Structuration de la matière grasse dans une matrice protéique laitière en fonction de la composition et du procédé : Influence sur les propriétés du produit

Marine Moussier

▶ **To cite this version:**

Marine Moussier. Structuration de la matière grasse dans une matrice protéique laitière en fonction de la composition et du procédé : Influence sur les propriétés du produit. Génie des procédés. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLA003 . tel-02294430

HAL Id: tel-02294430

https://theses.hal.science/tel-02294430

Submitted on 23 Sep 2019

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.

université PARIS-SACLAY

NNT : 2019SACLA003

Thèse de doctorat

Structuration de la matière grasse dans une matrice protéique laitière en fonction de la composition et du procédé : Influence sur les propriétés du produit

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à AgroParisTech (Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement)

École doctorale n°581 Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)
Spécialité de doctorat: Génie des Aliments

Thèse présentée à AgroParisTech Massy, le 1er février 2019, par

Marine MOUSSIER

Composition du Jury :

Sylvie Marchesseau Professeure, Université de Montpellier (UMR IATE)	Examinatrice *Présidente du jury*
Anne Saint-Eve Maître de Conférences, AgroParisTech – INRA (UMR GMPA), France	Examinatrice
Dérick Rousseau Professeur, Ryerson University (Dpt. of Chemistry and Biology), Canada	Rapporteur
Thomas Croguennec Professeur, Agrocampus Ouest – INRA (UMR STLO), France	Rapporteur
Camille Michon Professeure, AgroParisTech – INRA (UMR GENIAL), France	Directrice de thèse
Véronique Bosc Maître de Conférences, AgroParisTech – INRA (UMR GENIAL), France	Co-encadrante de thèse
Cyril Chaudemanche Ingénieur de Recherche, Yoplait General Mills, France	Invité

A mes grands-parents,
avec une tendre pensée pour toi, Papi G., qui me demandais toujours si j'avais « pigé »

Remerciements

Mes trois années de thèse s'achèvent, et avec, ce manuscrit. Il représente l'aboutissement d'un cheminement personnel mais aussi (et surtout !) d'un travail collectif et de beaucoup d'échanges. Avant de passer aux paragraphes descriptifs et aux schémas explicatifs, je tenais absolument à remercier de nombreuses personnes.

En premier lieu, je souhaite remercier Camille Michon, Véronique Bosc, Delphine Huc-Mathis et Jean-Marc Sieffermann. Vous avez été mon équipe encadrante pendant ces trois années et vous m'avez transmis, sans jamais aucune limite. A vos côtés, j'ai pu contempler et m'imprégner un peu, je l'espère, de votre esprit de synthèse, votre efficacité, votre précision, votre capacité à créer et imaginer, votre art de la transmission, vos visions stratégiques à la fois différentes et complémentaires. Avec chacun vos expertises, vos spécialités et vos personnalités, vous avez rendu cette expérience très riche scientifiquement, professionnellement et humainement parlant. Merci pour les nombreuses discussions techniques et plus personnelles, votre accompagnement, votre patience, votre écoute, votre soutien et votre disponibilité. Merci également de m'avoir permis d'explorer avec une certaine liberté, de l'autonomie et de la créativité. C'était important pour moi et j'espère avoir été à la hauteur de votre confiance. Vous m'avez tout simplement permis de réaliser ce travail de thèse et j'ai beaucoup appris auprès de vous tous. Je vous en suis très reconnaissante et j'espère pourvoir à nouveau échanger et travailler avec vous par la suite.

Je voudrais aussi remercier l'ensemble des partenaires du projet SLIM : Yoplait, Häagen-Dazs, General Mills, CAD Instruments, Emulsar et le CBMN. Au travers des nombreux comités scientifiques, des comités de pilotage et autres réunions, nous avons beaucoup partagé et échangé pour faire avancer le bateau collectivement. Ce fût une belle et riche collaboration. Merci à Marion Morand, Violaine Pistre, Javier Romero, Bruno Lecanu, Andreas Schopf, Claude Vizcaino puis Jérôme Sabathier, Christophe Arnaud, Fernando Leal-Calderon, Chrystel Faure et Marine Boursier. Merci à Lucie Goibier. Nous avons été co-doctorantes pendant ces trois années et je suis contente d'avoir fait ta connaissance. Merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse, ta sincérité et les échanges que nous avons pu avoir. Je te souhaite de réaliser tous tes projets. Je tiens à remercier particulièrement Cyril Chaudemanche. Merci d'avoir pensé à moi et de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse. Merci d'avoir été présent pendant les trois années qui ont suivi notre première discussion à propos du projet SLIM. Nous avons eu de nombreuses discussions scientifiques qui m'ont fait avancer et progresser. Merci pour ta disponibilité, merci d'avoir coordonné le projet SLIM – suivi par Marion, merci de m'avoir encadrée au travers de nos rencontres et de mes comités de thèse.

Ce travail de thèse a été l'occasion d'expérimenter à l'échelle pilote au travers de plusieurs essais. Je tiens donc à remercier tout particulièrement Bouchaib Marfouk et Jonathan Nicolas, pilotes et techniciens R&D au *Vienne Technical Center* (General Mills), pour m'avoir permis de mener ces essais. Merci de m'avoir accueillie avec disponibilité et gentillesse, d'avoir partagé vos expertises et d'avoir accepté d'explorer des pistes inhabituelles et parfois pleines de surprises (# douche de beurre). J'ai beaucoup aimé nos collaborations. Merci à Violaine et Cyril d'avoir supervisé, coordonné et participé aux essais. Ils ont contribué à faire avancer mon travail de thèse.

Je remercie également les membres de mon jury de thèse pour leurs nombreuses remarques et suggestions d'améliorations. J'ai vraiment apprécié nos échanges. Ils m'ont fait progresser et avancer dans ma réflexion. Merci à Dérick Rousseau et Thomas Croguennec d'avoir rapporté mon travail et merci à Sylvie Marchesseau et Anne Saint-Eve de l'avoir examiné.

Je souhaiterais remercier Marie-Hélène Famelart, membre de mon comité de thèse. Nos discussions ont été très enrichissantes pour moi et m'ont vraiment aidée à avancer scientifiquement et personnellement dans mon

travail de thèse. Merci pour votre écoute. Merci d'avoir pris le temps de suivre mon travail et de vous êtes toujours rendue disponible pour nos rencontres et nos échanges.

Ce travail a également été possible grâce à Jean-Baptiste Thomazo, Morgane Tertre, Manon Crouillère, Mona Gorge, Isabela Gava de Souza, Mélanie Ngo et Congong Jiang. Au travers de vos stages et projets d'étudiants, vous avez contribué (scientifiquement) à ce travail et je vous en remercie chaleureusement. Je tiens aussi (et c'est important pour moi) à vous remercier pour ce que vous m'avez apporté et appris humainement parlant, au travers de nos échanges. Nos collaborations représentent des expériences toutes différentes, riches et instructives pour moi. Merci. Je vous souhaite plein de réussite et de beaux projets pour la suite de vos vies personnelles et professionnelles.

Je remercie Véronique Solé-Jamault, responsable du plateau purification de protéines au sein de l'unité Biopolymères Interactions Assemblages (INRA). Nous avons eu l'occasion de travailler ensemble pour caractériser les protéines laitières. Merci pour ton chaleureux accueil au sein du BIA, ta disponibilité et le temps que tu as passé à m'aider dans mon travail de thèse. Merci d'avoir partagé avec simplicité ton expertise sur l'A4F. Grâce à toi, j'ai appris une nouvelle technique et nos mesures ont permis de consolider les résultats de ma thèse.

Je remercie également Pascale Reichl, technicienne de recherche en sensoriel à AgroParisTech. Nous avons travaillé ensemble à plusieurs moments de ma thèse. Tu m'as transmis ton savoir en analyse sensorielle et tu m'as aidée à mettre au point des méthodes. Merci pour ta grande disponibilité et ta bonne humeur. J'ai beaucoup aimé notre collaboration. Tu as vraiment apporté à mon travail de thèse.

Je souhaite adresser un grand merci à l'ensemble de l'équipe SP2 ! J'y ai fait de belles rencontres. J'ai pu y évoluer et y grandir dans un cadre solide, chaleureux et réconfortant.

Je remercie Pablo Granda, Anne-Marie Gibon, Brigitte Deau et Gabrielle Moulin, qui ont été des piliers au cours de ces trois années. Pablo, merci d'être si entier ! Merci pour ta présence toujours constante, ton humour et ton franc-parler, ton apport scientifique et humain. Tu mets de la vie dans le laboratoire et ton soutien m'a vraiment aidée pendant ces trois ans. Anne-Marie, je te remercie d'avoir été si présente dans le laboratoire avec toujours le mot gentil, le mot pour rire ou pour dédramatiser. Brigitte, tu es une belle rencontre dans mon parcours. Merci d'avoir toujours été attentive, prête à écouter et épauler. Merci d'avoir fait en sorte que tout fonctionne bien pendant ma thèse. Merci pour ta bonne humeur, ton rire communicatif, le café toujours chaud et les gâteaux dont tu as le secret. Merci pour ta précieuse aide dans mes expérimentations, les heures passées au granulomètre, à analyser méticuleusement mes échantillons. Gaby, merci pour ces trois années ! J'ai beaucoup aimé nos échanges. Merci d'avoir toujours fait attention à moi, d'avoir transmis ta joie de vivre, d'avoir partagé ton expertise en microscopie. Merci d'avoir réfléchi avec nous, d'avoir pris tant d'images microscopiques et d'avoir reconstitué des microgels en 3D, et ce, même si tu as vu plus beau ! Merci pour toute ta contribution scientifique et personnelle. Je remercie également Sophie Berland. Nous avons moins eu l'occasion de travailler ensemble mais tu m'as protégée et beaucoup apporté pendant ces trois années. Merci pour nos jolis échanges, ta grande écoute et ton soutien. Vous m'avez tous aidée à aller jusqu'au bout de ce travail de thèse.

Quand je suis arrivée en thèse, il y avait une équipe de doctorantes SP2 avisées et expérimentées : Marine Dewaest-Barros, Lucie Huault, Sarah Abidh et Cassandre Leverrier. Lucie, je suis arrivée sur la fin de ta thèse mais j'ai eu la chance de te rencontrer. Merci pour ton accueil au sein de SP2 et ta gentillesse. Tu m'as aidée à me sentir à l'aise et à trouver ma place. Marine, on a finalement appris à se connaître après ta thèse puisque tu as soutenu trois mois après mon arrivée. Je suis vraiment contente d'avoir fait ta connaissance. Merci pour nos différents échanges que j'apprécie toujours beaucoup. J'espère qu'on aura vite l'occasion de se recroiser. Sarah, ta présence a été vraiment importante pour moi. Merci pour ta spontanéité, ton honnêteté, tes « oui mais tu as raison ! » quand je râlais, ton grand cœur (!!). J'ai passé d'excellents moments à tes côtés et j'ai pris

beaucoup de plaisir à débattre et réfléchir avec toi, que ce soit de science, de politique, de révolution, de sociologie ou je ne sais quoi ! Tu m'as enrichie et j'ai hâte qu'on partage de futurs moments. Cassandre, merci pour tout ce que tu m'as apporté. Tu as été d'un soutien très précieux. Je suis chanceuse de t'avoir rencontrée. Merci pour ton incroyable écoute, la sérénité que tu es capable d'insuffler aux gens, tes conseils scientifiques et personnels toujours très éclairés. Merci pour nos belles discussions sur le passé, le présent et l'avenir. Tu as été inspirante. Je vous souhaite à toutes plein de bonheur et de réussite dans vos projets, même les plus fous.

Pendant ces trois années, j'ai eu le plaisir de partager mon bureau avec Damien Mat et Anne-Flore Monnet, puis Charlotte Floret, et, Alban Lacroix. Merci Damien et Anne-Flore de m'avoir accueillie dans votre univers « *enchanteur peuplé de plantes, de classeurs métalliques rétro et de béchers à digérer du thé* » *(dixit A-F)*. C'était exactement ça. Merci à tous les deux de m'avoir fait une place. Merci pour la jolie complicité que nous avons construite et pour nos longues discussions autour de la différence, de la tolérance ou encore du développement durable. J'ai beaucoup aimé tous ces moments. Damien, je te remercie pour ton petit grain de folie et pour toutes tes idées. Anne-Flore, nous nous sommes croisées pour la première fois lors de mon entretien. Nous avions tout de suite accroché et tu m'avais rassurée. Depuis nous avons tissé une belle relation, qui m'est précieuse. Merci pour ton amitié pendant ces trois ans. Vivement nos nouvelles aventures ! Charlotte, lors de notre première rencontre, tu avais les cheveux rouges et ton accent chantant. Merci pour ton rire éclatant, la franchise de nos échanges, et les liens que nous avons créés. Merci pour ton soutien et ta spontanéité ! Je prends toujours beaucoup de plaisir à discuter et débattre avec toi. Enfin, merci Alban d'avoir supporté mes derniers mois de rédaction (pas les plus fameux), imperturbable malgré mon moral pas toujours au beau fixe. A tous, je ne vous souhaite que du bonheur pour la suite.

Pendant ces trois années, il y a eu également les camarades avec qui je n'ai pas partagé de bureau mais dont la présence quotidienne au sein de l'équipe SP2 a été si importante : Valérie Guénard-Lampron, Laurena Masbernat, Benoît Basse, Mathieu Maréchal et Kevin Lachin. Merci pour votre bonne humeur et tous les moments partagés à bavarder, à jouer aux mots-croisés (bien que je ne vous ai pas été d'un grand secours), à râler, à rire, à manger, à boire (toujours avec modération !). Merci pour votre écoute et votre soutien. Benoît, merci pour ton sourire et ta gentillesse. Merci d'être toujours partant, disponible et prêt à aider. J'ai toujours pu compter sur toi. Laurena, j'ai beaucoup aimé nos discussions. Merci d'avoir été attentive, positive et bienveillante. Valérie, notre petite québécoise préférée. Ça a été un plaisir de te voir arriver dans le laboratoire. Je suis heureuse d'avoir fait ta connaissance et d'avoir partagé à propos des yaourts brassés (attention !) et de la vie en générale. Merci pour ta fraîcheur ! Kevin, merci pour nos discussions toujours riches et instructives. Merci pour ton honnêteté et ton écoute. Valérie et Kevin, merci à tous les deux pour notre article à trois voix. J'ai adoré travailler avec vous. Ce travail d'équipe a été très enrichissant et donne une note collective à mon travail de thèse, qui me rend fière. Mathieu, on aurait dû commencer notre thèse exactement au même moment, et puis on s'est un peu décalés dans le temps. Je me rappelle de notre première rencontre à la cantine et j'ai été très heureuse de pouvoir régulièrement échanger et partager avec toi pendant les trois années qui ont suivi. Merci pour ton optimisme (si célèbre maintenant) ! Merci aussi pour ta sensibilité. Tu as été un appui solide et je t'en suis très reconnaissante. Merci à tous. J'espère partager de nombreux autres moments avec vous.

Je voudrais également remercier tous les autres membres de l'équipe SP2 : Giana Almeida-Perre, Gérard Cuvelier, Artemio Plana-Fattori, Paul Menut, Denis Flick, Christelle Turchiuli,… Vous m'avez partagé vos expertises scientifiques et apporté votre soutien, avec toujours beaucoup de bienveillance. Merci pour tout.

Je remercie AgroParisTech et l'UMR GENIAL pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans de bonnes conditions. Merci à Catherine Bonazzi de diriger l'UMR GENIAL et de nous apporter écoute et soutien pendant notre doctorat. Merci à tous ceux qui ont fait en sorte que les choses se passent bien au quotidien : Christiane Lajeune, Valérie Lafaux, Narimène Chouarfia, Dominique Gry, Jacqueline Nunes, et tous les autres. Merci aux

membres des équipes HAP, Calipro et I2MC pour les différents échanges scientifiques et humains que nous avons eus. Ils m'ont aidée à avancer et progresser pendant ces trois années.
Je remercie plus particulièrement Aurélia Pernin, Jeehyun Lee, Pierre Awad, Véronique Masselot, Adrien Douady, Marion Gaff, Charlène Lambert, Josselin Bousquières, Thibaut Vine, Hajar Faraj, Maxime Touffet, Benjamin Le Delliou, Julie Palczak, Valérie Duthoit,… Merci pour avoir partagé plaintes et rires !! Aurélia, Jeehyun, nous avons partagé l'aventure Asthère et elle nous a permis de faire connaissance. Je suis ravie de vous avoir rencontrées et d'avoir partagé de beaux moments avec vous deux. Je m'en souviendrai et j'espère que nous aurons l'occasion d'en partager plein d'autres. Je vous souhaite plein de belles choses pour la suite.

Enfin, je tiens à remercier tous mes proches ! Merci, merci et encore merci les amis (vrais reconnaîtront vrais), Maman, Papa, Mamie, Papi, Berit, Fabrice, Catherine, Dominique, Éric, Louisette, Isabelle, Pascale et tous les autres. Merci pour vos messages, les petits colis surprises, les petits plats réconfortants, votre écoute de tous les instants, vos conseils, et votre inébranlable soutien dans cette (sacrée) aventure.

Romain, mon complice de toujours. Je sais que je peux compter sur toi n'importe quand et pour n'importe quoi. Merci pour ton optimisme et ta sérénité (apparente) dans la vie. On est parfois différents sur ces points et même si on aime se chamailler, même si on ne parle pas toujours complètement la même langue, nos échanges sont extrêmement riches et précieux pour moi ! Merci d'avoir été là tout au long de cette aventure, fidèle à toi-même et si fidèle au poste de frère.

Thibaud, je me souviens du moment où je t'ai parlé de ce projet de thèse pour la première fois. Nous étions en voiture, il faisait (super) chaud et nous voici trois ans après. Tu as tout partagé et traversé avec moi, les hauts et les bas, les difficultés et les progrès. Tu as été une oreille infatigable et un soutien infaillible. Tu as été d'une patience, d'une douceur et d'une bienveillance à toute épreuve. Merci de m'avoir réveillée avec du café chaud tous les jours de la semaine, les samedis et les dimanches pour me réconforter et me donner des forces. Merci de m'avoir prêté tes épaules pour décompresser. Merci de m'avoir fait tant rire ! Tu m'as aidée, entourée et conseillée au quotidien pour aller jusqu'au bout de l'aventure. Ces trois années m'ont beaucoup appris sur moi-même et tu le sais mieux que quiconque. Merci, tout simplement, infiniment.

Merci à tous ceux qui ont contribué, de très près ou de plus loin à ce travail, à cette aventure.

Table des matières

ABREVIATIONS ET APPELLATIONS **11**

LISTE DES FIGURES **13**

LISTE DES TABLEAUX **23**

INTRODUCTION GENERALE **27**

ORGANISATION DU MANUSCRIT ET PRECISIONS CONCERNANT SA LECTURE 31

CHAPITRE 1 : **ETAT DE L'ART** **33**

1.1. FABRICATION D'UN YAOURT BRASSE RICHE EN MATIERE GRASSE ET PROCESSUS PHYSICO-CHIMIQUES ASSOCIES 35

1.1.1. Composition et structure du lait natif *35*

Composition et structure des protéines laitières 36

Composition et structure de la matière grasse laitière 38

Représentation simplifiée de la structure du lait natif 40

1.1.2. Opérations unitaires du procédé de fabrication d'un yaourt brassé riche en matière grasse *41*

Procédé classique de fabrication d'un yaourt brassé 41

Diversité des opérations unitaires 44

1.1.3. Structuration d'un yaourt brassé riche en matière grasse au cours du procédé classique de fabrication *48*

1.2. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET FONCTIONNALISATION DES INGREDIENTS LAITIERS 54

1.2.1. Propriétés physico-chimiques et fonctionnalisation des protéines laitières *54*

Propriétés d'interactions des protéines en fonction de leur état et de l'environnement 54

Propriétés émulsifiantes des protéines 60

1.2.2. Propriétés physico-chimiques et fonctionnalisation de la matière grasse laitière *65*

Structure et propriétés de la matière grasse laitière en émulsion 68

Facteurs impactant les propriétés des globules gras 70

1.3. RELATION ENTRE COMPOSITION, STRUCTURE ET PROPRIETES MACROSCOPIQUES DES YAOURTS BRASSES RICHES EN MATIERE GRASSE 74

1.3.1. Contribution de la matière grasse aux propriétés macroscopiques des yaourts gras *74*

Impact de la matière grasse sur les propriétés sensorielles et le crémeux 74

Rôle de la matière grasse évalué par des mesures instrumentales qui prennent en compte le *processus oral* 75

1.3.2. Relation entre la structure et les propriétés instrumentales des yaourts brassés riches en matière grasse aux différentes échelles *77*

Relation entre la structure et les propriétés de texture : *Quels paramètres prendre en compte aux différentes échelles ?* 77

Leviers permettant de moduler la structure et les propriétés macroscopiques des yaourts brassés riches en matière grasse 81

CHAPITRE 2 : **DEMARCHE ET STRATEGIE EXPERIMENTALE** **85**

2.1. DEMARCHE GENERALE 87

2.2. LEVIERS, HYPOTHESES ET VARIABLES 87

2.2.1. Leviers identifiés et hypothèses de travail *87*

2.2.2. Variables testées *89*

2.3. ORGANISATION DU TRAVAIL DE THESE EN DIFFERENTS BLOCS EXPERIMENTAUX 89

CHAPITRE 3 : **MATERIEL ET METHODES** **91**

3.1. MATERIEL 93

3.1.1. L'eau purifiée et le perméat *93*

3.1.2. La matière grasse et les protéines laitières *93*

3.1.3. Les autres ingrédients *94*

3.2. METHODES 95

3.2.1. Fabrication des différents systèmes étudiés selon leur niveau de complexité *95*

Préparation des solutions de protéines laitières aux échelles laboratoire et pilote 95

Fabrication d'émulsions H/E à l'échelle laboratoire 95

Fabrication de yaourts brassés aux échelles laboratoire (modèle) et pilote 96

3.2.2. Méthodes de caractérisation en fonction de l'échelle d'étude du système *96*

Détermination de la composition en ions (force ionique) 97

Mesure des propriétés thermiques des fractions de matière grasse 97
Propriétés rhéologiques des émulsions 98
Propriétés sensorielles des yaourts brassés 99
Récapitulatif sur les traitements statistiques utilisés 99

CHAPITRE 4 : **MISE AU POINT DE L'EXPERIMENTATION 103**

4.1. IMPACT D'UNE REDUCTION DE LA TENEUR EN MATIERE GRASSE SUR LES PROPRIETES DU YAOURT BRASSE RICHE EN MATIERE GRASSE 105

4.1.1. Impact sur les propriétés sensorielles 106

4.1.2. Impact sur les propriétés mesurées instrumentalement 108

Propriétés microscopiques 108
Propriétés macroscopiques 109

4.1.3. Comparaison entre les propriétés sensorielles et instrumentales 110

4.2. MISE AU POINT D'UN MODELE LABORATOIRE 112

4.2.1. Adaptation du procédé pilote à l'échelle laboratoire [ARTICLE] 112

4.2.2. Complexification du modèle laboratoire 122

Crèmes *à façon* obtenues par l'émulsification laboratoire en fonction de l'interface et de la fraction de matière grasse laitière 122
Impact de l'émulsification laboratoire sur les propriétés des protéines sériques 123

CONCLUSIONS ET MESSAGES CLES DU CHAPITRE 125

CHAPITRE 5 : **ETUDE DE LA DISPERSION DE MICROGELS CONSTITUTIVE DU YAOURT BRASSE 127**

5.1. CARACTERISATION DE LA TAILLE, DE LA FORME ET DE LA DIMENSION FRACTALE DES MICROGELS [ARTICLE] 129

5.2. MODIFICATION DES PROPRIETES DES MICROGELS ET IMPACT SUR LES YAOURTS BRASSES 141

5.2.1. Impact du ratio cas/WP sur les microgels en fonction de l'état physico-chimique des protéines sériques 142

5.2.2. Impact du ratio cas/WP sur les propriétés macroscopiques des yaourts brassés 145

5.2.3. Lien entre la structure des microgels et les propriétés des yaourts brassés 146

CONCLUSIONS ET MESSAGES CLES DU CHAPITRE 148

CHAPITRE 6 : **ETUDE DE L'INTERFACE 149**

6.1. IMPACT D'UNE MODIFICATION DE L'INTERFACE SUR LE YAOURT BRASSE 151

6.2. STRUCTURATION DE L'INTERFACE [ARTICLE] 153

CONCLUSIONS ET MESSAGES CLES DU CHAPITRE 167

CHAPITRE 7 : **ETUDE DE LA PHASE DISPERSEE 169**

7.1. CRISTALLISATION ET FUSION DE LA MATIERE GRASSE LAITIERE EN FONCTION DE LA FORMULATION ET DE LA VITESSE DE REFROIDISSEMENT 171

7.1.1. Impact de l'émulsification 171

7.1.2. Impact de la vitesse de refroidissement 173

7.2. COMPORTEMENT RHEOLOGIQUE DES EMULSIONS EN FONCTION DE LEUR FORMULATION 176

7.2.1. Impact de la fraction de matière grasse laitière 176

7.2.2. Impact de l'interface 179

CONCLUSIONS ET MESSAGES CLES DU CHAPITRE 181

CHAPITRE 8 : **COMBINAISON DE PLUSIEURS LEVIERS POUR STRUCTURER *A FAÇON* 183**

[ARTICLE] 185

CONCLUSIONS ET MESSAGES CLES DU CHAPITRE 201

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 203

STRUCTURER POUR INNOVER 205

COMPRENDRE POUR MIEUX STRUCTURER 208

VALORISATIONS SCIENTIFIQUES 211

Publications dans des revues internationales à comité de lecture 211
Communications lors de congrès internationaux 211

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 215

Abréviations et appellations

Etant donné que les abréviations et termes plus spécifiques sont explicités au fur et à mesure du manuscrit (notamment dans les articles), voici la signification des abréviations les plus couramment utilisées et la définition de quelques termes clés :

α-LA : α lactalbumine

β-LG : β lactoglobuline

ACP (*PCA*): analyse en composante principale

A/E : air dans eau

ANS : anilino-naphtalène-sulfonate

DRX : diffraction rayon X

DSC : *differential scanning calorimetry* (calorimétrie différentielle à balayage)

DTNB : acide dithiobis-nitrobenzoïque

GDL : glucono-δ-lactone

H/E (*O/W*) : huile dans eau

MGLA (*AMF*) : matière grasse laitière anhydre (*anhydrous milk fat*)

MM : masse moléculaire

pH : potentiel hydrogène

pHi : point isoléctrique

PLE : poudre de lait écrémé

Ratio cas/WP : le ratio caséines/protéines sériques correspond au ratio entre la proportion de caséines et la proportion de protéines sériques (WP). Il diminue quand la proportion de WP augmente.

rpm : *rotation per minute* (rotation par minute)

SDS : sodium-dodecyl-sulfate

SFC : solid fat content, utilisé pour désigner le taux de solide

SH : groupement thiol

SMP : skim milk powder (utilisé dans les articles en anglais uniquement)

TAG : triacylglycérol *ou* triglycéride

WP : whey protein(s) ; utilisé pour désigner les protéines sériques

WPI : whey protein isolate ; utilisé pour désigner des concentrats de protéines sériques (manuscrit)

WPn : whey proteins natives

WPd : whey proteins agrégées thermiquement (dénaturation)

p-value ou ***p :*** *probabilité donné sous l'hypothèse nulle d'obtenir la même valeur (=) (ou une valeur plus extrême (< ou >) que celle observée.*

Yaourt brassé : *pour simplifier le manuscrit, les produits laitiers frais fermentés brassés étudiés dans ce travail sont appelés yaourts brassés.*

Systèmes assimilés : *ils correspondent aux laits acidifiés, « cream cheese », émulsions gélifiées modèles et les yaourts. Ils peuvent être brassés ou fermes.*

Référence (yaourt brassé) : *elle correspond à la matrice laitière (10% de matière grasse) fermentée et brassée (recette commerciale) qui est obtenue via le procédé pilote ou industriel du partenaire industriel du projet (Yoplait).*

Yaourt brassé modèle : *il correspond à un yaourt fabriqué à l'échelle laboratoire (mini-ligne de fabrication spécialement conçue) par acidification GDL.*

Yaourt brassé pilote : *il correspond à un yaourt fabriqué à l'échelle pilote chez Yoplait (procédé parfaitement maîtrisé et représentatif de l'échelle industrielle) par fermentation lactique.*

Liste des Figures

Figure 1 : Qualificatifs de texture de plusieurs yaourts brassés utilisés comme arguments de vente en fonction de la composition en matière grasse et en protéines 29

Figure 2 : Composition globale moyenne (A) et composition en protéines laitières (B) du lait natif ($g.L^{-1}$), avec les caséines α_{S1}, α_{S2}, β, et κ ainsi que les protéines sériques α-LA, β-LB, sérum albumine bovine, immunoglobuline et lactoferrine (à partir de Cayot and Lorient, 1998) 35

Figure 3 : (A) Structures des micelles de caséines du lait natif obtenues par microscopie électronique en transmission grandissement x85000 (à gauche) et par microscopie électronique à balayage grandissement x70000 (à droite) (McMahon and McManus, 1998); (B) Structures tertiaires des protéines sériques majeures β-LG (à gauche) et α-LA (à droite) issues de *Protein Data Bank* (Croguennec et al., 2008) 36

Figure 4 : Différents modèles de la structure de la micelle de caséines : (A) modèle submicellaire proposé par Schmidt (1982) (a) puis par (Walstra, 1999) (b) avec des différences dans la position des clusters de phosphate de calcium et dans la structure de la couche extérieure de la micelle, (B) modèle des nanoclusters proposé par Holt and Horne (1996) et (C) modèle réticulé (illustration de la coupe transversale) récemment proposé par Huppertz et al. (2017) d'après https://www.frieslandcampina.com/en/innovation/casein-micelles/ 37

Figure 5 : Structure générale des globules gras du lait natif à travers (A) leur distribution de taille (Lopez et al., 2010), (B) l'étude de leur composition en TAG par microscopie (barres d'échelle = 10 µm) (à partir de Lopez et al., 2010) et (C) leur organisation (à partir de Gallier et al., 2015; Michalski et al., 2002) 38

Figure 6 : Structure détaillée de la membrane native des globules gras à travers (A) son organisation en tricouche (organisation latérale des lipides et distribution hétérogène des protéines) (Lopez, 2011; Lopez et al., 2011) et (B) la mise en évidence de la ségrégation des phospholipides de sa bicouche extérieure en plusieurs domaines plus ou moins ordonnés (barres d'échelle = 5 µm) (à partir de Lopez et al., 2011, 2010) 40

Figure 7 : Représentation schématique et simplifiée du lait natif et de ses constituants 40

Figure 8 : Principales étapes du procédé classique de fabrication d'un yaourt brassé (à partir de Lee and Lucey 2010; Sodini et al. 2004; Jeantet et al. 2008) 41

Figure 9 : Schéma d'un homogénéisateur classique à deux étages (A) et schéma du principe de l'homogénéisation haute pression (B) (Roustel, 2010) 42

Figure 10 : Suivi de la gélification d'un lait pasteurisé au cours de sa fermentation lactique à travers (A) l'évolution du pH et (B) l'évolution du module conservatif (G', Pa, ligne pointillée) et du module de perte (tan δ, ligne continue) (Lucey et al., 1998) 43

Figure 11 : Schématisation de l'impact du brassage sur (A) la rupture du gel continu (yaourt ferme) (Mokoonlall et al., 2016) et (B) l'évolution de sa viscosité (van Marle et al., 1999) 43

Figure 12 : Illustration de l'évolution de la taille des microgels de lait fermenté sous l'influence de différents cisaillements, *où ξ est le rayon calculé à partir de la dimension fractale, R_h est le rayon hydrodynamique et η_s est la viscosité du sérum entre les microgels* (van Marle et al., 1999) 44

Figure 13 : Variation de la date limite de consommation (DLC) en fonction du traitement de pasteurisation ou microfiltration de laits demi-écrémés du commerce 45

Figure 14 : Evolution du diamètre de Sauter (x_{43}, µm) d'une émulsion huile/eau (paraffine) en fonction de l'énergie apportée par un système rotor/stator (*Ultra Turrax*), par un traitement ultrason (*Ultrasonic transducer*) et par un homogénéisateur classique (*Homogenizer*) (Walstra, 1993) 45

Figure 15 : Différence des cinétiques d'acidification (A) et de gélification (B) de laits acidifiés avec des ferments ou avec 1,3% de GDL. Module conservatif (G', Pa, ligne en pointillée) et module de perte (tan δ, ligne continue) (Lucey et al., 1998)..... 47

Figure 16 : Modifications maximales et minimales des propriétés rhéologiques du lait fermenté au cours des différentes opérations unitaires de brassage (Mokoonlall et al., 2016)..... 48

Figure 17 : Distribution de taille des globules gras de différents laits entiers : natif, traité par upérisation haute température (UHT) (140 °C, quelques secondes) puis homogénéisé, et pasteurisé (80-95 °C, plusieurs minutes) puis homogénéisé ; Mesure des tailles effectuée par diffraction laser et micrographes obtenus par microscopie optique (Lopez, 2005) 49

Figure 18 : Impact combiné de la pasteurisation (P) et de l'homogénéisation (H) sur l'interface du lait natif par observation en microscopie électronique à transmission (McMahon and Yousif, 1993) (A) ; Observation en microscopie électronique à balayage des protéines adsorbées à l'interface d'une crème reconstituée à partir de MGLA et de lait écrémé (Sharma et al., 1996) (B) ; Représentation graphique de l'organisation de la surface d'un globule gras après l'étape d'homogénéisation (à partir de Michalski et al., 2002) (C) 49

Figure 19 : Mécanismes de formation de gels à partir de micelles de caséines seules (à partir de McMahon et al., 2009) (en haut) ou de de lait (micelles de caséines et protéines sériques) non chauffé (au milieu) ou chauffé (en bas) (à partir de Famelart et al., 2004)..... 50

Figure 20 : Influence des globules gras, de leur taille et de la composition de l'interface sur la structuration d'un gel laitier (à partir de Michalski et al., 2002) 51

Figure 21 : Exemple de l'aspect (microscopie confocale) et de la distribution de taille (diffraction laser) de microgels de différents diamètres obtenus après brassage de lait fermenté (à partir de Hahn et al., 2015).... 51

Figure 22 : Structuration du yaourt brassé au cours de son procédé de fabrication..... 52

Figure 23 : Représentation des types de réorganisation possibles aux différentes échelles identifiés pour des systèmes de type lait fermenté (à partir de Mellema et al., 2002)..... 53

Figure 24 : Modes d'interaction des protéines laitières en fonction de leur composition, de leur état et des conditions physico-chimiques 55

Figure 25 : Observation par microscopie électronique à transmission d'agrégats de β-LG (10 g.L^{-1}) formés par traitement thermique à des pH de 2,0 (A), de 5,8 (B) et 7,0 (C) (à partir de Nicolai, 2016 (d'après Jung, Savin, Pouzot, Schmitt, & Mezzenga, 2008))..... 56

Figure 26 : Rupture des agrégats de protéines sériques par un traitement d'homogénéisation à 415 bar (Chung et al., 2014)..... 56

Figure 27 : Synthèse des facteurs physico-chimiques impactant les propriétés des micelles de caséines (Broyard and Gaucheron, 2015) 57

Figure 28 : Gélification des micelles de caséines par traitement thermique en fonction du pH et de leur concentration (à partir de Thomar and Nicolai, 2016)..... 57

Figure 29 : Microstructures de gels (microscopie électronique à balayage) d'agrégats de protéines sériques de différentes tailles obtenues par acidification (GDL) (Donato et al., 2011) 58

Figure 30 : Microstructures de gels obtenus par l'acidification de différents mélanges de protéines sériques et de micelles de caséines : (A) Gels à partir de différents états des protéines (à partir de Vasbinder et al., 2004) et (B) étude de l'impact du mélange des protéines sur la dimension fractale des gels (à partir de Andoyo et al., 2015)..... 58

Figure 31 : Représentation de protéines globulaires (avec des zones hydrophobes représentées par des points rouges) qui se déplacent jusqu'à l'interface (A), s'adsorbent (B) et forment un film interfacial viscoélastique (C) (Lam and Nickerson, 2013)..... 60

Figure 32 : Importance de la quantité de protéines (matériel émulsifiant) pour stabiliser la surface interfaciale créée au moment de l'émulsification : (A) Illustration et exemple d'émulsions (H/E) faites avec des petites protéines flexibles (à partir de Raikos, 2010; Ye, 2008) ; (B) Exemple d'émulsions (H/E) faites avec des agrégats de protéines sériques plus gros et moins flexibles (à partir de Destribats et al., 2014)..... 62

Figure 33 : Représentation de la réorganisation des protéines à l'interface liquide/liquide : (A) Protéines globulaires non flexibles, ou flexibles avec ou sans ancrage dans la phase dispersée (à partir de Bos and Van Vliet, 2001; Cayot and Lorient, 1998 *d'après* Dickinson, 1992; Shizimu, 1994) ; (B) Particules molles de type agrégats protéines ou micelles de caséines (à partir de Deshmukh et al., 2015) 62

Figure 34 : Impact de la taille, de la flexibilité et de la concentration des protéines sur la structure d'émulsions H/E (comparaison entre des micelles de caséines plus rigides et plus grosses et des caséinates de sodium flexibles et plus petites) (à partir de Ye, 2011)..... 63

Figure 35 : Compétition de protéines laitières « pures », petites et flexibles pour s'adsorber à l'interface d'émulsions H/E en fonction de la concentration en protéines et du mélange de protéines (à partir de Ye, 2008) 63

Figure 36 : (A) Proportions des protéines laitières du lait écrémé adsorbées à l'interface d'une émulsion H/E (à partir de Sharma et al., 1996) et (B) composition de l'interface H/E stabilisée par différentes concentrations de mélanges de caséines et protéines sériques (natives ou agrégées) (à partir de Chevallier et al., 2016)..... 64

Figure 37 : Stabilisation des émulsions par répulsions électrostatiques (A) ou par encombrement stérique (B) (zones hydrophobes représentées en rouge) (Lam and Nickerson, 2013)..... 64

Figure 38 : Exemples de facteurs impactant la stabilité des émulsions : (A) Etude de l'impact combiné du pH et de la force ionique sur la structure et l'interface d'émulsions H/E stabilisées par des agrégats de protéines sériques (à partir de Destribats et al., 2014); (B) Représentation schématique de l'impact du traitement thermique sur la stabilité d'émulsions H/E composées de protéines laitières à l'interface (Chevallier et al., 2016) 65

Figure 39 : Structure et diversité des triacylglycérides (TAG)..... 66

Figure 40 : Cristallisation des TAG : (A) Etapes de leur cristallisation depuis la formation d'un nucleus jusqu'à l'organisation en sphérulites (Tran and Rousseau, 2016) et (B) leurs différents niveaux d'organisation (stabilité de $\alpha < \beta' < \beta$) (Lopez et al., 2000)..... 66

Figure 41 : Lien entre l'énergie à apporter et la cristallisation des TAG : (A) Barrière énergétique (en partie responsable de la surfusion) à passer pour permettre la nucléation (à partir de McClements, 2012) et (B) phénomène de cristallisation (nucléation ou croissance) favorisé selon la vitesse de refroidissement (exemple avec la MGLA) (à partir de McClements, 2012; Rye et al., 2005) 67

Figure 42 : (A) Fusion (DSC) de la MGLA, de sa fraction à haut point de fusion (stéarine) et de sa fraction à bas point de fusion (oléine) ; (B) Aspect des cristaux formés par la MGLA, la stéarine et l'oléine après un refroidissement à 1 °C.min^{-1} (Lopez and Ollivon, 2009)..... 68

