ m; J&W Agilent, Santa Clara, CA, USA). The resulting data were expressed in arbitrary units of area.

2.5. Gas chromatography–olfactometry analyses

2.5.1. Sample preparation and extraction of volatiles

Processed cheese (2 g) was rapidly mixed with 8 g of anhydrous sodium sulphate (Sigma–Aldrich; purity > 99%) in a mortar and the volatile components extracted by dynamic headspace gas chromatography (Tekmar, Cincinnati, OH, USA). An aliquot of 3 g of the mixture was extracted at 30 °C for 60 min with a helium stream flow rate of 40 mL min^{−1} (He/U purity: 99.995%; Air Liquide, Paris, France). Two cartridges were successively purged, the first for 45 min and the second for 15 min to compensate for the loss of the most volatile compounds. Volatile compounds were separated on an Agilent 4890D gas chromatograph (Agilent) equipped with an RTX-5 fused silica capillary column (5% diphenyl-, 95% dimethylpolysiloxane, length 60 m $\times$ internal diameter 0.53 mm $\times$ film thickness 1.50 μ m; Restek, Evry, France) with an 8 mL min^{−1} constant flow rate of helium (Air Liquide). The oven temperature was 5 min isothermal at 40 °C, 4 °C min^{−1} ramp to 205 °C and 5 min isothermal at 205 °C.

2.5.2. Sniffer selection and training

The sniffers (three men, five women, aged 25–35 years) were selected for their sensitivity and ability to detect and describe the odours, and were trained in three sessions.

2.5.3. Multiway gas-phase chromatography–mass spectrometry/olfactometry

Multiway gas chromatography coupled to olfactometry and mass spectrometry was used to carry out a rapid but exhaustive analysis of the volatile odour-active fraction of a product with the help of eight sniffers who simultaneously evaluated the duration (by pressing a button), the intensity (scored 0–5) and the nature of the odour sensed at the outflow from eight individual sniffing vents (Berdagué & Tournayre, 2005; Berdagué, Tournayre, & Cambou, 2007).

2.5.4. Monoway gas-phase chromatography–mass spectrometry/olfactometry

For the precise identification of the odour-active substances present in any given area of the aromagram established by the panel of eight sniffers, we used gas-phase chromatography coupled to mass spectrometry and olfactometry designed to operate in two different configurations: (i) classical monoway gas-phase chromatography–mass spectrometry/olfactometry (GC–MS/O) to locate the area or areas of interest sensed with the multiway olfactometry system (GC–MS/8O), and (ii) two-dimensional “heartcut” chromatographic analysis coupled to mass spectrometry and monoway olfactometry (GC–GC–MS/O), as already described by Théron et al. (2010), for detailed exploration of each area. This circumvents the problems of co-elution encountered in GC–MS/8O and GC–MS/O, as two columns with different polarities are successively used. The

GC–MS/O and GC–GC–MS/O olfactometric analyses were carried out by the two sniffers who performed best in the 8W–GC–MS/O tests.

2.5.5. Gas chromatography–olfactometry data acquisition and processing

Numerical recording of vocabulary items, intensity and persistence of odours was launched at the start of injection of the volatile compounds into the chromatography column at a rate of 1 scan s^{−1} throughout the 35 min sessions. The data were analyzed using the VIDEO-Sniff method and the AcquiSniff® Software (version 6.5.3) (Tournayre and Berdagué, 2003 and 2006) by breaking up the total olfactory signal into *n* olfactory classes according to Berdagué and Tournayre (2002). The total olfactory signal of the aromagrams (TOS_{int} × Det) was expressed as a product of the intensities in terms of average scores in order to locate the odour-active areas commonly and intensely sensed by the sniffers (Berdagué et al., 2007).

2.5.6. Identification of volatile compounds

To achieve reliable identification, the data obtained from the GC–MS/80, GC–MS/O, GC–GC–MS/O and GC × GC–tofMS devices, computer matches against spectral databases (NIST/EPA/NIH 2005 v2.0d, Gaithersburg, MD, USA; Wiley 275K, 1996; masslib 1999: MSP Köfel, Bindenhausenstrasse 46, 3098 Koeniz, Switzerland) and comparisons with databases of linear retention indices (Kondjoyan & Berdagué, 1996) were cross matched. For the identification of odour-active compounds, odour databases (Flavornet 2006; LRI and Odour Database 2006) and olfactory comparisons with pure compounds were also used.

2.6. Experimental design and statistical analysis

All the cooking parameters used are presented in Fig. 3. Each point corresponds to a triplicate run integrating formulation, cooking and analysis steps.

2.6.1. GC × GC–tofMS analyses

Because of the very large number of volatile compounds identifiable by GC × GC–tofMS, each volatile compound was measured in three repeats of at least one experimental heat treatment to be retained in the study. To select the volatile compounds that were

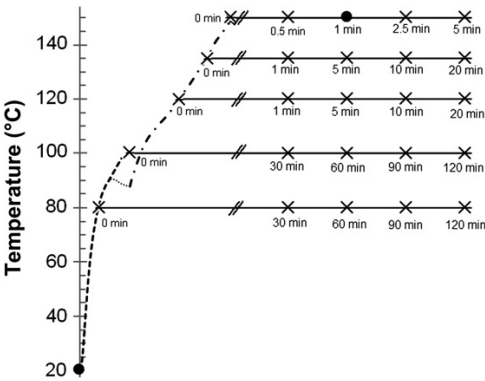


Fig. 3. Overview of the experimental design. Numbers represent the time elapsed at the desired temperature (warm-up period excluded). Processed cheese samples cooked according to (x) conditions were analyzed by solid-phase micro-extraction–comprehensive gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry, whereas those processed according to (•) conditions were also analyzed by multiway gas chromatography coupled to olfactometry and mass spectrometry. The thermal treatments were carried out according to the five successive steps given in Fig. 2.

Table 1
Synthetic representation of the structures identified by solid-phase micro-extraction–comprehensive gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry in model cheese samples.

Elements	Structures	Functions
CH (117)	Aliphatic	94 (Alkane, 48; alkene, 44; alkyne, 2)
	Terpene	10 (Mono-, 7; di-, 3)
	Benzenic	11 (Alkyl)
	Naphthalene	1
CHO (149)	Aliphatic	102 (Aldehyde, 24; ketone, 28; alcohol, 23; ester, 15; acid, 12)
	Cycloalkane/ene	4 (Ketone, 3; alcohol, 1)
	Lactone	18
	Oxirane	2
	Furan	19 (Alkyl, 9; aldehyde, 3; ketone, 2; 2H/4H, 5)
	Pyran	3 (Ketone, 3)
	Benzenic	6 (Aldehyde, 2; alcohol, 3; acid, 1)
	Naphthalene	2 (Alcohol, 1; ketone, 1)
	Benzofuran	1
	Benzo-pyran	1 (Ketone, 1)
	Benzoquinone	1
CHS (10)	Aliphatic	5 (Sulphide, 4; thiol, 1)
	Thiophene	3
	Thiirane	2
CHN (22)	Aliphatic	9 (Nitrile, 9)
	Benzenic	1 (Nitrile, 1)
	Pyrrole	2
	Pyrazine	5 (Alkyl, 3)
	Hydrazine	2
	Pyridazine	2
	Tetrazole	1
CHBr, Cl, F (27)	Aliphatic	24 (Cl, 10; Br, 11; F, 3)
	Benzenic	3 (Br, 3)
CHNS (3)	Thiazole	3 (Alkyl, 3)
CHON (7)	Aliphatic	3 (Amide, 2; nitrile, 1)
	Benzenic	2 (Nitrile, 1; amine, 1)
	Furan	1 (Nitrile, 1)
	Oxazole	1 (Alkyl, 1)
CHOS (11)	Aliphatic	7 (Aldehyde, 1; thiol, 4; ester, 2)
	Furan	2 (Thiol, 2)
	Thiophene	2 (Methoxy, 1; carboxaldehyde, 1)

