

Réhydratation des protéines laitières dans un milieu complexe : influence de l'état d'hydratation sur les propriétés texturales des gels acides

Marie-Céleste Karam

▶ **To cite this version:**

Marie-Céleste Karam. Réhydratation des protéines laitières dans un milieu complexe : influence de l'état d'hydratation sur les propriétés texturales des gels acides. Alimentation et Nutrition. Université de Lorraine, 2013. Français. NNT : 2013LORR0132 . tel-01750125

HAL Id: tel-01750125
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750125

Submitted on 29 Mar 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.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Thèse Présentée en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Réhydratation des protéines laitières dans un milieu complexe : influence de l'état d'hydratation sur les propriétés texturales des gels acides

Marie-Céleste Karam

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

ECOLE DOCTORALE RESSOURCES PROCEDES PRODUITS ENVIRONNEMENT

Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules - LIBio

Soutenue publiquement le 13 septembre 2013 devant la commission d'examen

Rapporteurs :

Mme Sylvie MARCHESSEAU	Professeur, Université Montpellier II
M. Romain JEANTET	Professeur, Agrocampus Ouest

Directeurs de thèse :

M. Joël SCHER	Professeur, Université de Lorraine
M. Chadi HOSRI	Maître de Conférences, Université Saint-Esprit de Kaslik

Membres invités :

Mme Claire GAIANI	Maître de Conférences, HDR, Université de Lorraine
Mme Reine BARBAR	Maître de Conférences, Université Saint-Esprit de Kaslik

Remerciements

Ce travail de thèse a bénéficié d'une co-direction entre l'Université de Lorraine (France) et l'Université Saint-Esprit de Kaslik (Liban).

Je tiens à remercier tout d'abord les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail.

Je remercie particulièrement les Professeurs Sylvie Marchesseau et Romain Jeantet pour avoir accepté d'analyser ce travail en tant que rapporteurs ainsi que l'ensemble des examinateurs.

Je tiens à adresser également mes remerciements au Pr. Joël Scher pour m'avoir accueillie au sein de son équipe au Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules durant ces trois années. Je vous remercie également pour avoir accepté d'assurer l'encadrement de cette thèse, ainsi que pour la confiance et les opportunités qui m'ont été données au cours de ce travail, sans oublier les judicieux conseils qui ont ponctué ce parcours.

J'exprime toute ma reconnaissance et mon plus profond respect au Dr. Claire Gaiani pour m'avoir fait bénéficier de ses nombreuses compétences ainsi que pour son soutien et ses encouragements, encore merci à vous Madame.

Je remercie également le Dr. Chadi Hosri pour son encadrement en dépit de la distance. Merci aussi pour la confiance qui m'a été accordée, ainsi que pour votre soutien et les efforts qui ont permis à ce travail de voir le jour.

J'adresse toute ma gratitude à Madame Carole Jeandel, technicienne du LIBio, qui a un cœur d'or et pour toute son aide et sa disponibilité dans l'utilisation des appareils.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes du laboratoire qui auront partagé mon quotidien au cours de ces 3 années passées dans une ambiance chaleureuse. Mes pensées vont en particulier à Ingrid Murrieta Pazos et à Raza Hussain qui m'ont initiée au « monde expérimental », m'aidant ainsi à faire mes premiers pas parmi tous ces appareils… Je tiens également à exprimer ma gratitude à Ingrid pour m'avoir aidée à mon installation lors de ma première année à Nancy, et qui m'a fait aussi partager son monde et ses amis.

Je remercie aussi très chaleureusement Jennifer, Charlotte, Yoanna, Citlali, Petya, Laurette, Benoush, Chancelle, Amira, Yelena, Vanessa, Mona, Nabila, Nadia, Ismael, Magid, Ghazi, Emmanuel, Mahmoud, Mohammed ainsi que tous les autres qui ne figureraient pas dans cette liste (mais qui est tellement longue) et qui se reconnaitront de toute façon, pour leur très grande sympathie et pour avoir rendue à chaque fois mes séjours très agréables au LIBio… A vous tous, je vous souhaite également une très belle continuation et beaucoup de réussite dans tous vos projets !!

Finalement, je n'aurai jamais de cesse de remercier mes parents, Georges et Suzanne Karam, qui ont été et demeureront toujours la clé de ma motivation, pour leur soutien perpétuel en toutes circonstances, sans vous, ce travail n'aurait jamais pu voir le jour… Merci simplement pour tout… c'est pour cela que je vous dédie tout particulièrement cette thèse, en espérant que vous serez toujours fiers de moi.

Enfin, je tiens à remercier très chaleureusement mon mari, Didier, qui, grâce à son aide et à son soutien précieux m'a également permis de mener à bien ce travail. A lui aussi je dédie ce travail, merci d'être là, tout simplement…

LISTE DES COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

Articles à comité de lecture international :

- **M.C. Karam**, C. Gaiani, R. Barbar, C. Hosri, J. Scher. Effect of dairy powder rehydration state on gel formation during yogurt process. (2012), *Journal of Dairy Research* 79(3), p. 280-286

- **M.C. Karam,** C. Gaiani, C. Hosri, J. Burgain, J. Scher. Effect of dairy powders fortification on yogurt textural and sensorial properties: a review, *Journal of Dairy Research* (*accepté*)

- **M.C. Karam**, C. Gaiani, C. Hosri, J. Scher. Textural properties of acid milk gels: effects of dairy proteins powders rehydration state, *International Journal of Dairy Technology* (*soumis*)

- **M.C. Karam**, C. Gaiani, C. Hosri, R. Hussain, J.Burgain, R. Barbar, J. Scher. Influence of whey protein isolates hydration state and denaturation on acid gel formation, *(en préparation)*

- R. Hussain, C. Gaiani, R. Shukat, **M.C. Karam,** J. Scher. Multiscale characterization of whey protein isolates under high NaCl environments. (2012), *Milchwissenschaft* 67(3), p.270-274.

- C. Gaiaini, P. Boyanova, R. Hussain, I. Murrieta Pazos, **M.C. Karam**, J. Burgain, J. Scher. Morphological descriptors and colour as a tool to better understand rehydration properties of dairy powder. (2011), *International Dairy Journal* 21(7), *p.462-469.*

Presse académique :

- **M.C. Karam**, C. Gaiani, R. Barbar, C. Hosri, R. Hussain, J. Burgain, J. Scher, 2012, Influence de l'état de réhydratation des poudres de lait sur la gélification au cours du processus de fabrication du yaourt, *Ecole Doctorale Ressources Procédés Produits Environnement, Nancy France, 7p.*

COMMUNICATIONS AFFICHEES

- **M.C. Karam**, C. Gaiani, R. Barbar, C. Hosri,J. Scher. Effect of dairy powder rehydration state on gel formation during yogurt process.
  IDF World Dairy Summit 2011 "Summilk»,Parma Italie, Octobre 2011.
  Séminaire RP2E, Nancy France, Janvier 2012.

- **M.C. Karam**, C. Gaiani, C. Hosri, R. Hussain, J. Burgain, R. Barbar, J. Scher. Influence of whey proteins hydration state and denaturation on acid gel formation.
  ACIA-Journées Agoriales, Paris France, Octobre 2012.
  Séminaire de LAU, Lebanese American University, Jbeil Liban, Avril 2013.

COMMUNICATIONS ORALES

- **M.C. Karam**, C. Gaiani, C. Hosri, R. Hussain, J. Burgain, R. Barbar, J. Scher. Influence of whey protein isolates hydration state and denaturation on acid induced gelation. *5th International Symposium on spray dried dairy products***,** Saint-Malo France, Juin 2012.

- **M.C. Karam**, C. Gaiani, C. Hosri, R. Hussain, J. Burgain, R. Barbar, J. Scher. Influence de l'état de réhydratation et de dénaturation des protéines solubles sur les propriétés rhéologiques des gels acides. *ACIA-Journées Agoriales,* Paris France, Octobre 2012.

Table des matières

Introduction Générale 15

Synthèse bibliographique 18

1. La composition du lait 18

1.1. Généralités 18

1.2. Les lipides 19

1.3. Les glucides : cas du lactose 20

1.4. Les protéines laitières 20

1.5. Les micronutriments 25

2. Influence des modifications physico-chimiques du lait sur les protéines laitières 25

2.1. Le traitement thermique 26

2.2. L'acidification 27

2.3. La réfrigération 27

2.4. L'ajout de sels 28

2.5. L'ajout de présure 28

3. Les différents ingrédients protéiques laitiers déshydratés 28

3.1. Les ingrédients protéiques laitiers en poudre dérivés du fractionnement du lait écrémé 30

3.2. Les ingrédients protéiques laitiers en poudre dérivés du fractionnement du lactosérum 33

3.3. Les ingrédients protéiques laitiers en poudre dérivés du babeurre 34

4. Les étapes de réhydratation des ingrédients protéiques en poudre 35

4.1. L'étape du mouillage ou mouillabilité d'une poudre laitière 35

4.2. L'étape de gonflement d'une poudre laitière 36

4.3. L'étape de dispersion d'une poudre laitière 36

4.4. La solubilité d'une poudre laitière 36

5. Les facteurs influençant les étapes de réhydratation d'une poudre laitière 37

6. Les différentes étapes de réhydratation des protéines laitières dans un milieu simple : l'eau 39

6.1. Les différentes étapes de réhydratation des caséines micellaires dans de l'eau 39

6.2. Les différentes étapes de réhydratation des protéines solubles dans de l'eau 43

7. Les différents comportements de réhydratation des deux principales protéines laitières dans un milieu simple : l'eau 44

8. La réhydratation des deux principales protéines laitières dans un milieu ionique 45
8.1. La réhydratation des caséines micellaires dans des milieux ioniques 45
8.2. La réhydratation des protéines solubles dans des milieux ioniques 46
9. Influence de l'ajout des différentes protéines laitières sur les propriétés texturales et sensorielles des gels acides 48
9.1. Introduction 50
9.2. Formation of yogurt gels 53
9.3. Textural properties of yogurt gels 55
9.4. Effect of dairy powders addition on yogurt textural properties 56
9.5. Addition of other dairy ingredients and protein blends 65
9.6. Conclusion 65
10. Synthèse et positionnement de l'étude 66
Matériels et méthodes 68
1. Les matières premières utilisées tout au long de cette étude 68
2. Les méthodes 68
2.1. Caractérisation physico-chimique des poudres 68
2.2. Caractérisation physique de la taille des particules 70
2.3. Détermination de la solubilité des poudres de caséines micellaires 70
2.4. Préparation du mix laitier et formation des gels acides 70
2.5. Cinétique de réhydratation des protéines laitières dans un milieu complexe : le lait ……72
2.6. Caractérisation structurale des gels acides 73
2.7. Caractérisation physique des gels acides 76
2.8. Analyses statistiques 78
Résultats et discussion 80
1. Influence de l'état de réhydratation des poudres de lait sur la gélification au cours du processus de fabrication du yaourt 80
1.1. Introduction 81
1.2. Materials and methods 83
1.3. Results and discussion 85
1.4. Conclusion 92
2. Influence de l'état de réhydratation et de dénaturation des protéines solubles sur le processus de gélification 93
2.1. Introduction 94

2.2. Materials and methods 96
2.3. Results and discussion 98
2.4. Conclusion 105
3. Influence de l'état de réhydratation de poudres de lait sur les propriétés texturales de gels acides laitiers 106
3.1. Introduction 107
3.2. Materials and methods 108
3.3. Results and discussion 111
3.4. Conclusion 119
Conclusion générale et perspectives 120
Références 124
Annexes……..……141

Liste des figures

Figure 1 : Modèle de « structure ouverte » de la micelle de caséine ……..... 22

Figure 2 : Structure « en éponge » de la micelle de caséine sous compression osmotique….23

Figure 3 : Structures tridimensionnelles de la β-lactoglobuline bovine et de l'α-lactalbumine …….. 24

Figure 4 : Représentation schématique des différents ingrédients protéiques laitiers en poudre obtenus à partir du fractionnement du lait et de ses co-produits…….. 29

Figure 5 : Profil de viscosité et données microscopiques obtenus lors de la réhydratation d'une poudre de caséine micellaire granulée dans de l'eau à 24°C……..... 40

Figure 6 : Profils de turbidité et de conductivité obtenus lors de la réhydratation d'une poudre de caséine micellaire granulée dans de l'eau à 24°C……....41

Figure 7 : Profil de viscosité et données granulométriques obtenus lors de la réhydratation d'une poudre de caséine micellaire dans de l'eau à 24°C. …….. 42

Figure 8 : Profils de turbidité obtenus lors de la réhydratation de protéines solubles non granulée (A) et granulées (B) dans de l'eau à 24°C…… 43

Figure 9 : Profils de turbidité (NTU, unité de turbidité néphélométrique) obtenus au cours de la réhydratation de caséines micellaires natives (5 %) à 24°C durant 1000 min dans différents milieux ioniques……...…… 46

Figure 10 : Profils de turbidité (NTU, unité de turbidité néphélométrique) obtenus au cours de la réhydratation d'isolat de protéines natives de lactosérum (5 %) à 24°C durant 1000 min dans différents milieux ioniques…….…… 47

Figure 11 : Main processing steps of the two major yogurt types: set and stirred yogurt…..52

Figure 12 : Typical pH profiles during the fermentation process of yogurt……...…… 54

Figure 13 : Microstructure of yogurt prepared with milk fortified with skim milk powder (a), sodium caseinates (b), whey protein concentrates (c) and calcium caseinates (d). …….. ..57

Figure 14 : Schéma des principaux objectifs de la thèse……..….. 67

Figure 15 : Effet du traitement thermique sur la microstructure d'un gel acide de type yaourt……..…. 71

Figure 16 : Granulomètre QICPIC (A) avec système de dispersion LIXELL (B)…….…… 72

Figure 17 : Principe de fonctionnement du QICPIC…….……..… 73

Figure 18 : Principe de fonctionnement du Lloyd (A) et modèle utilisé - LF Plus Lloyd Instruments - (B)…….……..74

Figure 19 : Rhéomètre rotatif Kinexus (Malvern Instruments, Orsay, France)…….……..…75

Figure 20 : Fresh and aged micellar casein (respectively white and black squares) rehydration profiles obtained with the Qicpic equipment in milk at 20 °C…….…… 86

Figure 21 : Example of in situ microscopy images obtained during fresh (1) and aged (2) micellar casein powder rehydration in milk media (A: few seconds, B: 5 min, C: 180 min, D: 300 min, E: 480 min, F: 900 min and G: 1440 min)…… 88

Figure 22 : Onset of gelation determination (a) and storage modulus (b) at the end of acidification after variable rehydration time for fresh and aged micellar casein powder……...89

Figure 23 : Micellar casein powder solubility in milk base at variable rehydration times in minutes……..90

Figure 24 : Normalized curves of rehydration of both powders (native and denatured whey protein powder) into milk obtained with the Qicpic apparatus at 20°C……..…..…. 100

Figure 25 : Images of mixes with native (a) and denatured (b) whey protein isolates after few seconds (A), 5 min (B), 180 min (C), 300 min (D), 480 min (E), 900 min (F) and 1440 min (G) of rehydration……...102

Figure 26 : Firmness (N) of yogurt samples prepared with WPI and MC for the four different rehydration times…… 114

Figure 27 : Water holding capacity (A) and syneresis values (B) (in %) of WPI and MC-fortified yogurt mixes after the four rehydration times…….. 115

Figure 28 : Grains formation observation (fluorescence microscopy) in yogurt mixes fortified with: MC (a, b, c, d) or WPI (e, f, g, h) after the different rehydration times of 5, 120, 240 and 1440 minutes respectively……..…… 116

Figure 29 : SEM Images of microstructure of yogurt mixes fortified with: MC (a, b, c, d) and WPI (e, f, g, h) after the different rehydration times of 5, 120, 240 and 1440 minutes respectively……..……..… 118

Figure 30 : Les différents procédés de filtration membranaires…….….. 147

Figure 31: Principe du séchage sur double cylindre…….…… 149

Figure 32 : Principe de fonctionnement d'une tour d'atomisation « trois temps »……...150

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition chimique moyenne du lait de vache……19

Tableau 2 : Composition protéique moyenne du lait……...21

Tableau 3 : Composition caractéristique des concentrés de protéines totales de lait (MPC) en pourcentage sur poudre…….30

Tableau 4 : Composition moyenne (g .100g^{-1}) des caséines et caséinates……..32

Tableau 5 : Composition moyenne (g.100g^{-1}) des principaux dérivés de protéines solubles..34

Table 6 : Summary of the three most common dairy powders added in yogurt formulation and their main influences on products textural properties.……..64

Table 7 : Chemical composition (g/100 g) of the powders used: skim milk powder, fresh and old micellar casein powders……. 85

Table 8: Chemical composition (g.100g^{-1}) of the used powders: skim milk powder, whey protein powders (native and denatured). ……. 99

Table 9: Rheological properties of the obtained acid gels after different rehydration time for both powders. …… 103

Table 10: Chemical composition (g.100g^{-1}) of the powders used (mean of triplicates with corresponding standard deviation)……..112

Table 11 : Complex shear stress and graininess values for WPI and MC-enriched yogurts samples after different rehydration times (mean of triplicates with corresponding standard deviation)……....114

Nomenclature

ADPI : american dry product institute

α-La : alpha lactalbumine

β-Lg : beta-lactoglobuline

C : carbone

$CaCl_2$: chlorure de calcium

CaCn : caséinate de calcium

GMP : glycomacropeptide

CGP : caséinoglycopeptide

CCP : phosphate de calcium colloïdal

ES : extrait sec

ESV : évaporation sous vide

FIL : fédération internationale laitière

G' : module élastique

G'' : module visqueux

GDL : Glucono-Delta-Lactone

ID : indice de dispersibilité

KCn : potassium caseinate (caséinate de potassium)

***L. bulgaricus* :** Lactobacillus *bulgaricus*

LS : lactosérum

LVER : linear visco elasticity region

MAT : matière azotée totale

MC : micellar casein (caséine micellaire)

MCC : micellar casein concentrate

MgCn : magnesium caseinates (caséinate de magnésium)

MPC : milk protein concentrate (concentrés de protéines totales de lait)

MPI : milk protein isolates (isolats de protéines totales de lait)

NaCl : chlorure de sodium

NaCn : sodium caseinates (caséinate de sodium)

NF : nanofiltration

PPCN : phosphocaséinate natif

RMN : résonance magnétique nucléaire

***S. thermophilus* :** Streptococcus *thermophilus*

SMP : skim milk powder (poudre de lait écrémé)

UF : ultrafiltration

WP : whey protein (protéines solubles ou solubles)

WPC : whey protein concentrate (concentrés de protéines de lactosérum ou concentrés de protéines sériques)

WPH : whey protein hydrolysates (hydrolysats de protéines de lactosérum)

WPI : whey protein isolates (isolats de protéines de lactosérum ou isolats de protéines sériques)

µg : microgramme

Introduction Générale

Le lait, produit biologique d'origine animale, constitue une denrée de base dans l'alimentation humaine, possédant à la fois une grande valeur nutritionnelle et un caractère très périssable. Sa transformation, à l'origine accidentelle, en un caillé acide permit à l'homme de prolonger sa conservation. Le procédé de fermentation lactique se perpétua alors à travers les siècles, conduisant également à l'élargissement progressif du panel de lait fermentés dont beaucoup sont, de nos jours, fabriqués industriellement. Parmi les processus de coagulation les plus utilisés actuellement, l'on peut citer la coagulation : par acidification biologique (résultant directement de l'activité métabolique de bactéries lactiques), par emprésurage (ajout d'un coagulant, la présure, constituée d'enzymes d'origine animale, végétale ou microbienne avec une action optimale comprise entre 30 et 42 °C), par acidification chimique (utilisation d'un additif alimentaire chimique tel que la Glucono-delta-lactone ou GDL) ou encore par des méthodes physiques comme le chauffage (St-Gelais & Tirard-Collet, 2002 ; Singh, 2004).

L'exemple probablement le plus populaire du produit issu de la coagulation lactique est le yaourt (Sodini & Béal, 2003). Sa consommation a connu un essor considérable ces dernières décennies. En 2005, la production en France s'élevait ainsi à 1,309 millions de tonnes avec plus de 21 kg de yaourt consommé par habitant (Source : Centre National Interprofessionnel de l'économie Laitière CNIEL, 2005). La fabrication industrielle de ce produit comporte plusieurs étapes parmi lesquelles l'enrichissement en protéines du lait de base qui s'avère indispensable pour former un yaourt de bonne qualité texturale, consistant et exempt de synérèse (Tamime & Robinson, 2000 ; Sodini & Béal, 2003 ; Damin *et al.*, 2009 ; Peng *et al.*, 2009).

Historiquement, le lait était longuement chauffé afin de permettre une évaporation partielle et une réduction d'environ aux deux tiers du volume de liquide initial, conduisant artificiellement à l'augmentation du taux de protéines laitières (Sodini & Béal, 2003). De nos jours, les dernières avancées technologiques des méthodes de séparation sur membrane

(microfiltration, ultrafiltration, nanofiltration, osmose inverse) ainsi que des méthodes de séchage (par atomisation ou par utilisation de cylindres chauffants) permettent l'obtention d'une grande variété de bases protéiques laitières telles que les concentrés de protéines de lactosérum, les concentrés en caséines micellaires, les concentrés et isolats de protéines solubles et autres caséinates (Fauquant *et al.*, 1988 ; Trouvé *et al.,* 1991 ; Schuck *et al.,* 1994 a,b ; Jeantet *et al.,* 1996 ; Schuck, 1999). L'ajout de ces divers concentrés protéiques (ou poudres de lait) dans le mix laitier à des fins de fortification et d'enrichissement en protéines connait un intérêt croissant du fait, notamment, de la bonne qualité texturale des produits finis, tout en limitant grandement l'expulsion du sérum (la partie liquide issue de la coagulation du lait) (Sodini & Béal, 2003 ; Tamime & Robinson, 2007). Cependant, la réhydratation complète des poudres ajoutées dans le lait de base est cruciale pour garantir aux gels acides comme le yaourt une structure lisse et éviter la formation de grumeaux, ces derniers constituant un défaut textural redouté (Sodini & Béal, 2003). En effet, la bonne qualité texturale du yaourt apparaît comme un facteur déterminant dans l'acceptation du produit fini par les consommateurs (Soukoulis *et al.*, 2007).

Jusqu'à présent, la réhydratation des protéines laitières a été essentiellement abordée dans un milieu simple tel que l'eau (Gaiani, 2006) et dans un milieu ionique (Schuck *et al.*, 2002 ; Hussain, 2012). Il s'est avéré que les caséines micellaires (protéines majoritaires du lait impliquées dans sa coagulation) se dispersent difficilement dans l'eau, ainsi que dans un environnement ionique contenant du chlorure de calcium ou du chlorure de sodium à faible concentration, rendant le processus de réhydratation des poudres laitières extrêmement long (Schuck *et al.,* 2002 ; Gaiani, 2006 ; Hussain, 2012). Quant aux protéines solubles dérivées du lait, leur réhydratation dans ces différents milieux semble presque instantanée, accompagnée cependant par la formation de grumeaux lors de l'étape de mouillage (Gaiani *et al.,* 2007 ; Hussain *et al.,* 2011). En outre, divers paramètres concernant la dénaturation thermique des protéines solubles ou la durée de conservation des caséines micellaires conduiraient à la détérioration des propriétés de réhydratation des poudres (Gaiani, 2006 ; Mimouni *et al.,* 2010).

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse. Deux volets d'étude ont été définis, consistant à : i) élucider le processus de réhydratation des deux protéines laitières majeures que sont les caséines micellaires et les protéines solubles (protéines solubles) dans un milieu complexe et opaque tel que le lait, ii) appréhender l'influence de l'état d'hydratation

de ces ingrédients laitiers sur les propriétés rhéologiques, texturales, microstructurales et physiques des gels acides.

Pour répondre à ces objectifs, le manuscrit sera structuré en une première partie consacrée à l'état des connaissances. En premier lieu, la composition du milieu de réhydratation, le lait, sera abordée. Dans un deuxième temps, les principaux ingrédients protéiques constituant les poudres laitières et obtenus à partir du fractionnement du lait seront détaillés. Par la suite, les différentes étapes de réhydratation des deux protéines majoritaires du lait (caséines micellaires et protéines sériques) dans des milieux simples (eau) et ioniques (contenant principalement du chlorure de calcium ou du chlorure de sodium) seront présentées. Enfin, l'état de l'art sur l'effet de l'ajout des ingrédients laitiers sur les propriétés texturales et sensorielles des gels acides (par analogie avec le yaourt) sera réalisé.

La seconde partie du manuscrit traitera des matériels et méthodes mis en œuvre pour atteindre les objectifs fixés. La caractérisation physico-chimique des poudres laitières, le protocole de détermination de la cinétique de réhydratation des protéines laitières ainsi que celui portant sur la caractérisation des propriétés rhéologiques, physiques et microstructurales des gels acides seront décrits.

Les résultats des principaux travaux expérimentaux effectués au cours de cette thèse seront exposés sous forme de publications dans la troisième et dernière partie de ce manuscrit. Ils comprennent tout d'abord le processus de réhydratation des protéines laitières dans un milieu opaque et complexe : le lait. Dans un second temps, l'ensemble des travaux ayant trait à l'influence de l'état d'hydratation des protéines de lait sur les propriétés rhéologiques et texturales des gels acides sera intégré sous la forme de publications supplémentaires et discutés.

Enfin, le manuscrit s'achèvera par une conclusion générale permettant de faire le point sur les résultats obtenus et les perspectives engendrées à l'issue de ce travail.

Synthèse bibliographique

1. La composition du lait

1.1. Généralités

Le décret du 25 mars 1924 stipule que la définition «lait», sans indication de l'espèce animale de provenance, est généralement réservée au lait de vache. Cette définition sera également adoptée au cours de cette synthèse bibliographique. Le lait peut être défini comme le produit résultant de la sécrétion des glandes mammaires d'un mammifère femelle bien portant, bien nourri et non surmené (Boudier *et al.,* 1999). C'est un mélange complexe et instable, composé à 90 % d'eau et contenant tous les groupes de nutriments : les matières grasses ou lipides, les glucides (majoritairement représentés par le lactose), les protéines, les minéraux et les vitamines. Ces différents nutriments se répartissent en plusieurs phases :

- une phase aqueuse ou phase dispersante continue, comprenant les glucides du lait, les protéines solubles, les minéraux et les vitamines hydrosolubles ;
- une phase colloïdale constituée de caséines sous forme micellaire associées à des minéraux (ex : phosphocaséinate de calcium - $(PO_4)_2Ca_3$) ;
- une phase émulsionnée de matière grasse sous forme de globules gras pouvant aller de 1 à 20 µm de diamètre, leur taille moyenne étant de 3,5 µm de diamètre (Walstra, 1975 ; Schuck, 1999 ; Snappe *et al.,* 2010).

A titre d’exemple, la composition moyenne d'un litre de lait est reportée dans le tableau 1 :

Constituant	Teneur (g/l)
Eau	878
Glucides (Lactose)	48
Matières grasses	39
Matières azotées • caséines • protéines sériques • azote non protéique	32 26 5 1
Minéraux • calcium • phosphore • potassium	7 1.2 0.9 1.4
Oligo-éléments	Traces

Tableau 1: Composition chimique moyenne du lait de vache (Tamime & Robinson, 2000)

1.2. Les lipides

De tous les constituants du lait, les lipides sont ceux qui, quantitativement, varient le plus. Les taux moyens habituellement reportés dans la littérature sont de l’ordre de 35 g/l. Les lipides du lait sont constitués à 96-98 % (p/p) de triglycérides, à 0,2-1,5 % (p/p) de diglycérides, de traces de monoglycérides (0,1 % p/p), à 0,2-1 % (p/p) de phospholipides polaires (Courtet Leymarios, 2010) et enfin à 0,5 % (p/p) de substances liposolubles telles que le cholestérol (0,31 % p/p) et les vitamines liposolubles (Christie, 1983 ; Snappe *et al.*, 2010). D’un point de vue structural, les acides gras constituant les triglycérides sont très variés. On distingue ainsi :

- les acides gras saturés, à nombre pair de carbone qui dominent et représentent à eux seuls près de la moitié des acides gras contenus dans le lait ;
- les acides gras monoinsaturés, le plus abondant étant l'acide oléique qui représente 25 à 30 % (p/p) de la totalité des acides gras. L'acide linoléique (C18:2) quant à lui n’est retrouvé qu'à raison de 2 % (p/p)
- les acides gras polyinsaturés qui n'existent qu'en faibles proportions comparativement aux autres constituants de la matière grasse (<8 % p/p). Il en découle que les acides gras essentiels sont peu représentés dans le lait de vache (de l’ordre de 3 % p/p)

(Courtet Leymarios, 2010). La matière grasse est contenue dans des globules gras ou gouttelettes lipidiques enrobées d'une enveloppe protectrice (Danthine *et al.*, 2000). Leur exocytose depuis les cellules épithéliales vers la lumière de la glande mammaire entraîne la formation d'une membrane constituée essentiellement par des protéines glycolysées (Mather, 2000).

Il est à préciser qu'au cours des traitements comme par exemple lors de l'homogénéisation du lait, la matière grasse va être fragmentée permettant ainsi la stabilisation de l'émulsion lipidique (Gaiani, 2006).

1.3. Les glucides : cas du lactose

Le lactose, disaccharide composé de glucose et de galactose, est le sucre majoritaire du lait ainsi que le constituant essentiel de la matière sèche (Gaiani, 2006 ; Snappe *et al.*, 2010). Il se retrouve sous deux formes isomères en équilibre dans le lait : le lactose hydraté ou α-lactose et le lactose anhydride ou β-lactose. Ces deux formes diffèrent par la configuration stérique de l'atome d'hydrogène et du groupe hydroxyle OH au niveau du carbone C_1 du glucose. Leurs proportions relatives à température ambiante sont de 37 et de 63 % (p/p) pour les formes α et β respectivement (Gaiani, 2006). Le lactose est à l'origine de la réaction de Maillard (appelé également « brunissement non enzymatique ») qui aurait lieu entre les protéines et les sucres réducteurs, conduisant à des processus de condensation et de dégradation ainsi qu'à la formation de composés carbonylés réactifs. Cette réaction est susceptible d'altérer les qualités nutritionnelles (pertes en acides aminés de type lysine et tryptophane, diminution de la digestibilité du lactose et des protéines), organoleptiques (jaunissement des poudres et défaut de goût, *i.e.* arôme de « cuit ») et fonctionnelles des poudres laitières (notamment l'altération des propriétés de réhydratation) (O'Brien *et al.*, 1989 ; Zbikowski *et al.*, 1993 ; O'Brien, 1995 ; Stapelfeldt *et al.*, 1997).

1.4. Les protéines laitières

Les protéines laitières constituent la majeure partie (95 % p/p) des composés azotés du lait (Snappe *et al.*, 2010). Elles sont présentes sous deux phases différentes : d'une part une phase micellaire composée de particules en suspension, les micelles de caséines, et d'autre part une phase constituée de polymères protéiques hydrophiles, les protéines sériques ou

protéines solubles (Snappe *et al.*, 2010). La composition en protéines du lait est présentée dans le tableau 2.

Protéines	Concentration (g/l)
caséines α_{S1}	10,0
caséines α_{S2}	2,6
caséines β	9,3
caséines κ	3,7
caséines Y	0,8
Lactoglobuline β	3,2
Lactalbumine α	1,2
Immunoglobuline	0,8
protéose-peptones	0,8
Albumine du sérum	0,4
Membranes globules gras	0,4
Lactoferrine	0,1
Transferrine	0,1

Tableau 2 : Composition protéique moyenne du lait d'après Walstra & Jenness (1984)

1.4.1. Les caséines micellaires

Les caséines représentent 80 % (p/p) des protéines totales du lait. Il s'agit de complexes organiques formés à 92 % (p/p) par de petites protéines caséiniques : α_{S1}, α_{S2}, β, et κ (Farrell *et al.*, 2006 ; Horne, 2006). Leurs poids moléculaires varient de 19 kDa pour la caséine κ à 23 kDa pour les caséines α_{S1} et β et jusqu'à 25 kDa pour la caséine α_{S2} (Swaisgood, 1982 ; Cheftel *et al.*, 1985). Leur proportion relative est de l'ordre de 4 :1 :4 :1 pour la α_{S1}, α_{S2}, β, et κ respectivement (Liu & Guo, 2008). La fraction restante, constituant les caséines micellaires (≈ 8 % p/p), est composée de minéraux avec essentiellement du phosphate de calcium et en quantité moindre des ions citrate et magnésium (Alais, 1984).

L'agencement et la répartition des différents constituants de la micelle de caséine demeurent non élucidés. Parmi les divers modèles de structure proposés au cours des

cinquante dernières années, deux sont devenus majoritairement répandus (Walstra, 1999 ; Horne, 2006).

Selon un premier modèle, la micelle de caséines résulterait d'associations hydrophobes et de liaisons hydrogène entre les différentes caséines maintenues rigides grâce au phosphate de calcium colloïdal. La caséine κ serait répartie en paquets hétérogènes à la surface des micelles et associée à ces dernières par sa partie N-terminale hydrophobe ; sa partie C-terminale hydrophile formant des protubérances projetées dans la phase aqueuse et conférant ainsi un aspect « chevelu » à la micelle (Walstra & Jenness, 1984 ; Holt, 1992 ; Holt & Horne, 1996 ; de Kruif & Zhulina, 1996 ; de Kruif, 1999 ; de Kruif *et al.*, 2012). La figure 1 représente le modèle de « structure ouverte » de la micelle de caséines d'après Horne (1998).

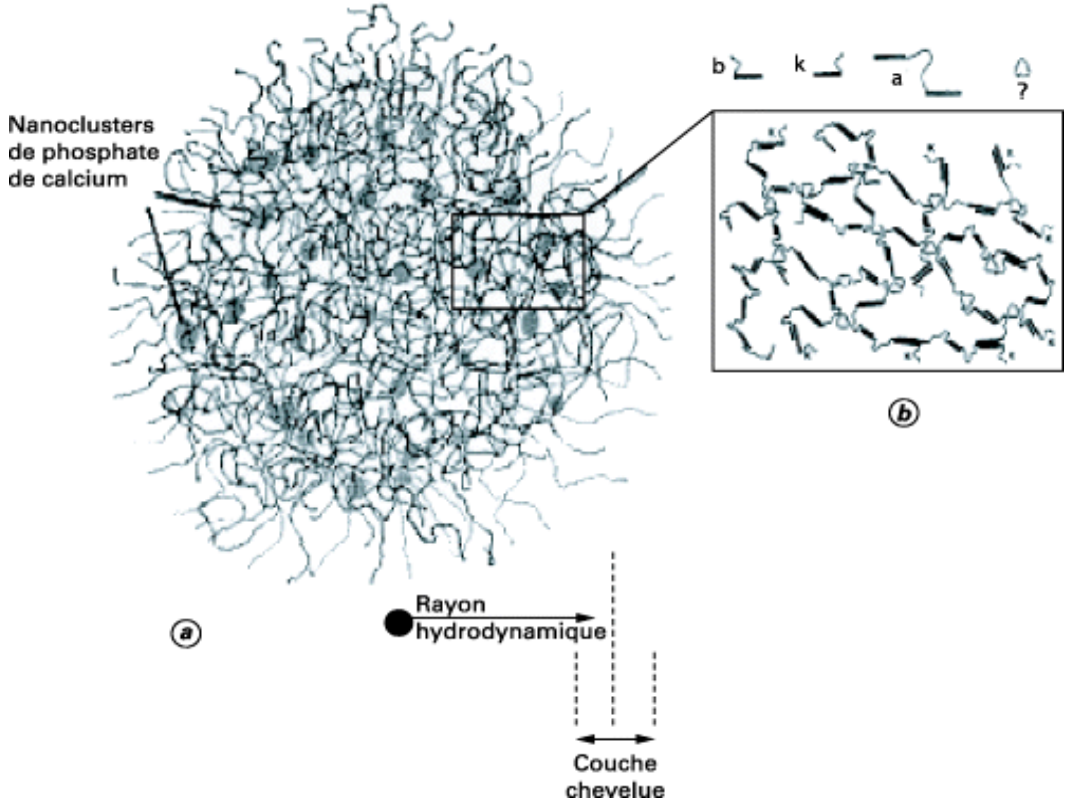


Figure 1 : Modèle de « structure ouverte » de la micelle de caséine, d'après Holt & Horne, 1996 ; Horne, 1998.

Le second modèle, plus récemment décrit, contraste avec les modèles déjà développés. En effet, la micelle de caséines serait structurée selon un modèle « en éponge » à trois niveaux. Bouchoux *et al.*, (2010) ont suivi l'évolution de la structure interne de la micelle en cours de compression par diffusion des rayons X aux petits angles (« Small Angle X-rays

Scattering »). Selon ces travaux, la micelle de caséines consisterait en un matériau hétérogène formé de régions denses résistantes à la compression, et de régions « molles » ou « vides » s'effondrant lorsque la micelle est déformée (figure 2), justifiant ainsi l'appellation en « éponge » (Bouchoux *et al.,* 2010).

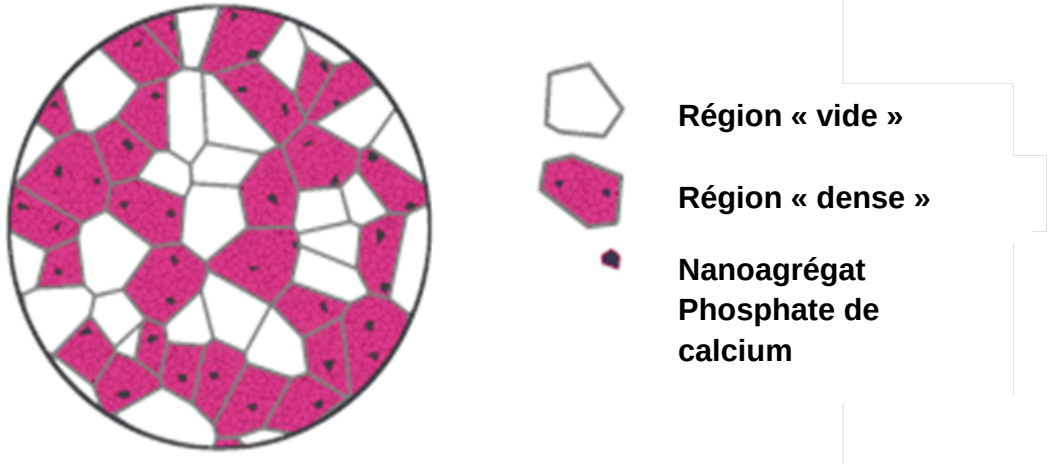


Figure 2 : Structure « en éponge » de la micelle de caséine sous compression osmotique, d'après Bouchoux *et al.,* 2010.

Les micelles de caséines de forme et de masse variées sont chargées négativement dans le lait frais. Il en résulte une répulsion électrostatique des micelles, assurant par là-même leur stabilité (De Brandere & De Baerdemader, 1999 ; Vasbinder *et al.,* 2003).

1.4.2. Les protéines solubles

Les protéines solubles ou sériques, en proportions relatives de 5 à 7 g/l de lait, sont définies comme étant la fraction protéique retrouvée dans le lait après coagulation des caséines à pH 4,6 (Farell *et al.,* 2004). Les protéines solubles sont des protéines de structure globulaire se présentant sous forme d'une chaine enroulée et serrée en pelote naturellement non dénaturée (Fox & Mulvihill, 1983 ; Swaisgood, 1982). La β-lactoglobuline (54 % p/p), l'α-lactalbumine (21 % p/p), la sérum albumine bovine, les immunoglobulines et la lactoferrine représentent plus de 90 % (p/p) des protéines solubles totales du lait (Kinsella, 1984). Ces protéines sont généralement riches en acides aminés soufrés et possèdent une grande sensibilité aux traitements thermiques. En effet, le chauffage entraîne la perte de la structure native de ces protéines liée à l'ouverture de leurs structures secondaires et tertiaires,

aboutissant ainsi à leur dénaturation irréversible (Swaisgood, 1982 ; Fox & Mulvihill, 1983 ; Singh & Waungana, 2001 ; Sawyer *et al.*, 2002).

La β-lactoglobuline est une protéine de 162 acides aminés ayant un poids moléculaire de 18,3 kDa et une structure secondaire compacte, constituée de feuillets β perpendiculaires maintenus par deux ponts disulfures et refermés par une hélice α ; 45 % des acides aminés sont impliqués dans les feuillets β et 15 % dans les feuillets α (Kinsella *et al.*, 1989). L'estimation de son point isoélectrique est évaluée à un pH de 5,2 (Pelegrine & Gasparetto, 2005).

L'α-lactalbumine renferme 123 acides aminés pour un poids moléculaire de 14,3 kDa. Elle présente quatre ponts disulfures et un ion calcium intervenant dans sa stabilisation (Ribadeau-Dumas, 1981). On retrouve une proportion faible d'acides aminés structurés en hélice α (30 %) et en feuillets β (9 %). Elle possède une plus grande résistance aux traitements thermiques que la β-lactoglobuline (Kinsella & Whitehead, 1989). Son point isoélectrique est de 4,8 (Cayot & Lorient, 1998). Les structures tridimensionnelles de la β-lactoglobuline bovine et de l'α-lactalbumine sont présentées dans la figure 3. Elles sont obtenues par diffraction aux rayons X à pH 6,5 et en présence d'ions Ca^{2+} à pH 8,0 respectivement (Brownlow *et al.*, 1997 ; Chrysina *et al.*, 2000).

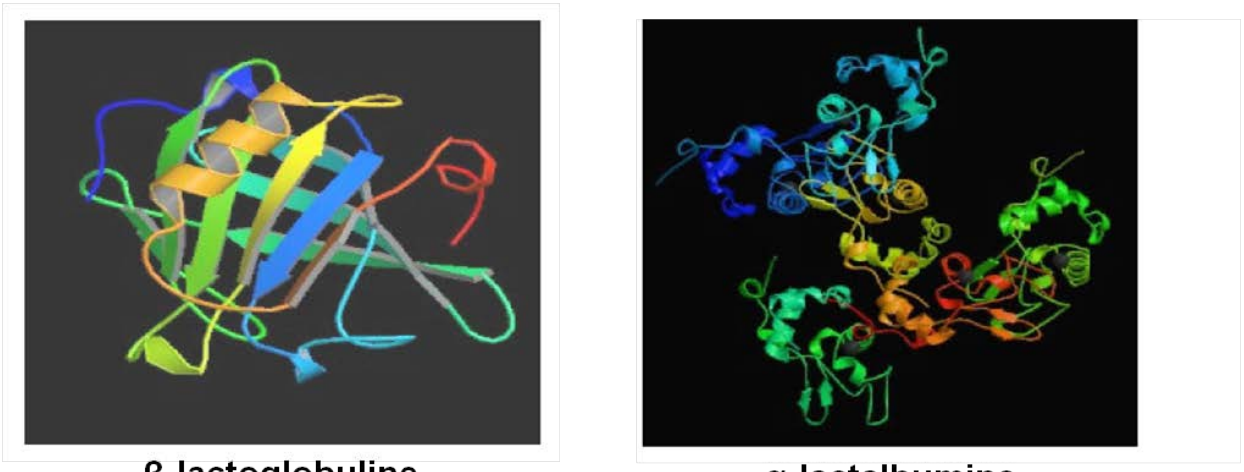


Figure 3 : Structures tridimensionnelles de la β-lactoglobuline bovine et de l'α-lactalbumine obtenues par diffraction aux rayons X d'après Brownlow *et al.*, 1997 et Chrysina *et al.*, 2000.

1.5. Les micronutriments

1.5.1. Les sels minéraux

Le lait contient également des sels minéraux à hauteur de 7 g/l environ retrouvés soit en solution dans la fraction aqueuse, soit sous forme liée dans la fraction colloïdale. Les minéraux les plus représentés en terme d'équilibre micellaire sont le calcium (1,2 g/l), le phosphore (0,9 g/l) et le citrate (Alais, 1984 ; Van Hooydonk *et al.*, 1987 ; Holt, 1992). Dans la fraction soluble, ils existent en partie sous forme libre (calcium -un tiers de la fraction totale- et magnésium ionisés), sous forme saline (phosphates et citrates non dissociés au calcium ou au magnésium), ou sous forme complexe (esters phosphoriques et phospholipidiques). Dans la fraction colloïdale, les minéraux tels que le calcium (deux tiers de la fraction totale), le phosphore (la moitié de la fraction totale), le soufre et le magnésium sont liés à la caséine au sein des micelles (Alais, 1984 ; Gaucheron *et al.*, 2004). D'autres minéraux sont également présents dans le lait à l'état dissous sous forme d'ions tel que le sodium, le potassium et le chlore.