Figure 43 : Lien entre la réduction de la taille des globules gras et la probabilité de trouver des impuretés favorisant la nucléation dans les globules gras (McClements, 2012)..... 68

Figure 44 : (A) Suivi de la cristallisation et de la fusion de la MGLA pure (anhydrous milk fat) et en émulsion (cream) par DSC (à partir de Lopez et al., 2006) et (B) lien entre la température de fusion et la fonte des polymorphismes obtenue en DRX (à partir de Lopez et al., 2000)..... 69

Figure 45 : Représentation schématique des différents mécanismes possibles de déstabilisation d'une émulsion H/E (Fredrick et al., 2010) 70

Figure 46 : Impact de la composition des globules gras en matière grasse et de la composition de l'interface sur la stabilité (coalescence partielle) de mélanges huiles de coco et de palme d'une émulsion H/E (à partir de Fredrick et al., 2010)..... 71

Figure 47 : Impact de la taille des globules gras sur (A) la morphologie de globules gras cristallisés de stéarine (laitière) (à partir de Truong et al., 2015) et (B) sur les propriétés rhéologiques (à partir de Kim and Mason, 2017) 71

Figure 48 : (A) Impact de la vitesse de refroidissement sur la cristallisation de globules gras stabilisés par de la membrane native (lait natif) (à partir de Lopez, 2011) et (B) comparaison avec la classification des globules gras (du lait) en fonction de leur cristallisation proposée par Walstra en 1967 (à partir de Fredrick et al., 2010) ... 72

Figure 49 : Impact du tempérage (maintien d'une température ou cycles de variation de la température) sur (A) la cristallisation des globules gras (à partir de Fredrick et al., 2010; Moens et al., 2016) et (B) sur la stabilité des émulsions H/E (coalescence partielle) (à partir de Vanapalli et al., 2002) 73

Figure 50 : Corrélation du terme crémeux (creaminess) avec d'autres attributs sensoriels de texture caractérisant des produits de type cream cheese (Janhoj et al., 2009) 75

Figure 51 : Différentes étapes du processus oral (langue en ■) d'un produit de type yaourt (■) et lien avec les attributs sensoriels (à partir de Liu et al., 2015; Sonne et al., 2014) et les mesures instrumentales (à partir de Huc et al., 2016; Mortazavian et al., 2009). 76

Figure 52 : Relation entre les propriétés rhéologiques et la fraction volumique d'éléments dispersés déformables (microgels ou globules gras) (à partir de Shewan and Stokes, 2014) (en haut)..... 77

Figure 53 : Caractéristiques qui peuvent être modifiées pour moduler les propriétés macroscopiques des dispersions concentrées de microgels (Shewan and Stokes, 2013) 78

Figure 54 : Impact de la forme des particules (microgels) sur les propriétés rhéologiques d'une dispersion (Barnes, 2000) 78

Figure 55 : Interactions entre la phase dispersée et la phase continue au sein d'une émulsion gélifiée : (A) Interactions en fonction de la compatibilité entre la taille des globules gras et celle du réseau protéique (Michalski et al., 2002) ; (B) Illustration des différents types d'interactions possibles (Houzé et al., 2005) 79

Figure 56 : Projections 2D de différents agrégats constitués de 4096 particules et ayant différentes dimensions fractales (obtenues par simulation informatique) (Thouy and Jullien, 1996)..... 79

Figure 57 : Différentes fractions volumiques de remplissage maximum (ou fraction volumique d'encombrement) pour des sphères dures et non chargées, et pour des gouttelettes déformables et stabilisées par une interface chargée (à partir de Kim and Mason, 2017) (en bas) 80

Figure 58 : Microstructures de yaourts brassés avec ou sans matière grasse observées en microscopie confocale à balayage laser (à partir de Huc et al., 2016) 80

Figure 59 : Schématisation de la structure d'un yaourt brassé riche en matière grasse aux différentes échelles 87

Figure 60 : Synthèse des leviers identifiés pour moduler les microgels et leur structure et des hypothèses formulées pour augmenter la consistance (en bleu) ou augmenter la perception du gras en bouche (en rouge) des yaourts brassés riches en matière grasse..... 88

Figure 61 : Articulation du travail de thèse autour de plusieurs blocs expérimentaux et lien avec les chapitres du manuscrit et les différents articles 90

Figure 62 : Evolution de la température et des différentes étapes au cours du protocole de mesure des propriétés rhéologiques des émulsions en écoulement (η_8 et η_{25}) 98

Figure 63 : Echantillons fabriqués à l'échelle pilote afin de mesurer l'impact d'une réduction de la teneur en matière grasse sur une référence pilote de yaourt brassé à 10% de matière grasse..... 105

Figure 64 : Evolution de la note hédonique en fonction de la teneur en matière grasse de yaourt brassé de référence pour évaluer la préférence par les trois différents groupes (α, β, γ) de consommatrices (135 sur 150 retenues) identifiés..... 107

Figure 65 : Images confocales des échantillons aux bornes (teneurs en matière grasse maximale de 10% et minimale de 6%) observées avec des objectifs ×10 et ×40) ; Les globules gras apparaissent en rouge, les protéines en vert, les zones où la matière grasse et les protéines sont co-localisées apparaissent en jaune-orange et les zones contenant du sérum apparaissent en noir 108

Figure 66 : Evolution des mesures instrumentales de (A) texture (plateau), (B) rhéologie (G'_0, G'_f, η_0, η_f) et (C) tribologie (μ) en fonction de la teneur en matière grasse ; Les R^2 indiqués en B sont ceux obtenus par régressions linéaires (droites continues pour G' et droites pointillées pour η) 110

Figure 67 : Cercle des corrélations des propriétés instrumentales (à gauche) avec les attributs sensoriels projetés en tant que variables supplémentaires, et cartographie des échantillons correspondante (à droite) 111

Figure 68 : Distributions de taille obtenues des crèmes *à façon* fabriquées par émulsification laboratoire (A) à partir de protéines sériques natives (WPn) et des différentes fractions de matière grasse laitière (MGLA, oléine, stéarine) ou (B) à partir de MGLA et de protéines sériques natives ou agrégées (WPn, WPd) 122

Figure 69 : Cercle des corrélations des propriétés des protéines (à gauche) et cartographie des différents prélèvements de protéines sériques natives (WPn, ■) et agrégées (WPd, ■) au cours du procédé d'émulsification laboratoire (à droite) 124

Figure 70 : Procédé laboratoire de fabrication de yaourt brassé modèle avec ou sans émulsification *à façon* 125

Figure 71 : Différentes formules de yaourt brassé pilote fabriquées afin de mesurer l'impact du ratio cas/WP, en fonction de l'état physico-chimique des protéines sériques, sur les microgels et les propriétés macroscopiques des yaourts brassés 142

Figure 72 : Images confocales des yaourts brassés pilotes (objectif × 40) avec un agrandissement sur une zone (encadré blanc) pour chacune ; Les globules gras apparaissent en rouge, les protéines en vert, les zones où la matière grasse et les protéines sont co-localisées en jaune-orange et les zones contenant du sérum en noir ; Les dimensions fractales des microgels de chacune des formules de yaourt brassé pilote sont indiquées dans l'encadré en-dessous (les valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$) sont indiquées avec des lettres différentes) 143

Figure 73 : Visualisation par reconstructions 3D, distributions de taille et différents diamètres des microgels des yaourts brassés pilotes 144

Figure 74 : Propriétés rhéologiques des yaourts brassés pilotes (les valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$) sont indiquées avec des lettres différentes) 145

Figure 75 : Coefficients de friction des yaourts brassés pilotes mesurés par tribologie (les valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$) sont indiquées avec des lettres différentes) 145

Figure 76 : Cercle des corrélations des propriétés microscopiques et macroscopiques (en haut à gauche), cartographie des yaourts brassés pilotes correspondants (en haut à droite) et matrice de Pearson avec les coefficients de corrélation entre les différentes propriétés mesurées (en bas) ; Les valeurs en **gras** indiquent que les propriétés sont significativement corrélées / anti-corrélées ($p < 0,10$) 146

Figure 77 : Fabrication de yaourts brassés modèles avec différentes interfaces obtenues via la formulation de crèmes *à façon* à partir de MGLA et de WPn ou de WPd 151

Figure 78 : Propriétés rhéologiques des yaourts brassés modèles avec des protéines sériques natives (WPn) ou agrégées thermiquement (WPd) à l'interface (les valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$) sont indiquées avec des lettres différentes) 151

Figure 79 : Fabrication de yaourts brassés modèles avec différents moments d'incorporation de la crème (100% avant *ou* 50% avant + 50% après) pour mettre en évidence l'impact du degré d'interaction entre l'interface et le réseau protéique (protocoles détaillés en Chapitre 3, p. 95 et 96) 152

Figure 80 : Propriétés rhéologiques des yaourts brassés modèles avec un fort (100% avant) ou un plus faible (50% avant + 50% après) degré d'interaction entre l'interface et le réseau protéique (les valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$) sont indiquées avec des lettres différentes) 152

Figure 81 : Thermogrammes des fractions de matière grasse pures obtenus par le suivi de l'enthalpie (H, W.g-1) lors d'une augmentation de la température (après une cristallisation par refroidissement rapide jusqu'à 8°C d'après le protocole présenté en Chapitre 3, p. 97)..... 171

Figure 82 : Taux de solide à 8 °C (calculés) de la stéarine, la MGLA et l'oléine stabilisées par des protéines sériques natives (WPn) ou agrégées thermiquement (WPd) calculés (les valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$) sont indiquées avec des lettres différentes) 173

Figure 83 : Taux de solide à 8 °C des émulsions de stéarine, de MGLA et d'oléine stabilisées par des protéines sériques agrégées thermiquement et cristallisées par un refroidissement lent (1 °C/min) ou rapide (30 °C/min) jusqu'à 8°C (les valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$) sont indiquées avec des lettres différentes) 174

Figure 84 : Observation de l'évolution des cristaux de MGLA et de stéarine pures refroidies lentement (1 °C.min^{-1}) ou rapidement (10 °C.min^{-1}) de 40 à 8 °C par microscopie optique en lumière polarisée (barres d'échelle = 50 µm) 175

Figure 85 : (A) Evolution de la viscosité (η) à 8 °C (5 s^{-1}) ou après chauffage à 25 °C (rouge) d'une émulsion de stéarine en fonction de la fraction volumique de stéarine (ϕ) et (B) aspect de l'émulsion à l'issue des mesures de viscosité en fonction de la fraction volumique de stéarine (*en-dessous*) 177

Figure 86 : (A) Evolution de la viscosité (η) à 8 °C (5 s^{-1}) ou après chauffage à 25 °C (rouge) d'une émulsion d'oléine en fonction de la fraction volumique d'oléine (ϕ) et (B) aspect de l'émulsion à l'issue des mesures de viscosité en fonction de la fraction volumique d'oléine (*en-dessous*) 178

Figure 87 : Comparaison des comportements rhéologiques des émulsions d'oléine (losanges bleus) et de stéarine (ronds jaunes) au travers de l'évolution de leurs viscosités (η) à 8 °C (5 s^{-1}) en fonction de la fraction volumique..... 179

Figure 88 : Evolution de la viscosité (η) à 8 °C (5 s^{-1}) d'émulsions de stéarine stabilisées par des protéines sériques natives (WP natives) (orange) ou agrégées (WP dénaturées) thermiquement (jaune) en fonction de la fraction volumique (ϕ)..... 180

Figure 89 : Interprétation des comportements rhéologiques en fonction du taux de solide (dépendant de la fraction de matière grasse laitière) et de la capacité de l'interface à faire de l'ancrage et à interagir (dépendante de la nature de l'interface)..... 181

Figure 90 : Principaux impacts de l'interface sur la structure des yaourts brassés (modèles)..... 201

Figure 91 : Principaux impacts du type de matière grasse sur les propriétés macroscopiques des yaourts brassés modèles (laboratoire), en fonction de leurs propriétés thermiques..... 201

Figure 92 : Modulation de la structure par les différents leviers identifiés pour créer des propriétés macroscopiques innovantes..... 206

Figure 93 : Caractérisation de la structure aux différentes échelles pour mieux comprendre les mécanismes de structuration de la matrice et leur impact sur la texture à l'échelle macroscopique 209

****

Fig. 1: The typical unit operations of stirred fermented milk production are listed in the middle column, from ingredients at the top to the conditioning at the bottom. The physico-chemical conditions applied throughout the process are listed on the left hand column. The matrix microstructure and its changes during the process

are schematized in the right hand column. Adapted from FAO (2013); Lee and Lucey (2010); Mokoonlall et al. (2016); Sodini et al. (2004) 114

Fig. 2: Impact of sonication (S) on the size distribution of the fat droplets in the cream (dotted line) measured in the mix (S-Mix, dashed line). Comparison between the fat droplet size distributions in the lab-scale milk gel (LabREF(10)_SDS, solid line) and in the pilot reference (PilotREF(10)_SDS, pale grey solid line) 117

Fig. 3: **(A)** Acidification kinetics (GDL) of the lab-scale set milk gel and the fermentation kinetic of the pilot-scale set milk gel with a target pH of 4.5 (horizontal line). **(B)** Changes in the elasticity index over time (gelling). **(C)** Changes in the elasticity index during acidification. The increase in the concentration of GDL is shown by the change in the color of the curves from dark to pale grey. The variability of the acidification kinetics was ± 1.0% 118

Fig. 4**:** Effect of pore sizes of filters and ultra-smoothing (**A**, **B**) and of the pump flow rates (**C**, **D**). Size distribution of microgels with corresponding d(0.9) and span below (**A**, **C**) and average value of the normal force at the plateau measured by back-extrusion (F_P force, N) after 7 days of storage of stirred acid milk gels (**B**, **D**)..... 119

Fig. 5: Correlation loading plot of the rheological (G'0, G'f, η0, ηf) and structural indicators (median diameter of the microgel "d(0.5) µgel") (**A**) and corresponding score plot of the lab and pilot stirred milk gels with 10 and 6 wt% fat contents and two different batches labeled with the letters A and B (**B**). 121

Fig. 6: Processing steps used to reconstitute the 3D microgels of stirred yogurt: 1) z-acquisition of 2D confocal images (x, y) (proteins in green); 2) 3D reconstruction and application of a median filter (a → b); 3) 3D identification of the microgels 133

Fig. 7: Size distributions obtained using laser diffraction (dotted lines), 2D dynamic image analysis (dashed lines) and 3D reconstruction (solid line). The tables give the diameters and descriptive parameters corresponding to the different size distributions. The table on the left shows data for the FP3 microgels (A) and the table on the right shows data for the P4.5 microgels (B). Values with different letters in the same row differ significantly at $p < 0.05$ 135

Fig. 8: Details of microgel lengths (major, Fmax, minor, Fmin) (A) studied for FP3 (B) and P4.5 (C) stirred yogurts through: (a) the length distributions (average curves) obtained from 2D image analysis (dashed lines) and 3D reconstruction (solid lines), (b) the 3D reconstructions and (c) a screenshot of the movie processed throughout 2D image analysis 136

Fig. 9: Weighted average curves (three repetitions) of the roughness index distributions obtained from 2D image analysis (dashed lines) and 3D reconstruction (solid lines) for FP3 (A) and P4.5 (B) stirred yogurts 137

Fig. 10: Graph of principle used to obtain the fractal dimension from the laser diffraction data (A) and the 3D reconstruction data (B) where q (m^{-1}) is the scattering vector, $I(q)$ is the light scattered intensity, V_{ag} (m^3) is the volume and S_{ag} (m^2) the surface envelope of each aggregate 140

Fig. 11: Protein size distributions measured by DLS for permeate, native WPI in purified water (NAT-H_2O) and native WPI in permeate (NAT). Average values from three repetitions, with a maximum standard deviation of ± 1 nm for small proteins (NAT-H_2O) and of ± 10 nm for big proteins (Permeate, NAT) 156

Fig. 12: Effects of solvent and thermo-mechanical treatments on the physico-chemical characteristics of WPI proteins: (**A**) Size order of magnitude through absorbance at 600 nm (turbidity), (**B**) Surface hydrophobicity index, (**C**) ζ-potential, (**D**) Total free thiols. Pale gray bars (■) represent samples in H_2O and dark gray bars (■) samples in permeate. Values with different letters are significantly ($p < 0.05$) different..... 159

Fig. 13: (**A**) Principal component map of H_2O (♦) and permeate (♦) samples. Different groups of samples are symbolized by grey circles; (**B**) Correlation circle of physico-chemical properties with schematic representations of aggregated protein, an individual protein macromolecule and the symbols used below to represent free thiol groups (SH), surface hydrophobicity (●) and protein charge (⊝). These schemas will be used with the other results to represent the interfacial mechanisms 160

Fig. 14 : Evaluation of the effects of solvent (H_2O, permeate) and heat treatment (HT) on the interfacial properties; (**A**) Changes in the surface pressure (V = 18 µl, 25°C) for olein in whey protein solutions (dilution 1:1000). Average values from three repetitions, with a maximum reproducibility value of 0.613 $mN.m^{-1}$ for all the solutions tested. Two characteristic times were determined: 1) T1, corresponding to the true lag time (when the value of the surface tension varied by more than 5% from its starting value); 2) T2, corresponding to the crossing of the x-axis by the tangent to the surface pressure first acceleration; (**B**) Changes in the storage modulus with surface pressure during oscillatory measurements of whey protein at the olein interface. Average values from three repetitions, with a reproducibility ranging from 0.001 to 2.18 $mN.m^{-1}$ for all the solutions tested 161

Fig. 15 : Evaluation of the effects of mechanical (RSS) and pressure treatments (PT) on the interfacial properties; (**A**) Changes in the surface pressure (V = 18 µl, 25°C) for olein in whey protein solutions (dilution 1:1000). Average values from three repetitions, with a maximum reproducibility value of 0.613 $mN.m^{-1}$ for all the solutions tested. Two characteristic times were determined: 1) T1, corresponding to the true lag time (when the value of the surface tension varied by more than 5% from its starting value); 2) T2, corresponding to the crossing of the x-axis by the tangent to the surface pressure first acceleration; (**B**) Changes in the storage modulus with surface pressure during oscillatory measurements of whey protein at the olein interface. Average values from three repetitions, with a reproducibility ranging from 0.001 to 2.18 $mN.m^{-1}$ for all the solutions tested 162

Fig. 16: Optical micrographs of emulsions stabilized with WPI samples. Magnification x 50 [RSS emulsification: *rotor/stator (15,000 rpm ; 5 min) and sonication (130 W ; 15 effective min ; pulses of 10 s intervals)*] 163

Fig. 17: Schematic representation of emulsions at different spatial scales and under different solvent and process conditions. Aggregated proteins scales (100 nm, 500 nm, 1 µm) are different from those of other proteins (10 nm, 50 nm, 1 µm). The WPI is shown with their differing properties of total free SH (SH), surface hydrophobicity (●), charge (⊖) and size. The individual and aggregated protein hydrodynamic volume is indicated by the dotted circles (- - -). Protein aggregates are represented with their hydrophobic core in yellow. The disulfide bridges are represented by a blue line (—)..... 165

Fig. 18: Cooling and heating kinetics used to study the crystallization (grey lines) and fusion (black lines) properties of milk fats with cooling either to -55 °C (solid line) or to 8 and then to -10 °C (dotted line)..... 188

Fig. 19: (A) Average enthalpy profiles during the melting (heating at 2 °C.min-1) of creams (60 wt% fat) cooled at 8 °C (-10 °C), with stearin (ST), AMF or olein (OL) and stabilized either with native WPI (dashed line) or with heat-aggregated (HT) ones (solid line). The range of temperature mimicking oral processing (between 25 and 8 °C) is indicated with a pale grey rectangle. (B) Solid fat content (8 °C) of fat emulsified either with native (pale grey) or with heat-aggregated WPI (dark grey) 191

Fig. 20: Images of the different types of stirred milk gels obtained by CLSM. Magnification ×40. Scale bar = 50 µm. Fat droplets are shown in red, the global protein network in green, areas where proteins and fat are co-located are yellowish-orange (arrow 1) and areas containing only serum are black. There are highly aggregated fat droplets in the serum (arrow 2) and embedded in the protein matrix (arrow 3) 194

Fig. 21: Mathematical morphology analysis of the protein organization at microscopic scale. (A) PC1-PC2 mapping of stirred milk gels obtained from the PCA and the confocal images, with the ellipse (black line) outlining the area where the stirred milk gels studied in this work are located on the map. (B) Samples a to e illustrate the axes. (C) Loadings of PC1 and PC2 versus micrometers of the size of the structuring element transformation (more details on erosions, dilatations and mathematical morphology are given in subsection 2.5 195

Fig. 22: (A) D1 scores (coarseness of the protein network) and (B) D2 scores (size of the pores) from the mathematical morphology analysis of the stirred milk gel confocal images 196

Fig. 23: (A) Correlation loading plot of the functional properties (G'0, RG', µ (25°C)), microstructure indicators (median diameter of the microgels d(0.5) µgels, pore size D2) and solid fat content at 8 °C (SFC (8°C)) and (B) score plot of the different types of stirred milk gels produced 197

Fig. 24: Diagram showing the relationship between the formulation, structure and texture of 6% fat stirred milk gels (the effect of fat increase being better known). Different creams tailored in terms of fat fraction (AMF, olein or stearin) and interfacial proteins (native or heat-aggregated WPI) led to different thermal properties (SFC) and different stirred milk gel structures (pore size, microgel size, protein network coarseness, interactions of the fat droplets between themselves or with the protein network). All these differences resulted in different textural and lubrication properties (G'0, RG' and μ) of the stirred milk gels measured in conditions that accounted for oral processing 200

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques détaillées des principales protéines du lait natif ; Les températures de dénaturation, les solubilités et les charges des protéines sont données pour un pH de 6,6 (pH du lait natif) (Cayot and Lorient, 1998; Croguennec et al., 2008) 38

Tableau 2 : Composition moyenne de la matière grasse laitière et composition des principaux acides gras constitutifs des TAG (Croguennec et al., 2008; Jensen, 2002) 39

Tableau 3 : Informations détaillées sur les technologies d'homogénéisation typiquement étudiées pour une application à des émulsions 46

Tableau 4 : Principaux types d'interactions possibles entre les protéines (à partir de Abd El-Salam, El-Shibiny, & Salem, 2009; Cayot & Lorient, 1998; Donato & Guyomarc'h, 2009) 55

Tableau 5 : Bilan sur la gélification des protéines laitières 59

Tableau 6 : Synthèse des facteurs pouvant avoir un effet sur les différentes étapes d'installation et de stabilisation de l'interface H/E par des protéines (Bos and Van Vliet, 2001; Cayot and Lorient, 1998; Lam and Nickerson, 2013) 61

Tableau 7 : Utilisation des propriétés instrumentales pour comprendre le rôle de la matière grasse et son évolution dans des conditions pertinentes par rapport au processus oral (Chojnicka-Paszun et al., 2012; Ciron et al., 2011; Liu et al., 2015; J A Lucey et al., 1998; Sala et al., 2008; Sonne et al., 2014) 76

Tableau 8 : Leviers utilisés dans la littérature pour moduler les propriétés de structure des globules gras et impact sur les propriétés macroscopiques ; (C) Composition ; (P) Procédé ; (F) Formulation – *du nanomètre à quelques micromètres* 81

Tableau 9 : Leviers utilisés dans la littérature pour moduler les interactions entre les ingrédients à l'échelle de l'émulsion gélifiée et impact sur les propriétés macroscopiques ; (C) Composition ; (P) Procédé ; (F) Formulation – *de 1 à 10 µm* 82

Tableau 10 : Leviers utilisés dans la littérature pour modifier les propriétés des microgels et impact sur les propriétés macroscopiques ; (C) Composition ; (P) Procédé ; (F) Formulation – *de 10 à quelques centaines de micromètres (≈ 250 µm)* 83

Tableau 11 : Synthèse des variables sélectionnées pour tester les hypothèses sur chacun des leviers identifiés et compenser les propriétés dégradées lors de la réduction de la teneur en matière grasse dans des yaourts brassés riches en matière grasse 89

Tableau 12 : Propriétés physico-chimiques des fractions MGLA, oléine et stéarine 93

Tableau 13 : Informations essentielles sur les ingrédients minoritaires utilisés au cours des différentes expérimentations 94

Tableau 14 : Détails sur les différentes cinétiques de refroidissement appliquées pour cristalliser la matière grasse analysée pure ou en émulsion 97

Tableau 15 : Synthèse de l'ensemble des méthodes de caractérisation en fonction de l'échelle d'étude du système 100

Tableau 16 : Ensemble des mesures effectuées pour caractériser les cinq échantillons, évaluer l'impact d'une réduction de la teneur en matière grasse sur les propriétés sensorielles et instrumentales du yaourt brassé riche en matière grasse et juger de la pertinence des propriétés instrumentales choisies par rapport aux propriétés sensorielles (détails en Chapitre 3, p. 87) 105

Tableau 17 : Définition des attributs de texture (significatifs pour la caractérisation des 5 échantillons) utilisés par les panélistes pour caractériser les échantillons 106

Tableau 18 : Matrice de Pearson avec les coefficients de corrélation entre les différents attributs sensoriels de texture et lors de la réduction de la teneur en matière grasse ; Les valeurs en **gras** indiquent que les attributs sont significativement corrélés / anti-corrélés ($p < 0,05$) 107

Tableau 19 : Matrice de Pearson avec les coefficients de corrélation entre les mesures instrumentales de texture (force au plateau *(ou consistance)* en N, pente *(ou résistance)*), de rhéologie (G'_0 et G'_f en Pa, η_0 et η_f en Pa.s) et de tribologie (µ mesuré à 10 $mm.s^{-1}$) ; Les valeurs en **gras** indiquent que les propriétés sont significativement corrélées / anti-corrélées ($p < 0,02$) 109

Tableau 20 : Ensemble propriétés physico-chimiques mesurées pour caractériser les protéines sériques en solution au cours de l'émulsification laboratoire (protocoles sont détaillés en Chapitre 3, p. 87)..... 123

Tableau 21 : Propriétés physico-chimiques des solutions de protéines sériques fabriquées à l'échelle pilote sans traitement (WPn) ou avec un traitement thermique suivi d'un traitement haute pression dynamique (WP(T+HP)) 141

Tableau 22 : Ensemble des mesures effectuées pour caractériser les microgels et les yaourts brassés pilotes obtenus en faisant varier le ratio cas/WP et l'état physico-chimique des protéines sériques (détails en Chapitre 3, p. 87) 142

Tableau 23 : Températures de début (Tonset), de pic (Tpeak) et de fin (Tendset) de fusion de la MGLA, de l'oléine et de la stéarine pure ou en émulsion au cours de leur fusion (après une cristallisation par refroidissement rapide jusqu'à -55°C d'après le protocole présenté en Chapitre 3, p. 93) ; Dans une même colonne, les valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$) sont indiquées avec des lettres différentes..... 172

Tableau 24 : Températures de début (T*onset*), de pic (T*peak*) et de fin (T*endset*) de fusion de la MGLA, de l'oléine et de la stéarine en émulsion au cours de leur fusion après une cristallisation par refroidissement rapide ou lent jusqu'à -55 °C ; Dans une même colonne, les valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$) sont indiquées avec des lettres différentes 173

****

Table 1: Summary of the parameters tested and corresponding sample names. The protein content of all the samples was 3.1 *wt%* and pasteurization was performed at 80 °C for 30 min. The amounts of fat, rice starch and GDL are given in *wt%*, the pumping rate in $mL.min^{-1}$, the filter pore size *mm* and ultra-smoothing in *rpm* 115

Table 2: Rheological (G'_0, G'_f, η_0, η_f) and structural indicators (median diameter d(0.5) of the microgels) of lab-scale stirred milk gel and the pilot reference with 10 and 6 wt% fat contents. The impact of fat reduction corresponds to the rate of variation (%) between 10 wt% and 6 wt% of fat in the lab or pilot products. Values with different letters in the same row differ significantly ($p < 0.05$). Values with a different number of asterisk(s) (*) in the same row differ significantly ($p < 0.05$) 120

Table 3: Average fractal dimensions obtained from laser diffraction, 2D image analysis and 3D reconstruction. Values with different letters in the same column differ significantly at $p < 0.05$ 137

Table 4: Comparison of laser diffraction, 2D image analysis and 3D reconstruction. Information **in bold** indicates the advantages of each technique..... 139

Table 5: Composition, treatment and naming of the samples..... 155

Table 6: Structure and properties of emulsions made from 30 wt% olein and the different WPI solutions with RSS emulsification (*rotor/stator (15,000 rpm; 5 min) and sonication (130 W; 15 effective min; pulses of 10 s intervals)*. The values in the same row, having different letters, differ significantly ($p < 0.05$) 164

Table 7: Composition of the fats used determined by GC-MS with the average values ± standard deviation of 3 repetitions 187

Table 8: Composition, treatment and labeling of the creams and stirred milk gels 187

Table 9: Median diameters (d(0.5)) and span of the size distributions of fat droplets in the creams (30 wt% fat) (measured in Milli-Q water). Values with different letters in one column are significantly different at $p \leq 0.05$ 190

Table 10: Textural properties through (i) the storage moduli and the apparent viscosities at the beginning (G'_0, η_0) and at the end (G'_f, η_f) of rheological oral processing, and (ii) the changes they underwent (RG', Rη) between the beginning and the end of rheological oral processing. The friction coefficient (μ) obtained by tribology at 25 °C. Values in the same column with different letters are significantly different at $p \leq 0.05$ 192

Table 11: Average diameters (d(0.5)) and span of the size distributions of the microgels of the stirred milk gels. Values with different letters in the same column are significantly different at $p \leq 0.05$ 193

Table 12: Pearson's correlation coefficients between the properties used in Fig. 23 (values in bold indicate significant correlations between properties at $p \leq 0.1$) 198

Introduction générale

Les produits laitiers frais fermentés et les yaourts brassés (non sucrés, non aromatisés)

En France, le secteur de l'ultrafrais représente 6% des ventes de produits de grande consommation tous secteurs confondus (LSA, 2017). L'appellation des différents produits laitiers frais est strictement réglementée. L'appellation « yaourt » est réservée aux produits laitiers composés exclusivement de matières premières d'origine laitière, et fermentés par les bactéries lactiques *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*, qui doivent se trouver vivantes dans le produit fini (Décret n°88-1203). En toute rigueur, on utilise le terme de « produit laitier frais fermenté » pour parler de l'ensemble des produits similaires aux yaourts, mais fabriqués avec d'autres ferments ou contenant des additifs tels que la gélatine ou l'amidon. Ces produits regroupent notamment les yaourts et les laits fermentés, les fromages frais et fromages blancs et les spécialités laitières. En 2017, près de 6,5 millions de tonnes de ces produits ont été fabriquées et près de 28 kg ont été consommés par habitant en France (Cniel, 2018). Lorsqu'ils sont fermentés en cuve puis brassés avant d'être mis en pots, on parle de « produits laitiers frais fermentés brassés ». **Par commodité, les « produits laitiers frais fermentés brassés » seront appelés « yaourts brassés » dans tout le reste de ce manuscrit.**

La diversité des textures en fonction de la composition des yaourts brassés

La concurrence est très forte sur le marché de l'ultrafrais, et plus particulièrement sur le marché des yaourts, avec la présence de grands groupes et de nouveaux acteurs toujours plus nombreux (Businesscoot, 2018). Depuis plusieurs décennies, les différents acteurs ont beaucoup innové pour diversifier les produits et proposer de nouvelles offres aux consommateurs. La texture constitue l'un des principaux leviers d'innovation et elle fait partie des arguments de vente clés mis en avant par les acteurs du marché. Les yaourts brassés sont des produits dont la texture peut être modulée de manière importante et les fabricants jouent à la fois sur le procédé et la composition (Figure 1) pour la modifier.

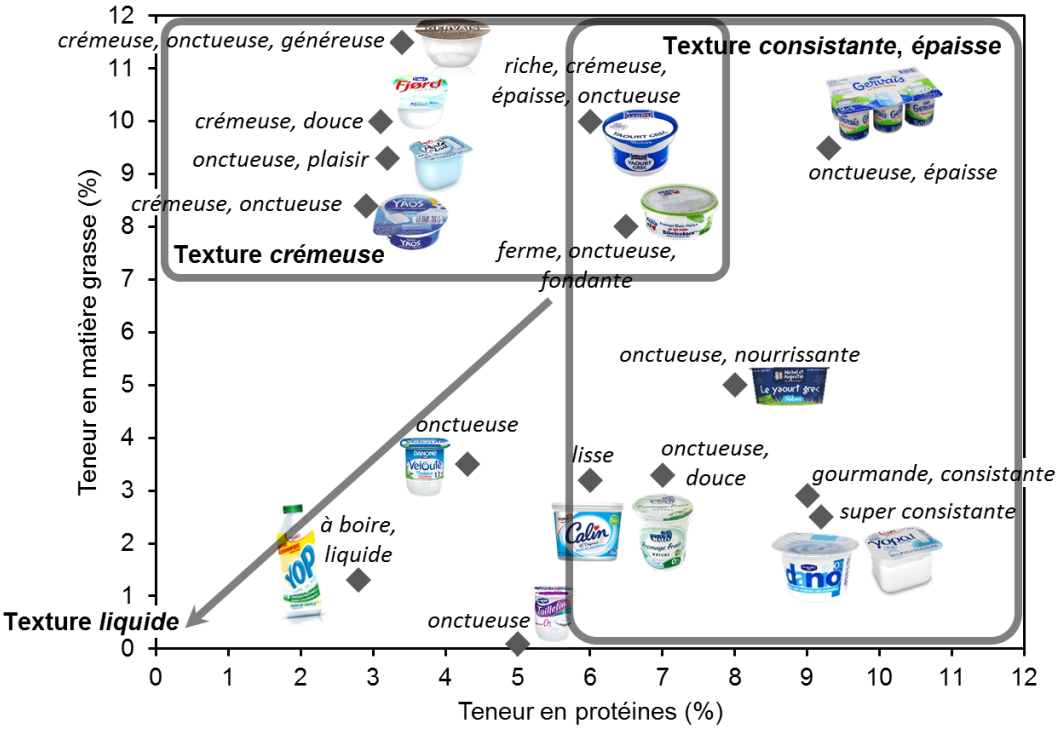


Figure 1 : Qualificatifs de texture de plusieurs yaourts brassés[1] utilisés comme arguments de vente en fonction de la composition en matière grasse et en protéines

[1] *Yaourts brassés nature au lait de vache et vendus sur le marché français.*

Si la texture des yaourts brassés est presque systématiquement définie comme *onctueuse* sur le marché, elle varie aussi très fortement en fonction de la composition de ces derniers. La texture des yaourts brassés ayant à la fois peu de matière grasse et peu de protéines ressort comme plus *liquide*. Celle des yaourts brassés ayant une teneur en protéines élevée est vendue comme *épaisse* ou *consistante*. La texture *crémeuse* est, quant à elle, utilisée pour qualifier les yaourts brassés avec une teneur en matière grasse élevée.

Vers une réduction de la teneur en matière grasse

La recommandation de consommer quotidiennement deux à trois produits laitiers fait partie des neuf repères du programme national nutrition santé (PNNS). Cette recommandation est basée sur la contribution des produits laitiers aux apports journaliers en minéraux (notamment le calcium), en protéines et en vitamines (notamment B12, B2, B3, A, B5 et D), tout en ayant un apport énergétique modéré. Cette recommandation est valable pour des produits laitiers dont la teneur en matière grasse n'est pas trop élevée. Il est donc intéressant, d'un point de vue nutritionnel, de chercher à réduire la teneur en matière grasse dans les produits laitiers riches en matière grasse (> 5%). C'est également intéressant d'un point de vue économique puisque le coût de la matière grasse a considérablement augmenté ces dernières années (Syndifrais, 2018). A titre d'exemple, en 2017, le prix moyen du beurre (matière grasse) dans le monde était de 4750 €/tonnes, contre 1810 €/tonne pour la poudre de lait écrémé (protéines) (d'après U.S.D.A[2], Cniel, 2018).

Une réduction de la teneur en matière grasse des yaourts brassés riches en matière grasse impacte leur perception sensorielle (Le Calvé et al., 2015; Sodini et al., 2004; Tomaschunas et al., 2012), et notamment celle de leur texture crémeuse. Elle peut dégrader l'appréciation des consommateurs pour ce genre de produit (Richardson-Harman et al., 2000), et la question du maintien du crémeux apparaît comme centrale lorsque l'on cherche à réduire leur teneur en matière grasse.

Le projet collaboratif SLIM et l'objectif général de la thèse

Le projet collaboratif SLIM, financé par un fond unique interministériel (FUI), a été mis en place dans le but d'optimiser les propriétés liées à la matière grasse et ainsi améliorer la balance entre nutrition/coût et plaisir/appréciation des yaourts brassés et des crèmes glacées, sans utiliser d'additifs. Son premier objectif était de proposer aux consommateurs des crèmes glacées et des yaourts brassés innovants, allégés en matière grasse, mais perçus de façon similaire à des produits à haute teneur en matière grasse, c'est-à-dire avec des caractéristiques organoleptiques gourmandes et une texture crémeuse. Le deuxième objectif du projet SLIM était d'aboutir à des solutions d'émulsification et de structuration de la matière grasse, ainsi qu'à des outils analytiques et sensoriels d'aide à la décision, permettant de développer ces produits allégés et gourmands. Ce projet était pluridisciplinaire et regroupait plusieurs partenaires :

- Yoplait (General Mills), un industriel leader sur le marché des produits laitiers frais et coordinateur du projet
- Häagen-Dazs (General Mills), un industriel leader sur le marché des crèmes glacées
- Emulsar, une PME ayant développé une technologie innovante d'émulsification membranaire
- CAD Instruments, une PME spécialisée dans la conception d'instruments d'analyse des structures et des textures
- L'UMR CBMN, spécialisée dans les systèmes colloïdaux à base de lipides pour la nutrition
- L'UMR GENIAL (cotutelle AgroParisTech-INRA), spécialisée en ingénierie des procédés et des aliments,

[2] *U.S.D.A : U.S. department of agriculture (département de l'agriculture des Etats-Unis)*

L'objectif général de la thèse a donc été d'optimiser la texture pour qu'elle s'éloigne le moins possible d'une référence de yaourt brassé riche en matière grasse (> 5%) lors de la réduction de sa teneur en matière grasse. Pour cela, nous avons travaillé sur la structuration de la matrice en utilisant des leviers de composition et de procédé, et ce, sans ajouter d'additif. Cette approche par la structure a été choisie pour permettre i) de comprendre les mécanismes mis en jeu et ii) de développer des outils de formulation et de caractérisation généralisables à d'autres yaourts brassés et produits laitiers.

Organisation du manuscrit et précisions concernant sa lecture

Le premier chapitre de ce manuscrit est consacré à l'état de l'art pour faire le point sur ce que la littérature nous apprend à propos des yaourts brassés riches en matière grasse, de leur structuration, de leurs propriétés et de leurs ingrédients.

Le deuxième chapitre présente la démarche et la stratégie expérimentale mises en place pour répondre aux objectifs de la thèse à partir de l'ensemble des connaissances acquises dans l'état de l'art.

Le troisième chapitre fait le récapitulatif du matériel et des méthodes utilisés, avec différents renvois vers les chapitres et articles dans lesquels les informations sont détaillées.

Le manuscrit se compose ensuite de cinq chapitres de résultats (4, 5, 6, 7 et 8). Le chapitre 4 présente les résultats de mise au point de l'expérimentation au travers de :

- L'évaluation de l'impact d'une réduction de la teneur en matière grasse sur les propriétés instrumentales et sensorielles du yaourt brassé riche en matière grasse.
- La comparaison des propriétés instrumentales et sensorielles pour sélectionner et valider les méthodes de caractérisation instrumentales.
- La mise au point d'un yaourt brassé modèle à l'échelle laboratoire.