significantly influenced by the heat treatments applied, an analysis of variance according to equation (1) was carried out for all the volatile compounds retained in the study:

$$X_{i,n} = \mu + T_i + \varepsilon_n \tag{1}$$

where $X_{i,n}$ =value observed, μ =mean effect and T_i =effect of heat treatment with $i=25$ levels (five temperatures × five treatment durations) and $n=$ three repetitions. A principal component analysis was carried out on 78 samples (75 cooked matrices plus three raw matrices) from a subset of volatile components significantly influenced by the heat treatments and recognized in the literature as markers of Maillard reactions, caramelization or fatty acid oxidation. In view of the broad range of abundances (spanning more than five orders of magnitude), calculations were made from reduced centred data (Statistica® 8.0, Tulsa, OK, USA).

2.6.2. Gas chromatography–olfactometry analyses

To identify the areas of the aromagrams of the raw and cooked cheese matrices (heated at 150 °C for 1 min) that displayed significant differences, a comparison of means was carried out (Student's t-test on independent samples) on each of the 2100 scans obtained during the analyses.

3. Results and discussion

3.1. Changes in composition during heating

A synthesis by compositional and structural class of the 346 volatile compounds identified by GC × GC–toFMS, all heat treatments combined, is presented in Table 1. Only 81 structures were significantly influenced by the heat treatment applied to the model cheese matrix ($P < 0.01$). These structures came mainly from the degradation of lipids (involving hydrolysis and oxidation reactions), amino acids (involving, in particular, the Maillard reaction) and glucids (including possible caramelization reactions without involvement of an amino acid).

The hydrolysis of triglycerides was responsible for the increase in free fatty acids (C_2 to C_9) according to the intensity of the heat treatments. The oxidation of lipid fatty acids was responsible for most of the un-branched aliphatic structures: alkanes, alkenes, alkynes, aldehydes, ketones, alcohols and carboxylic acids. Of these structures, 196 were identified. Among these, aliphatic aldehydes (C_3 to C_{12}) and methylated ketones (C_6 to C_{11}) increased in amount with the intensity of the heat treatment. Contarini, Povolio, Leardi, and Toppino (1997) considered these compounds as good markers for the heat treatment of milk (pasteurized, direct UHT and bottle-sterilized UHT) and for its storage duration and temperature. The different aliphatic alcohols (C_1 to C_9) showed different changes that were difficult to link to the heat treatments applied. The esters identified in the raw matrix came from esterification between C_2 to C_6 acids and C_1 to C_4 alcohols. They were progressively hydrolyzed in step with the treatment intensity. However, the short-chain fatty acids were mainly derived from the thermal hydrolysis of triglycerides (Belitz, Grosch, & Schieberle, 2009). The alkylfurans (methyl- to pentylfuran) mostly came from the auto-oxidation of lipids. During cooking, their content increased regularly with the intensity

of the heat treatments applied. According to Limacher, Kerler, Davidek, Schmalzried, and Blank (2008), furan and methylfuran also come from the Maillard reaction.

The assay of free amino acids gave low mean values of about 9 mg per 100 g in the raw matrix. Two kinds of behaviour were noted: (i) that of glutamic acid, the content of which increased with the duration of heating for temperatures 80 °C and 100 °C and decreased for temperatures 120 °C, 135 °C and 150 °C, and (ii) that of glycine, proline, arginine, alanine, valine, cysteine, isoleucine, leucine and lysine, the contents of which increased with the duration of heating for all cooking temperatures. The increase in the free amino acid levels, according to the intensity of the cooking schedule, can probably be explained by the partial hydrolysis of proteins. Free amino acids react with glucids during the initial steps of the Maillard reaction to form Amadori compounds. Among these, lactulosyllysine (formed from lactose and lysine) was assayed after acid hydrolysis by measuring furosine content. These values increased regularly with temperature between 80 °C and 120 °C (Fig. 4). A decrease was observed from 135 °C, which was sharper at 150 °C. Hence lactulosyllysine presents a positive mass balance at temperatures below 135 °C and a negative balance above it. This finding is consistent with the work of Berg and Van Boekel (1994) and Morales and Jiménez-Pérez (1998), who found the threshold temperature for the degradation of lactulosyllysine during the heat treatment of milk to be 130 °C. In general, the Amadori compounds formed from the different sugars (principally lactose and galactose) and amino acids will contribute to the formation of reaction intermediates called deoxyosones, common to caramelization and Maillard reactions (Hodge, 1953).

The fission of deoxyosones produces dicarbonyl compounds which mostly account for the increase in levels of 2,3-butanedione, 2,3-pentanedione and 3-hydroxy-2-butanone in the matrices during cooking at 80 °C, 100 °C and 120 °C. At higher temperatures,

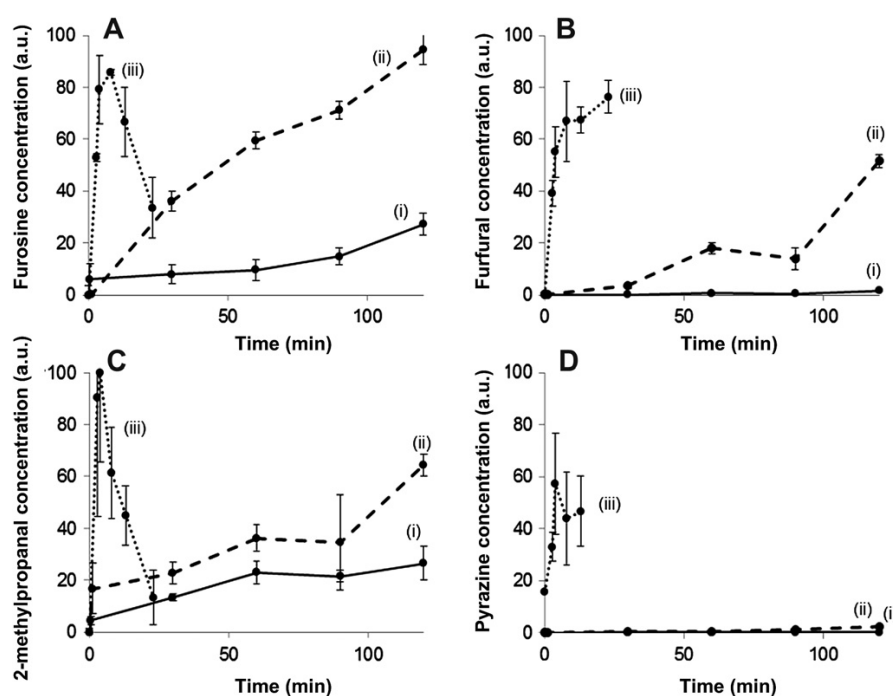


Fig. 4. Kinetics measured for four typical markers (A, furosine; B, furfural; C, 2-methylpropanal; D, pyrazine) of the Maillard reaction at (i) 80, (ii) 120, and (iii) 150 °C (data are expressed in arbitrary units of area). The error bars represent the standard deviation for the three repetitions.