1.5.2. Les vitamines

Concernant les vitamines, on retrouve généralement toutes celles connues pour leur liposolubilité (vitamines A, D, E et K) ou hydrosolubilité (vitamines du groupe B en particulier B2, B9, B12 et du groupe C), présentes dans le lait de vache en proportions variables. Toutefois, les techniques de traitement du lait (ex : chauffage, la stérilisation et la pasteurisation) peuvent modifier sensiblement leurs teneurs particulièrement pour la viTamime C très fragile avec une perte de 50 % en stérilisation classique et au cours du stockage du lait en tanks réfrigérés (Courtet Leymarios, 2010).

2. Influence des modifications physico-chimiques du lait sur les protéines laitières

Les micelles de caséines et les protéines solubles résistent différemment aux procédés de traitements appliqués au lait (*i.e.* traitement thermique, acidification) ainsi qu'aux modifications physico-chimiques résultantes. Ces divers aspects seront décrits de manière plus approfondie dans la suite de cette synthèse.

2.1. Le traitement thermique

Suite à un traitement thermique supérieur à 70 °C, les deux protéines solubles majoritaires (α-lactalbumine et la β-lactoglobuline) subissent d'importantes modifications structurelles et fonctionnelles (Raikos, 2009). En effet, au-delà de cette température, un dépliement de la structure des protéines a lieu, conduisant à leur dénaturation irréversible (Sawyer *et al.*, 2002). Ce phénomène a été décrit par une première étape caractérisée par une déformation prononcée de la structure tridimensionnelle des protéines du lactosérum et l'apparition de groupements thiols réactifs précédemment « cachés » à l'intérieur de la structure globulaire des protéines (Calvo,1995 ; Singh & Waungana, 2001), suivis par leur agrégation (Singh & Waungana, 2001 ; Elshereef *et al.*, 2008 ; Raikos, 2009). Dans le cas de la β-lactoglobuline, ce processus intramoléculaire expose en même temps le groupement thiol libre ainsi que des ponts disulfures très réactifs (Fryer *et al.*, 1995). Les protéines déplissées présentent alors une configuration instable stabilisée ensuite par une phase d'agrégation. La disponibilité de nouveaux sites exposés par le déplissage des protéines permet la formation d'agrégats constitués exclusivement de protéines solubles ou d'un mélange avec les caséines micellaires (Kinsella, 1989 ; Anema & Li, 2003). Cela dépend de plusieurs facteurs, tels que la durée et l'intensité du chauffage, le pH, la force ionique, la concentration en calcium et en phosphate solubles ainsi que le degré de dissociation de la caséine κ de la micelle (Devold *et al.*, 2000). Il est à préciser que l'α-lactalbumine, bien qu'elle participe aussi aux interactions protéines-protéines, ne se lie pas directement aux caséines mais par l'intermédiaire de la β-lactoglobuline (Dzurec & Zall, 1985). En effet, il a été démontré que l'α-lactalbumine ne polymérise pas en l'absence des autres protéines solubles (Calvo, 1995). De plus, en dessous de 90 °C, l'α-lactalbumine et la β-lactoglobuline s'associent pour former des complexes intermédiaires qui, eux, s'associent ensuite aux micelles de caséines (Corredig & Dalgleish, 1999).

Concernant la micelle de caséine, l'apport de chaleur entraine des modifications des équilibres minéraux en fonction de l'intensité du traitement thermique appliqué (De la Fuente, 1998). Pour un chauffage à des températures inférieures à 90 ^{o}C, il y aura par exemple un transfert réversible des ions calcium et phosphate de la phase aqueuse vers la phase micellaire lors du refroidissement (De la Fuente, 1998 ; Snappe *et al.*, 2010). Pour des traitements thermiques plus sévères (température supérieure à 90 °C), il y aura une précipitation du

phosphate de calcium qui se retrouvera alors associé aux protéines sous forme de phosphate tricalcique, phosphate de calcium amorphe ou phosphate dicalcique. Ces changements seraient irréversibles et atteindraient la structure et la répartition des sels entre la micelle et la fraction soluble (Guyomarc'h *et al.,* 2003). La micelle de caséine peut également être déstabilisée sous l'action de plusieurs autres facteurs externes.

2.2. L'acidification

L'acidification rapide par un acide concentré minéral ou organique entraîne la floculation des caséines sous forme d'un précipité granuleux dispersé dans le lactosérum (Jeantet *et al.,* 2012). Au contraire, l'acidification lente par des bactéries lactiques ou par un agent acidulant chimique, *e.g.* Glucono-Delta-Lactone, entraîne un réarrangement profond des micelles de caséines et la formation d'un gel homogène. Dans les deux cas, l'acidification est associée à une décalcification de la micelle (St-Gelais & Tirard-Collet, 2002). En effet, Les micelles de caséines se désintègrent suite à la solubilisation du phosphate de calcium colloïdal (à pH 5,2) mais aussi suite à l'augmentation de l'activité des ions Ca^{2+} (connus pour leur rôle de réduction des répulsions électrostatiques entre molécules de charges identiques) et forment alors des agrégats de quelques microns dispersés dans le sérum. Ces agrégats, à partir d'un pH de 5, s'associent par l'intermédiaire des caséines solubilisées pour former un réseau gélifié, englobant entre ces mailles la totalité de la phase aqueuse (Horne & Davidson, 1986 ; Dalgleish & Holt, 1988 ; Dalgleish & Law, 1989 ; Le Graet & Brulé, 1993 ; Vasbinder *et al.,* 2003 ; Dalgleish *et al.,* 2004).

2.3. La réfrigération

La réfrigération du lait (à 4 ^{o}C) s'accompagne de la solubilisation réversible d'une partie (environ 10 %) du phosphate de calcium colloïdal ainsi que la solubilisation de la caséine β initialement contenue dans le lait ; cette dernière est expulsée de la micelle et peut alors être hydrolysée par une enzyme endogène du lait, la plasmine (conduisant notamment à une baisse du rendement fromager) (De la Fuente, 1998).

2.4. L’ajout de sels

Le chlorure de calcium ($CaCl_2$) particulièrement utilisé en technologie fromagère induit des modifications dans la répartition des sels entre la phase soluble et la phase colloïdale du lait. Il conduit à la formation de phosphate de calcium (HPO_4Ca) qui, en raison de sa solubilité, est majoritairement dirigé vers la micelle de caséine. Une partie du calcium apporté réduit alors la stabilité thermique de la micelle tout en induisant en parallèle une diminution de l’état d'hydratation de celle-ci. Il est à noter également que le chlorure de sodium et le citrate ont un effet déstructurant sur la micelle, pouvant conduire, selon les quantités en présence, à sa désintégration (De la Fuente, 1998 ; Famelart *et al.*, 1999 ; Schuck *et al.*, 2002).

2.5. L’ajout de présure

La présure, en particulier la chymosine, est l'enzyme coagulante du complexe caséinique utilisée en technologie fromagère. Elle provoque l'hydrolyse enzymatique de la caséine s'accompagnant de la libération de sa partie C-terminale hydrophile (caséinomacropeptide, CMP). Il s’en suit une déstabilisation des complexes colloïdaux (Sandra & Dalgleish, 2007) et leur agrégation via des interactions électrostatiques entre résidus de charges opposées, des liaisons hydrophobes et des ponts calciques et résultant en la formation d'un réseau gélifié par réticulation (O’Connell & Fox, 2000 ; Sandra *et al.*, 2011).

3. Les différents ingrédients protéiques laitiers déshydratés

Le développement des procédés de fractionnement et de séparation par précipitation, par différents procédés membranaires (ultrafiltration tangentielle, microfiltration, osmose inverse et nanofiltration ; annexe 1), par chromatographie échangeuse d’ions ou par électrodialyse a permis l’obtention d’un large éventail de protéines laitières soit directement à partir du lait, soit à partir des co-produits laitiers tels que le lactosérum et le babeurre. Les concentrés alors obtenus subissent des étapes d’homogénéisation et de concentration par évaporation sous vide, suivies par leur séchage par atomisation ou par passage sur des cylindres chauffants (annexe 2). A ces débuts, l’usage des protéines laitières était davantage à vocation industrielle qu’alimentaire (utilisation par exemple de caséines pour la production de

colles et de plastiques). Aujourd'hui, l'industrie agroalimentaire constitue le premier secteur demandeur des protéines laitières (généralement commercialisées sous forme déshydratées) en raison de leurs nombreuses propriétés fonctionnelles et nutritionnelles (Schuck, 1999 ; Snappe *et al.*, 2010). En effet, les protéines laitières possèdent des propriétés de gélification et d'émulsification tout en agissant également en tant que stabilisants (Walstra *et al.*, 1999 ; Tamime & Robinson, 2000 ; Isleten & Karagul-Yuceer, 2006 ; 2008). La figure 4 récapitule de manière schématique les différents ingrédients protéiques laitiers en poudre obtenus à partir du fractionnement du lait et de ses co-produits.

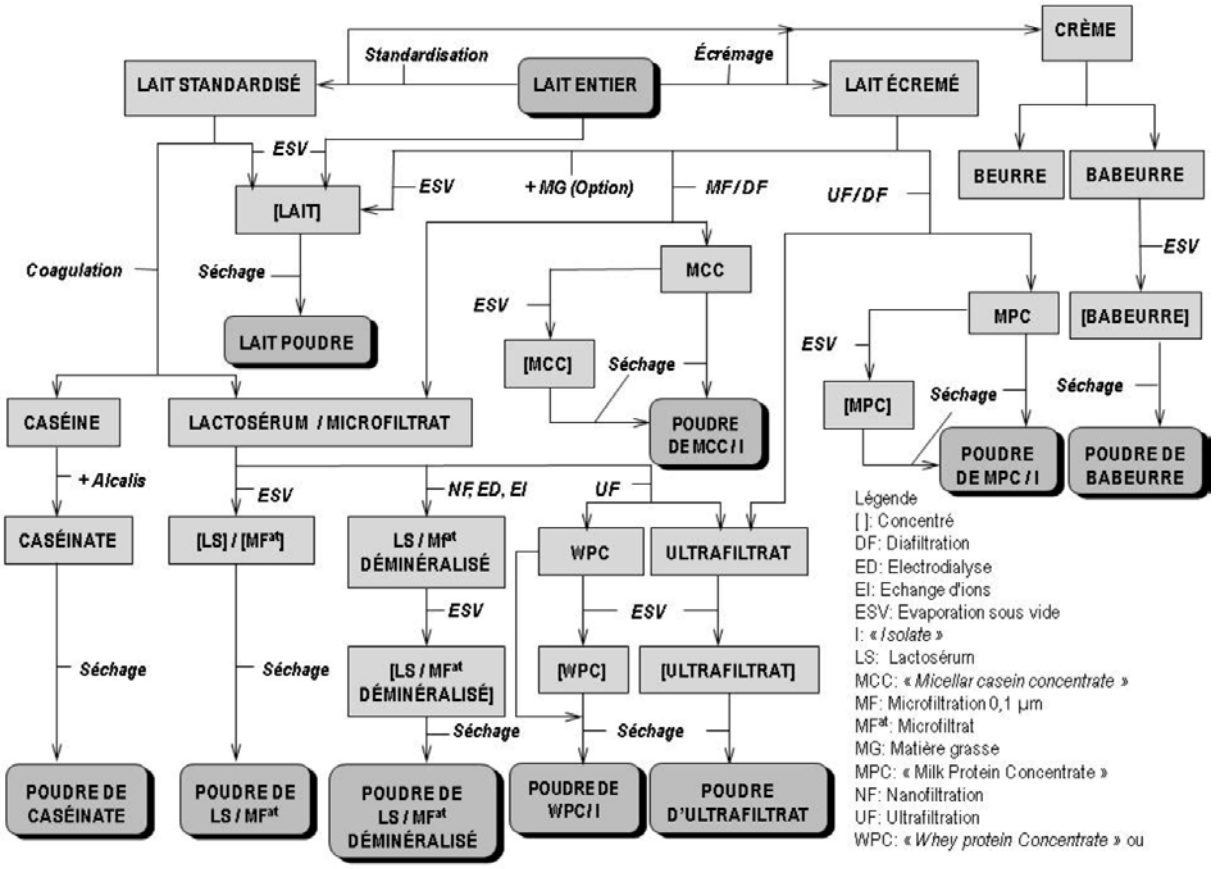


Figure 4 : Représentation schématique des différents ingrédients protéiques laitiers en poudre obtenus à partir du fractionnement du lait et de ses co-produits (d'après Schuck, 2002).

3.1. Les ingrédients protéiques laitiers en poudre dérivés du fractionnement du lait écrémé

3.1.1. Les concentrés (MPC) et isolats (MPI) de protéine totale de lait

Les concentrés et isolats de protéines totales de lait, respectivement MPC et MPI, sont généralement obtenus à partir du lait écrémé qui subit une ultrafiltration tangentielle (annexe 1) permettant la concentration des protéines totales, sans toutefois dénaturer les protéines solubles (Schuck *et al.*, 1998 ; Hussain, 2012). Le taux de protéines atteint alors 50 à 70 % de protéines sur matière sèche (Snappe *et al.*, 2010). Il s'ensuit un processus de diafiltration permettant d'accroître davantage la pureté des protéines en réduisant la proportion de lactose et de minéraux solubles (Mistry & Hassan, 1991 ; Snappe *et al.*, 2010 ; Patel, 2011). La totalité des protéines du lait est ainsi conservée, tout en préservant leur rapport (4/1) et leur structure native (Schuck *et al.*, 1998 ; Kelly, 2006 a,b ; Ye, 2011). Les concentrés protéiques (< 85 % MAT/sec) et les isolats (> 85 % MAT/sec) sont finalement pasteurisés et séchés par atomisation (Schuck,1999). Le tableau 3 donne les compositions typiques des MPC en pourcentage de poudre.

Produit	Humidité	Matière grasse	Protéine	Lactose	Minéraux
MPC42	3,5	1,0	42,0	46,0	7,5
MPC70	4,2	1,4	70,0	16,2	8,2
MPC75	5,0	1,5	75,0	10,9	7,6
MPC80	3,9	1,8	80,0	4,1	7,4
MPC85	4,9	1,6	85,0	1,0	7,1

Tableau 3 : Composition caractéristique des concentrés de protéines totales de lait (MPC) en pourcentage sur matière sèche (d'après Dairy Management, 2013).

3.1.2. Les caséines et caséinates

La production de caséines et de caséinates est complexe du fait de la variété des techniques mises en œuvre, incluant des réactions enzymatiques et chimiques ainsi que des techniques de coagulation et de filtration.

3.1.2.1. Les caséines natives ou phosphocaséinates natives (PPCN)

Les micelles de caséines natives sont concentrées et purifiées à partir de lait écrémé par microfiltration tangentielle et diafiltration à l'eau, ce qui permet d'éliminer la quasi-totalité des protéines sériques, le lactose et les minéraux du rétentat (Fauquant *et al.,* 1988 ; Schuck *et al.,* 1994).

Les autres types de caséines sont obtenus par déstabilisation des caséines micellaires : par précipitation acide (caséine acide) ou enzymatique (caséine présure).

3.1.2.2. Les caséines acides et caséinates

Les caséines acides et caséinates sont obtenues par acidification du lait écrémé au point isoélectrique des caséines à pH 4,6. À ce pH, le complexe micellaire est détruit, les caséines s'agrègent et précipitent sous forme d'un coagulum. L'acidification est obtenue : i) soit par ajout d'acides forts tels que l'acide sulfurique (H_2SO_4) ou l'acide chlorhydrique (HCl), permettant d'obtenir des caséines différentes en fonction des températures d'acidification (lorsque la température est inférieure à 10 ^oC, les agrégats formés sont fins et la charge minérale est faible, alors qu'ils sont plus grossiers et plus minéralisés pour des températures plus élevées (40-45 ^oC), ii) soit par fermentation par des bactéries lactiques entrainant la conversion du lactose en acide lactique, iii) soit par utilisation de résines échangeuses de cations : des groupements acides en surface des membranes vont échanger leur proton avec les cations présents dans le lait conduisant à un abaissement du pH (Schuck *et al.,* 1994 ; Gaiani, 2006). Après précipitation, le coagulum est séparé du lactosérum acide par centrifugation. Il est lavé à l'eau pour le débarrasser du lactose, des sels et de l'acide lorsque nécessaire. La caséine acide est ainsi obtenue. Elle peut être séchée par des sécheurs en lits fluidisés, circulaires ou par attrition (Britten *et al.,* 2002) pour être commercialisée sous cette forme, ou partiellement solubilisée par neutralisation. Selon la nature de la base, l'on obtient des caséinates de sodium (hydroxyde de sodium), des caséinates de potassium (hydroxyde de potassium) ou des caséinates de calcium (hydroxyde de calcium) (Fabra *et al.,* 2010). Par la suite, le séchage et la dispersion des caséinates sont réalisés par atomisation ou par le biais d'un sécheur à cylindres (Schuck, 1999).

3.1.2.3. La caséine présure

La caséine présure est obtenue par l'utilisation d'enzymes telles que la présure de veau ou enzymes protéolytiques qui vont scinder la caséine κ par coupure de la liaison phénylalanine-méthionine. Cela engendre l'obtention de deux fragments : la paracaséine κ (sensible au calcium) et le caséinoglycopeptide (CGP), appelé également glycomacropeptide (GMP), soluble et responsable des répulsions stériques et électrostatiques. Les micelles de caséine vont devenir instables et précipiteront en présence de calcium pour former la caséine présure. La dispersion obtenue est pasteurisée et séparée par centrifugation puis séchée, le plus souvent par attrition (Snappe *et al.,* 2010). Le tableau 4 représente la composition moyenne des caséines et principaux caséinates d'après Pierre *et al.,* (1992) ; Britten *et al.,* (2002) et Gaiani (2006). Il est à préciser que la composition ionique des caséines micellaires diffère de celle des autres caséines avec une teneur moyenne maximale en phosphore (1,9 $g.100g^{-1}$ *vs* 0,8 $g.100g^{-1}$; 0,9 et 1,5 $g.100g^{-1}$ pour les caséinates, la caséine acide et présure respectivement), une teneur importante en calcium (2,6 $g.100g^{-1}$ *vs* 0,08 ; 0,1 ; 1,5 ; 3,0 $g.100g^{-1}$ pour la caséine acide, la caséinate de sodium, de calcium et la caséine présure respectivement) et enfin, une teneur minimale en sodium de l'ordre de 0,02 $g.100g^{-1}$ (égale à celle de la caséine présure) (*vs* 0,05 ; 0,1 et 1,3 pour la caséinate de calcium, la caséine acide et la caséinate de sodium respectivement) (Pierre *et al.,* 1992 ; Britten *et al.,* 2002 ; Gaiani, 2006).

	Humidité	**Protéine**	**Lipides**	**Lactose**	**Minéraux**
Caséine présure	12	80	1,5	0,2	7
Caséine acide	10	87	1, 5	0,2	2
Caséinate de sodium	4	92	1,5	0,2	4
Caséinate de calcium	4	91	1,5	0,2	4,5
Caséine micellaire	6,5	85	-	-	8,4

Tableau 4 : Composition moyenne ($g.100g^{-1}$) des caséines et caséinates d'après Pierre *et al.,* (1992) ; Britten *et al.,* (2002) et Gaiani (2006).

3.2. Les ingrédients protéiques laitiers en poudre dérivés du fractionnement du lactosérum

3.2.1. La poudre de lactosérum

Le lactosérum est la phase aqueuse issue de la transformation fromagère ou de la production de caséine. Deux types de lactosérums peuvent être distingués selon le type de fromage ou de caséine produit : les lactosérums acides (suite à une précipitation des caséines par acidification) ou les lactosérums doux (suite à une précipitation des caséines de type présure) dont la composition en matières azotées et minérales varie. La poudre de lactosérum est ensuite obtenue par concentration et séchage (Gaiani, 2006). L'échange d'ions, l'électrodialyse et plus récemment la nanofiltration, sont également utilisés, obtenant ainsi une poudre de lactosérum déminéralisée (Snappe *et al.*, 2010).

3.2.2. Les concentrés de protéines solubles (WPC ou concentrés de protéines de lactosérum) et isolats de protéines solubles (WPI)

Les WPC sont des ingrédients issus de l'élimination des constituants non protéiques du sérum, de manière à obtenir une poudre contenant au minimum 25 % (p/p) de protéines. Ils sont produits par des techniques de séparation physique comme la précipitation, la filtration ou la dialyse (Barba *et al.*, 2001 ; Yee *et al.*, 2007). Ils peuvent être obtenus par précipitation des protéines du lactosérum : le lactosérum est d'abord chauffé (90 ^{o}C/3-5′) avec ajustement du pH entre 4 et 4,8. Les protéines précipitent alors et deviennent insolubles, pouvant être récupérées par décantation et centrifugation. L'obtention des WPC peut aussi s'effectuer grâce à des procédés de filtration membranaire à partir de lactosérum ou de perméats de microfiltration issus de la production de caséines natives. La concentration des protéines solubles s'effectue par ultrafiltration et leur extraction sélective est réalisée par le biais de résines de chromatographie échangeuse d'ions (Morr & Ha, 1993 ; Hussain, 2012). La séparation différentielle et la concentration sélective des protéines de lactosérum permettent d'obtenir des WPC contenant de 35 à 80 % de protéines sur matière sèche (Gaiani, 2006 ; Snappe *et al.*, 2010 ; Hussain, 2012).

Les concentrés protéiques obtenus par techniques de chromatographie sont appelés « isolats » et ont une teneur en protéines d'environ 90 %. Ils sont complètement délactosés et ont une charge minérale faible (Considine *et al.*, 2011). Industriellement, ils sont produits

selon deux procédés où les protéines solubles sont d'abord adsorbées sur des billes de carboxy-méthyl cellulose à pH acide. Les protéines sont ensuite éluées par un lavage à un pH neutre. La solution de protéines quasiment pure est alors concentrée et séchée ; les protéines peuvent aussi être récupérées à l'aide de colonnes échangeuses d'ions permettant de sélectionner les protéines (Snappe *et al.*, 2010).

Il est à noter que d'autres protéines pourraient être également produites à partir du lactosérum, par échanges d'ions ou par utilisation de procédés de filtration membranaire : la lactoferrine par exemple est notamment isolée par chromatographie ou colonnes échangeuses de cations (Morr & Ha, 1993). Le tableau 5 représente la composition moyenne ($g.100g^{-1}$) des principaux dérivés de protéines sériques.

Produit	Protéines	Lactose	Humidité	Lipides	Minéraux
Poudre de lactosérum	12	70	4	1	8
Lactalbumine	85	3	4	3,5	1,5
Concentrés-35	35	46	4,5	3,2	8
Concentrés-50	50	31	4,3	4,3	6
WPC	65-80	4-21	4-4,2	5,6-7,5	3-3,9
Isolats	88-92	< 1	4	1	2-3

Tableau 5 : Composition moyenne ($g.100g^{-1}$) des principaux dérivés de protéines solubles adapté d'après Britten *et al.*, 2002 ; Jelen, 2003 et Gaiani, 2006.

3.3. Les ingrédients protéiques laitiers en poudre dérivés du babeurre

Le babeurre doux est un co-produit issu de la production de la crème du lait (Vanderghem *et al.*, 2010). Du fait de ses propriétés émulsifiantes et moussantes, le babeurre constitue un ingrédient utile et précieux pour l'industrie laitière (Sodini *et al.*, 2006). Le babeurre en poudre est classé essentiellement selon deux catégories : le babeurre doux ou acide. Le babeurre commercial est généralement doux et est obtenu à partir de la fabrication du beurre par barattage (Sodini *et al.*, 2006 ; Morin *et al.*, 2007). Le babeurre présente une composition proche de celle du lait écrémé, comprenant également des phospholipides et des glycoprotéines (Tamime & Robinson, 2000 ; 2007). Toutefois, la composition en

phospholipides du babeurre varie selon le stade de lactation ainsi que la race de la vache. En général, la teneur en phospholipides du babeurre représente 20 % de ses lipides totaux (Alais, 1984). Quant aux glycoprotéines, elles constituent avec d'autres composants (lipoprotéines, agglutinines) la couche externe de la structure de la membrane du globule gras du lait (Alais, 1984).

Finalement, les protéines laitières (purifiées ou en mélange) peuvent subir des hydrolyses enzymatiques par addition d'enzymes digestives (pepsine ou trypsine) ou de protéases issues de plantes ou de micro-organismes. L'hydrolyse enzymatique s'effectue dans des réacteurs couplés à une membrane d'ultrafiltration, permettant de séparer le produit de fermentation du substrat et de l'enzyme. Les hydrolysats de protéines ainsi obtenus ont des fonctionnalités différentes des protéines initiales en raison de modifications physico-chimiques et nutritionnelles (Snappe *et al.,* 2010).

4. Les étapes de réhydratation des ingrédients protéiques en poudre

Il est généralement admis que le processus de réhydratation d'une poudre laitière se déroule en plusieurs étapes (Schubert, 1993 ; Freudig *et al.,* 1999) comprenant le mouillage, le gonflement, la dispersion et la solubilisation (Schuck *et al.,* 2011). Le degré d'avancement de ces étapes est caractérisé essentiellement par trois indices : la mouillabilité, la dispersibilité et la solubilité (Schuck, 1999).

4.1. L'étape du mouillage ou mouillabilité d'une poudre laitière

La mouillabilité d'une poudre laitière a lieu par immersion de la poudre constituant l'interface solide dans de l'eau (interface liquide). Il est à signaler également l'existence d'autres types de mouillage, *i.e.* par étalement, par ascension capillaire ou par condensation, non reportés pour une poudre laitière. La mouillabilité d'une poudre reflète l'aptitude de celle-ci à s'immerger dans l'eau (Haugaard Sorensen *et al.,* 1978). Elle peut être mesurée selon les normes FIL (1985), ADPI (2002a) ou la méthode Niro Atomizer (1978) qui consistent à mesurer le temps (en secondes) nécessaire à une certaine quantité de poudre pour pénétrer dans l'eau à travers sa surface au repos (Schuck *et al.,* 2011). Dans le domaine laitier, une poudre est généralement considérée mouillable si son indice de mouillabilité est inférieur à 60 secondes et très mouillable si ce dernier est inférieur à 30 secondes (Schuck *et al.,* 2011). Il est à préciser que des valeurs d'indice de mouillabilité supérieures à 120 secondes renvoient

à des poudres non mouillables (Schuck *et al.*, 2011). De plus, certains auteurs associent parfois la notion de mouillabilité à des propriétés de « pénétrabilité » exprimant la quantité de poudre en milligramme pénétrée par minute et par centimètre carré de liquide (Freudig *et al.*, 1999 ; Gaiani, 2006). D'autres auteurs, enfin, associent la mouillabilité à l'aptitude de gonflement d'une poudre (Cayot & Lorient, 1998 ; Schuck *et al.*, 2011).

4.2. L'étape de gonflement d'une poudre laitière

Lorsqu'une poudre absorbe de l'eau, elle gonfle progressivement tant que l'eau reste piégée dans sa matrice. Il n'existe pas de normes (telles que FIL, ADPI) ou de méthodes (telle que Niro Atomizer) permettant de mesurer la capacité d'absorption de l'eau. Cette propriété a été cependant évaluée par relaxation RMN transversale et peut être déterminée par des isothermes de sorption (Gaiani, 2006). Davenel *et al.*, (1997 ; 1997a) ont pu par exemple quantifier par RMN la capacité d'absorption des poudres de phosphocaséinate native à environ 5 g d'eau.g^{-1} de poudre pendant les 20 premières minutes de leur réhydratation.

4.3. L'étape de dispersion d'une poudre laitière

La dispersibilité d'une poudre correspond à l'aptitude de celle-ci à se dissocier en particules de tailles plus réduites (Schuck, 1999 ; Forny *et al.*, 2011 ; Schuck *et al.*, 2011). C'est probablement le meilleur critère pour traduire l'aptitude d'une poudre à la réhydratation, puisque cette dernière est influencée par la mouillabilité et la solubilité (Schuck *et al.*, 2011). La dispersibilité d'une poudre dans l'eau est mesurée par les normes FIL (1985), ADPI (2002a) ou par la méthode Niro Atomizer (1978). L'indice de dispersibilité d'une poudre dans l'eau est la quantité de matière sèche (en pourcentage) pouvant traverser un tamis d'ouverture de maille connue (200 μm) après agitation pendant 15 secondes avec une spatule (Schuck *et al.*, 2011). Westergaard (1994) considère qu'une poudre de lait est dispersible si son indice de dispersibilité est supérieur à 95 %. Cette propriété a été étudiée en utilisant diverses techniques ainsi que diverses tailles de maille du tamis (180 μm pour Baldwin & Woodhams, 1974 ; 210 μm pour Kinsella, 1984), rendant les comparaisons entre résultats difficiles.

4.4. La solubilité d'une poudre laitière

La solubilité correspond à la disparition totale de la structure granulaire, c'est-à-dire à la solubilisation intégrale de la poudre. L'indice de solubilité reflète l'aptitude de la poudre à

se dissoudre dans l'eau suite à des séries de centrifugation contrôlées. Il peut aussi être mesuré selon la méthode de Niro Atomizer (1978) ou les normes FIL (1995) et ADPI (2002b). Dans le domaine laitier, une poudre est considérée comme étant soluble si son indice de solubilité est supérieur à 99 % (Schuck, 1998 ; Schuck *et al.,* 2011). Il est important de signaler que le résultat de l'indice de solubilité dépend de la méthode utilisée et essentiellement de la concentration en protéines de la dispersion, de la force de centrifugation, de la durée et de la vitesse d'agitation ainsi que de la température de reconstitution (Schuck *et al.,* 1994a ; Gaiani, 2006, Jeantet *et al.,* 2010). Ainsi, l'indice de solubilité de la poudre de caséine micellaire est de 64,6 %, celle des caséinates de sodium et des isolats de protéines de protéines solubles de 99,8 % (Schuck *et al.,* 2011). L'indice de solubilité des protéines de lactosérum ainsi que celui des caséinates de calcium et des concentrés de protéines de lactosérum est de 99,5 % (Schuck *et al.,* 2011). Finalement, la solubilité des concentrés de protéines du lait varie entre 35,5 et 47,7 % (De Castro-Morel & Harper, 2002 ; Anema *et al.,* 2006).

5. Les facteurs influençant les étapes de réhydratation d'une poudre laitière

La cinétique de réhydratation d'une poudre laitière dépend de plusieurs facteurs caractéristiques de la poudre (sa nature, sa composition biochimique et celle de sa surface, ses propriétés physiques de taille, de porosité et de masse volumique et les procédés de fabrication) mais aussi des conditions de réhydratation (température, vitesse d'agitation, concentration solide/liquide et du milieu de réhydratation) (Schober & Fitzpatrick, 2005 ; Jeantet *et al.,* 2010 ; Gaiani *et al.,* 2005, 2007 ; Mimouni *et al.,* 2009 ; Schuck *et al.,* 2011). Dans l'étude de Jeantet *et al.* (2010), il a ainsi été montré que la température jouerait un rôle prépondérant dans la cinétique de réhydratation des caséines micellaires avec une diminution du temps de réhydratation pour une augmentation même sensible de ce facteur (4 °C). Cette diminution du temps de réhydratation a également été reportée avec un doublement de la vitesse d'agitation. La relation de procédé obtenue a montré que, pour le mélangeur utilisé, en conditions isothermes et sur les gammes de vitesse d'agitation et de concentration testées, le nombre de révolutions nécessaires pour atteindre un certain degré de réhydratation augmente avec la concentration de la solution (Jeantet *et al.,* 2010). Finalement, des variations au sein

de tous ces paramètres sont susceptibles d'influencer les différentes étapes de réhydratation des poudres de lait.

Ainsi, l'étape de mouillage apparaît facilitée par la présence de composés hygroscopiques comme le lactose (par opposition aux lipides en surface (Pisecky, 1980 ; Boiros *et al.,* 1985 ; Kim *et al.,* 2002 ; Gaiani *et al.,* 2006), par la taille importante des particules, par la porosité et par la masse volumique élevées des particules de la poudre (Westergaard, 1994 ; Freudig *et al.,* 1999 ; Schuck, 1999). La dénaturation des protéines suite au traitement thermique appliqué au cours du procédé de séchage ainsi que l'agglomération des particules réintroduites facilitent cette étape (Kinsella, 1984 ; Schubert, 1993 ; Westergaard, 1994 ; Schuck, 1999 ; Gaiani, 2006).

La nature de la poudre (caséines) et la présence de protéines non structurées amélioreraient l'absorption de l'eau. Aussi, la baisse de température et l'ajout de sel tel que le chlorure de calcium augmenteraient la quantité d'eau piégée (Farrell *et al.,* 1989 ; Robin *et al.,* 1993 ; Gaiani, 2006).

La dispersibilité des poudres laitières est quant à elle facilitée par une augmentation de la quantité de lactose et se retrouve améliorée par des diamètres de particules moyens (200 µm) ainsi que par un séchage à basse température au cours de la fabrication de la poudre (Kinsella 1984 ; Schuck *et al.,* 1994 ; Cayot & Lorient, 1998 ; Gaiani, 2006). Une conservation de longue durée (100 jours pour la caséine micellaire) ainsi qu'une teneur importante en protéines tendent en revanche à détériorer les propriétés de dispersibilité de certaines poudres (Lascelles & Baldwin, 1976 ; Zbikowski *et al.,* 1993 ; Schuck, 1999).

La solubilité peut être entravée par la dénaturation des protéines solubles suite au traitement thermique. L'homogénéisation et l'adsorption conséquente des micelles de caséines à la surface augmenteraient aussi l'insolubilité (Mc Kenna *et al.,* 1999). Aussi, l'augmentation de la concentration en caséine micellaire diminue fortement la solubilité des poudres (Mistry & Hassan, 1991 ; Pierre *et al.,* 1992 ; Schuck *et al.,* 1994a, b). Au contraire, des poudres avec une forte teneur en lactose et une taille réduite de particules possèdent une meilleure solubilité (Furuta, 1992 ; Okos *et al.,* 1992 ; Wastergaard, 1994 ; Schuck *et al.,*1994a, b; Schuck, 1999 ; Gaiani, 2006).

Il est à signaler par ailleurs la présence apparente d'insolubles constitués de poudres non réhydratées dans certains cas, remettant ainsi en cause les normes mises en œuvre et parfois peu adaptées à ces contextes (Schuck *et al.,* 1994a,b ; Gaiani, 2006).

6. Les différentes étapes de réhydratation des protéines laitières dans un milieu simple : l'eau

La réhydratation des poudres a pu être suivie de manière continue par relaxation RMN transversale (Samuelsson & Hueg, 1973 ; Schuck & Marchal, 1997 ; Davenel *et al.*, 2002). Cela a permis d'évaluer la capacité d'absorption d'eau des poudres, leur dispersion ainsi que le temps total de réhydratation. Cependant, la technique d'étude par RMN ne permet pas d'estimer les étapes initiales de la réhydratation telles que le mouillage (Gaiani, 2006). Aussi, les normes ADPI, FIL ainsi que la méthode Niro Atomizer portant sur un seul indice ne permettent pas d'approfondir les propriétés de réhydratation des poudres laitières. Plusieurs méthodes basées sur des suivis rhéologiques (Ennis *et al.*, 1998), sur des techniques de spectrométrie à ultrasons ou par des approches granulométriques ont été envisagées (Povey *et al.*,1999, Richard *et al.*, 2012) afin de suivre le processus de réhydratation des poudres de manière continue. Récemment, Gaiani *et al.*, (2005, 2006, 2007) ont pu mettre en évidence les différentes étapes de réhydratation en couplant plusieurs méthodologies d'analyse, définissant ainsi le processus de réhydratation dans sa globalité pour les deux protéines laitières majoritaires (caséines micellaires et protéines sériques) dans un milieu simple tel que l'eau.

6.1. Les différentes étapes de réhydratation des caséines micellaires dans de l'eau

Différentes méthodologies turbidimétriques, rhéologiques et conductimétriques couplées à des mesures de granulométrie et de microscopie optique ont pu être employées à cet effet (Gaiani *et al.*, 2005, 2006, 2007). Le profil de viscosité obtenu par un rhéomètre équipé d'une géométrie de type vane (figure 5) présentait quatre étapes : une augmentation rapide de la viscosité atteignant un maximum après l'ajout de poudres (pic a) suivie par une augmentation plus lente (pic b) puis une diminution (lente également) de la viscosité (phase c) et finalement une stabilisation des valeurs de viscosité après environ 800 minutes de réhydratation (phase d) (Gaiani, 2006).

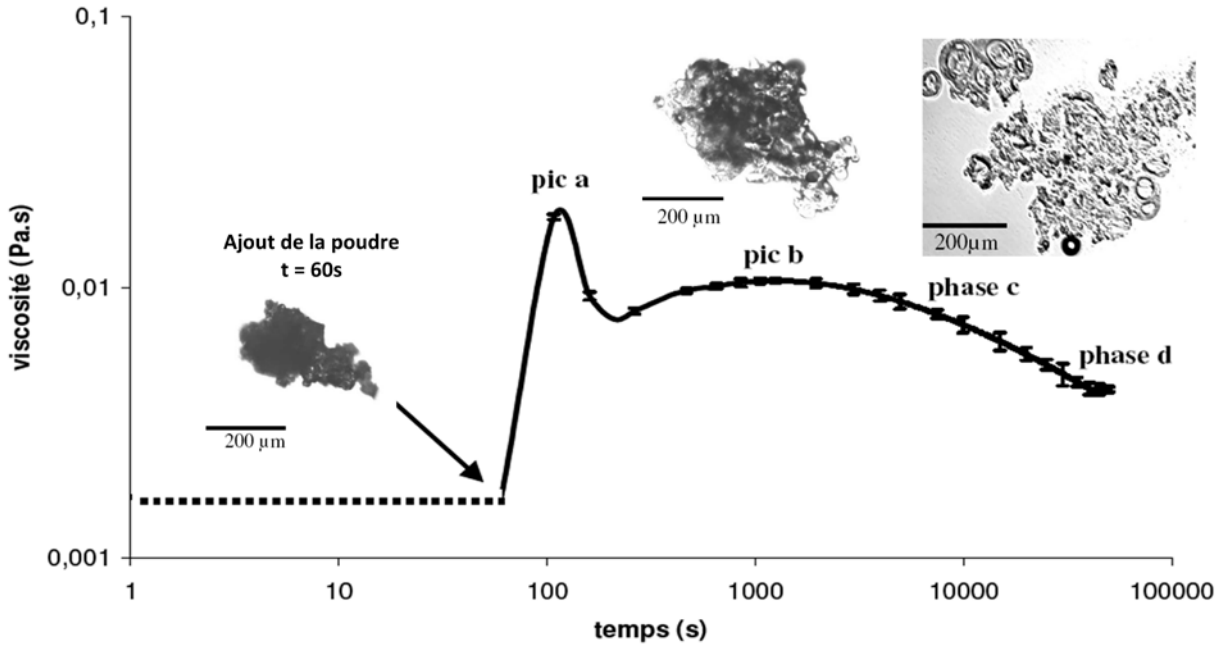


Figure 5 : Profil de viscosité et données microscopiques (prélèvements après 2000 et 20 000 s respectivement) obtenus lors de la réhydratation d'une poudre de caséine micellaire granulée dans de l'eau à 24 °C, d'après Gaiani *et al.*, (2007).

Une seconde méthodologie mettant en œuvre un réacteur équipé de trois sondes de turbidité, de conductivité et de pH a aussi permis de suivre la réhydratation de cette poudre dans de l'eau (Gaiani *et al.*, 2005 ; Gaiani, 2006). Il en a résulté un profil où, suite à l'addition de poudre, l'on observe une augmentation rapide de la turbidité suivie d'une diminution de la turbidité (atteignant son minimum). Puis, une augmentation lente et régulière de turbidité a pu être mise en évidence, menant à une stabilisation de ce paramètre après environ 750 minutes de réhydratation (Gaiani *et al.*, 2005). Un profil comparable à celui de la turbidité a été reporté pour la conductivité à travers une augmentation des valeurs après l'ajout de la poudre, avec toutefois une pente moins importante, suivie d'une diminution de la conductivité et finalement à nouveau une augmentation lente et régulière de ce paramètre (Gaiani, 2006). La figure 6 représente les profils de turbidité et de conductivité obtenus lors de la réhydratation d'une poudre de caséine micellaire granulée dans de l'eau à 24 °C d'après Gaiani, 2006.

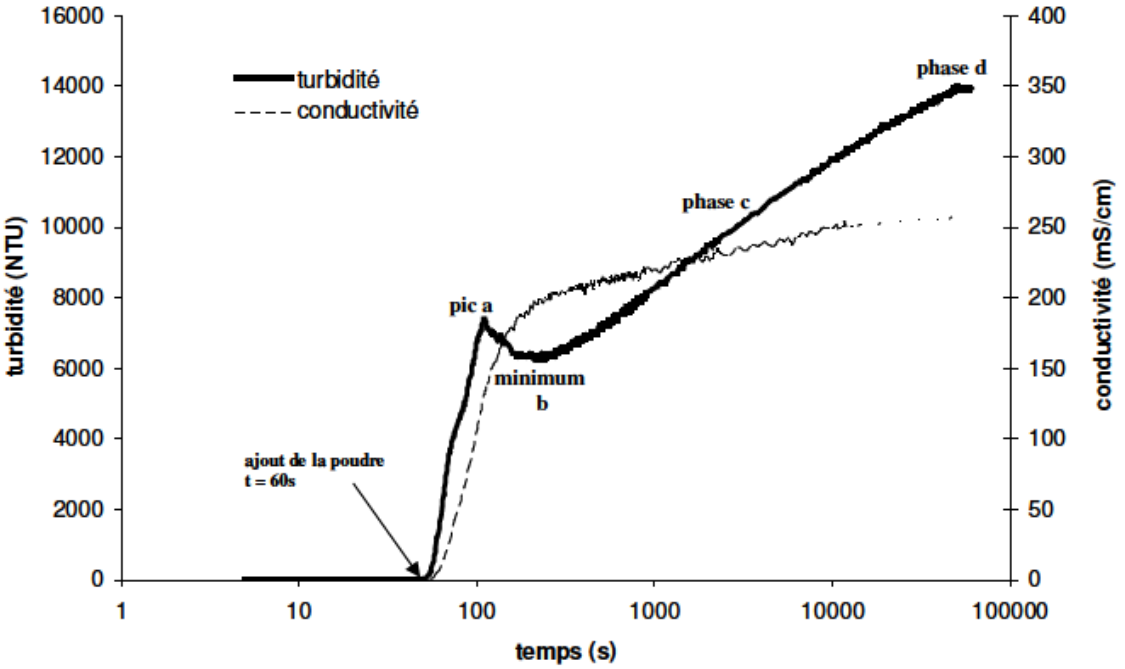


Figure 6 : Profils de turbidité et de conductivité obtenus lors de la réhydratation d'une poudre de caséine micellaire granulée dans de l'eau à 24°C d'après Gaiani (2006).

Les premiers pics des profils ont été visuellement interprétés et associés à la première étape de la réhydratation des poudres de caséine micellaire dans de l'eau et correspondent au moment où toutes les particules sont mouillées (pic a). L'augmentation régulière de la viscosité avec sa valeur maximale d'une part et le minimum de la turbidité d'autre part correspondait à une taille maximale des particules tels que observées par granulométrie et microscopie. Cela a été associé à l'étape de gonflement (pic b). La diminution lente de la viscosité et l'augmentation de la turbidité coïncidaient avec une diminution de la taille des particules (observée par granulométrie et microscopie) et ont pu être associées à l'étape de dispersion (phase c). Il s'avère que la stabilisation de ces deux profils correspondait à une stabilisation de la taille des particules, soulignant ainsi la fin de la réhydratation (phase d) (Gaiani *et al.*, 2005 ; 2007). La figure 7 représente le profil de viscosité interprété à partir des données granulométriques obtenus lors de la réhydratation d'une poudre de caséine micellaire dans de l'eau à 24°C d'après Gaiani *et al.*, (2007).