Les chapitres 5, 6, 7 et 8 sont consacrés aux différents leviers testés pour optimiser la texture et structurer *à façon* les yaourts brassés riches en matière grasse. Les chapitres 4, 5, 6 et 8 sont principalement basés sur des articles (en anglais), avec certains compléments. Le chapitre 7 ne fait, quant à lui, pas l'objet d'un article. Chaque article est introduit par un court paragraphe en français. Chacun des chapitres de résultats se termine par un encadré reprenant ses conclusions importantes et ses messages clés (dont ceux des articles).

Le manuscrit se finit par un chapitre de conclusion générale sur l'ensemble des résultats et les perspectives qui en découlent.

Afin d'alléger le manuscrit, nous avons choisi de placer l'intégralité des références bibliographiques à la fin du manuscrit (y compris celles des différents articles).

Chapitre 1 : Etat de l'art

Les yaourts brassés riches en matière grasse sont des systèmes complexes, dans lesquels protéines et matière grasse laitières interagissent pour former une dispersion concentrée de microgels, où chaque microgel est une émulsion gélifiée. Ils sont particulièrement connus pour leur texture crémeuse (Cayot et al., 2008; Richardson-Harman et al., 2000; Richardson and Booth, 1993). Dans ces systèmes, la teneur en matière grasse impacte directement les propriétés de texture à la fois sensorielles et instrumentales (Ciron et al., 2011; Tomaschunas et al., 2012). Dans le cadre du projet, plusieurs questions se sont naturellement posées à propos des yaourts brassés riches en matière grasse :

- Comment les yaourts brassés se **structurent**-ils au cours de leur **procédé de fabrication** ?
- Quelles sont les **propriétés fonctionnelles** des **protéines et de la matière grasse laitières** mises en jeu dans la structuration d'un yaourt brassé ?
- Quelle **relation multi-échelle** existe-t-il entre la composition, la structure et les **propriétés macroscopiques** des yaourts brassés riches en matière grasse, en lien avec leur **texture crémeuse** ?

Cet état de l'art a pour objectif de voir les réponses que la littérature apporte à ces questions pour émettre des hypothèses de travail et bâtir une stratégie expérimentale adaptées aux différents objectifs.

1.1. Fabrication d'un yaourt brassé riche en matière grasse et processus physico-chimiques associés

L'objectif de cette partie est d'étudier comment le lait natif est transformé en yaourt brassé. Dans un premier temps, nous décrivons les principales caractéristiques physico-chimiques du lait natif. Nous faisons ensuite le point sur le procédé de fabrication du yaourt brassé, ses différentes opérations unitaires, leur diversité et les conditions physico-chimiques qu'elles imposent au produit. Enfin, nous présentons la structuration du yaourt brassé au fur et à mesure des opérations unitaires classiques de son procédé de fabrication.

1.1.1. Composition et structure du lait natif

Le lait natif de vache est une dispersion colloïdale composée de trois phases (Croguennec et al., 2008) :

- une émulsion de gouttelettes de matière grasse (globules gras)
- une suspension colloïdale de micelles caséines
- une phase continue aqueuse composée principalement de lactose, de minéraux et de protéines solubles

La composition en protéines et en matière grasse du lait peut varier en fonction de nombreux facteurs, qui sont notamment la race des vaches, leur état physiologique (gestation, stade de lactation) et leur alimentation (selon les saisons). La composition moyenne du lait est présentée en Figure 2. Le pH du lait natif se situe entre 6,5 et 6,7, sa masse volumique est de 1030 $kg.m^{-3}$ et sa pression osmotique d'environ 700.10^3 Pa. De plus, sa force ionique moyenne est de 0,08 M avec comme minéraux principaux : le potassium (K^+, 144 $mg.100\ g^{-1}$), le phosphate (PO_4^{3-}, 108 $mg.100\ g^{-1}$), le chlorure (Cl^-, 106 $mg.100\ g^{-1}$), le sodium (Na^+, 46 $mg.100\ g^{-1}$), le calcium (Ca^{2+}, 37 $mg.100\ g^{-1}$), le sulfate (SO_4^{2-}, 10 $mg.100\ g^{-1}$), le bicarbonate (HCO_3^-, 10 $mg.100\ g^{-1}$) et le magnésium (Mg^{2+}, 8 $mg.100\ g^{-1}$) (Cayot and Lorient, 1998; Croguennec et al., 2008; Walstra and Jenness, 1984).

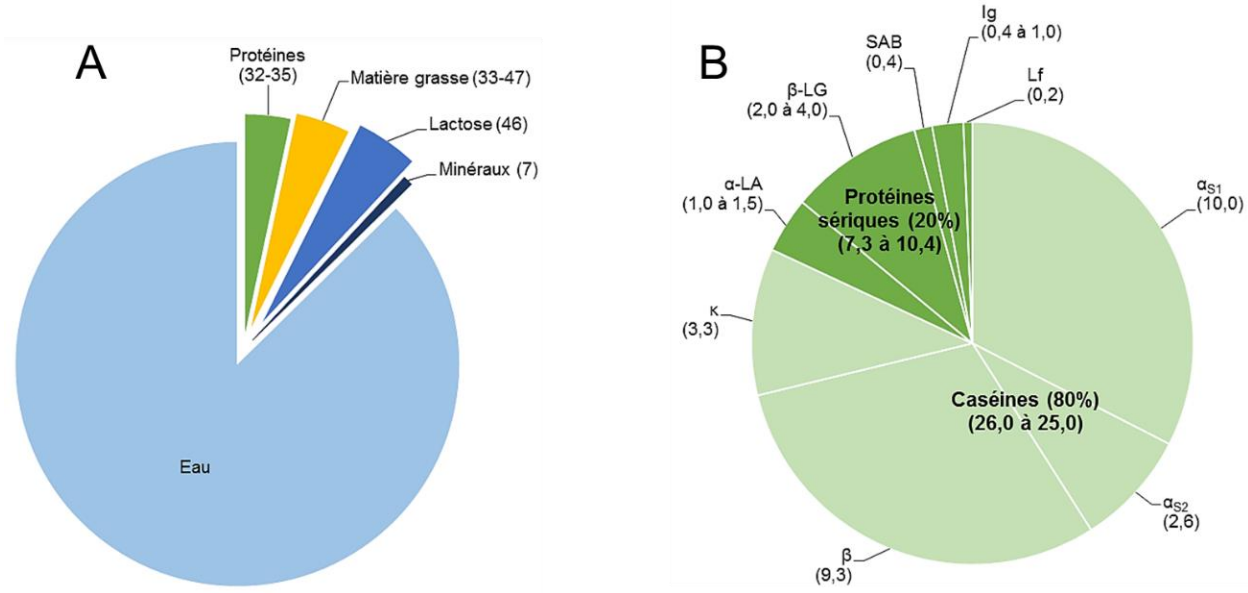


Figure 2 : Composition globale moyenne (A) et composition en protéines laitières (B) du lait natif ($g.L^{-1}$), avec les caséines α_{S1}, α_{S2}, β, et κ ainsi que les protéines sériques α-LA, β-LB, sérum albumine bovine, immunoglobuline et lactoferrine (à partir de Cayot and Lorient, 1998)

Composition et structure des protéines laitières

Il existe deux grandes catégories de protéines laitières, avec d'une part les micelles de caséines sphériques, non solubles et mesurant de 30 à 600 nm (180 nm en moyenne), et d'autre part les protéines sériques, qui sont solubles et mesurent moins de 5 nm (Figure 3) (Cayot and Lorient, 1998; Croguennec et al., 2008).

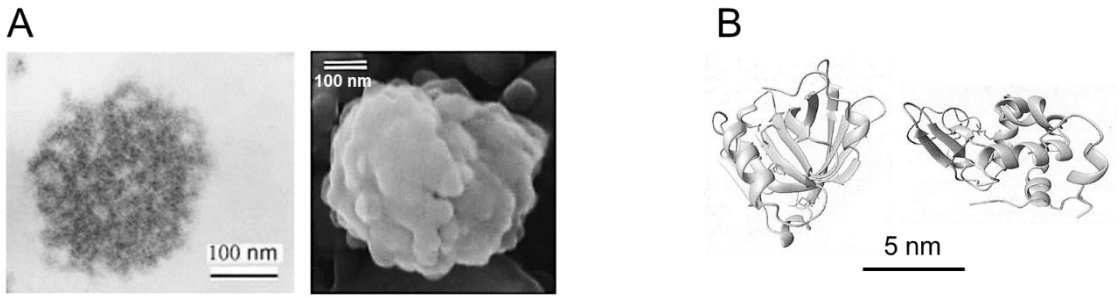


Figure 3 : (A) Structures des micelles de caséines du lait natif obtenues par microscopie électronique en transmission grandissement x85000 (à gauche) et par microscopie électronique à balayage grandissement x70000 (à droite) (McMahon and McManus, 1998); (B) Structures tertiaires des protéines sériques majeures β-LG (à gauche) et α-LA (à droite) issues de *Protein Data Bank* (Croguennec et al., 2008)

Les **micelles de caséines** sont des supramolécules formées par l'association de quatre types de caséines (α_{S1}, α_{S2}, β et κ), de quelques fragments peptidiques de la caséine β (caséines γ) et de minéraux (majoritairement le calcium et le phosphate) (Croguennec et al., 2008). S'il semble clair que les caséines à l'intérieur de la micelle sont reliées par du phosphate de calcium et que les κ-caséines sont présentes de façon prépondérante en surface, la structure exacte de la micelle de caséines ne fait pas encore l'unanimité. Plusieurs modèles ont été proposés dans la littérature (Figure 4) :

- *Le modèle submicellaire :* C'est le modèle le plus ancien et le plus cité, d'après lequel la micelle serait constituée d'un ensemble de submicelles de caséines (15 à 30 nm) associées entre elles par des ponts phosphocalciques (phosphate de calcium colloïdal). La teneur des submicelles en caséines β et κ serait variable au sein de la micelle et les submicelles les plus riches en caséines κ seraient préférentiellement localisées en périphérie. Ce modèle ne correspondrait *a posteriori* pas aux données expérimentales (Cayot and Lorient, 1998; Croguennec et al., 2008; De Kruif et al., 2012).
- *Le modèle des nanoclusters :* Ce modèle considère la micelle comme un réseau protéique formé de caséines et dans lequel les nanoclusters de phosphate de calcium colloïdaux (≈ 2 nm) sont dispersés. Les sites de phosphorylation des caséines se fixeraient à la surface des nanoclusters et les queues des caséines interagiraient ensuite entre elles par interactions faibles. Les caséines α_{S1} et α_{S2}, riches en sites de phosphorylation, participeraient fortement à la formation du réseau, les caséines β plus faiblement, et les caséines κ, dépourvues de site de phosphorylation, se localiseraient en surface des micelles. Cette auto-association serait limitée par les caséines κ qui permettraient ainsi la stabilisation des micelles natives. Ce modèle semble plus compatible avec les données expérimentales (Croguennec et al., 2008; De Kruif et al., 2012; Holt and Horne, 1996).
- *Le modèle réticulé :* Ce modèle est une variante du modèle des nanoclusters, qui provient de travaux expérimentaux plus récents sur la réticulation interne des micelles. Il présente le noyau de la micelle comme un réseau poreux fait de particules non sphériques primaires (caséines). Ces particules seraient réticulées par des nanoclusters de phosphate de calcium. Cette structure s'apparente plus à une organisation fractale (De Kruif et al., 2012; Huppertz et al., 2017).

En moyenne, les micelles se composent d'environ 20.000 caséines et 3000 nanoclusters de phosphate de calcium. Elles sont entre 10^{17} à 10^{19} par litre de lait et leur point isoélectrique est d'environ 4,6. Avec un potentiel de surface de -18 mV dans le lait natif, les micelles sont en équilibre colloïdal par répulsions électrostatiques, avec une distance libre d'environ 240 nm entre elles (Croguennec et al., 2008; McMahon and Brown, 1984).

Les micelles de caséines ont une structure assez stable lors des traitements thermiques inférieurs à 140 °C. En revanche, cette structure est très sensible aux variations de pH.

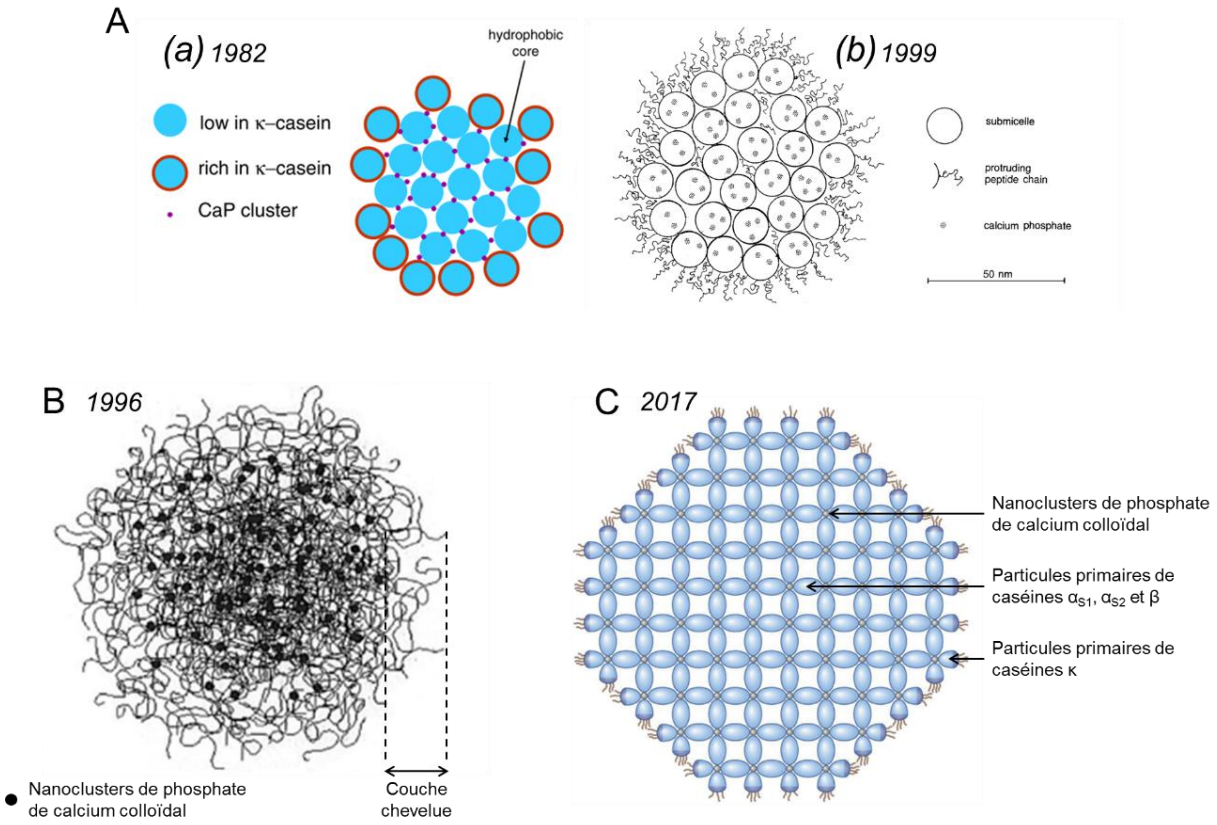


Figure 4 : Différents modèles de la structure de la micelle de caséines : (A) modèle submicellaire proposé par Schmidt (1982) (a) puis par (Walstra, 1999) (b) avec des différences dans la position des clusters de phosphate de calcium et dans la structure de la couche extérieure de la micelle, (B) modèle des nanoclusters proposé par Holt and Horne (1996) et (C) modèle réticulé (illustration de la coupe transversale) récemment proposé par Huppertz et al. (2017) d'après https://www.frieslandcampina.com/en/innovation/casein-micelles/

Par ailleurs, il existe plusieurs types de **protéines sériques**. Elles se composent majoritairement des protéines globulaires β-lactoglobuline (β-LG) (≈ 50%) et α-lactalbumine (α-LA) (≈ 25%), mais sont également constituées de sérum albumine bovine (≈ 5%), de lactoferrine (< 5%), de différentes immunoglobulines (≈ 12%) et d'autres peptides (< 5%). La structure secondaire de la β-LG comprend 50% de feuillets β et 10% d'hélices α. Elle acquiert sa structure tertiaire grâce à la formation de deux ponts disulfures (inter-cystéines) et des interactions hydrophobes entre ses feuillets β (cœur hydrophobe). Elle possède également un thiol libre (cystéine libre) enfoui dans sa structure. La structure secondaire de l'α-LA est, elle, constituée de 30% d'hélices α et 9% de feuillets β. Sa structure tertiaire est notamment liée à la formation de quatre ponts disulfures et à la présence d'un site de fixation du Ca^{2+} (pont divalent) qui lui confère une assez bonne stabilité à la chaleur. Le pHi moyen des protéines sériques se situe autour de 5,5. Leurs structures et leurs propriétés varient en fonction du pH, mais elles sont principalement sensibles aux traitements thermiques, qui entrainent leur dénaturation et leur agrégation. Dans les conditions physico-chimiques du lait natif, la dénaturation de la β-LG est irréversible au-delà de 70 °C alors qu'elle ne l'est qu'au-delà de 90 °C dans le cas de l'α-LA.

Le Tableau 1 reprend les caractéristiques physico-chimiques essentielles des principales protéines du lait, avec leur masse moléculaire (MM), le nombre de leurs résidus d'acides aminés, leur charge dans le lait natif à pH=6,6 (Potentiel ζ), leur point isoélectrique (pHi), leur température de dénaturation et leur solubilité à pH=6,6 (T dénat), leur hydrophobicité totale, ainsi que leur nombre de pont(s) disulfure(s) et de groupement(s) thiol(s) (cystéines).

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques détaillées des principales protéines du lait natif ; Les températures de dénaturation, les solubilités et les charges des protéines sont données pour un pH de 6,6 (pH du lait natif) (Cayot and Lorient, 1998; Croguennec et al., 2008)

	Caséines				Protéines sériques	
	α_{S1}	α_{S2}	β	κ	β-LG	α-LA
MM (kDa)	23,6	25,2	24,0	19,0	18,4	14,2
Nombre de résidus	199	207	207	109	162	123
Potentiel ζ *à pH=6,6* (mV)	- 21	- 15	- 12	- 3	- 16	- 3,7
pHi	4,9-5,0	5,0-5,4	5,1-5,6	5,4-5,9	5,2	4,2 à 5,1
T dénat *à pH=6,6* (°C)	-	-	-	-	> 70[1]	65[2] ; > 90[1]
Solubilité à pH=6,6	-	-	-	-	> 90 %	> 90 %
Hydrophobicité[3] (KJ/résidu)	4,9	4,6	5,6	5,1	5,0	4,7
Pont(s) disulfure(s)	0	1	0	1 *ou* 0	2	4
Groupement(s) thiol(s)	0	0	0	0 *ou* 2	1	0

Notes : [1]température de dénaturation irréversible ; [2]température de dénaturation réversible à 90 %. ; [3]moyenne des indices d'hydrophobicité de toutes les chaînes latérales des résidus d'acides aminés constitutifs.

Composition et structure de la matière grasse laitière

La matière grasse laitière se trouve sous forme de globules gras ayant un diamètre médian compris entre 4 et 5 µm dans le lait natif. Elle est composée de plus de 97% de triacylglycérols (TAG) (Figure 5).

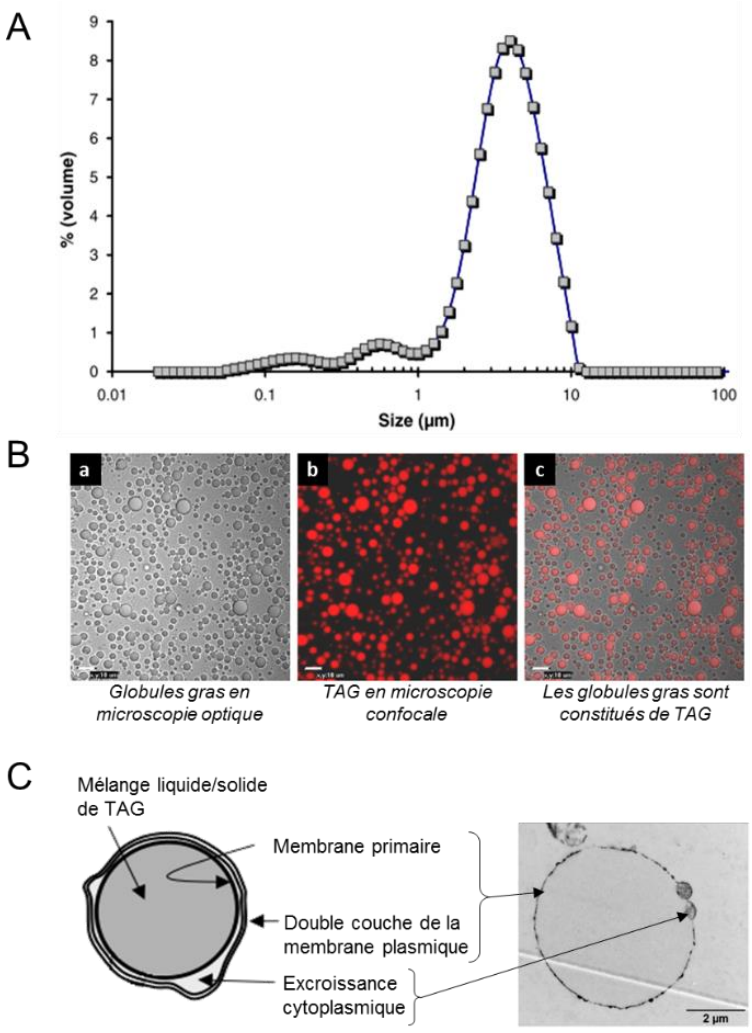


Figure 5 : Structure générale des globules gras du lait natif à travers (A) leur distribution de taille (Lopez et al., 2010), (B) l'étude de leur composition en TAG par microscopie (barres d'échelle = 10 µm) (à partir de Lopez et al., 2010) et (C) leur organisation (à partir de Gallier et al., 2015; Michalski et al., 2002)

Les TAG du lait sont formés à partir de plus de 400 acides gras différents, mais seule une douzaine d'entre eux sont présents à plus de 1% (Tableau 2). Même s'il est possible de faire plusieurs milliers de combinaisons d'acides gras, il n'existe que 35 TAG principaux (Blank and Privett, 1964). Ces derniers déterminent en grande partie les propriétés physiques de la matière grasse laitière (fusion, cristallisation, texture), qui se compose de trois fractions principales (Lopez et al., 2007) : la fraction à bas point de fusion (< 10 °C) (*ou* oléine), la fraction à moyen point de fusion (≈ 20 °C) et la fraction à haut point de fusion (> 30-35 °C) (*ou* stéarine). D'après Jensen and Sampugna (1966), la fraction à haut point de fusion contient 71% de TAG tri-saturés et 26% de TAG di-saturés tandis que la fraction à bas point de fusion contient moins de TAG tri-saturés et plus de TAG di-saturés, mono-saturés et insaturés totaux. Par ailleurs, la matière grasse laitière est constituée de petites quantités de diacylglycérols, monoacylglycérols, acides gras libres, cholestérol, phospholipides, caroténoïdes, vitamines liposolubles et de traces d'hydrocarbures (Tableau 2). Malgré leur faible quantité, ces composés lipidiques jouent un rôle fonctionnel important dans le lait natif puisqu'ils stabilisent les globules gras en formant une membrane à l'interface (Croguennec et al., 2008; Jensen, 2002).

Tableau 2 : Composition moyenne de la matière grasse laitière et composition des principaux acides gras constitutifs des TAG (Croguennec et al., 2008; Jensen, 2002)

Composé	Teneur (%)	Localisation principale
Triacylglycérols (TAG)	97,5	*à l'intérieur des globules gras*
Diacylglycérols	0,36	*à l'intérieur des globules gras*
Monoacylglycérols	0,027	*à l'interface (membrane native)*
Acides gras libres	0,027	*à l'interface (membrane native)*
Phospholipides	0,6	*à l'interface (membrane native)*
Cholestérol	0,31	*à l'interface (membrane native)*
Vitamines liposolubles	0,01	-
Caroténoïdes	0,008	-
Hydrocarbures	Traces	-
Principaux acides gras des TAG	**Teneur ($mol.mol^{-1}$)**	**Point de fusion (°C)**
C 4:0 (butyrique)	9,8	- 7,9
C 6:0 (caproïque)	3,2	- 1,5
C 8:0 (caprylique)	2,3	+ 16,5
10:0 (caprique)	3,9	+ 31,4
C 12:0 (laurique)	3,3	+ 43,6
C 14:0 (myristique)	10,8	+ 53,8
C 16:0 (palmitique)	26,1	+ 62,6
C 16:1 (palmitoléique)	1,4	- 0,5
C 18:0 (stéarique)	10,8	+ 69,3
C 18:1 (oléique)	24,1	+ 14,0
C 18:2 (linoléique)	2,4	- 5,0
C 18:3 (linolénique)	1,1	- 11,0

La membrane native mesure entre 4 et 10 nm d'épaisseur et sa quantité moyenne à l'interface est de 0,5 $g.m^2$. En plus des composés lipidiques, elle est constituée de quelques protéines qui sont principalement des enzymes. Dans leur revue bibliographique, Danthine et al. (2000) montrent que la composition et l'organisation de cette membrane ont fait l'objet de nombreux travaux de recherche depuis les années 1950. Avec l'avancement des techniques, plusieurs travaux de recherche récents ont permis de comprendre finement ce qu'était cette membrane et de proposer une structure (Gallier et al., 2015; Lopez, 2011; Lopez et al., 2011, 2010; M.-C. Michalski et al., 2002). Aujourd'hui, elle est décrite comme l'association d'une première monocouche homogène de phospholipides et d'une seconde couche hétérogène contenant notamment des lipides polaires. La Figure 6 présente la structure complexe de la membrane native, à partir d'illustrations de la littérature.

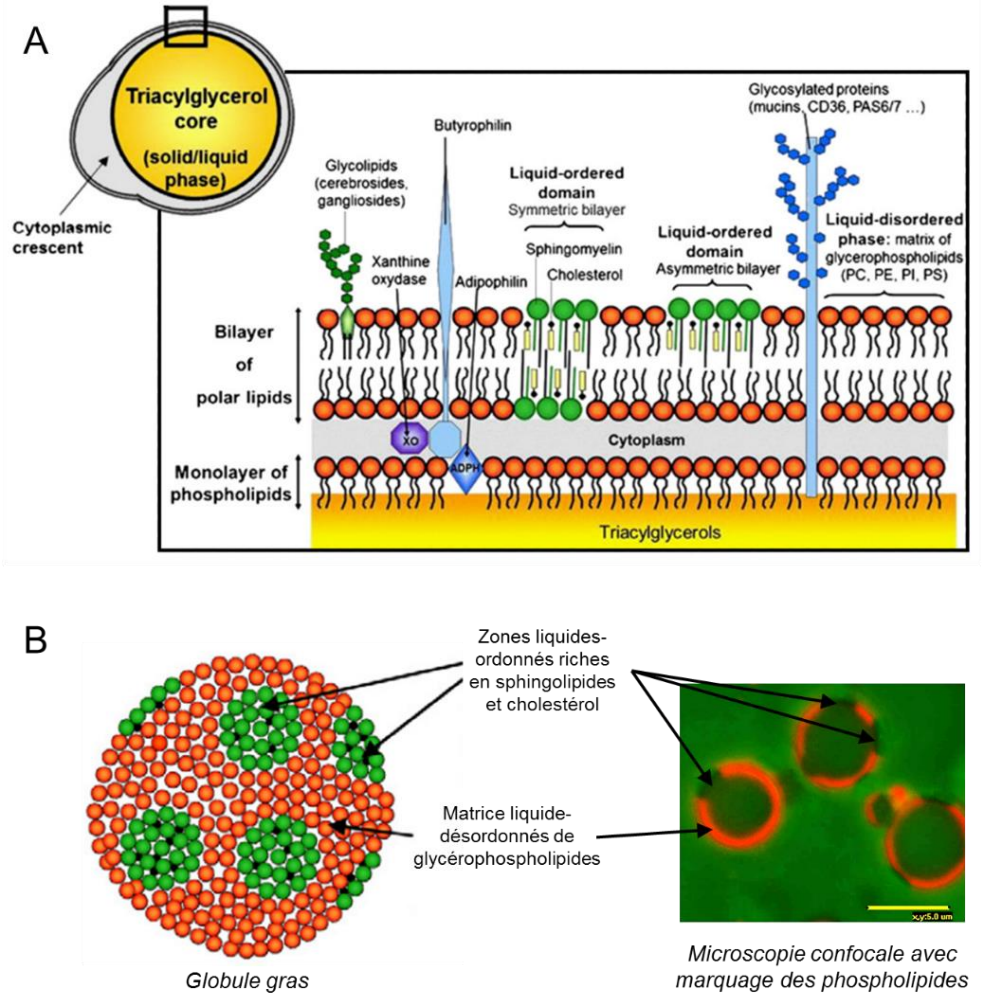


Figure 6 : Structure détaillée de la membrane native des globules gras à travers (A) son organisation en tricouche (organisation latérale des lipides et distribution hétérogène des protéines) (Lopez, 2011; Lopez et al., 2011) et (B) la mise en évidence de la ségrégation des phospholipides de sa bicouche extérieure en plusieurs domaines plus ou moins ordonnés (barres d'échelle = 5 µm) (à partir de Lopez et al., 2011, 2010)

Représentation simplifiée de la structure du lait natif

A partir de toutes les informations recueillies dans la littérature sur le lait natif et ses constituants, la Figure 7 propose une représentation schématique de la structure de ce dernier. Elle servira de base pour représenter les changements de structure au cours du procédé de fabrication des yaourts brassés.

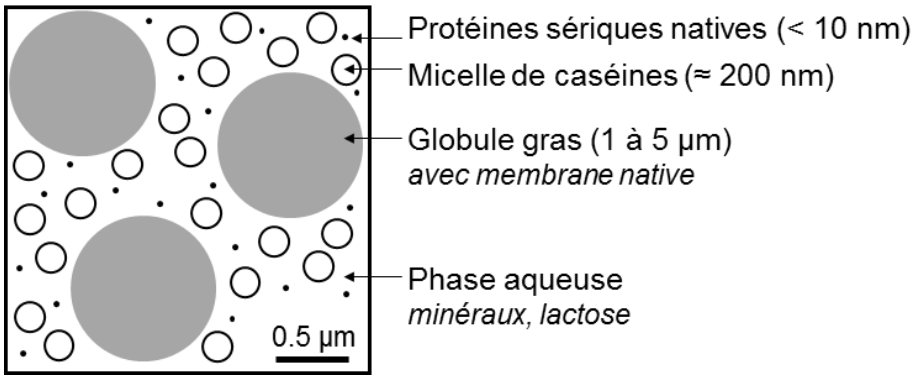


Figure 7 : Représentation schématique et simplifiée du lait natif et de ses constituants

1.1.2. Opérations unitaires du procédé de fabrication d'un yaourt brassé riche en matière grasse

A son arrivée en usine, le lait natif est généralement centrifugé pour séparer la crème (environ 35% de matière grasse et 2% de protéines) du lait écrémé (environ 3.5% de protéines). Pour la majorité des produits laitiers, la crème et le lait écrémé sont ensuite mélangés à nouveau, en fonction des teneurs en protéines et en matière grasse ciblées. Selon la recette, de la poudre de lait écrémé (PLE) (environ 35 % de protéines) et d'autres ingrédients en poudre peuvent être ajoutés au mix. Le mix final obtenu peut ensuite être transformé en produit fini par les différentes opérations unitaires de son procédé.

Procédé classique de fabrication d'un yaourt brassé

Le procédé classique du yaourt brassé est bien connu et ses principales étapes sont présentées en Figure 8. La pasteurisation et l'homogénéisation peuvent être interverties en fonction des procédés, avec des conséquences sur la structure et les propriétés du produit final. Pour se rapprocher de ce qui est fait dans le procédé auquel nous nous intéressons dans ce travail de thèse, seul le cas où la pasteurisation précède l'homogénéisation sera traité dans l'état de l'art (à gauche sur la Figure 8).

Pendant l'étape de **pasteurisation**, le mix est préchauffé dans un échangeur à plaques, puis maintenu à température dans un échangeur tubulaire avant d'être refroidi dans un nouvel échangeur à plaques. Cette étape est très bien optimisée à l'échelle industrielle, avec notamment l'utilisation du lait chaud sortant de la pasteurisation pour préchauffer le lait froid en entrée de pasteurisation. Classiquement, le couple temps-température de pasteurisation est compris entre [80 °C pendant 30 min] et [95 °C pendant 5 min]. Ce traitement thermique a pour fonction première de détruire les microorganismes mais il entraîne également la dénaturation, l'agrégation et l'association des protéines du lait. Au final, c'est l'une des étapes qui a le plus d'effet sur la texture et les propriétés des produits finis (Sodini et al., 2004).

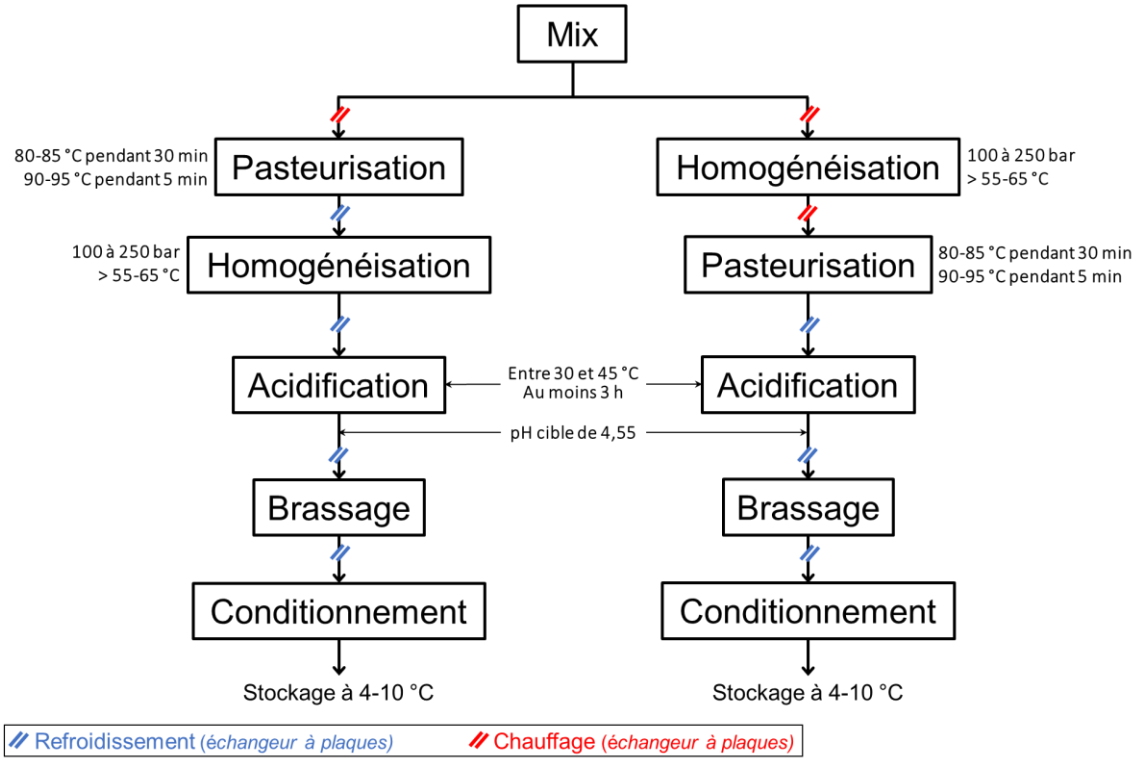


Figure 8 : Principales étapes du procédé classique de fabrication d'un yaourt brassé (à partir de Lee and Lucey 2010; Sodini et al. 2004; Jeantet et al. 2008)

La vitesse de crémage (v, m.s^{-1}) des globules gras peut être calculée à partir de la loi de Stokes :

$$v = \frac{2.r^2.g.\Delta\rho}{9.\mu} \qquad \text{Equation 1}$$

avec r le rayon des globules gras (m), g l'accélération de la pesanteur (m.s^{-2}), $\Delta\rho$ la différence entre les masses volumiques des globules gras et de la phase continue (g.m^{-3}) et μ la viscosité dynamique du fluide (Pa.s). L'étape d'**homogénéisation** a pour objectif de réduire la taille des globules gras afin de lutter contre leur crémage ($v \rightarrow 0$) et d'améliorer la texture du produit fini. Avant d'être homogénéisé, le mix est plus ou moins refroidi mais sa température doit rester supérieure à la température de cristallisation de la matière grasse laitière pour que les globules gras puissent se fractionner correctement. En général, le mix passe par un homogénéisateur à deux étages (Figure 9), sous une pression allant de 100 à 250 bar (Sodini et al., 2004).

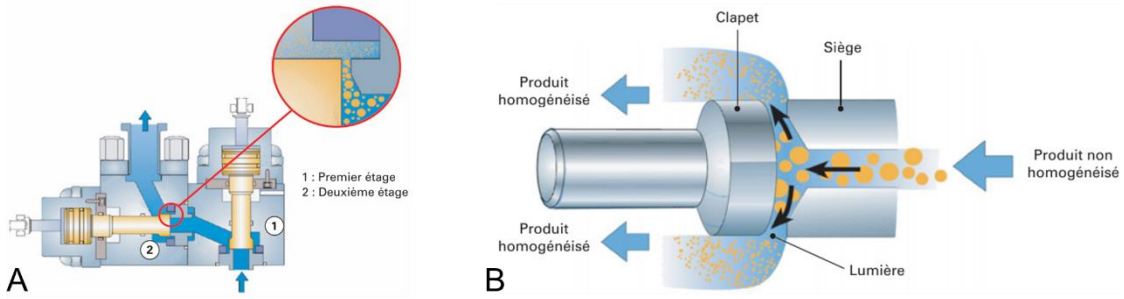


Figure 9 : Schéma d'un homogénéisateur classique à deux étages (A) et schéma du principe de l'homogénéisation haute pression (B) (Roustel, 2010)

Dans sa revue, Walstra (1993) fait la synthèse de plusieurs de ses travaux pour expliquer les mécanismes impliqués pendant l'homogénéisation. Tout d'abord, cette dernière doit apporter assez d'énergie pour rompre les globules gras. Autrement dit, il faut que l'énergie apportée soit supérieure à la pression de Laplace P_L (Pa), qui pour une sphère vaut :

$$P_L = \frac{2.\gamma}{r} \qquad \text{Equation 2}$$

avec γ la tension interfaciale en N.m^{-1}, et r le rayon en m. A titre d'exemple, pour un globule gras natif ayant un rayon de 5 µm et une tension interfaciale de 2 mN.m^{-1} (valeur classique), la pression de Laplace vaut 800 Pa. Si l'énergie apportée est suffisante et que les globules gras se rompent, il faut ensuite qu'il y ait suffisamment de matériel émulsifiant pour stabiliser la surface interfaciale nouvellement créée. Il y a alors une compétition entre la vitesse d'adsorption du matériel émulsifiant et la probabilité de rencontre des globules gras susceptibles de re-coalescer. La rupture des globules gras par homogénéisation semble être due à la combinaison de plusieurs phénomènes physiques (Floury et al., 2000; Foucquier et al., 2012; Walstra, 1993) :

- *Turbulence ou micro-turbulences :* Ce serait le principal phénomène responsable de la réduction de la taille des globules gras. Il se passe au niveau de la tête d'homogénéisation, où le régime d'écoulement devient turbulent. L'importance des micro-turbulences est fortement liée à la viscosité de la phase dispersée et à la vitesse de passage du mix dans la tête d'homogénéisation.
- *Cisaillement :* Il est dû aux forces visqueuses qui génèrent des contraintes tangentielles ou perpendiculaires aux globules gras. Il a principalement lieu lorsque le régime est laminaire ou qu'il y a des variations brutales de la vitesse du mix. Il ne peut engendrer la rupture des gouttelettes que si le rapport des viscosités de la phase dispersée et de la phase continue est inférieur à 4.
- *Cavitation :* Elle a lieu au niveau du clapet, où le mix est accéléré et la pression diminue fortement. Il se forme alors des micro-bulles de vapeur dans la phase continue. Après le clapet, le produit ralentit et la pression remonte, ce qui fait imploser les bulles formées et génère une forte cavitation. Les globules gras entrent alors en vibration et les plus gros d'entre eux se rompent. Ce phénomène dépend

fortement de la tension interfaciale (résistance à la rupture) et des viscosités de la phase dispersée et de la phase continue.