the levels of these compounds decreased, indicating a strong consumption probably directed towards the formation of condensation products of the Maillard reaction. This consumption occurred faster as the temperature increased (Fig. 4); the diketones reacted with the amino acids to form Strecker aldehydes and α -amino ketones. The main Strecker aldehydes that we observed were 2-methylpropanal, (Fig. 4), 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, and methional, coming from the Strecker degradation of valine, isoleucine, leucine and methionine, respectively (Belitz et al., 2009). The formation of products derived from Strecker degradation at 80 °C can be explained, independently of a source of carbonyl compounds derived from the fission of deoxyosones, by the presence of carbonyl compounds already present in the raw material, unlike binary model systems made of a sugar mixed with an amino acid which first require these carbonyl compounds to be formed to initiate the Strecker degradations (Hodge, 1953). It is the condensation of two α -aminoketones (formed at the same time as the Strecker aldehydes) that leads to the production of heterocyclic compounds, such as pyrazines.

Among the nitrogen heterocycles, the pyrazines we identified (pyrazine, 2-methylpyrazine, 2,5-dimethylpyrazine, 2,6-dimethylpyrazine, ethenylpyrazine and tetramethylpyrazine) are characteristic products of Maillard reactions (Huang, Bruechert, & Ho, 1989). Likewise for the other nitrogen heterocycles (pyridazine, tetrazole and oxazole), which were not detected or were present in very small amounts in the raw cheese matrix. The changes in their levels according to the heat treatments were perfectly co-linear, and so we present only that of pyrazine (Fig. 4),

which clearly shows that these structures appear systematically after cooking between 135 °C and 150 °C. No long-chain alkylpyrazine, such as pentylpyrazine, specific to interactions between products of the Maillard reaction and products of lipid oxidation (Hidalgo & Zamora, 2000; Whitfield, 1992) was detected. Pyrroles were already present in the raw cheese matrix and their levels were not significantly influenced by the heat treatments applied. These compounds may form in milk powders (Ferretti & Flanagan, 1971), which have a much lower water content than the cheese matrix. The Maillard reaction applied to sulphur-containing amino acids leads to the formation of methional, methanethiol, 2-mercaptoacetaldehyde, sulphides, and thiophenes (Belitz et al., 2009; De Wit & Nieuwenhuijse, 2008; Fox & McSweeney, 1998). Thiazole and furfurylmethylsulphide originate from thermal degradation of thiamine (Belitz et al., 2009).

In the model matrix, the main sugar is lactose, a disaccharide made up of glucose and galactose. In the uncooked matrix, lactose levels were 6.5 g per 100 g and those of galactose and glucose were below quantification thresholds. During heating, the levels of lactose fell to values between 5.50 and 3.50 g per 100 g, whereas those of galactose rose to between 0.02 and 0.45 g per 100 g. However, no trace of glucose was detected. Two explanations for the absence of glucose can be offered: (i) it is rapidly degraded after thermal hydrolysis of lactose, or (ii) the glucose moiety of lactose is preferentially degraded when the Amadori compound is formed from lactose and an amino acid. On heating, sugars produce short-chain ketones such as 2,3-butanedione or 2,3-pentanedione (Yaylayan & Keyhani, 1999).