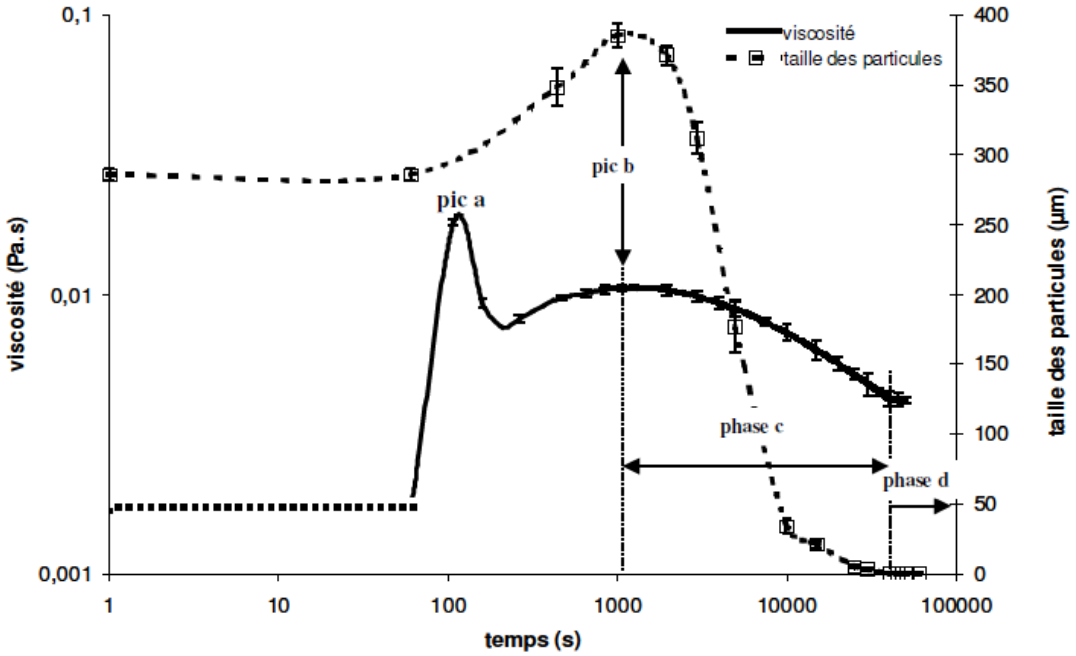


Figure 7 : Profil de viscosité et données granulométriques obtenus lors de la réhydratation d'une poudre de caséine micellaire dans de l'eau à 24 °C d'après Gaiani *et al.*, (2007).

Il est également à signaler qu'une poudre de phosphocaséinates natives (ou caséines micellaires) non granulées témoigne des mêmes étapes qu'une poudre de phosphocaséinates granulés mais avec des durées différentes. Les phases de mouillage et de gonflement s'avèrent en effet plus rapides pour une poudre granulée, toutefois la dispersion plus lente rend le processus total de réhydratation plus long (environ 800 minutes contre 560 minutes environ pour une poudre non granulée) (Gaiani, 2006).

Il faut également souligner la détérioration rapide des propriétés de réhydratation des caséines micellaires au cours de leur conservation. En effet, même lorsque les conditions sont considérées comme optimales (conservation dans des sacs étanches, à une température de 20 °C) des évolutions plus lentes des signaux (diminution du profil de viscosité et augmentation du signal de turbidité) apparaissent, témoignant d'une mauvaise réhydratation de la poudre et particulièrement d'une mauvaise dispersion. Aussi, un rallongement du temps de mouillage expliqué par l'apparition des lipides en surface de la poudre, est alors observé (Gaiani, 2006).

6.2. Les différentes étapes de réhydratation des protéines solubles dans de l'eau

Gaiani *et al.*, (2005 ; 2007) ont étudié la réhydratation d'une poudre de protéines solubles dans un milieu simple tel que l'eau à partir des profils de turbidimétrie. Ces derniers représentaient deux phases. Une première phase a pu être décrite où le signal de turbidité augmente, suivi d'une instabilité correspondant à la formation de grumeaux pour une durée de 5 à 15 minutes environ pour les protéines solubles granulées et non granulées respectivement, puis d'une stabilisation immédiate du signal. Il en découle que la dispersion de ces poudres semble instantanée après leur mouillage. La figure ci-après (figure 8) représente les profils de turbidimétrie obtenus suite à la réhydratation de protéines solubles non granulées et granulées dans de l'eau d'après Gaiani, 2006.

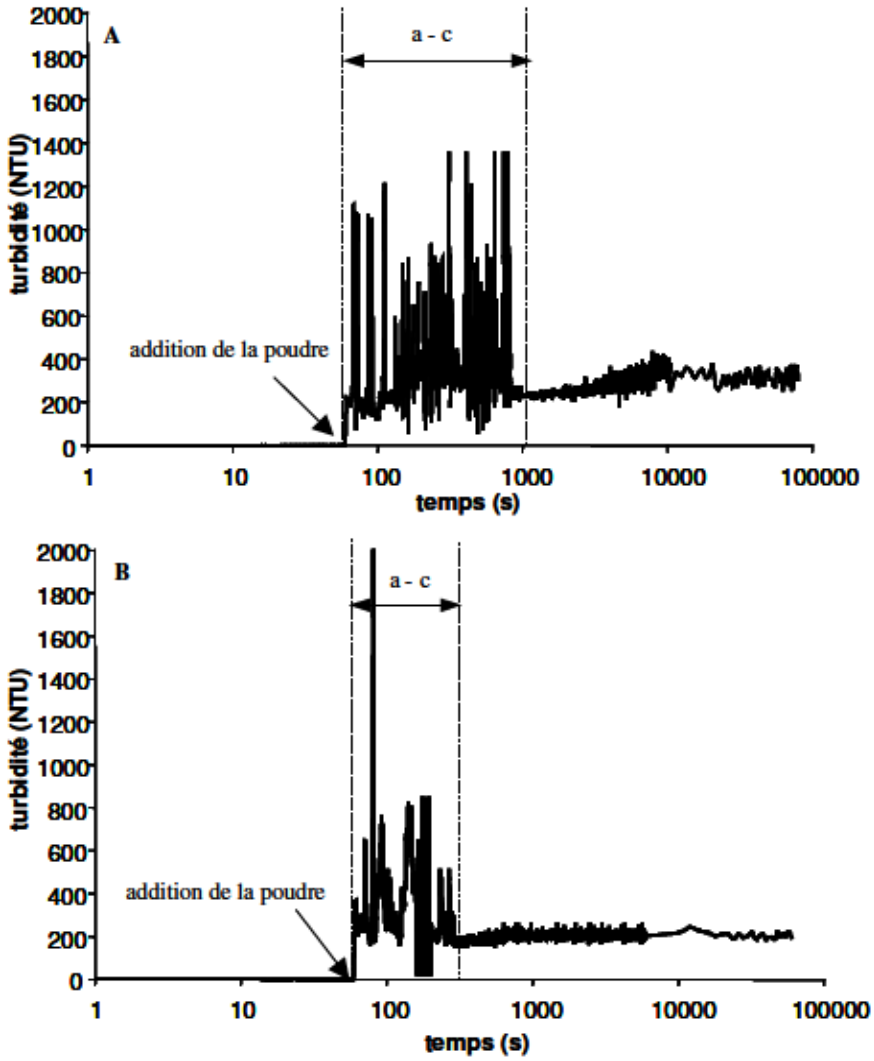


Figure 8 : Profils de turbidité obtenus lors de la réhydratation de protéines solubles non granulée (A) et granulées (B) dans de l'eau à 24 °C d'après Gaiani (2006).

7. Les différents comportements de réhydratation des deux principales protéines laitières dans un milieu simple : l'eau

En comparant le temps de réhydratation des deux poudres de caséines micellaires et de protéines solubles dans un milieu simple tel que l'eau, il peut être constaté qu'elles présentent un comportement différent. La première poudre (PPCN) indique trois phases de réhydratation : le mouillage, le gonflement et la dispersion, avec un temps de mouillage rapide et un temps de gonflement et une dispersion très lente, rendant l'ensemble de réhydratation très lent (Schuck *et al.,* 2002 ; Gaiani, 2006). Concernant les protéines solubles, deux phases de réhydratation peuvent être distinguées, avec une phase de mouillage lente accompagnée de formation de grumeaux et une phase de dispersion rapide rendant également le processus de réhydratation plus rapide (Gaiani *et al.,* 2007). La présence des lipides en surface des protéines solubles (les protéines solubles ayant des propriétés limitées d'encapsulation des lipides) pourrait expliquer ce mouillage difficile (Gaiani, 2006). En outre, aucune étape de gonflement n'a été notée pour les protéines sériques. Cette différence de comportement a été expliquée par l'état structural qui diffère au sein des deux protéines ; la micelle de caséines avec sa structure ouverte favorisant l'entrée de l'eau dans un premier temps pour ensuite la ralentir (Gaiani *et al.,* 2006).

L'ensemble des différentes approches mises en œuvre par Gaiani *et al.,* (2005 ; 2006 ; 2007) pour la caractérisation de la réhydratation des protéines de lait est basé sur la séparation du processus en plusieurs étapes. Plus récemment, Mimouni *et al.,* (2009) ont eu recours à une méthode de dispersion en lumière statique (« static light scattering ») afin d'appréhender la cinétique de réhydratation d'une poudre de lait (MPC). L'étude plus spécifique de la dispersibilité (par diffraction laser) a permis de suivre l'évolution de la taille des particules. Il en a découlé que la dispersibilité d'une MPC dans un milieu simple tel que l'eau s'avère longue (d'une durée d'environ 480 minutes) et peut être accélérée par une augmentation de la température.

8. La réhydratation des deux principales protéines laitières dans un milieu ionique

La réhydratation des deux protéines laitières majeures (caséines micellaires et protéines sériques) a été récemment étudiée dans des milieux ioniques contenant du chlorure de sodium ou du chlorure de calcium à des concentrations en sels allant de 0,75 % à 12 % (p/p) (0,75 ; 1,5 ; 2,25 ; 3 ; 6 ; 9 et 12 %), et à une concentration constante en protéines (5 % p/v) grâce à une méthode de turbidimétrie permettant d'appréhender la globalité du processus de réhydratation (Hussain *et al.,* 2011). Des études de cinétique portant sur la réhydratation de la caséine micellaire native avaient également été réalisées par RMN dans un environnement ionique (Schuck *et al.,* 2002). L'ajout de citrate ou d'une solution de phosphate à la suspension de caséine micellaire avant l'étape de séchage est associé à une augmentation importante du taux de réhydratation, un résultat lié à la destruction de la structure (déstructuration) micellaire (Schuck *et al.,* 2002). Le transfert de l'eau dans la suspension de caséine a été amélioré par l'ajout de NaCl au cours de la réhydratation, cet effet pouvant davantage s'expliquer par la nature hygroscopique du sel sodique que par une modification majeure de la structure micellaire en elle-même. Il a pu être montré également que l'ajout de $CaCl_2$ affecte considérablement l'organisation micellaire, conduisant à la formation de structures insolubles lors des étapes de séchage par atomisation (Schuck *et al.,* 2002).

8.1. La réhydratation des caséines micellaires dans des milieux ioniques

Deux comportements différents ont été observés pour la réhydratation des caséines micellaires dans des milieux ioniques suivant la concentration en sels (Hussain *et al.,* 2011). Le premier comportement ressemble au profil typique de réhydratation de la caséine micellaire dans un milieu simple tel que l'eau. En effet, à des concentrations faibles en NaCl et $CaCl_2$, jusqu'à 3 % et à 0,75 % (p/p) respectivement, les profils de turbidité suivent une évolution « classique » avec une étape de mouillage rapide et des étapes de gonflement et de dispersion très longues (Hussain *et al.,* 2011). Les étapes de mouillage et de dispersion étaient néanmoins plus longues que celles observées dans de l'eau, rendant le temps de réhydratation plus long et la réhydratation non achevée même au-delà de 500 minutes de réhydratation (Hussain, 2012).

Au contraire, pour de fortes concentrations en NaCl et à partir de 6 % (p/p) et de 1,5 % (p/p) pour les solutions de NaCl et $CaCl_2$ respectivement, le temps de mouillage était plus long que celui observé dans de l'eau mais l'étape de dispersion était réduite (environ 200 minutes). Il n'y avait pas d'étape de gonflement dans ces solutions à fortes concentrations (Hussain *et al.*, 2011 ; Hussain, 2012). Cette observation, associée à la réduction du temps de réhydratation, a été expliquée par les modifications structurales subies par la micelle de caséine suite à l'addition de sels entraînant l'augmentation de son hydratation (De la Fuente, 1998 ; Famelart *et al.*, 1999 ; Hussain *et al.*, 2011) ainsi que sa déstructuration. La figure 9 représente les profils de turbidités obtenus lors de la réhydratation des caséines micellaires dans des milieux ioniques à 24 °C.

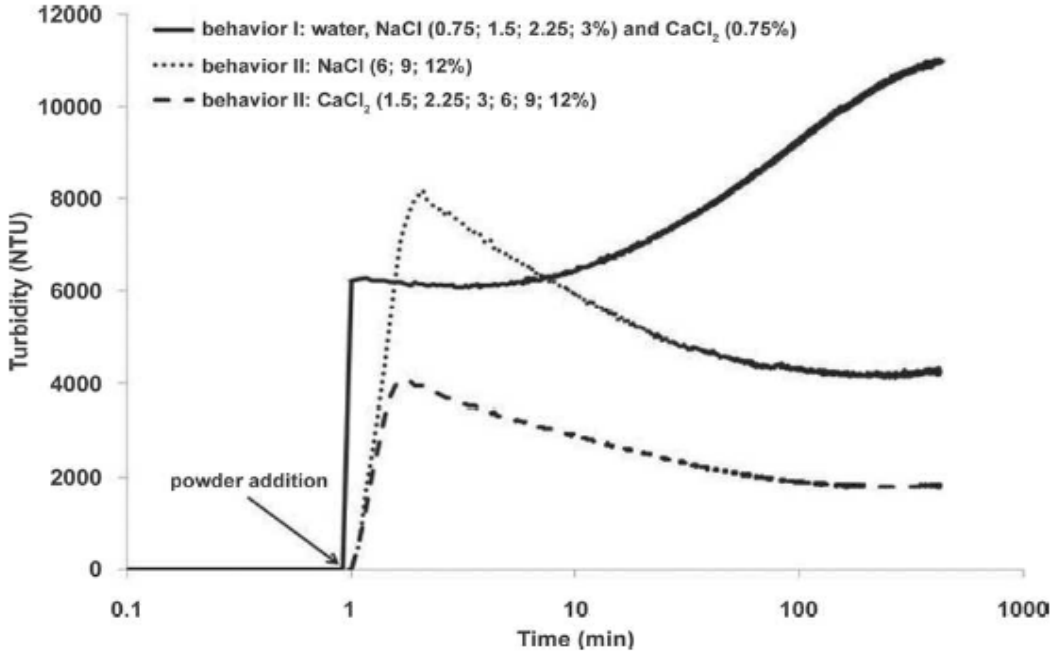


Figure 9 : Profils de turbidité (NTU, unité de turbidité néphélométrique) obtenus au cours de la réhydratation de caséines micellaires natives (5 %) à 24 °C durant 1000 min dans différents milieux ioniques. Comportement I : étape de mouillage, étape de gonflement et étape complète de réhydratation (longue). Comportement II : étape de mouillage, absence d'étape de gonflement et étape complète de réhydratation (courte), d'après Hussain *et al.*, 2011.

8.2. La réhydratation des protéines solubles dans des milieux ioniques

La réhydratation d'isolats des protéines solubles apparaît moins influencée par les sels (Hussain, 2012). En effet, à de faibles concentrations en sels, un profil typique de

réhydratation similaire à celui obtenu dans un milieu simple a été observé dans des solutions de NaCl de l'ordre de 6 % (p/p) avec une étape de mouillage accompagnée d'une formation de grumeaux, l'absence d'étape de gonflement et une dispersion rapide. Pour des concentrations de NaCl de 9 et 12 % (p/v), les temps de mouillage et de réhydratation totale ont été reportés comme étant rallongés (Hussain *et al.*, 2011).

Les protéines solubles dans une solution de $CaCl_2$ présentent elles aussi deux types de comportements. Jusqu'à une concentration de 1,5 % (p/v), les profils de turbidité ont témoigné d'un mouillage précoce et d'un temps de réhydratation rapide (Hussain *et al.*, 2011). A des concentrations plus élevées, la réhydratation n'était en revanche pas achevée, même après 500 minutes de réhydratation, avec en outre un temps de mouillage rallongé par rapport à celui observé dans un milieu simple tel que l'eau (Hussain *et al.*, 2011). La figure 10 représente les profils de turbidités obtenus lors de la réhydratation des protéines solubles dans des milieux ioniques différents à 24 °C.

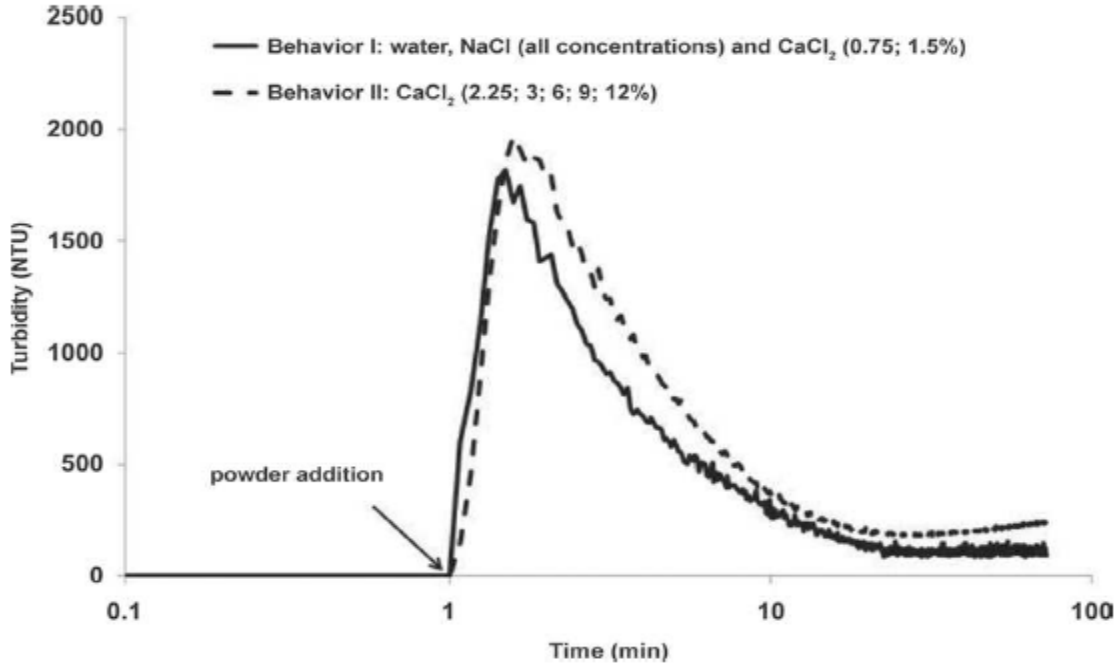


Figure 10 : Profils de turbidité (NTU, unité de turbidité néphélométrique) obtenus au cours de la réhydratation d'isolat de protéines natives de lactosérum (5 %) à 24 °C durant 1000 min dans différents milieux ioniques. Comportement I : étape de mouillage, absence d'étape de gonflement et étape complète de réhydratation (rapide). Comportement II : étape de mouillage, absence d'étape de gonflement et de réhydratation, d'après Hussain *et al.*, 2011.

Une hypothèse pouvant appuyer de tels résultats résiderait dans la dénaturation potentielle des protéines solubles suite à l'ajout de $CaCl_2$, expliquant la non-stabilité des

valeurs de turbidimétrie. Un tel comportement n'était pas reporté avec la solution de NaCl et a été expliqué par les cations monovalents qui ne joueraient pas de rôle significatif dans la dissolution des protéines solubles (Hussain, 2012).

9. Influence de l'ajout des différentes protéines laitières sur les propriétés texturales et sensorielles des gels acides

Les protéines sont les constituants du lait participant à la structuration du gel lors de sa transformation en un caillé acide, comprenant notamment les gels acides de type yaourt. Afin d'améliorer la texture des produits ainsi formés à la suite des processus de coagulation, le lait de base peut être enrichi en diverses fractions protéiques : poudres de lait, concentrés ou isolats de protéines sériques, de caséines micellaires ou caséinates (Isleten & Karagul-Yuceer, 2006 ; Saint-Eve, 2006 ; Damin *et al.,* 2009 ; Peng *et al.,* 2009). La composition du mix laitier en protéines, les différentes catégories de protéines utilisées à des fins de fortification ainsi que leurs concentrations jouent un rôle important sur les propriétés physiques et la perception texturale des gels acides obtenus. L'influence de ces facteurs a été étudiée par de nombreux auteurs (Tamime *et al.,* 1999 ; Puvanenthiran *et al.,* 2002 ; Béal & Sodini, 2003 ; Remeuf *et al.,*2003 ; Sodini *et al.,* 2004 ; Damin *et al.,* 2009 ; Peng *et al.,* 2009). La transformation du lait en un gel acide de type yaourt, la structure et la texture du yaourt ainsi que l'influence de la composition en protéines laitières sur ces différents paramètres a fait l'objet d'une revue bibliographique acceptée pour publication dans *Journal of Dairy Research* :

Effect of dairy powders fortification on yogurt textural and sensorial properties: a review

Marie Celeste Karam[1], Claire Gaiani[1]*, Chadi Hosri[2], Burgain Jennifer[1], Joël Scher[1]

Résumé

Les yaourts sont des produits laitiers dont la consommation, très répandue, a connu une accélération de sa croissance au cours des dernières décennies. Les procédés de fabrication industrielle du yaourt impliquent différentes étapes de traitement. Parmi ces dernières, l'enrichissement du lait de base en protéines constitue une étape cruciale. En effet, cela permet une amélioration considérable des propriétés nutritionnelles et fonctionnelles des

yaourts tout en diminuant leur synérèse, un défaut de texture très préjudiciable à l'acceptation du produit fini par les consommateurs. L'enrichissement en protéines peut être réalisé soit par des processus de concentration (évaporation sous vide, traitements membranaires tels que l'osmose inverse et/ou l'ultrafiltration) ou par l'addition d'ingrédients laitiers. Traditionnellement, la poudre de lait écrémé (SMP) est utilisée pour enrichir la base de lait avant l'étape de fermentation. Cependant, l'augmentation de la qualité et de la disponibilité des ingrédients laitiers tels que les isolats de protéines de lait (MPI), les protéines de lait concentré (MPC), les isolats de protéines de lactosérum (WPI) et concentrés (WPC), les caséines micellaires (MC) et caséinates a favorisé leur utilisation comme alternative à la poudre de lait écrémé. La substitution de ces différents ingrédients secs à la poudre de lait écrémé lors de la fabrication du yaourt est susceptible d'affecter la composition finale en protéines et éléments minéraux, le pouvoir tampon, les interactions entre protéines, le temps de gélification et la microstructure des gels acides obtenus. Cette revue synthétise les différents types de protéines de lait utilisés à des fins d'enrichissement et de fortification ainsi que leur influence sur les caractéristiques texturales et sensorielles du yaourt.

Mots-clés : yaourt, ajout de poudres laitières, fermentation, texture, propriétés sensorielles

ABSTRACT

Yogurts are important dairy products that have known a rapid market growth over the past few decades. Industrial yogurt manufacture involves different processing steps. Among them, protein fortification of the milk base is elemental. It greatly enhances yogurt nutritional and functional properties and prevents syneresis, an apprehended (or detrimental) yogurt textural defect. Protein enrichment can be achieved by either concentration process (evaporation under vacuum and membrane processing: reverse osmosis and/or ultrafiltration) or by addition of dairy ingredients. Traditionally, skim milk powder (SMP) is used to enrich the milk base before fermentation. However, increased quality and availability of other dairy ingredients such as milk protein isolates (MPI), milk protein concentrates (MPC) whey protein isolates (WPI) and concentrates (WPC), micellar casein (MC) and caseinates have promoted their use as alternatives for SMP. Substituting different dry ingredients for skim milk powder in yogurt making affected the yogurt mix protein and mineral composition, imparted the buffering capacity, the extent of protein interactions, the length of gelation and the microstructure of the obtained acid milk gels. This review focuses on various type of milk

protein used for fortification purposes and their influence on yogurt textural and sensorial attributes.

Keywords: yogurt, dairy powder addition, fermentation, textural, sensorial properties

Abbreviations: **MPC**: Milk Protein Concentrate, **SMP**: Skim Milk Powder, **WP**: Whey Powder, **WPC**: Whey Protein concentrate, **WPI**: Whey Protein Isolate, **MC**: Micellar Casein, **NaCn:** Sodium Caseinates, **CaCn**: Calcium Caseinate.

9.1. Introduction

Yogurt is a very popular fermented dairy product widely consumed all over the world (Lucey & Singh, 1998; Verman & Sutherland, 2004; Peng *et al.,* 2009). Three major types are found: drinking, set and stirred yogurt. The typical yogurt manufacturing process changes milk properties in an irreversible way and consists of different processing steps. First, the milk base fat content is standardized to the desired level by mixing cream and skim milk powder (Sodini & Béal, 2003; Lee & Lucey, 2010). Afterward, the non fat total solid content is traditionally increased to achieve a protein concentration between 40-50 g/kg (Sodini *et al.,* 2005). Fortification of the milk base is one of the most important steps that enhances functional and nutritional properties and prevents textural defects such as poor gel firmness and syneresis as assessed by sensory evaluations and instrumental measurements (Dave & Shah, 1998; Schodka *et al.,* 2001; Sodini & Béal, 2003; Séverin & Wenshui, 2005; Marafon *et al.,* 2011). Dry matter fortification can be achieved by either concentration process (evaporation under vacuum) followed by membrane processing (ultrafiltration or reverses osmosis) or by the addition of dairy ingredients including SMP, whey proteins, caseins and caseinates (Tamime & Robinson, 2000; Sodini & Béal, 2003; Damin *et al.,* 2009; Peng *et al.,* 2009). The fortified milk is then homogenized at 10 - 20 MPa and 5 MPa at first and second stage respectively with a temperature ranking between 55 and 65 °C (Lee & Lucey, 2010). This processing step engenders fat globules with new surface layer formed by the caseins and whey proteins increasing thus the number of possible structure-binding components in yogurt products (Lee & Lucey, 2010). The milk base is subsequently submitted to a drastic heat treatment. In fact, it is usually heated at 85 °C for 30 minutes, at 90 - 95 °C for 5 - 10 minutes or at 115 °C for 3 seconds (Sodini & Béal, 2003). Heat treatment causes whey protein denaturation which complex with themselves and casein micelles (Ozer *et al.,* 1999; Lee & Lucey, 2010; Matumoto-Punto *et al.,* 2011). Afterward, the milk base is cooled to the incubation

temperature (40 – 45 °C) (Sodini & Béal, 2003) prior to inoculation with a mixture of two homofermentative bacterial cultures: *Streptococcus thermophilus and Lactobacillus delbrueckii subs.bulgaricus* (Tamime & Robinson, 1985; Tamime & Robinson, 2000; Damin *et al.,* 2009; Peng *et al.,* 2009) which convert lactose to lactic acid. As the milk pH drops (from 6.5 to ≤ 4.6) the casein micelles lose their structural integrity, become unstable and aggregate forming thus a three-dimensional heterogeneous casein network (Ozer *et al.,* 1999; Lee & Lucey, 2010; Marafon *et al.,* 2011; Patel, 2011). Finally, fruits, flavoring ingredients, thickeners and stabilizers (when regulation permits it) are added before blast chilling and cold storage. It is important to point out that the primary aim of stabilizers addition is their ability to form linkage with protein particles resulting hence in viscosity and texture enhancement as well as mouth feel improvement (Everett & Mc Leod, 2005; Ares *et al.,* 2007). The main manufacturing procedures of set and stirred yogurts are illustrated in **Figure 11**.

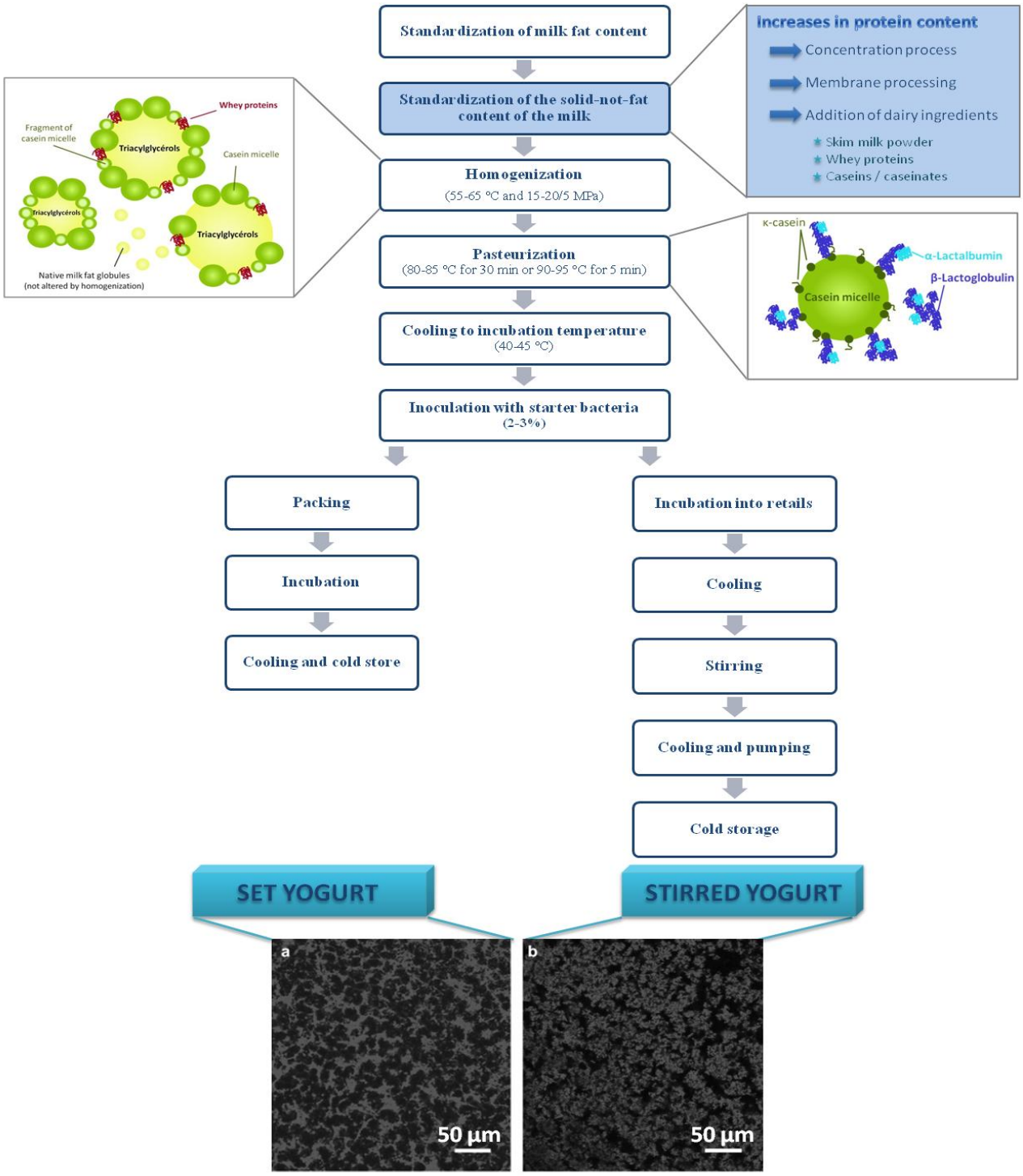


Figure 11: Main processing steps of the two major yogurt types: set and stirred yogurt (adapted from Sodini & Béal, 2003; Lee & Lucey, 2010; Pesic *et al.*, 2012, Berton-Carabin *et al.*, 2013). Confocal scanning electron microscopy images are taken from Corredig *et al.*, (2011).

It is important to remind that set and stirred yogurt are formed during incubation in retail pots and large fermentation tanks respectively. The latter being usually disrupted by agitation

(stirring) and pumped through a screen (Sodini & Béal, 2003; Lee & Lucey, 2010). It is obvious from what mentioned previously that yogurt manufacture and its feature is primary dependant on the level, nature and relative proportion of milk proteins. Indeed, methods of milk enrichment affect yogurt mix composition and impart the buffering capacity, the extent of protein interactions, the length of fermentation as well as the microstructure and hence the resulting textural and sensorial properties of the coagulum. These latter attributes are determinant features, defining yogurt quality and consumer acceptability (Kristo *et al.,* 2003; Soukoulis *et al.,* 2007; Lee & Lucey, 2010). In this review, the effects of milk fortification with various dairy ingredients on gel formation as well on physical and sensorial properties of yogurt products are described and discussed.

9.2. Formation of yogurt gels

Yogurt is typically produced by bacterial fermentation of milk with a mixture of two strains of lactic acid bacteria which converts lactose to lactic acid. The AFNOR standards recommend for "yogurt" appellation a minimum level of 10 million of living microorganism per gram of product at the time of consumption. Throughout fermentation bacterial growth of *S. thermophilus* is stimulated by Lactobacilli proteolytic activity, that of *L. Bulgaricus* by releases of formic acid and CO_2 with a final count with a dominance of *S. thermophilus* over *L. bulgaricus* (Sodini & Béal, 2003; Birollo *et al.,* 2000; Oliviera *et al.,* 2001; Damin *et al.,* 2009). It is important to point out that milk acidification has been also stimulated in model studies by the use of Glucono-delta-lactone (GDL) where the hydrolysis of GDL to gluconic acid results in pH reduction (Lucey *et al.,* 1997; Lucey *et al.,* 1998). The use of GDL avoided some of the difficulties associated with starter bacteria such as variable biological activity and variation of the type of cultures used and resulted in shorter gelation time, higher storage modulus, yield stress and spontaneous whey separation (Lucey *et al.,* 1998). From a physicochemical point of view, yogurt gel formation can be described as a two step-process (Vasbindel *et al.,* 2002). The first is attributed to the denatured whey proteins, the second corresponds to casein micelles precipitation. Indeed, as the pH of the milk base (initially near 6.7) decreases to pH 6.0, the net negative charge on the casein micelles begins to decrease leading hence to a decrease in electrostatic repulsion (Lee & Lucey, 2010). On one hand, and as the pH of milk decreases further to the vicinity of 5.0; the rate of solubilized colloidal calcium phosphate (CCP) increases (CCP is responsible for holding casein micelles together)

weakening the internal casein micelles structure and leading thus to the removal of the "hairy" layer of *k*-casein (Vasbinder & de Kruif, 2003; Lee & Lucey, 2010). This results in further decrease in electrostatic repulsion and steric stabilization. On the other hand, denaturation of whey protein subsequent to heat treatment (it is important to point out that casein micelle fraction is hardly affected by heat) results in exposure of thiol groups favoring hence disulfide links with casein micelles through thiol-group disulfide bridge exchange reaction with *k*-casein (Vasbinder *et al.*, 2004; Lakemonda & Vanvliet, 2007; Lee & Lucey, 2010) as well as whey protein precipitation at their isoelectric point initiating hence gelation. This results in a shift in gelation pH towards higher pH values due to the higher isoelectric point (pH 5.3) of whey proteins. Finally, and near the pH of 4.6 (isoelectric point of casein micelles) casein-casein interactions increase due to increased hydrophobic and electrostatic charge interactions (Horne, 1998; Lee & Lucey, 2010). The acidification process results in the formation of a three dimensional network consisting of caseins clusters, chains and strands. To conclude, the fermentation time, defined as the time required to reach pH 4.6 according to the legal yogurt time, takes 2 to 6 hours for a shift from pH 6.4 to 4.6 (De Brandere & De Baerdemader, 1999). **Figure 12** illustrates the typical pH profile in yogurt fermentation process.

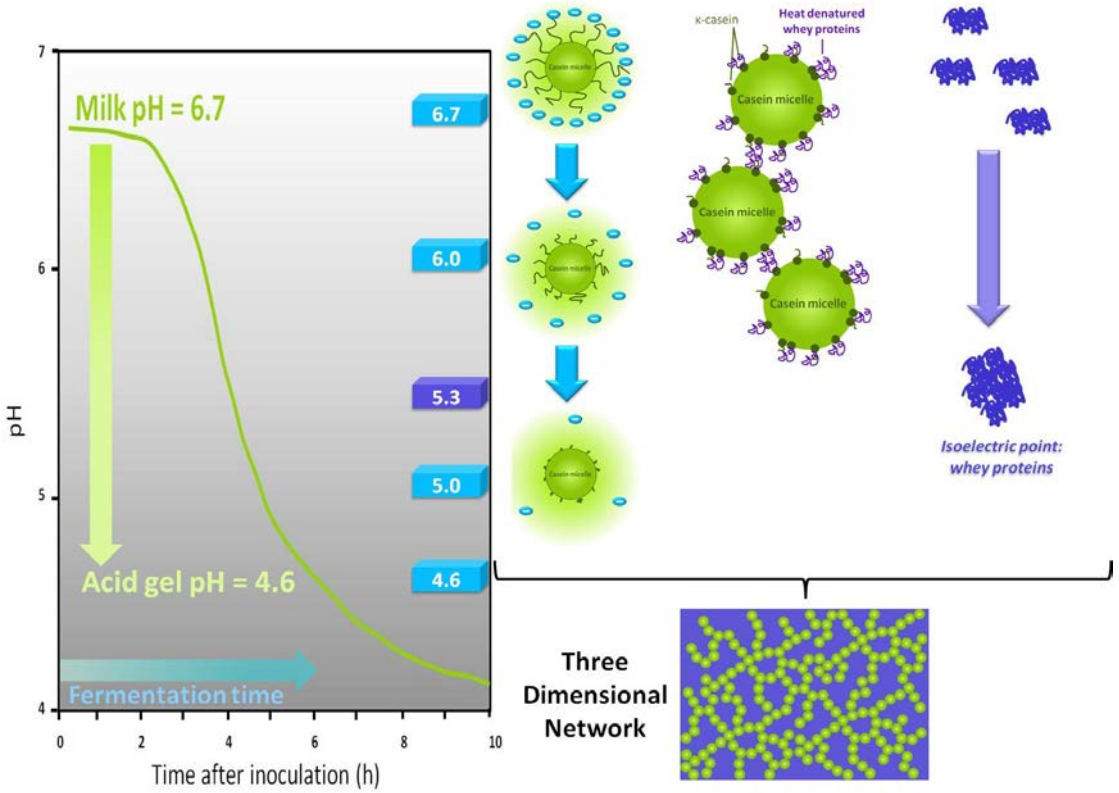


Figure 12: Typical pH profiles during the fermentation process of yogurt (adapted from De Brandere & De Baerdemader, 1999).

9.3. Textural properties of yogurt gels

Yogurt texture defines the disposition and arrangement of the different part of a system. It represents all the rheological, the structural and the sensorial properties assigned by mechanical, instrumental and visual (*i.e.* apparent viscosity) attributes (Sodini *et al.,* 2004). First, in the term of rheology, yogurt can be classified as a pseudo-elastic material that can be either viscoelastic fluid (for stirred and drinking yogurt type) or viscoelastic solid (set yogurt type). Yogurts exhibits a wide range of non-Newtonian effect such as shear-thinning, yield stress and thixotropic flow behaviors (Lucey *et al.,* 1997; Sodini *et al.,* 2004; Damin *et al.,* 2009; Lee & Lucey, 2010). Small amplitude oscillatory rheology (which does not damage the gel network) has been commonly used to characterize the rheological properties of yogurt during the gel formation process. Elastic or storage modulus, viscous modulus, loss tangent and linear viscoelastic region are rheological properties characterizing the firmness of a yogurt gel (Damin *et al.,* 2009; Lee & Lucey, 2010). Typical gelation profile of yogurt gels resulting from oscillatory rheology are characterized by a simultaneous increase in elastic modulus values (subsequent to bonds formation between protein particles and rearrangements in the protein network) and a decrease in loss tangent values due to the decrease in electrostatic repulsion and an increase in caseins-caseins interactions (Lucey, 2004; Lee & Lucey, 2010). Yield stress property of acid milk gels is another rheological parameter studied and obtained by large deformation instrumental test (Tamime & Robinson, 2000). It reflects the strength of protein-protein bonds, the number of bonds per cross section of the strand as well as the strands orientation. A low yield stress value implies a weak yogurt gel network (Lee & Lucey, 2010).

Furthermore, yogurt is organized as a concentrated dispersion of protein particles, aggregates, chains and clusters (Kalab *et al.,* 1983; Sodini *et al.,* 2004; Lee & Lucey, 2010). It is important to point out that stirred yogurt type is organized as a soft gel with weak proteins clusters making up the network. The visual observation of gel microstructure and the indirect evaluation of network homogeneity (by measurement of water holding capacity and syneresis) permit molecular evaluation of macroscopic changes of yogurt appearance. Yogurt microstructure was mainly studied by scanning or transmission electron microscopy and rarely by confocal laser microscopy (Tamime *et al.,* 1984; Gastaldi *et al.,* 1997; Remeuf *et al.,* 2003; Sodini *et al.,* 2004; Lee & Lucey, 2010). From its part, syneresis, the most dreaded yogurt defect can be explained by an unstable network, induced by either an increase in the

rearrangements of the gel network (related to the dynamics and relaxation of the protein-bonds) or a damage to the weak gel network (Lucey *et al.*,1998). Syneresis have been studied by many researcher through the use of high speed centrifugation methods which measures water holding capacity as a result of high external force or whey drainage (Tamime & Robinson, 2007).

Finally, yogurt textural characteristics are generally assessed in the cup using a spoon or in the mouth (Sodini *et al.,* 2004). The most common sensory attributes related to yogurt texture are thickness or viscosity, smoothness (opposite to lumpiness and graininess) and flavor. This latter is one of the most important attributes determining consumer acceptance (Guichard, 2002). Typical yogurt aroma is primary characterized by the presence of specific carbonyl compounds (such as acetone and acetaldehyde content) affected by protein composition (Tamime & Robinson, 2000; Isleten & Karagul-Yuceer, 2006; Saint-Eve *et al.,* 2006). Indeed, proteins interact with many flavor compounds by reversible and irreversible bindings (Guichard, 2002; Saint-Eve *et al.,* 2006). In conclusion, yogurt textural characteristics are affected by the composition of the milk base, temperature and time of heat treatment, type and amount of starter bacteria, temperature of fermentation and the storage conditions until the end shelf-life of the product (Lucey *et al.,* 1998; Kristo *et al.,* 2003; Marafon *et al.,* 2011). The only effects of the milk base (and more particularly the protein content) on yogurts textural and sensorial properties will be highlighted in the following sections.

9.4. Effect of dairy powders addition on yogurt textural properties

9.4.1. Addition of milk powder

The use of skim milk powder to fortify yogurt is preferable to whole milk powder, the latter being involved in oxidized flavor (Tamime & Robinson, 2007). The addition of SMP for fortification purposes appear to be by far the most common practice in yogurt industry (Lucey & Singh, 1998; Sodini & Béal, 2003; Soukoulis *et al.,* 2007; Damin *et al.,* 2009; Peng *et al.,* 2009) and is considered as the reference process (control) for yogurt preparation (Remeuf *et al.,* 2003; Damin *et al.,* 2009). Addition rates of skim milk powder in the yogurt mix ranges from as slight as 1 % to as high as 6 % with a recommended level of 3 – 4 % (Tamime & Robinson, 2007). In general, addition of 2 % of SMP is considered appropriate for amending yogurt textural quality (Tamime & Robinson, 2007; Soukoulis *et al.,* 2007). The addition of important amounts of SMP exceeding 6 % w/w engenders a powdery taste in yogurt products

(Tamime & Robinson, 2000). Addition of SMP has produced good quality yogurt and assisted in increasing yogurts viscosity and gel strength when compared to yogurt produced without fortification (Tamime & Robinson, 2000; Peng *et al.*, 2009; Patel, 2011). Indeed, addition of 1 %, 2 % and 3 % of SMP has increased yogurt viscosity by 22 %, 43 % and 70 % respectively (Patel, 2011). Furthermore the use of SMP for dry matter fortification seems to not affect the pH profile and development during yogurt fermentation (the sigmoidal pH decrease has occurred from the beginning of the fermentation) despite the remarkable increase in buffering capacity near the pH vicinity of 5.8 to 4.1 (De Brabandere & De Baerdemaecher, 1999; Peng *et al.*, 2009). Moreover, enrichment of yogurt mix with SMP has led to a very low graininess, lumpiness and important water holding capacity in yogurts (Remeuf *et al.*, 2003; Isleten & Karagul-Yuceer, 2006). Further, SMP fortified yogurts display an irregular gel organization with short and individualized casein filaments in addition to marked micelles fusion and numerous pores heterogeneous in size with a considerable amount (up to 50 %) of small pores (**Figure 13**) (Modler & Kalab, 1983; Guzman-Gonzalez *et al.*, 1999; Remeuf *et al.*, 2003; Damin *et al*., 2009).