Une fois homogénéisé, le mix est refroidi jusqu'à la température d'activité des ferments pour être acidifié par **fermentation** lactique (30 à 45 °C). Le mix passe ainsi d'un pH de 6,6 à un pH cible de 4,5 en 3 à 4 h. Cette acidification entraîne la gélification du mix (Figure 10). La cinétique d'acidification par fermentation lactique commence par une phase de latence d'une trentaine de minutes durant laquelle les microorganismes se multiplient. Elle s'accélère ensuite jusqu'à un pH de 4,5 à partir duquel elle ralentit légèrement, car l'acide lactique produit limite alors l'action des ferments. Bien que le refroidissement du produit freine fortement la fermentation au sein du produit, son pH continue de baisser légèrement au cours du stockage via la post-acidification (Beal et al., 1999).

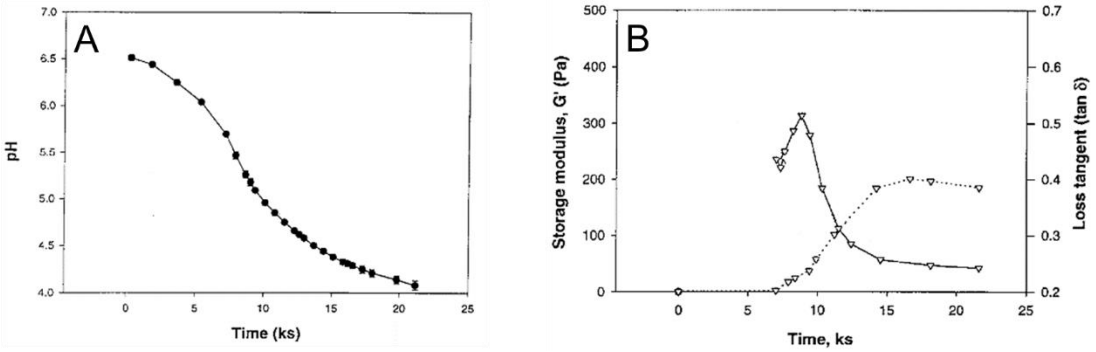


Figure 10 : Suivi de la gélification d'un lait pasteurisé au cours de sa fermentation lactique à travers (A) l'évolution du pH et (B) l'évolution du module conservatif (G', Pa, ligne pointillée) et du module de perte (tan δ, ligne continue) (Lucey et al., 1998)

Pour finir, le **brassage** rompt le gel continu obtenu après acidification et le transforme en une dispersion concentrée de microgels, dont la taille et la rigidité vont directement impacter le « granuleux » du yaourt brassé (Hahn et al., 2012b). Cette étape a un très fort impact sur les propriétés structurelles et rhéologiques du produit (Figure 11).

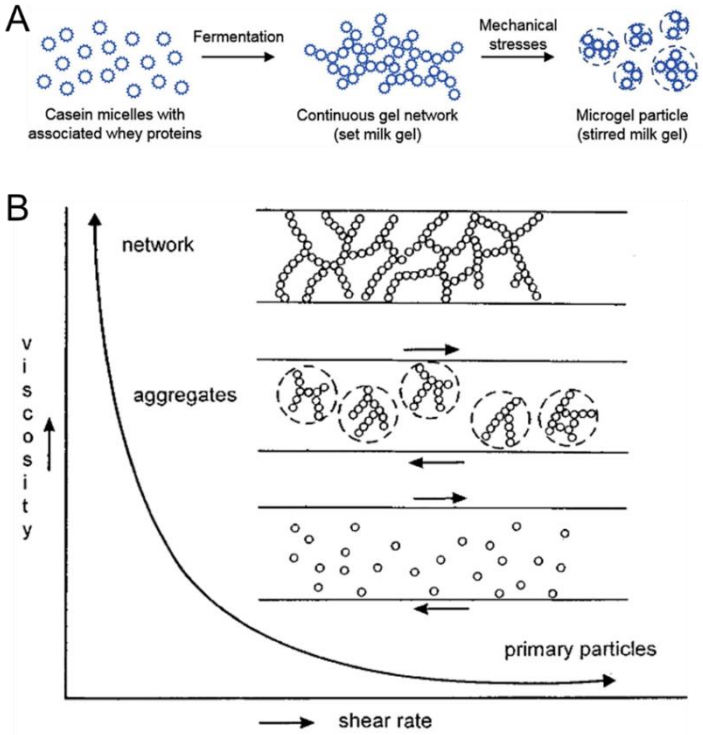


Figure 11 : Schématisation de l'impact du brassage sur (A) la rupture du gel continu (yaourt ferme) (Mokoonlall et al., 2016) et (B) l'évolution de sa viscosité (van Marle et al., 1999)

Dans leur revue, Mokoonlall et al. (2016) ont fait le bilan des études menées sur les différentes opérations unitaires typiques qui constituent cette étape de brassage. En voici la synthèse :

- *Décaillage :* Cette étape est optionnelle. Elle correspond à la rupture grossière du gel ferme à l'intérieur de la cuve de fermentation. Elle se fait souvent par une agitation avec une pale ou une hélice.
- *Lissage par pompage :* La force exercée sur le gel et les microgels formés dépend du débit, du temps de passage dans la pompe et des caractéristiques de la pompe (dimensions, puissance, nature des forces exercées).
- *Lissage via les tuyaux :* Il a lieu lors du transport du produit. En général, le régime est laminaire dans les tuyaux et cette étape exerce un cisaillement sur les microgels obtenus après pompage, avec une contrainte de cisaillement τ (Pa), telle que :

$$\tau = \frac{8.\eta.v}{d_T} \qquad \text{Equation 3}$$

avec η la viscosité du produit (Pa.s), v la vitesse (m.s^{-1}) et d_T le diamètre du tuyau (m). La Figure 12 illustre la rupture des microgels de yaourt brassé en fonction de la vitesse de cisaillement. Le produit peut également rencontrer des pertes de charges singulières – typiquement des coudes lors des changements de direction et des rétrécissements/élargissements au niveau des raccords de tuyaux – et se fragmenter encore plus. L'impact de cette étape sur le produit va essentiellement dépendre du débit, des tuyaux (diamètres et longueurs), de la température et des pertes de charges singulières.

- *Traitement mécanique supplémentaire (ultra-lissage) :* Il est optionnel et a pour objectif de réduire un peu plus la taille des microgels. Classiquement, il correspond au passage du produit par des filtres ou des vannes de lissage.
- *Refroidissement en échangeur de chaleur :* C'est l'ultime étape de brassage avant la mise en pot. Le produit est généralement refroidi jusqu'à 20 °C en échangeur à plaques.

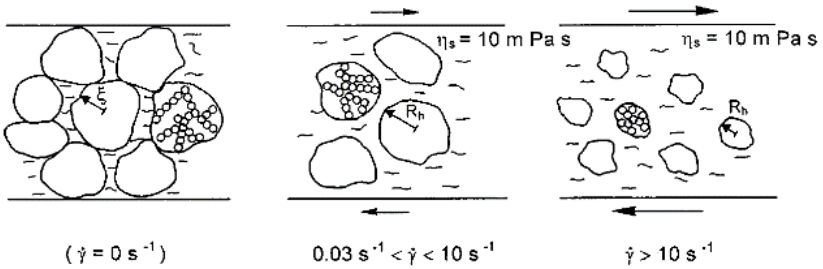


Figure 12 : Illustration de l'évolution de la taille des microgels de lait fermenté sous l'influence de différents cisaillements, *où ξ est le rayon calculé à partir de la dimension fractale, R_h est le rayon hydrodynamique et η_s est la viscosité du sérum entre les microgels* (van Marle et al., 1999)

Diversité des opérations unitaires

Il existe une certaine diversité des types et des conditions d'utilisation des opérations unitaires. De plus, les avancées technologiques font émerger de nouvelles techniques innovantes. Cette sous-partie illustre cette diversité en la mettant en lien avec la variété des conditions physico-chimiques imposées au produit.

Dans le cas du lait, la **pasteurisation** peut être remplacée par une étape de microfiltration afin d'éviter l'altération des qualités nutritives et gustatives par la température. Cette technologie permet de réduire fortement la population microbienne mais pour une courte durée. A l'inverse, la pasteurisation peut être remplacée par un traitement à ultra haute température (140 °C pendant quelques secondes), qui est très dénaturant mais permet de stériliser le lait pour le conserver plusieurs mois (Figure 13). Des technologies plus originales, telles que les hautes pressions hydrostatiques ou les champs électriques pulsés, pourraient également être utilisées (Devlieghere et al., 2004). Néanmoins, dans le cas des yaourts et autres produits

fermentés, la pasteurisation doit permettre de tirer profit de la dénaturation/agrégation des protéines par les hautes températures (L. Donato and Guyomarc'h, 2009), sans pour autant détruire toutes leurs qualités nutritives et gustatives. Ces produits se conservent naturellement bien grâce à leur pH acide et à la présence des ferments lactiques. Les traitements thermiques entre 75 et 95 °C pendant quelques minutes sont donc préférés pour pasteuriser le lait au cours de la fabrication des yaourts (Sodini et al., 2004).

Lait frais microfiltré *DLC de 3 jours* | Lait frais pasteurisé *DLC de 3 jours* | Lait pasteurisation haute *DLC de 8 jours* | Lait stérilisé UHT *DLC de 3 mois*

Figure 13 : Variation de la date limite de consommation (DLC) en fonction du traitement de pasteurisation ou microfiltration de laits demi-écrémés du commerce

L'étape d'**homogénéisation** est clé et il existe différentes technologies, avec chacune leurs avantages et leurs inconvénients. L'énergie apportée au système et les mécanismes d'émulsification ne sont pas les mêmes en fonction de la technologie utilisée, ce qui permet d'obtenir des émulsions avec différentes tailles de globules gras. La Figure 14 est un exemple de comparaison de différentes technologies d'homogénéisation en termes d'énergie dépensée et de réduction de la taille des globules gras.

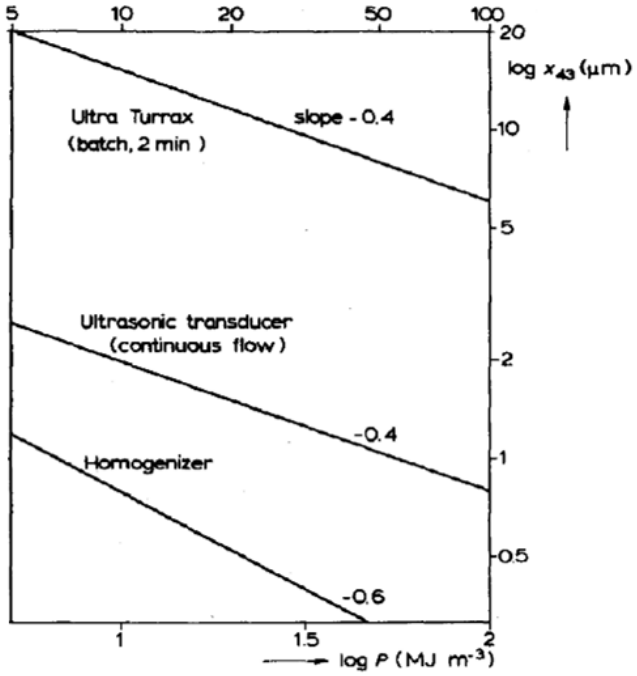


Figure 14 : Evolution du diamètre de Sauter (x_{43}, µm) d'une émulsion huile/eau (paraffine) en fonction de l'énergie apportée par un système rotor/stator (*Ultra Turrax*), par un traitement ultrason (*Ultrasonic transducer*) et par un homogénéisateur classique (*Homogenizer*) (Walstra, 1993)

Depuis de nombreuses années, cette étape est étudiée dans le but de comprendre ses mécanismes, de l'optimiser pour réduire sa dépense énergétique, ou encore de développer de nouvelles technologies. Le Tableau 3 fait le point sur les principales technologies d'homogénéisation classiques et plus innovantes.

Tableau 3 : Informations détaillées sur les technologies d'homogénéisation typiquement étudiées pour une application à des émulsions

Technique	Ordre de grandeur de l'énergie apportée	Mécanismes d'émulsification	Effets du procédé	Avantages	Inconvénients	Références
Homogénéisateur classique	≈10^4 kJ.m^{-3} *jusqu'à 250 bar*	Turbulence *cavitation, cisaillement*	▫ Taille médiane entre 0,5 et 1 µm ▫ Polydispersité : *assez faible* ▫ Réchauffement du produit : *faible*	Bien maîtrisé Compromis intéressant entre le coût énergétique et la gamme de taille obtenue	La taille médiane est limitée à environ 0,5 µm	(Walstra, 1993) (Floury et al., 2000) (Calligaris et al., 2018) (Canselier and Poux, 2004) (Poux and Canselier, 2004)
Homogénéisateur haute pression (dynamique)	≈ 10^5 kJ.m^{-3} *jusqu'à 3500 bar*	Turbulence, cavitation, cisaillement	▫ Taille médiane jusqu'à 100 nm ▫ Polydispersité : *assez faible* ▫ Réchauffement du produit : *fort*	Les tailles obtenues sont les plus fines (nanoémulsions)	Coûteux en énergie (Figure 14) Maintenance importante Réchauffement important du produit	(Floury et al., 2000) (Calligaris et al., 2018) (Canselier and Poux, 2004) (Poux and Canselier, 2004)
Disperseur rotor/stator	≈ 10^5 kJ.m^{-3} *20.000 rpm, 5 min, 500 ml*	Turbulence *cisaillement*	▫ Taille médiane passant de 10 à 5 µm ▫ Polydispersité : *assez élevée* ▫ Réchauffement du produit : *fort*	Utilisable comme outil de pré-émulsification couplé à d'autres techniques	La taille médiane est limitée à environ 5 µm Coûteux en énergie (Figure 14)	(Walstra, 1993) (Silva et al., 2018) (Canselier and Poux, 2004) (Poux and Canselier, 2004)
Sonde à ultrason	≈ 10^4 à 10^6 kJ.m^{-3} *20 kHz, 5 min, 200 mL*	Cavitation *turbulence*	▫ Taille médiane < 1 µm ▫ Polydispersité : *moyenne* ▫ Réchauffement du produit : *fort* ▫ Il existe d'autres équipements utilisant les ultrasons pour émulsifier (pour des procédés en continu également)	*Avec la sonde*, facile à mettre en œuvre et bonne flexibilité à petite échelle *Avec d'autres équipements*, les tailles obtenues avec certains systèmes peuvent être très fines	*Avec la sonde,* la taille médiane est limitée à environ 0,5 µm *Avec d'autres équipements*, c'est très coûteux en énergie (Figure 14) Réchauffement important du produit	(Walstra, 1993) (Calligaris et al., 2018) (Silva et al., 2018) (Canselier and Poux, 2004) (Poux and Canselier, 2004)
Emulsification membranaire	≈ 10^1 à 10^3 kJ.m^{-3}	Pression pour passer à travers une membrane et cisaillement	▫ Tailles > 10 µm émulsification directe ▫ Tailles < 1 µm à partir d'une émulsion ▫ Polydispersité : *monodisperse* ▫ Réchauffement du produit : *peu*	Peu coûteuse en énergie Le cisaillement imposé au produit est faible Peu dénaturant (pas de réchauffement du produit) Permet d'obtenir des émulsions monodisperses Permet de maîtriser l'interface	Encore peu appliquée et utilisée dans le domaine des industries laitières La taille médiane n'est pas aussi fine qu'avec l'homogénéisation classique	(Vladisavljević, 2015) (Silva et al., 2017) (Canselier and Poux, 2004) (Poux and Canselier, 2004)

Si la **fermentation** des yaourts par les ferments lactiques classiques (*Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*) se fait généralement autour de 45°C, il existe également d'autres souches de ferments, avec des températures de fermentation et des propriétés différentes (FAO, 2013). Certaines souches forment notamment des exopolysaccharides, qui sont la plupart du temps composés de deux à huit monomères (glucose, galactose, rhamnose, etc.). Ces exopolysaccharides permettent notamment de retenir l'eau et d'augmenter la viscosité des yaourts fermes et brassés (Bouzar et al., 1997; Sodini et al., 2004). En complément des ferments, certaines enzymes telles que la présure (coagulation du lait) ou la transglutaminase (renforcement des interactions protéiques) peuvent également être utilisées. Ces variations de l'étape de fermentation permettent de moduler les propriétés de texture des yaourts mais le travail de thèse ne portant pas sur cette voie, nous n'irons pas plus loin sur cet aspect. Un autre moyen de gélifier le lait est l'acidification chimique par la glucono-δ-lactone (GDL) ($C_6H_{10}O_6$). Cette molécule est un métabolite issu de l'oxydation du glucose et qui, en présence d'eau, a la propriété de s'hydrolyser progressivement en acide gluconique ($C_6H_{12}O_7$). Cette acidification est très souvent utilisée comme alternative à la fermentation dans les études à l'échelle laboratoire car elle présente l'avantage d'être très répétable et plus rapide qu'une fermentation lactique. Plusieurs paramètres peuvent impacter l'acidification par la GDL (Azim et al., 2010; Jacob et al., 2011) :

- Elle sera plus rapide avec une concentration en GDL (à même concentration en protéines) et/ou une température plus élevées.
- Les protéines ont un effet tampon et l'acidification dépend du ratio GDL/protéines.
- Un pH acide a tendance à ralentir l'hydrolyse de la GDL.

L'acidification par GDL ne permet pas la formation d'exopolysaccharides. Sa cinétique n'est pas la même que par fermentation, ce qui va modifier la gélification et les propriétés rhéologiques finales des yaourts (Figure 15).

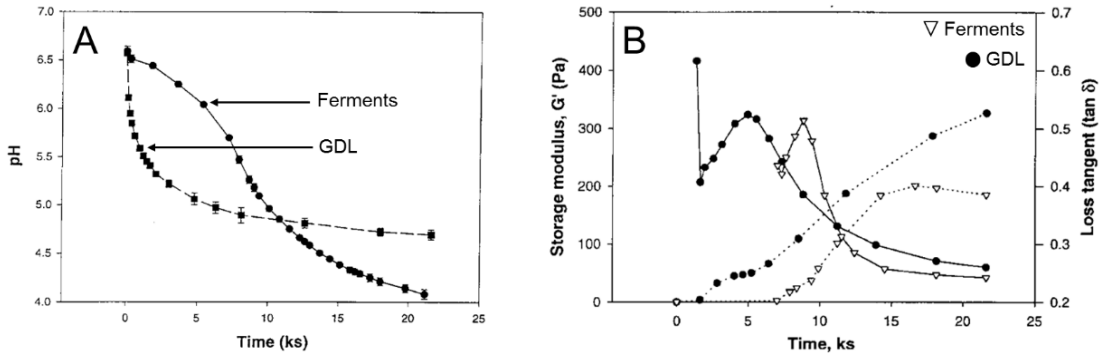


Figure 15 : Différence des cinétiques d'acidification (A) et de gélification (B) de laits acidifiés avec des ferments ou avec 1,3% de GDL. Module conservatif (G', Pa, ligne en pointillée) et module de perte (tan δ, ligne continue) (Lucey et al., 1998)

En jouant sur la température, Rohart and Michon (2016) ont optimisé les conditions d'acidification par GDL pour ajuster sa cinétique à celle de la fermentation lactique.

Au vu de l'impact du **brassage** sur les propriétés sensorielles et rhéologiques des yaourts brassés, c'est une étape importante. Il faut notamment trouver l'équilibre entre des microgels de tailles suffisamment petites pour ne pas avoir des produits « granuleux », et suffisamment grandes pour préserver la texture. L'impact du brassage sur le produit va dépendre de la composition de ce dernier. Toutes les étapes peuvent être modulées avec la mise en œuvre d'un décaillage ou pas, l'utilisation d'une pompe centrifuge ou volumétrique, des longueurs et des diamètres de tuyaux différents, plus ou moins de pertes de charges singulières et une ou plusieurs étapes d'ultra-lissage (différentes tailles des filtres, différentes vannes de lissage, etc.) (Mokoonlall et al., 2016). Au final, la taille des microgels va varier d'un type de brassage à un autre, ce qui va engendrer des propriétés rhéologiques différentes (Figure 16).

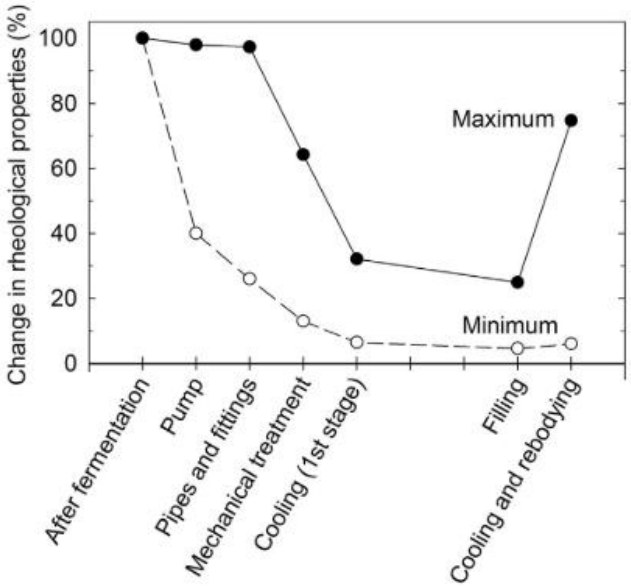


Figure 16 : Modifications maximales et minimales des propriétés rhéologiques du lait fermenté au cours des différentes opérations unitaires de brassage (Mokoonlall et al., 2016)

1.1.3. Structuration d'un yaourt brassé riche en matière grasse au cours du procédé classique de fabrication

Les différentes interactions entre les fonctionnalités des ingrédients qui composent le lait natif et les conditions physico-chimiques imposées par les opérations unitaires permettent de structurer le produit pour former un yaourt brassé. Cette partie a pour objectif de comprendre finement les mécanismes de structuration des ingrédients à l'échelle microscopique dans le cadre d'un procédé classique de fabrication des yaourts brassés.

Lors du traitement thermique de **pasteurisation**, les protéines changent de structure :

- *Formation des agrégats de protéines sériques :* Les β-LG se déplient (< 80 °C) puis s'agrègent (> 80 °C) par la formation de ponts disulfures et par interactions hydrophobes (Petit et al., 2011). Les α-LA s'associent avec les β-LG pendant le mécanisme d'agrégation, formant ainsi des agrégats fractals sphériques de moins de 100 nm pour un pH d'environ 6,6 (Schmitt et al., 2011; Wijayanti et al., 2014).

- *Association des agrégats de protéines sériques avec les micelles de caséines :* Les agrégats de protéines sériques s'associent aux micelles via les κ-caséines. Cette association se fait principalement via la formation de ponts disulfures, également par interactions hydrophobes et plus hypothétiquement par des interactions ioniques et électrostatiques. Cette association se fait entre 70 et 90 °C. Au-delà de 90 °C, elle est plus limitée car les β-LG ont plus tendance à s'agréger entre elles. *In fine*, ces complexes peuvent mesurer jusqu'à environ 300 nm, leur potentiel ξ est d'environ -15 à -20 mV et leur pHi se situe autour de 4,5. Les mécanismes exacts de la formation des complexes sont encore discutés (L. Donato and Guyomarc'h, 2009).

L'**homogénéisation** classique réduit ensuite la taille des globules gras, d'un facteur 5 à 10. Ces derniers passent d'une taille médiane initiale d'environ 5 µm à une nouvelle d'environ 0,5 µm (Figure 17).

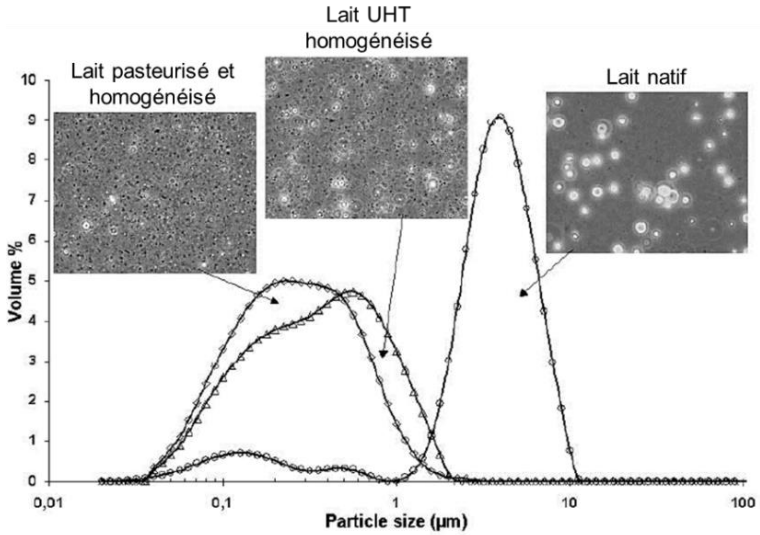


Figure 17 : Distribution de taille des globules gras de différents laits entiers : natif, traité par upérisation haute température (UHT) (140 °C, quelques secondes) puis homogénéisé, et pasteurisé (80-95 °C, plusieurs minutes) puis homogénéisé ; Mesure des tailles effectuée par diffraction laser et micrographes obtenus par microscopie optique (Lopez, 2005)

A l'issue des **étapes de pasteurisation et d'homogénéisation**, les protéines laitières colonisent la surface interfaciale nouvellement créée et remplacent une partie de la membrane native qui est assez fragile (Figure 18).

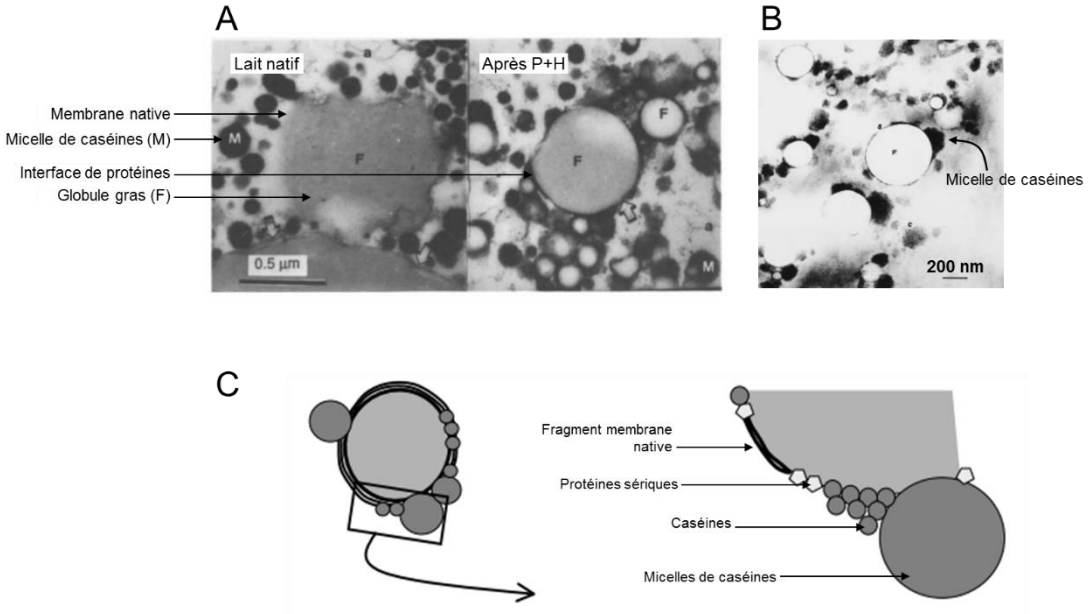


Figure 18 : Impact combiné de la pasteurisation (P) et de l'homogénéisation (H) sur l'interface du lait natif par observation en microscopie électronique à transmission (McMahon and Yousif, 1993) (A) ; Observation en microscopie électronique à balayage des protéines adsorbées à l'interface d'une crème reconstituée à partir de MGLA et de lait écrémé (Sharma et al., 1996) (B) ; Représentation graphique de l'organisation de la surface d'un globule gras après l'étape d'homogénéisation (à partir de Michalski et al., 2002) (C)

La littérature permet d'avoir des éléments sur la composition de cette nouvelle interface. Michalski et al. (2002) montrent que pour une pression de 80 bar appliquée à du lait natif, environ 60 % de l'interface est finalement recouverte par des protéines laitières. Sharma et al. (1996) montrent quant à eux que pour une crème reconstituée à partir de matière grasse laitière anhydre (MGLA) et de lait écrémé, 6 $mg.m^{-2}$ de protéines s'adsorbent à l'interface, dont environ 80 % de caséines (sous forme micellaire ou sous forme de caséines libres) et 20 % de protéines sériques.

Suite à ces deux premières étapes, le mix reste une dispersion colloïdale liquide, avec des globules gras qui mesurent entre 0,5 et 1 µm en moyenne et des protéines qui ont subi d'importants changements structuraux par agrégation. A son tour, l'étape d'**acidification par fermentation lactique** engendre de grandes modifications dans la structure puisqu'elle mène le système à former un gel par interactions entre les composés du mix. La formation progressive du réseau tridimensionnel au fur et à mesure de l'acidification est bien décrite dans la littérature (Famelart et al., 2004; Lee and Lucey, 2010; Sodini et al., 2004) :

- *De pH 6,6 à 6,0 :* Les répulsions électrostatiques entre les micelles de caséines diminuent, le phosphate de calcium commence à se solubiliser mais les micelles de caséines (et leurs tailles) restent intactes.
- *De pH 6,0 à 5,5 :* Les répulsions électrostatiques entre les micelles continuent de diminuer. Le phosphate de calcium colloïdal se solubilise, ce qui entraîne le relâchement des micelles de caséines et la solubilisation d'une partie des caséines. Avec la présence des agrégats de protéines sériques associés aux micelles, le relâchement de ces dernières et la solubilisation des caséines sont limités.
- *De pH 5,5 à 5,0 :* Les répulsions électrostatiques entre les micelles continuent de diminuer. Comme le pHi des agrégats de protéines sériques est atteint, les premières intéractions hydrophobes ont lieu entre les micelles et les globules gras, via ces agrégats de protéines sériques. C'est le début de la formation d'un réseau tridimensionnel. Une augmentation du module conservatif (G', Pa) est mesurée par rhéologie.
- *De pH 5,0 à 4,5 :* Les répulsions électrostatiques entre les micelles continuent de diminuer jusqu'à atteindre le pHi (4,6) de ces dernières. Les interactions entre les micelles sont nombreuses et le réseau tridimensionnel finit de se former. Lorsque la taille des globules gras est suffisamment petite (c-a-d inférieure à taille des pores du réseau protéique), ces derniers participent à la structuration du réseau à la fois par l'intermédiaire de l'interface protéique, et par encombrement stérique. A l'inverse, lorsque les globules gras sont trop gros, ils peuvent limiter la structuration du milieu par gêne stérique.

Dans le lait, le mécanisme de structuration du réseau protéique dépend fortement de la formation, par traitement thermique, d'agrégats de protéines sériques et de complexes qu'ils forment avec les micelles de caséines (Figure 19).

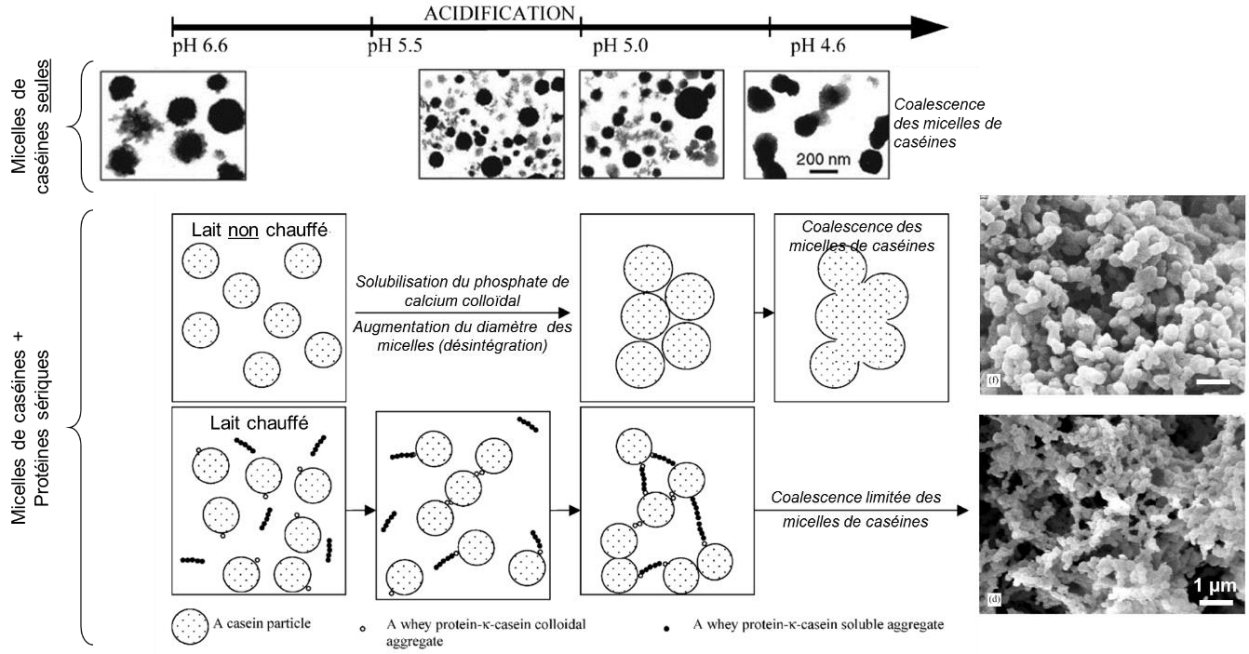


Figure 19 : Mécanismes de formation de gels à partir de micelles de caséines seules (à partir de McMahon et al., 2009) (en haut) ou de de lait (micelles de caséines et protéines sériques) non chauffé (au milieu) ou chauffé (en bas) (à partir de Famelart et al., 2004)

Quand les protéines sériques sont natives et n'ont pas interagi avec les micelles, ces dernières s'agrègent et gélifient. Lorsque les protéines sériques sont agrégées et qu'elles ont formé des complexes avec les micelles, la coalescence des micelles est limitée et le réseau tridimensionnel formé est différent.

Les globules gras participent également à la formation du réseau tridimensionnel par encombrement stérique et par intéraction avec le réseau protéique via l'interface (Sodini et al., 2004). La Figure 20 illustre le type de réseaux qui peuvent être obtenus en fonction de la nature de l'interface et de la taille des globules gras.

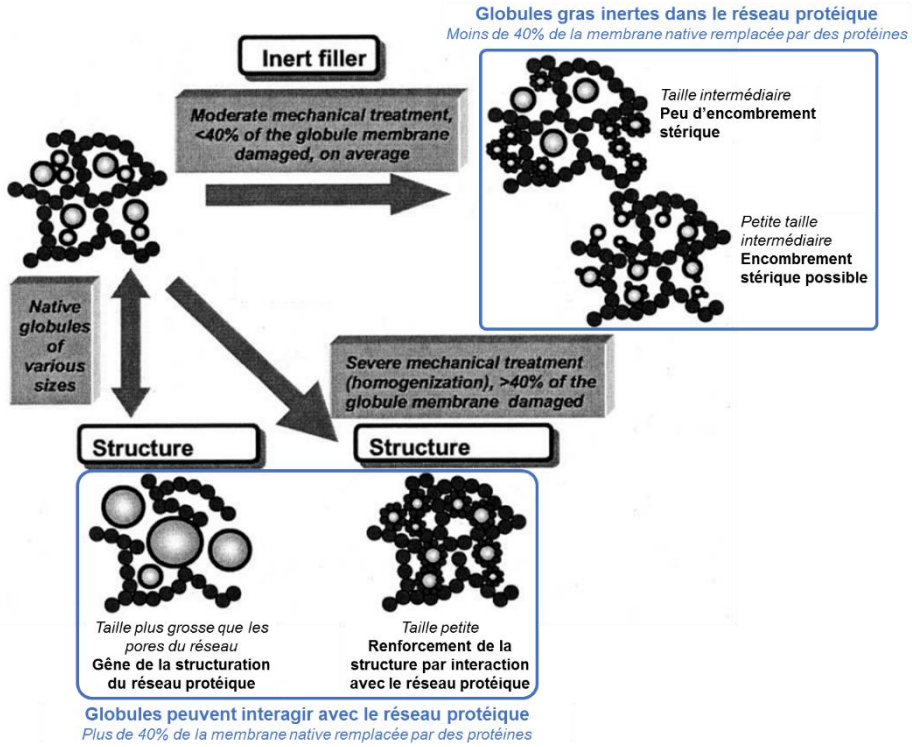


Figure 20 : Influence des globules gras, de leur taille et de la composition de l'interface sur la structuration d'un gel laitier (à partir de Michalski et al., 2002)

A la fin de l'acidification, le mix est devenu un gel continu de type émulsion gélifiée. Le **brassage** modifie profondément la structure du milieu en transformant cette émulsion gélifiée continue en une dispersion concentrée de microgels d'émulsions gélifées. La Figure 21 donne des exemples de microgels obtenus après différents brassages.

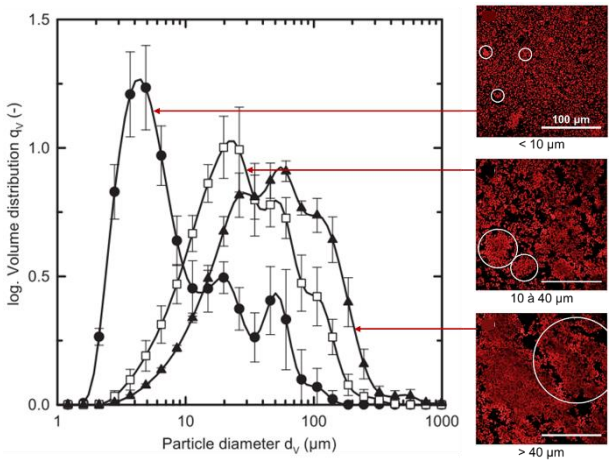


Figure 21 : Exemple de l'aspect (microscopie confocale) et de la distribution de taille (diffraction laser) de microgels de différents diamètres obtenus après brassage de lait fermenté (à partir de Hahn et al., 2015)

Les microgels obtenus après brassage ont des formes irrégulières et leurs distributions de taille sont assez polydisperses. Dans leurs travaux, van Marle et al. (1999) ont calculé une dimension fractale moyenne de 2,24 pour des microgels de yaourts brassés faits à partir de lait écrémé (avec 3,9% de protéines et sans matière grasse).

Nous proposons le **schéma de synthèse** en Figure 22. Il représente la transformation du lait natif en yaourt brassé par l'intermédiaire de l'évolution de la structure microscopique au fur et à mesure des opérations unitaires.