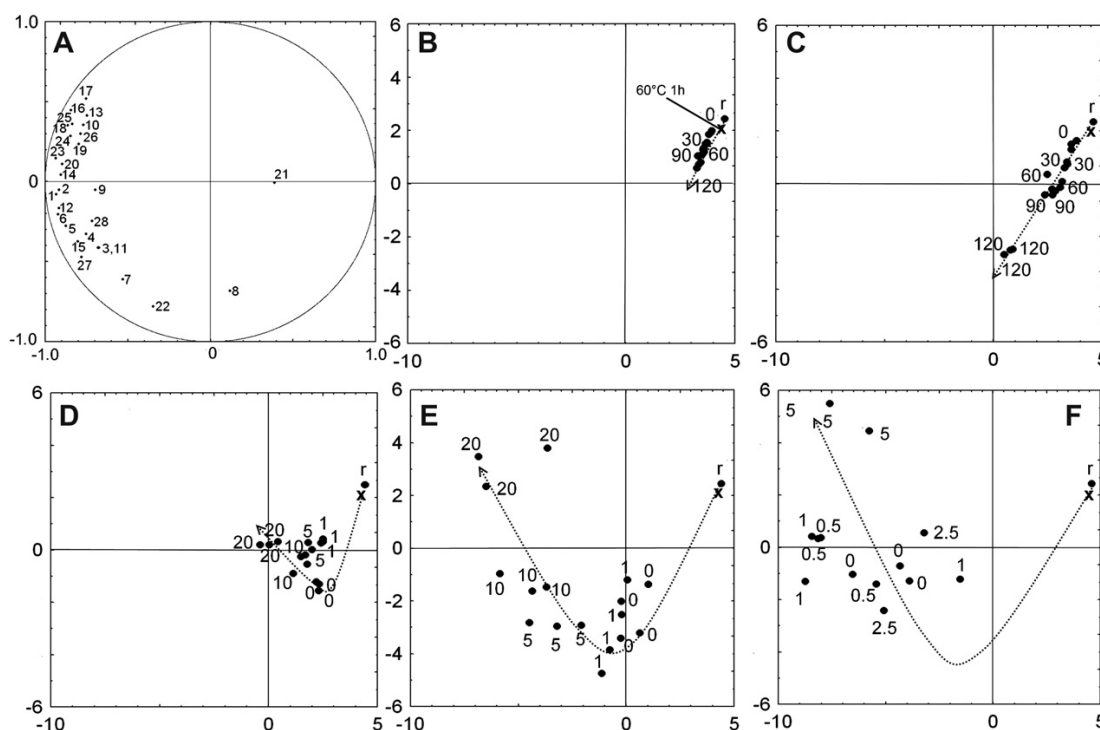


Fig. 5. Principal component analysis plot PC1 versus PC2 of all variables (A) and samples (B, 80 °C; C, 100 °C; D, 120 °C; E, 135 °C; F, 150 °C). PC1 and PC2 accounted for 60% and 13.4% of the total variance respectively; 'r' stands for the raw matrix (extracted 1 h at 60 °C) and 'x' stands for the matrix cooked for 1 h at 60 °C (extracted one additional hour at 60 °C). Numbers represent the time elapsed at the desired temperature in minutes as indicated in Fig. 3. The full line represents the overall time course of the volatile fraction during the heating period. The dotted line represents its time course during the holding period. Numerals stand for compounds as follows: 1: 3-hydroxy-2-butanone; 2: cyclopenten-1,4-dione; 3: 2,3-butanedione; 4: 2-methylpropanal; 5: benzaldehyde; 6: 2-methylbutanal; 7: 3-methylbutanal; 8: methional; 9: dimethylsulphide; 10: dimethyldisulphide; 11: thiazole; 12: thiophene; 13: dimethyltrisulphide; 14: furfural; 15: furfuryl alcohol; 16: pyrazine; 17: 2-methylpyrazine; 18: 2,5-dimethylpyrazine; 19: ethenylpyrazine; 20: 2-ethylpyrazine; 21: 5-methylfurfural; 22: isomaltol; 23: maltol; 24: 2-ethylfuran; 25: hexanal; 26: octanal; 27: nonanal.

Heterocycles such as furfuryl alcohol and furfural (Patton, 1955), furaneol and maltol are derived from lactose degradation reactions. However, furfural, furaneol and maltol can also originate from the Maillard or caramelization reactions (Berg & Van Boekel, 1994; Kroh, 1994; van Boekel, 1998). The 27 halogenated residues detected did not present any significant variations in abundance in the course of the treatment undergone by the matrix, indicating their stability under the heat treatment conditions. They are assumed to be environmental contaminants classically present in the lipid phases of numerous animal products.

3.2. Changes in the selected markers

Principal component analysis (PCA) was carried out on 27 of the 81 compounds that were significantly influenced by the heat treatment, gave an easily integratable signal and are recognized in the literature as being markers of fatty acid oxidation, Maillard or caramelization reactions. This analysis gave a multivariate picture of changes in the composition of the volatile fraction of the matrices in the course of the 25 thermal treatments applied (five temperatures, five treatment durations and three repeats). To facilitate the description of the changes observed, they are presented by temperature. For each temperature (Fig. 5B–F), the effect of the temperature rise on the composition is visualized by a solid line (from the raw matrix to the target temperature) and the effect of the treatment duration by a dotted line.

The principal plane of the PCA shows that the phase during which the matrix temperature rises to 135 °C induces a change in composition (Fig. 5: solid line) that is significantly correlated with the variables in the $[-1, -1]$ quadrant of the correlation circle (Fig. 5A). This shift corresponds to the formation of diacetyl (in redox equilibrium with acetoin), several Strecker aldehydes (variables 4–7) except for methional (variable 8) and several sulphur-

containing compounds (sulphides: variables 9, 10 and 13, thiazole and thiophene: variables 11 and 12). When the temperature rose to 150 °C, we observed a break in the evolution of the composition significantly correlated with variables 14 and 15 and all those in the $[-1, 1]$ quadrant of the correlation circle. This shift corresponds to the formation of markers of caramelization and Maillard reactions (furfural, furfuryl alcohol, 5-methylfurfural, maltol, isomaltol and five pyrazines: variables 14–23).

The effect of the duration of the heat treatments induced different effects according to the temperature. For final temperatures of 80 °C and 100 °C, a moderate shift in composition was observed irrespective of the duration (Fig. 5: dotted line), corresponding to an increase in levels of diacetyl, Strecker aldehydes and sulphides. For final temperatures of 120, 135 and 150 °C, the shift in composition reflects the formation of advanced products of caramelization and Maillard reactions (variables 14–23). This formation occurred faster as the treatment temperature increased.

There are two likely explanations for very high variability of the repetitions at high temperatures: (i) more difficult experimental control of treatments at the highest temperature (error of ± 4 °C at 150 °C versus ± 1 °C at 80 °C and 100 °C), and (ii) the combined effects of higher reactivity and more complex reactions (corroborated by the greater number of compounds identified at 150 °C).

3.3. Identification of volatile odour-active compounds

The olfactometric analyses revealed about 30 odour-active areas (Fig. 6). The descriptive vocabulary used to describe these areas was grouped into ten olfactive classes: “alcohol-acidic”, “animal”, “butter-lactic-cheesy”, “earthy-undergrowth”, “empyreumatic”, “fruity-floral”, “green-vegetable”, “plastic-chemical”, “sulphur-garlic” and “not classified”. The list of odour-active compounds identified with their odours predominantly reported by the sniffers is given in Table 2.

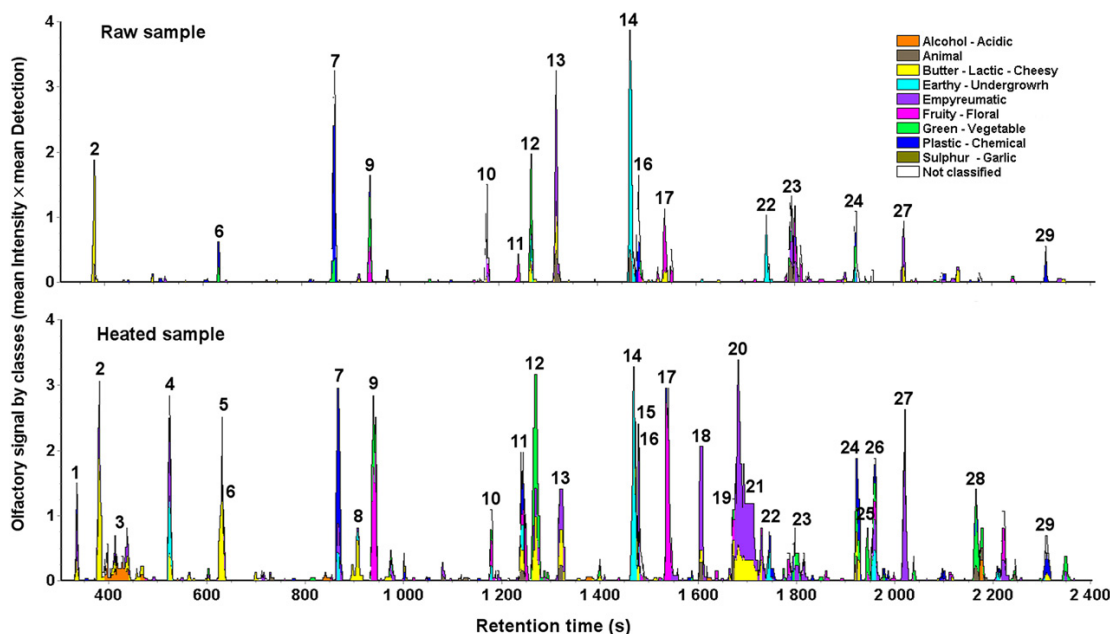


Fig. 6. Model cheese aromagrams before (top; raw sample) and after (bottom; heated sample) a thermal treatment of 1 min at 150 °C. The total olfactory signal by class is expressed as a mean product of intensity and number of detections of the eight individual aromagrams ($TOS_{int} \times Det$). The breakdown of the $TOS_{int} \times Det$ into 10 classes shows the aromagram zones belonging to a given olfactive class. Numerals refer to Table 2.