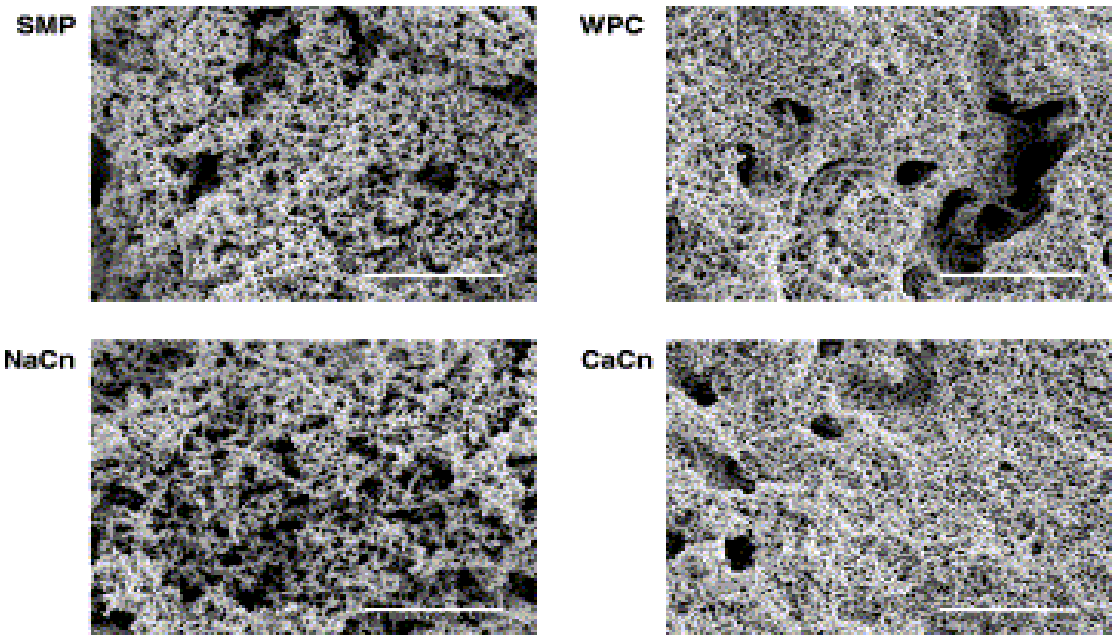


Figure 13: Microstructure of yogurt prepared with milk fortified with skim milk powder (a), sodium caseinates (b), whey protein concentrates (c) and calcium caseinates (d) by Remeuf *et al.*, (2003).

Finally, yogurts prepared from SMP have been characterized as having a marked fermented, cereal-type flavor and astringency as assessed by sensory evaluations (Isleten & Karagul-

Yuceer, 2006). SMP-fortified products have been also distinguished by their richly mineral composition (in calcium, magnesium, copper, zinc, potassium and manganese) as well as their tyrosine content (Isleten & Karagul-Yuceer, 2008).

In conclusion, standardization of the total solid content of the milk base with SMP and the specifications of the used SMP seem to be insufficient to produce yogurt of consistent physical attributes over the season. Moreover, the potential development of excess acidity of the final product subsequent to the important lactose content of the powder remains the limiting factor for the use of SMP (Tamime & Robinson, 2007; Patel, 2011). It is important to point out that excessive acidification below the pH of 4 might enhance whey separation and gel defects in the final products (Jaros & Rohm, 2003).

9.4.2. Addition of whey powder

Whey proteins are the class of milk proteins that remains soluble after rennet or acid precipitation (Considine *et al.,* 2011). They are a by-product from cheese industry, processed generally by ultrafiltration and spray drying (Gonzalez-Martinez *et al.,* 2002; Sodini *et al.,* 2005). These globular structured proteins are of many types: whey protein concentrates (WPC), whey protein isolates (WPI) and whey protein hydrolysates (WPH). Their characteristics differ regarding the processing conditions practiced before drying such as demineralization, lactose removal, whey protein concentration or straightforward drying (Boudier & Schuck, 2010). The addition of whey proteins to fortify yogurt mixes has gained interest because of their nutritional and functional attributes (Séverin & Wenshui, 2005; Sodini *et al.,* 2005; Isleten & Karagul-Yuceer, 2006). Indeed, whey proteins are valuable dairy ingredients with their high protein (branched amino-acids), mineral (calcium, potassium) content (Ha & Zemel, 2003; Séverin & Wenshui, 2005; Sodini *et al.,* 2005), functional properties of emulsification, water-holding, foaming, thickening and gelling characteristics (Guzman-Gonzalez *et al.,* 2002). Moreover, whey protein may form a tightly-packed viscoelastic structure at their interfaces, favoring hence long term stability (Tamime & Robinson, 2000).

Whey protein powder was used to fortify yogurt mixes at levels ranging between 0.6 to 4 % w/w (considered as an upper limit) (Tamime & Robinson, 2007; Lee & Lucey, 2010). However the recommended level of whey protein addition to dairy products is around 1 to 2 % w/w since higher levels may impart an undesirable whey flavor as well as under some

conditions a grainy texture (Gonzalez-Martinez *et al.,* 2002; Lucey & Singh, 1997; Tamime & Robinson, 1999). Addition of WPC to milk bases seems to be a more popular practice than WPI addition even though that these latter powders contain higher whey protein content and branched-amino acids (> 90 % vs. 60 – 85 %) and relatively lower concentration of lactose and minerals (Considine *et al.,*2011). The effect of replacement of SMP by whey proteins on physical and textural properties of yogurts have been studied by many authors (Modler & Kalab, 1989; Lucey *et al.,* 1999; Guzman-Gonzalez *et al.,* 1999; Guzman-Martinez *et al.,* 2002; Puvanenthiran *et al.,* 2002; Remeuf *et al.,* 2003; Sodini *et al.,* 2005; Amatayakul *et al.,* 2006; Herrero & Requana, 2006; Aziznia *et al.,* 2008; Damin *et al.,* 2009) and a range of inconsistent effects have been reported. First, according to Guzman-Martinez *et al.,* (2002), yogurt samples fortified with WP showed a slower decrease in pH values in the first fermentation stage. This behavior can be attributed to the lower lactose concentration in WP fortified yogurts (Penna *et al.,* 1997). While Penna *et al.,* (1997), Lee & Lucey, (2010), Lucey *et al.,* (1997), Soukoulis *et al.,* (2007), found a reduction in acidification/gelation time for yogurt mix supplemented with WPC, an opposite effect was reported by Puvanenthiran *et al.,* (2002) and Damin *et al.,* (2009). From their part, Islenten & Karagul-Yuceer (2006) reported that milk fortification with WP isolates did not affect fermentation time ($t_{pH\ 4.7}$). A similar tendency was observed by Marafon *et al.,* (2011) in WPC fortified probiotic yogurt. The observed decrease in fermentation in yogurt mix fortified with WPC can be explained by WPC susceptibility to heat coagulation (Thomopoulos *et al.,* 1993; Shaker *et al.,* 2001) related to their high calcium content making thus the solution unstable (Lee & Lucey, 2010). In contrast, the observed increase in fermentation time has been explained by an increase in buffering capacity of the mix when the casein to whey ratio is altered (Puvanenthiran *et al.,* 2002). To continue, addition of WPC to yogurt mix seems to sustain a constant cell count of the typical starter culture (*Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*) in the inoculum with the dominance of *S. thermophilus* strain over *L. bulgaricus* (Lucey *et al.,* 1998; Birollo *et al.,* 2000; Oliveira *et al.,* 2001; Isleten & Karagul-Yuceer, 2008; Damin *et al.,* 2009). Nevertheless, and according to Mc Comas & Gilliland (2003) and Tamime & Robinson (2007), an enhanced growth of some probiotic species (*Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum*) was observed in yogurt with mix supplemented with WPC. Furthermore, whereas in some studies WP addition favors yogurt viscosity, firmness and gel strength (G') and reduce syneresis (Lucey *et al.,* 1999; Bhullar *et al.,* 2002; Haque & Ji, 2003; Remeuf *et al.,* 2003; Isleten & Karagul-Yuceer, 2006; Tamime & Robinson, 2007; Lee &

Luvey, 2010), it seems in others insufficient to improve its quality profile (Guzman-Gonzalez *et al.,* 1999; Gonzalez-Martinez *et al.,* 2002; Sodini *et al.,* 2005). Many mechanisms may be put forward to explain these inconsistencies. In one hand, heat treatment of yogurt mix fortified with WP leads to a high level of cross-linking within the gel network explaining thus the observed increase in yogurt viscosity and water holding capacity (Remeuf *et al.,* 2003). Moreover, as the casein to whey ratio decreases, the gel network becomes finer, the cross-link denser and pores smaller resulting hence in a decreased amount of syneresis (Puvanenthiran *et al.,* 2002). On the other hand, some authors have reported that interactions between serum proteins and *k*-caseins, make micelles less sensitive to the pH decrease enhancing thus their solvatation rather than their aggregation and contributing hence to weaker gels (Oldifield *et al.,* 2000; Gonzalez-Martinez *et al.,* 2002). Further, some researchers believe that the more open gel structure formed with low casein content will make the aggregate network more sensitive to syneresis (Gonzalez-Martinez *et al.,* 2002).

Besides, the replacement of SMP by WPC imparted yogurt's microstructure (**Figure 13**). Some studies describe WPC-enriched as a very fine network containing a lot of very small pores (Remeuf *et al.,* 2003; Saint-Eve *et al.,* 2006) and where casein micelles appear as individual (not fused) entities and casein micelle chains are less apparent (Remeuf *et al.,* 2003; Tamime & Robinson, 2000). Others described it as a more compact flocculated protein matrix with more obvious micelle chains (Modler, 1983) and larger pore and whey protein aggregates (Krzeminski *et al.,* 2011). In the matter of fact, these different microstructure observations can be explained with respect to WPC isolation method: ultrafiltration and ion exchange (representing an individual micelle structure delimited by flocculated proteins) or electrodialyses (compact flocculated matrix with apparent micelle chains) (Modler, 1983).

Finally, WPC-fortified yogurts are characterized by limited acetaldehyde content according to Isleten & Karagul-Yuceer (2008) and important acetaldehyde content according to Tamime & Robinson (2007), a subtle fermented and creamy flavor, a pronounced whey flavor and an appreciable sweetness (Isleten & karagul-Yuceer, 2006). In addition, WPC-enriched yogurts are distinguished by a homogeneous fluid, a soft gel exempt of lumps and a yellowish aspect (Gonzalez-Martinez *et al.,* 2002). In terms of consumer acceptance, the data is also conflicting: WPC fortified products were preferred by panelist in some studies and rejected in others (Gonzalez-Martinez *et al.,* 2002; Isleten & Karagul-Yuceer, 2006).

Two main conclusions can be drawn from what was previously reported. These apparent contradictions in the literature are primary due to the different methods used to determine the

physical and rheological properties of yogurts in these studies and to the variation in functional properties of WPC. For instance, the increase and decrease in fermentation time may be explained by the demineralized whey fraction; fermentation time being reduced in line with increases in demineralized whey (Gonzalez-Martinez *et al.,* 2002). Further, the degree of whey protein denaturation, the level of non-protein nitrogen in WPC (Sodini *et al.,* 2005) as well as the casein to whey ratio (Puvanenthiran *et al.,* 2002) can explain some inconsistencies between studies. As a final point, WPC fortification of the milk base appears very suitable for drinking yogurt production (Ozen & Kilic, 2009).

9.4.3. Addition of casein powder

Caseins are the most important class of proteins in bovine milk (Wastra *et al.,* 1999; Hussain *et al.,* 2012). They are recognized for their binding, foaming, gel foaming, thickening and emulsifying capacities (Wastra *et al.,* 1999). This later property is mainly due to its high proline content (Chen, 2002; Khwaldia *et al.,* 2004). Micellar caseins (or native phosphocaseins) are prepared by microfiltration (to reduce whey protein concentration) and have undergone extensive diafiltration (Peng *et al.,* 2009). For their part, caseinates are obtained by skim milk acidification to pH 4.6 (leading thus to casein precipitation) followed by water washing (to remove the soluble components) and final pH neutralization (Fabra *et al.,* 2010). Regarding the alkali used to adjust the pH, the recovered caseinate fraction is termed sodium (NaCn), calcium (CaCn), magnesium (MgCn) or potassium caseinate (KCn) when NaOH, CaOH, MgOH or KOH are respectively used (Fabra *et al.,* 2010). Among NaCn and CaCn are the most commonly used in dairy industry. Nevertheless, due to variations in their aggregates state, calcium caseinates have less emulsifying abilities than NaCn, limiting eventually their use in dairy applications (Fabra *et al.,* 2010). Addition rate of MC and caseinates in yogurt mix is between 1 to 2 % w/w. Higher amounts of caseinates addition impart uncontrolled thickening (Tamime & Robinson, 2000). The addition of MC to yogurt mix greatly increases the buffering capacity around pH 5 during acidification consistent with high concentration of total calcium and insoluble calcium content (Peng *et al.,* 2009). In contrast, addition of sodium caseinates considerably decreased the buffering capacity in the vicinity of pH during acidification. Addition of NaCn might have solubilized some of the colloidal calcium phosphate from the casein micelles in milk. Indeed, it has been reported that NaCl addition to milk can lead to exchange of colloidal calcium by sodium (Peng *et al.,*

2009). The increased buffering capacity in MC fortified yogurt justifies the different observed pH profiles and the slow rate of decrease in pH close to 5. The slow rate of pH decrease is probably accountable of the longer fermentation time (Peng *et al.,* 2009). On the contrary, fermentation time ($t_{pH4.5}$) was decreased in yogurt mix enriched with sodium caseinates according to Damin *et al.,* (2009). However, Isleten & Karagur-Yuceer (2006) and Peng *et al.,* (2009) reported a constant fermentation time for yogurt supplemented with different dairy powders (SMP, WPC and NaCn). Furthermore, yogurt fortification with NaCn seems to not affect the ultimate bacterial counts of yogurt cultures (Damin *et al.,* 2009; Marafon *et al.,* 2011). Further, in term of rheology, MC fortified yogurt displayed the lowest G' and yield stress values (Peng *et al.,* 2009). Contrarily, acid-induced gels made from NaCn had the maximal loss tangent, yield stress and G' values (Damin *et al.,* 2009; Peng *et al.,* 2009). In fact, many authors reported that yogurt fortification with NaCn resulted in higher viscosity, firmness and stronger networks and less syneresis than yogurt fortified with different types of milk protein ingredients (Bremer *et al.,* 1990; Rohm, 1993; Guzman-Gonzalez *et al.,* 2000; Remeuf *et al.,* 2003; Isleten & Karagul, 2006; Damin *et al.,* 2009; Peng *et al.,* 2009). The slow solubilization during fermentation process of high CCP amounts, may have contributed to the decrease in G' values. Tamime *et al.,* (1984) have concluded that NaCn fortification of the milk base is the most effective means of increasing yogurt firmness. This latter finding is believed to be caused by the partial removal of CCP (subsequent to NaCn addition) affecting the internal structure of caseins micelle, increasing their mobility, contact area and thus the elastic modulus (Peng *et al.,* 2009). The structure of yogurt enriched with casein-based ingredients differs from that fortified with other milk proteins ingredients (**Figure 12**). To our knowledge, the microstructure of yogurt made with MC has not been assessed. Nonetheless, Peng *et al.,* (2009) reported the highest permeability values for yogurt supplemented with MC. Once again, this could be related to the extended time remained at pH values near 5 which allowed particles rearrangement after gelation. High permeability value reflects inhomogenities in gel network and implies a coarse gel with larger pores (Lucey *et al.,* 1997; Peng *et al.,* 2009). The milk supplementation with sodium caseinates seems to impact severely yogurt microstructure (Modler, 1983). NaCn fortified yogurts have fewer pores and exhibit a relatively coarse and loose structure with the largest casein micelles and an extensive micelle cluster (Tamime *et al.,* 1984; Tamime & Robinson, 2000; Remeuf *et al.,* 2003; Damin *et al.,* 2009). Some authors reported that calcium caseinates fortified yogurts showed a dense,

more compact and finely performed microstructure comparable to that of yogurt prepared with WPC (Remeuf *et al.*, 2003; Akalain *et al.*, 2008).

Finally, NaCn fortified yogurts are characterized by a poor content in some minerals such as copper, magnesium, potassium, iron and calcium. It is important to point out that MC-fortified yogurt encompasses an important calcium, sodium and zinc content (Guzman-Gonzalez *et al.*, 2000; Isleten & Karagul-Yuceer, 2006; Peng *et al.*, 2009). They are also characterized by a flat lumpiness, an important acetaldehyde amount, a pronounced animal like, cereal and cardboard flavor, a marked aftertaste, an astringency taste and finally, a poor sweetness flavor (Lucey *et al.*, 1998; Isleten & Karagul-Yuceer, 2006). In term of consumer acceptance, while some panelist in some studies preferred NaCn fortified yogurts (Isleten & Karagul-Yuceer, 2008), others reject it and found it inacceptable (Tamine, 1984).

In conclusion, the difference among MC and NaCn effect on yogurt products could be explained by the very different physicochemical properties of both powders as well as the micellar state of casein in these powders and the non-micellar soluble form of caseins present in sodium caseinates.

The **Table 6** recapitulates the most common dairy powder listed above and used in yogurt formulation as well as their influence on products textural attributes.

Table 6: Summary of the three most common dairy powders added in yogurt formulation and their main influences on products textural properties from Guzman-Gonzalez *et al.*, 1999; Gonzalez-Martinez *et al.*, 2002; Remeuf *et al.*, 2003; Isleten & Karagul-Yuceer, 2006; Tamime & Robinson, 2007; Isleten & Karagul-Yuceer, 2008; Damin *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2009).

Powder type added	**Recommended addition rates**	**Effect on pH profile**	**Physical properties**	**Microstructure**	**Sensorial properties**	**Specifications**	**Conclusion**
Skim milk powder	3-4 %	An increase in buffering capacity near the vicinity of 5.8 to 4.1	A good viscosity and a poor rate of graininess and lumpiness	An irregular gel organization with short casein filaments and numerous pores heterogeneous in size	A marked fermented and astringent taste	Yogurt products rich in mineral composition (particularly, in calcium); and rich in lactose	The control method but insufficient to produce a yogurt of consistent textural characteristics all over the season
Whey proteins concentrates	1-2 %	A slow decrease in pH values in the first fermentation stage	An opposite tendency of increased and decreased firmness and viscosity	A very fine gel network with very small pores with less or more obvious casein micelles chains	A marked fermented, creamy and whey flavor and an appreciable sweetness	Yogurt products poor in lactose content	Resulting properties primary rely on powder characteristics Their use is appropriate for drinking yogurt
Sodium caseinates	1-2 %	A decrease in the buffering capacity near the vicinity of 5	A remarkable increase in yogurt firmness and viscosity	A coarse and loose gel network with few pores and large casein micelles and extensive caseins clusters	A marked aftertaste and astringency	Yogurt products with a poor mineral content	The best fortification method in means of increasing yogurt physical attributes

9.5. Addition of other dairy ingredients and protein blends

The addition of other dairy ingredients (than WP, casein and caseinates) has been reported during yogurt manufacture in some instance. The addition of milk protein hydrolysates (in the range of 0.3 – 0.5 g/100 g) (casein and whey) reduced the fermentation time, increased yogurt viscosity, decreased yogurt graininess and syneresis and resulted in a more open gel microstructure with fewer branched proteins (Sodini & Beal, 2005; Zhao *et al.,* 2006; Tamime & Robinson, 2007). Moreover, the addition of casein hydrolysates stimulated the growth of *Streptococcus thermophilus* (Tamime & Robinson, 2007) and enhanced the cell counts of probiotic microorganisms in yogurt (Oliviera *et al.,* 2002; Sodini *et al.,* 2002; Mc Comas & Gilliland, 2003; Lucas *et al.,* 2004; Tamime & Robinson, 2007). Furthermore, milk protein concentrates and isolates have been added to increase the protein content of yogurt mix (Chandan & Shahani, 1995) and produced firm yogurts (Tamime & Robinson, 2007) with improved viscosity and gel strength up to 100 % and 50 % respectively regarding SMP for milk protein concentrates (Patel, 2011). Moreover, fresh buttermilk powder was used up to 50 % as a replacement of SMP in yogurt manufacture and produced an acceptable soft and smooth textured yogurt. The use of fresh buttermilk powder concentrated by ultrafiltration has been also reported in the literature. The yogurt products obtained present a denser matrix and a lower syneresis, but an impaired flavor and aroma (Tamime & Robinson, 2007; Lee & Lucey, 2010).

Finally, blends of different type of milk protein (such as SMP and sweet whey powder in a ratio of 75:25; whey and casein in a 1:1 ratio; CaCn and WP in a ratio of 1:1; SMP and WPC in a ratio of 1.5:0.5; and finally blends of NaCn and CaCn) have been used in yogurt manufacture and resulted in an overall good quality product in terms of sensory and texture profiles as well as extent of syneresis (Gonzalez-Martinez, 2002; Augustin *et al.,* 2003; Tamime & Robinson, 2007).

9.6. Conclusion

Miscellaneous dairy ingredients can be added to the yogurt milk bases for fortification purposes. These methods of milk protein enrichment will not have the same consequences on the protein and mineral composition of the milk base, the length of fermentation process, extent of proteins interactions and the microstructure of the coagulum. To sum up,

fortification with skim milk powder seems insufficient to produce yogurts of consistent physical properties over the entire season. Addition of WPC seems to be highly dependent on the specifications of the powders employed and appears definitely appropriate for drinking yogurt production. Addition of sodium caseinates seems to be the most effective in means of increasing yogurt textural characteristics. Lastly, using blends of different dairy ingredients in a proper ratio appears as a useful and interesting perspective for yogurt mix fortification.

10. Synthèse et positionnement de l'étude

Ce travail s'articule autour de deux volets complémentaires. La fabrication de laits fermentés de type yaourt se caractérise par plusieurs étapes parmi lesquelles la fortification du lait de base en protéines. Cette étape s'avère indispensable à l'obtention de produits de bonne qualité texturale et exempts de synérèse. Cependant, une mauvaise réhydratation des poudres ajoutées peut être source d'altération de la bonne perception du produit fini, en particulier du fait de la formation de grumeaux, un défaut textural redouté. La réhydratation des poudres laitières a été à ce jour appréhendée essentiellement dans un milieu simple (eau) et ionique (contenant du chlorure de calcium ou du chlorure de sodium). Aussi, le premier axe de ce travail de thèse repose sur l'étude de la réhydratation des protéines laitières dans un milieu opaque et complexe : le lait. Etant donné que certaines protéines laitières présentent un processus de réhydratation complexe et dans la mesure où une réhydratation totale de ces poudres est souhaitable pour l'obtention de laits fermentés de structure lisse, l'étude de l'état d'hydratation de ces protéines laitières sur la structure et la texture des laits acidifiés résultants constituent le deuxième volet majeur du travail. En outre, il est à préciser que traditionnellement (et par définition) l'acidification du lait est obtenue par fermentation lactique. Dans le cadre de notre démarche expérimentale, cette fermentation n'a pu être envisagée en raison des difficultés à contrôler l'activité bactérienne (Desobry-Banon, 1991) (afin de garantir notamment des conditions de répétabilité au cours des différentes séries d'expérimentation), des facultés d'adaptation biologique des ferments à la variation des paramètres et à la complexité physico-chimique des systèmes d'étude. Par conséquent, notre choix pour l'acidification du lait s'est porté sur l'utilisation de la Glucono-delta-lactone (GDL), assurant une acidification lente du milieu par analogie à la fermentation lactique.

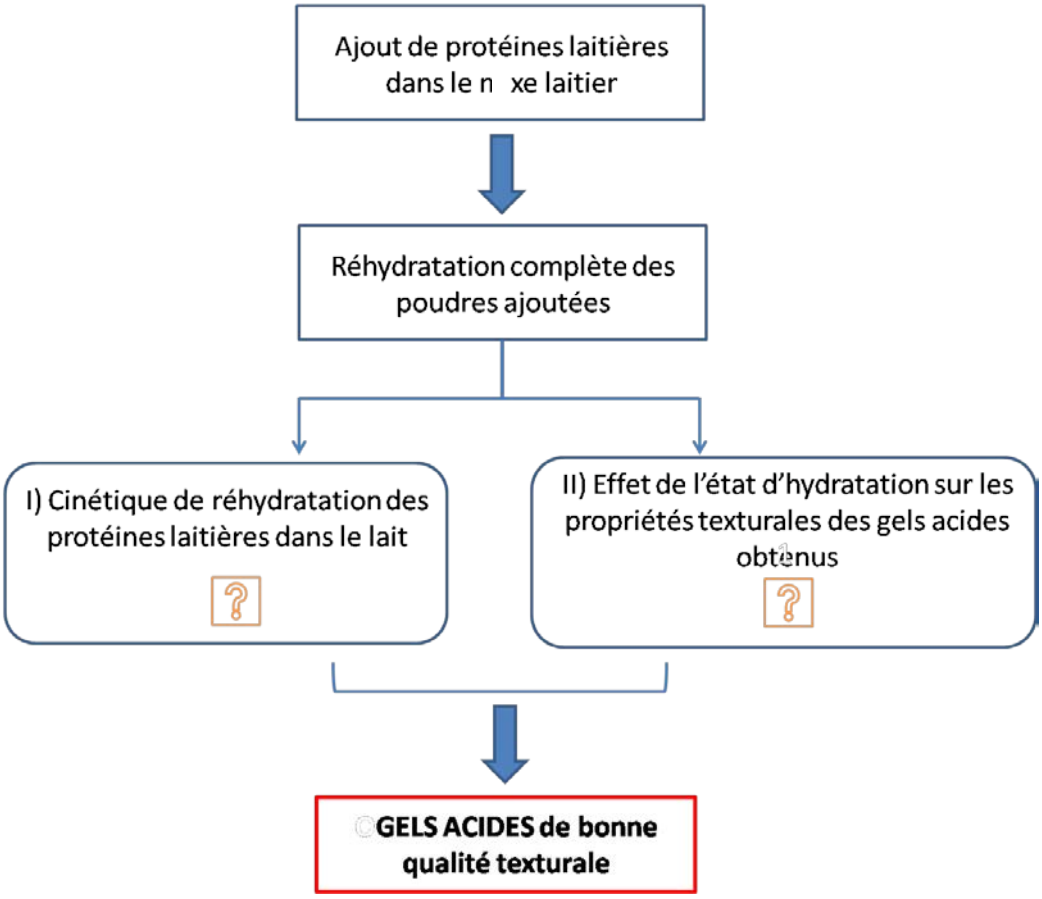


Figure 14 : Schéma des principaux objectifs de la thèse.

Matériels et méthodes

1. Les matières premières utilisées tout au long de cette étude

Pour l'ensemble des travaux, la poudre de lait écrémé « low heat » a été utilisée pour la reconstitution du lait de base (ou mix laitier). Toutes les quantités nécessaires à la réalisation des différentes expérimentations ont été prélevées à partir d'un même lot fourni par Lactalis (Lactalis Ingredients, Bourgbarré, France).

Les ingrédients laitiers tels que les isolats de protéines de lactosérum (WPI) natives et dénaturées d'une part, ainsi que les poudres de caséines micellaires (MC) « anciennes » (datant de douze mois) et celles considérées comme « récentes » (datant de deux mois) d'autre part, ont été respectivement procurés auprès de Lactalis (Lactalis Ingredients, Bourgbarré, France) et de « International Dairy Ingredient SAS» (IDI SAS, Arras, France). Toutes les poudres sont conservées sous vide en sachets de 200 g, à l'abri de la lumière et de l'humidité à une température de 20 °C. Les isolats de protéiques sériques natives ont été dénaturés par chauffage à sec à l'étuve à 103 °C pendant deux heures.

La Glucono-delta-lactone (GDL), l'azoture de sodium (ou azide de sodium) et le colorant alimentaire « Fast Green FCF » ont été fournis par Merck (Merck & Co, Inc, Whitehouse station, NJ, USA).

2. Les méthodes

2.1. Caractérisation physico-chimique des poudres

2.1.1. Détermination de la teneur en cendres

La teneur en cendres est déterminée d'après la norme décrite par l'ADPI (2002c) par minéralisation de 2 g de poudre de lait dans des creusets en porcelaine de 42 mm de diamètre et de 50 mm de profondeur. Ces derniers sont placés dans un four à moufles à 550 °C durant 5 h jusqu'à l'obtention des cendres blanches. La pesée s'effectue ensuite à 0,1 mg près.

2.1.2. Détermination de la teneur en eau

La teneur en eau est déterminée selon la norme AFNOR (1978) par étuvage de 2 g de poudre durant trois heures à 103 °C et par pesée suite au refroidissement dans un dessiccateur en présence d'anhydride phosphorique P_2O_5.

2.1.3. Dosage du lactose

La teneur en lactose est déterminée par dosage enzymatique à partir d'un kit commercial (Enzytec. Lactose/D-Galactose kit ; Diffchamb France SARL, Lyon, France). Les échantillons sont préalablement clarifiés avec les réactifs de Carrez. Le lactose est hydrolysé (en glucose et D-galactose), la réaction étant catalysée par la β-galactosidase. Le D-galactose est ensuite oxydé en acide galactonique. La réaction est couplée à la production de NADH quantifié indirectement par mesure d'absorbance à 340 nm.

2.1.4. Dosage de la matière grasse

La teneur en lipides est déterminée selon la norme FIL (1987) de Röse Gottlieb, basée sur l'extraction des lipides par les solvants d'éther diéthylique et d'éther de pétrole. Ces solvants organiques sont ensuite évaporés sous hotte et les lipides extraits pesés à 0,1 mg près.

2.1.5. Dosage des protéines

2.1.5.1. Teneur en protéines totales

Les teneurs en protéines des poudres sont déterminées d'après la méthode Kjeldahl (AOAC, 1984) avec un facteur de conversion de 6,38.

2.1.5.2. Détermination du pourcentage de protéines solubles dénaturées

Le pourcentage de dénaturation des protéines solubles est déterminé par la mesure de la quantité d'azote soluble après centrifugation d'une solution protéique à 5 % pendant 30 min à 3000 g (Fil, 1995). Les protéines sont précipitées à pH 4,6 et le filtrat est dosé par Kjeldahl. A ce pH, les protéines dénaturées sont insolubles. Elles se retrouvent dans le culot et le surnageant contient quant à lui les protéines natives.

2.2. Caractérisation physique de la taille des particules

La distribution initiale de la taille des particules des différentes poudres a été déterminée grâce à un granulomètre laser de marque QICPIC (S*ympatec GmbH, Clausthal-Zellerfeld, Germany*). A cet effet, 0,25 g de poudre sont dispersés dans 75 ml d'éthanol pur anhydre. Le traitement des données est assuré à l'aide du logiciel WINDOX 5.4.10 (*Windox 5.4 – 2007, Sympatec GmbH, Clausthal-Zellerfeld, Germany).* Le principe de cet outil sera décrit avec précision dans le paragraphe 2.5.

2.3. Détermination de la solubilité des poudres de caséines micellaires

La solubilité des caséines micellaires dans les mixes laitiers a été estimée d'après la méthode de la Fédération Internationale de Laiterie (IDF, 1988) modifiée. Brièvement, 2 g de poudre sont incorporés dans 100 ml de lait afin de permettre leur solubilisation. Différents temps de réhydratation (à 20 °C) sont évalués, *i.e.* 5 min, 120 min (2 h), 180 min (3 h), 240 min (4 h), 300 min (5 h), 480 min (8 h), 900 min (15 h) ou 1440 min (24 h), au bout desquels les dispersions sont centrifugées à 266 g durant 20 minutes. Pour chaque échantillon, le surnageant est retiré et le culot mis à sécher durant une nuit à l'étuve à 103 °C avant pesée du sédiment restant. L'indice de solubilité (exprimé en %) est finalement calculé comme la différence entre la quantité de poudre initialement ajoutée (2 g) et celle restante dans le sédiment.

2.4. Préparation du mix laitier et formation des gels acides

Les mix laitiers (lait de base) sont réalisés en reconstituant la poudre de lait écrémé dans de l'eau distillée pour atteindre une concentration en extrait sec total de 10 % p/p. De l'azoture de sodium est ajouté (0,02 % p/p) afin d'éviter toute prolifération microbienne. Le mix est stocké à 4 °C une nuit sous agitation orbitale à 300 tr/min préalablement à toute analyse. Il est ensuite enrichi par des isolats de protéines solubles natives ou dénaturées (obtenues par chauffage à sec à 103 °C durant 2 h) ou par des poudres de caséines micellaires récentes ou anciennes afin d'obtenir une concentration finale en extrait sec total de 12 % (p/p). Les poudres ajoutées sont ainsi soumises à la réhydratation durant 5 min, 120 min (2 h), 180 min (3 h), 240 min (4 h), 300 min (5 h), 480 min (8 h), 900 min (15 h) ou 1440 min (24

h) sous agitation orbitale (300 tr/min) à 20 °C avant les phases d'acidification et de traitement thermique (lorsqu'il y a lieu). Deux catégories de gels acides, avec ou sans traitement thermique préalable, sont alors obtenues (figure 15).

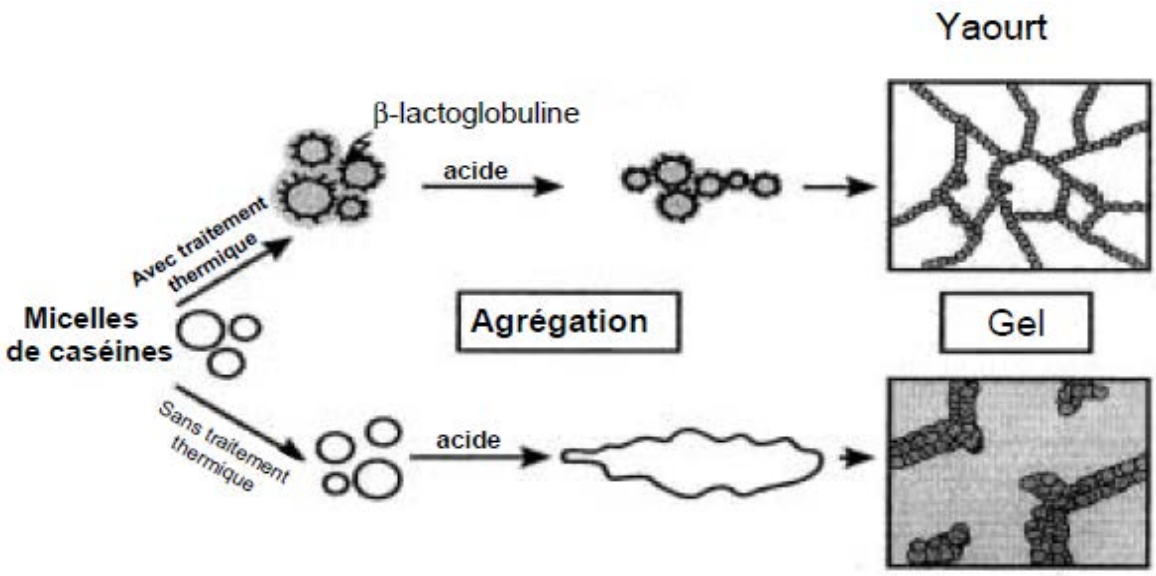


Figure 15 : Effet du traitement thermique sur la microstructure d'un gel acide de type yaourt. Les micelles de caséines forment des chaînettes liées entre elles à l'issue du chauffage du lait lors de la fabrication du yaourt, alors qu'elles forment des agrégats en absence de traitement thermique (d'après Kessler, 1998).

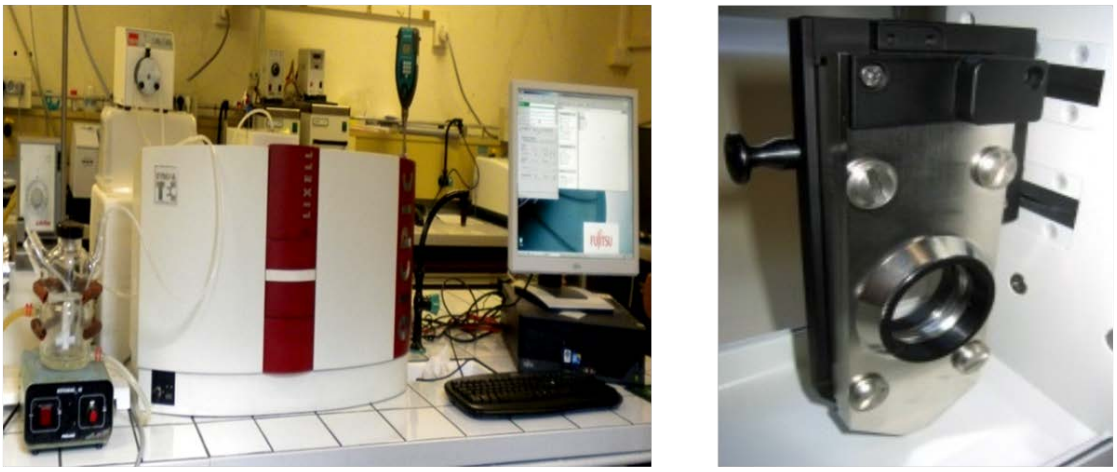
Les mix qui subissent un traitement thermique intense sont chauffés à 95 °C pendant 5 min dans un bain-marie thermostaté, simulant ainsi les procédés généralement employés en industrie. Ils sont ensuite refroidis dans un bain d'eau glacée jusqu'à retrouver une température de 42 °C. L'acidification quant à elle est obtenue par ajout de 1,5 % (p/p) d'un acidifiant chimique (additif alimentaire E575) : la Glucono-delta-lactone (GDL), l'ensemble étant porté à une température de 42 °C. En solution aqueuse, la GDL s'hydrolyse lentement en acide gluconique, conduisant à l'acidification du milieu jusqu'à l'obtention d'un équilibre entre l'acide gluconique et la forme native. Tout au long du processus d'acidification, le pH de la solution est suivi par une sonde de pH-mètrie *(Radiometer Analytical SAS, France)* étalonnées à 42 °C et les échantillons sont extraits du bain-marie une fois le pH de 4,6 atteint. Le choix de cette méthode d'acidification par utilisation d'un acidifiant chimique s'explique afin d'éviter tout artefact supplémentaire résultant de l'activité bactérienne (et des variations biologiques inhérentes au type de culture (souche) utilisée). L'acidification à une concentration en GDL de 1,5 % (p/p) à 42 °C a été définie dans la mesure où la cinétique

d’acidification qui en découle permet d’acquérir des informations sur les transformations physico-chimiques du lait, de manière analogue à celles engendrées par la diminution de pH lors de la fabrication du yaourt en industrie (Banon-Desobry, 1991). Les gels acides ainsi obtenus sont refroidis dans un bain d’eau glacée jusqu’à une température de 7 °C avant d’être stocké dans une chambre froide à 4 °C.

2.5. Cinétique de réhydratation des protéines laitières dans un milieu complexe : le lait

Principe

La cinétique de réhydratation des protéines laitières étudiées est suivie par un granulomètre laser de marque QICPIC (Sympatec, GmbH,System-partikel-Technik, Allemagne) équipé d’une caméra (figures 15 et 16). L’analyse granulométrique consiste en la détermination de la taille des particules élémentaires d‘une suspension et de leur fréquence statistique. L’appareillage QICPIC permet ainsi d’analyser par diffraction laser des particules de taille allant de 0,1 µm à 1750 µm (Hussain, 2012). Le fonctionnement de l’appareil repose sur un principe combinant une analyse d’image dynamique à un système de dispersion (LIXELL, développé par Sympatec ; Witt *et al.,* 2008) au sein duquel sont passés les échantillons à analyser (figure 16A et 17).



A B

Figure 16: Granulomètre QICPIC (A) avec système de dispersion LIXELL (B).

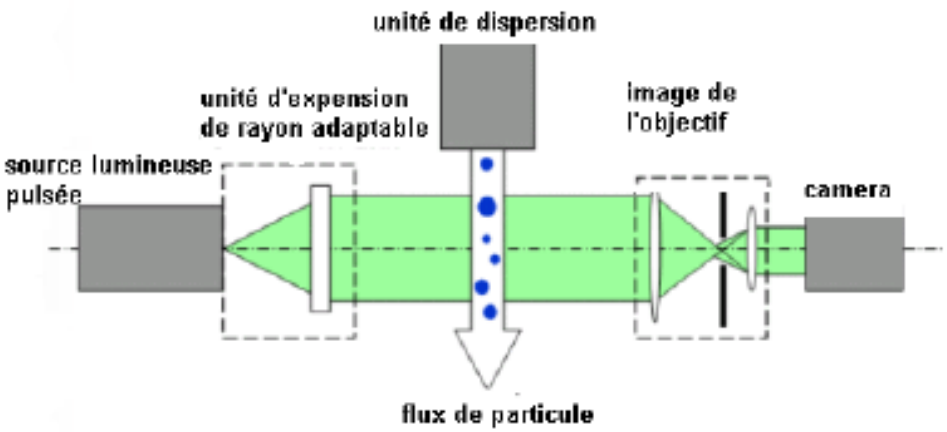


Figure 17 : Principe de fonctionnement du QICPIC.

Méthode

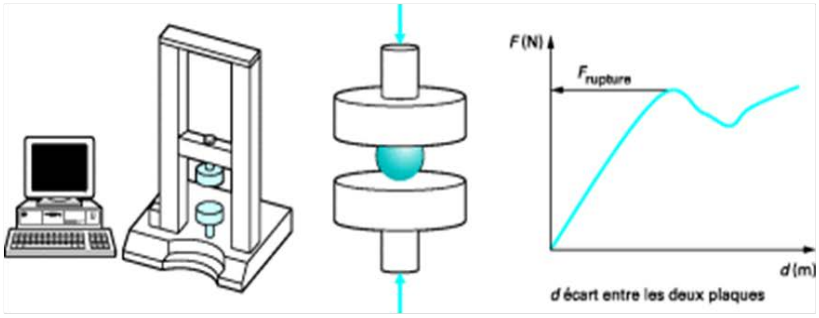
La position de la cuvette tout au long de l'axe optique est contrôlée par le logiciel WINDOX 5.4.10 (Sympatec GmbH, Allemagne). La cuvette utilisée, permettant de visualiser des particules dans un milieu opaque et turbide comme le lait, a une longueur de trajet optique de 200 µm. Après traitement d'image (par ce même logiciel), le QICPIC permet de mesurer différents paramètres caractérisant la taille des particules (diamètre de Ferret, équivalent sphérique, longueur totale (LEFI) etc), ainsi qu'une analyse de forme (bidimensionnelle) des particules (rapport hauteur/largeur, sphéricité, concavité etc). Les données sont recueillies toutes les 15 secondes pour la première heure, puis chaque minute pour les 180 minutes suivantes, toutes les 15 minutes pour les 6 heures et enfin chaque heure pour les 14 heures restantes. Les images récupérées par la suite correspondent aux différents temps de réhydratation étudiés.

2.6. Caractérisation structurale des gels acides

2.6.1. Analyse de la texture

Principe

La texture des gels acides est mesurée sur le produit fini, 24 heures après sa formulation (Luquet & Carrieu, 2005). Elle est réalisée par pénétromètrie, grâce à un analyseur de texture (texturomètre) LF Plus Lloyd (Lloyd Instruments, Ametek, France) (figure 18).



A



B

Figure 18 : Principe de fonctionnement du LLyod (A) et modèle utilisé - LF Plus Lloyd Instruments - (B).

Le principe de fonctionnement de cet appareil repose sur un système de traction/compression vers une force (avec détection de rupture) permettant de réaliser des mesures sur une gamme allant de 0 à 50 N (avec une résolution de 0,01 N et une force maximale d'utilisation pouvant atteindre 1 KN). Ces appareils comportent deux plateaux, disposés horizontalement. Le plateau inférieur est fixe alors que celui du niveau supérieur est mobile. La vitesse de descente du plateau supérieur est variable (allant de 0,05 à 1270 mm/min) et est fixée avant la mesure. Lors d'un test, l'échantillon est placé entre les deux plateaux. Le plateau supérieur descend à une vitesse constante (de l'ordre de quelques millimètres par seconde). La force et le déplacement font alors l'objet d'une acquisition numérique, analysée par le logiciel NEXYGEN *plus* (Lloyd Instruments materials testing system).

Méthode

Dans le cadre de nos séries d'expériences sur les gels acides, le mobile utilisé est de forme cylindrique avec un diamètre de 2,5 cm se déplaçant à une vitesse de 2 $mm.s^{-1}$ et à une profondeur de 15 mm (Damin *et al.*, 2009). La force du gel ou force de rupture permettant d'évaluer la consistance et la fermeté du gel des produits finis est ainsi mesurée à partir du déplacement de ce mobile (Fizman *et al.*, 1999). L'analyse de pénétration est répétée trois fois pour chaque échantillon.