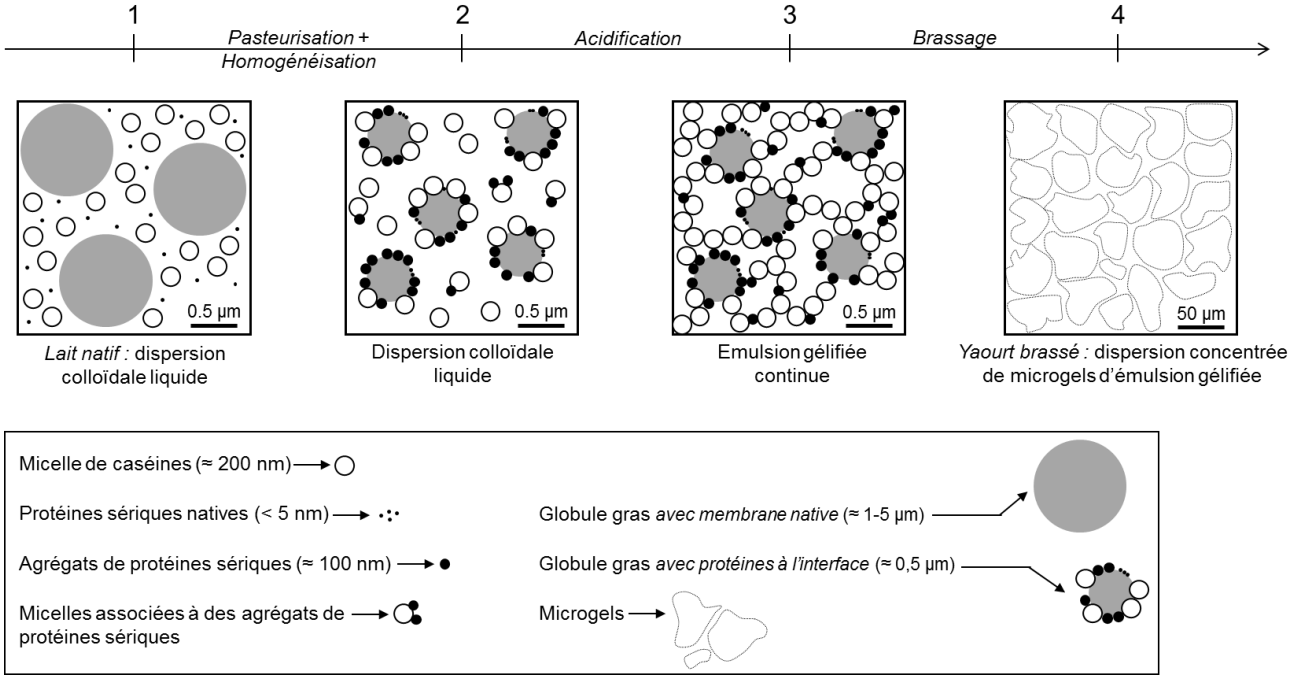


Figure 22 : Structuration du yaourt brassé au cours de son procédé de fabrication

Le yaourt brassé est refroidi à une température proche de 20 °C avant d'être mis en pots puis stocké entre 4 et 10 °C. Pendant le **vieillissement** du yaourt brassé, les globules gras peuvent remonter en surface (crémage). Ce phénomène est cependant limité par la petite taille des globules gras obtenus à l'issue de l'homogénéisation. En outre, le yaourt brassé reprend systématiquement en texture (viscosité et module conservatif) et peut également faire de la synérèse. La littérature explique ces deux phénomènes par plusieurs choses :

- La diminution de la température au cours du stockage, qui permet d'augmenter les propriétés rhéologiques (température-dépendantes) (Mokoonlall et al., 2016; Renan et al., 2009).
- Une augmentation des interactions entre les protéines au sein des microgels (densification). Il s'agirait surtout d'interactions électrostatiques, sûrement dues à la post-acidification (Renan et al., 2009).
- Des réorganisations des protéines et des microgels à différentes échelles, allant de 0,2 à 40 µm et plus. La Figure 23 reprend les quatre types de réorganisation proposés par Mellema et al. (2002).
- Un possible gonflement des microgels pendant le vieillissement, qui augmenterait ainsi leur fraction volumique et donc la viscosité du yaourt brassé (Mokoonlall et al., 2016; Nöbel et al., 2012).

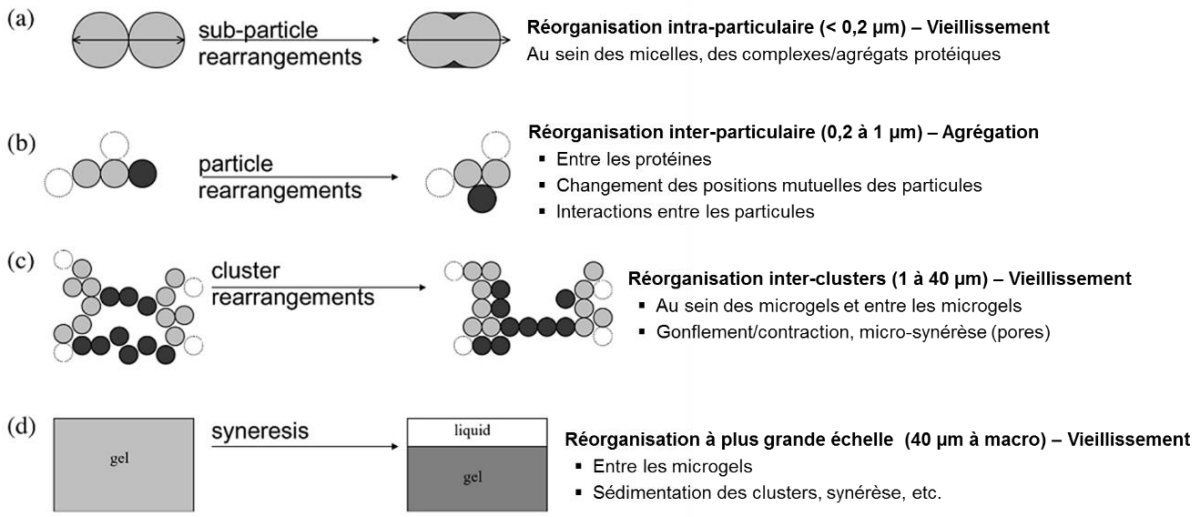


Figure 23 : Représentation des types de réorganisation possibles aux différentes échelles identifiés pour des systèmes de type lait fermenté (à partir de Mellema et al., 2002)

1.2. Propriétés physico-chimiques et fonctionnalisation des ingrédients laitiers

Dans cette partie, nous faisons le point sur les propriétés fonctionnelles des protéines et de la matière grasse laitières dans le cadre d'une application aux yaourts brassés. En repartant des conditions du procédé et de sa diversité, nous décrivons les facteurs qui impactent ces propriétés fonctionnelles.

1.2.1. Propriétés physico-chimiques et fonctionnalisation des protéines laitières

La composition et les propriétés intrinsèques des protéines natives du lait (§ 1.1.1) leur confèrent plusieurs propriétés fonctionnelles (Cayot and Lorient, 1998; Croguennec et al., 2008) :

- *Propriétés d'hydratation :* Les protéines (notamment les groupements polaires de leurs acides aminés) peuvent interagir avec des molécules d'eau de plusieurs manières. De l'eau peut faire partie de la structure finale d'une protéine, soit en étant liée à un site actif (structures II et III), soit après avoir été piégée lors de son repliement (structure III), soit encore, en étant physiquement retenue par capillarité dans ses anfractuosités moléculaires (structures III et IV). Des molécules d'eau peuvent également faire partie de la couche d'eau liée autour d'une protéine et y être fixées par interactions électrostatiques ou par liaisons hydrogène. Elle est alors transportée avec cette dernière lors de ses mouvements et constitue son volume hydrodynamique. Les propriétés d'hydratation donnent lieu à la capacité de rétention d'eau et à la solubilité. Les protéines sont notamment plus ou moins solubles en fonction de leur affinité avec l'eau et des conditions physico-chimiques telles que le pH et la force ionique. Les protéines sériques sont très solubles et peuvent fixer entre 60 et 95% de leur poids en eau en fonction du type de protéine sérique et de l'environnement. Les micelles de caséines ont une solubilité maximale de ≈ 15-20% et ne sont pas considérées comme solubles. Nous ne détaillerons pas plus ces propriétés.
- *Propriétés d'interactions (inter-protéines) :* Les protéines ont la capacité d'interagir par l'intermédiaire de liaisons covalentes, d'interactions hydrophobes et d'interactions électrostatiques. Grâce à ces liaisons, les protéines ont la capacité de s'agréger et/ou de gélifier (*i.e.* former des réseaux tridimensionnels).
- *Propriétés interfaciales :* Grâce à la présence de groupements hydrophobes et hydrophiles, les protéines sont amphiphiles, ce qui leur permet de s'adsorber aux interfaces de deux phases immiscibles huile/eau (émulsions) ou air/eau (mousses). Seules les propriétés émulsifiantes seront traitées dans cet état de l'art.

Les propriétés d'interactions et les propriétés émulsifiantes varient fortement en fonction des conditions physico-chimiques et des types de protéines laitières en présence : protéines sériques seules, micelles de caséines seules ou mélange des deux. Dans cette partie, les propriétés sont mises en lien avec les conditions physico-chimiques relatives au yaourt brassé : environnement ionique, pH, traitements mécaniques et thermiques.

Propriétés d'interactions des protéines en fonction de leur état et de l'environnement

La capacité des protéines laitières à interagir entre elles est liée à leur état et à leurs propriétés intrinsèques. Elles peuvent interagir pour s'agréger et/ou pour gélifier (Figure 24) :

- *L'agrégation* correspond à l'association de plusieurs protéines en de plus grosses entités, qu'on appelle souvent particules ou « microgels »[3] ;
- *La gélification* correspond à la formation d'un réseau tridimensionnel continu appelé gel. Les agrégats peuvent également interagir entre eux pour gélifier.

[3] *Nous n'utiliserons pas ce terme de « microgel » pour désigner les agrégats car nous l'utilisons pour définir les morceaux de gels obtenus à l'issue du brassage.*

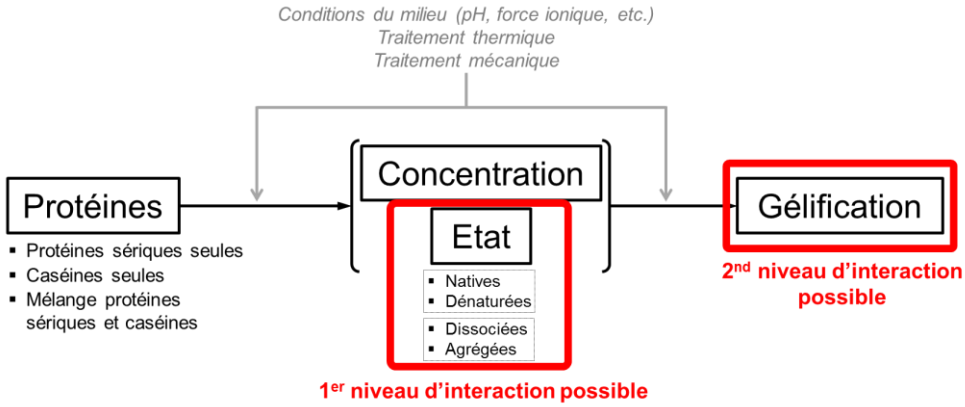


Figure 24 : Modes d'interaction des protéines laitières en fonction de leur composition, de leur état et des conditions physico-chimiques

Il existe plusieurs types d'interaction entre les protéines, avec différents niveaux d'énergie et faisant intervenir différentes propriétés des protéines (Tableau 4). L'hydrophobicité, le nombre de thiols libres, la charge, la taille et la flexibilité des protéines dépendent de leur état, et les interactions entre les protéines varient donc en fonction de leur état.

Tableau 4 : Principaux types d'interactions possibles entre les protéines (à partir de Abd El-Salam, El-Shibiny, & Salem, 2009; Cayot & Lorient, 1998; Donato & Guyomarc'h, 2009)

Interaction	Niveau d'énergie (ordre de grandeur)	Propriété des protéines mise en jeu
Pont disulfure	300 à 400 kJ.mol^{-1}	Acides aminés avec su souffre (cystéine)
Interaction hydrophobe	≈ 20 kJ.mol^{-1}	Acides aminés hydrophobes
Interactions électrostatiques		
Liaison ionique (ions divalents)	50 à 250 kJ.mol^{-1}	Acides aminés polaires chargés
Liaison +/-	50 à 100 kJ.mol^{-1}	Acides aminés polaires chargés
Liaison hydrogène	≈ 30 kJ.mol^{-1}	Acides aminés polaires
Forces de Van Der Waals	≈ 10 kJ.mol^{-1}	Acides aminés polaires

Lorsqu'elles interagissent, les protéines peuvent former des structures fractales, avec un certain degré de remplissage et un certain degré d'inoccupation de l'espace (Andoyo et al., 2015). La dimension fractale (Df) permet de décrire les gels ou les agrégats issus de l'interaction de particules (entités protéiques de type agrégats de protéines sériques ou micelles de caséines). Elle représente le niveau de remplissage de l'espace par les particules et se définit par (Cayot and Lorient, 1998) :

$$N_P = \left(\frac{R_F}{r}\right)^{Df} \qquad \text{Equation 4}$$

où N_P est le nombre de cases occupées par une particule dans un espace découpé par un quadrillage, R_F est le rayon fractal et r est la taille d'une case. L'Equation 4 peut être simplifiée de la manière suivante (Cayot and Lorient, 1998) :

$$N = \left(\frac{R}{r}\right)^{Df} \qquad \text{Equation 5}$$

où N est le nombre de particules élémentaires dans un agrégat, R est le rayon sphérique de l'agrégat et r est le rayon de la particule élémentaire. L'agrégation des particules élémentaires est due à leur mise en mouvement, qui peut être causée soit par le mouvement brownien, soit par l'hydrodynamique du système (écoulement) (Lachin et al., 2016). L'agrégation des particules peut être limitée par plusieurs choses :

– *S'il n'y a pas de répulsions électrostatiques entre les particules :* leur agrégation est limitée par leur probabilité de rencontre (*diffusion limited aggregation*). Les agrégats formés sont peu compacts et leur dimension fractale est basse.

– *S'il y a des répulsions électrostatiques entre les particules :* leur agrégation est limitée par leur capacité à réagir / interagir (*reaction limited aggregation*). Les agrégats obtenus sont alors plus compacts, avec une dimension fractale plus élevée.

L'état des protéines

La littérature est riche d'informations sur les facteurs qui impactent l'état des protéines laitières, qui peuvent rester natives, se dénaturer, se dissocier[4] ou s'agréger :

***Protéines sériques seules* :** Le pH, la force ionique, la pression osmotique (via la concentration en lactose notamment) ont tous un impact sur la conformation des protéines, qui peuvent se trouver plus ou moins chargées ou dépliées. Le traitement thermique est le facteur qui impacte le plus l'état des protéines sériques, notamment celui de la β-LG (Abd El-Salam et al., 2009). La littérature rapporte qu'il existe une température critique de 80 °C, en-dessous de laquelle la dénaturation (dépliement) de la β-LG protéines prédomine (réaction limitante), et au-dessus de laquelle c'est leur agrégation qui devient prédominante (réaction limitante) (Petit et al., 2011). En-dessous de cette température critique, le pH, le type d'ions et la présence de lactose ont également un impact sur le dépliement des β-LG. Au-dessus, ce sont plutôt le pH, la force ionique, la concentration en protéines et la quantité d'α-LA qui peuvent modifier l'agrégation des protéines sériques (Nicolai et al., 2011). Il y a donc une interdépendance importante des effets des facteurs. La Figure 25 donne un exemple de différents types d'agrégats de β-LG obtenus par traitement thermique à différents pH.

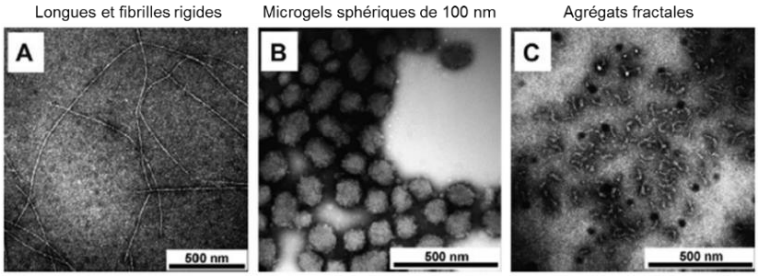


Figure 25 : Observation par microscopie électronique à transmission d'agrégats de β-LG (10 g.L^{-1}) formés par traitement thermique à des pH de 2,0 (A), de 5,8 (B) et 7,0 (C) (à partir de Nicolai, 2016 (d'après Jung, Savin, Pouzot, Schmitt, & Mezzenga, 2008))

L'état des protéines sériques peut également être modifié par d'autres traitements. La littérature montre notamment l'effet des hautes pressions (jusqu'à 3000 bar) (Abd El-Salam et al., 2009; Bouaouina et al., 2006) et des ultrasons (Abd El-Salam et al., 2009; O'Sullivan et al., 2014) sur la conformation des protéines via la modification des interactions intra-protéiques. Par ailleurs, les hautes pressions peuvent rompre les agrégats (Figure 26).

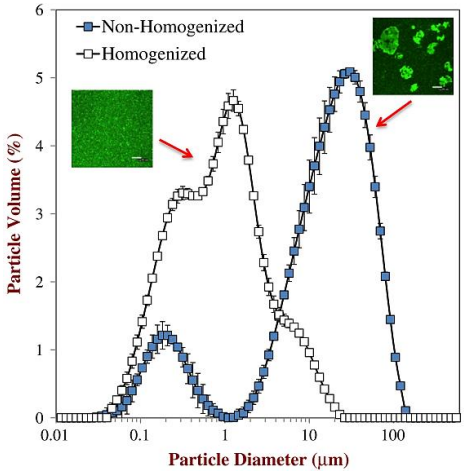


Figure 26 : Rupture des agrégats de protéines sériques par un traitement d'homogénéisation à 415 bar (Chung et al., 2014)

[4] *Dissociation de la structure quaternaire.*

Micelles de caséines seules **:** La littérature rapporte de nombreux facteurs qui modifient la structure et l'état des micelles de caséines. La Figure 27 synthétise l'ensemble de ces facteurs physico-chimiques.

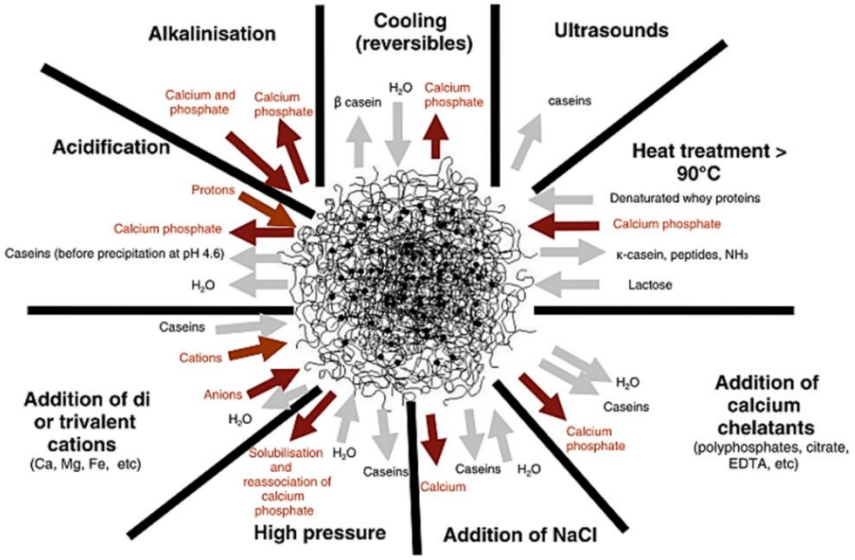


Figure 27 : Synthèse des facteurs physico-chimiques impactant les propriétés des micelles de caséines (Broyard and Gaucheron, 2015)

Mélange de protéines sériques et de micelles de caséines : Les micelles de caséines et les protéines sériques peuvent s'associer pour former des complexes. Ce point est détaillé en partie 1.1.3 (p. 50).

La gélification des protéines

Pour que les protéines ou leurs agrégats puissent interagir et former un gel, il est indispensable qu'il y en ait une quantité minimale. Si c'est le cas, la variation de pH (acidification), le traitement thermique ou l'augmentation de la force ionique (avec notamment la présence d'ions divalents comme le Ca^{2+}) peuvent provoquer leur gélification (Cayot and Lorient, 1998; Croguennec et al., 2008). L'utilisation d'enzymes comme la présure ou la transglutaminase peut également provoquer la gélification des protéines laitières mais nous ne nous y intéresserons pas dans ce manuscrit. Ces facteurs peuvent être soit i) de premier ordre lorsqu'ils sont nécessaires aux interactions et *in fine* à la gélification, soit ii) de deuxième ordre quand ils modifient les interactions sans permettre la gélification à eux seuls. Les études sur la gélification des protéines laitières sont nombreuses.

La gélification des micelles de caséines se fait principalement par la variation du pH (partie 1.1.3, p. 50). Néanmoins, la littérature montre également que leur gélification peut se faire par traitement thermique (Figure 28). Cette gélification thermique dépend fortement de la concentration en micelles de caséines et du pH du milieu.

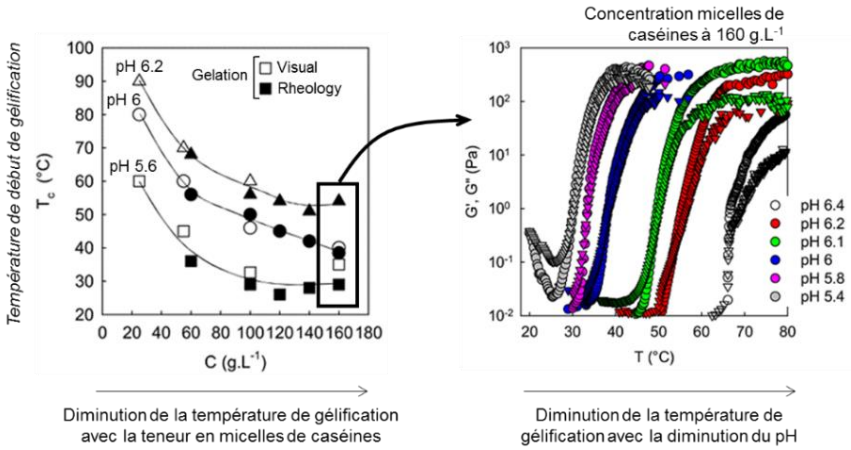


Figure 28 : Gélification des micelles de caséines par traitement thermique en fonction du pH et de leur concentration (à partir de Thomar and Nicolai, 2016)

Les protéines sériques, quant à elles, gélifient principalement par traitement thermique. Cependant, les agrégats de protéines sériques peuvent également gélifier par un traitement secondaire tel que l'acidification ou l'augmentation de la force ionique. Il s'agit de la gélification à froid (*cold gelation*). La Figure 29 donne des exemples de réseaux tridimensionnels obtenus à partir d'agrégats (thermo-induits) de protéines sériques de différentes tailles suite à une acidification par GDL.

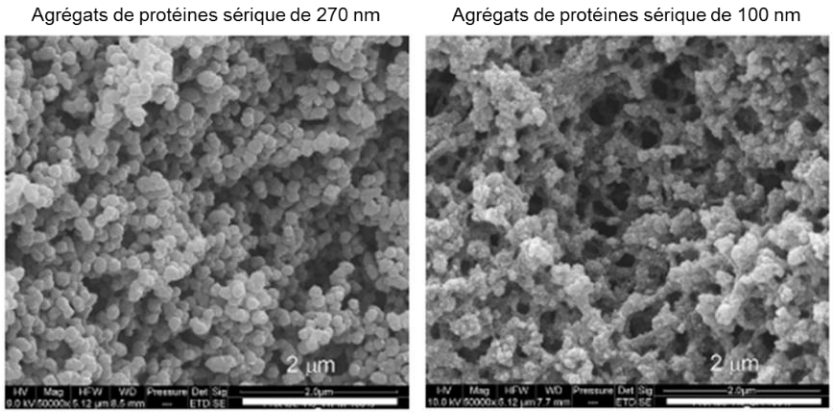


Figure 29 : Microstructures de gels (microscopie électronique à balayage) d'agrégats de protéines sériques de différentes tailles obtenues par acidification (GDL) (Donato et al., 2011)

Enfin, la gélification de mélanges de protéines sériques et de micelles de caséines (tels que dans le lait) se fait principalement par acidification. Les protéines laitières forment différents types de réseaux en fonction de leurs proportions et du traitement qui leur a été appliqué au préalable. La Figure 30 en donne des exemples.

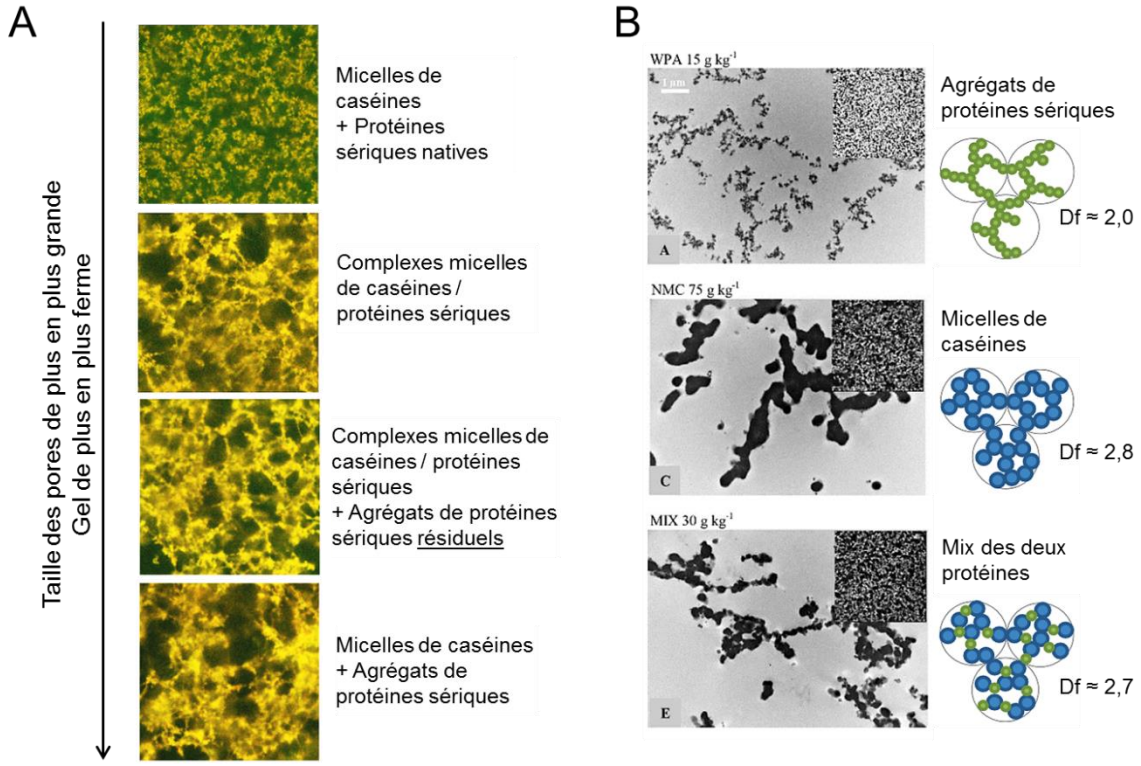


Figure 30 : Microstructures de gels obtenus par l'acidification de différents mélanges de protéines sériques et de micelles de caséines : (A) Gels à partir de différents états des protéines (à partir de Vasbinder et al., 2004) et (B) étude de l'impact du mélange des protéines sur la dimension fractale des gels (à partir de Andoyo et al., 2015)

Le Tableau 5 propose une synthèse sur la gélification des protéines laitières seules ou en mélange.

Tableau 5 : Bilan sur la gélification des protéines laitières

Nature des protéines laitières	Mode de gélification (facteurs de premier ordre)	Conditions	Interactions mises en jeu et mécanismes	Référence(s)
Micelles de caséines seules	Principalement par acidification	--	Les interactions mises en jeu sont principalement des interactions électrostatiques et hydrophobes (interactions non covalentes) (§ 0 et Figure 30).	(Andoyo et al., 2014) (Andoyo et al., 2015)
	Egalement par traitement thermique	La gélification irréversible des micelles de caséines par traitement thermique et à pH fixe (entre 5,4 et 6,5) est possible à une concentration élevée (> 40 $g.L^{-1}$). La température de gélification est fortement dépendante du pH (30 °C à pH 5,4 ; 90 °C à pH 6,5).	L'agrégation des caséines serait due à une restructuration des micelles de caséines sous l'effet de la chaleur, avec l'apparition d'interactions hydrophobes, de liaisons hydrogènes et la formation de complexes avec le calcium et le phosphate (Figure 28).	(Thomar and Nicolai, 2016)
Protéines sériques non agrégées seules	Principalement par traitement thermique	La gélification des protéines sériques natives est possible à des concentrations élevée en protéines (≈ 60-100 $g.L^{-1}$).	Les mécanismes d'interactions sont sensiblement les mêmes que pour la formation d'agrégats de protéines sériques (§ 0), mais à l'échelle d'un gel continu. Les interactions sont principalement covalentes (ponts disulfures) et hydrophobes.	(Nguyen et al., 2017)
Agrégats de protéines sériques seuls	Acidification (gélification à froid)	La taille et le nombre d'agrégats (concentration) impactent leur gélification.	Les agrégats protéiques peuvent former un réseau protéique grâce à la réduction des répulsions électrostatiques et à l'apparition d'interaction hydrophobes (interactions non covalentes) (Figure 29 et Figure 30).	(Andoyo et al., 2014) (Andoyo et al., 2015) (Donato et al., 2011)
	Traitement thermique (gélification à chaud)	La taille et le nombre d'agrégat (concentration) impactent leur gélification. Un traitement thermique de 90 °C pendant 5 min permet de faire gélifier les agrégats de protéines sériques.	Les interactions mises en jeu sont à la fois covalentes et non covalentes.	(Chung et al., 2014)
	Augmentation de la force ionique par différents types d'ions (gélification à froid)	La taille et le nombre d'agrégat (concentration) impactent leur gélification. L'ajout de $CaCl_2$ est plus efficace que celui de NaCl.	Les agrégats protéiques peuvent gélifier grâce à l'écrantage des répulsions électrostatiques principalement (interactions non covalentes) et à la formation de ponts par des ions divalents.	(Bryant and McClements, 2000) (Chung et al., 2014)
Mélanges de micelles de caséines et protéines sériques	Principalement par acidification	La gélification, la structure et les propriétés du gel obtenu dépendent des proportions en protéines sériques et en micelles de caséines, et de leur état (complexes protéines sériques / micelles de caséines, protéines natives ou agrégées) (Figure 30).	Les protéines sériques natives ou agrégées permettent de renforcer le réseau par des interactions hydrophobes et des ponts disulfures, qui varient en fonction de l'état et de la quantité de protéines sériques.	(Andoyo et al., 2014) (Andoyo et al., 2015) (Nguyen et al., 2017) (Vasbinder et al., 2004)

Propriétés émulsifiantes des protéines

Les propriétés interfaciales des protéines ont également été bien étudiées dans la littérature. Les deux équations simplifiées suivantes établissent les liens qu'il existe entre les protéines, leurs propriétés interfaciales et la formation de systèmes dispersés :

$$\delta W = \gamma . dA \qquad \text{Equation 6}$$

$$d\gamma = -R.T.\Gamma.dln(C) \qquad \text{Equation 7}$$

où δW (J) est le travail à fournir pour augmenter la surface interfaciale A (m^2) de dA, avec γ tension de surface ($N.m^{-1}$) ; et où dγ est la diminution de la tension de surface engendrée par l'adsorption de protéines, avec Γ la concentration de protéines à l'interface ($mol.m^{-2}$), C la concentration de protéines en solution ($mol.m^{-3}$), T la température (K) et R la constante des gaz parfaits. Seules les propriétés émulsifiantes seront traitées dans le cadre de ce manuscrit.

Même si beaucoup d'études s'intéressent aux propriétés émulsifiantes des protéines laitières purifiées (β-LG, différentes caséines), les études sur les mélanges de protéines ou les ingrédients plus réalistes, tels que les isolats de protéines sériques, sont aussi pris en compte dans cette partie.

La littérature renseigne bien sur les mécanismes d'installation et de stabilisation de l'interface par les protéines. La Figure 31 en illustre les principales étapes dans le cas d'une émulsion H/E.

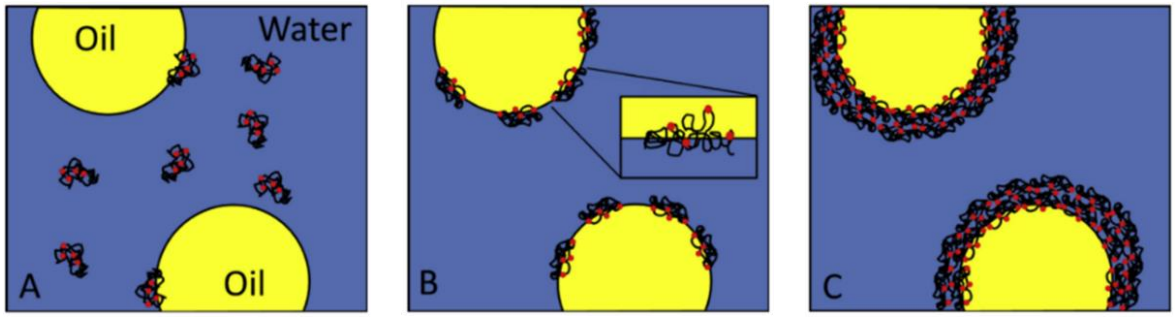


Figure 31 : Représentation de protéines globulaires (avec des zones hydrophobes représentées par des points rouges) qui se déplacent jusqu'à l'interface (A), s'adsorbent (B) et forment un film interfacial viscoélastique (C) (Lam and Nickerson, 2013)

Lam & Nickerson (2013), Bos & Van Vliet (2001) et McClements (2005) expliquent que les protéines commencent d'abord par diffuser dans le milieu jusqu'à l'interface puis s'y adsorbent en passant une barrière enthalpique. Cette étape d'adsorption permet de réduire la tension interfaciale entre les deux phases immiscibles de l'émulsion, ce qui est favorable d'un point de vue énergétique. Contrairement aux petits tensioactifs, l'adsorption des protéines est considérée comme pratiquement irréversible, bien que ces dernières puissent être remplacées par des tensioactifs dans certaines conditions. Lorsqu'elles sont adsorbées, les protéines peuvent se réorganiser de manière plus ou moins importante et permettent souvent l'adsorption de nouvelles protéines. Une fois l'interface complètement couverte, les protéines en excès dans la phase continue peuvent interagir avec la première couche de protéines adsorbée. On parle alors de multicouches. Le film interfacial viscoélastique ainsi formé permet de plus ou moins bien stabiliser l'émulsion en fonction, notamment, des conditions physico-chimiques de la phase continue. En moyenne, il y a environ 2 à 3 $mg.m^{-2}$ de protéines adsorbées à l'interface, le film interfacial qu'elles forment mesure environ 4 nm d'épaisseur et la pression de surface finale se situe entre 15 et 25 $mN.m^{-1}$ (Bos and Van Vliet, 2001).

Cependant, ces valeurs peuvent varier puisque chaque étape d'installation et de stabilisation de l'interface par des protéines peut être modifiée en fonction de plusieurs facteurs. Le Tableau 6 est un récapitulatif de ces facteurs, classés en deux niveaux :

- *Le niveau I :* Il regroupe les facteurs qui ont un impact direct sur les étapes d'installation et de stabilisation, et sur leur déroulement.
- *Le niveau II :* Il correspond aux facteurs qui peuvent avoir un effet sur les facteurs de niveau I, et donc *in fine* sur les étapes et leur déroulement.

Tableau 6 : Synthèse des facteurs pouvant avoir un effet sur les différentes étapes d'installation et de stabilisation de l'interface H/E par des protéines (Bos and Van Vliet, 2001; Cayot and Lorient, 1998; Lam and Nickerson, 2013)

Etape	Facteurs de niveau I	Facteurs de niveau II
Diffusion jusqu'à l'interface	▫ Concentration des protéines ▫ Solubilité des protéines ▫ Taille des protéines	▫ *Composition et conditions physico-chimiques de la phase continue (force ionique, pH)* ▫ *Traitement(s) mécanique(s) ou thermique(s) appliqué(s) aux protéines*
Adsorption	▫ Hydrophobicité des protéines ▫ Répulsions électrostatiques et encombrement stérique ▫ Protéines en concurrence (compétition)	▫ *Composition préalable de l'interface* ▫ *Composition et conditions physico-chimiques de la phase continue (force ioniques, pH, tensioactifs)* ▫ *Traitement(s) mécanique(s) ou thermique(s) appliqué(s) aux protéines* ▫ *Concentration en protéines*
Réorganisation	▫ Etat des protéines (natives, dénaturées, agrégées) ▫ Flexibilité des protéines en fonction de leurs structures II, III et IV	▫ *Composition préalable de l'interface* ▫ *Composition et conditions physico-chimiques de la phase continue (force ionique, pH)* ▫ *Traitement(s) mécanique(s) ou thermique(s) appliqué(s) aux protéines*
Formation de multicouches	▫ Concentration en protéines ▫ Potentiel d'interaction des protéines	▫ *Composition et conditions physico-chimiques de la phase continue (force ionique, pH, ions divalents)* ▫ *Traitement(s) mécanique(s) ou thermique(s) appliqué(s) aux protéines*
Stabilisation	▫ Quantité de protéines adsorbées (taux de recouvrement, épaisseur du film interfacial) ▫ Résistance du film interfacial ▫ Répulsions électrostatiques et encombrement stérique entre deux interfaces	▫ *Composition et conditions physico-chimiques de la phase continue (force ionique, pH, ions divalents, autres polymères)* ▫ *Structure des protéines adsorbées* ▫ *Taille des protéines adsorbées* ▫ *Charge des protéines adsorbées*

Modification de l'installation et de la stabilisation par des facteurs de niveau I

De manière plus précise, plusieurs études montrent à quel point les facteurs de niveau I ont un impact sur les étapes d'installation de stabilisation de l'interface H/E par des protéines.

Tout d'abord, la concentration en protéine, c'est-à-dire en matériel émulsifiant, est primordiale pour permettre de stabiliser l'interface créée au moment de l'émulsification (Figure 32).