Table 2

List of identified odour-active compounds and a short description of their perceived odour by the panel.

Peak number ^a	Retention time (s) ^b	Chemical name	LRI ^c	Reliability ^d	Descriptors ^e	Main origin ^f	t-Test ^g
1	330	2-Methylpropanal	552	a	Chocolate, cheesy, buttery	M.R.	r < h**
2	385	2,3-Butanedione	581	a	Butter	O.	r < h*
3	412	acetic acid	595	a	Vinegar	M.R.	r < h*
4	524	3-Methylbutanal	648	a	Chocolate, cheese	M.R.	r < h***
5	620	2,3-Pentanedione	689	a	Butter, yoghurt	M.R.	r < h*
6	629	Pentanal	693	a	Grass, orange	L.O.	n.s.
7	861	1-Hexen-3-one	780	b	Plastic, chemical	L.O.	n.s.
8	895	Butanoic acid	792	a	Cheese, vomit	L.	r < h*
9	933	Hexanal	804	a	Grass, green apple	L.O.	r < h***
10	1173	Not identified Pyrazine	882	d	Plastic, chemical, empyreumatic	M.R.	n.s.
11	1249	Heptanal	902	a	Citrus, fruity	L.O.	r < h**
12	1260	Methional	910	a	Potatoes	M.R.	r < h***
13	1309	—	—	—	Empyreumatic	—	r > h*
14	1469	1-Octen-3-one	980	a	Mushroom	L.O.	r > h*
15	1472	Dimethyltrisulphide	981	a	Sulphur, gas, cabbage	O.	r < h*
16	1478	1,5-Octadiene-3-one	985	d	Chemical, plastic	—	n.s.
17	1531	Octanal	1002	a	Citrus, orange	L.O.	r < h*
18	1596	2-Acetylpyrazine	1038	b	Empyreumatic	M.R.	r < h***
19	1668	Phenylacetaldehyde	1055	b	Floral	M.R.	n.s.
20	1673	2,4-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (furanol)	1056	a	Toffee, empyreumatic	M.R.	r < h***
21	1676	4H-pyran-4-one,3-hydroxy-2-methyl- (maltol)	1057	a	Empyreumatic	M.R.	r < h***
22	1745	1-Nonen-3-ol	1077	b	Mushroom	L.O.	n.s.
23	1790	Nonanal	1107	a	Cut grass, leather	L.O.	n.s.
24	1920	—	—	—	Chemical	—	n.s.
25	1940	2-Oxepanone	1179	b	Vegetable	L.O.	n.s.
26	1958	—	—	—	Plastic, chemical	—	n.s.
27	2013	Furfurylmethylsulphide	1223	c	Dry ham, empyreumatic	O.	n.s.
28	2156	—	—	—	Green, vegetable	—	r < h**
29	2320	γ-Decalactone	1450	c	Potatoes, bedbug, chemical	L.O.	n.s.

^a Peak number as given in Fig. 6.^b Retention time of the odours in seconds.^c Linear retention indices (LRI) calculated for the DB-5 capillary column of the GC–MS systems.^d Reliability of identification: a, mass spectrum, retention index and odour identical to those of an authentic sample; b, mass spectrum, retention index and odour in agreement with the corresponding literature data; c, tentative identification by mass spectra; d, tentative identification by retention index.^e Major descriptors given by the sniffers.^f Origin of chemicals: M.R.: Maillard reaction; L.O.: lipid oxidation; L.: lipolysis; O.: other source.^g Significance of the Student's t-test r < h: mean intensity perceived by the sniffers significantly stronger for the heated sample than for the unheated one.

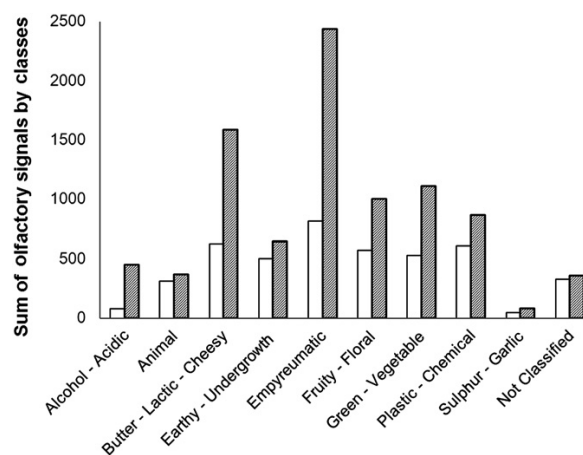
Comparison of aromagrams differentiates between odour-active substances endogenous to the raw materials used (raw sample aromagram, Fig. 6) and those formed during heating for one minute at 150 °C (heated sample aromagram, Fig. 6). The absence of ripened cheese and of butter in the model formulation reduced the number of odour-active volatile compounds classically found in dairy products. The use of rising steep temperature gradients and prompt analysis after cooking limited the effects of residual enzyme activity that can generate odour-active compounds (Fox & McSweeney, 1998). Under these conditions, the significant differences observed between aromagrams (raw versus heated matrix) can be attributed to chemical reactions induced by the heat treatment.

Among the 16 principal odour-active areas for the raw cheese matrix (areas 2, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 22, 23, 24, 27 and 29, Fig. 6), only 10 had an intensity greater than 1 (intensities scored between 0 and 5). The aldehydes, mono-ketones, alcohols and γ-decalactone (Table 2) probably arise from the oxidation of fatty acids in the anhydrous milk fat.

After cooking, the aromagram of the cheese matrix was markedly modified (Fig. 6). A general increase in the odour intensity of the different olfactory signal classes was observed (Fig. 7) with 19 odour-active substances presenting an intensity greater than 1. Qualitatively, higher temperatures amplified the “butter-lactic-cheesy” and “empyreumatic” notes and to a lesser degree the “fruity-floral” and “green-vegetable” notes.

These modifications were partly the result of an increase in the odour intensity of substances already present in the raw matrix

(areas 2, 9, 11, 17, Fig. 6): of these, hexanal and octanal (areas 9 and 17) were mainly responsible for the fruity notes sensed by the sniffers. They were also due to the formation of 13 new odour-active substances (areas 1, 3, 4, 5, 8, 15, 18, 19, 20, 21, 25, 26 and 28, Fig. 6). Of these, four were mostly responsible for the increase

**Fig. 7.** Sum of the olfactory signals by class for the raw sample (white bars) and the heated sample (hatched bars).

in the “butter-lactic-cheesy” class; these were 2-methylpropanal (area 1), 2,3-butanedione (area 2), 2,3-pentanedione (area 5) and butanoic acid (area 8). Five substances were responsible for the “empyreumatic” note, three of which made the largest contributions to the increase in this note after cooking; these were 2-acetylpyrazine (area 18), furaneol (area 20) and maltol (area 21). The other two substances, a pyrazine and an unidentified entity (areas 10 and 13), were sensed less strongly after cooking.