2.6.2. Mesures des propriétés rhéologiques

2.6.2.1. Appareil et échantillonnage

Principe

La rhéologie recouvre un domaine d'investigation très large, traitant de manière générale de l'écoulement des matériaux et de leur déformation sous l'action de contraintes. Les gels acides, notamment ceux du type yaourt, peuvent être considérés comme des fluides viscoélastiques rhéofluidifiant, toute manipulation énergique modifiant par conséquent leurs propriétés rhéologiques. Dans le cadre des analyses des propriétés rhéologiques des gels acides réalisés au cours de ce travail de thèse, les mesures ont été effectuées à l'aide d'un rhéomètre rotatif Kinexus (Malvern Instruments, Orsay, France) à contrainte imposée (figure 19).

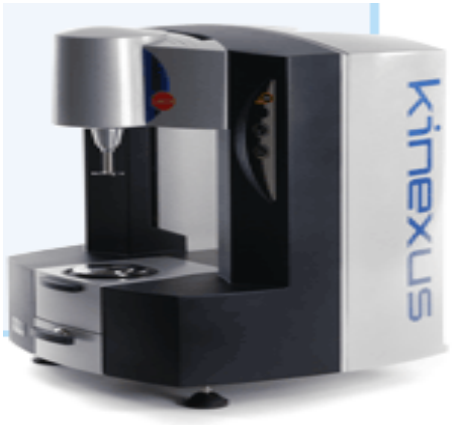


Figure 19 : Rhéomètre rotatif Kinexus (Malvern Instruments, Orsay, France).

Méthode

Le protocole appliqué pour la préparation des différents échantillons de gels acides a été établi lors de précédents travaux sur le yaourt (Koskoy & Kilic, 2004 ; Paci Kora, 2004). Les gels étudiés sont conservés avant analyse à une température de 4 °C durant une nuit. Afin d'homogénéiser leur contenu et d'éliminer la présence potentielle de sérum à leur surface, chaque récipient est délicatement mélangé trois fois de bas en haut à l'aide d'une petite cuillère, tout en le tournant de gauche à droite. Puis, une cuillerée de l'échantillon de gel acide à analyser est disposée au centre du plan du rhéomètre. Trois répétitions de l'analyse sont réalisées à partir du même récipient de gel.

2.6.2.2. Mesures rhéologiques

Point de gel

Les paramètres retenus pour caractériser le point de gel sont le module élastique ou module de conservation (G'), le module de perte ou module visqueux (G''), ainsi que l'angle de phase (δ aussi appelé angle de perte). Ces paramètres sont déterminés à partir du mix laitier à l'aide du rhéomètre Kinexus (Malvern Instruments, Orsay, France) équipé d'un module à cylindres coaxiaux (numéro de série : C25 SC0026SS). Les échantillons oscillent à une fréquence constante de 1 Hz avec une déformation de cisaillement appliquée de 0,1 %. L'ensemble des mesures est réalisé à une température constante de 42 °C. Le point de gel (ou point de gélification) est défini comme étant le point où l'angle de phase passe par 45 ° pour la dernière fois, avec les angles de phase suivants inférieurs à 45 °, marquant la dominance des composantes élastiques du système (figure 19). Le point de gel (aussi défini comme le point où le module élastique est supérieur à 1 Pa) est reporté en secondes et correspond aux moyennes acquises à partir des trois répétitions de l'analyse.

Composantes viscoélastiques

Les composantes visqueuses et élastiques, la tangente δ (tan δ) ainsi que la limite de la région linéaire viscoélastique sont également déterminées à l'aide du rhéomètre Kinexus (Malvern Instruments, Orsay, France), équipé cette fois d'une géométrie serrée de 40 mm d'épaisseur (et de numéro de série PL40S0505 SS pour la partie « lower serrated geometry » et PU40 XSC0010SS pour la partie « upper »). Les mesures rhéologiques sont effectuées par balayage en contrainte et sous régime harmonique. Une rampe de balayage comprise entre 0,001 % et 50 % avec une fréquence constante de 1 Hz est exercée. La limite de la région linéaire viscoélastique a été défini comme le point ou le module élastique (G') dévie de 5 % de sa valeur maximale (Damin *et al.*, 2009). Les valeurs de contrainte de cisaillement correspondantes sont alors reportées.

2.7. Caractérisation physique des gels acides

2.7.1. Synérèse

Le volume de sérum séparé à la surface des différents gels préparés est mesuré au bout de 24 h après la formulation des gels. La quantité de lactosérum expulsé de 20 g de yaourt

après centrifugation pendant 20 min à 640 g à 4 °C est mesurée et la synérèse est alors exprimée d'après l'équation suivante (Guzman-Gonzalez *et al.*, 1999) :

$$Synérèse\ (\%) = \frac{quantité\ de\ lactosérum\ expulsé * 100}{20\ g\ de\ yaourt}$$

Pour chaque temps de réhydratation, la valeur considérée est la moyenne de trois mesures sur 3 récipients de d'échantillons différents de gels.

2.7.2. Capacité de rétention d'eau

La capacité de rétention d'eau a été déterminée selon la procédure décrite par Sodini *et al.*, (2005). Un échantillon de 20 g de gel acide est centrifugé pendant 10 min à 1250 g à 4 °C. Le lactosérum expulsé est collecté et pesé. La capacité de rétention d'eau (WHC ou « Water Holding Capacity ») est calculée d'après la formule :

$$WHC\ (\%) = \frac{(20\ g\ de\ yaourt - quantité\ de\ lactosérum\ expulsé) * 100}{20\ g\ de\ yaourt}$$

2.7.3. Formation de grumeaux

Principe

La formation de grumeaux est mesurée en microscopie à fluorescence, d'après une méthode modifiée de Remeuf *et al.*, (2003) et Sodini *et al.*, (2005). La microscopie de fluorescence permet la détection de particules et de structures qui ne peuvent être visualisées en microscopie optique conventionnelle. Brièvement, le principe repose sur une excitation monophotonique (dans le domaine du visible ou de l'ultraviolet) de l'échantillon à observé, ce dernier étant préalablement marqué par un fluorochrome. Une fois l'échantillon illuminé par le faisceau excitateur, le signal de fluorescence émis et transmis est collecté par l'objectif du microscope et visualisé.

Méthode

Dans le cadre de ce travail, un échantillon marqué de 1 g de yaourt est visualisé par l'intermédiaire d'un microscope à fluorescence équipé d'un module photographique. Le « Fast green » (Sigma-Aldrich) est utilisé en tant que colorant fluorescent des protéines, préalablement dissous dans de l'eau distillée à une concentration de 0,2 % (p/v). 300 µl du marqueur ainsi préparé sont ajoutés à 40 ml de lait préchauffé utilisé par la suite dans la

préparation des gels. La granulation est évaluée par le logiciel Image J (Wayne Rasband, NIH, version 1.43) en mode de niveaux de gris. Les grains ayant un diamètre supérieur à 1 mm sont dénombrés. Les résultats sont exprimés en nombre de grains par gramme d'échantillon de gel.

2.7.4. Microstructure

Principe

La microstructure est déterminée par microscopie électronique à balayage (MEB), selon une méthode adaptée de Matumoto-Pintro *et al.*, (2011). Les observations microscopiques sont réalisées au laboratoire de chimie minérale à la faculté des sciences et techniques de l'Université de Lorraine (Vandoeuvre-Lès-Nancy, France). Au cours des analyses en microscopie électronique, le rayon incident n'est pas de nature photonique (comme en microscopie optique) mais est formé d'un faisceau d'électrons accélérés sous une tension pouvant atteindre jusqu'à 30 kV. Les électrons rétrodiffusés et/ou secondaires sont recueillis en synchronisant la détection au balayage du faisceau incident, permettant finalement l'obtention d'une image de surface contrastée.

Méthode

Les échantillons de gels stockés à 4 °C pendant une journée sont fixés dans l'azote liquide puis lyophilisé. Les échantillons secs sont alors fixés montés sur un ruban adhésif double face lui-même monté sur des talons en aluminium. Les échantillons sont d'abord recouverts d'une couche de carbone de 10 nm puis d'un mélange or/palladium (destinés à rendre les échantillons de poudre conducteurs). Les échantillons ainsi préparés sont observés sous un microscope à balayage à émission de champ d'électrons (Philips CM20, France), fonctionnant à une tension de 1,0 à 10,0 KV. Les images ont été enregistrées sous un grossissement de 1500 à 10 000 X et analysées en utilisant le logiciel libre Image J (Wayne Rasband, NIH, version 1.43).

2.8. Analyses statistiques

L'ensemble des tests statistiques sont effectués à l'aide du logiciel SigmaStat v.3.5. Les résultats correspondent à la moyenne ± écart type de trois valeurs indépendantes pour chacune des mesures effectuées. La normalité des distributions et l'homogénéité des variances entre les différents groupes sont d'abord vérifiées. Pour cela, les tests de Kolmogorov-Smirnov et de Levene sont respectivement effectués ($p < 0,05$). Si les deux conditions sont

remplies, *i.e.* normalité de la distribution et homogénéité des variances, le test *t* de Student est réalisé pour les comparaisons de moyennes entre deux groupes.

Pour la comparaison de plusieurs groupes, une ANOVA à un facteur est d'abord effectuée. Si une différence significative entre les échantillons est observée, il s'en suit un test post-hoc afin de savoir entre quels groupes se situe la différence.

Le test de Student Newman-Keuls ($p < 0,05$) est utilisé pour déterminer entre quels échantillons se situe la différence. Dans le cas de groupes ayant un nombre d'échantillons variable, le test de Dunn est réalisé à la place du test de Student Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Dans les cas où la normalité des distributions n'est pas vérifiée, les échantillons sont comparés d'après le test de Kruskall-Wallis ($p < 0,05$). Si une différence significative entre les échantillons est observée, la même démarche relative aux tests post-hoc précédemment énoncée est suivie.

Résultats et discussion

1. Influence de l'état de réhydratation des poudres de lait sur la gélification au cours du processus de fabrication du yaourt

La fortification du lait de base (entrant dans la formulation des gels acides de type yaourt) par l'ajout de poudres laitières et la solubilisation de ces dernières constituent des facteurs déterminants dans les propriétés texturales du produit fini. Dans un premier temps, la réhydratation de deux poudres de caséines micellaires natives, l'une récente (datant de deux mois) et l'autre ancienne (datant de douze mois), a été suivie dans un milieu complexe et opaque tel que le lait. Pour cela, un granulomètre par diffraction laser (QICPIC), dont le fonctionnement repose sur un nouveau concept combinant un système de dispersion des particules à une analyse d'image dynamique, a pu être utilisé afin de déterminer la taille des particules en suspension.

Il en résulte que le processus de réhydratation des caséines micellaires peut être scindé en trois étapes : tout d'abord une étape de mouillage des particules, suivie d'une étape de gonflement caractérisée par une augmentation de la taille des particules et enfin une étape de dispersion marquée par la diminution de la taille des particules. Le profil de réhydratation obtenu correspond à ceux préalablement observés pour ces types de poudre dans des milieux simples (eau) et ioniques.

Par ailleurs, la conservation de longue durée (poudre ancienne *vs* récente) altèrerait les propriétés de réhydratation des caséines micellaires, en particulier lorsqu'il s'agit de la phase de gonflement et de dispersion. L'allongement de la phase de réhydratation est ainsi observé, le processus n'étant pas achevé même au-delà de 480 minutes de réhydratation.

De plus, l'étude des propriétés rhéologiques des gels acides (obtenus après acidification par la Glucono-delta-lactone) a été réalisée au bout de différents temps de réhydratation (5, 180, 300, 480, 900 ou 1440 min). Il en résulte que les valeurs du module élastique sont comparables à la suite des différents temps pour les échantillons préparés à partir des deux types de poudre. Le point de gélification, quant à lui, est rallongé proportionnellement au temps de réhydratation des poudres dans le mix laitier (avant

acidification). En revanche, la durée de conservation des poudres n'affecte pas les caractéristiques rhéologiques des différents gels acides étudiés.

L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'une publication dans *Journal of Dairy Research* (2012) :

Effect of dairy powder rehydration state on gel formation during yogurt process

Marie Celeste Karam, Claire Gaiani, Reine Barbar, Chadi Hosri, Joël Scher

Journal of Dairy Research, 2012, 79:280-286

Abstract:
Protein fortification and solubilisation into the milk base are important parameters enhancing yogurt texture. In this study, the milk base prepared from reconstituted skim milk powder was fortified with 2 % of 'aged' (1 year old) or 'fresh' micellar casein (MC) powder. Micellar casein powders were left to rehydrate at 20 °C for different times (5 or 180, 300, 480, 900 or 1440 min) before acidification with glucono-delta-lactone. The rehydration of the MC powders into milk was monitored with a granulomorphometer equipment, thus, for the first time, allowing the elucidation of MC rehydration process into an opaque environment such as milk. Whereas the gel point was delayed proportionally to the powder rehydration length, the storage modulus appears unaffected. Besides, the gelation onset was not altered by the powder age.

Keywords: Rehydration, micellar casein powder, milk gelation, yogurt.

Abbreviations: CCP, colloidal calcium phosphate; GDL, glucono-δ-lactone; G', storage modulus; G'', loss modulus; MC, micellar casein; SMP, skim milk powder.

1.1. Introduction

Yogurt is an acidified coagulated milk product widely consumed worldwide. Yogurt's texture is a determinant feature that affects product quality and acceptability. One of the greatest approaches to enhance yogurts textural attributes (mainly consistency and viscosity) consists of increasing the solid content (more particularly the protein content) of the milk base. Indeed, according to Damin *et al.*, (2009) the increase in protein levels is the key factor influencing texture since protein enrichment enhances casein micelle aggregate and chain

development. The increase in protein content could be achieved by either milk concentration (evaporation of water under vacuum, ultra-filtration or reverse osmosis) or by the addition of miscellaneous dairy powders (skim milk powder (SMP), milk protein concentrates, whey proteins, micellar casein (MC) and caseinates) (Kristo *et al.,* 2003; Soukoulis *et al.,* 2007; Damin *et al.,* 2009; Peng *et al.,* 2009). The fortification of milk by the addition of SMP is a common practice (Sodini & Béal, 2003; Soukoulis *et al.,* 2007; Peng *et al.,* 2009) in industrial yogurt manufacture (Schkoda, 2002). Nevertheless, the use of high proteins ingredients (Isleten & Karagul-Yuceer, 2008) such as, whey proteins and caseins fractions has gained interest because of their functional and nutritional properties (González-Martínez *et al.,* 2002). These added dairy ingredients should be completely dispersed and rehydrated in milk in order to avoid some subsequent defects such as lumps formation (Sodini & Béal, 2003).

The use of casein based ingredients in yogurt production has been extensively studied and several studies have reported that this type of fortification resulted in firmer (Soukoulis *et al.,* 2007; Peng *et al.,* 2009), more elastic and viscous products (Damin *et al.,* 2009) that undergo less syneresis (Sodini & Béal, 2003; Soukoulis *et al.,* 2007) when compared with yogurts fortified with SMP or whey proteins. On the other hand, numerous authors have reported that casein proteins and especially native casein present a poor aptitude to rehydrate and dissolve into water (Gaiani *et al.,* 2006) and other ionic media. Indeed, in a recent study, Hussain *et al.,* (2011), demonstrated that micellar casein rehydration at 24 °C into a salt media (NaCl and CaCl2) at a concentration up to 3 %, was not completed even after 500 min.

From a rheological viewpoint, yoghurt gel is formed by aggregation of casein micelles (in unheated milk) into chains, strands and clusters throughout milk acidification (Gastaldi *et al.,* 1997). Moreover, casein aggregation and viscosity and gel modulus. Gel point could thus be determined by considering rheological properties of the gel (Horne, 1999). Elastic (or storage) modulus (G') and viscous (or loss) modulus (G'') as well as phase angle are rheological measures that define the gel properties. The storage modulus reflects the measure of energy stored per cycle, the solid-like behaviour. The viscous modulus reflects the energy dissipated per cycle and the viscous-like behaviour. Finally, the ratio of the viscous to the storage modulus defines the tangent of the phase angle (Horne, 1999).

The objective of this study was to investigate a potential effect of casein powder age and rehydration condition (referred to as the length of rehydration) on some rheological properties (gel time and storage modulus) of acid gels. In this study, glucono-delta-lactone (GDL) was used as the acidifying agent in order to eliminate external variables associated

with starter bacteria like variable activity and variation of culture type used (Lucey & Singh, 1998).

1.2. Materials and methods

1.2.1. Materials

SMP was supplied by Lactalis (Lactalis Ingredients, Bourgbarré, France). MC powders (Promilk 872B) were both procured from International Dairy Ingredient (IDI, Arras, France). There were obtained through milk microfiltration and presented an important fraction (more than 83.5 %) of native micellar casein. The ‘aged’ and the ‘fresh’ casein powders were stored at 20 °C for their entire storage period (one year for the aged powder and less than 2 months for the fresh one). GDL and sodium azide were both provided by Merck (Merck & Co, Inc., Whitehouse Station, NJ, USA).

1.2.2. Milk base preparation and acidification

SMP was rehydrated in distilled water to the concentration of 10 % w/w in glass bottles. Sodium azide (0.02 g/100 g) was added in order to prevent bacterial growth. Samples were covered with an aluminium foil to prevent evaporation then stored at 4 °C under low mechanical agitation for 15 h before use. The aged or fresh MC powder was then added under mechanical agitation (300 rpm) at 20 °C, at a 2 % level to reach a final solid content of 12 % w/w. There were left to rehydrate for various duration (5 or 180, 300, 480, 900 or 1440 min) before acidification with 1.5 % GDL at 42 °C.

1.2.3. Powder chemical characterisation

Protein and lactose content of the dairy powders were determined by Kjeldahl and Potterat-Eschmann methods respectively. Fat content was determined with a Rös–Gottlieb extraction and ashes were measured after a dry ashing procedure in a muffle furnace of 550 °C (AFNOR standards). Moisture content was determined via a drying oven at 103 °C as described by AFNOR standards.

1.2.4. Rheological properties and pH determination

Rheological properties (viscous and elastic components as well as the final value of the storage modulus and the phase angle) were measured at 42 °C with a Kinexus rotational rheometer (Malvern Instruments, Orsay, France). The rheometer was equipped with a cup and bob geometry consisting of coaxial cylinders. After addition of GDL, the mixture was stirred for 2 min and then 17.25 ml of the acidified mix were transferred into the cup. Samples were oscillated at a constant frequency of 1 Hz with an applied shear strain of 0.1 %. Gelation time was defined as the time when the phase angle transits 45 ° and when subsequent phase angles of less than 45 ° are recorded thus emphasizing elasticity behavior dominance. The final G′ value corresponds to the final value of storage modulus measured after 2000 s of onset of gelation.

The pH values concomitant with the onset of gelation were monitored using an analytical radiometer (SAS, Villeurbanne, France) equipped with a miniaturized combined pH electrode. The combined electrode consists of a sensitive glass membrane of 1.5 mm. It was standardized by means of two buffers (pH 7.0 and 4.0), rinsed with sterilised water and placed on the surface of the rheometer cup.

1.2.5. Particle size during rehydration

Experiments were carried out in vessels under mechanical agitation (by a stirrer) at 300 rpm. The temperature was held at 20 °C via a double wall jacket vessel. Particle dispersion was achieved through a peristaltic pump (Watson-Marlow pumps, La Queue les Yvelines, France) and monitored via an inline process. Analyses were performed using a Qicpic equipment (Sympatec GmbH, Germany) with a dispersion module (Lixell, Sympatec) particularly appropriate for powders in suspension (Gaiani *et al.,* 2011). For each measure, 0.5

g MC powder was dispersed in 100 ml milk base preparation. Concurrently, regular images and video of the particles under rehydration were incessantly recorded during 24 h. Data were first collected every 15 s for the first 1 h, then every min for 3 h, every 15min for 6 h and finally every hour for the remaining 14 h. Windox 5.4.10 software (Sympatec GmbH, Germany) was used in this study to determine the particle size distributions in milk media.

1.2.6. Casein powder solubility in milk base preparation

The powder solubility in milk was estimated according to the International Dairy Federation Method (IDF, 1988) with slight modifications. MC powder (2 g) was added to 100 ml milk to allow powder solubilisation. After 5 or 180, 300, 480, 900 or 1440 min of powder rehydration at 20 °C, the dispersion was centrifuged at 266 g for 20 min. The supernatant was then removed and samples were left overnight in the drying oven at 103 °C before weighing the remaining sediment. Finally, the insolubility index was calculated on the difference between the quantity of powder added (2 g) and the quantity of the remaining sediment.

1.2.7. Statistical analyses and data treatments

For all experiments, the results are the averages of three experiments. Statistical analyses were performed using Sigma Stat 3.1 (Systat Software, Inc., Chicago, IL, USA).

1.3. Results and discussion

1.3.1. Powder characterisation

The powders composition is presented in Table 7. SMP composition was consistent with that reported in literature (Peng *et al*., 2009).

Table 7. Chemical composition (g/100 g) of the powders used: skim milk powder, fresh and old micellar casein powders (mean of three independent analyses with standard deviation)

	Skim milk powder	Micellar casein powder (aged powder)	Micellar casein powder (fresh powder)
Proteins	38·1 ± 1·1	84·2 ± 0·4	87·9 ± 0·8
Ashes	5·6 ± 0·7	6·6 ± 0·1	7·6 ± 0·1
Water	3·8 ± 0·3	8·5 ± 0·3	3·8 ± 0·2
Fat	0·5 ± 0·0	0·3 ± 0·1	0·3 ± 0·1
Lactose	52·0 ± 0·9	0·4 ± 0·0	0·4 ± 0·2

MC powder compositions were comparable except for water content and in agreement with others (Gaiani *et al.*, 2007a; Hussain *et al.*, 2011). Aged MC powder had a greater moisture content that could be explained by acquired humidity during storage. In addition, this powder is well known for water uptake during storage (Mimouni *et al.*, 2010). Nevertheless, the composition of the aged powder was determined (when this powder was still fresh) and found similar to the fresh powder (data not shown).

1.3.2. Rehydration profile of MC powders in milk base

Figure 20 illustrates the rehydration profiles of MC powders in milk. These profiles were obtained by following the evolution of particle size (d50 in µm) during rehydration.

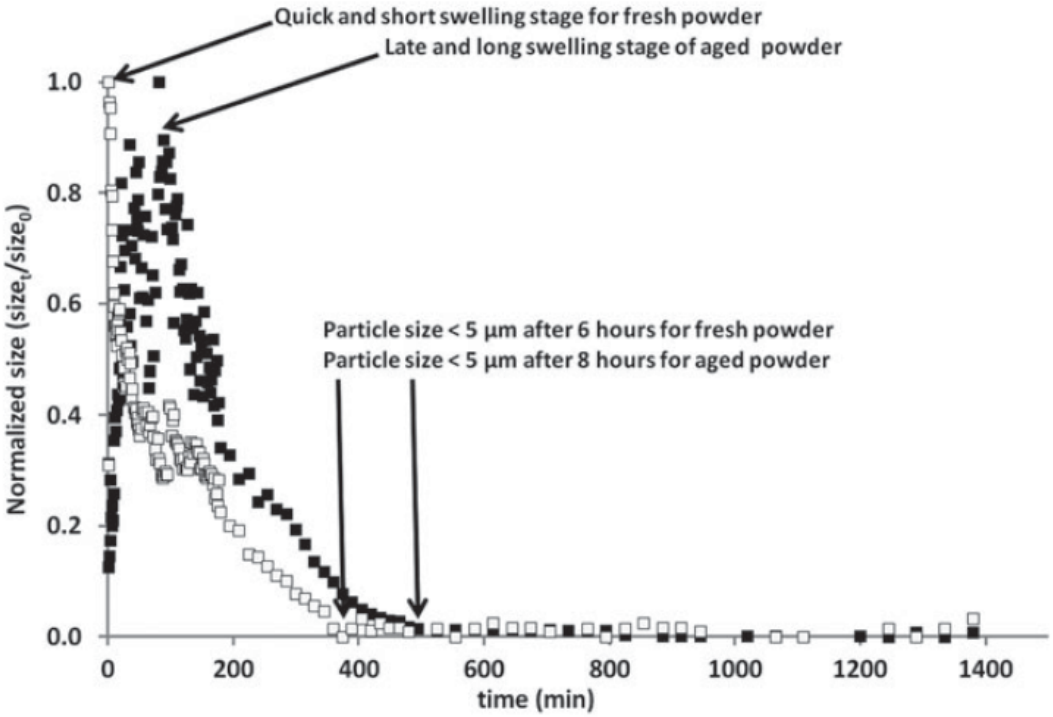


Figure 20. Fresh and aged micellar casein (respectively white and black squares) rehydration profiles obtained with the Qicpic equipment in milk at 20 °C (mean of triplicates independent analyses).

Since both powders had an initial different size, the results were normalised taking into account their initial size. Indeed, the initial particle size for fresh and aged MC powders were about 20 and 40 µm, respectively. The same profiles were observed for each powder. Our results are in agreements with others (Gaiani *et al.*, 2005, 2007), insofar as they show

similar rehydration profiles. These authors depicted four phases in rehydration: the wetting, swelling, dispersing and finally the dissolution phase.

In Fig. 20, a quick particle size increase was first observed from the initial particle size to 30 and 80 μm for fresh and aged powder respectively. A similar behaviour was already noticed in water and was related to the particle swelling (Gaiani *et al.,* 2006). The particle size increase was rapid for the fresh powder (around 10–15 min) and significantly longer for the aged powder (around 100–120 min). The observed extended length of aged casein micelle swelling phase could be attributed to the deterioration of the rehydration properties over time (Gaiani *et al.,* 2005). Indeed, Mimouni *et al.,* (2009) showed the progressive loss of milk powder rehydration properties during storage in the dry form, especially in the case of high protein containing powders. Finally, a slow decrease of the particle size was observed for each powder. A particle size under 2–5 μm was obtained after 360 min (6 h) for the fresh powder and 480 min (8 h) for the aged powder (Fig. 20). The normalized particle size at zero was in fact related to a particle size under 2–5 μm. Indeed, only the beginning of the rehydration was investigated as the Qicpic apparatus could not measure particles under 2–3 μm. So, 6 and 8 h were the times needed to reach this size correlated to the detection limits of the apparatus and not to the end of the dispersion phase. The dispersion stage was already observed for MC powders rehydrated in water (Gaiani *et al.,* 2006) and in salt media (Hussain *et al.,* 2011). Mimouni *et al.,* (2009) also observed this phenomenon for milk protein concentrate powders. These authors also depicted the very slow dispersion of this powder. In conclusion, differences were observed between the two powders. Logically, the fresh powder presented faster swelling and dispersions properties in comparison with the aged powder. All these results were concordant with the in situ microscopy observations presented in Fig. 21.

For the first time, an in situ determination of the particles size during rehydration into an opaque environment (milk) was measured without any dilution and in different medias from those studied by several authors (water or ionic environment) (Gaiani *et al.,* 2006; Mimouni *et al.,* 2009). These results were made possible by the use of the Qicpic apparatus equipped with a very thin window allowing the determination of the size in this kind of media.

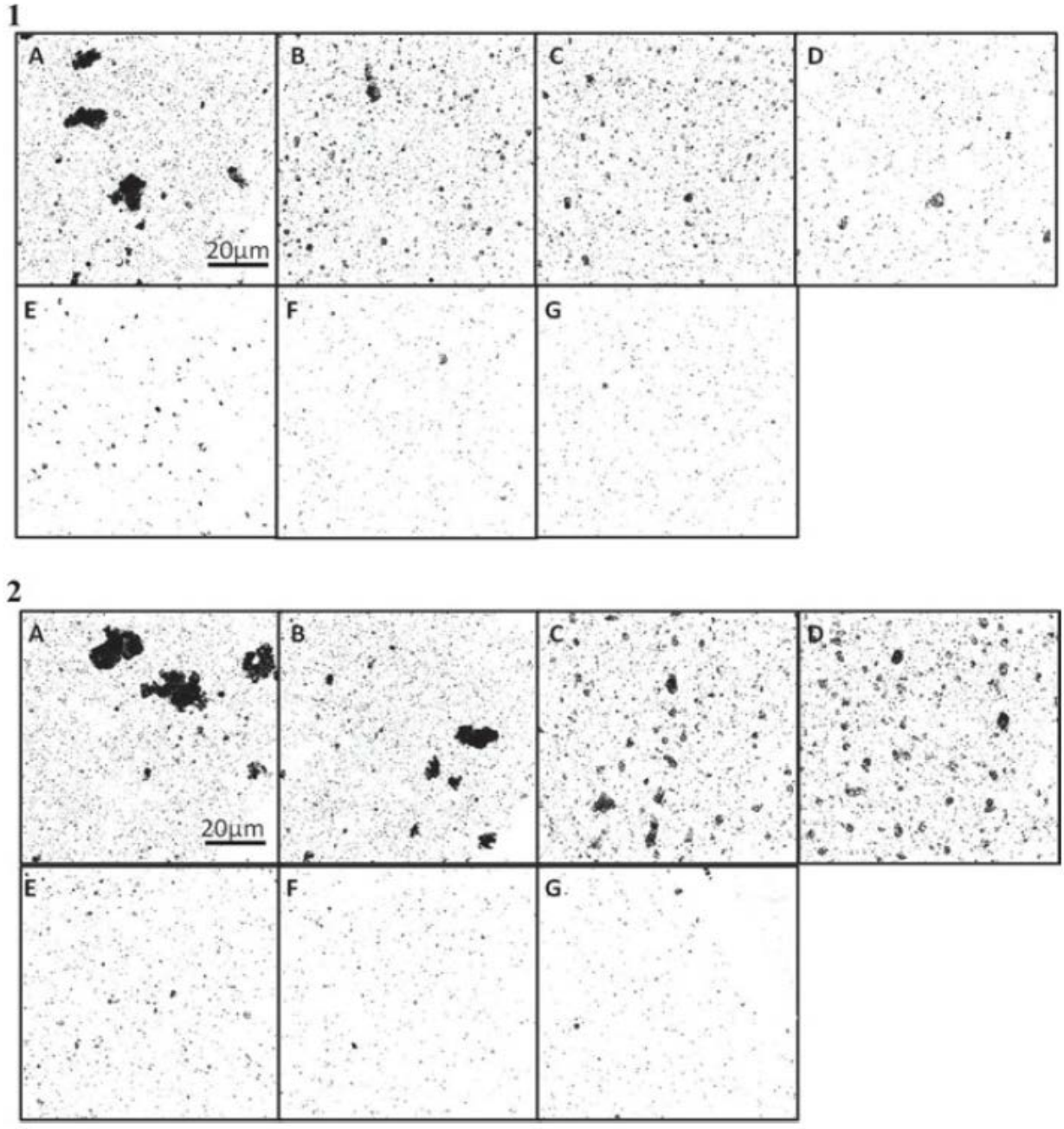


Figure 21. Example of in situ microscopy images obtained during fresh (1) and aged (2) micellar casein powder rehydration in milk media (A: few seconds, B: 5 min, C: 180 min, D: 300 min, E: 480 min, F: 900 min and G: 1440 min).

1.3.3. Influence of casein rehydration state on gel formation and pH

Average gelation times observed for various rehydration times for both fresh and aged MC powders are reported in Fig. 22a.

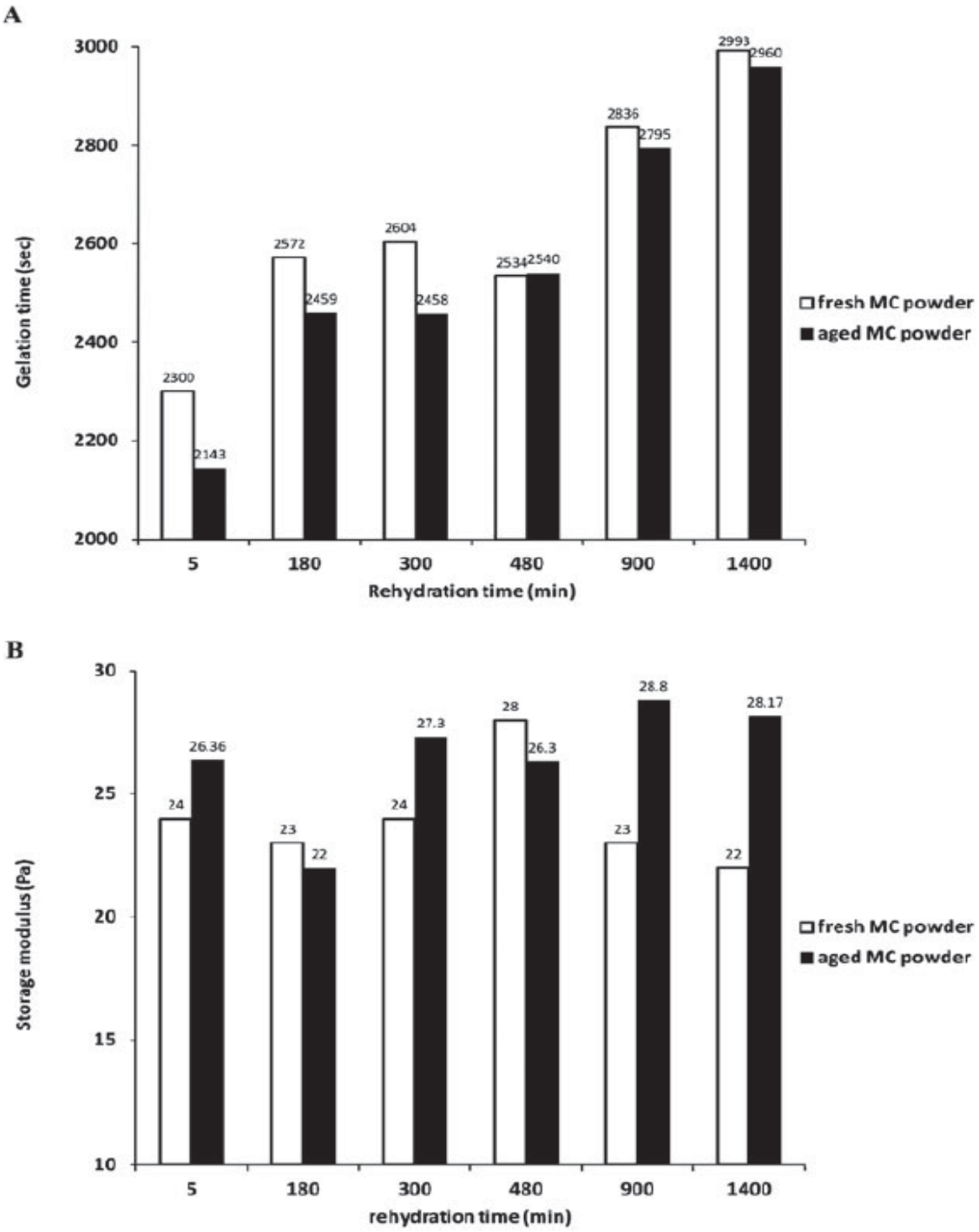


Figure 22. Onset of gelation determination (a) and storage modulus (b) at the end of acidification after variable rehydration time for fresh and aged micellar casein powder (values are means of triplicates independent analyses).

The rehydration state of MC powder was found to significantly ($p < 0{\cdot}05$) affect the onset of gelation. The onset of gelation was about 2100 s (for the aged powder) and 2300 s (for the fresh powder) after 5 min of rehydration. This time increased proportionally to the

rehydration length (Fig. 22) reaching 3000 s for both powders after 1440 min of rehydration. The onset of gelation for aged and fresh powders was found comparable within the same rehydration time despite a distinct rehydration profile (Fig. 20). The pH associated to the onset of gelation was also determined. There was no significant difference in the values for samples at different rehydration time. The gelation pH value was 5.3 (± 0.04) after 5 or 180, 300, 480, 900 or 1440 min of rehydration.

1.3.4. Relationships between powder rehydration stage and gel formation delay

A number of explanations can be drawn from these results. First, the extended onset of gelation could be partially due to the decrease in GDL/protein ratio. In fact, in our study GDL concentration remains constant (1.5 %) whereas the soluble casein fraction (reported in Fig. 23) increases with the rehydration length (although this increase is minimal). Braga *et al.*, (2006) have shown that a high GDL/protein ratio reduces the gelation time. In fact, in our study, the powder solubility increased from about 17 % (average of the solubility of the two powders) after 5 min rehydration to about 70 % after 15 and 24 h rehydration. Indeed, these results show that even after 8 h of rehydration, MC powders continue to disperse into milk before complete dissolution. This result was also observed by the Qicpic apparatus. The latter, however, (due to sensitivity limitations) could just depict the beginning of the dispersion phase.

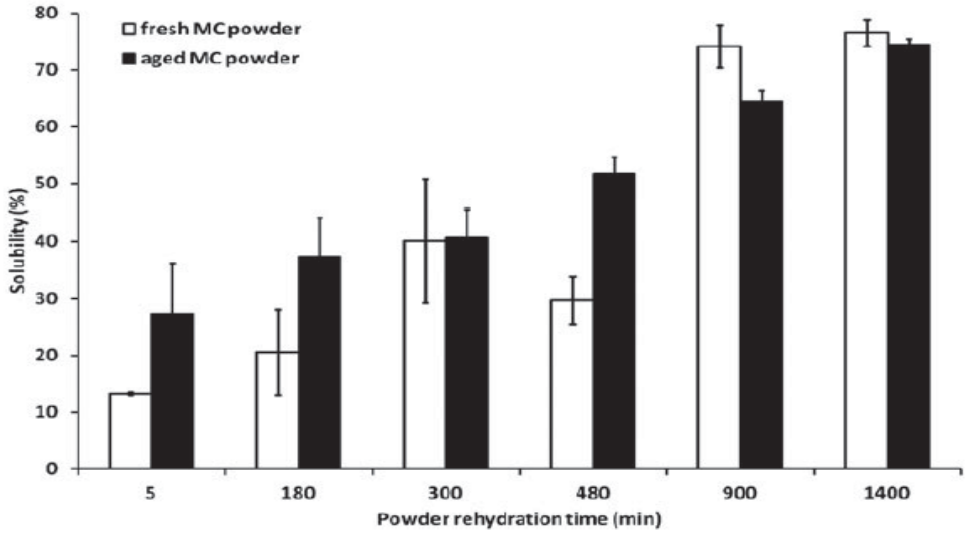


Figure 23. Micellar casein powder solubility in milk base at variable rehydration times in minutes (mean of three independent analyses with standard deviation).

The higher soluble casein fraction could be also correlated to the delayed gel point. Indeed, Glantz *et al.,* (2009) have reported a positive correlation between low protein content and short gelation time. Finally, the increased gel point could be explained by a more important buffering of extra soluble casein exhibited in the vicinity of pH 5 (Peng *et al.,* 2009).

Concerning the obtained pH-range (of 5.3), it differs from the pH-value reported by Sodini & Béal (2003). In fact, these authors have reported a higher pH of gelation (at pH range near 5.5) when the milk basic was heated. This disparity in pH-range may be attributable to the presence of denatured whey proteins that interact with themselves in a heated system. Indeed, it is well-known that in unheated milk (like our system) gelation is governed by casein aggregation. In heated milk, denatured whey protein forms complexes with themselves and with κ-casein and precipitate at higher pH values (Donato *et al.,* 2007; Fox & Brodkorb, 2008) before true casein precipitation and coagulation. Moreover, our pH values could correspond to the dissolution of the inorganic micellar calcium phosphate (which is usually fully soluble at pH near 5.2) (Heertje, 1985; Donato *et al.,* 2007).

1.3.5. Storage modulus at the end of acidification after different rehydration times

The values of storage modulus at the end of acidification after several rehydration times for both powders (aged and fresh) are represented in Fig. 22b. The storage modulus was about 24 Pa after 5, 180 and 300 min rehydration and about 28 Pa after 480 min rehydration for the fresh micellar casein powder. It was around 26 Pa after 5, 180 and 300 min rehydration and around 28 Pa after 900 min rehydration for the aged casein powder. The storage modulus slightly increased parallel to the rehydration length (except for the fresh MC powder after 900 min). This is mainly due to the increased soluble casein concentration. Indeed, Gastaldi *et al.,* (1997) stated that higher solids content are correlated to increases in elasticity and firmness. Moreover, these authors reported that increases in caseins particles are responsible of higher values of storage modulus due to an increase of bonds and interactions. However, in our study the increase in caseins particles was not statistically significant. We can speculate that the increase in casein concentration (maximum 2 %) was negligible to impact significantly the storage modulus. On the other hand, Donato *et al.,* (2007) reported that the storage modulus measurement depends on all particles present in the suspension (even the non soluble fraction

of micellar casein) and that even after aggregation particles continue to rearrange. This could be a potential explication of the insignificant increase in the storage modulus.

1.4. Conclusion

This study highlights the impact of rehydration state of micellar casein into the milk base on some rheological properties of yogurt. Indeed, gelation time was increased proportionally to the rehydration duration whereas storage modulus seems unaltered by rehydration conditions. Furthermore, this study used, for the first time, interesting equipment combining a dispersion module and a camera allowing tracking of the rehydration of dairy powders into a complex and opaque environment such as milk. Other rheological properties will be correlated with rehydration state of miscellaneous dairy ingredients in further studies.

Acknowledgements

The authors thank the financial support of Philippe Jabre Association.

2. Influence de l'état de réhydratation et de dénaturation des protéines solubles sur le processus de gélification

Après avoir étudié l'influence de l'état d'hydratation des caséines micellaires dans le lait, la suite des travaux a porté sur les protéines solubles ou protéines solubles qui représentent la deuxième catégorie majeure de protéines (20 %) dans le lait.

La réhydratation de deux poudres de protéines solubles natives et dénaturées (par chauffage à sec) a été suivie dans un mix laitier grâce au système QICPIC par diffraction laser. Le profil de distribution des tailles des particules témoigne de la diminution quasi-instantanée de ces dernières pour les deux poudres. Cette observation est associée à la phase de dispersion rappelant le profil observé classiquement dans un milieu simple tel que l'eau ainsi que dans des milieux ioniques à faibles concentrations en sels. La réhydratation des protéines solubles natives dans le lait, caractérisée par une grande rapidité, présente ainsi deux phases : le mouillage et la phase de dispersion (superposée). Il en est de même pour les protéines solubles dénaturées, avec toutefois une phase de dispersion légèrement plus longue.

De plus, l'étude des propriétés rhéologiques des gels acides (obtenus après acidification par la Glucono-delta-lactone) a été réalisée au bout de différents temps de réhydratation (5, 180, 300, 480, 900 ou 1440 min). Alors que les conditions de réhydratation n'altèrent ni le point de gélification ni les propriétés viscoélastiques des gels obtenus, la dénaturation initiale des protéines solubles en revanche retarde leur point de gel tout en affectant également leurs propriétés élastiques.

Ces résultats ont également fait l'objet d'une seconde publication (en préparation).

Influence of whey powder rehydration state and denaturation on acid gel formation

Marie Celeste Karam, Claire Gaiani, Chadi Hosri, Raza Hussain, Jennifer Burgain, Reine Barbar, Joel Scher

Abstract:

Yogurt texture is a determinant feature of its quality and acceptability. Protein enrichment of the milk base and heat treatment are two inevitable practices in yogurt formulation. In this study, native or denatured whey protein ingredients were used for fortification purposes in an unheated simulated yogurt milk system in order to elucidate their rehydration mechanism as well as the potential effect of this latter condition on acid-gels formation. To attain this

objective, native whey protein isolates (WPI) or WPI denatured by dry heating were added to the basic mix to reach a final milk total solid content of 12 % w/w. These powders were left to rehydrate under mechanical stirring at 20 °C for different time ranking from 5, 180, 300, 480, 900 till 1440 minutes. Rehydration Kinetics of these powders into milk was monitored by tracking particles size variation via the Qicpic granulo-morphometer. Acid-gels were then made by acidification of the simulated yogurt milk with Glucono-delta-lactone at 42 °C to pH 4.6 and their properties were measured by dynamic rheology. It results that native WPI rehydration into milk can be described as a quick wetting and dispersion phase one step process. Denatured WPI presented a similar behavior with however a slightly lengthier dispersion phase. Moreover, whereas rehydration conditions did not alter neither the onset of gelation nor the viscoelasticity characteristics of the obtained acid gels, denaturation condition resulting from dry heating appeared to extend the gel point and weaken the elastic character of the final acid gels.

Keywords: Acid gelation, whey protein isolate, simulated yogurt milk, rehydration, denaturation.