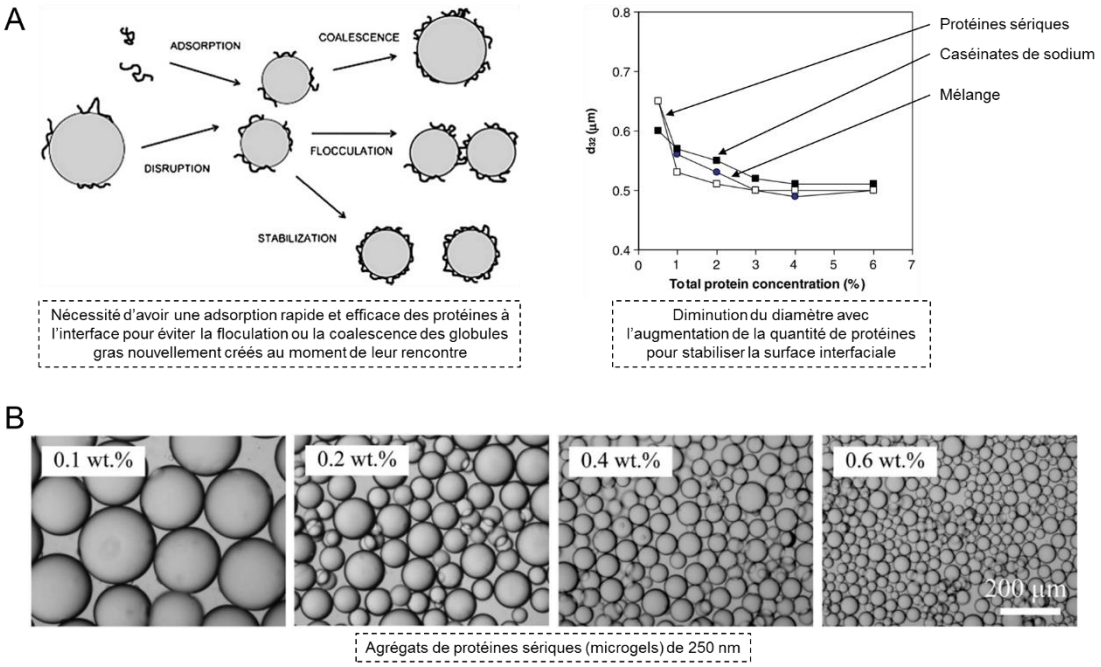


Figure 32 : Importance de la quantité de protéines (matériel émulsifiant) pour stabiliser la surface interfaciale créée au moment de l'émulsification : (A) Illustration et exemple d'émulsions (H/E) faites avec des petites protéines flexibles (à partir de Raikos, 2010; Ye, 2008) ; (B) Exemple d'émulsions (H/E) faites avec des agrégats de protéines sériques plus gros et moins flexibles (à partir de Destribats et al., 2014)

Une fois adsorbées, les protéines ne se réorganisent pas de la même manière à l'interface et ne forment pas le même type de film interfacial en fonction de leur nature, de leur flexibilité et de leur état (natif, dénaturé, dissocié ou agrégé). La Figure 33 reprend les différents types de réorganisation des protéines à l'interface proposés dans la littérature.

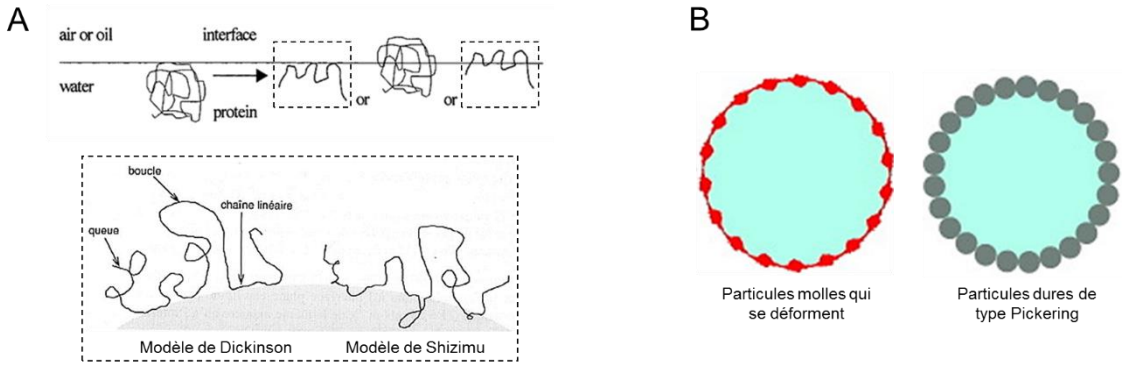


Figure 33 : Représentation de la réorganisation des protéines à l'interface liquide/liquide : (A) Protéines globulaires non flexibles, ou flexibles avec ou sans ancrage dans la phase dispersée (à partir de Bos and Van Vliet, 2001; Cayot and Lorient, 1998 *d'après* Dickinson, 1992; Shizimu, 1994) ; (B) Particules molles de type agrégats protéines ou micelles de caséines (à partir de Deshmukh et al., 2015)

On peut distinguer plusieurs comportements de réorganisation des protéines à l'interface. D'une part, les protéines natives et individuelles telles que les protéines sériques ou les caséines peuvent se réorganiser en changeant de conformation (Zhai et al., 2013). Plus précisément, Day et al. (2014) ont montré, par dichroïsme circulaire, que les protéines globulaires changeaient de structures secondaire et tertiaire à l'interface H/E. D'autre part, les protéines plus complexes et moins « flexibles » telles que les micelles de caséines ou les agrégats de protéines sériques ne peuvent pas réellement se réorganiser. Si certains auteurs les assimilent à des particules rigides (émulsions de Pickering), Deshmukh et al. (2015), Dickinson (2016) et Murphy et al. (2016) considèrent qu'elles ont une certaine capacité à se déformer (particules molles) et donc à se réorganiser à

l'interface. La Figure 34 illustre l'effet de l'état et de la flexibilité de différentes protéines laitières pour émulsifier de la matière grasse dans une phase continue aqueuse.

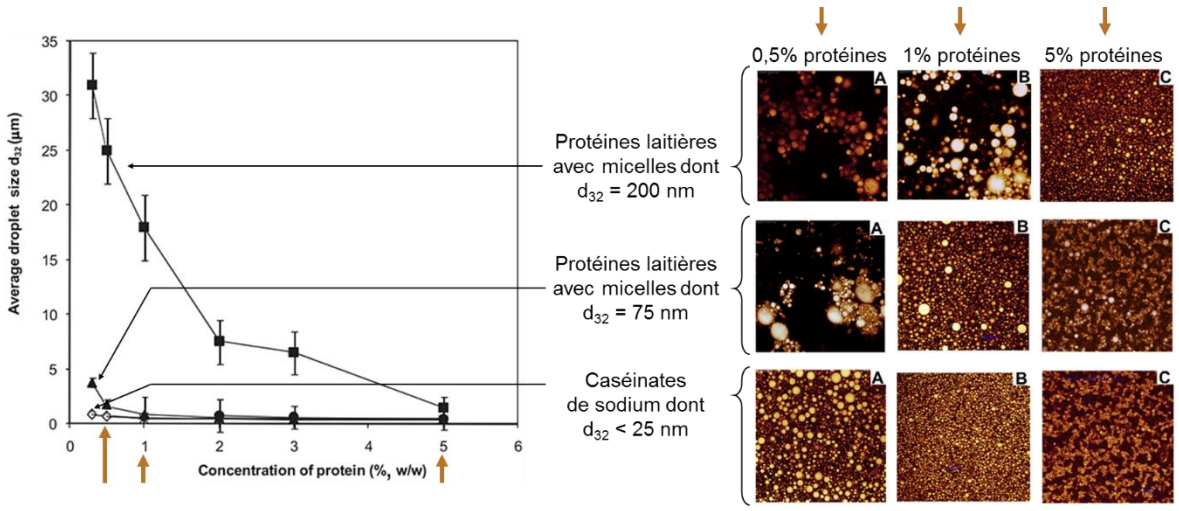


Figure 34 : Impact de la taille, de la flexibilité et de la concentration des protéines sur la structure d'émulsions H/E (comparaison entre des micelles de caséines plus rigides et plus grosses et des caséinates de sodium flexibles et plus petites) (à partir de Ye, 2011)

A 0,5% de protéines, le diamètre moyen (d_{32}) des globules gras est supérieur à 30 µm quand l'interface est stabilisée avec des micelles de caséines de 200 nm, il est d'environ 4,5 µm avec des micelles de 75 nm et inférieur à 1 µm avec des caséinates de sodium (< 25 nm). Il faut plus de protéines pour stabiliser l'interface et réduire la taille des globules gras lorsque les protéines sont plus grosses et plus complexes. Ceci est à la fois dû au nombre d'entité, à la vitesse de déplacement et à la capacité à se réorganiser à l'interface qui sont toutes les trois plus faibles quand les protéines sont plus grosses et plus complexes (composées de plusieurs protéines associées ou agrégées).

Un autre paramètre important est la compétition entre des protéines de natures différentes pour s'adsorber et se réorganiser à l'interface. Les Figure 35 et Figure 36 montrent que la composition de l'interface ne sera pas la même en fonction des propriétés émulsifiantes des protéines en compétition, de leurs concentrations et des conditions du milieu.

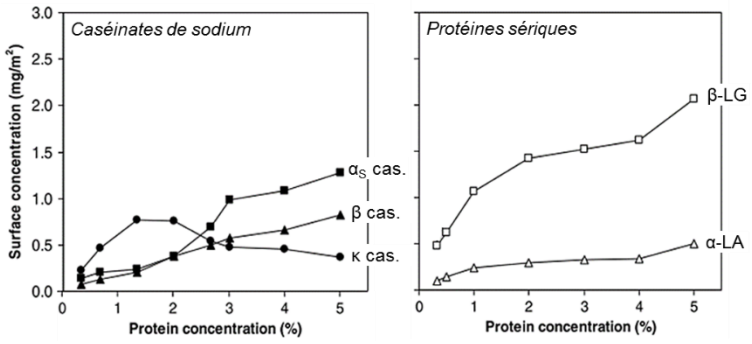


Figure 35 : Compétition de protéines laitières « pures », petites et flexibles pour s'adsorber à l'interface d'émulsions H/E en fonction de la concentration en protéines et du mélange de protéines (à partir de Ye, 2008)

Dans le cas des caséinates de sodium, il existe une concentration seuil d'environ 2,5 %, en-dessous de laquelle ce sont surtout les κ-caséines qui constituent l'interface et au-dessus de laquelle ce sont plutôt les α-caséines. En ce qui concerne les protéines sériques, les β-LG s'adsorbent systématiquement en plus grande quantité que les α-LA, mais leurs proportions varient en fonction de la concentration globale en protéines (Figure 35).

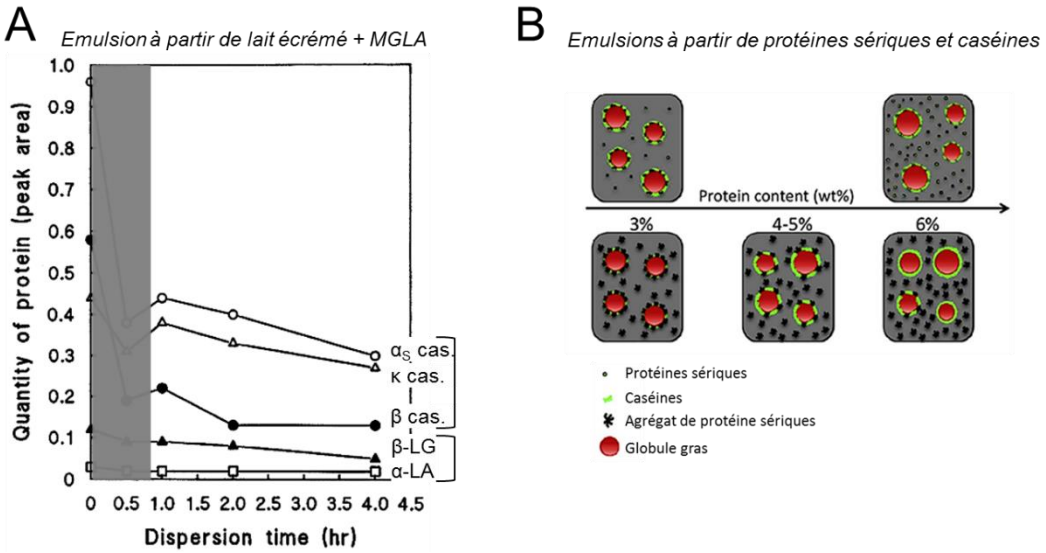


Figure 36 : (A) Proportions des protéines laitières du lait écrémé adsorbées à l'interface d'une émulsion H/E (à partir de Sharma et al., 1996) et (B) composition de l'interface H/E stabilisée par différentes concentrations de mélanges de caséines et protéines sériques (natives ou agrégées) (à partir de Chevallier et al., 2016)

Lorsque les protéines sont des mélanges plus complexes, la compétition à l'interface dépend à la fois de la composition en différentes protéines, de leurs proportions, de leur niveau d'association ou d'agrégation et de la concentration globale en protéines. Quand une émulsion H/E est faite à partir de lait écrémé, la composition de l'interface est complexe et se rapproche de la composition réelle du lait, avec environ 20% de protéines sériques et 80% de caséines. De plus, la compétition entre les caséines et les protéines sériques n'est pas la même si les protéines sériques sont natives ou si elles sont agrégées (Figure 36).

Par ailleurs, la présence de tensioactifs peut avoir un impact important sur l'installation des protéines à l'interface H/E et sur la stabilisation de cette dernière (Bos and Van Vliet, 2001; McClements, 2005).

Une fois le film viscoélastique formé, l'interaction entre les globules gras et la stabilité de l'émulsion dépendent de plusieurs paramètres. Tout d'abord, les protéines apportent une charge nette de surface aux globules gras qui peut être négative ou positive selon que le pH de l'émulsion est supérieur ou inférieur à leur point isoélectrique. Si la force ionique du milieu est faible, il y a alors une forte répulsion électrostatique entre les globules gras et l'émulsion est stable. De plus, lorsque les protéines rayonnent autour des globules gras, en exposant leurs queues ou boucles hydrophiles, ou lorsqu'elles sont de taille importante (agrégats ou micelles de caséines), elles apportent une stabilisation stérique des globules gras, limitent leur agrégation et évitent physiquement leur coalescence (Figure 37).

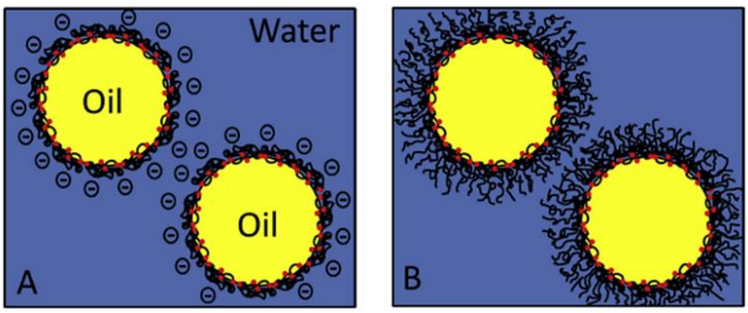


Figure 37 : Stabilisation des émulsions par répulsions électrostatiques (A) ou par encombrement stérique (B) (zones hydrophobes représentées en rouge) (Lam and Nickerson, 2013)

Plusieurs facteurs peuvent engendrer la déstabilisation des émulsions H/E composées de protéines laitières à l'interface. Il existe plusieurs études qui étudient ces facteurs et la Figure 38 en montre des exemples.

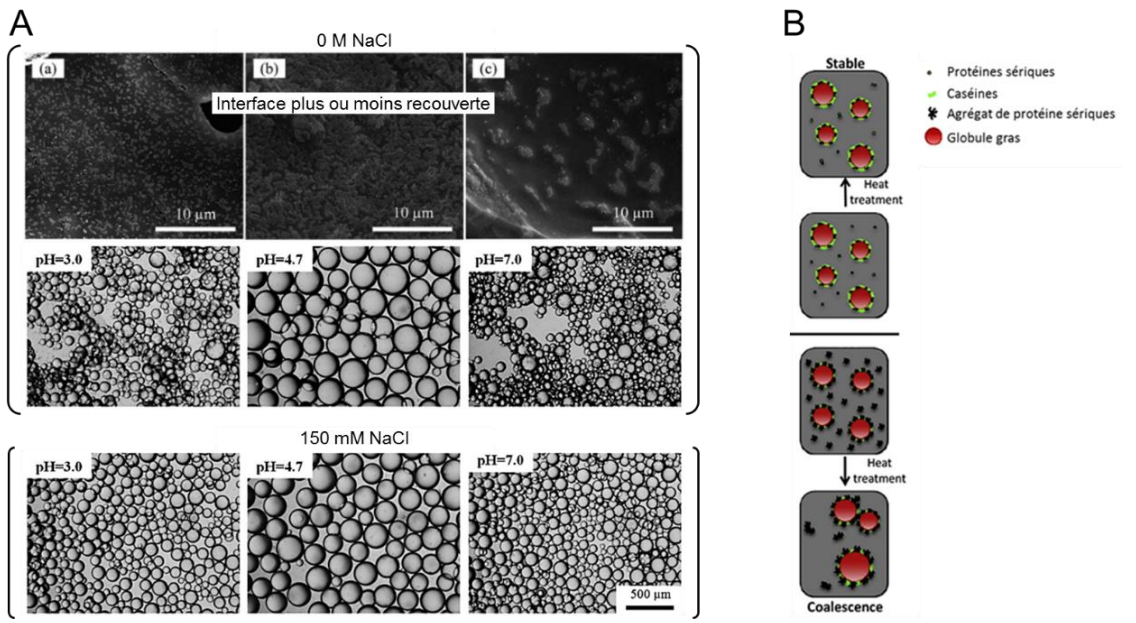


Figure 38 : Exemples de facteurs impactant la stabilité des émulsions : (A) Etude de l'impact combiné du pH et de la force ionique sur la structure et l'interface d'émulsions H/E stabilisées par des agrégats de protéines sériques (à partir de Destribats et al., 2014); (B) Représentation schématique de l'impact du traitement thermique sur la stabilité d'émulsions H/E composées de protéines laitières à l'interface (Chevallier et al., 2016)

Lorsque le pH se rapproche du point isoélectrique ou que la force ionique du milieu est élevée, les globules gras peuvent s'agréger et l'émulsion se déstabiliser (Destribats et al., 2014; Lam and Nickerson, 2013). Le traitement thermique peut également entraîner l'agrégation des protéines en entraînant l'interaction entre les protéines de l'interface (Chevallier et al., 2016). La présence d'ions divalents peut également créer des interactions entre les protéines des interfaces de plusieurs globules gras et ainsi déstabiliser l'émulsion (McClements, 2005).

Modification de l'installation et de la stabilisation par des facteurs de niveau II

La littérature fait également état des facteurs ayant un impact indirect sur les propriétés émulsifiantes des protéines laitières (facteurs de niveau II). En particulier, Ye (2008) et Chevallier et al. (2016) démontrent qu'en plus de dépendre des types de protéines mélangées, leur compétition pour l'interface dépend également de la concentration globale en protéines. Pour des concentrations en protéines faibles (< 4%), les protéines sériques s'adsorbent plus facilement à l'interface H/E que les caséines alors que c'est l'inverse pour des concentrations plus élevées (> 4%). Dans leur revue, Amagliani and Schmitt (2017) rapportent également que la stabilisation de l'interface n'est pas la même en fonction des conditions d'obtention des agrégats de protéines sériques. Par exemple, à pH 7, les fibrilles de β-LG (2% β-LG, pH = 2, 90 °C pendant 5 h) sont plus efficaces que leurs agrégats fractals (2% β-LG, pH = 7, 90 °C pendant 5 h) ou que leurs microgels (2% β-LG, pH ≈ 5, 90 °C pendant 5 h) pour stabiliser une émulsion H/E.

1.2.2. Propriétés physico-chimiques et fonctionnalisation de la matière grasse laitière

La matière grasse laitière est très majoritairement composée de triacylglycérols (TAG). Ces derniers se composent d'un glycérol estérifié par trois acides gras (Figure 39). Si les trois acides gras sont identiques, on dit que le TAG est homogène. Dans le cas contraire, on dit qu'il est mixte, ce qui est le cas pour la plupart des TAG de la matière grasse laitière.

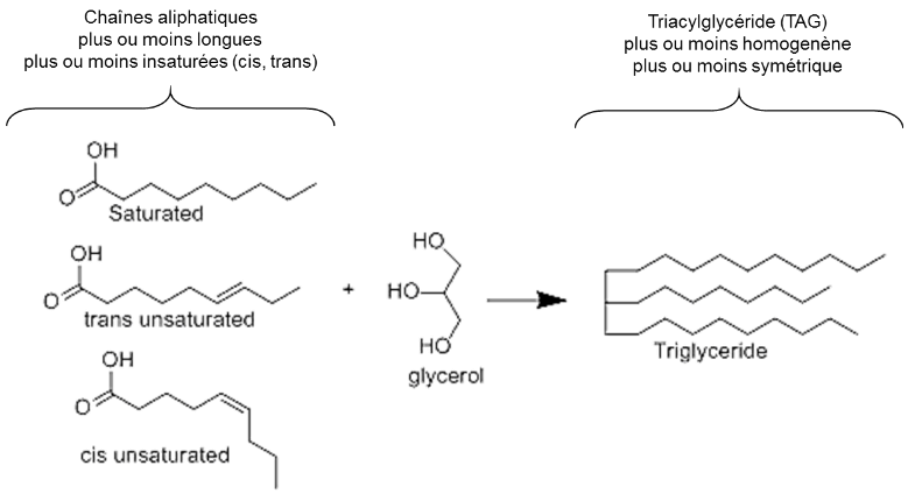


Figure 39 : Structure et diversité des triacylglycérides (TAG)

Les TAG sont en grande partie responsables des propriétés de la matière grasse laitière, c'est-à-dire de ses propriétés thermiques (fusion, cristallisation) et mécaniques (texture). Ces propriétés physiques proviennent de la capacité des TAG à interagir pour former des structures cristallines (Croguennec et al., 2008).

Lorsque la température est assez basse, le mouvement brownien est ralenti et les acides gras des TAG peuvent intéragir entre eux par l'intermédiaire, principalement, des forces de Van Der Waals. La Figure 40 montre les mécanismes qui conduisent les TAG à former des cristaux.

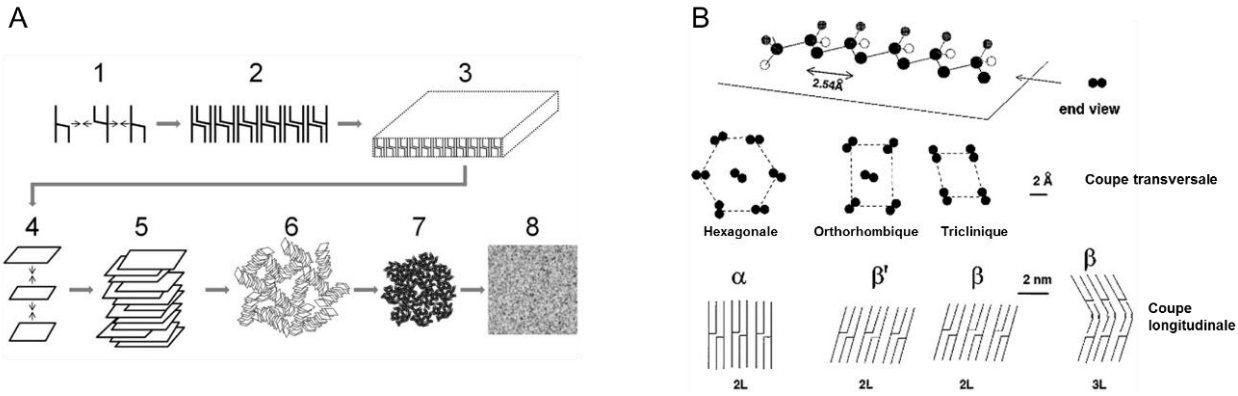


Figure 40 : Cristallisation des TAG : (A) Etapes de leur cristallisation depuis la formation d'un nucleus jusqu'à l'organisation en sphérulites (Tran and Rousseau, 2016) et (B) leurs différents niveaux d'organisation (stabilité de α < β' < β) (Lopez et al., 2000)

La température à laquelle la cristallisation[5] se produit dépend des acides gras constitutifs des TAG et de leurs caractéristiques :

- Plus les acides gras sont longs et plus la température de cristallisation est haute (elle apparaît plus vite au refroidissement) puisque le point de fusion est élevé, c'est-à-dire qu'il faut apporter plus d'énergie pour mettre les acides gras en mouvement.
- Plus le nombre d'insaturations est important et plus la température de cristallisation est basse car elles gênent l'interaction entre les chaînes carbonées. Avec la formation de coudes, les insaturations *cis* gênent d'autant plus la cristallisation que les insaturations *trans*.
- L'homogénéité des TAG et la position des différents acides gras qui les composent influencent également la cristallisation.

[5] *La cristallisation est exothermique et la fusion est endothermique.*

Différentes structures cristallines peuvent se former en fonction de l'interaction des TAG. C'est ce qu'on appelle les polymorphismes :

- *L'organisation transversale* des TAG peut être hexagonale α (désorganisée), orthorhombrique perpendiculaire β' (peu organisée) ou triclinique parallèle β (organisée).
- *L'organisation longitudinale* des TAG correspond, elle, à l'épaisseur de l'empilement des acides gras. Elle peut être double (2L) pour les formes α, β et β', ou triple (3L) pour la forme β.

En fonction de ces deux organisations, la structure polymorphique peut être peu stable (α), moyennement stable (β') ou stable (β). Avec le temps, les cristaux tendent vers la forme la plus stable. Les cristaux formés dépendent des conditions de cristallisation et de la composition des TAG. L'organisation 3L est notamment favorisée quand il y a des insaturations ou que les longueurs des chaînes sont différentes. L'organisation 2L est plutôt favorisée lorsque les acides gras sont de même longueur ou avec un même nombre d'insaturations.

Le mécanisme de cristallisation se déroule en deux étapes, avec d'abord la nucléation et ensuite la croissance. La nucléation est l'étape d'initiation, où une première interaction stable entre deux TAG a lieu. Elle détermine le nombre et la taille des cristaux (Figure 41).

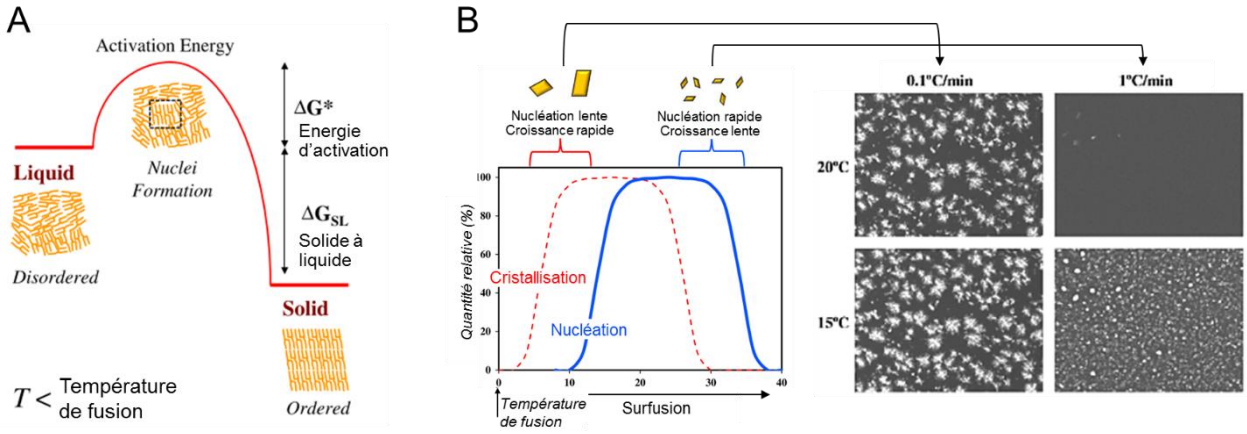


Figure 41 : Lien entre l'énergie à apporter et la cristallisation des TAG : (A) Barrière énergétique (en partie responsable de la surfusion) à passer pour permettre la nucléation (à partir de McClements, 2012) et (B) phénomène de cristallisation (nucléation ou croissance) favorisé selon la vitesse de refroidissement (exemple avec la MGLA) (à partir de McClements, 2012; Rye et al., 2005)

L'étape de nucléation demande de passer une barrière énergétique, ce qui est, en partie, à l'origine du phénomène de surfusion pendant la cristallisation. On parle de surfusion quand la température de début de cristallisation est inférieure à la température de début de fusion des cristaux (Marangoni and Wesdorp, 2012). Au cours d'un refroidissement lent, la zone de surfusion est dépassée lentement et la croissance de gros cristaux peu nombreux est favorisée. A l'inverse, lors d'un refroidissement rapide, cette zone est dépassée rapidement et c'est la nucléation de nombreux petits cristaux qui est favorisée. Par ailleurs, il existe plusieurs types de nucléation :

- La nucléation homogène, qui se produit en l'absence préalable de cristaux ;
- La nucléation hétérogène, qui s'effectue en présence d'un site de nucléation comme des mono et diglycérides, des poussières ou des cristaux. La présence de sites de nucléation permet la diminution de l'énergie d'activation de la nucléation.

Grâce à ses TAG, la matière grasse laitière possède les propriétés thermiques présentées en Figure 42. La diversité de ses TAG (p. 39) lui confère une large plage de fusion allant de 10 à 40 °C, avec plusieurs pics de fusion confondus. Il est possible d'en extraire sa fraction à bas point de fusion (oléine) et sa fraction à haut point de fusion (stéarine). Chacune de ces fractions présentent des morphologies de cristaux différentes.

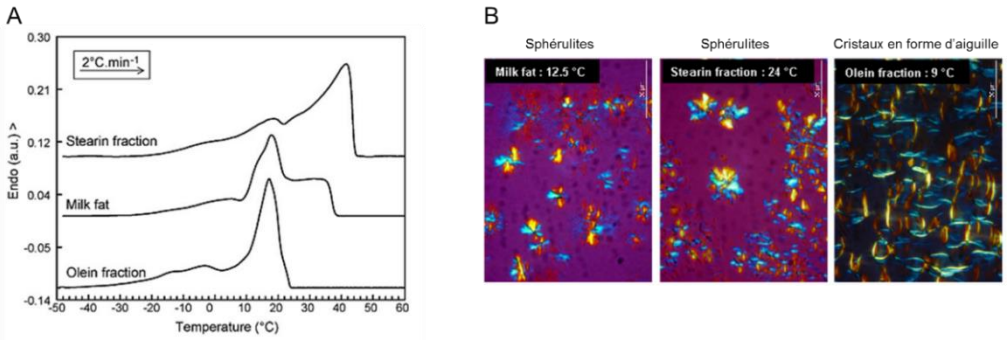


Figure 42 : (A) Fusion (DSC) de la MGLA, de sa fraction à haut point de fusion (stéarine) et de sa fraction à bas point de fusion (oléine) ; (B) Aspect des cristaux formés par la MGLA, la stéarine et l'oléine après un refroidissement à 1 °C.min^{-1} (Lopez and Ollivon, 2009)

Lorsque les types d'acides gras sont très différents, leur co-cristallisation entraîne la formation de cristaux mixtes, différents des cristaux qui seraient obtenus pour chacun des types d'acides gras séparément. Ce phénomène a été démontré par plusieurs auteurs dans le cas de la matière grasse laitière (Breitschuh and Windhab, 1998; Marangoni and Lencki, 1998; Mazzanti et al., 2009).

Structure et propriétés de la matière grasse laitière en émulsion

Dans le lait et dans le yaourt brassé riche en matière grasse, la matière grasse est sous forme de globules gras. La structuration des TAG au sein des globules gras et les facteurs qui l'impactent sont décrits dans cette partie. Il existe plusieurs études sur la matière grasse laitière mais certaines études sur d'autres types de TAG et d'acides gras ont aussi été prises en compte pour compléter l'état de l'art.

L'organisation de la matière grasse sous forme de globules gras lui impose (McClements, 2005) :

- *Un rayon de courbure*, qui représente une contrainte / gêne physique à la structuration des TAG sous forme de cristaux. Cette courbure est d'autant plus importante que les globules gras sont petits.
- *La présence d'une interface*, qui est de nature protéique ou phospholipidique (membrane native) dans le cas du lait et du yaourt brassé riche en matière grasse et qui peut interagir avec les TAG.
- *La pression de Laplace* (Equation 2, p. 42), qui dépend également du rayon des globules gras et retarde leur cristallisation. Plus les globules gras sont petits et plus la pression est forte.
- *La séparation des impuretés :* McClements (2012) montre que la probabilité de trouver des impuretés dans les globules gras diminue drastiquement quand leur diamètre diminue, et ce, quelle que soit la concentration initiale en impuretés (Figure 43).

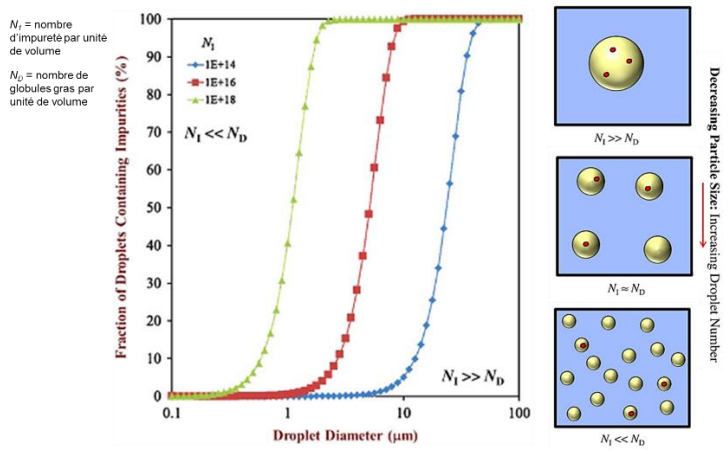


Figure 43 : Lien entre la réduction de la taille des globules gras et la probabilité de trouver des impuretés favorisant la nucléation dans les globules gras (McClements, 2012)

Finalement, la matière grasse laitière en émulsion a des propriétés de cristallisation et de fusion en partie différentes de la matière grasse laitière pure (Figure 44 A). La cristallisation de la crème se fait de façon continue entre 18 et 2 °C alors que celle de la MGLA pure présente deux évènements distincts de cristallisation, avec un premier pic autour de 18 °C et un deuxième pic plus large entre 16 et 4 °C. Les fusions de la MGLA pure et de la crème sont également légèrement différentes (Figure 44 B).

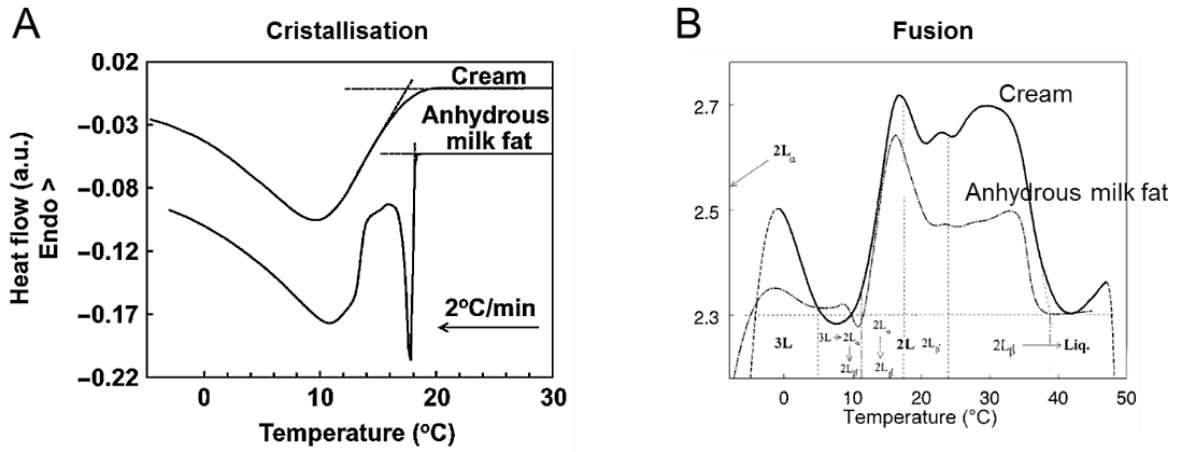


Figure 44 : (A) Suivi de la cristallisation et de la fusion de la MGLA pure (anhydrous milk fat) et en émulsion (cream) par DSC (à partir de Lopez et al., 2006) et (B) lien entre la température de fusion et la fonte des polymorphismes obtenue en DRX (à partir de Lopez et al., 2000)

D'après Coupland (2002), les mécanismes de cristallisation des TAG au sein des globules gras sont complexes à comprendre et à prédire précisément puisqu'ils peuvent varier d'un globule gras à un autre, notamment parce que la distribution des impuretés n'est pas homogène. Dans leur revue, Fredrick et al. (2010) exposent d'ailleurs une classification des globules gras du lait selon leur cristallisation (montrée en Figure 48). Cette dernière symbolise la diversité des mécanismes de cristallisation possibles : en aiguille, stratifiée ou encore mixte.

Néanmoins, la littérature fournit des éléments de compréhension plus précis sur ces mécanismes de cristallisation. Campbell et al. (2004) ont travaillé sur la modélisation de la nucléation au sein du globule gras et ont montré que la nucléation était principalement homogène. Douaire et al. (2014) ont également expliqué que l'interface joue le rôle d'impureté et permet la nucléation de cristaux. Ils expliquent qu'en fonction de la nature de l'interface, les cristaux en croissance peuvent plus ou moins interagir avec l'interface. Ogden and Rosenthal (1997) ont montré que lorsque l'interface est composée de protéines, il peut y avoir une interaction entre les TAG cristallisés et les peptides hydrophobes. En couplant les techniques complémentaires de *differential scanning calorimetry* (DSC), DRX et RMN (résonnance magnétique nucléaire), Fredrick et al. (2011) ont démontré, de manière plus précise, les étapes de cristallisation de globules gras de matière grasse laitière (5 µm) stabilisés par des protéines laitières au cours d'un refroidissement rapide (65 à 5 °C à 30 °C.min^{-1}) :

- Pendant le refroidissement de 65 à 5 °C : $liquide \rightarrow \alpha\ 2L + liquide$
- Première étape de cristallisation à 5 °C (isotherme) : $\alpha\ 2L + liquide \rightarrow \alpha\ 3L + liquide$
- Deuxième étape de cristallisation à 5 °C (isotherme) : $\alpha\ 3L + liquide \rightarrow \beta' 2L' + \alpha\ 3L' + liquide$

La cristallisation des TAG au sein des globules gras est importante car elle détermine le taux de cristaux présents (solid fat content, SFC) et leur(s) forme(s) à une température donnée. Ces propriétés influencent la fusion et la stabilité (Figure 45) des globules gras ainsi que leurs propriétés mécaniques.