The higher intensity of the “green-vegetable” notes was due to the production after heating of methional (potato odour), dimethyltrisulphide (gas, cabbage odour) and an unidentified entity (area 28). Other sulphur-containing substances such as methanethiol, dimethylsulphide and dimethyldisulphide were not sensed, probably because their detection thresholds were above those of the first three sulphur-containing compounds.

The results of direct sniffing of cheese matrices (data not shown) indicate that when an extreme heat treatment was applied the empyreumatic notes predominated over the buttery, fruity and vegetable notes. This suggests that after heating, products of the Maillard reaction affect the cheese odour more than compounds such as 2,3-butanedione or those derived from oxidation of fatty acids. Furaneol and maltol can be considered as the main substances responsible for the “overcooked” odour defect in processed cheeses. The odour of these two substances (empyreumatic) is perceptible on sniffing cooked cheeses from heat treatments at 120 °C for 5 min, and becomes conspicuous after extreme cooking. These two compounds, though present in only trace amounts, have a dominant character as they mask most of the odour contributions of other compounds shown by GC–O to be abundantly present.

4. Conclusions

The approach taken in this work was based on the study of a simplified model formulation and the development of a system allowing the consistent, reproducible heat treatment of a thin layer of cheese. The detailed analysis of the volatile fraction during cooking of the model cheese matrix enabled us to identify and monitor markers of the lipid oxidation, Maillard and caramelization reactions, and to assess their respective roles in the changes in aroma induced by heat treatments. In the model matrix, 120 °C represents a critical value in the progress of the reactions. It is above this temperature that the compounds characteristic of Maillard and caramelization reactions are observed, and that the “overcooked” defects grow perceptible. Maltol and furaneol, because of their very low detection thresholds and their probable ability to mask the other odour-active substances, play a major part in the appearance of the “overcooked” defect. To limit its occurrence, (i) work to optimize thermal settings, minimizing time spent at temperatures above 120 °C (while meeting microbiological requirements) and/or (ii) work on formulation to limit lactose content in the matrix could be considered. At this stage of research, the sensory properties of processed cheeses obtained should be validated by further analysis.

Acknowledgements

This work had the financial support of the Agence Nationale de la Recherche (French National Research Agency) under the Programme National de Recherche en Alimentation et Nutrition Humaine project ANR-06-PNRA-023. We thank Nathalie Kondjoyan for her valuable help with the 8-Way-GCO device.

References

- Belitz, H., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food chemistry* (4th ed.). Berlin and Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.
- Berdagué, J.-L., & Tournayre, P. (2002). The “Video-Sniff” method, a new approach for the “vocabulary-intensity-duration” study of “elementary odours” perceived by gas-chromatography–olfaction. In J. L. Le Qué, & P. X. Étévant (Eds.), *Flavor research at the dawn of the 21st century* (pp. 514–519). Paris, France: Editions Tec & Doc.
- Berdagué, J.-L., & Tournayre, P. (2005). Gas chromatography–olfaction analyses device and method. World Patent. WO 2005/001470 A2.
- Berdagué, J.-L., Tournayre, P., & Cambou, S. (2007). Novel multi-gas chromatography–olfactometry device and software for the identification of odour-active compounds. *Journal of Chromatography A*, 1146, 85–92.
- Berg, H., & Van Boekel, M. A. J. S. (1994). Degradation of lactose during heating of milk. 1. Reaction pathways. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 48, 157–175.
- Bley, M., Johnson, M., & Olson, N. (1985a). Factors affecting non-enzymatic browning of process cheese. *Journal of Dairy Science*, 68, 555–561.
- Bley, M., Johnson, M., & Olson, N. (1985b). Predictive test for the tendency of Cheddar cheese to brown after processing. *Journal of Dairy Science*, 68, 2517–2520.
- Caric, M. (2000). Processed cheese. In F. J. Francis (Ed.), *Encyclopedia of food science and technology* (2nd ed.). (pp. 1973–1987) New York, NY, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Contarini, G., Povolio, M., Leardi, R., & Toppino, P. (1997). Influence of heat treatment on the volatile compounds of milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3171–3177.
- De Wit, R., & Nieuwenhuijse, H. (2008). Kinetic modelling of the formation of sulphur-containing flavour components during heat-treatment of milk. *International Dairy Journal*, 18, 539–547.
- Ferretti, A., & Flanagan, V. P. (1971). Volatile constituents of whey powder subjected to accelerated browning. *Journal of Dairy Science*, 54, 1764–1768.
- Fox, P. J., & McSweeney, P. L. H. (1998). *Dairy chemistry and biochemistry*. London, UK: Blackwell Academic & Professional.
- Hidalgo, F. J., & Zamora, R. (2000). The role of lipids in nonenzymatic browning. *Grasas y Aceites*, 51, 35–49.
- Hodge, J. (1953). Chemistry of browning reactions in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1, 928–943.
- Huang, T., Bruechert, L. J., & Ho, C. (1989). Kinetics of pyrazine formation in amino acid–glucose systems. *Journal of Food Science*, 54, 1611–1614.
- ISO:DIS 18329 Standard. (2004). Détermination de la teneur en furones, méthode par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse par paire d'ions.
- Kapoor, R., & Metzger, L. E. (2008). Process cheese: scientific and technological aspects; a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7, 194–214.
- Kataoka, H., Lord, H. L., & Pawliszyn, J. (2000). Applications of solid-phase micro-extraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 880, 35–62.
- Kondjoyan, A., & Portanguen, S. (2008). Prediction of surface and “under surface” temperatures on poultry muscles and poultry skins subjected to jets of super-heated steam. *Food Research International*, 41, 16–30.
- Kondjoyan, N., & Berdagué, J. (1996). *A compilation of relative retention indices for the analysis of aromatic compounds*. Saint-Genès Champanelle, France: Editions du Laboratoire Flaveur.
- Kroh, L. W. (1994). Caramelisation in food and beverages. *Food Chemistry*, 51, 373–379.
- Lee, S., Buwalda, R., Euston, S., Foegeding, E., & McKenna, A. (2003). Changes in the rheology and microstructure of processed cheese during cooking. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie – Food Science and Technology*, 36, 339–345.
- Morales, F., & Jiménez-Pérez, S. (1998). Study of hydroxymethylfurfural formation from acid degradation of the Amadori product in milk-resembling systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3885–3890.
- Panouille, M., Durand, D., Nicolai, T., Larquet, E., & Boisset, N. (2005). Aggregation and gelation of micellar casein particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 287, 85–93.
- Patton, S. (1955). Browning and associated changes in milk and its products, a review. *Journal of Dairy Science*, 38, 457–478.
- Pitkowski, A., Nicolai, T., & Durand, D. (2008). Scattering and turbidity study of the dissociation of casein by calcium chelation. *Biomacromolecules*, 9, 369–375.
- Rocklin, R., & Pohl, C. A. (1983). Determination of carbohydrates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Journal of Liquid Chromatography*, 1577–1590.
- Théron, L., Tournayre, P., Kondjoyan, N., Abouelkaram, S., Santé-Lhoutellier, V., & Berdagué, J. L. (2010). Analysis of volatile profile and identification of odour-active compounds in Bayonne ham processing. *Meat Science*, 85, 453–460.
- Tournayre, P., & Berdagué, J. L. (2003 and 2006). AcquiSniff® software: registered trademark no. 023166185 (APP reference: IDDN.FR.001.210006.001.R.P.2003.000.30000). <http://www4.inra.fr/cepia_eng/Food-quality/Softwares/AcquiSniff>.
- van Boekel, M. A. J. S. (1998). Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chemistry*, 62, 403–414.
- van Boekel, M. A. J. S. (2002). On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 139–159.
- Whitfield, F. B. (1992). Volatiles from interactions of Maillard reactions and lipids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 31, 1–58.
- Yaylayan, V., & Keyhani, A. (1999). Origin of 2,3-pentanedione and 2,3-butanedione in D-glucose/L-alanine Maillard model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3280–3284.