2.1. Introduction

Yogurt is an acidified, coagulated milk product widely consumed worldwide. Industrial yogurt manufacture involves different processing steps. Among them, protein fortification and heat treatment of the milk base are determinant parameters of the final textural properties of products (Lucey *et al.*, 1999). Indeed, perceived texture is an important characteristic that defines yogurt quality and acceptability (Kristo *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2009; Soukoulis *et al.*, 2007). Yogurt fortification could be achieved by milk concentration (evaporation under vacuum, ultrafiltration or reverse osmosis) or by the addition of miscellaneous dairy powders (skim or whole milk, casein or whey powders) (Damin *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2009; Soukoulis *et al.*, 2007). The addition of dairy powders in yogurt manufacture has been extensively investigated. Nonetheless, the rehydration mechanism of these dairy ingredients into the milk base (commonly referred to as the mix basic) has been barely studied. Karam *et al.*, (2012) have recently traced for the first time the rehydration process of a micellar casein powder into the mix base. These authors have also emphasized the importance of powder rehydration state on gel point; the latter being postponed parallel to the powder rehydration length. The use of whey powders in yogurt manufacture has gained

interest due to their high nutritional value (Isleten & Karagul-Yuceer, 2008) and their functional attributes. In fact, whey proteins are recognized for their foaming, emulsifying, thickening, gelling and water holding properties (Dissanayake & Vasiljevic, 2009). Their addition to the basic mix improved yogurt viscosity and firmness while reducing the syneresis (Isleten & Karagul-Yuceer, 2008; Remeuf *et al.,* 2003). Heat treatment of the milk base is an inevitable step in dairy processing. It primarily aims to enhance yogurt physical properties. Several reports have shown that acid gels obtained from heated milk undergo less syneresis and exhibit higher gel strength (Damin *et al.,* 2009; Donato *et al.,* 2007; Lucey & Singh, 1998). In industrial yogurt manufacture, milk is usually heated at 85°C for 30 minutes, at 90-95 °C for 5-10 minutes or 115 °C for 3 seconds (Sodini & Béal, 2003). It is well known that during heat treatment, significant physicochemical changes occur in milk components. When heated above 70°C, the two major whey proteins (α-lactalbumin and β-lactoglobulin which constitute 50 % and 12 % of the total whey proteins) experience important structural and functional modifications, generally referred as denaturation (Raikos, 2009). This phenomenon has been described by an "unfolding" stage characterized by a pronounced distortion of the three dimensional structure of whey proteins and the layout of previously hidden parts (hydrophobic and reactive thiol groups) followed by their aggregation (Elshereef *et al.,* 2008; Raikos, 2009; Singh & Waungana, 2001). In earlier studies, authors have linked the enhanced firmness and viscosity of yogurt-heated gels to the denaturation process (Damin *et al.,* 2009; Lucey & Singh, 1998).

In term of rheology, yogurt-gels (also referred as acid-gels) are particles gels that display a range of non-Newtonian effects, such as yield stress and viscoelasticity (Damin *et al.,* 2009). Viscoelastic properties could be evaluated via a dynamic rheometer through a strain (or stress) sweep test that determines the limits of Linear Visco Elasticity Region (LVER) providing thus structural information on the protein gel matrix. Indeed, this limit reflects the stability of a suspension where gel structure is sustained and where beyond it gel structure begins to collapse.

The present work intended to: (1) elucidate the rehydration process of whey protein isolates into the milk base, (2) assess the effect of this powder rehydration state on some rheological properties (gel point, elastic and viscous components as well as LVER determination and loss tangent) of acid gels simulating yogurt and to also evaluate the effect of denaturation on the same rheological properties. In this study, Glucono-delta-lactone was

used as the acidifying agent in order to eliminate external variables associated with starter bacteria such as activity and variation of culture type used.

2.2. Materials and methods

2.2.1. Materials

Skim milk and whey protein isolates (Prolacta 90) were both provided by Lactalis (Lactalis Ingredients, Bourgbarré, France). Native (non heat treated) whey powders were obtained through membrane filtration technique as specified by the manufacturer. Whey powders were denatured by dry heating the native whey protein isolates at 103 °C for 2 hours. Glucono-delta-lactone (GDL) and sodium azide were both provided by Merck (Merck & Co, Inc., Whitehouse Station, NJ, USA).

2.2.2. Powder chemical characterization

The initial percentage of denatured protein in the unheated 9 % WPI solution was calculated as the difference between total protein content and the protein content in the supernatant after precipitation of insoluble material taken as a percentage of the total protein content. Insoluble material was precipitated at pH 4.8 (3000 x g, 30 min) and the protein content was calculated from N determinations by the Kjeldahl procedure (IDF, 1993). Moisture content was determined by weight loss after drying and ashes were estimated after combustion at 550 °C during 5 hours. Lactose content was obtained using an enzymatic method via an Enzytec Lactose/D-Galactose kit (Diffchamb SARL, Lyon, France). Finally, fat content was determined using the Röse-Gottlieb extraction method.

2.2.3. Preparation of acid gels simulating yogurt

Simulated yogurt milk was made by reconstituting skim milk powder in distilled water up to 10 % w/w total solid content. Sodium azide (0.2 $g.100g^{-1}$) was added to prevent bacterial growth and then the milk base was stored overnight at 4°C under mechanical stirring (300 rpm). The powders (denatured or native whey powders) were added to reach a final total solid of 12 % w/w. The powders were left to rehydrate under mechanical stirring (300 rpm) at 20 °C for 5, 180, 300, 480, 900 or 1440 minutes before acidification of the mix base. The latter was stimulated by the addition of GDL at a concentration of 1.5 % w/w at 42 °C in a

water bath. Acidification was stopped once the desired pH of 4.65 was reached. Obtained acid-gels were then stored overnight at 4 °C. It is important to point out that the control samples were made by reconstituting skim milk powder up to 12 % w/w total solid content.

2.2.4. Rheological properties

2.2.4.1. Gel point determination

Viscous and elastic components as well as angle phase of the basic mix were measured at 42 °C with a rotational rheometer (Kinexus, Malvern Instruments, Orsay, France). The rheometer was equipped with a cup (with a serial number: PC25S0408AL) and bob geometry consisting of coaxial cylinders (with a serial number: C25 SC0026SS). After addition of GDL, the mixture was stirred for 2 minutes and then 20 ml of the yogurt mix were transferred into the cup. Samples were oscillated at constant frequency of 1 Hz with an applied shear strain of 0.1 %. Gelation time was defined as the time when the phase angle transits 45 degree and when subsequent phase angles of less than 45 degrees are recorded thus emphasizing elasticity behavior dominance.

2.2.4.2. LVER Determination

An amplitude sweep shear stress ramp was carried out via the rheometer (Kinexus, Malvern Instruments, Orsay, France) and using a serrated geometry. The serial numbers of the 40 mm lower serrated plate geometry and upper plate were respectively PL40S0505 SS and PU40 XSC0010SS. The measurement of the elastic (G') and viscous (G") modulus and loss tangent (tan (δ)) as well as the determination of the Linear Visco Elasticity Region (LVER) of the acid-gels were performed with an applied stress between 0.1 to 100 Pa at a frequency of 1 Hz at 4 °C. The limit of linearity (end point of the linear region) was considered as the point where G' initiate to collapse (when determined graphically), and when G' go lesser than 1 Pa (when determined by analyzing data). The two methods showed concordant results.

2.2.5. Powder rehydration profiles

Experiments were conducted into vessels under mechanical agitation (by a stirrer) at 300 rpm. The temperature was held at 20 °C via a double wall jacket vessel. Particle dispersion was achieved through a peristaltic pump (Watson-Marlow pumps, La Queue les Yvelines, France) and monitored via an inline process. Analyses were performed using the

QICPIC™ (Sympatec GmbH, Germany) equipped with a dispersion module (LIXELL™, Sympatec). This equipment is particularly appropriate for powders in suspension *(Gaiani et al.,* 2011; Karam *et al.,* 2012). For each measure, 0.4 g of powder was dispersed in 100 ml of milk base preparation. Concurrently, regular images and video of the particles under rehydration were incessantly recorded during 24 hours. Data were first collected every 15 seconds for 1 hour, then every minute for 3 hours, every 15 minutes for 6 hours and finally every hour for the remaining 14 hours. Windox 5.4.10 software (Sympatec) was used in this study to determine particles' size distribution, a physical characteristic influencing rehydration properties (Gaiani *et al.,* 2011). Particles' size determination was possible based on the laser diffraction and dispersing system of the QICPIC™ instrument.

2.2.6. Statistical Analyses and data treatments

For all experiments, the results correspond to the average of three trials. Statistical analyses were performed using Sigma Stat 3.1 (Systat Software, Inc., Chicago, IL, USA). The differences between groups were determined by ANOVA followed by Student Newman-Keuls post hoc tests. The level of significance was set at a $p < 0.05$.

2.3. Results and discussion

2.3.1. Physiochemical determinations

Powders chemical composition is reported in **Table 8**. Skim milk and native whey protein isolates compositions were consistent with those previously reported in the literature (Peng *et al.,* 2009). The increased protein content of denatured whey protein could be explained by their minor water content. The denatured whey protein isolates presented a more important fraction of denatured whey compatible with the applied thermal treatment.

Table 8. Chemical composition ($g.100g^{-1}$) of the used powders: skim milk powder, whey protein powders (native and denatured). (Results are the mean of triplicates with corresponding standard deviations)

	Skim milk powder	Whey protein powder (native)	Whey protein powder (denatured)
Total proteins - Denatured - Native*	38.1 ± 1.1 - 38.1	87.7 ± 3.3 26.8 ± 2.0 60.9	93.7 ± 2.4 56 ± 1.2 42.2
Ashes	5.6 ± 0.7	2.1 ± 0.6	2.3 ± 0.3
Water	3.8 ± 0.3	6.9 ± 0.1	1.0 ± 0.10
Fat	0.5 ± 0.0	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.2
Lactose	52.0 ± 0.9	2.2. ± 0.2	2.0 ± 0.2

2.3.2. Rehydration profiles of whey powders into the milk base

2.3.2.1. Rehydration process of native whey powder

Figure 24 illustrates the standardized rehydration profile of the native whey protein isolates into milk. This profile was obtained by tracking the evolution of particles size d_{50} (µm) of the native whey protein isolates throughout 24 hours of rehydration. Initially, native whey protein isolates particles size was around 35 µm. This original size was determined in ethanol as previously performed by Gaiani *et al.*, (2005). Subsequently to the addition of the native whey protein isolates to the milk, the particles size (d_{50}) decreased promptly and reached 14 µm after around 5 minutes of rehydration. Afterward, particles size was stable and increased considerably from 166 minutes of rehydration reaching a maximum after 1081 minutes (28 µm). The observed decrease in particles size could be correlated to the "dispersion stage of rehydration" described by Gaiani *et al.*, (2006). Our results are in agreement with others previously reported regarding a quick dispersion stage characterized by a decrease in particles size (Gaiani *et al.*, 2005; Gaiani *et al.*, 2007). Nevertheless, these studies were conducted in water and not in a complex medium such as milk. The increase in particles size starting around 166 minutes was unexpected and could be associated to an eventual particles aggregation. This increase was not previously observed in water (Gaiani *et al.*, 2005; Gaiani *et al.*, 2007) but for the first time the study is conducted in milk media. A hypothesis for this observation could be related to the denatured fraction (around 30 % of proteins) of the native whey protein probably due to prior heat treatment during manufacture and/or powder storage. When added to the milk the accessible thiols groups could have

interacted by disulfide bonding with milk constituents and formed aggregates. Indeed, according to Vasbinder *et al.*, (2003), sulfhydryl group-disulfide bond interchange reactions take place even at ambient temperature.

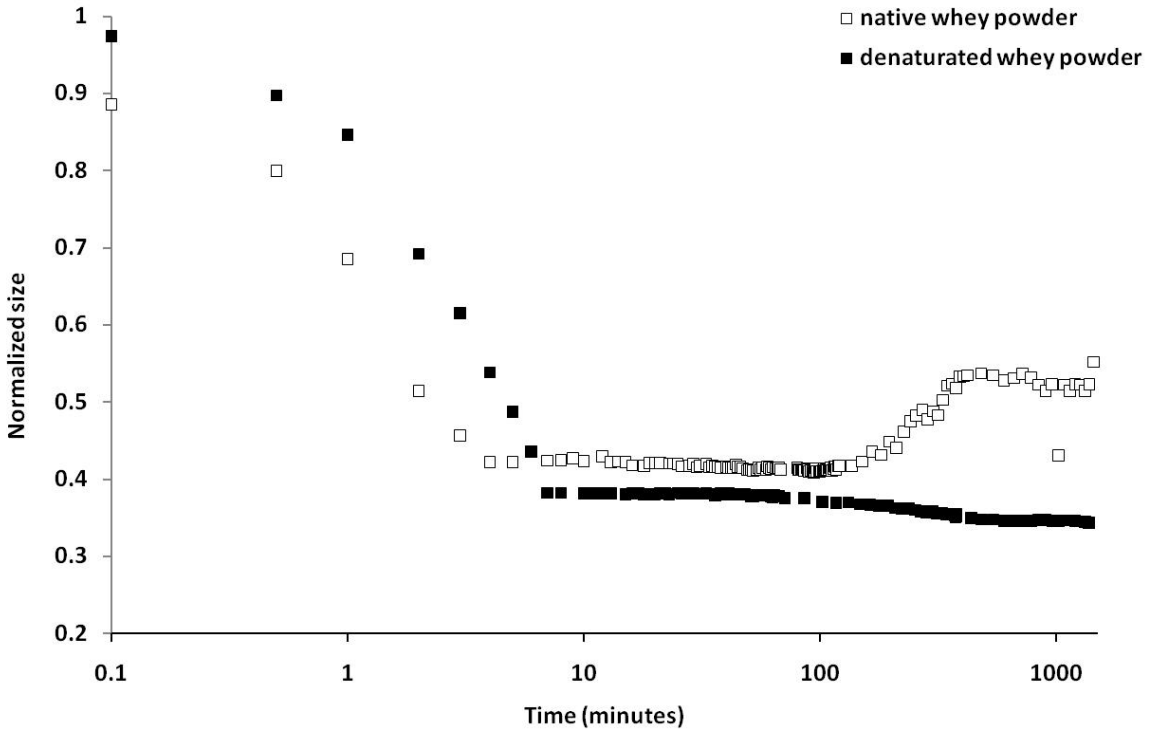


Figure 24. Normalized curves of rehydration of both powders (native and denatured whey protein powder) into milk obtained with the Qicpic apparatus at 20 °C (mean of triplicates independent analyses).

2.3.2.2. Rehydration process of denatured whey powder

The standardized rehydration profile of the denatured whey protein isolates in a complex medium such as milk is also represented in **Figure 24**. The original particles size of the denatured whey protein isolates was around 39 µm. Subsequent to the addition of denatured whey protein isolates into the milk base, the particles size decreased steadily and reached 14 µm after 9 minutes of rehydration. The denatured whey protein isolates presented a comparable profile of rehydration to the native whey powder. As expected, the denatured whey protein isolates presented a slighter lengthy dispersion phase that could be attributed to the deterioration of dispersion properties of whey proteins during heat treatment (Dissanayake & Vasiljevic, 2009). Surprisingly and in comparison with native whey powder, denatured whey protein didn't present particles aggregation after 166 minutes of rehydration. This

finding could be attributed by a lack of required reactive sites for cross-linking that had presumably interacted before rehydration (during the dry heating step). Indeed, Gulzar *et al.*, (2011) have demonstrated that intermolecular disulfide bonds were formed in the powder during dry heating.

2.3.2.3. Rehydration process of whey powders followed in situ by microscopy

These rehydration profiles of native and denatured whey protein powders were concordant with the in situ microscopy observations presented in **Figure 25a** and **b**. Indeed, **Figure 25a** represents in situ images of the rehydration of native whey protein isolates into milk respectively, soon after few seconds, 5, 180, 300, 480, 900 and 1440 minutes of rehydration. The dispersion phase is observed in figures (2a: A. B. C. D) as well as the aggregation part observed in figures (2a: E. F. G). **Figure 25b** represents the in situ images of the rehydration of denatured whey protein isolates into milk. The dispersion phase is noticeable in figures (2b: A. B. C. D.) as well as a particle size stabilisation in figures (2b: E. F. G.). These visual observations are in total agreement with the evolution of the d (50) in **Figure 24**.

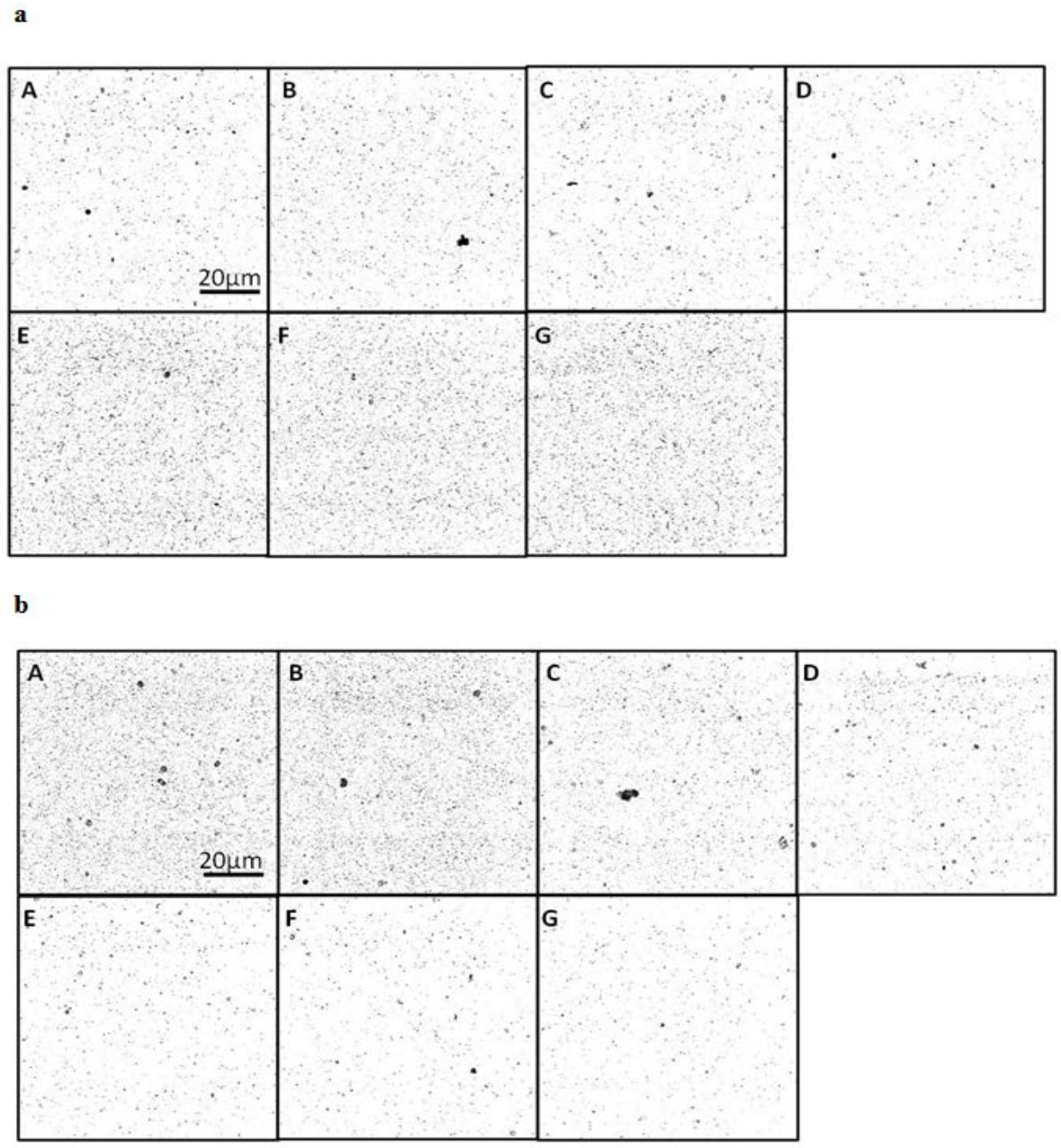


Figure 25. Images of mixes with native (a) and denatured (b) whey protein isolates after few seconds (A), 5 min (B), 180 min (C), 300 min (D), 480 min (E), 900 min (F) and 1440 min (G) of rehydration.

2.3.3. Influence of the rehydration state on gel point

Table 9 represents the means of triplicates and standard deviation of gelation onset corresponding to the different rehydration times of the native and denatured whey powder. Gelation onset was significantly increased in milk bases fortified with WPI. This latter occurred around 2100 seconds for milk bases supplemented with skim milk powder. Our

finding is in agreements with others (Puvanenthiran *et al.*, 2002) who demonstrated that acidification time is increased proportionally to increases in whey protein to casein ratio.

Table 9. Rheological properties of the obtained acid gels after different rehydration time for both powders (Results are the means of triplicates with corresponding standard deviations and statistical results, $p<0.05$)

Milk powder	Rehydration Time	Onset of gelation (s)	Complex Shear Stress (Pa)	Elastic modulus G'(Pa)	Viscous Modulus G'' (Pa)	tan(δ) (G''/G')
skim milk powder	-	2136 ± 58	18.0 ± 4.2	79.3 ± 6.4	36.5 ± 5.3	0.46 ± 0.06
Native whey protein	5 min	3017^{ab} ± 64	21.0^{ab}±2.7	135.2^{ab*}±9.3	42.4^{ab*}±4.1	0.31^{ab*}±0.01
	180 min	2874^{ab*}±188	21.0^{ab}±2.4	137.1^{ab}±29.2	63.1^{ab}±13.2	0.46^{ab} ±0.01
	300 min	2788^{ab*}± 86	23.0^{ab}±3.2	137.0^{ab}±23.2	52.5^{ab} ± 1.3	0.39^{ab}± 0.05
	480 min	3054^{ab*}± 59	21.0^{ab}±3.3	138.5^{ab}±35.7	45.0^{ab} ± 6.7	0.33^{ab} ±0.03
	900 min	2944^{ab*}± 17	23.3^{ab}±3.3	135.7^{ab}±13.4	36.6^{ab} ± 4.9	0.26^{ab}± 0.06
	1440 min	2930^{ab*} ± 27	24.3^{ab}±3.7	139.2^{ab}±22.6	37.1^{ab} ± 4.5	0.27^{ab} ±0.01
Denatured whey protein	5 min	2976^{a*b}± 44	20.5^{ab}±0.2	70.6^{ab*}± 7.3	24.9^{ab*}±1.9	0.35^{ab*}±0.01
	180 min	3233^{ab*} ± 40	19.3^{ab}±1.7	83.8^{ab} ± 3.4	27.0^{ab} ± 0.7	0.32^{ab} ±0.04
	300 min	3142^{ab*}± 24	21.3^{ab}±2.6	77.1^{ab} ±11.4	30.0^{ab} ± 5.9	0.38^{ab} ±0.05
	480 min	3345^{ab*}± 16	19.0^{ab}±1.2	89.8^{ab} ±12.3	31.7^{ab} ± 4.6	0.35^{ab}± 0.07
	900 min	3176^{ab*}± 85	22.8^{ab}±2.6	87.8^{ab} ± 2.6	39.5^{ab} ± 0.4	0.45^{ab}± 0.09
	1440 min	3218^{ab*} ± 56	20.6^{ab}±2.8	88.9^{ab} ± 5.2	41.9^{ab} ± 2.8	0.47^{ab} ±0.09

[a]: not significant within the same powder for different rehydration time
[b]: not significant within the same rehydration time for the two powders
[a*] : significant within the same powder for different rehydration time
[b*]: significant within the same rehydration time for the two powders

Gelation onset occurred at around 3000 seconds in the case of the native whey protein isolates and no statistical differences were noted for the different rehydration times (5, 180, 300, 480, 900 and 1440 minutes). The gel point took place at 3000 seconds after 5 minutes of rehydration of the denatured whey protein isolates and at 3200 seconds after 180, 300, 480, 900 and 1440 minutes of rehydration. The observed increase in gelation onset starting from 180 minutes of rehydration was significant when compared to the gel point after 5 minutes of rehydration.

Regarding the native whey powder, our results differed from those reported by Karam *et al.*, (2012) who found that rehydration state of micellar casein powder affected and postponed significantly the gel point. These two contradictory findings could be correlated to the different rehydration properties of the two dairy powders. In fact, micellar caseins are well

known for their slow total rehydration process and more particularly their slow dispersion into water (Gaiani *et al.,* 2005; Gaiani *et al.,* 2006) and into other ionic environments (Hussain *et al.,* 2011). In contrast, the rehydration of whey protein powders is well known to be quicker and easier (Gaiani *et al.,* 2007). In conclusion, a high percentage of the powder being quickly rehydrated could thus explain the unaltered point gel.

Concerning the denatured powder, the significant increase in onset of gelation could be correlated to the slightly extended dispersion phase. The latter being a consequent to the decreased solubility subsequent to heat treatment (Dissanayake & Vasiljevic, 2009).

2.3.4. Influence of powder denaturation on gel point

The gel point was significantly ($p<0.05$) increased for denatured whey protein isolates when compared to the native whey protein isolates within a similar rehydration range after 5 minutes of rehydration. This observation could be explained by a limited accessibility of sulphydryl groups in denatured whey protein isolates. Indeed, according to Gulzar *et al.,* (2011) the exposed sulphydryl groups tend to be reduced in dry heated whey protein powder. Moreover, we can hypothesize that the formation of aggregates in milk with native whey protein isolates might have provoked earlier gelation of the casein micelles. We speculate that the binding of this aggregates formed after 166 minutes of rehydration to the destabilized and acidified structurally modified casein micelles might have initiated earlier gelation.

2.3.5. Influence of powder rehydration state and denaturation on LVER

The complex shear stress values required to breakdown the gel structure and the corresponding elastic and viscous modulus as well as tan (δ) values for both powders after different rehydration times are reported in **Table 9**. The gel structure of yoghurt made from native and denatured whey protein collapsed when applying a complex shear stress of 20 to 24 Pa. The limit of LVER seemed unaffected by the different rehydration times (5, 180, 300, 480, 900 and 1440 minutes) for both powders. This result was partially expected since rehydration of whey protein into milk appeared to be rapid and dispersion occurred after 5 and 9 minutes for native and denatured whey powders, respectively.

Nonetheless, the gel structure of yoghurt prepared from denatured whey protein presented lower elastic modulus values, higher tan (δ) values and collapsed at lower complex shear

stress values than yoghurts supplemented by native whey powder. These values reflect the more elastic character of acid-gels prepared from native whey powder. Indeed, a high value of tan (δ) reflects that the material has a liquid-like behavior (Rao, 1999). These results are in contrast with those of Isleten & Karagul-Yuceer, (2008) and Remeuf *et al.,* (2003) who established that yogurts prepared from denatured whey protein experienced an increased elastic character. Our observations could be explained by the fact that in our work the added whey proteins to the yoghurt's mix were already denatured and intermolecular disulfide bonds were already formed in dry heated powder, whereas in their study, whey proteins were denatured by heat treatment in the yoghurt milk base. Nonetheless, our finding could be explained by a lower concentration of available reactive thiol groups consequent to the addition of denatured whey powder. Indeed, Matumoto-Pintro *et al.,* (2011) reported that preheated whey protein exhibited a reduction in accessible thiol and thus a decrease in disulfur bond formation through oxidation reaction. These authors have also correlated the high concentration and accessibility of thiol groups to the increased gel stability. Thus, a lower concentration of thiol groups is then responsible of a lesser extent of disulfur bonds during gelation and consequently of softer gels. However, in our study, the differences in values of the complex shear stress required to breakdown the gel matrix and in G', G" and tan (δ) values were not statistically significant (Table 8). A potential explanation of this latter observation could be the fact that rheology and more particularly elastic measurements depend on all particles present in the suspension as well as all rearrangements occurring even after aggregation (Donato *et al.,* 2007).

2.4. Conclusion

For the first time, this study traced the rehydration process of whey protein isolates into a complex medium such as milk. It showed that whey protein isolates exhibit a relatively rapid dispersion phase and it is worth noting that denatured whey protein isolates after a quick dispersion start to aggregate in milk medium. This work demonstrated also that the rehydration state of whey protein isolates does not affect neither the onset of gelation nor the elastic character of the obtained acid gels. Whereas, the denaturation state by dry heating of whey protein isolates prolongs slightly both the dispersion phase and the onset of gelation and results in weaker elastic gels.

Acknowledgements

The authors would like to thank the financial support of Philippe Jabre Association.

3. Influence de l'état de réhydratation de poudres de lait sur les propriétés texturales de gels acides laitiers

La réhydratation des protéines majoritaires du lait (caséines micellaires et protéines solubles solubles) a été étudiée au cours des travaux précédents dans le mix laitier servant de base à la formulation des yaourts. Il en a résulté que les caséines micellaires présentent un long processus de réhydratation contrairement aux protéines solubles (processus de réhydratation quasi-instantanée). La suite des travaux a porté sur l'impact de l'état de réhydratation des poudres de lait sur les propriétés texturales des gels acides.

Dans cette étude, l'influence de l'état d'hydratation des poudres de lait (caséines micellaires et protéines solubles natives) a été analysée sur les propriétés physiques et texturales des gels acides en fonction du temps (5, 120, 240 ou 1440 minutes de réhydratation). Il en résulte que l'incorporation des protéines solubles améliore les propriétés physiques (capacité de rétention d'eau) et texturales des gels telles que leur fermeté et leur force, tout en diminuant la synérèse mais augmente également la formation de grumeaux. Ces effets ne sont pas influencés par les différents temps d'hydratation. En revanche, pour les caséines micellaires, l'allongement des temps d'hydratation est associé à une nette amélioration des différents paramètres physiques et texturaux des gels, du fait de l'augmentation en parallèle de la solubilité des particules de poudre.

Ces travaux ont fait l'objet de la rédaction d'un article soumis à *International Journal of Dairy Technology* :

Textural properties of acid milk gels: effects of dairy proteins powders rehydration state

Marie Céleste Karam, Claire Gaiani, Chadi Hosri, Joel Scher

Abstract:
Addition of dried dairy ingredients such as casein-based ingredients and whey protein isolates for fortification purposes is a common practice in yogurt manufacture. The effect of their rehydration state on the textural properties and microstructure of yogurt was investigated in this study. For this, yogurt mixtures were enriched with whey protein isolates (WPI) or native micellar casein (MC) powders. Different rehydration times (5, 120, 240 and 1440 minutes) were considered before studying gel textural properties (firmness, gel strength, water holding capacity, syneresis and graininess) as well as microstructure after 24 h of storage at 4 °C.

Yogurt made with WPI instead of MC resulted in an increase in firmness, gel strength, water holding capacity and graininess and in a decrease in syneresis susceptibility. Rehydration length of MC in contrast to that of WPI altered strongly the physical properties of the obtained acid milk gels. It resulted in enhanced textural properties and reduced syneresis parallel to rehydration duration.
Keywords: milk proteins, rehydration, textural properties, acid milk gels.
Abbreviations: GDL: glucono-delta-lactone; **MC**: micellar casein; **SMP**: skim milk powder; **WHC**: water holding capacity; **WPI**: whey protein isolates.

3.1. Introduction

Yogurt is a very popular fermented dairy product widely consumed all over the world (Verman & Sutherland, 2004; Peng *et al.,* 2009). Industrial yogurt manufacture involves different processing steps (Sodini & Béal, 2003; Lee & Lucey, 2010). Among them, protein fortification of the milk base appears as a crucial step for amending yogurt textural attributes (Sodini & Béal, 2003; Séverin & Wenshui, 2005; Marafon *et al.,* 2011). Milk powders and their derivates have been commonly added for protein enrichment of the milk base. The addition of milk-derived powder proteins such as micellar casein based ingredients and whey protein has gained interest because of their functional characteristics of emulsification, foaming, thickening as well as their nutritional attributes (Ha & Zemel, 2003; Isleten & Karagul-Yuceer, 2006, 2008). Their use in yogurt formulation has been addressed by many researches (Isleten & Karagul-Yuceer, 2006; Peng *et al.,* 2009; Supavititpatana *et al.,* 2009) and resulted in firmer and more viscous product less prone to syneresis. Nevertheless, while WPI powders are known for their quick rehydration process into milk (Karam *et al.,* 2012), micellar casein powders are put forward for their lengthy rehydration mechanism (Karam *et al.,* 2012). These authors have found that MC dispersion phase into the milk was not totally achieved even though after 480 minutes of rehydration. On the other hand, improper powder rehydration imparts yogurt texture and results in an apprehended defect, graininess (Tamime & Robinson, 2007). It is well known that consumer acceptance of yogurt is strongly affected by textural properties (Kristo *et al.,* 2003; Soukoulis *et al.,* 2007; Lee & Lucey, 2010).

Yogurts are organized as a concentrated dispersion of protein particles, aggregates, chains and clusters (Modler & Kalab, 1983; Sodini *et al.,* 2004; Lee & Lucey, 2010).Yogurt texture defines the disposition and arrangement of the different part of the system. It

represents all the rheological and the physical properties perceptible by means of mechanical and instrumental attributes (Sodini *et al.,* 2004). In term of rheology, yogurt can be classified as a pseudo-elastic material that can be either viscoelastic fluid (for stirred and drinking yogurt type) or viscoelastic solid (set yogurt type). Yogurts exhibits a wide range of non-Newtonian effects such as shear-thinning, yield stress and thixotropic flow behaviors (Lucey *et al.,* 1997; Sodini *et al.,* 2004; Damin *et al.,* 2009; Lee & Lucey, 2010). Small amplitude oscillatory rheology (which does not damage the gel network) has been commonly used to characterize the rheological properties of yogurt gels. The linear viscoelastic region is a rheological parameter characterizing the strength of a yogurt gel. It reflects the stability of a suspension where gel structure is sustained and where beyond it gel structure begins to collapse (Damin *et al.,* 2009). The firmness of a yogurt gel can be also characterized by dynamic tests such as penetrometry, which measures the force required to push a probe into yogurt gels at a fixed depth of penetration. Finally, yogurt microstructure and the indirect evaluation of network homogeneity (by measurement of water holding capacity and syneresis) permit molecular evaluation of macroscopic changes of yogurt appearance (Sodini *et al.,* 2004).

As mentioned before, the effects of these powders on yogurt textural characteristics have been investigated by many researchers. However, to our knowledge, little is known about the effect of incorporation and hydration of these dairy proteins on yogurt textural attributes. Further, whereas Tamime & Robinson, (2007) clearly recommend a period of three hours for skim milk powder rehydration into the milk base before fermentation/acidification, a similar recommendation concerning whey protein isolates and micellar casein does not exist.

Hence, the current study aimed to investigate the effect of WPI and MC hydration condition on some yogurt textural characteristics. In this study, milk acidification has been stimulated by the use of a chemical acidulant, Glucono-delta-lactone (GDL) in place of bacterial cultures in order to eliminate variations caused by bacterial cultures.

3.2. Materials and methods

3.2.1. Materials

Throughout the study, a low heat skim milk powder (**SMP**) supplied by Lactalis (Lactalis Ingredients, Bourgbarré, France) was used as the basic raw material. The used dairy ingredients, whey protein isolates (**WPI**) and micellar casein (**MC**) were procured from

Lactalis (Lactalis Ingredients, Bourgbarré, France) and International Dairy Ingredient (IDI, Arras, France) respectively. Sodium azide, GDL and Fast green were provided by Merck (Merck and Co, Inc, Whitehouse station, NJ, USA).

3.2.2. Powder chemical characterization

The moisture content of the powders was determined by weight loss after drying and ashes were estimated after combustion at 550 °C during 5 hours. Lactose content was obtained using an enzymatic method via an Enzytec Lactose/D-Galactose kit (Diffchamb SARL, Lyon, France). Finally, fat and protein content were determined using the Röse-Gottlieb extraction method and Kjeldahl method respectively.

3.2.3. Yogurt gels preparation

Low heat skim milk powder was used to yield reconstituted skim milk containing 10 % w/w total solids content. Sodium azide (0.02 % w/w) was added to prevent bacterial growth and the milk base was stored overnight at 4 °C under mechanical stirring (300 rpm). An additional 2 % (w/w) of whey protein isolates or micellar casein was added in appropriate amounts to obtain a total solid content of 12 % (w/w) in the final yogurt mix. The mixture was then stirred under mechanical agitation (300 rpm) for 5, 120, 240 or 1440 minutes at room temperature (20 °C). The yogurt mixes were then heat-treated in a thermostatically controlled water bath at 95 °C for 5 minutes than cooled down to 42 °C in an ice bath. Acidification of the milk base was then stimulated by the use of 1.5 % (w/w) of glucono-delta-lactone, where the hydrolysis of GDL to gluconic acid ensured the pH reduction. Acidification was stopped when the desired pH of 4.6 was reached. The yogurt samples were afterward cooled in an ice bath (7 °C) and then stored overnight at 4°C before evaluation. The set of yogurt mix was prepared in triplicates. The control yogurt samples were made with 12 % (w/w) of reconstituted skim milk powder into distilled water without any further powder addition.

3.2.4. Yogurt gels textural properties

3.2.4.1. Yogurt gels firmness

After one day of storage at 4 °C, the firmness of yogurt samples was determined with a puncture test using a texture analyzer (LIod, Instruments, Ametek, France). The probe used was a 2.5 cm diameter cylinder. The speed of penetration was fixed at 2 $mm.s^{-1}$ and

penetration depth was set at 15 mm. Firmness was defined as the force necessary to reach the maximum depth (Damin *et al.*, 2009). Tests were replicated thrice.

3.2.4.2. Yogurt gels rheological properties

The rheological properties parameters were measured at 4 °C with a Kinexus Rheometer (Malvern Instruments, Orsay France). The rheometer was equipped with serrated plates (40 mm, 1.0 mm gap). A strain sweep test was performed to determine the linear viscoelastic region of the obtained gels with an applied strain between 0.001 % and 50 % at a constant frequency of 1 Hz. The limit of linearity as the end point of the linear region was considered as the point at which the elastic modulus deviated more than 5 % from its maximum value (Damin *et al.*, 2009) Corresponding complex shear stress values (Pa) were thus reported.

3.2.5. Yogurt gels physical properties

3.2.5.1. Water holding capacity

The water holding capacity was determined with a procedure described by Sodini *et al.*, (2005). A sample of 20 g of yogurt was centrifuged for 10 minutes at 1250 g at 4 °C. The whey expelled was harvested and weighed. The water holding capacity was calculated as the following:

$$WHC\ (\%) = \frac{(20\ g\ of\ yogurt - whey\ expelled)\ *\ 100}{20\ g\ of\ yogurt}$$

3.2.5.2. Syneresis measurement

Syneresis was also determined by a centrifugation method adapted from Guzman-Gonzalez *et al.*, (1999). Yogurt (20 g) was weighed into centrifuge tubes, and centrifuged (at 640 g for 20 minutes at 4 °C). The clear supernatant was thoroughly removed and weighed. Syneresis was calculated according to the following equation:

$$Syneresis\ (\%) = \frac{Weight\ of\ supernatant\ *\ 100}{Weight\ of\ yogurt\ sample}$$

3.2.5.3. Graininess

Graininess was measured by a modified procedure from Remeuf *et al.,* (2003) and Sodini *et al.,* (2005). A marked sample of 1 g of yogurt was visualized via a microscope operating in a fluorescence mode equipped with a camera. Fast green was used as a fluorescent protein dye and dissolved in distilled water to a concentration of 0.2 % (w/w) then added to 40 ml of pre-heat treated milk and mixed. Graininess was evaluated by Image J software (Wayne Rasband, NIH, version 1.43). Grains having a perimeter > 1 mm were enumerated. The results were expressed as number of grains per gram of yogurt sample.

3.2.5.4. Microstructure

Microstructure was determined by an adapted method described by Matumoto-Pintro *et al.,* (2011). Yogurt samples stored at 4 °C for one day were frozen fixed in liquid nitrogen and lyophilized. The dried samples were mounted on aluminum stubs covered with double-sided tape and coated with 10 nm gold layer. The gold-coated samples were placed for observation in a field-emission scanning electron microscope (Philips CM20, France), operating at a voltage of 1.0 to 10.0 Kv. Images were registered under magnifications from 1500 to 10.000 x. Images were analyzed using the software Image J (Wayne Rasband, NIH, version 1.43).

3.2.6. Statistical analysis

Measurements for all experiments were performed in triplicates after one day of storage at 4 °C. All of the statistical analyses were performed using Sigma Stat 3.1 software (Systat Software, Inc., Chicago, IL, USA). The differences were determined by ANOVA and Tukey test. The level of significance was set at a $P < 0.05$.

3.3. Results and discussion

3.3.1. Powders chemical characterization

Powders chemical composition is reported in **Table 10.** SMP, WPI and MC contained 38.1, 87.7 and 84.2 g of proteins per 100g, with a mineral content of 5.6, 2.1 and 6.6 $g.100g^{-1}$ respectively. The studied CM and WPI powders represented a comparable composition to that of the average composition of these powders reported in the literature (Peng *et al.,* 2009).

Nonetheless, higher moisture content was found for MC powder that could be explained by an acquired humidity during storage. Indeed, MC powder is well-known for its water uptake during storage (Mimouni *et al.*, 2010).

Table 10: Chemical composition ($g.100g^{-1}$) of the powders used (results are the mean of triplicates with corresponding standard deviation).

	Skim milk powder	Whey protein isolates	Micellar casein
Proteins	38.1 ± 1.1	87.7 ± 3.3	84.2 ± 0.4
Ashes	5.6 ± 0.7	2.1 ± 0.6	6.6 ± 0.1
Water	3.8 ± 0.3	6.9 ± 0.1	8.5 ± 0.3
Fat	0.5 ± 0.0	1.1 ± 0.3	0.3 ± 0.1
Lactose	52.0 ± 0.9	2.2. ± 0.2	0.4 ± 0.2

3.3.2. Yogurt gels textural characteristics as a function of rehydration length

The firmness of yogurt gels prepared with MC or WPI and after different rehydration times is shown in **Figure 26**. The firmness value of the control samples was around 0.20 N. The values increased significantly and linearly with MC rehydration length (from 0.18 after 5 minutes of rehydration to 0.27 N after 1440 minutes of rehydration). When yogurt mixes were prepared with WPI, there were no significant differences in firmness values (around 0.3 N regardless the rehydration time).

As shown in **Table 11**, the complex shear stress required to collapse the gel structure of MC-fortified yogurt increased proportionally to rehydration length (from around 74 Pa to 84 Pa after 1440 minutes of rehydration). Nevertheless, this increase was not statistically significant. This observation may be explained by the fact that rheology measurements depend on all particles present in the suspension as well as all rearrangements occurring even after aggregation (Donato *et al.*, 2007). The complex shear stress required to break-down the gel structure of WPI-enriched yogurt was steady and around 180 Pa regardless the different rehydration times. Similar tendencies were also observed for water holding capacity of yogurt samples fortified with either MC or WPI (**Figure 27 A**). A statistically significant increase in WHC for MC-fortified yogurts was observed parallel to rehydration length. WPI-fortified yogurt samples presented a constant WHC around 42 % regardless WPI rehydration time.

Furthermore, a significant decrease in syneresis values and graininess were noted for yogurt samples prepared with MC parallel to rehydration extent **(Figure 27 B** and **Table 11** respectively). The drop off in syneresis values and graininess was statically significant when comparing MC-prepared yogurt samples proportionally to rehydration length with a syneresis value of around 45 % and a graininess value of around 160grains/gram after 1440 minutes of rehydration. Moreover, yogurt samples made with WPI exhibited similar syneresis (around 30 %) and graininess values (around 240 grains/g) regardless rehydration duration **(Figure 27 B and Table 11).** The decrease in grains formation is also apparent in **Figure 28** (a, b, c, d) reporting the grains observation by fluorescence microscopy in yogurt samples fortified with MC after different rehydration length. The comparable grains formation of yogurt samples prepared with WPI despite their different rehydration time is also illustrated in **Figure 28** (e, f, g, h).One main hypothesis is put forward to explain these results concerning the textural characteristics of acid-gels formulated with WPI or MC after different rehydration length. Indeed, the opposite rehydration properties of the two powders may contribute to the observed results. WPI rehydration into water and into milk is characterized by a quick process with a wetting stage limiting and a quick dispersion stage making the entire process relatively quick (Gaiani *et al.,* 2006; Karam *et al.*, 2012). Contrarily, MC powder present a very slow and long dispersion phase making the total rehydration process time-consuming in water (Gaiani *et al.,* 2007), in ionic environments (Hussain *et al.,* 2011) and in complex media such as milk (Karam *et al.,* 2012). Thus, the unaltered firmness, complex shear stress required to initiate the gel structure break-down, WHC, syneresis and graininess values in WPI-enriched yogurt samples may be due to the rapid dispersion/dissolution phase of WPI particles which usually occurs after five minutes of rehydration into milk (Karam *et al.,* 2012). The significant increases in firmness, WHC, complex shear stress values as well as the decreases in graininess and syneresis values may be explained by the slow and progressive increase of MC powder dissolution. Indeed, in a previous study Karam *et al.,* (2012) reported an increase in particles dissolution up to 70 % proportionally to rehydration length. We can speculate, hence, that additional MC particles have engendered further casein-casein throughout acidification resulting thus in a stronger gel network.