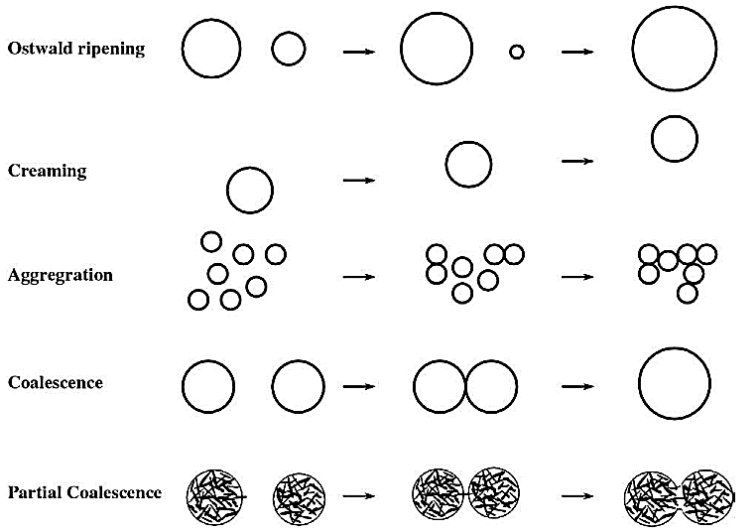


Figure 45 : Représentation schématique des différents mécanismes possibles de déstabilisation d'une émulsion H/E (Fredrick et al., 2010)

Facteurs impactant les propriétés des globules gras

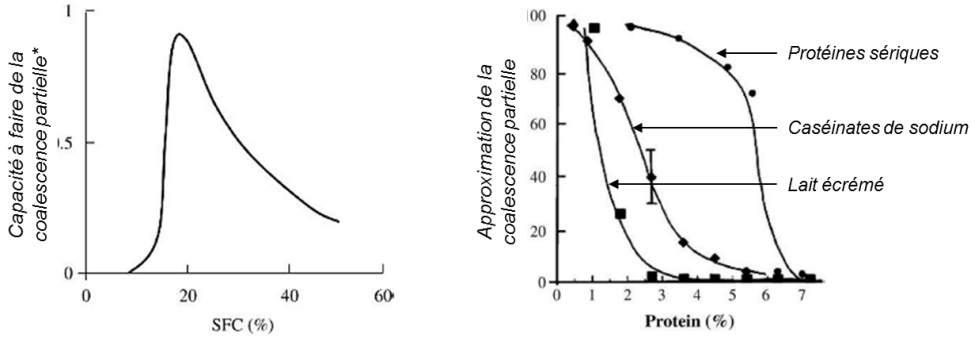
La littérature fait état de plusieurs facteurs qui impactent les propriétés thermiques, mécaniques et la stabilité des globules gras (Fredrick et al., 2010; McClements, 2012, 2005) :

- La composition de la matière grasse et la composition de l'interface
- La distribution de taille des globules gras
- Les variations de températures via la vitesse de refroidissement et le tempérage

Impact de la composition de l'interface et de la matière grasse

Plusieurs études apportent des informations sur l'impact de la composition de l'interface sur les propriétés thermiques des émulsions. Fredrick et al. (2013) ont montré que la longueur des monoglycérides adsorbés à l'interface impacte les mécanismes de formation des cristaux. Si les monoglycérides sont constitués de longues chaînes aliphatiques, ils ont tendance à favoriser la nucléation à l'interface et à diminuer la température de début de cristallisation. S'ils sont composés de chaînes plus courtes, ils facilitent le passage de la forme α à β'. Une étude menée par Palanuwech and Coupland (2003) a aussi montré que la nature des protéines interfaciales impacte le début de la cristallisation, avec une température plus basse pour les protéines sériques natives que les protéines sériques agrégées et les caséinates de sodium. Truong et al. (2015, 2014) ont également montré qu'une interface constituée de caséinates de sodium facilite la cristallisation et aboutit à un SFC plus élevé, par rapport à une interface composée de protéines sériques. Les propriétés thermiques des globules gras dépendent également de leur composition en acides gras et Bugeat et al. (2011) ont montré qu'un plus grand nombre d'insaturations dans des globules gras de matière grasse laitière favorise la formation de l'organisation 2L, augmente le nombre de formes β (par opposition à la forme β') et diminue le SFC.

Vanapalli et al. (2002) ont démontré que les TAG favorisent généralement la destabilisation des émulsions H/E du fait de leur large plage de fusion qui laissent le temps aux globules gras d'intéragir. Dans leur revue sur les facteurs qui sont suceptibles de destabiliser des émulions H/E, Fredrick et al. (2010) ont rapporté que la coalescence partielle est favorisée par un SFC compris entre 20 et 50% (Figure 46). Ils ont également expliqué que la résistance du film interfacial protéique, qui dépend à la fois du type de protéine(s) et de leur(s) concentation(s) à l'interface, est essentiel pour lutter contre la coalescence totale ou partielle (Figure 46). Palanuwech and Coupland (2003) ont d'ailleurs montré que les protéines sériques sont moins résistantes à la coalescence totale ou partielle des globules gras que les caséinates de sodium.



* La capacité à coalescer dépend – en partie – de la probabilité de rencontre

Figure 46 : Impact de la composition des globules gras en matière grasse et de la composition de l'interface sur la stabilité (coalescence partielle) de mélanges huiles de coco et de palme d'une émulsion H/E (à partir de Fredrick et al., 2010)

Peu d'études démontrent cependant l'impact des compositions de l'interface et de la matière grasse sur les propriétés mécaniques des globules gras. Certains auteurs ont fait varier la rigidité des globules gras[6] en augmentant leur SFC via l'utilisation de différentes matières grasses animales ou végétales (TAG) telles que la graisse de porc, la graisse de bœuf, le beurre de cacao, la matière grasse laitière ou l'huile de tournesol (Liu et al., 2015; Oliver et al., 2015b). Sans le démontrer à proprement parler, ils ont indirectement montré qu'un SFC plus élevé augmente la rigidité des globules gras. Dans leur revue, Kim & Mason (2017) ont raporté que l'interface peut également modifier la déformabilité des globules gras.

Impact de la taille des globules gras

La taille des globules gras est un facteur essentiel qui impacte surtout les propriétés thermiques et mécaniques des globules gras. Dans une première étude, Truong et al. (2014) ont étudié l'impact de la taille de globules gras laitiers allant de 1,4 à moins de 0,2 µm. Ils ont montré que sous l'effet d'une plus grande pression de Laplace dans de plus petits globules gras, la surfusion est plus importante (température de début de la cristallisation plus basse) et le SFC plus bas. Des auteurs expliquent cette surfusion plus importante par une diminution du taux de nucléation (Campbell et al., 2004) et par une croissance des cristaux limitée (Lopez et al., 2002) dans des plus petits globules gras. Dans une seconde étude, Truong et al. (2015) ont prouvé que la taille des globules gras affecte la structure et la proportion des différents cristaux ainsi que la morphologie des globules gras (Figure 47). Dans les plus petits globules gras, les cristaux étaient plutôt de type 2L que 3L, et d'autant plus pour l'oléine (plus longues chaînes aliphatiques dans les TAG) que pour la stéarine. Cela a également été demontré par Bugeat et al. (2011) et Lopez et al (2002) ont montré que les cristaux formés dans de petits globules gras sont aussi plus désordonnés (formes α et β').

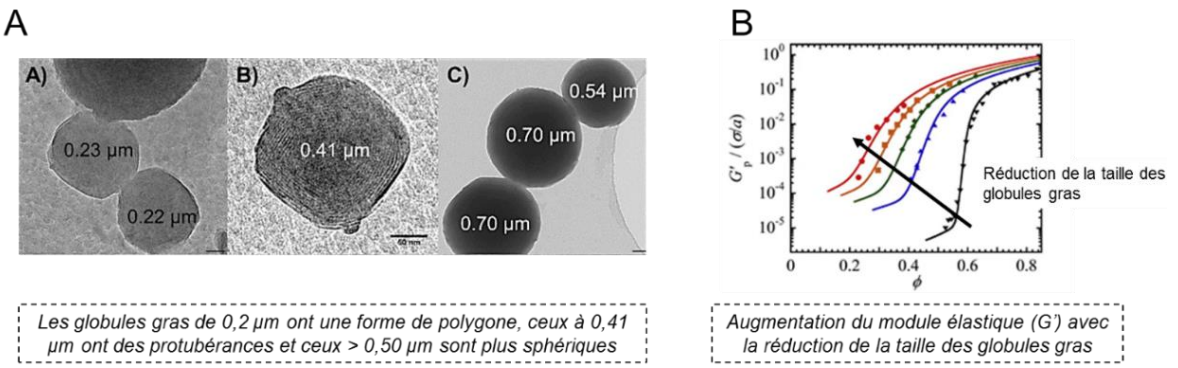


Figure 47 : Impact de la taille des globules gras sur (A) la morphologie de globules gras cristallisés de stéarine (laitière) (à partir de Truong et al., 2015) et (B) sur les propriétés rhéologiques (à partir de Kim and Mason, 2017)

[6] *La rigidité des globules gras est estimée par les auteurs via les propriétés rhéologiques du produit fini (émulsion gélifiée).*

Par ailleurs, Kim & Mason (2017) rapportent l'impact de la taille des globules gras sur les propriétés rhéologiques des émulsions H/E et donc sur la déformabilité de ces derniers (Figure 47). Plus spécifiquement, ils expliquent que l'augmentation de la pression de Laplace dans de plus petites globules gras a tendance à augmenter leur « rigidité » et diminuer leur déformabilité.

Impact des variations de température

Les variations de température sont également un facteur clé. Dans la littérature, on trouve principalement des études sur l'effet de la vitesse de refroidissement et du tempérage sur les cristaux formés, sur les propriétés thermiques et sur la stabilité des globules gras. Il n'existe pas d'étude qui s'intéresse spécifiquement à l'influence des variations de température sur les propriétés mécaniques des globules gras.

Lopez et al. (2002) ont étudié l'impact de la vitesse de refroidissement sur la cristallisation de globules gras de matière grasse laitière stabilisés par des β-LG (Figure 48). Ces auteurs ont montré que plus la vitesse de refroidissement est rapide et plus la taille des cristaux au sein des globules gras est petite. Cela est notamment dû à une surfusion de la matière grasse, alors plus importante (Truong et al., 2014).

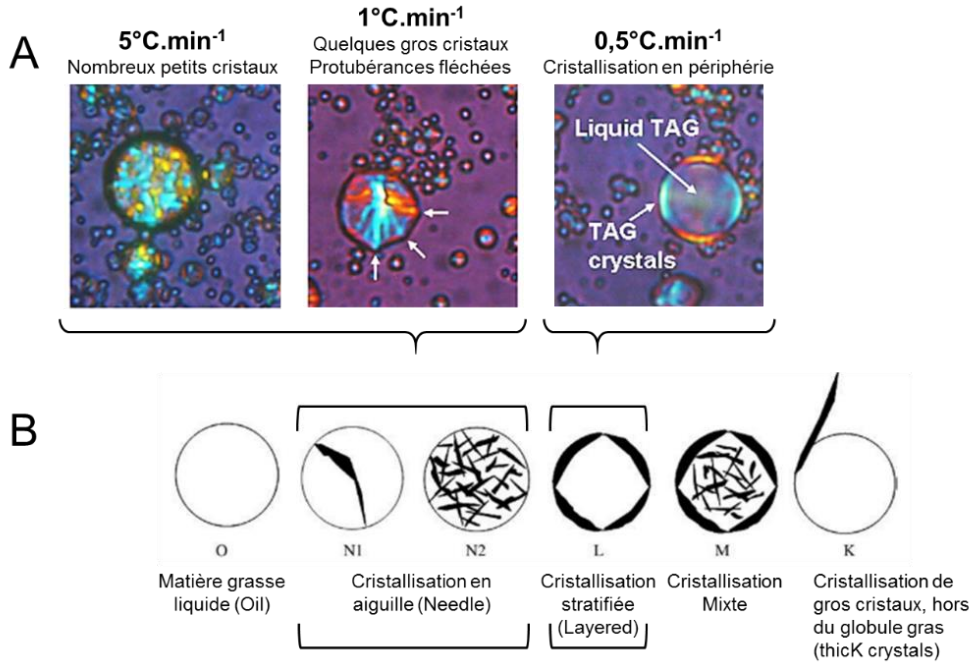


Figure 48 : (A) Impact de la vitesse de refroidissement sur la cristallisation de globules gras stabilisés par de la membrane native (lait natif) (à partir de Lopez, 2011) et (B) comparaison avec la classification des globules gras (du lait) en fonction de leur cristallisation proposée par Walstra en 1967 (à partir de Fredrick et al., 2010)

Plusieurs auteurs ont étudié l'effet du tempérage (Figure 49). De manière générale, ce dernier augmente le risque de coalescence partielle car il permet aux plus gros cristaux, pouvant percer l'interface et faire du pontage avec d'autres globules gras, de s'installer préferentiellement à l'interface (Moens et al., 2016).

De plus, la coalescence totale ou partielle des globules gras sous l'effet du tempérage est facilitée lorsque la vitesse de refroidissement est plus rapide (Vanapalli et al., 2002).

Les protéines et la matière grasse laitières peuvent faire varier les propriétés de systèmes laitiers tels que le yaourt brassé et de nombreux facteurs physico-chimiques peuvent modifier les propriétés de ces ingrédients. L'ensemble des facteurs identitiés sont interdépendants. Au vu de la complexité du yaourt brassé riche en matière grasse et de son procédé de fabrication, il est important de comprendre le lien multi-échelle qui existe

entre la composition, la structure et les propriétés macroscopiques pour pouvoir mettre en place la bonne stratégie expérimentale et avoir une bonne maîtrise des effets aux différentes échelles.

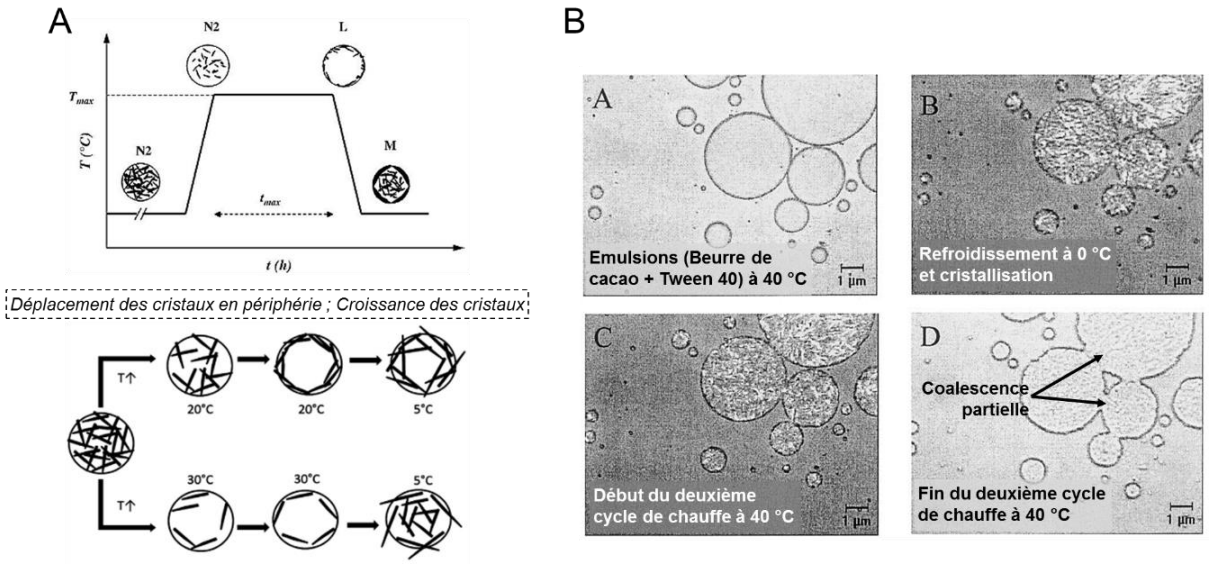


Figure 49 : Impact du tempérage (maintien d'une température ou cycles de variation de la température) sur (A) la cristallisation des globules gras (à partir de Fredrick et al., 2010; Moens et al., 2016) et (B) sur la stabilité des émulsions H/E (coalescence partielle) (à partir de Vanapalli et al., 2002)

1.3. Relation entre composition, structure et propriétés macroscopiques des yaourts brassés riches en matière grasse

Cette partie a pour objectif de faire le point sur les travaux qui font le lien entre la composition, la structure et les propriétés macroscopiques (instrumentales et sensorielles) des yaourts brassés riches en matière grasse, en rapport avec leur texture crémeuse. Il y a peu d'études consacrées aux yaourts brassés contenant de la matière grasse qui mettent en lien les propriétés aux différentes échelles. Les études sur les systèmes assimilés[7] qui apportent des informations pertinentes sont donc prises en compte pour compléter l'état de l'art.

1.3.1. Contribution de la matière grasse aux propriétés macroscopiques des yaourts gras

Plusieurs questions peuvent se poser sur les propriétés macroscopiques – sensorielles et instrumentales – des yaourts brassés et autres systèmes assimilés[6], en fonction de leur teneur en matière grasse. La littérature apporte des informations sur ces propriétés et étudie également le lien qui existe entre les propriétés sensorielles et instrumentales.

Impact de la matière grasse sur les propriétés sensorielles et le crémeux

Plusieurs auteurs ont mesuré l'impact de la matière grasse sur les propriétés sensorielles des yaourts brassés. Tout d'abord, Le Calvé et al. (2015) ont démontré que la perception d'une variation de la teneur en matière grasse dépend fortement de la matrice. Elle est notamment plus perceptible pour des aliments à hautes viscosités (comme les yaourts brassés) que pour des aliments liquides (tels que le lait). Pour des yaourts brassés, Tomaschunas et al. (2012) ont montré que les principaux attributs sensoriels liés à la matière grasse sont *creamy taste*[8], *creamy texture*[9], *visual viscosity*[10], *visual texture*[11], et *fatty mouth feel*[12]. La matière grasse a donc un impact à la fois sur le visuel, sur l'aromatique et sur la texture.

La notion de crémeux regroupe différents termes sensoriels en lien avec la perception de la matière grasse (de Wijk et al., 2006). Différentes études ont cherché à définir le crémeux pour des matrices de type yaourt. Les définitions suivantes ont été proposées au cours des vingt-cinq dernières années :

- « *Creaminess is the perceptual integration of thickness contributed by viscosity and one or more physical attributes of dairy creams that contribute a sensation of smoothness* » (Richardson and Booth, 1993)
- « *Creaminess consists of a range of sensations typically associated with fat content, such as full and sweet taste, compact, smooth, not rough, not dry, with a velvety (not oily) coating. Food disintegrates at a moderate rate* » (de Wijk et al., 2006)
- « *Smooth texture, rather thick, but which behaves like a fluid product when slightly pushing the tongue against the palate* » (Cayot et al., 2008)
- « *The word creamy describes a mouthfeel characteristic 'possessing the textural property producing the sensation of the presence of a miscible, thick, smooth liquid in the oral cavity'* » (Dickinson, 2018)

[7] *Ils correspondent aux laits acidifiés, cream cheese, émulsions gélifiées modèles et yaourts brassés ou fermes contenant plus ou moins de matière grasse. Leurs définitions sont précisées en p. 77 (bas de page).*
[8] *Degree of perceived flavour associated with fresh dairy cream.*
[9] *Personal definition of creaminess in the mouth, associated with gloss, smoothness and a higher viscosity.*
[10] *Visible flow resistance, from thin to thick.*
[11] *Flow resistance in the mouth, from thin to thick.*
[12] *Amount of fat perceived in the mouth/ fatty film that covers the mouth/throat.*

Plusieurs auteurs ont également montré la corrélation du terme crémeux avec d'autres attributs sensoriels. Ciron et al. (2011) ont démontré que le terme *creaminess*, employé pour des yaourts, est corrélé à des attributs sensoriels d'apparence (*viscous* et *smooth*), de saveur et de texture (*viscous*, *firm*, *velvety*, *cohesive*, *thick*). Dans leur revue portant sur des produits de type yaourt brassé, Frøst and Janhøj (2007) ont rapporté que le terme *creaminess* est lié aux termes *smoothness* et *viscosity*. Janhoj et al. (2009) ont, quant à eux, montré que le terme *creaminess* est correlé aux attributs *oral firmness* et *oral graininess* pour des produits de type cream cheese (Figure 50).

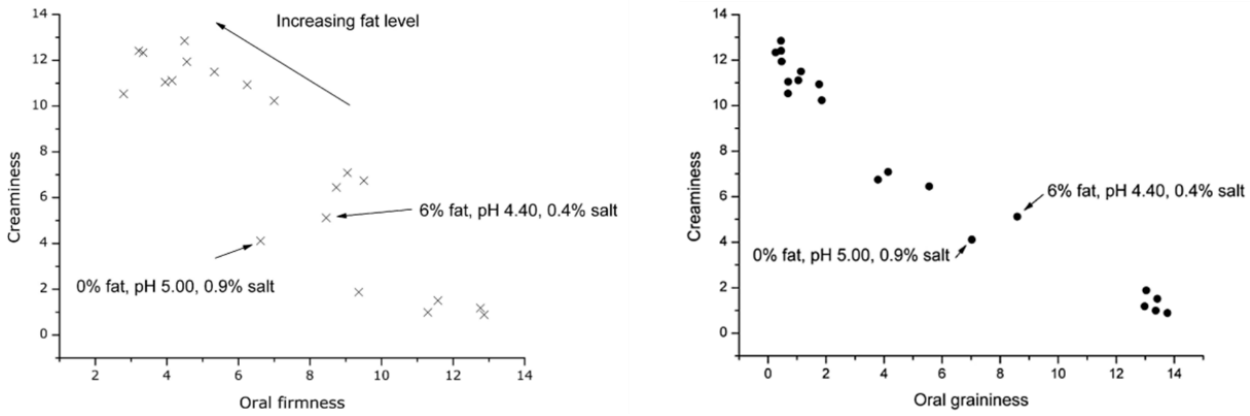


Figure 50 : Corrélation du terme crémeux (creaminess) avec d'autres attributs sensoriels de texture caractérisant des produits de type cream cheese (Janhoj et al., 2009)

Le terme *crémeux* (*creaminess*) est donc largement utilisé dans la littérature mais il est intégrateur et a des répercussions sur plusieurs modalités sensorielles. Ce terme est aussi lié à plusieurs étapes du processus oral (*firmness/viscosity ; smoothness/graininess ; mouthfeel*). Il est donc difficile de s'en servir comme moyen direct de mesure. Il est nécessaire de passer par des mesures plus précises des caractéristiques en lien avec la matière grasse pour un système d'étude donné.

Rôle de la matière grasse évalué par des mesures instrumentales qui prennent en compte le *processus oral*

Mortazavian et al. (2009) ont dressé le bilan de toutes les caractérisations instrumentales faites sur les yaourts brassés en discutant de leur capacité à améliorer la qualité et la texture de ces derniers.

Des mesures rhéologiques (contrainte à 100 s^{-1}, 10 °C) et tribologiques (coefficient de friction, 10 °C) ont été combinées par Liu et al. (2015) pour caractériser des émulsions gélifiées modèles et par Sonne et al. (2014) pour caractériser des yaourts brassés. Ces auteurs ont comparé les mesures instrumentales avec les propriétés sensorielles pour i) valider leur pertinence par rapport au processus oral et ii) étudier les phénomènes physiques et sensoriels qui se produisent au fur et à mesure du processus oral.

Si la tribologie et la rhéologie se complètent et sont pertinentes pour se rapprocher du processus oral, Huc et al. (2016) ont également montré – pour des yaourts brassés – qu'il est important de prendre en compte le changement de température au plan instrumental.

La Figure 51 synthétise les travaux de ces différents auteurs en faisant le lien entre les étapes du processus oral, les attributs sensoriels et les conditions instrumentales.

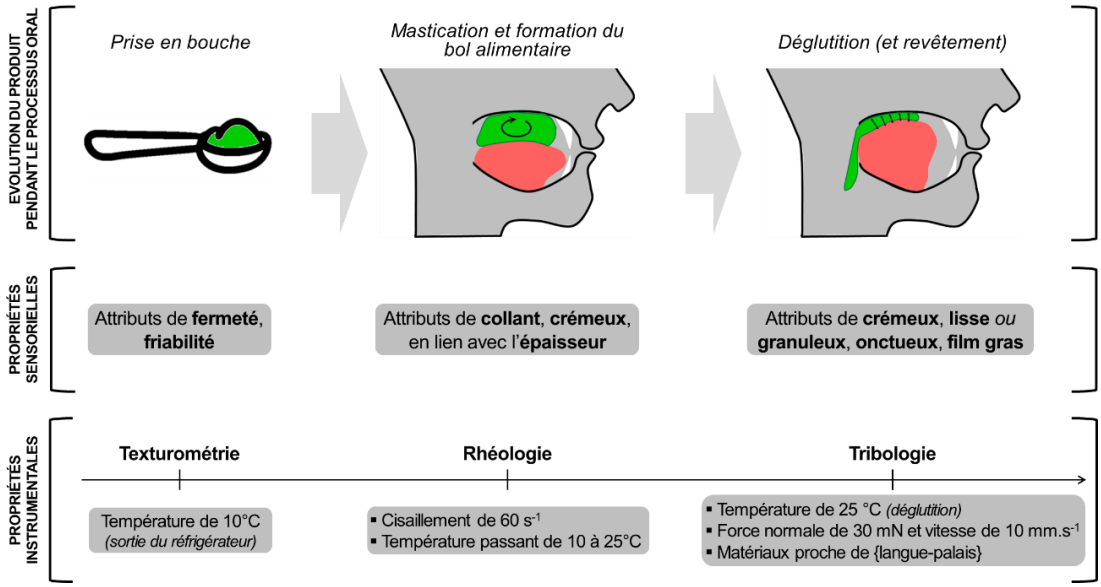
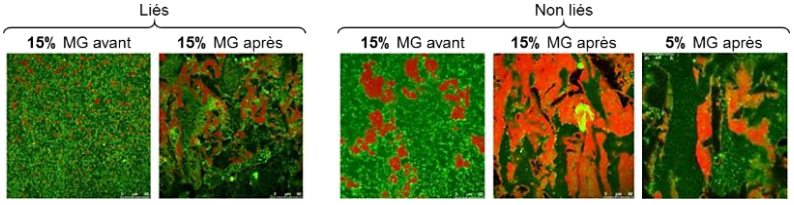


Figure 51 : Différentes étapes du processus oral (langue en ■) d'un produit de type yaourt (■) et lien avec les attributs sensoriels (à partir de Liu et al., 2015; Sonne et al., 2014) et les mesures instrumentales (à partir de Huc et al., 2016; Mortazavian et al., 2009).

Les mesures rhéologiques et tribologiques, parfois associées à de la microscopie, ont été utilisées par plusieurs auteurs pour évaluer le rôle de la matière grasse dans des yaourts brassés et autres systèmes assimilés. Le Tableau 7 en fait la synthèse.

Tableau 7 : Utilisation des propriétés instrumentales pour comprendre le rôle de la matière grasse et son évolution dans des conditions pertinentes par rapport au processus oral (Chojnicka-Paszun et al., 2012; Ciron et al., 2011; Liu et al., 2015; J A Lucey et al., 1998; Sala et al., 2008; Sonne et al., 2014)

Mesure instrumentale	Système	Variation avec une augmentation de la teneur en matière grasse	Rôle et évolution de la matière grasse
Rhéologie	Lait gélifié ferme (GDL)	Augmentation du module conservatif	▫ Participation des globules par interaction avec le réseau protéique via l'interface et renforcement de la texture (consistance)[13] ▫ Participation par encombrement
	Yaourt brassé (ferments)	Augmentation du module conservatif	
	Emulsion gélifiée modèle	▫ Augmentation nette du module conservatif et du module d'Young quand les globules gras sont liés ; Effet moins net quand non liés ▫ Augmentation de la contrainte de rupture quand les globules gras sont liés ; Diminution quand non liés ▫ Diminution de la déformation de rupture ; Effet moins net quand non liés	
Tribologie	Lait et crème	Diminution du coefficient de friction *Coefficients de friction bien distincts : 2% < teneur en matière grasse < 7%* *Coefficients de friction difficile à distinguer : teneur en matière grasse < 2% ou > 7%*	▫ Les globules gras forment un film gras par coalescence sous friction ▫ Ce phénomène est renforcé quand ils sont non liés
	Yaourt brassé (ferments)	Diminution du coefficient de friction	
	Emulsion gélifiée modèle	▫ Diminution du coefficient de friction ▫ Coefficient de friction plus bas quand les globules gras sont non liés	
Microscopie confocale *avant/après cisaillement par tribologie*	Emulsion gélifiée modèle		

[13] *Les globules gras sont dit « liés » quand ils interagissent avec le réseau protéique via l'interface et « non liés » quand ils n'interagissent pas.*

1.3.2. Relation entre la structure et les propriétés instrumentales des yaourts brassés riches en matière grasse aux *différentes échelles*

De nombreux travaux étudient le lien entre la structure des systèmes dispersés et leurs propriétés instrumentales. Cette partie vise à :

- Identifier les éléments importants à prendre en compte dans la structure pour moduler les propriétés de texture des yaourts brassés riches en matière grasse ;
- Faire le point sur les travaux dans lesquels la structure des yaourts brassés (et systèmes assimilés) a été modifiée pour faire varier leurs propriétés macroscopiques.

Relation entre la structure et les propriétés de texture : *Quels paramètres prendre en compte aux différentes échelles ?*

Les yaourts brassés riches en matière grasse peuvent être considérés comme des systèmes dispersés à plusieurs échelles puisque :

- Ce sont des dispersions concentrées de microgels entourés de sérum ;
- Où chaque microgel est une émulsion gélifiée, avec des globules gras dispersés dans réseau protéique.

C'est la structuration aux différentes échelles qui permet d'obtenir les propriétés finales du produit.

Structuration et propriétés de la dispersion concentrée de microgels

Les propriétés rhéologiques d'un système dispersé dépendent de la fraction volumique des éléments dispersés (particules) (Figure 52). Lorsqu'un système dispersé est dilué, ce sont principalement les propriétés de la phase continue qui pilotent ses propriétés rhéologiques à l'échelle macroscopique. Quand le système dispersé est concentré, ce sont les propriétés des particules qui pilotent alors ses propriétés rhéologiques à l'échelle macroscopique.

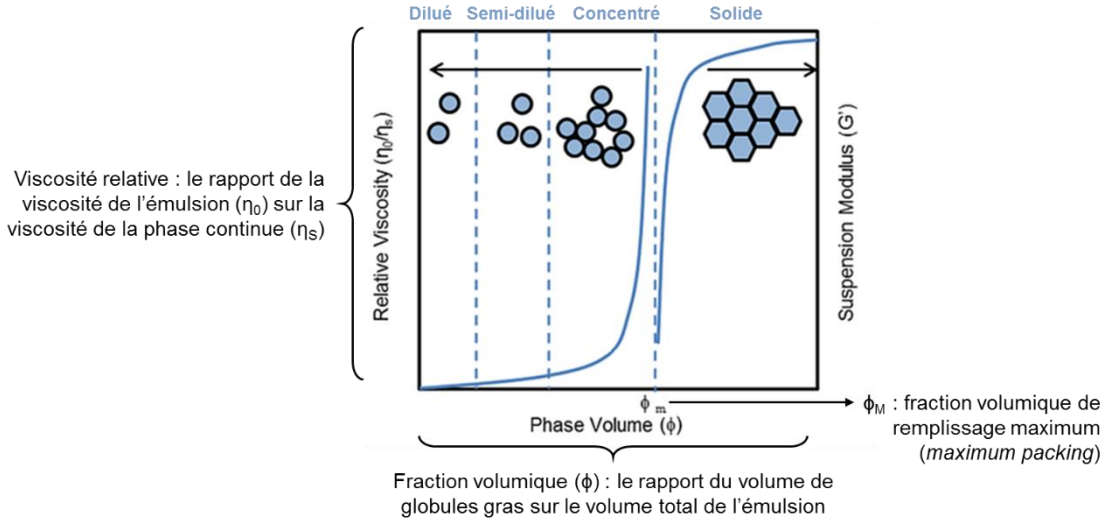


Figure 52 : Relation entre les propriétés rhéologiques et la fraction volumique d'éléments dispersés déformables (microgels ou globules gras) (à partir de Shewan and Stokes, 2014) (en haut)

Comme le yaourt brassé est une dispersion concentrée de microgels, les caractéristiques des microgels vont impacter ses propriétés rhéologiques. Dans leur revue, Shewan and Stokes (2013) ont fait le point sur l'ensemble des caractéristiques des microgels (particules molles de micro-hydrogels de polymères) qui ont un impact sur leur structure et sur les propriétés macroscopiques du produit (dispersion concentrée) (Figure 53).

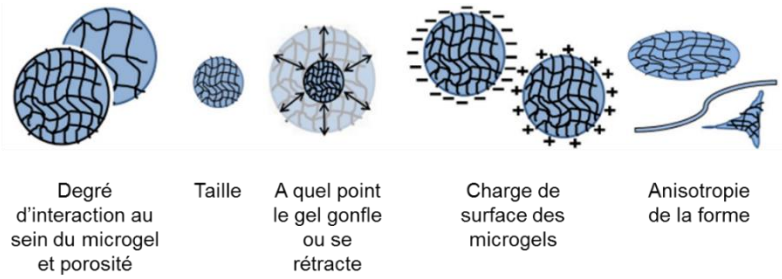


Figure 53 : Caractéristiques qui peuvent être modifiées pour moduler les propriétés macroscopiques des dispersions concentrées de microgels (Shewan and Stokes, 2013)

La taille des microgels, leur polydispersité, leur déformabilité (porosité et degré d'interaction au sein des microgels, leur degré de gonflement) et leurs interactions mécaniques (forme, rugosité) ou chimiques (charges de surface des microgels, potentiel d'interaction des ingrédients qui constituent les microgels) ont tous un impact sur les propriétés macroscopiques des dispersions concentrées (Quemada, 2006; Shewan and Stokes, 2013).

A même fraction volumique, des microgels plus petits augmentent la viscosité (ou le module conservatif) de la dispersion. De même, à même fraction volumique, des microgels plus monodisperses, plus rigides (c'est-à-dire moins déformables) ou en plus forte interaction augmentent la viscosité (ou le module conservatif) de la dispersion.

De plus, les microgels ne sont pas sphériques, et la forme des éléments dispersés est également un facteur important, qui influence les propriétés rhéologiques de la dispersion concentrée (Figure 54). A même concentration, une dispersion concentrée de microgels sphériques a une viscosité relative plus faible qu'une dispersion concentrée de microgels en forme de bâtonnets. De plus, les irrégularités de surface (rugosité) des microgels peuvent augmenter le potentiel d'interaction entre les microgels et ainsi impacter les propriétés macroscopiques des dispersions concentrées.

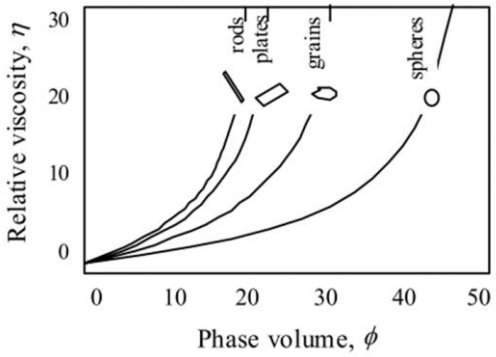


Figure 54 : Impact de la forme des particules (microgels) sur les propriétés rhéologiques d'une dispersion (Barnes, 2000)

La phase continue, constituée de sérum, peut également avoir un impact sur les propriétés rhéologiques puisqu'elle favorise ou non les interactions entre les microgels, en fonction de sa composition (pH, force ionique, ions présents, lactose, exopolysaccharides, etc.) et de sa viscosité (Shewan and Stokes, 2013).

En dehors des propriétés rhéologiques, les microgels ont aussi un impact sur les propriétés tribologiques. Chojnicka et al. (2009) a fait le lien entre le coefficient de friction et les caractéristiques de la phase continue et des microgels (taille, déformabilité, forme, polydispersité).

Pour un même brassage, les propriétés intrinsèques d'un microgel dépendent directement de sa structure, qui correspond à une émulsion gélifiée.

Structuration et propriétés de l'émulsion gélifiée (au sein des microgels)

La structure et les propriétés des émulsions gélifiées dépendent principalement des interactions entre les ingrédients. Ces interactions dépendent à la fois de :

- la quantité de protéines (participant au réseau protéique) et de globules gras qui peuvent interagir (Houzé et al., 2005) ;
- leur compatibilité structurelle, c'est-à-dire la taille des pores du réseau protéique versus la taille des globules gras (M. C. Michalski et al., 2002) ;
- la quantité et la nature des interactions potentielles (Houzé et al., 2005; Sala et al., 2007; Shewan and Stokes, 2013).

La Figure 55 illustre le lien qui existe entre les interactions et la structure d'émulsions gélifiées laitières.

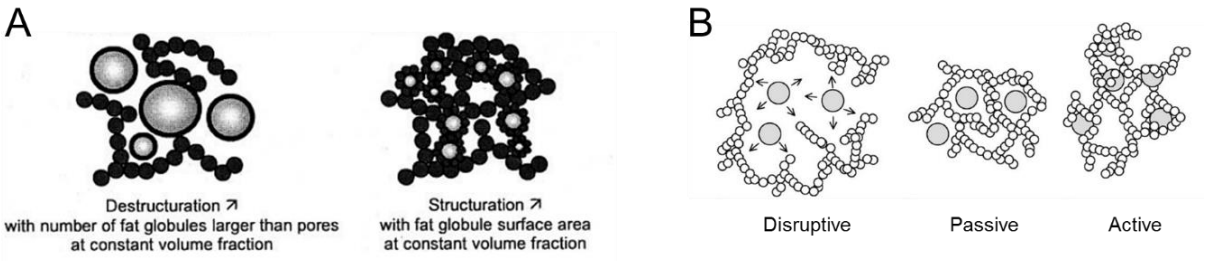


Figure 55 : Interactions entre la phase dispersée et la phase continue au sein d'une émulsion gélifiée : (A) Interactions en fonction de la compatibilité entre la taille des globules gras et celle du réseau protéique (Michalski et al., 2002) ; (B) Illustration des différents types d'interactions possibles (Houzé et al., 2005)

Plusieurs auteurs ont également relié les interactions entre les ingrédients (protéines laitières notamment) avec la dimension fractale (Andoyo et al., 2015; van Marle et al., 1999). La dimension fractale permet notamment de quantifier des différences dans la structuration de différentes matrices en évaluant leur taux de remplissage. Elle complète ainsi les analyses classiques de la microstructure par microscopie, rhéologie et/ou tribologie. Pour des gels ou des agrégats de protéines laitières, la dimension fractale est généralement comprise entre 2,0 et 2,7 (Andoyo et al., 2015; Cayot and Lorient, 1998; Vétier et al., 2003a) et dépend des protéines qui s'agrègent, de leur concentration et des conditions physico-chimiques de leur environnement. La Figure 56 donne des exemples de l'aspect d'agrégats en fonction de leur dimension fractale. La dimension fractale est aussi liée à la sphéricité d'un agrégat et elle vaut 3,0 pour un agrégat sphérique (Botet, 2001).

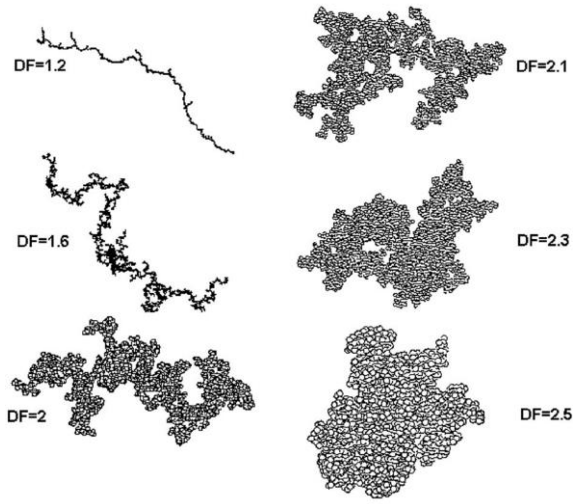


Figure 56 : Projections 2D de différents agrégats constitués de 4096 particules et ayant différentes dimensions fractales (obtenues par simulation informatique) (Thouy and Jullien, 1996)

En dehors des propriétés rhéologiques, les interactions entre les globules gras et le réseau protéique influencent également les propriétés tribologiques, c'est-à-dire la capacité de la matrice à lubrifier des surfaces en contact. Dans leur étude, Chojnicka, Sala, de Kruif, & van de Velde (2009) ont notamment démontré que le coefficient de friction est plus faible lorsque les globules gras n'interagissent pas (non liés) avec la matrice protéique que quand il interagissent (liés) via l'interface. Les globules gras non liés seraient libérés de la matrice au moment du cisaillement pouvant ainsi former un film gras lubrifiant.

Outre leurs interactions avec le réseau protéique, les globules gras peuvent également impacter les propriétés des microgels en fonction de leur propriétés intrinsèques et de leur agrégation. Les interactions entre les globules gras dépendent beaucoup de leurs propriétés de surface (Figure 57) et de leur SFC. En fonction de ces propriétés, ces derniers vont plus ou moins interagir par agrégation ou coalescence partielle.