Identification of odour active compounds generated in a processed cheese-like model system

Emmanuel Bertrand^{1,2*}, Cyril Chevarin¹, Stéphane Portanguen¹, Pascal Tournayre¹, Saïd Abouelkaram¹, Jean-Louis Berdagué¹, Alain Kondjoyan¹ and Anne-Sophie Guillard²

¹ Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité de Recherche sur la Qualité des Produits Animaux (UR 370), F - 63122 Saint Genès Champanelle, France; ² Fromageries Bel D.R.A.G., 7 Bd de l'Industrie, F - 41100 Vendôme cedex, France; *email: emmanuel.bertrand@clermont.inra.fr

Context The elaboration of food and especially their thermal treatment lead to major changes in food rheology, colour, nutritional value, microbiological stability and flavour properties. In the case of processed cheese, the first four points are relatively well known and taken into account for its production. However there is still a need to integrate the developpement of flavour in the multi-objectives optimisation strategies. This work aims at the identification of odour-active compounds which are influenced by the heating conditions.

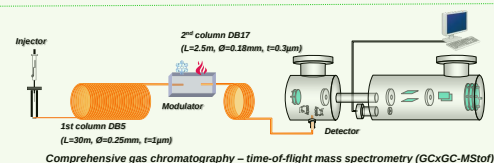
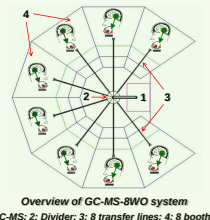
Material and Methods

Processed Cheese-like model formulation: Native Caseinate, skimmed milk powder, citric acid, emulsifying salts and sodium chloride were hydrated overnight in water at 4°C. Anhydrous milk fat was emulsified at 25°C for 10 min using a Janke and Kunkel T25 Ultra-Turrax (20500 rpm). The Cheese matrix was then stored at 4°C and cooked during its day of fabrication.

Cooking process: a 10 g sample was cooked in an hermetically closed cooking cell designed to heat uniformly as quickly as possible the cheese matrix without any volatile compound leak. This cell is subjected to a succession of thermal treatments such as boiling water and/or superheated steam. Details concerning the pilot plant can be found in [1].



Identification of odour active compounds: An eight-way gas chromatograph-olfactometer (GC-MS-8WO) allows to detect a maximum of odorants. It consists of a chromatograph coupled to a divider that distributes the volatile component outflow evenly and synchronously to eight sniffing ports located in separated booths. The GC-MS-8WO analytical conditions are described in detail in [2]. An independent GC-O-MS device was used to phase olfactory and mass spectrometry signals in order to propose structures for odour-active compounds.

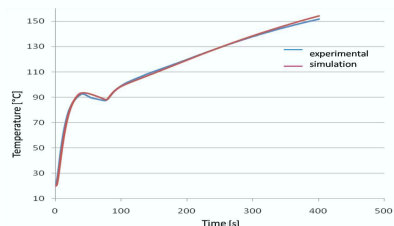


GCxGC-MS/MS analyses: A SPME Carboxen/PDMS, 75 µm fiber was equilibrated with the headspace of an 1g sample for 30 min at 30°C. A "LECO Pegasus IV" GC x GC-MS/MS instrument (LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA) was used to identify the volatiles compounds.

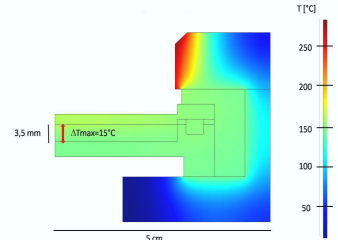
Results

Evaluation of the thermal treatment :

Comparison between experimental and simulated temperature profile at the center of the cheese matrix



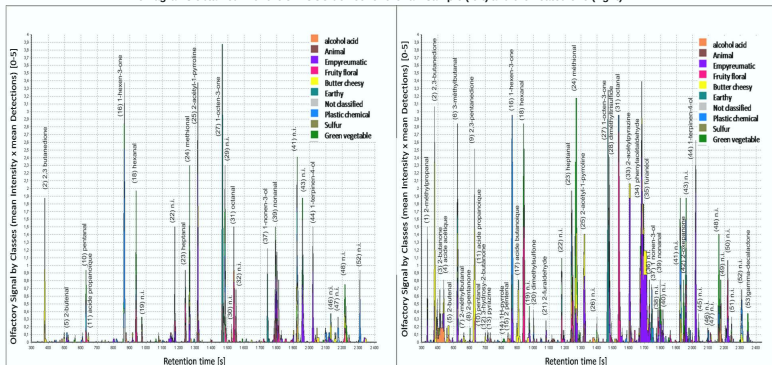
Overview of the Temperature profile inside the processed cheese sample at the end of the treatment



Both experimental measurements and numerical simulations demonstrate a good temperature reproducibility at the end of the treatment (less than +/- 5°C)

Evaluation of odour active compounds:

Aromagrams obtained with the 8W-GCO device for the raw sample (left) and the heated one (right)