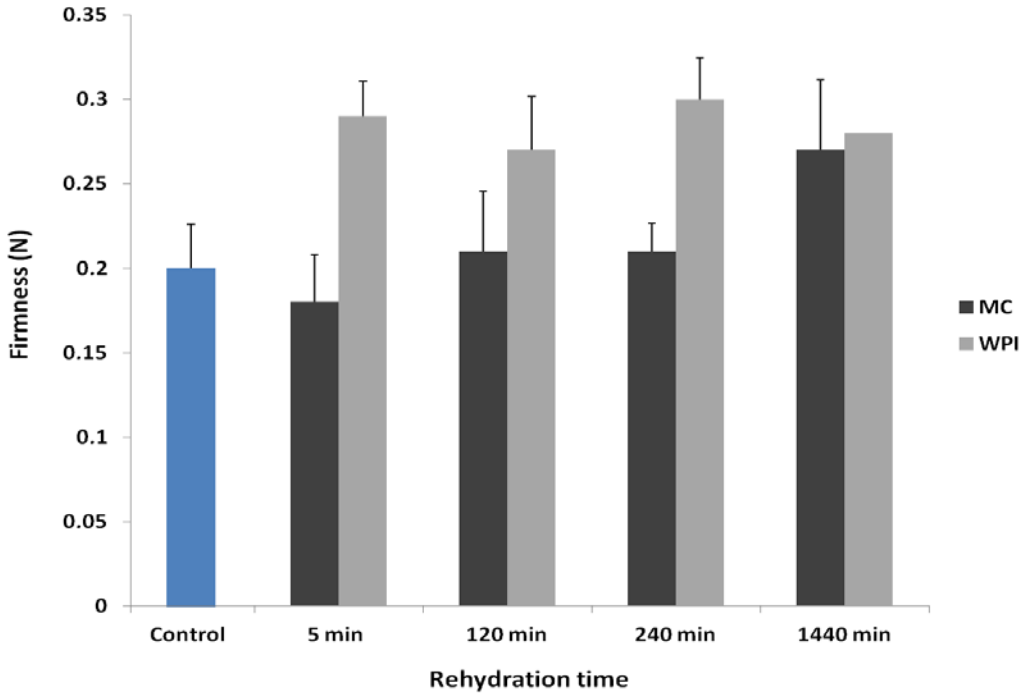


Figure 26: Firmness (N) of yogurt samples prepared with WPI and MC for the four different rehydration times.

Table 11: Complex shear stress and graininess values for WPI and MC-enriched yogurts samples after different rehydration times (mean of triplicates with corresponding standard deviation).

	Rehydration time (minutes)	Complex Shear Stress (Pa)	Graininess (Grains/g)
Non-fortified SMP	-	79.3 ± 6.4	226 ± 13.27
Micellar Casein	5	73.6 ± 3.4	232 ± 16.7
	120	84.2 ± 8.4	227.3 ± 27.6
	240	76.6 ± 9.5	208± 31.2
	1440	84.1 ± 9.7	162.6 ± 29.7
Whey protein isolates	5	177 ± 24.8	247 ± 16.1
	120	190 ± 25.2	251 ± 38.5
	240	170.9 ± 28.9	243.6 ± 28.3
	1440	183 ± 11.8	213 ± 38.4

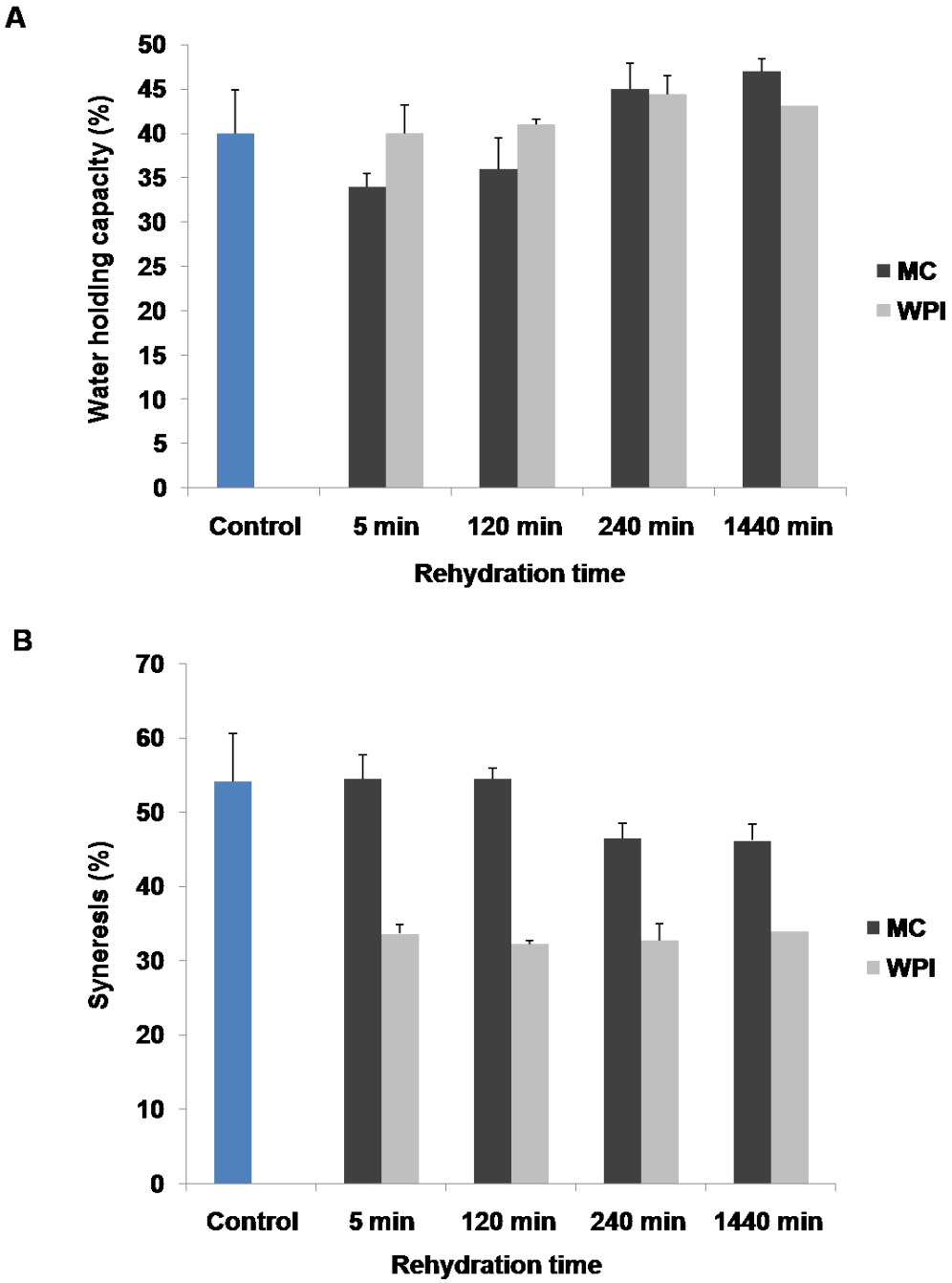


Figure 27: Water holding capacity (A) and syneresis values (B) (in %) of WPI and MC-fortified yogurt mixes after the four rehydration times.

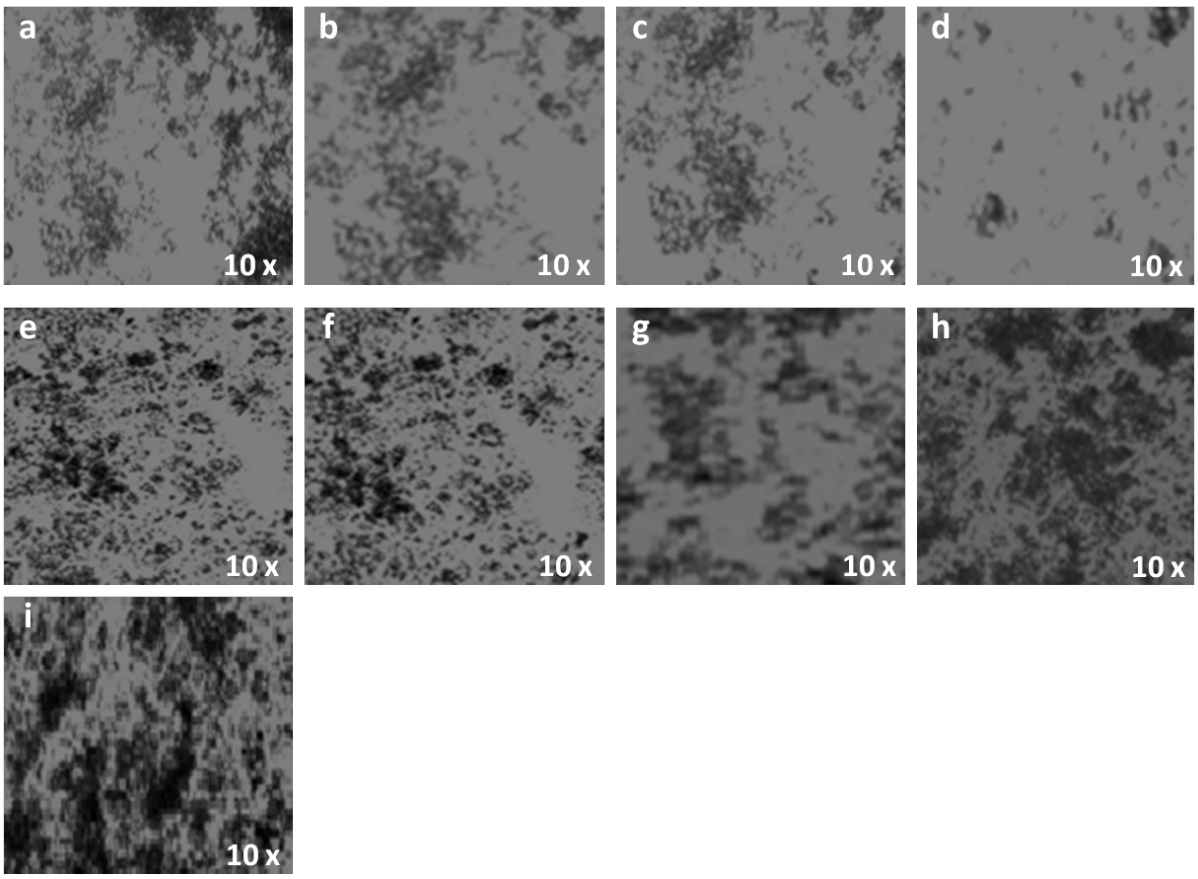


Figure 28: Grains formation observation (fluorescence microscopy) in yogurt mixes fortified with: MC (a, b, c, d) or WPI (e, f, g, h) after the different rehydration times of 5, 120, 240 and 1440 minutes respectively. Figure i corresponds to grain formation in control yogurt.

3.3.3. Yogurt gels textural characteristics as a function of the dairy proteins added within a similar rehydration range

When comparing within a similar rehydration category, WPI-fortified yogurt samples exhibit a statistically significant higher complex shear stress required to break-down the gel structure, firmness and water holding capacity values in comparison with MC-fortified samples. Besides, yogurt samples prepared with WPI were statically less susceptible to syneresis within a similar rehydration length. However, grains formation was statistically comparable in yogurt samples prepared with either MC or WPI powders. These findings suggesting an enhanced textural characteristics in WPI-enriched yogurts samples (except for graininess) might be partially explained by the heat treatment of the milk bases which lead to whey protein denaturation and subsequent important cross-linking within the gel network in yogurt fortified with WPI (Dickinson, 2001). Moreover, these results could be also explained by the decrease in casein and in casein/whey ratio. Further, high proportion of whey proteins in the yogurt

gels composed of WPI may have led to saturation of all the capacity for binding K-casein to whey and once this occurred, whey protein heat- induced aggregates could have been formed (Beaulieu *et al.*,1999). This may have permit to the gel network to absorb more applied force by flexing without breaking the particles cross-links resulting thus in higher gel strength and firmness. This might have also led to less syneresis of the gel network during centrifugation. The effect of WPI on yogurt gels strength and firmness are comparable to earlier studies (Puvanenthiran *et al.,* 2002; Kucuckelin *et al.,* 2008; Krzeminski *et al.,* 2011). Furthermore, the graininess seems the only studied parameter being worsen (by being increased) in WPI-enriched samples. However, this finding is no surprising since previous researches demonstrated that graininess was increased with increasing whey protein content (Puvanenthiran *et al.,* 2002; Kucuckelin *et al.,* 2008). This has been explained by the important amount of WPI which might have engendered a high number of bonds during the first stage of the coagulation (aggregation of the denatured proteins as approaching their isoelectric point). This may have lead to a high stress in the network during the second stage of the coagulation (aggregation of casein particles as they reach their isoelectric point). Rearrangements would have thus caused a transition from an initial denatured whey protein (associated with casein micelles) induced gel formed at a high pH (pH 5.2), to a network dominated by casein–casein interaction at a lower pH (pH 4.6). This transition may be the result of local stresses in the network, which could give rise to graininess defects (Lucey *et al.*, 1997; Lucey *et al.*, 1998; Lucey & Singh, 1998; Sodini *et al.*, 2005).

3.3.4. Microstructure of yogurt gels samples prepared with MC and WPI after different rehydration time

The microstructure of yogurts samples fortified with MC and WPI after different rehydration times is reported in **Figure 29**. To our knowledge, microstructure of yogurt samples prepared with MC and WPI has not yet been addressed in previous studies. Yogurt samples enriched with MC seem to present a rather coarse, rough and inhomogeneous structure (**Figures 29 a, b, c, d**). The presence of a high number of large pores is also noticeable. Peng *et al.,* (2009) reported the permeability of yogurt gels prepared with CM which reflects the unhomogenities and pores at the level of the gel network (Lucey *et al.,* 1997). They reported a high permeability value suggesting thus a coarse gel with larger pores, which is comparable to our scanning electron microscopy findings. The yogurt gels made from WPI showed a more homogeneous structure, finely perforated and containing numerous very small pores (**Figures**

29 e, f, g, h). Some authors have reported that the microstructure of yogurts with high whey proteins proportions showed mainly a particulate, uniform protein network with smaller pores as compared to those of yogurts prepared with other dairy ingredients (sodium caseinates for example) (Saint-Eve *et al.*, 2006, Krzeminski *et al.*, 2011). Moreover, our results are comparable to those of Remeuf *et al.*, (2003) who stated that the gels of whey protein concentrate-enriched yogurts exhibited a very fine network with small pores. Puventhiran *et al.*, (2002) reported that adding whey proteins led to a structure where casein micelles appeared in the form of individual entities surrounded by finely-flocculated protein and linked to very small whey protein aggregates. This structure might increase the number of bonds between particles and might explain thus the dense and finely-branched network observed in yogurt samples enriched with WPI in our study.

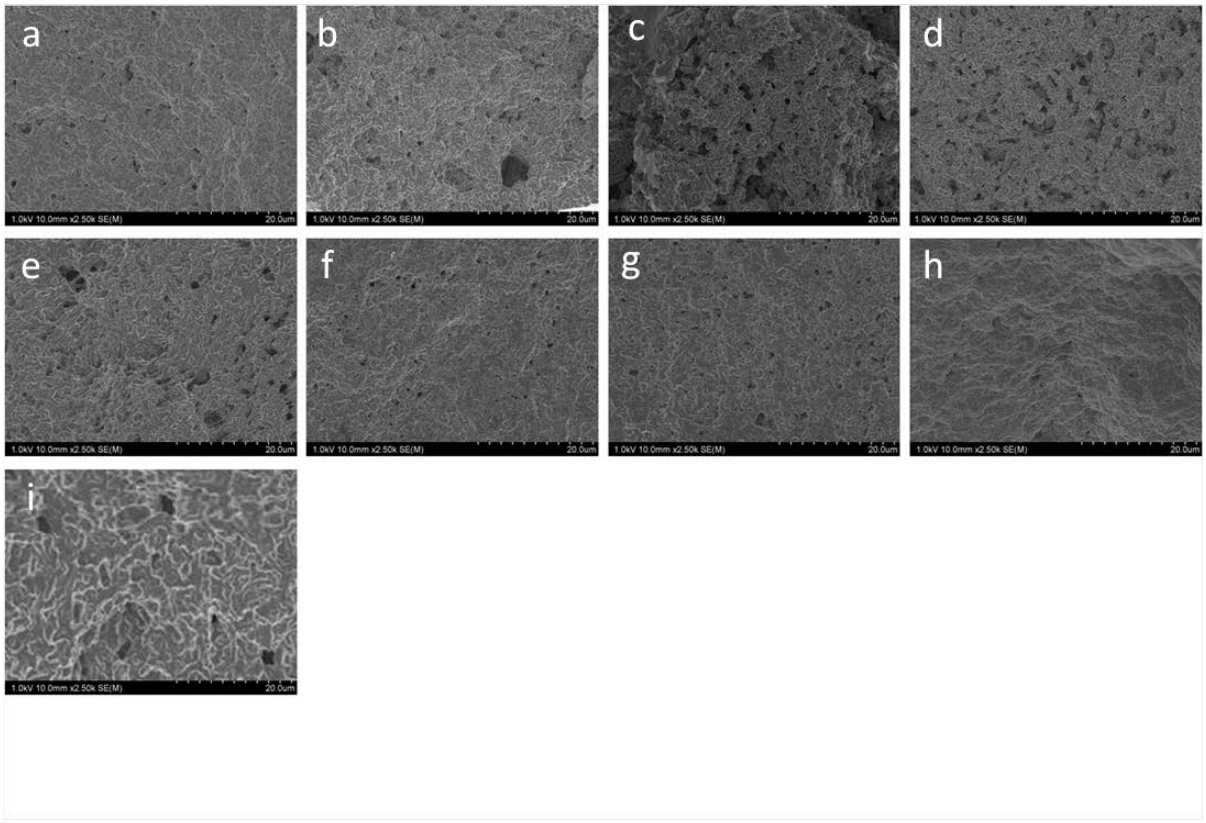


Figure 29: SEM Images of microstructure of yogurt mixes fortified with: MC (a, b, c, d) and WPI (e, f, g, h) after the different rehydration times of 5, 120, 240 and 1440 minutes respectively. Figure i corresponds to control yogurt sample.

3.4. Conclusion

Some textural aspects of MC-enriched and WPI-fortified yogurt samples have been addressed for the first time in this study. Moreover, where the rehydration length of WPI powder seems to not affect the textural characteristics of the final acid milk gels, MC rehydration time strongly affects them. It results a significant improvement in yogurt textural attributes parallel to rehydration duration. A recommendation of 4 hours of MC rehydration into the milk base can be thus formulated for optimal textural properties of MC-enriched yogurt products. Finally, yogurts prepared with WPI displayed better physical and textural properties in means of gel strength than MC-enriched acid milk gels whatever the powder rehydration time.

Acknowledgements

The authors would like to thank the financial support of Philippe Jabre Association.

Conclusion générale et perspectives

Les objectifs de ce travail de thèse consistaient à étudier : i) le mécanisme de réhydratation des poudres de protéines laitières dans un milieu complexe et opaque : le lait de base de formulation des yaourts (ou laits fermentés), ii) ainsi que l'influence de l'état d'hydratation de ces poudres (défini en fonction du temps) sur les propriétés de texture des gels acides obtenus.

La première phase des travaux a été consacrée à l'étude du mécanisme de réhydratation des poudres de lait. Elle a pu être mise en œuvre grâce à un équipement innovant : le QICPIC, permettant l'étude de la granulométrie par diffraction laser. Le suivi de la réhydratation dans un milieu opaque comme le lait a ainsi pu être mené, soulignant le caractère novateur du travail. Ainsi, la réhydratation des caséines micellaires dans un tel milieu peut se décomposer en trois phases :

- une phase de mouillage des particules de poudre,
- suivie du gonflement de ces particules,
- et enfin de leur dispersion.

Il s'avère que la durée totale du processus de réhydratation des caséines micellaires dans le lait est extrêmement longue, étant inachevée même au-delà de 480 min (8 h) de réhydratation. A l'opposé, la poudre de protéines solubles présente globalement un processus de réhydratation rapide voire quasi-instantanée, avec deux phases superposées de mouillage et de dispersion. L'augmentation « atypique » de la taille des particules au-delà de 166 min de réhydratation témoignerait de la formation potentielle de grumeaux ou de processus d'agrégation. Une hypothèse pouvant être émise afin d'expliquer un tel comportement porterait sur les interactions disulfures des groupements réactifs d'origine protéique avec les constituants du milieu, *i.e.* le lait de base de formulation des gels acides.

Par ailleurs, les propriétés de réhydratation des poudres dans le lait sont apparues comme étant directement influencées par leurs conditions de conservation (poudre récente *vs* ancienne) ainsi que par leur état (protéines natives *vs* dénaturées). A titre d'illustration, la poudre de caséine micellaire ancienne (conservée depuis une durée de douze mois) témoigne d'une altération de ses propriétés de réhydratation avec un retard dans les phases de gonflement et de dispersion. L'augmentation du taux d'humidité de la poudre au cours de la période de stockage pourrait expliquer en partie ce comportement. Les protéines solubles,

quant à elles, présentent un profil de réhydratation que l'on peut qualifier comme « classique » lorsqu'elles sont dénaturées, *i.e.* similaire notamment à celui reporté dans un milieu simple tel que l'eau. Ce profil est caractérisé par un retard sensible du début de la phase de dispersion en comparaison au profil obtenu avec des protéines solubles natives, et surtout par l'absence de la formation d'agrégats au cours du processus de réhydratation. Cette dernière observation pourrait être notamment associée au mode de dénaturation initialement adoptée : le chauffage à sec des protéines qui conduirait vraisemblablement à une nette diminution de leurs groupements réactifs.

Dans une deuxième partie des travaux, l'influence de l'état d'hydratation des poudres de lait, défini en fonction du temps, a été étudié sur les propriétés rhéologiques des gels acides obtenus (après coagulation par acidification grâce à l'ajout de Glucono-delta-lactone). Il en résulte que l'état d'hydratation des caséines micellaires influe directement sur les propriétés des gels acides. En effet, l'allongement du temps de réhydratation des caséines micellaires se retrouve associé à un allongement du temps de gélification, avec une augmentation de la fermeté du gel, de sa capacité de rétention d'eau, et de sa force de structure, témoignant de l'augmentation de la fraction soluble des caséines micellaires au fil du temps et du nombre d'interactions résultantes. Des diminutions de l'indice de synérèse et de la formation des grains sont également observées.

A l'opposé, concernant les protéines solubles et plus particulièrement les isolats de protéines solubles, il apparaît que leur état d'hydratation (en fonction du temps) n'affecte pas les propriétés rhéologiques des gels acides ainsi formés. Les différents paramètres physiques et texturaux précédemment mentionnés (capacité de rétention d'eau, structure du gel, fermeté, synérèse) témoignent de valeurs identiques indépendamment du temps de réhydratation. De manière générale, l'ensemble de ces résultats s'expliquerait ainsi essentiellement par le comportement de réhydratation différent des deux protéines. En outre, les gels acides obtenus à partir de la formulation des protéines solubles présentent une meilleure qualité rhéologique, texturale et physique que ceux formulés à partir des caséines micellaires. La force des gels ainsi préparés serait essentiellement liée à leur dénaturation en solution au cours du traitement thermique, résultant en la formation de complexes solubles et de l'interaction entre protéines solubles et caséines κ. Aussi, une hypothèse supplémentaire quant à l'interprétation de ces résultats porterait sur la diminution du ratio caséines/protéines solubles.

Enfin, une tendance dans l'augmentation de grumeaux était observable pour les gels acides préparés à partir des protéines solubles. Cet effet pourrait être attribué d'une part aux phénomènes d'agrégation reportés avant la formation du gel dans le cas des échantillons de protéines solubles traités thermiquement, et d'autre part au fait que les protéines solubles, dont le point isoélectrique est à pH 5,2, s'agrègent avant les caséines micellaires (point isoélectrique à un pH de l'ordre de 4,6), fragilisant alors le réseau structural du gel au cours de sa formation et favorisant ainsi la formation de grumeaux.

Perspectives

La réalisation d'analyses sensorielles par un panel afin de mieux appréhender les aspects liés à l'acceptation des produits finis, en particulier pour les gels fabriqués à partir des mix où les poudres témoignaient de différents temps de réhydratation, viendrait en complément direct aux travaux réalisés. L'étude sensorielle permettrait éventuellement de mieux définir certaines recommandations concernant le temps de réhydratation des poudres ajoutées préalablement aux étapes de traitements thermique et d'acidification du processus de fabrication du yaourt ; de telles recommandations n'existant actuellement que pour la poudre de lait écrémé.

Par la suite, l'étude du mécanisme de réhydratation d'autres poudres laitières telles que la poudre de lait écrémé et les caséines de sodium pourrait également être envisagée via l'utilisation du QICPIC. Le recours à ces deux poudres constituent d'une part le moyen le plus répandu dans l'industrie alimentaire pour la fabrication du yaourt et d'autre part celui se révélant le mieux approprié en terme d'augmentation de viscosité et de consistance des produits finis.

Dans la même perspective, l'étude de l'incorporation du mélange de ces deux protéines (caséine micellaire et protéine soluble) qui font preuve d'un intérêt croissant dans la formulation industrielle des yaourts du fait de la bonne qualité texturale des produits qui en découlent, ainsi que l'étude de l'influence du ratio caséines/protéines solubles, pourraient aussi être abordées.

Enfin, il serait également intéressant d'approfondir les travaux portant sur l'influence de divers autres paramètres tels que la température ou le facteur d'agitation sur le mécanisme de réhydratation des poudres dans le lait. En effet, ces deux facteurs impactent de manière significative la cinétique de réhydratation. Aussi, l'étude de l'effet de l'augmentation du nombre de tours par minute de l'agitateur mécanique (utilisé pour la réhydratation des

poudres dans le lait) à des valeurs proches de celles employées dans les procédés industriels permettrait la recommandation du temps de réhydratation optimale pour la caséine micellaire.

Par ailleurs, la quantification (par méthode du réactif d'*Ellman par exemple)* des *groupements thiol* libres des protéines solubles dénaturées permettrait de valider les hypothèses émises concernant l'allongement du temps de gélification et la structure des gels formulés à partir de ces protéines dénaturées par chauffage à sec.

Enfin, la confrontation des résultats de l'ensemble de ce travail à ceux qui pourraient être obtenus dans un contexte d'acidification du lait par fermentation bactérienne (tel qu'utilisé dans les procédés industriels) constituerait une étape supplémentaire incontournable pour la compréhension des mécanismes directement impliqués dans la fabrication industrielle des yaourts.

Références

A

ADPI (American Dry Product Institute, Elmhurst, IL) (2002a). Determination of dispersibility of nonfat dry milk powder, in Standards for grades of dry milks including methods of analysis, bulletin 916, 36-38.

ADPI (American Dry Product Institute, Elmhurst, IL) (2002b). Determination of solubility index, in Standards for grades of dry milks including methods of analysis, bulletin 916, 30-31.

ADPI (American Dry Product Institute, Elmhurst, IL) (2002c). Determination of total ash, in Standards for grades of dry milks including methods of analysis, bulletin 916, 40-41.

AFNOR, (1978). Détermination de la teneur en eau – méthode par étuvage, No : V04-348.

Akalain, A.S., Unal, G., Dinkci, N. Hayaloglu, A.A., (2008). Microstructural, textural, and sensory characteristics of probiotic yogurts fortified with sodium calcium caseinate or whey protein concentrate. Journal of Dairy Science 95(7), 3617-3628.

Alais, C., (1984). Science du Lait : Principe des techniques laitières, 4ème édition, Editions SEPAIC, Paris, France.

Amatayakul, T., Sherkat, F., Shah, N.P., (2006). Physical characteristics of set yoghurt made with altered casein to whey protein ratios and EPS-producing starter cultures at 9 and 14% total solids. Food Hydrocolloids 20(2-3), 314-324.

Anema, S. G., Li, Y., (2003). Effect of pH on the association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk. Journal of Agricultural of Food Chemistry 51(6), 1640-1646.

Anema, S.G., Pinder, D.N., Hunter, R.J., Hemar, Y., (2006). Effects of storage temperature on the solubility of milk protein concentrate (MPC85). Food Hydrocolloids 20(2-3), 386-393.

Ares, G., Gonçalvez, D., Pérez, C., Reolon, G., Segura, N., Lema, P., Gambaro, A., (2007). Influence of gelatin and starch on the instrumental and sensory texture of stirred yogurt. International Journal of Dairy Technology 60(4), 263-269.

Augustin, M.A., Cheng, L.J., Glagovskaia, O., Clarke, P.T., Lawrence, A., (2003). Use of blends of skim milk and sweet whey protein concentrates in reconstituted yogurt. Australian Journal of Dairy Technology 58(1), 30-35.

Aziznia, S., Khosrowshahi, A., Madadlou, A., Rahimi, J., (2008). Whey protein concentrate and gum tragacanth as fat replacers in nonfat yogurt: chemical, physical, and microstructural properties. Journal of Dairy Science 91(7), 2545-2552.

B

Baldwin, A. J., Woodhams, D.J., (1974). The dispersibility of skim milk powder at high total solids. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology 9(140), 140-151.

Barba, D., Beolchini, F., Cifoni, D., Veglió, F., (2001). Whey protein concentrate production in a pilot scale two-stage diafiltration process. Separation Science and Technology 36 (4), 587-603.

Bazinet, L., Pouliot, Y., Castaigne, F., (2002). 3 - Opérations unitaires, *in Science etTechnologie du Lait – Transformation du lait*, Fondation de technologie laitière du Quebecinc., Presses internationales Polytechnique, 153-243.

Berton-Carabin, C., Elias, R.J., Coupland, J.N., (2013). Reactivity of a model lipophilic ingredient in surfactant-stabilized emulsions: Effect of droplet surface charge and ingredient location. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 418, 68-75.

Beaulieu, M., Pouliot, Y., Pouliot, M., (1999). Thermal aggregation of whey proteins in model solutions as affected by Casein/Whey protein ratios. Journal of Food Science 64 (5),776-780.

Bhullar, Y.S., Uddin, M. A., Shah N. P., (2002). Effects of ingredients supplementation on textural characteristics and microstructure of yoghurt. Milchwissenschaft 57(6), 329-332.

Birollo, G.A., Reinheimer, J.A., Vinderola, G.C., (2000). Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt. Food Research International 33, 799-805.

Boiros, M., Lancelot, J., Davenas, P., Ilari, J.L, (1985). Influence de la technologie sur les propriétés physiques du lait en poudre. Technicien du lait 32, 10-21.

Bouchoux, A., Gésan-Guiziou, G., Pérez, J., Cabane, B., (2010). How to squeeze a sponge: Casein micelles under osmotic stress, a SAXS study. Biophysical Journal 99(11), 3754-3762.

Boudier, J.F., Cayot, P., Letourneur, G., Lorient, D., Tomé, D., (1999). Les protéines dans tous leurs états, CIDIL.

Boudier, J.F., Schuck, P. (2010). Les laits en poudres. Science des aliments 29, 51-60.

Braga, A.L.M., Menossi, M., Cunha, R.L., (2006). The effect of the glucono-δ-lactone/caseinate ratio on sodium caseinate gelation. International Dairy Journal 16(5) 389–398.

Britten, M., Gauthier,S., Pouliot,Y., (2002). Ingrédients laitiers, in Science et Technologie du Lait - Transformation du Lait, Fondation de technologie laitière du Quebec inc., Presses internationals polytechnique 471-525.

Brownlow, S., Morais Cabral, J.H., Cooper, R., Flower, D.R., Yewdall, S. J., Polikarpov, I., North, A.C, Sawyer, L. (1997). Bovine β-lactoglobulin at 1.8 A resolution - Still an enigmatic lipocalin. Structure 5(4), 481-495.

C

Calvo, M.M., (1995). Heat-induced interactions between serum albumin, immunoglobulin, and k-casein inhibit the primary phase of renneting. Journal of Agricultural and Food Chemistry 43(11), 2823-2827.

Cayot, P., Lorient, D., (1998). Les propriétés d'hydratation des protéines, in Structures et technofonctions des protéines du lait, Arilait Recherches, Lavoisier Tec et Doc, 209-227.

Chandan, R.C., Shahani, K.M., (1995). Other fermented dairy products. Biotechnology : Enzymes, biomass, food and feed 9, 385-418.

Cheftel, J.C., Cuq, J-L., Lorient, D., (1985). Protéines alimentaires, Tec & Doc, Lavoisier, Paris, (1985).

Chen, H., (2002). Formation and properties of casein films and coatings. In. Gennadios, A. (Ed). Proteins-based films and coatings. CRC Press, New york 181-211.

Christie, W.W., (1983). The composition and structure of milk lipids, in Developments in Dairy Chemistry, vol. 2, P. F. Fox, Applied science publishers, London, 1-35.

Chrysina, E.D., Brew, K., Acharya, K.R., (2000). Crystal structures of apo- and holobovine alpha-lactalbumin at 2. 2-A resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions. Journal of Biology and Chemistry 275(47), 37021-37029.

CNIEL, L'économie laitière en chiffres, Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière, Paris (2005).

Considine, T., Noisuwan, A., Hemar, Y., Wilkinson, B., Bronlund, J., Kasapis, S., (2011). Rheological investigations of the interactions between starch and milk proteins in model dairy systems: A review. Food Hydrocolloids 25(8), 2008-2017.

Corredig, M., Dalgleish, D.G., (1999). The mechanisms of the heat-induced interaction of whey proteins with casein micelles in milk. International Dairy Journal 9(3-6), 233-236.

Corredig, M., Sharafbafi, N., Kristo, E., (2011). Polysaccharide-protein interactions in dairy matrices, control and design of structures. Food Hydrocolloids 25(8), 1833-1841.

Courtet-Leymarios, F., (2010). Qualité nutritionnelle du lait de vache et de ses acides gras. Voies d'amélioration par l'alimentation. Thèse Ecole Nationale Veterinaire d'Alfort.

D

Dalgleish, D.G., Law, A.J.R., (1989). pH induced dissociation of bovine casein micelles.II. Mineral solubilization and its relation to casein release. Journal of Dairy Research 56(5), 727-735.

Dalgleish, D. G., & Holt, C. (1988). A geometrical model to describe the initial aggregation of partly renneted casein micelles. Journal of Colloid and Interface Science 123(1), 80–84.

Dalgleish, D., Alexander, M., Corredig, M., (2004). Studies of the acid gelation of milk using ultrasonic spectroscopy and diffusing wave spectroscopy. Food Hydrocolloids 18(5), 747-755.

Damin, M.R., Alcântara, M.R., Nunes, A.P., Oliveira, M.N., (2009). Effects of milk supplementation with skim milk powder, whey protein concentrate and sodium caseinate on acidification kinetics, rheological properties and structure of nonfat stirred yogurt. Food Science and Technology 42 (10), 1744-1750.

Danthine, S., Blecker, C., Paquot, M., Innocente, N., Deroanne, C., (2000). Evolution des connaissances sur la membrane du globule gras du lait : synthèse bibliographique. Le Lait 80(2), 209-222.

Dave, R. I., Shah, N. P. (1998). The influence of ingredient supplementation on the textural characteristics of yogurt. Australien journal of dairy technonolgy 53(3), 180-184.

Davenel, A., Schuck, P., Marchal, P., (1997). A NMR relaxometry method for determining the reconstitutability and water holding capacity of protein rich milk powders. Milchwissenschaft 52(1), 35-39.

Davenel, A., Schuck, P., Marchal,P., (1997a). Cinétiques de réhydratation et capacités de rétention d'eau de poudres mesurées par relaxométrie RMN. Analysis Magazine 25(1), 21- 23.

Davenel, A., Schuck, P., Mariette, F., Brulé, G., (2002). NMR relaxometry as a noninvasive tool to characterize milk powders. Le Lait 82(4), 465-473.

De Brabandere, A.G., De Baerdemaeker, J.G., (1999). Effects of process conditions on the pH development during yogurt fermentation. Journal of Food Engineering 41(4), 221-227.

De Castro-Morel, M., Harper, W.J., (2002). Basic functionality of commercial milk protein concentrates. Milchwissenschaft 57(7), 367-370.

de Kruif, C.G., Zhulina, E.B., (1996). k-casein as a polyelectrolyte brush on the surface of casein micelles. Colloids and Surface A, Physicochemical and Engineering Aspects, 117(1-2), 151-159.

de Kruif, C.G., (1999). Casein micelle interactions. International Dairy Journal 9(3-6), 183-188.

de Kruif, C.G., Huppertz, T., Urban, V.S., Petukhov, A.V., (2012). Casein micelles and their internal structure. Advances in Colloid and Interface Science 171-172, 36-52.

De la Fuente, M.A., (1998). Changes in the mineral balance of milk submitted to technological tratments.Trends in Food Science & Technology 9(7), 281-288.

Desobry-Banon, S., (1991). Modification de la structure des micelles de caséine lors de l'acidification du lait par hydrolyse de Glucono-Delta-Lactone. Thèse INPL, Nancy, France.

Devold, T.G., Brovold, M.J., Langsrud, T., Veragug, G.E., (2000). Size of native and heated casein micelles, content of protein and minerals in milk from Norwegian Red Cattle-

effect of milk protein polymorphism and different feeding regimes. International Dairy Journal 10(5-6), 313-323.

Dickinson, E. (2001). Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 20(3),197-210.

Dissanayake, M., Vasiljevic, T., (2009). Functional properties of whey proteins affected by heat treatment and hydrodynamic high-pressure shearing. Journal of Dairy Science 92(4), 1387-1397.

Donato, L., Alexander, M., Dalgleish, D.G., (2007). Acid gelation in heated and unheated milks: interactions between serum protein complexes and the surfaces of casein micelles. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55(10), 4160-4168.

Dzurec, D.J.Jr., Zall, R.R., (1985). Effect of heating, cooling, and storing milk on casein and whey proteins. Journal of Dairy Science 68(2), 273-280.

E

Elshereef, R., Budman, H., Moresoli, C., Legge, R.L., (2008). Fluorescence-based soft-sensor for monitoring β-Lactoglobulin and α-Lactalbumin solubility during thermal aggregation. Biotechnology and Bioengineering 99(3), 567-577.

Ennis, M. P., O'Sullivan, M. M., Mulvihill, D.M., (1998). The hydration behaviour of rennet caseins in calcium chelating salt solution as determined using a rheological approach. Food Hydrocolloids 12(4), 451-457.

Everett, D.W., McLeod, R.E., (2005). Interactions of polysaccharide stabilisers with casein aggregates in stirred skim-milk yoghurt. International Dairy Journal 15(11), 1175-1183.

F

Fabra, M.J., Talens, P., Chiralt, A., (2010). Influence of calcium on tensile, optical and water vapour permeability properties of sodium caseinate edible films. Journal of Food Engineering 96(3), 356-364.

Famelart, M.H., Le Graet,Y., Raulot, K., (1999). Casein micelle dispersions into water, NaCl and $CaCl_2$: Physicochemical characteristics of micelles and rennet coagulation. Interantional Dairy Journal 9(3-6),293-297.

Farrell, H.M., Pessen, H., Kumosinski, T.F., (1989). Water interactions with bovine caseins by hydrogen-2 nuclear magnetic resonance relaxation studies: structural implications. Journal of Dairy Science 72(2) 562-574.

Farrell Jr., H.M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G.T., Brown, E.M., Butler, J.E., Creamer, L.K., Hicks, C.L., Hollar, C.M., Ng-Kwai-Hang, K.F., Swaisgood, H.E., (2004). Nomenclature of the proteins of cows'milk-Sixth revision. Journal of Dairy Science 87(6), 1641-1674.

Farrell Jr., H.M., Malin, E.L., Brown, E.M., Qi, P.X., (2006). Casein micelle structure: what can be learned from milk synthesis and structural biology? Current Opinion in Colloid & Interface Science 11(2-3), 135–147.

Fauquant, J., Maubois, J.L., Pierre, A., (1988). Microfiltration du Le Lait sur membrane minérale.Tech Le Lait 1028,21-23.FIL (Fédération Internationale Laitière), (1985). Brussels, Belgium, Détermination de la dispersibilité et de la mouillabilité, No: V04-364.

Fernandes Oliveira, C.A., Fernandes, A.M., Cunha O.C., Laranja Fonseca, L.F., Telles Silva, E.O., Carvalho Balian, S., (2002). Composition and sensory evaluation of whole yogurt produced from milk with different somatic cell counts. Australian Journal of Dairy Technology 57(3), 192-196.

FIL (Fédération Internationale Laitière), (1987). Brussels, Belgium, Dried milk, dried whey, dried buttermilk & dried butter serum – Determination of fat content – Röse Gottlieb reference method, No 009C.

FIL (Fédération Internationale Laitière), (1995). Brussels, Belgium, Détermination de l'indice de solubilité de l'azote dans les poudres de protéines lactiques, No. 173.

FIL (Fédération Internationale Laitière), (2004). Brussells, Belgium, Milk and milk products – Determination of furosine content, No. 193.

Fiszman, S.M., Liuch, M.A, Salvador, A., (1999). Effect of addition of gelatine on microstructure of acidic milk gels and yoghurt and on their reheological properties. International Dairy Journal 9(12), 895-901.

Forny, L., Marabi, A., Palzer, S., (2011). Wetting, disintegration and dissolution of agglomerated water soluble powders. Powder Technology, 206(1–2), 72-78.

Fox, P. F., Mulvihill, D.M., (1983). Functional properties of caseins, caseinates and casein co-precipitates, in Physicochemical aspects of dehydrated protein rich milk products.

Proc.Int. Dairy Fed. Symp., Danish Govt. Res. Inst. Dairy Ind., Helsingor, DK, 188-259.

Fox, P.F., Brodkorb, A. (2008). The casein micelle: historical aspects, current concepts and significance. International Dairy Journal 18(7), 677-694.

Freudig, B., Hogekamp, S., Schubert, H., (1999). Dispersion of powders in liquids in a stirred vessel. Chemical Engineering Processing 38(4-6),525-532.

Fryer, P.J., Belmar-Beiny, M.T., Schreier, P.J.R., (1995). Fouling and cleaning in milk processing. Dans: Heat-induced changes in milk, International Dairy Federation (IDF) 364-395.

G

Gaiani, C., Banon, S., Scher, J., Schuck, P., Hardy, J., (2005). Use of a turbidity sensor to characterize micellar casein powder rehydration: influence of some technological effects. Journal of Dairy Science 88(8), 2700-2706.

Gaiani, C., Scher, J., Schuck, P., Hardy, J., Desobry, S., Banon, S., (2006). The dissolution behaviour of native phosphocaseinate as a function of concentration and temperature using a rheological approach. International Dairy Journal 16(12), 1427-1434.

Gaiani, C., (2006). Etude des mécanismes de réhydratation des poudres laitières : influence de la structure et de la composition des poudres. Thèse de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires, Nancy.

Gaiani, C., Scher, J., Ehrhardt, J.J, Linder, M., Schuck, P., Desobry, S., Banon, S., (2007a). Relationships between dairy powder surface composition and wetting properties during storage: importance of residual lipids. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55(16), 6561-6567.

Gaiani, C., Schuck, P., Scher, J., Desobry, S., Banon, S., (2007b). Dairy powder rehydration: Influence of protein state, incorporation mode, and agglomeration. Journal of Dairy Science 90(2), 570-581.

Gaiani, C., Boyanova, P., Hussain, R., Murrieta-Pazos, I., Burgain, J., Karam, M.C., Scher, J., (2011). Morphological descriptors as a tool to better understand rehydration properties of dairy powders. International Dairy Journal 21(7), 462-469.

Gastaldi, E., Lagaude, A., Marchesseau, S., Torodo De la Fuente, B., (1997). Acid milk gel formation as affected by total solids content. Journal of Food Science 62(4), 671-687.

Gaucheron, F., Le Graet, Y., Schuck, P., (2004). Equilibres minéraux et conditions physicochimiques, in Minéraux et produits laitiers, F. Gaucheron, Editions Tec et Doc, Paris, 219 - 280.

Glantz, M., Devold, T.G., Vegarud, G.E., Lindmark Mansson, H., Stalhammar, H., Paulsson, M., (2009). Importance of casein micelle size and milk composition for milk gelation. Journal of Dairy Science 93(4), 1444–1451.

González-Martínez, C., Becerra, M., Cháfer, M., Albors, A., Carot, J.M. Chiralt, A., (2002). Influence of substituting milk powder for whey powder on yoghurt quality. Trends in Food Science Technology 13 (9-10), 334-340.

Guichard, E., (2002). Interactions between flavor compounds and food ingredients and their influence on flavor perception. Food Reviews International. 18(1), 49–70.

Gulzar, M., Bouhallab, S., Jeantet, R., Schuck, P., Croguennec, T., (2011). Influence of pH on the dry heat-induced denaturation/aggregation of whey proteins. Food Chemistry 129 (1), 110-116.

Guyomarc'h, F., Law, A.J.R., Dalgleish, D.G., (2003). Formation of soluble and micelle-bound protein aggregates in heated milk. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51(16), 4652–4660.

Guzmán-González, M., Morais, F., Ramos, M., Amigo, L., (1999). Influence of skimmed milk concentrate replacement by dry dairy products in a low fat set-type yoghurt model system. I: Use of whey protein concentrates, milk protein concentrates and skimmed milk powder. Journal of the Science of Food and Agriculture 79(8), 1117-1122.

Guzmán-González, M., Morais, F., Amigo, L., (2000). Influence of skimmed milk concentrate replacement by dry dairy products in a low-fat set-type yoghurt model system. Use of caseinates, co-precipitate and blended dairy powders. Journal of the Science of Food and Agriculture 80(4), 433-438.

H

Ha, E., Zemel, M.B., (2003). Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). The Journal of Nutritional Biochemistry 14(5), 251-258.

Haugaard Sorensen, I., Krag, J., Pisecky, J., Westergaard, V., (1978). Méthodes d'analyses des produits laitiers déshydratés, Niro A/S (Ed), Copenhagen, Danemark, 109.

Haque, Z.U., JI, T., (2003). Cheddar whey processing and source: II. Effects on non-fat ice cream and yogurt. International Journal of Food Science and Technology, 38(4), 463–473.

Herrero, A.N., Requena, T., (2006). The effect of supplementing goats milk with whey protein concentrate on textural properties of set-type yogurt. International Journal of Food Science and Technology 41, 87-92.

Heertje, I., (1985). Structure formation in acid milk gels. Food Microstructure 4, 267–277.

Holt, C., (1992). Structure and stability of bovine casein micelles, in Advances in protein chemistry, Anfisen, C. B., Richards, F. M., Edsall, J. T. and Eisenberg, D. S. eds, Academic Press, Boston, USA, 43, 63-151.

Holt, C., Horne, D., (1996). The hairy casein micelle: evolution of the concept and its implications for dairy technology. Netherland Milk and Dairy Journal 50(2), 85-111.

Horne, D.S., Davidson, C.M., (1986). The effect of environmental conditions on the steric stabilization of casein micelles. Colloid and Polymer Science 264, 727–734.

Horne, D.S., (1998). Casein Interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products. International Dairy Journal 8(3), 171-177.

Horne, D.S., (2006). Casein micelle structure: models and muddles. Current Opinion in Colloid & Interface Science 11(2-3),148–153.

Horne, D.S., (1999). Formation and structure of acidified milk gels. International Dairy Journal 9(3-6), 261–268.

Hussain, R., Gaiani, C., Aberkane, L., Scher, J., (2011). Characterization of highmilk-protein powders upon rehydration under various salt concentrations. Journal of Dairy Science 94(1), 14-23.

Hussain, R., (2012). Caractérisation multi-niveau de protéines laitières : influence de l'environnement ionique et de la température. Thèse, ENSAIA, Nancy.

Hussain, R ., Gaiani, C., Scher, J., (2012). From high milk protein powders to the rehydrated dispersions in variable ionic environments: A review. Journal of Food Engeneering 113(3), 486-503.

I

International Dairy Federation 1988 Milk powders and cream powders, Solubility. Brussels: IDF (FIL-IDF) Standard 129A. ISO 8156:1987.

Isleten, M., Karagul-Yuceer, Y., (2006). Effects of Dried Dairy Ingredients on Physical and Sensory Properties of Nonfat Yogurt. Journal of Dairy Science 89(8), 2865-2872.

Isleten, M., Karagul-Yuceer, Y., (2008). Effects of functional dairy based proteins on nonfat yogurt quality. Journal of Food Quality 31(3), 265-280.

J

Jaros, D., Partschefeld, C., Henle, T., Rohm, H., (2006). Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications. Journal of Texture Studies 37(2),113-155.

Jeantet, R., (1995). Nanofiltration de liquides laitiers. Thèse ENSA , Rennes.

Jeantet, R., Schuck, P., Famelart, M.H., Maubois, J.L., (1996). Intérêt de la nanofiltration dans la production de poudres de lactosérum déminéralisées. Le Lait 76(3), 283-301.

Jeantet, R., Schuck, P., Six, T., Andre, C., Delaplace, G., (2010). Stirring speed, temperature and solid concentration influence on micellar casein powder rehydration time. Dairy Science Technology 90, 225-236.

Jelen, P., (2003). Whey processing: Utilization and products. - In « Encyclopedia of dairy sciences », edited Roginski, H., Fuquay, J.W., and Fox, P.F., New York Academic Press, 2739-2745.

K

Karam, M.C., Gaiani, C., Barbar, R., Hosri, C., Scher, J., (2012). Effect of dairy powder rehydration state on gel formation during yogurt process. Journal of Dairy Research 79(3), 280-286.

Kelly, J., Kelly, P., **(**1995). Nanofiltration of whey : quality , environmental and economic aspects.International Journal of Dairy Technology 48(1), 20-24.

Kelly, P.M., (2006a). Milk protein products, Milk Protein Concentrate. In: Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition), 848-854, San Diego: Academic Press.

Kelly, P.M., (2006b). Innovation in milk powder technology. International Journal of Dairy Technology 59(2), 70-75.

Kessler, H.G., (1998). The structure of fermented milk products as influenced by technology and composition. In texture of fermented milk products and dairy dessert. Proceedings of the IDF Symposium. Vicenza, Italy, 5-6 May 1997, 93-105.

Khwaldia, K., Banon, S., Desobry, S., Hardy, J., (2004). Mechanical and barrier properties of sodium caseinate-anhydrous milk fat edible films. International Journal of Food Science Technology 39(4), 403-411.

Kim, E.H.J., Chen, X.D., Pearce, D., (2002). Surface characterization of four industrial spray dried dairy powders in relation to chemical composition, structure and wetting properties. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 26(3), 197-212.

Kinsella, J.E., (1984). Milk proteins: physicochemical and functional properties. Critical Revue of Food Science and Nutrition 21(3), 197-262.

Kinsella, J.E., Whitehead, D.M., Brady, J., Bringe, N.A., (1989). Milk proteins:possible relationships of structure and function. Development in dairy chemistry. P.F. Fox, ed., Applied Science Publishers, London, UK, 53-93.

Kinsella, J.E., Whitehead, D.M., (1989). Proteins in whey: chemical,physical, and functional properties. Advances in Food and Nutrition Research, Academic Press ,Inc, London 33, 343-438.

Koskoy, A., Kilic M., (2004). Use of hydrocolloids in textural stabilization of a yoghurt drink, ayran. Food Hydrocolloids 18(4), 593-600.

Kristo, E., Biliaderis, C.G., Tzanetakis, N., (2003). Modelling of the acidification process and rheological properties of milk fermented with a yogurt starter culture using response surface methodology. Food Chemistry 83(3), 437-446.

Krzeminski, A., Groayhable, K., Hinrichs, J., (2011). Structural properties of stirred yoghurt as influenced by whey proteins. Food Science and Technology 44(10), 2134-2140.

Kücükcetin, A., (2008). Effect of heat treatment of skim milk and final fermentation pH on graininess and roughness of stirred yogurt. International Journal of Dairy Technology 61(4), 385-390.

L

Lakemond Catriona, M.M., van Vliet, T., (2008). Acid skim milk gels: The gelation process as affected by preheating pH. International Dairy Journal 18(5), 574-584.

Lascelles, D.R., Baldwin, A.J., (1976). Dispersibility of whole milk powder in warm water. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology 11, 283-284.

Lee, W.J., Lucey, J.A. (2010). Formation and Physical Properties of Yogurt. Asian - Australasian Journal of Animal Sciences 23(9), 1127-1136.

Le Graët, Y., Brulé, G., (1993). Les équilibres minéraux du lait: influence du pH et de la force ionique. Lait 73(1), 51–60.

Liu,Y., Guo, R., (2008). pH-dependent structures and properties of casein micelles.Biophyical Chemistry 136(2-3),67-73.

Lucas, A., Sodini, I., Monnet, C., Jolivet, P., Corrieu, G., (2004). Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with milk protein hydrolysates. International Dairy Journal 14(1), 47-53.

Lucey, J.A., Teo, C.T., Munro, P.A., Singh, H., (1997). Rheological properties at small (dynamic) and large (yield) deformations of acid gels made from heated milk. Journal of Dairy Research 64(4), 591-600.

Lucey, J.A., Singh, H., (1998). Formation and physical properties of acid milk gels: a review. Food Research International 30(7), 529-542.

Lucey, J.A., Tamehana, M., Singh, H., Muuro, P.A., (1998). A comparison of the formation , rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or glucono-δ-lactone. Food Research International 31(2), 147-155.

Lucey, J.A., Munro, P.A., Singh, H., (1999). Effects of heat treatment and whey protein addition on the rheological properties and structure of acid skim milk gels. International Dairy Journal 9(3-6), 275-279.

Lucey, J.A., (2004). Formation, structural properties and rheology of acid-coagulated milk gels. Cheese Chemistry, Physics and Microbiology 1, 105-122.

Luquet, F.M., Corrieu, G., (2005). Bactéries lactiques et probiotiques. Collection sciences et techniques agroalimentaires, Ed Lavoisier Tec et Doc , Paris, 307 p.

M

Mafart, P., (1996). Les procédés physiques de conservation. In : Génie Industriel alimentaire, Tec et Doc, Lavoisier, Paris.

Mak, B., (2001). Continuous wet agglomeration of milk related products by instant mixing technology, 1st International Symposium on the Spray Drying of Milk Products 16 – 18 october, Rennes.

Marafon, A.P., Sumi, A., Granato D., Alcantara, M.R., Tamine, A.Y., Nogueira de Oliveira, M., (2011). Effects of partially replacing skimmed milk powder with dairy ingredients on rheology, sensory profiling, and microstructure of probiotic stirred-type yogurt during cold storage. Journal of Dairy Science 94(11), 5330-5340.

Maubois, J.L, Ollivier, G., (1997). Extraction of milk proteins. In : Food proteins and their applications (Damodaran S, Paraf A, eds). M Dekker, New York, USA.

Mather, I. H., (2000). A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane. Journal of Dairy Science 83, 203-247.

Matumoto-Pintro, P.T., Rabiey, L., Robitaille, G., Britten, M., (2011). Use of modified whey protein in yoghurt formulations. International Dairy Journal 21(1), 21-26.

McComas Jr., K.A., Gilliland, S.E., (2003). Growth of probiotic and traditional yogurt cultures in milk supplemented with whey protein hydrolysate. Journal of Food Science 68(6), 2090-2095.

Mc Kenna, A.B., Lloyd, R.J., Munro, P.A., Singh, H., (1999). Microstructure of whole milk powder and insolubles detected by powder functional testing. Scanning 21(5), 305-315.

Mimouni, A., Deeth, H.C., Whittaker, A.K., Gidley, M.J., Bhandari, B.R., (2009). Rehydration process of milk protein concentrate powder monitored by static light scattering. Food Hydrocolloids 23(7), 1958–1965.

Mimouni, A., Deeth, H.C., Whittaker, A.K., Gidley, M.J., Bhandari, B.R., (2010). Investigation of the microstructure of milk protein concentrate powders during rehydration: Alterations during storage. Journal of Dairy Science 93(2), 463-472.

Mine, Y., (1997). Effect of dry heat and mild alkaline treatment on functional properties of egg white proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45(8), 2924-2928.

Mistry, V. V., Hassan, H. N., (1991). Delactosed, high milk protein powder. 1. Manufacture and composition. Journal of Dairy Science 74(4), 1163-1169.

Modler, H.W., Kalab, M., (1983). Microstructure of yogurt stabilized with milk proteins. Journal of Dairy Science 66(3), 430-437.

Morin, P., Britten, M., Jimenez-Flores, R., Poulio, Y., (2007). Microfiltration of buttermilk and washed cream buttermilk for concentration of milk fat globule membrane components. Journal of Dairy Science 90(5), 2132-2140.

Morr, C.V., Ha, E. Y.W., (1993). Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 33(6), 431-476.

N

Niro Atomizer, Méthodes d'analyse des produits laitiers déshydratés, 4 edn, Copenhague, (1978).

O

O'Brien, J., Morrissey, P.A., Ames, J.M., (1989). Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. International Dairy Journal 28(3), 211-248.

O'Brien, J., (1995). Heat induced changes in lactose: isomerisation, degradation, Maillard browning, in Heat induced changes in milk, vol.2, P. F. Fox, Brussels, IDF, 134-170.

O'Connell, J.E., Fox, P.F., (2000). The two-stages coagulation of milk proteins in the minimum of the heat coagulation time-pH profile of milk: effect of casein micelle size. Journal of Dairy Science 83(3),378-386.

Oldfield, D. J., Singh, H., Taylor, M.W., Pearce, K.N., (2000). Heat-induced interactions of ß-lactoglobulin and α-lactalbumin with the casein micelle in pH-adjusted skim milk. International Dairy Journal 10(8), 509-518.

Oliveira, M.N., Sodini, I., Remeuf, F., Corrieu, G., (2001). Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. International Dairy Journal 11(11-12), 935-942.

Okos, M.R., Narsimhan, G., Singh, R.K., Weitnauer, A.C, (1992). Food dehydration: in Handbook of food engineering (Heldman DR, Lund DB, eds). Dekker, M., New York, 437-562.

Ozer, B.H., Robinson, R.K, Grandison, A.S, Bell, A.E., (1998). Gelation properties of milk concentrated by different techniques. International dairy journal 8(9), 793-799.

Ozen, A.E., Kilic, M., (2009). Improvement of physical properties of nonfat fermented milk drink by using whey protein concentrate. Journal of Texture Studies 40(3), 288-299.

P

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 l'institut national agronomique de Paris-Grignon.

Patel, S., (2011). Evaluating the Effect of Milk Protein Concentrates (MPC) Fortification on Rheological Properties of Nonfat Set Yogurt Using Vane Rheometry Vol. Master of Science: The Graduate School University of Wisconsin-Stout.

Pelegrine, D.H.G., Gasparetto, C.A., (2005). Whey proteins solubility as function of temperature and pH. Food Science and Technology 38(1), 77-80.

Peng, Y., Serra, M., Horne, D.S., Lucey, J.A., (2009). Effect of fortification with various types of milk proteins on the rheological properties and permeability of nonfat set yogurt. Journal of Food Science 74(9), 666-673.

Penna, A.L.B., Baruffaldi, R., Oliveira, M.N., (1997). Optimization of Yogurt Production Using Demineralized Whey. Journal of Food Science 62(4), 846-850.

Pesic, M.B., Barac, M.B., Stanojevic, S.P., Ristic, M.N., Macej, O.D., Vrvic, M.M., (2012). Heat induced casein-whey protein interactions at natural pH of milk: A comparison between caprine and bovine milk. Small Rumin Research 108(1-3),77-86.

Pierre, A., Fauquant, J., Le Graet, Y., Piot, M., Maubois, J-L., (1992). Préparation de phosphocaséinate natif par microfiltration sur membrane. Le Lait 72(5),461-474.

Pisecky, J., (1980). Bulk density of milk powders. Australian Journal of Dairy Technology 35, 106-111.

Povey, J.W., Golding, M., Higgs, D., Wang, Y., (1999). Ultrasonic spectroscopy studies of casein in water. International Dairy Journal 9(3-6), 299-303.

Puvanenthiran, A., Williams, R.P.W., Augustin, M.A., (2002). Structure and visco-elastic properties of set yoghurt with altered casein to whey protein ratios. International Dairy Journal 12(4), 383-391.

R

Raikos, V., (2009). Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interfaces. A review. Food Hydrocolloids 24(4),259-265.

Rao, M.A., (1999). Rheology of fluids and semisolid foods. Aspen Publishers Inc. Maryland.

Remeuf, F., Mohammed, S., Sodini, I., Tissier, J.P., (2003). Preliminary observations on the effects of milk fortification and heating on microstructure and physical properties of stirred yogurt. International Dairy Journal 13(9), 773-782.

Ribadeau-Dumas, B., (1981). Actualités dans le domaine de la connaissance de la structure etdes propriétés biochimiques des protéines laitières, Colloque INRA-CNIEL Revue Laitière Française 400, 17-32.

Richard, B., Toubal, M., Le Page, J.F., Nassar, G., Radziszewski, E., Nongaillard, B., Debreyne, P., Schuck, P., Jeantet, R., Delaplace, G., (2012). Ultrasound tests in a stirred vessel to evaluate the reconstitution ability of dairy powders. Innovative Food Science and Emerging Technologies 16, 233-242.

Robin, O., Turgeon, S., Paquin, P., (1993). Functional proteins of milk proteins, in Dairy Science and Technology Hanbook. 1. Principles and properties, Ed. VCH publishers Inc, New York, 277-353.

Rohm, H., (1993). Influence of dry matter fortification on flow properties of yogurt. 1. Evaluation of flow curves. Milchwissenschaft 48(10), 556-560.

S

Saint-Eve, A., Lévy, C., Martin, N., Souchon, I., (2006). Influence of proteins on the perception of flavored stirred yogurts. Journal of Dairy Science 89(3), 922-933.

Samuelsson, E.G., Hueg, B., (1973). Nuclear magnetic resonance (NMR) as a method for measuring the rate of solution of dried milk. Milchwissenschaft 28(6),329-332.

Sandra, S., Dalgleish, D.G., (2007). The effect of ultra high-pressure homogenization (UHPH) on rennet coagulation properties of unheated and heated fresh skimmed milk. International Dairy Journal 17(9), 1043-1052.

Sandra, S., Cooper, C., Alexander, M., Corredig, M., (2011). Coagulation properties of ultrafiltered milk retentates measured using rheology and diffusing wave spectroscopy. Food Research International 44(4), 951-956.

Sawyer, L., Barlow, P.N., Boland, M.J., Creamer, L.K., Denton, H., Edwards, P.J.B., Holt, C., Jameson, G.B., Kontopidi, G., Norris, G.E., Uhrinova, S., Wu, S.Y., (2002).

Milk protein structure-what can it tell the dairy industry? International Dairy Journal 12(4), 299-310.

Schkoda, P., Hechler, A., Hinrichs, J., (2001). Influence of the protein content on structural characteristics of stirred fermented milk. Milchwissenschaft-Milk Science International 56(1), 19-22.

Schkoda, P., (2002). New technologies for fermented dairy products. Bulletin of the International Dairy Federation 374, 61–65.

Schober, C., Fitzpatrick, J.J., (2005). Effect of vortex formation on powder sinkability for reconstituting milk powders in water to high solids content in a stirred-tank. Journal of Food Engineering 71(1),1-8.

Séverin, S., Wenshui, X., (2005). Milk biologically active components as nutraceuticals: Review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 45(7-8), 645-656.

Shaker, R.R., Abu-Jdayil, B., Jumah, R.Y., Ibrahim, S.A., (2001). Rheological properties of set yogurt during gelation process: II. Impact of incubation temperature Milchwissenschaft 56(11), 622-625.

Schubert, H., (1993). Instantization of powdered food products. International Chemical Engineering 33(1),28-45.

Schuck, P., Piot, M., Méjean, S., Fauquant, J., Brulé, G., Maubois, J.L., (1994a). Désydratation des laits enrichis en caséine micellaire par microfiltration ; comparaison des propriétés des poudres obtenues avec celles d'une poudre de Le Lait ultra-propre. Le Lait 74(1),47-63.

Schuck, P., Piot, M., Méjean, S., Le Graët, Y., Fauquant, J., Brulé, G., Maubois, J.L., (1994b). Désydratation par atomisation de phosphocaséinate natif obtenu par microfiltration sur membrane. Le Lait 74(5),375-388.

Schuck, P., Roignant, M., Brulé, G., Davenel, A., Famelart, M.H., Maubois, J.L., (1998). Simulation of water transfer in spray drying. Drying Technology: An International Journal 16(7),1371-1393.

Schuck, P., (1999). Appréhension des mécanismes de transfert d'eau lors du séchage par atomisation de bases protéiques laitières et lors de la réhydratation. Effet de l'environnement glucidique et minéral. Thèse ENSAR, Rennes.

Schuck, P., Davenel, A., Mariette, F., Briard,V., Méjean, S., Piot, M., (2002). Rehydration of casein powders: effects of added mineral salts and salt addition methods on water transfer. International Dairy Journal 12(1),51-57.

Schuck, P., Dolivet, A., Jeantet, R., (2011). Les poudres laitières et alimentaires. Techniques d'analyse, Editions TEC & DOC, Lavoisier.

Singh, H., Waungana, A., (2001). Influence of heat treatment of milk on cheesemaking properties. International Dairy Journal 11(4-7), 543-551.

Singh, H., (2004). Heat Stability of milk. International Journal of Dairy Technology 57(2-3), 111-119.

Snappe, J.J., Lepoudere, A., Sredzinski, N., (2010). Protéines laitières. Technique de l'Ingénieur.

Sodini, I., Lucas, A., Oliveira, M.N., Remeuf, F., Corrieu, G., (2002). Effect of milk base and starter culture on acidification, texture, and probiotic cell counts in fermented milk Processing. Journal of Dairy Science 85(10), 2479-2488.

Sodini, I., Béal, C., (2003). Fabrication des yaourts et des laits fermentés. Technique de l'Ingénieur.

Sodini, I., Remeuf, F., Haddad, S., Corrieu, G., (2004). The relative effect of milk base, starter, and process on yogurt texture: A Review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 44(2), 113-137.

Sodini, I., Lucas, A., Tissier, J.P., Corrieu, G., (2005a). Physical properties and microstructure of yoghurts supplemented with milk protein hydrolysates. International Dairy Journal 15(1), 29-35.

Sodini, I., Montella, J., Tong, P.S., (2005b). Physical properties of yogurt fortified with various commercial whey protein concentrates. Journal of the Science of Food and Agriculture 85(5), 853-859.

Sodini, I., Morin, P., Olabi, A., Jiménez-Flores, R., (2006). Compositional and functional properties of buttermilk: a comparison between sweet, sour, and whey buttermilk. Journal of Dairy Science 89(2), 525-536.

Soukoulis, C., Panagiotidis, P., Koureli, R., Tzia, C., (2007). Industrial yogurt manufacture: monitoring of fermentation process and improvement of final product quality. Journal of Dairy Science 90(6), 2641-2654.

Stapelfeldt, H., Nielsen, B.R., Skibsted, L.H., (1997). Effect of heat treatment, water activity and storage temperature on the oxidative stability of whole milk powder. International Dairy Journal 7(5), 331-339.

St-Gelais, D., Tirard-Collet, P., (2002). Fromage. Dans : Science et technologie du lait : transformation du lait. Presses internationales Polytechnique, Montréal, 349-415.

Supavititpatana, P., Wirjantoro, T.I., Patcharin, R., (2009). Effect of sodium caseinate and whey protein isolate fortification on the physical properties and microstructure of corn milk yogurt. Chiang Mai University Journal of NaturalScience 8(2), 247-262.

Swaisgood, H.E., (1982). Chemistry of the milk proteins, in Development in dairy chemistry,vol. 1, P.F. Fox, Elsevier Applied Science, London, 1-59.

T

Tamime, A.Y., Kalab, M., Davies, G., (1984). Microstructure of set-style yoghurt manufactured from cow's milk fortified by various methods. Food Microstructure 3(1), 83-92.

Tamime, A.Y., Robinson, R.K., (2000). Yogurt Science and Technology. Washington, DC: CRC Press Woodhead.

Tamime, A.Y., Robinson, R.K., (2007). Tamime and Robinson's: Yoghurt Science and Technology, Third Edition by CRC Press.

Thompoulos, C., Tzia, C., Milkas, D., (1993). Influence of processing of solids-fortified milk on coagulation time and quality properties of yogurt. Milchwissenschaft 48(8), 426-430.

Timasheff, S. N., Susi, H., (1966). Infrared investigation of the secondary structure of b-lactoglobulin. The Journal of Biological Chemistry 241, 249-251.

Trouvé, E., Maubois, J.L., Piot, M., Madec, M.N., Fauquant, J., Rouault, A., Tabard, J., Brinkman, G., (1991). Rétention de différents espèces microbiennes lors de l'épuration du lait par microfiltration en flux tangentiel. Le Lait 71(1),1-13.

V

Vanderghem, C., Bodson, P., Danthine, S., Paquot, M., Deroanne, C., Blecker, C., (2010). Milk fat globule membrane and buttermilks: from composition to valorization. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement 14(3), 485-500.

Van Hooydonk, A.C., De Koster, P.G., Boerrigter, I.J., (1987). The renneting properties of heated milk. Netherlands milk and dairy Journal 41,3-18.

Vasbinder, A.J., van Mil, P.J.J.M., Bot, A., de Kruif, K.G., (2001). Acid induced gelation of heat treated milk studied by diffusing wave spectroscopy. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 21(1-3), 245–250.

Vasbinder, A.J., Alting, A.C., de Kruif, K.G., (2003). Quantification of heat-induced casein-whey protein interactions in milk and its relation to gelation kinetics. Colloids and Surfaces B:Biointerfaces 31(1-4), 115-123.

Vasbinder, A.J., de Kruif, C.G., (2003). Casein-whey protein interactions in heated milk: the influence of pH. International Dairy Journal, 13(8), 669–677.

Vasbinder, A.J., van de Velde, F., de Kruif, C.G., (2004). Gelation of casein-whey protein mixtures. Journal of Dairy Science, 87(5), 1167–1176.

Verman, A. H., Sutherland, J.P., (2004). Quality of yogurt. Journal of Dairy Science 2, 7-9.

W

Walstra, P., (1975). Effect of homogenization on the fat globule size distribution in milk. Netherlands milk and dairy journal 29,279-294.

Walstra, P., Jenness, R., (1984). Dairy chemistry and physics. JohnWiley et Sons, New York, USA.

Walstra, P., (1999). Sub-micelles: do they exist ? International Dairy Journal 9(3-6), 189-192.

Walstra, P., Geurts, T.J., Noomem, A., Jellema, A., Van Boekel, M.A.J.S., (1999). Dairy technology. Principles of milk properties and processes. New york, NY, Marcel Dekker, Inc..

Westergaard, V., (1994). Milk powder technology. Evaporation and spray drying. 4e edn., Niro A/S (Ed), Copenhaguen, Denmark, 159.

Witt, W., List, J., Köhler, U., (2008). Possibilities of Dynamic Image Analysis in the Laboratory and Process Environment, PSA 2008, Stratford-upon-Avon, 2008.

Y

Ye, A.Q., (2011). Functional properties of milk protein concentrates: Emulsifying properties, adsorption and stability of emulsions. International Dairy Journal 21(1), 14-20.

Yee, K.W.K., Wiley, D.E., Bao, J., (2007). Whey protein concentrates production by continuous ultrafiltration: Operability under constant operating conditions. Journal of Membrane Science 290(1-2), 125-137.

Z

Zbikowski, Z., Zbikowska, A., Ziajka, S., (1993). Effect of technological parameters on the quality of agglomerated whole milk powder II. Physico-chemical properties. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 2(43), 25-32.

Zhao, Q.Z., Wang, J.S., Zhao, M.M., Jiang, Y.M.,Chun, C., (2006). Effect of casein hydrolysates on yogurt fermentation and texture properties during storage. Food Technology and Biotechnology 44(3), 429-434.

Annexe 1 : Les différentes technologies de séparation pour l'obtention des poudres laitières

Le fractionnement des protéines issues du lait est réalisé grâce à différents procédés :

- la séparation par bioconversion des protéines ou précipitation ;
- la séparation moléculaire de nature stérique ;
- la séparation moléculaire de nature ionique.

Bioconversion ou précipitation des protéines

La précipitation des protéines du lait est utilisée pour isoler des caséines. La précipitation de ces protéines peut se faire par coagulation acide, qui consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique (pHi = 4,6). L'acidification peut être assurée par des processus biologiques, grâce à des ferments lactiques qui transforment le glucose en acide lactique, de manière chimique (par ajout d'additif alimentaire comme la Glucono-delta-lactone ou directement par ajout d'acides tels que l'acide lactique), ou par voie enzymatique, transformant le lait liquide en gel sous l'action d'une enzyme protéolytique (ex : chymosine).

Séparation moléculaire de nature stérique ou filtration sur membrane

Les procédés membranaires sont utilisés pour séparer deux liquides de compositions différentes. Ils permettent soit de concentrer en enlevant de l'eau, soit de sélectionner un élément spécifique (Snappe *et al.,* 2010). La filtration sur membrane répond aux spécifications de qualité sanitaire et de conservation de l'activité biologique des produits traités en n'impliquant ni changement de phase de l'eau des produits à traiter, ni réaction chimique ou élévation de température (Schuck, 1999 ; Gaiani, 2006). Son principe repose sur une matière première liquide (lait, sérum) qui est placée dans un système confiné isolé par une membrane semi-perméable en polymère ou en céramique, ne laissant traverser que certains éléments (Snappe *et al.,* 2010). Le liquide traversant la membrane est appelé perméat, le liquide retenu étant qualifié de rétentat. La classification des procédés de filtration se fait essentiellement sur la base de deux critères :

-la nature de la force de séparation (gradient de concentration et/ou potentiel électrique, gradient de pression) et l'intensité de la force de pression (de quelques MPa à plus de 10 MPa) ;

- la taille ou la nature des espèces à séparer ou la taille des pores de la membrane qui joue le rôle de barrière sélective.

Les différents procédés membranaires

La filtration des composants du lait peut se faire par **microfiltration (MF)** tangentielle. La taille des pores de la membrane utilisée est élevée (> 0,1 μm et comprise entre 0,1 μm et 10 μm) et la différence de pression transmembranaire est faible. Cette méthode très utilisée pour supprimer les micro-organismes du lait à basse température (pores de 1,4 μm) peut permettre également de concentrer la caséine (pores de 0,1 à 0,2 μm). En effet, la MF appliquée au lait permet d'accroitre le rapport caséines / protéines solubles (Schuck, 1999 ; Snappe *et al.,* 2010).

Lorsque la masse moléculaire de la molécule à isoler est plus faible que celle des autres composants du milieu, la séparation moléculaire basée sur la taille est plus aisée. C'est le cas pour les protéines de lait ou de lactosérum (15 000 g/mol pour les protéines contre 400 g/mol pour les sels ou glucides).

- **L'ultrafiltration (UF) tangentielle** est une technique particulièrement adaptée à la séparation moléculaire et est utilisé pour concentrer exclusivement la fraction protéique, sans toutefois modifier les caractéristiques de la phase solvante puisque le lactose et les sels minéraux solubles ne sont pratiquement pas retenus. La taille des pores de la membrane UF est comprise entre 2 et 20 nm. Pour atteindre des niveaux de pureté à haut degré, il faut procéder à la mise en œuvre d'une étape de **diafiltration**. Elle consiste à ajouter de l'eau afin d'épuiser le rétentat en solutés non retenus par la membrane (Maubois & Ollivier, 1997 ; Schuck, 1999 ; Snappe *et al.*, 2010)

- **L'osmose inverse (OI)** permet d'enlever de l'eau, grâce à la faible solubilité de certains composants en créant une différence de pression osmotique importante entre le rétentat et le perméat. Elle permet essentiellement de pré-concentrer les lactosérums jusqu'à une teneur de 20 à 22 % de matière sèche (Schuck, 1999 ; Snappe *et al.*, 2010)

- Enfin, **la nanofiltration (NF)** permet de concentrer les éléments organiques et de séparer une fraction de sels monovalents (KCl, NaCl) ainsi que les composés dont la taille varie de 200 à 1000 g/mol (Jeantet, 1995 ; Schuck, 1999 ; Gaiani, 2006). Elle couvre un domaine de séparation intermédiaire entre l'osmose inverse et l'ultrafiltration. Elle permet de déminéraliser de 25 à 60 % du lactosérum (Kelly & Kelly, 1995 ; Bazinet *et al.*, 2002).

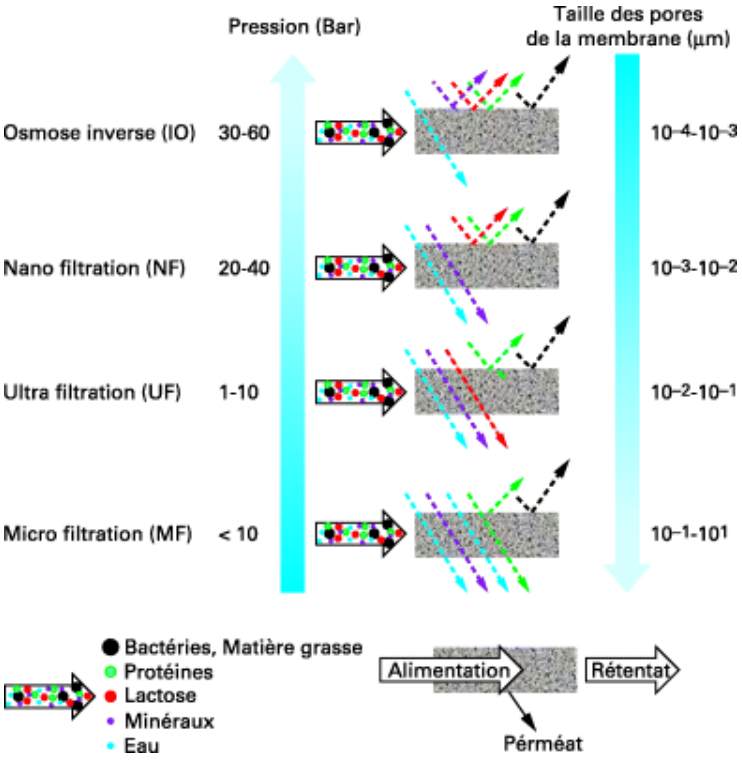


Figure 30 : Les différents procédés de filtration membranaires.

Séparation moléculaire de nature ionique

La chromatographie échangeuse d'ions

Les protéines majeures du lactosérum (β-lactoglobuline et α-lactalbumine) sont notamment séparées par ce système. Des groupements fonctionnels chargés négativement (ou positivement) et greffés de façon covalente sur les résines échangeuses d'ions permettent de ne retenir que certains ions (en fonction de leur charge électrique) : c'est le principe même de la chromatographie échangeuse d'ions.

L'électrodialyse

Il s'agit d'un procédé électrochimique permettant d'extraire les ions contenus en solution et de purifier ainsi les protéines. L'extraction se fait grâce aux transferts d'ions au travers de membranes sélectives, généralement sous l'action d'une force motrice créée par un champ électrique. Les membranes mises en place sont alternativement chargées positivement ou négativement. Le niveau d'extraction des espèces ioniques en présence dépend à la fois de la mobilité des ions et de la taille des molécules. Ce procédé a pour résultat.

Annexe 2 : Procédé technologique de déshydratation : le séchage

Séchage sur cylindres chauffants

Le séchage industriel du lait est utilisé depuis très longtemps. Dans le cas du séchage sur cylindres chauffants, le principe est le suivant. Un séchoir sur cylindres est constitué de deux cylindres rapprochés, chauffés intérieurement avec de la vapeur d'eau. Le produit à sécher est ainsi versé entre ces deux cylindres tournant lentement et en sens inverse (figure 30). Une pellicule se forme en surface des cylindres qui se dessèchent et sera détachée par un couteau racleur. Cependant, les séchoirs sur cylindres ne sont plus utilisés dans l'industrie laitière hormis la réalisation de certaines poudres de caséinates ou pour l'industrie de la chocolaterie en raison du taux de matière grasse libre élevée et la présence de composés de Maillard libérés lors de ce type de séchage (Schuck, 1999 ; Gaiani, 2006).

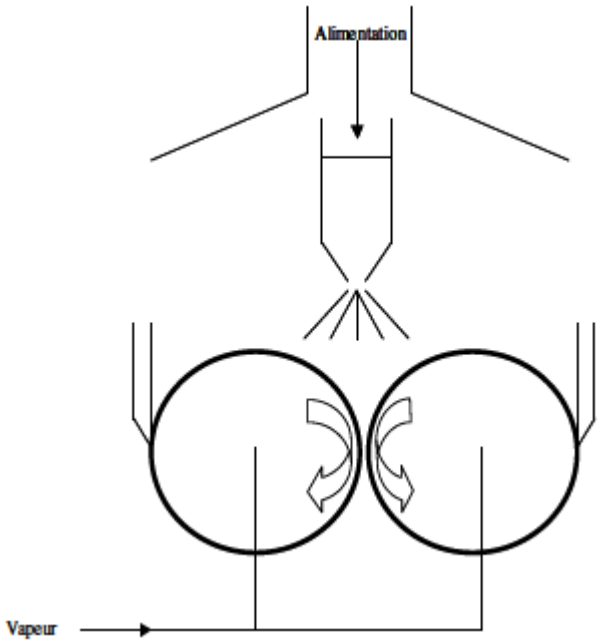


Figure 31 : Principe du séchage sur double cylindre (d'après Mafart, 1996).

Séchage par atomisation ou séchage par pulvérisation

Depuis une trentaine d'année, cette méthode de séchage constitue la norme dans l'industrie laitière. Elle consiste à pulvériser le produit à sécher (se présentant sous forme liquide ou en suspension) dans un courant de gaz chaud de façon à obtenir de fines gouttelettes (50 à 200 µm) qui seront entraînées par un courant chaud (figure 31). Ce dernier va les déshydrater de manière à obtenir une poudre. Cette méthode constitue aussi un chauffage par entrainement où l'air sert à la fois de fluide chauffant et de gaz vecteur pour l'eau enlevée. Le chauffage d'air est direct ou indirect à partir de l'air atmosphérique. Le chauffage d'air indirect est utilisé dans l'industrie agroalimentaire, présentant l'avantage de ne pas mettre en contact le produit à sécher avec le fluide caloporteur (vapeur). Toutefois, il

présente l'inconvénient d'être énergétiquement défavorable. Toutes les tours sont équipées de cyclone permettant la récupération des particules fines entraînées par l'air au cours du séchage. Ces particules peuvent être réincorporées à plusieurs niveaux (au niveau du système de pulvérisation, au niveau du vibro-fluidiseur externe ou au niveau du lit statique) aboutissant ainsi à différentes poudres. Les installations sont équipées de filtres à manches (laveurs d'air) permettant de limiter les rejets de particules fines dans l'atmosphère (Schuck, 1999 ; Mak, 2001 ; Gaiani, 2006).

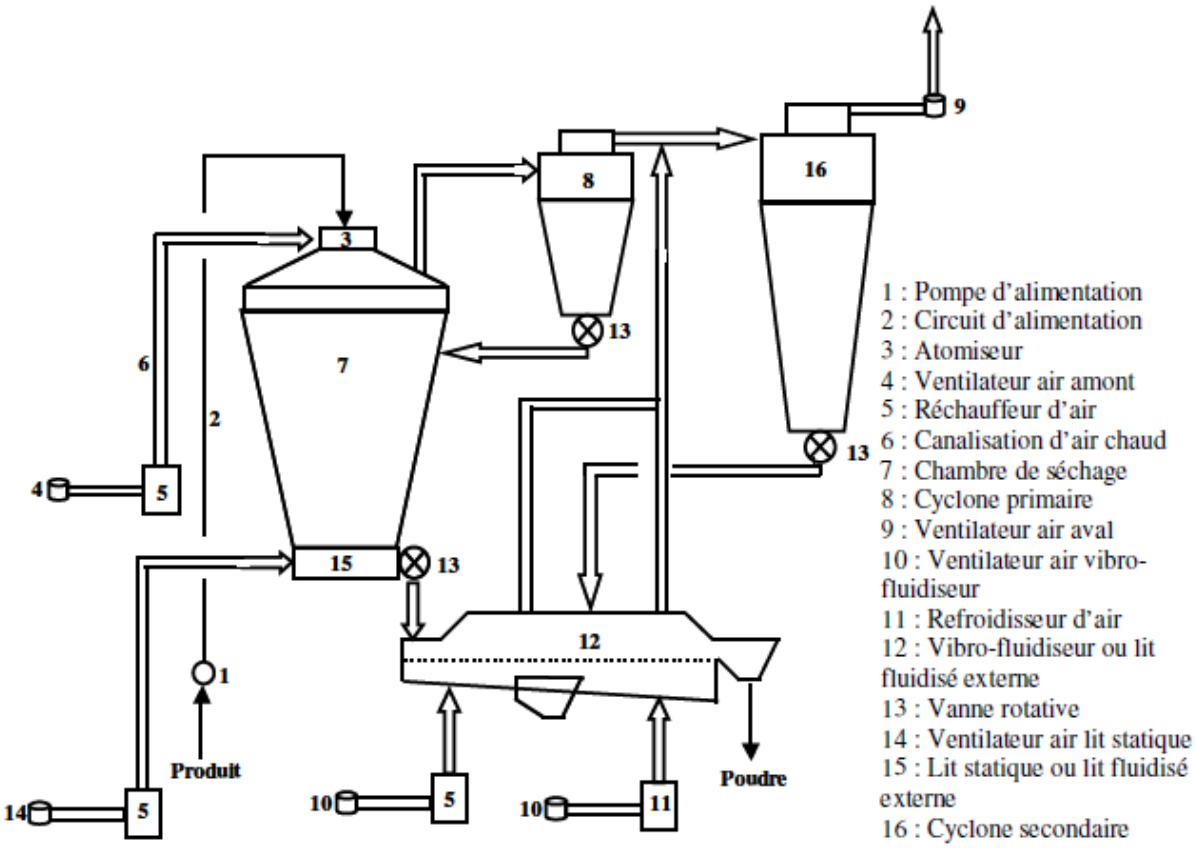


Figure 32 : Principe de fonctionnement d'une tour d'atomisation « trois temps » (d'après Schuck, 1999).

Résumé :

L'objectif de la thèse a été d'élucider le processus de réhydratation des caséines micellaires et des protéines solubles dans un milieu complexe et opaque : le lait. L'influence de l'état d'hydratation de ces ingrédients laitiers en fonction du temps (5, 120, 180, 240, 300, 480, 900 et 1440 min de réhydratation) sur les propriétés rhéologiques, texturales, physiques ainsi que la microstructure des gels laitiers acides a également été étudiée. Il en résulte que le processus de réhydratation des caséines micellaires diffère de celui des protéines solubles, et est extrêmement long avec trois étapes : une étape de mouillage des particules, suivie d'une étape de gonflement caractérisée par une augmentation de la taille des particules et enfin une étape de dispersion marquée par la diminution de la taille des particules. La réhydratation des protéines solubles est caractérisée par une grande rapidité, avec deux phases : le mouillage et la phase de dispersion (superposée). D'autre part, l'allongement de la durée de réhydratation des caséines micellaires est associé à une augmentation du point de gélification ainsi qu'à une nette amélioration des propriétés physiques, texturales et rhéologiques des gels : augmentation de leur fermeté et de leur force, diminution de la synérèse et de la formation de grumeaux. La durée de réhydratation des protéines solubles n'a pas d'influence sur ces paramètres. En revanche, leur dénaturation (par chauffage à sec) est associée à une dégradation des propriétés texturales des gels acides. Finalement, il s'avère que les gels acides formulés à partir des protéines solubles sont de meilleure qualité texturale (à l'exception de la formation de grumeaux) que ceux préparés à partir des caséines micellaires.

Mots-clés : réhydratation, caséine micellaire, protéine sérique, lait, propriétés physiques, texture, microstructure, rhéologie, gels laitiers acides.

Abstract:

The main objectives of this work were to elucidate the rehydration mechanism of the two major milk proteins (micellar casein and whey protein) into a complex and opaque medium such as milk and to assess the influence of hydration state (defined as a function of rehydration length after 5,120,180,240,300, 480, 900 and 1440 minutes of rehydration) on the rheological, textural, physical properties and microstructure of the obtained acid milk gels. Whereas, micellar casein presented a long rehydration process into milk characterized by three stages: a wetting, swelling and dispersion phase, whey protein displayed a quick rehydration process characterized by an overlapping of wetting and dispersion phase. Furthermore, an extended rehydration time of micellar casein powder into the milk base was associated with a postponed onset of gelation and enhanced physical, textural as well as rheological properties of the obtained acid milk gels characterized by increases in gel firmness, strength, and decreases in syneresis susceptibility and grains formation. In contrast, acid milk gels prepared with whey protein powder exhibited comparable overall textural properties regardless the different rehydration times. Nevertheless, denaturation of whey protein powder (by dry heating) was associated with a deterioration of the textural properties of the acid milk gels. Finally, acid gels prepared with whey proteins displayed better overall textural quality than those prepared with micellar casein (except for grains formation).

Keywords: rehydration, micellar casein, whey protein, milk, physical, textural properties, microstructure, rheology, acid milk gels.