Odour active compounds detected by GC-O and identified by GCxGC-MS/MS

Peak number	Retention time [s]	RI	Chemical name	Reliability of ID	Descriptors	t-test
1	330	552	propanal,2-methyl-	A	Empyreumatic	**
2	385	581	2,3-butanedione	A	Buttery	+
3	410	594	2-butanone	A	Lactic, Yoghourt	+
4	410	594	acetic acid	A	Vinegar	+
5	500	637	2-butanal	A	Cheesy	+
6	524	648	butanal,3-methyl-	A	Chocolate, Biscuit, Cheese	***
7	546	657	butanal,2-methyl-	A	Empyreumatic	***
8	602	681	2-pentanone	A	Milk	+
9	620	689	2,3-pentanedione	A	Butter, Yoghourt	**
10	629	693	pentanal	A	Grass, Orange	+
11	641	695	propionic acid	A	Cheese	+
12	676	712	3-hydroxy-2-butanone	A	Cheese	+
13	729	732	pyrazine	A	Coffee, Fish	+
14	798	760	1H-pyrazole	A	Peanut	+
15	853	777	2-pentenal	B	Rice	+
16	861	780	1-hexen-3-one	B	Plastic, Chemical	+
17	895	786	butanoic acid	A	Cheese, Vomit	+
18	933	804	hexanal	A	Green apple, Grass	***
19	970	817	n.l.	-	Sulfur	+
20	1001	827	dimethylsulfide	B	Sulfur	+
21	1047	842	2-furaldehyde	A	Empyreumatic	+
22	1074	851	n.l.	-	Animal, Ham	+
23	1249	902	heptanal	A	Citrus, Poultry	+
24	1260	910	methional	A	Potatoes	***
25	1309	926	2-acetyl-4-pyrrolone	B	Empyreumatic	***
26	1396	950	n.l.	-	Sulfur	+
27	1469	980	1-octen-3-one	A	Mushroom	+
28	1472	981	dimethylsulfide	B	Sulfur, Gas, Cabbage	+
29	1479	984	n.l.	-	Bread, Crust	+
30	1522	999	n.l.	-	Citrus	+
31	1531	1003	octanal	A	Citrus, Orange	+
32	1548	1009	n.l.	-	Animal	+
33	1596	1038	2-acetylpyrazine	C	Empyreumatic	+
34	1668	1065	phenylacetaldehyde	B	Rose	***
35	1679	1057	furalol	B	Tuffy, Empyreumatic	**
36	1726	1070	n.l.	-	Banana	+
37	1745	1077	1-nonen-3-ol	A	Mushroom	+
38	1770	1098	tetramethylpyrazine	C	Peanuts	+
39	1790	1107	nonanal	A	Cit Grass, Leather	+
40	1814	1117	n.l.	B	Bread, Crust	+
41	1919	1169	n.l.	-	Chemical	+
42	1940	1179	n.l.	-	Vegetal	+
43	1952	1185	n.l.	-	Plastic, Chemical	+
44	2013	1218	1-terpinen-4-ol	D	Dry ham, Empyreumatic	+
45	2039	1233	n.l.	-	Menthol	+
46	2087	1267	n.l.	-	Plastic, Chemical	+
47	2119	n.l.	-	-	Cheese	+
48	2156	n.l.	-	-	Vegetal	+
49	2159	n.l.	-	-	Plastic, Chemical	+
50	2186	n.l.	-	-	Menthol	+
51	2242	n.l.	-	-	Animal	+
52	2305	n.l.	-	-	Plastic, Chemical	+
53	2340	1450	γ-decalactone	D	Potatoes, Beefy	+

n.l.: not identified
A: mass spectrum, retention index and odour identical with those of an authentic sample
B: mass spectrum, retention index and odour in agreement with literature data
C: tentative identification by mass spectra
D: odour and retention index in agreement with literature data, no mass spectrum found

Conclusion and prospects Cooking and analytical strategies enabled to get samples with very different odour active profiles. In order to understand the thermal effect on the odour active fraction, these compounds as well as other non odorant key intermediates will now be kinetically measured during various time and temperature treatments.

(1) Kondjoyan, A. and Portanguen, S. (2008). Prediction of surface and "under surface" temperatures on poultry muscles and poultry skins subjected to jets of superheated steam. *Food Research International*, 41(1), 18-30.
(2) Berdagué, J.L., Tournayre, P., Cambou, S. 2007. Novel multi-gas chromatography-olfactometry device and software for the identification of odour-active compounds. *Journal of Chromatography A*, 1146 (1), 85-92



Emmanuel Bertrand

Composés formés au cours de la cuisson d'une matrice fromagère : contribution à la modélisation stœchio-cinétique multi-réponses de la réaction de Maillard

Résumé : Le fromage fondu est issu de la seconde transformation du lait. Sa fabrication implique le mélange, le chauffage et la texturation de produits laitiers (fromage, beurre et poudres de lait) et non laitiers (agents émulsifiants, acide citrique et chlorure de sodium). Le résultat est un produit homogène, généralement tartinable et à la durée de conservation longue, souvent supérieure à 6 mois. Au cours de la fabrication et du stockage, les réactions d'oxydation des lipides, de caramélisation et de Maillard forment des composés odorants dont certains sont potentiellement indésirables pour la flaveur du produit. Dans le cadre du projet ANR-06-PNRA-023 Réactial, une démarche méthodologique a été mise en place afin : (i) d'identifier les marqueurs réactionnels précurseurs ou responsables des défauts de flaveur observés, (ii) de suivre l'évolution de ces marqueurs au cours des traitements thermiques appliqués, (iii) d'établir un schéma réactionnel observable en vue (iv) de la modélisation et de la prédiction de l'évolution des marqueurs réactionnels et indirectement de l'apparition de défauts de flaveur. Ceci a nécessité la mise au point d'une formulation de matrice de fromage fondu modèle ainsi que l'élaboration d'une cellule de traitement thermique. Différents couplages de chromatographie en phase gazeuse à l'olfactométrie ont été utilisés afin d'identifier les composés odorants. La chromatographie bidimensionnelle systématique couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol a permis une semi-quantification des composés traces et ultra-traces tandis que les précurseurs ont été quantifiés par chromatographie liquide haute performance. Les données ainsi obtenues ont permis l'écriture d'un schéma réactionnel observable qui a donné lieu à une modélisation stœchio-cinétique multi-réponses. Un ajustement des données expérimentales par le modèle a pu être réalisé malgré une quantification partielle des différents constituants.

Mots clés : fromage fondu, réaction de Maillard, oxydation lipidique, composés volatils néoformés, GC-MS/O, GC-GC-MS/O, VIDEO-Sniff, GCxGC-*tof*MS, HPLC

Heat induced compounds in a model cheese matrix : a contribution to the multi-response modeling of the Maillard reaction

Abstract : Processed cheese derives from a secondary milk processing step that involves mixing and heating dairy (cheese, butter and milk powders) and non-dairy products (emulsifiers). This processing yields a homogeneous product, usually spreadable, with a shelf-life often longer than 6 months. During processing and storage, lipid oxidation, caramelization and Maillard reactions occur and produce odour-active compounds. Some of them are potentially involved in the development of odour defects. As part of the ANR-06-PNRA-023 Ri₂ ½actial project, a methodological approach was used in order to (i) identify key compounds responsible for the flavor defects observed, (ii) monitor the evolution of these markers during the heat treatment applied to the cheese matrix, (iii) establish an observable reaction scheme, (iv) model and predict the evolution of these compounds during thermal operations. To do this, a model cheese and its cooking cell were elaborated. Various couplings of gas chromatography with olfactometry were used to identify odorous compounds. Two-dimensional comprehensive chromatography allowed a semi-quantitation of trace and ultra-trace compounds, while precursors were quantitated by high performance liquid chromatography. An observable reaction scheme was extracted from these data and make the multi-response modelling step possible despite a partial quantitation of the volatile compounds.

Keywords : processed cheese, Maillard reaction, lipid oxidation, newly formed volatiles, GC-MS/O, GC-GC-MS/O, VIDEO-Sniff, GCxGC-*tof*MS, HPLC