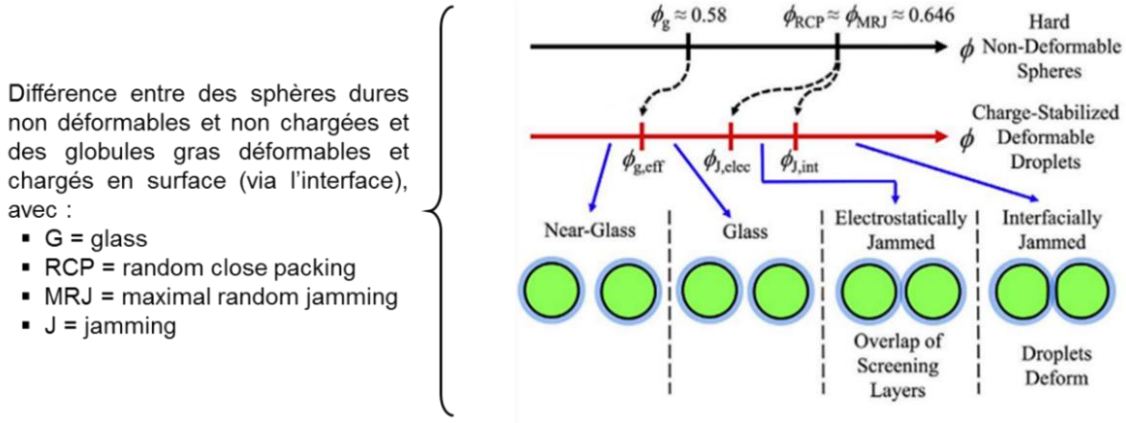


Figure 57 : Différentes fractions volumiques de remplissage maximum (ou fraction volumique d'encombrement) pour des sphères dures et non chargées, et pour des gouttelettes déformables et stabilisées par une interface chargée (à partir de Kim and Mason, 2017) (en bas)

Dans leur travaux sur les yaourts brassés, Huc et al. (2016) ont montré que les globules gras peuvent se concentrer dans des zones sous forme d'agrégats / clusters (Figure 58). Sur des émulsions gélifiées modèles, Oliver et al. (2015a) ont montré que la rigidité (module d'Young) est plus élevé lorsque les globules gras sont agrégés que quand ils sont individuels.

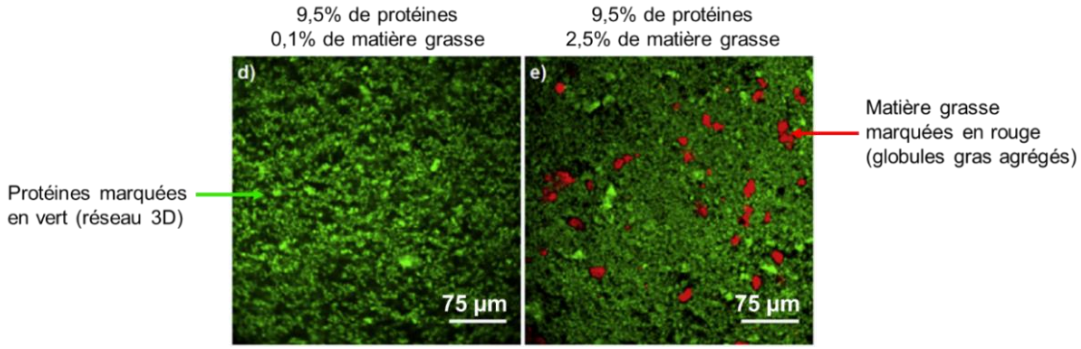


Figure 58 : Microstructures de yaourts brassés avec ou sans matière grasse observées en microscopie confocale à balayage laser (à partir de Huc et al., 2016)

La taille, la polydispersité et la déformabilité/rigidité des globules gras impactent également les propriétés rhéologiques des émulsions et des émulsions gélifiées (Kim and Mason, 2017; Oliver et al., 2015a; Sala et al., 2007) :

– Outre le fait que la taille impacte directement les propriétés intrinsèques des globules gras (pression de Laplace), plus ces derniers sont petits et plus la surface interfaciale est grande. Le potentiel d'interaction entre les globules s'en trouve alors augmenté.

– Un volume de globules gras monodisperses remplit plus d'espace qu'un même volume de globules gras polydisperses. A même fraction volumique, la viscosité d'une émulsion de globules gras polydisperses est plus faible qu'avec des globules gras monodisperses.
– Des globules gras plus déformables s'adaptent à l'espace. A même fraction volumique, la viscosité d'une émulsion de globules gras déformables est plus faible qu'avec des globules gras rigides.

Leviers permettant de moduler la structure et les propriétés macroscopiques des yaourts brassés riches en matière grasse

Plusieurs auteurs ont modifié la structure de systèmes plus ou moins modèles pour étudier son impact sur les propriétés macroscopiques. Cette partie reprend les leviers testés dans la littérature pour moduler la structure à différentes échelles, depuis les globules gras jusqu'aux microgels.

Tout d'abord, il existe plusieurs études qui s'intéressent aux propriétés intrinsèques des globules gras. Le Tableau 8 propose une synthèse des différents leviers utilisés dans la littérature pour moduler ces propriétés et analyser leur(s) effet(s) sur les propriétés macroscopiques de systèmes assimilés à des yaourts brassés.

Tableau 8 : Leviers utilisés dans la littérature pour moduler les propriétés de structure des globules gras et impact sur les propriétés macroscopiques ; (C) Composition ; (P) Procédé ; (F) Formulation – ***du nanomètre à quelques micromètres***

Propriété de structure modifiée	Levier	Impact sur les propriétés macroscopiques	Système étudié	Référence(s)
Réduction de la taille des globules gras *(≈ facteur 10)*	Homogénéisation haute pression (P) *jusqu'à environ 10^4 bar*	↗ consistance[14]	Lait acidifié[15]	(Ji et al., 2011)
			Cream cheese[16]	(Coutouly et al., 2014)
			Emulsions gélifiées modèles[17]	(Sala, van Vliet, Cohen Stuart, van de Velde, & van Aken, 2009)
		↗ perception du crémeux et du gras et fermeté en bouche	Emulsions gélifiées modèles	(Kilcast and Clegg, 2002)
	Ultrasons (P) *jusqu'à 100 W pendant 30 min*	↗ consistance	Cream cheese	(Almanza-Rubio et al., 2015)
Augmentation du taux de solide (SFC) *(jusqu'à facteur 10)*	Emulsification de différents types de matière grasse (C) *avec différentes températures de cristallisation/fusion*	↗ consistance	Emulsions gélifiées modèles	(Liu et al., 2015) (Oliver et al., 2015b)
			Lait acidifié	(Houzé et al., 2005)
			Yaourt[18] ferme	(Barrantes et al., 1996)
		↗ fermeté en bouche (pas d'effet sur la perception du gras en bouche)	Emulsions gélifiées modèles	(Liu et al., 2015)
Augmentation du SFC et cristaux plus petits et plus nombreux	Augmentation de la vitesse de refroidissement (P)	↗ consistance	MGLA pure *Les effets devraient être les mêmes au sein des globules gras*	(Campos et al., 2002)

La taille des globules gras et la structure cristalline des globules gras sont deux leviers intéressants qui permettent de moduler la consistance et la perception du gras en bouche.

[14] *Consistance : évaluation la viscosité (η, rhéologie), le module conservatif (G', rhéologie) et le module d'Young (E', texturométrie).*
[15] *Lait acidifié : Mélange d'ingrédients laitiers acidifié par GDL pour gélifier.*
[16] *Cream cheese : Fromage à la crème obtenu par fermentation du lait et de la crème, concentration puis brassage. C'est un système brassé riche en matière grasse, se rapprochant du yaourt brassé gras (au niveau de la structure).*
[17] *Emulsion gélifiée modèle : Système avec de la matière grasse dispersée (huile de tournesol, graisse de porc, MGLA, etc.) dans une phase continue gélifiée (gélatine, carraghénane, whey protein isolate (WPI), etc.), avec une interface variée (protéines diverses, différents Tween, etc.).*
[18] *Yaourt (ferme ou brassé) : Produit obtenu par fermentation lactique.*

A l'échelle de l'émulsion gélifiée, plusieurs auteurs ont fait varier les interactions entre les globules gras, entre les globules gras et la phase continue (via l'interface) ou entre les protéines du réseau protéique afin d'étudier leur impact sur les propriétés macroscopiques des yaourts brassés (et systèmes assimilés). Le Tableau 9 reprend les différents leviers testés.

Tableau 9 : Leviers utilisés dans la littérature pour moduler les interactions entre les ingrédients à l'échelle de l'émulsion gélifiée et impact sur les propriétés macroscopiques ; (C) Composition ; (P) Procédé ; (F) Formulation – ***de 1 à 10 µm***

Propriété de structure modifiée	Levier(s)	Impact sur les propriétés macroscopiques	Système étudié	Référence(s)
Densification de la structure *augmentation du nombre d'interactions*	Augmentation de la teneur en protéines (C)	↗ consistance	Emulsions gélifiées modèles	(G. Sala et al., 2009)
		↗ consistance	Yaourt brassé	(Krzeminski et al., 2011)
		↗ perception du granuleux ↗ perception de crémeux et du gras en bouche	Yaourt brassé	(Tomaschunas et al., 2012)
	Augmentation de la teneur en matière grasse (C)	*Quand globules gras en interaction avec la matrice* ↗ consistance	Emulsions gélifiées modèles	(Sala et al., 2008) (Liu et al., 2015)
		↗ consistance	Yaourt brassé	(Krzeminski et al., 2011)
		Surtout quand globules gras en interaction avec la matrice ↘ coefficient de friction	Emulsions gélifiées modèles brassées	(Chojnicka et al., 2009)
		Surtout quand globules gras en interaction avec la matrice ↗ perception de crémeux et du gras en bouche	Emulsions gélifiées modèles	(Sala et al., 2008) (Liu et al., 2015)
		↗ perception de crémeux et du gras en bouche	Yaourt brassé	(Tomaschunas et al., 2012)
Modification du type d'interaction entre les protéines	Diminution temporaire de la température au cours de la fermentation (pH de 5,2) (P)	↗ consistance ↗ capacité de rétention d'eau	Yaourt ferme (sans matière grasse)	(Trejo et al., 2014)
	Homogénéisation haute pression (P) *jusqu'à environ 10^5 bar*	↗ capacité de rétention d'eau	Yaourt ferme	(Loveday et al., 2013)
	Traitement thermique avant gélification (P)	↗ consistance ↗ capacité de rétention d'eau	Lait acidifié	(Cho et al., 1999) (Cayot et al., 2003)
	Utilisation de transglutaminase (F)	↗ consistance	Yaourt ferme	(Loveday et al., 2013)
	Augmentation de la proportion de protéines sériques (C)	*Pour des protéines sériques natives ou agrégées* ↗ consistance	Lait acidifié	(Chever et al., 2014) (Andoyo et al., 2015)
		↗ coefficient de friction	Yaourt brassé	(Laiho et al., 2017)
		↗ perception du granuleux	Yaourt brassé	(Tomaschunas et al., 2012) (Laiho et al., 2017)
Augmentation de l'interaction entre les globules gras *cluster*	Complexe à maîtriser[19] (F)	↗ consistance	Emulsions gélifiées modèles	(Oliver et al., 2015a)
			Emulsions gélifiées modèles	(Bot et al., 2007)
		↗ perception du gras en bouche	Emulsions gélifiées modèles	(Mosca et al., 2012)
Augmentation de l'interaction entre globules gras et réseau protéique via l'interface	Modification du matériel adsorbé à l'interface (F) *Augmentation de sa capacité à interagir avec le réseau protéique*	↗ consistance	Emulsions gélifiées modèles	(Sala et al., 2008) (Sala et al., 2007) (Liu et al., 2015)
			Lait acidifié	(Titapiccolo et al., 2011) (Cho et al., 1999)
		↗ coefficient de friction	Emulsions gélifiées modèles brassées	(Chojnicka et al., 2009)
		↘ perception du gras en bouche (moins de coalescence)	Emulsions gélifiées modèles	(Sala et al., 2008) (Liu et al., 2015)

[19] *Sur système modèle, combinaison de plusieurs leviers de procédé et de composition tels que le SFC des globules gras, la force ionique et le pH de la phase continue, la composition de l'interface, le traitement mécanique (homogénéisation), le traitement thermique (variations de la température) et la vitesse de gélification.*

Dans une démarche où la teneur en protéines ne serait pas augmentée, le procédé serait inchangé et l'ajout d'additifs (tels que la transglutaminase) serait exclu, l'augmentation de la proportion de protéines sériques (diminution du ratio caséines/protéines sériques) ressort comme l'un des leviers intéressants pour moduler les interactions au sein d'émulsions gélifiées laitières. Il n'existe que très peu d'études sur l'impact de la modification du ratio caséines/protéines sériques sur la structure des microgels et les propriétés de texture (rhéologie) des yaourts brassés. Torres et al. (2012, 2011) ont utilisé des agrégats de protéines sériques micro-particulés comme des texturants pour moduler la structure, la texture et les propriétés sensorielles des yaourts brassés. Ces deux études montrent que des que les agrégats de protéines sériques micro-particulés peuvent renforcer la texture mais elles ne donnent aucune information sur les propriétés des agrégats de protéines sériques et leurs conditions d'obtention. Elles révèlent que les degrés de dénaturation et d'agrégation des protéines sériques sont des paramètres importants à prendre en compte.

La modification du matériel adsorbé à l'interface ressort également comme l'un des leviers intéressants pour modifier les propriétés de texture des émulsions gélifiées. Dans leurs travaux sur des gels laitiers fermes, Cho et al. (1999) montrent notamment que la composition de l'interface en protéines laitières impacte le degré d'interactions entre les globules gras et le réseau protéique et donc les propriétés rhéologiques des gels. Ils montrent que le module conservatif (G', Pa) est plus élevé lorsque les protéines sériques adsorbées à l'interface sont agrégées thermiquement plutôt que natives. A notre connaissance, il n'existe pas d'études sur l'impact de l'interface sur les propriétés macroscopiques de yaourts ou autre système assimilés brassés.

La structure de l'émulsion gélifiée avant brassage détermine, en grande partie, les propriétés des microgels obtenus après brassage. Il est également possible de moduler la taille et la distribution des microgels par des leviers de procédé. Le Tableau 10 donne certains leviers rapportés dans la littérature.

Tableau 10 : Leviers utilisés dans la littérature pour modifier les propriétés des microgels et impact sur les propriétés macroscopiques ; (C) Composition ; (P) Procédé ; (F) Formulation – ***de 10 à quelques centaines de micromètres (≈ 250 µm)***

Propriété de structure modifiée	Levier(s)	Impact sur les propriétés macroscopiques	Système étudié	Référence(s)
Augmentation de la taille des microgels	Ultrasons pendant la fermentation (pH de 5,2) (P)	↗ perception du granuleux visuel ↗ perception du granuleux en bouche	Yaourt brassé (sans matière grasse)	(Nöbel et al., 2016)
	Brassage (P)	*Pour des tailles > 100 µm* ↘ consistance ↗ perception du granuleux ↘ perception du crémeux	Yaourt brassé (sans matière grasse)	(Cayot et al., 2008)
	Augmentation de la température de brassage (P)	*Pour des tailles < 100 µm* ↗ consistance ↗ synérèse	Yaourt brassé (sans matière grasse)	(Hahn et al., 2015)

La taille des microgels a un impact sur la consistance et la perception de granuleux en bouche des yaourts brassés. C'est donc un paramètre essentiel à prendre en compte quand on s'intéresse à la texture crémeuse de ces derniers.

L'ensemble de ces études permettent d'identifier des leviers intéressants pour moduler les propriétés instrumentales et sensorielles des yaourts brassés et mettre en place une démarche adéquate pour répondre à la problématique de thès

Chapitre 2 : Démarche et stratégie expérimentale

L'état de l'art a permis de comprendre comment le yaourt brassé riche en matière grasse se structure au fur et à mesure de sa fabrication, de faire le point sur les propriétés et la fonctionnalisation des protéines et de la matière grasse laitières, et d'identifier les liens qui existent entre les propriétés aux différentes échelles. A partir de l'ensemble de ces informations, une stratégie expérimentale a pu être construite et ce chapitre la présente au travers de :

- la **démarche générale** adoptée
- les **leviers** choisis et les **hypothèses** formulées pour chacun d'entre eux
- les **variables** sélectionnées pour tester les hypothèses
- l'**organisation des expérimentations en différents blocs**

2.1. Démarche générale

L'objectif général était d'optimiser la **texture crémeuse** pour qu'elle s'éloigne le moins possible d'une référence de **yaourt brassé riche en matière grasse (> 5%)** lors de la **réduction de sa teneur en matière grasse**. En nous basant sur l'état de l'art, nous avons défini la « texture crémeuse » comme la combinaison :

- d'une certaine **consistance**
- d'une bonne **perception du gras en bouche** (film gras, nappant, visqueux, fondant, onctueux, etc.)

Afin de répondre à l'objectif général, nous avons modulé la structure pour piloter les propriétés macroscopiques de texture des yaourts brassés riches en matière grasse. Nous avons donc adopté une **approche multi-échelle de caractérisation** afin de comprendre les mécanismes de structuration mis en jeu. Pour cela, plusieurs méthodes ont été combinées et/ou adaptées en veillant à ce qu'elles soient cohérentes par rapport aux **conditions de consommation (processus oral)** des yaourts brassés. Etant donné que la thèse s'est déroulée dans le cadre d'un projet multipartenaire, avec pour ambition finale de développer des produits innovants, nous avons choisi de structurer la matrice dans des **conditions réalistes** de composition (**ingrédients exclusivement laitiers**), de formulation (**système complexe**) et de procédé. Pour cela, nous avons développé une mini-ligne de fabrication de yaourt brassé modèle à l'échelle laboratoire représentative d'un procédé pilote de référence. Certains leviers jugés intéressants à l'échelle laboratoire ont également été mis en œuvre à l'échelle pilote pour tester leur **applicabilité**.

2.2. Leviers, hypothèses et variables

2.2.1. Leviers identifiés et hypothèses de travail

Le yaourt brassé riche en matière grasse peut être défini comme un système dispersé à plusieurs échelles :

- *Autour de 250 µm :* il correspond à une **dispersion concentrée de microgels** dans laquelle les microgels représentent la phase dispersée et le sérum qui les entoure représente la phase continue (Figure 59).
- *Autour de 2,5 µm (au sein des microgels) :* il correspond à une **émulsion gélifiée** dans laquelle i) la matière grasse est sous forme de globules gras et représente la phase dispersée, ii) les protéines forment un réseau tridimensionnel qui représente la phase continue et iii) les deux phases peuvent interagir via l'interface, généralement constituée de protéines laitières à la fin d'un procédé classique de fabrication de yaourt brassé (Figure 59).

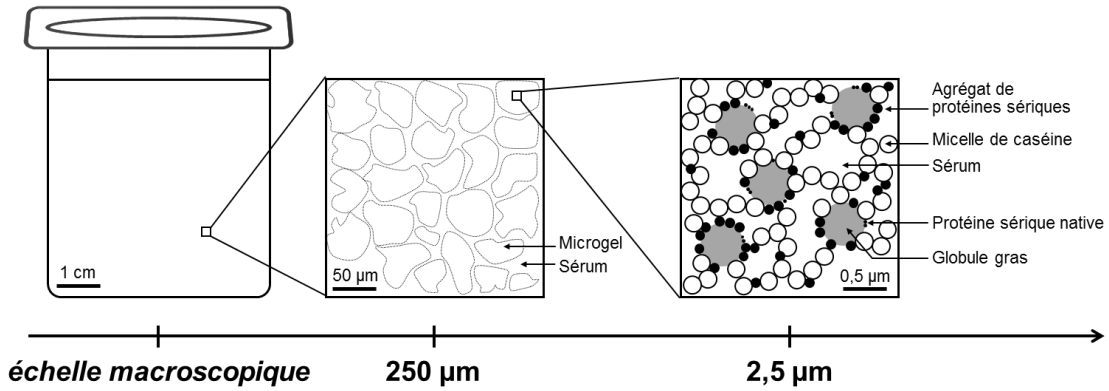


Figure 59 : Schématisation de la structure d'un yaourt brassé riche en matière grasse aux différentes échelles

Nous avons choisi d'**articuler la stratégie expérimentale autour des microgels et de leur structure**. Pour cela, nous nous sommes basés sur l'état de l'art pour identifier des **leviers** et formuler des **hypothèses** à propos de la phase dispersée (globules gras), de l'interface et de la phase continue (réseau protéique et microgels en eux-mêmes) des microgels (Figure 60).

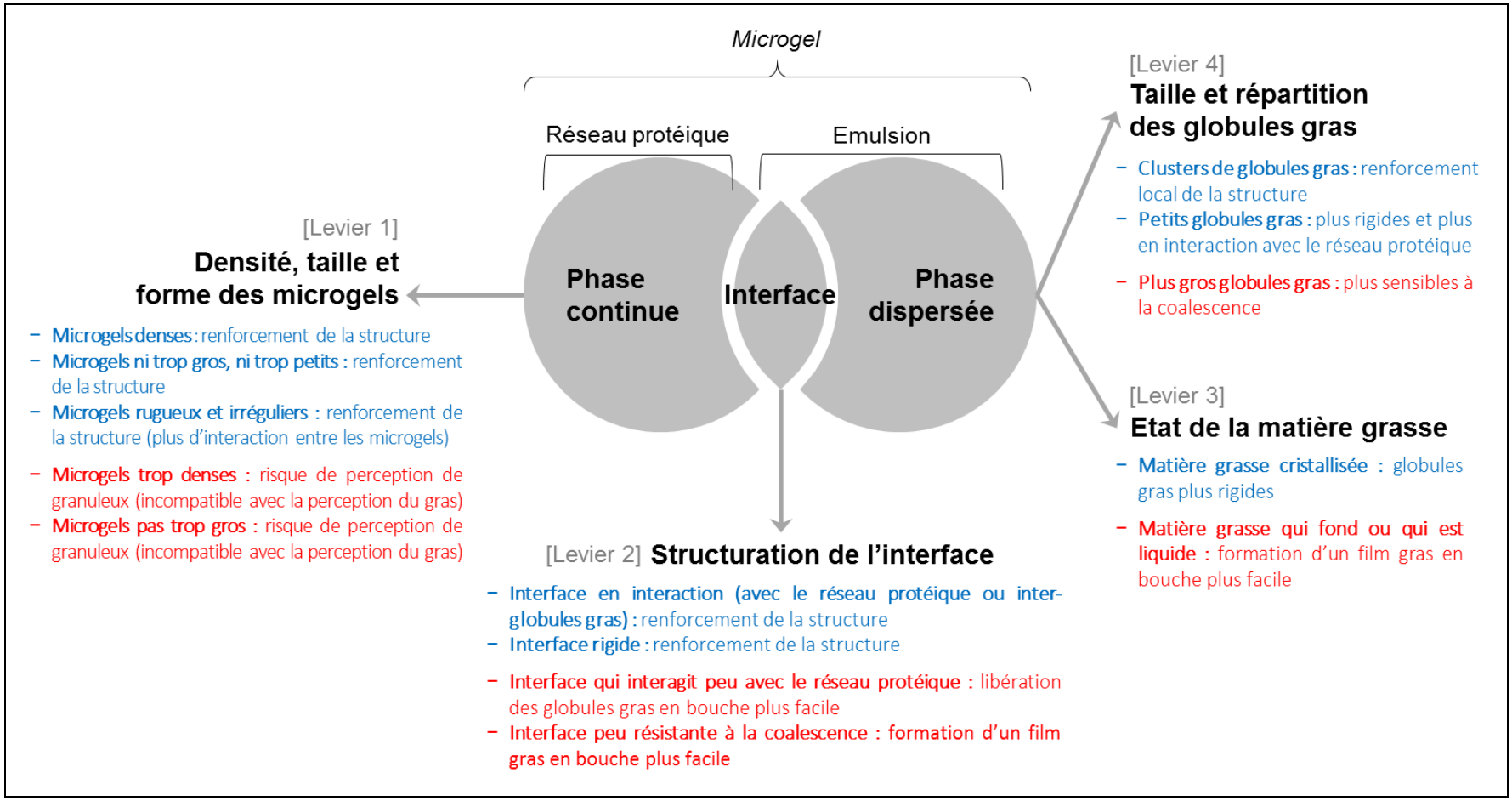


Figure 60 : Synthèse des leviers identifiés pour moduler les microgels et leur structure et des hypothèses formulées pour augmenter la consistance (en bleu) ou augmenter la perception du gras en bouche (en rouge) des yaourts brassés riches en matière grasse

Les leviers ont été sélectionnés pour pouvoir structurer les microgels *à façon* et ainsi optimiser la texture crémeuse (consistance et perception du gras en bouche) des yaourts brassés riches en matière grasse. Il est intéressant de noter que pour un levier donné, plusieurs des hypothèses formulées sont contradictoires vis-à-vis de la texture crémeuse. Par exemple, des microgels denses sont supposés apporter de la consistance (renforcement de la structure), mais ils risquent également d'apporter du granuleux en bouche (contraire au crémeux). Nous avons donc cherché à trouver un équilibre pour chacun des leviers et à comprendre les mécanismes de structuration qu'ils mettaient en jeu.

2.2.2. Variables testées

Plusieurs **variables** ont pu être sélectionnées à partir de l'état de l'art pour moduler les leviers identifiés et tester les différentes hypothèses. Le Tableau 11 présente toutes ces variables.

Tableau 11 : Synthèse des variables sélectionnées pour tester les hypothèses sur chacun des leviers identifiés et compenser les propriétés dégradées lors de la réduction de la teneur en matière grasse dans des yaourts brassés riches en matière grasse

Phase du système	Levier(s)	Variable(s)
Phase Continue	Densité, taille et forme des microgels	▪ Ratio micelles de caséines / protéines sériques (cas/WP) ▪ Pré-traitement des protéines sériques (agrégation)
Interface	Structuration de l'interface	▪ Composition des protéines de l'interface ▪ Etat physico-chimique des protéines sériques adsorbées à l'interface ▪ Phase continue (force ionique, composition)
Phase dispersée	Etat de la matière grasse	▪ Composition de matière grasse laitière (différentes fractions) ▪ Vitesse de refroidissement ▪ Etat physico-chimique des protéines sériques adsorbées à l'interface
	Taille et répartition des globules gras	▪ Composition de matière grasse laitière (différentes fractions) ▪ Etat physico-chimique des protéines sériques adsorbées à l'interface ▪ Phase continue (force ionique, composition)

L'état de l'art a montré que la plupart des variables sont interdépendantes et/ou peuvent avoir une action sur plusieurs leviers en même temps. Pour pouvoir comprendre et découpler certains effets, les variables ont été testées à plusieurs **niveaux de complexité** de la matrice :

- à partir des matière grasses pures ou solutions de protéines
- en émulsions
- sur le yaourt brassé modèle fait au laboratoire
- sur le yaourt brassé pilote

2.3. Organisation du travail de thèse en différents blocs expérimentaux

Les expérimentations ont été organisées en plusieurs blocs sur la base des leviers identifiés, des hypothèses formulées et des variables sélectionnées (Figure 61) :

- *Mise au point de l'expérimentation à l'échelle laboratoire :* Les propriétés instrumentales et sensorielles à compenser lors d'une réduction de la teneur en matière grasse ont d'abord été identifiées. Pour cela, une référence industrielle de yaourt brassé riche en matière grasse (système d'étude) ainsi que quatre versions contenant de moins en moins de matière grasse (réduction progressive) ont été fabriquées à l'échelle pilote[20] puis caractérisées. Dans un deuxième temps, les propriétés instrumentales et sensorielles mesurées ont été comparées pour sélectionner des méthodes instrumentales de caractérisation qui soient cohérentes vis-à-vis du sensoriel. Enfin, un yaourt brassé riche en matière grasse modèle a été mis au point à l'échelle laboratoire pour qu'il soit représentatif de la référence pilote,

[20] *Fabrication dans les installations pilotes de chez Yoplait, spécialement dimensionnées pour être représentatives de l'échelle industrielle.*

aussi sensible aux variations (de composition et de procédé) et plus flexible (pour permettre de tester l'ensemble des variables identifiées).

– ***Test des différentes variables identifiées :*** Les différentes variables présentées dans Tableau 11 ont été testées individuellement afin d'identifier les leviers les plus intéressants. Pour cela, nous avons utilisé les différents niveaux de complexité (§ 2.2.2) de la matrice et les différentes échelles de caractérisation. Ce bloc expérimental a permis d'identifier les variables et leviers intéressants.

– ***Combinaison de plusieurs leviers :*** Dans ce bloc, les leviers les plus intéressants ont été modulés en même temps pour mesurer à la fois leur effet combiné et leur interdépendance.

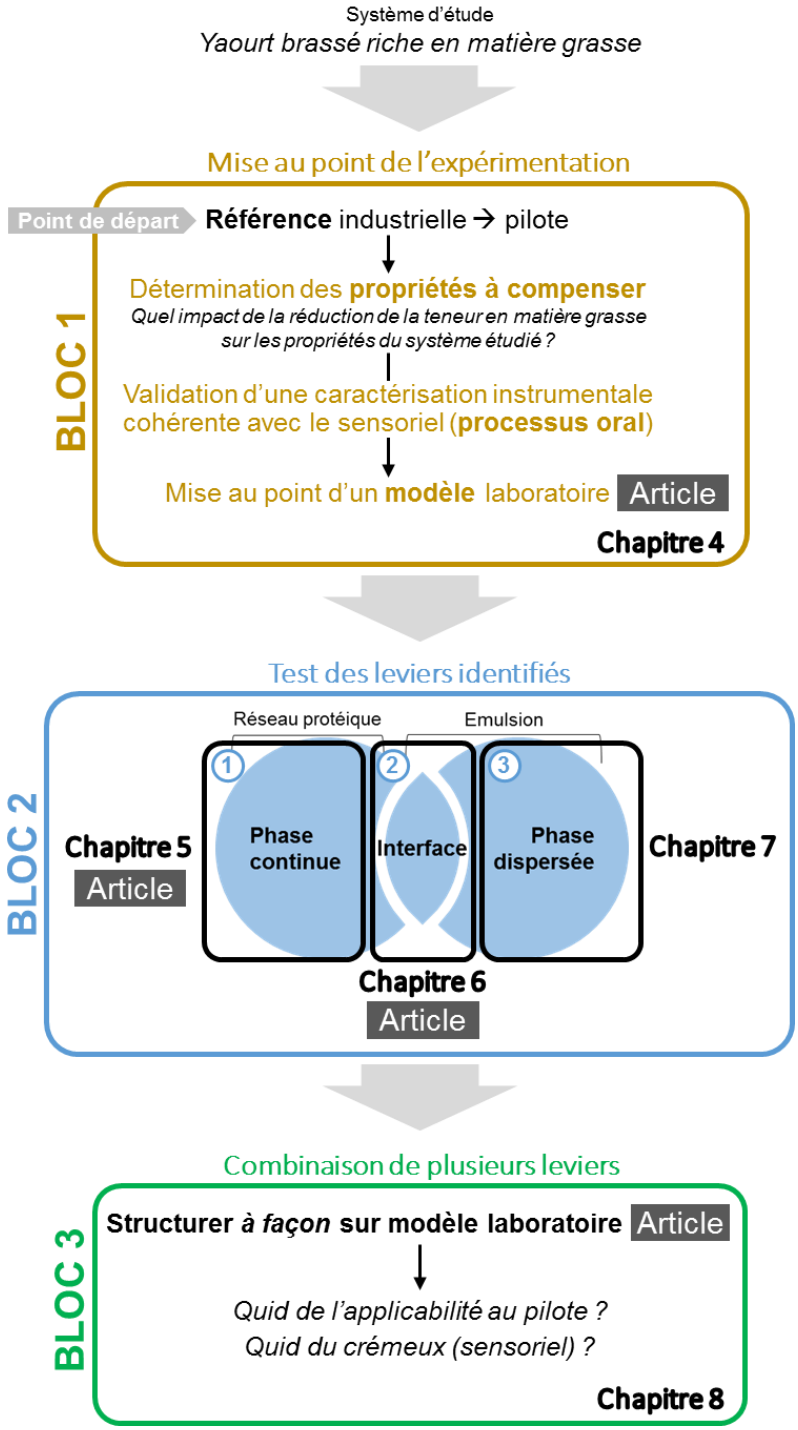


Figure 61 : Articulation du travail de thèse autour de plusieurs blocs expérimentaux et lien avec les chapitres du manuscrit et les différents articles

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

Etant donné que le manuscrit est basé sur des articles, la plupart du matériel et des méthodes sont détaillés au fur et à mesure des chapitres de résultats. Ce chapitre a pour objectif de récapituler l'ensemble du matériel et des méthodes utilisés en indiquant les pages auxquelles se référer ou en détaillant certains points qui ne sont pas directement abordés dans les articles ou chapitres de résultats.

3.1. Matériel

3.1.1. L'eau purifiée et le perméat

L'eau purifiée a toujours été obtenue en utilisant le système de purification Milli-Q (Millipore, Merck, Allemagne). Sa conductivité était inférieure à 6.6×10^{-5} S.m^{-1}.

Le perméat a été obtenu de deux manières différentes :

- La plupart du temps, il a été fourni par Yoplait (Le Mans, France). Sa composition était de 0,29% (en poids) de protéines sériques dont 41,1% native, 0,008% de caséines, 5,6% de lactose, 0,6% de minéraux avec 34 mg.100 g^{-1} de Ca^{2+}, 93,5% d'eau.
- Dans de rares cas, il a été reconstitué à partir de perméat en poudre fourni par Ingredia (Lugo, Espagne). Sa composition était de 4,3% (en poids) de protéines, 88,2% de lactose et 5,5% de minéraux. La dilution du perméat en poudre (environ 1/20) a été choisie pour que la composition finale du mélange soit proche de celle du perméat fourni par Yoplait, sur la base de la concentration en protéines.

Dans les deux cas, les perméats contenaient quelques résidus de protéines sériques agrégées et de caséines micellaires. Ils n'ont subi aucun changement de pH puisqu'ils ont été obtenus par ultrafiltration membranaire, et leur pH final était de 6,3 ± 0,2.

3.1.2. La matière grasse et les protéines laitières

La matière grasse laitière anhydre (MGLA), sa fraction à bas point de fusion (oléine) et sa fraction à haut point de fusion (stéarine) ont été fournies par Beuralia (Sodiaal, Quimper, France). A réception, la MGLA et la stéarine ont été découpées en morceaux de 1 kg mis sous vide puis conservés au congélateur (température de -18 °C) jusqu'à utilisation. L'oléine a, quant à elle, été versée dans des boîtes de conserve (250 g) qui ont été scellées puis également conservées au congélateur jusqu'à utilisation. Les principales caractéristiques des trois fractions sont résumées dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Propriétés physico-chimiques des fractions MGLA, oléine et stéarine

	Point de fusion (fournisseur)	Masse volumique à 8 °C (kg.m^{-3})	Masse volumique à 60 °C (kg.m^{-3})
MGLA	≈ 30 °C	$9,4 \times 10^2$	$9,0 \times 10^2$
Oléine	7-14 °C	$9,2 \times 10^2$	$9,0 \times 10^2$
Stéarine	> 40 °C	$9,0 \times 10^2$	$9,0 \times 10^2$

Les compositions en acides gras et les propriétés thermiques précises de la MGLA, de l'oléine et de la stéarine ont également été étudiées et sont détaillées dans le Chapitre 7 (§ 7.1, p. 171) et le Chapitre 8 (Table 7, p. 187 et § 3.1 , p. 190).

L'isolat de protéines sériques[21] a été acheté (Prolacta95, Lactalis, Laval, France). Il a été obtenu par ultrafiltration membranaire et sa composition était de 80,0% (en poids) de protéines sériques dont 99,4% sous forme native, 9,7% de caséines résiduelles non micellaires, 3,0% max. de lactose, 3,0% de minéraux avec 300 mg.100 g^{-1} de Ca^{2+} et entre 3,8 et 6% d'eau. Les propriétés physico-chimiques de cet isolat ont été étudiées et sont détaillées

[21] *Isolat de protéines sériques ou whey protein isolate (WPI).*

dans l'article présenté en partie 6.2 (§ 3.1, p. 158). La poudre de lait écrémé a été fournie par Eurosérum (Sodiaal, Port-sur-Saone, France), avec une composition de 18,4% (en poids) de caséines et 6,7% de protéines sériques dont 68.1% sous forme native.

Les deux poudres ont été soigneusement conservées dans des fûts en plastique de 30 L, hermétiquement fermés après chaque prélèvement.

3.1.3. Les autres ingrédients

D'autres ingrédients ont été utilisés de manière plus marginale ou en plus petites quantités. Le Tableau 13 reprend l'ensemble des informations essentielles concernant ces ingrédients. Leurs rôles et utilisations sont détaillés dans les articles des différents chapitres de résultats (4, 5, 6, 7 et 8).

Tableau 13 : Informations essentielles sur les ingrédients minoritaires utilisés au cours des différentes expérimentations

Produit(s)	Nom et fournisseur	Détails
Crème commerciale (laboratoire)	Alsace Lait, France	32,5% (en poids) de matière grasse 2,2% (en poids) de protéines
Crème pilote	Yoplait, France	Obtenue par centrifugation du lait dès sa réception en usine (composition mesurée systématiquement)
Glucono-δ-lactone (GDL)	Sigma-Aldrich, France	Utilisé pour acidifier, pureté ≥ 99,0%
Amidon de riz prégélatinisé	Fourni par Yoplait (confidentiel)	Diamètre des grains entre 2 et 8 µm
Lactose	Thermo Fisher Sc., France	-
Sel de mer	Sel fin, La Baleine, France	Riche en NaCl
Fluorochrome DyLight 488 nm	Thermo Fisher Sc., Etats-Unis	Affinité spécifique avec les protéines
Fluorochrome Bodipy 665/676 nm	Invitrogen, Etats-Unis	Affinité spécifique avec la matière grasse
Sodium-dodecyl-sulfate (SDS)	Sigma-Aldrich, Etats-Unis	Mis en solution à 1,0% (en poids), pureté ≥ 98,5%
Anilino-naphthalène-sulfonate (ANS)	Sigma-Aldrich, Etats-Unis	Réactif (hydrophobicité de surface), pureté ≥ 97,0%
Acide dithiobis-nitrobenzoïque (DTNB)	Sigma-Aldrich, Etats-Unis	Réactif d'Ellman (thiols libres), pureté ≥ 98,0%

3.2. Méthodes

3.2.1. Fabrication des différents systèmes étudiés selon leur niveau de complexité

Préparation des solutions de protéines laitières aux échelles laboratoire et pilote

Dans ce travail, les solutions de protéines sériques et de lait écrémé reconstitué étaient préparées soit à l'échelle laboratoire, soit à l'échelle pilote.

Les solutions de protéines sériques étaient obtenues à partir de poudre d'isolat de protéines sériques (WPI) et d'eau purifiée (ou de perméat). Le lait reconstitué était obtenu à partir de poudre de lait écrémé (PLE) et d'eau purifiée. Les différentes solutions étaient préparées à température ambiante, selon les protocoles suivants :

- *A l'échelle laboratoire :* La poudre de protéines (WPI ou PLE) était pesée en fonction de la concentration en protéines visée puis solubilisée dans de l'eau purifiée ou du perméat (bécher de 2 L) à l'aide d'un agitateur magnétique. Pour cela, la poudre était i) d'abord dispersée en l'incorporant progressivement dans un fort vortex (500 à 700 rpm) puis ii) laissée sous agitation plus douce (250 rpm) pendant 15 min. La solution obtenue était systématiquement réservée au frais (8 °C) pendant une nuit entière pour garantir une bonne solubilisation des protéines avant utilisation.
- *A l'échelle pilote :* La poudre de protéines (WPI ou PLE) était pesée en fonction de la concentration en protéines visée puis solubilisée dans de l'eau purifiée ou du perméat (bidon de 30 L) à l'aide d'un Rayneri (VMI, France). Pour cela, la poudre était i) d'abord dispersée en l'incorporant progressivement dans un fort vortex puis ii) laissée sous agitation plus douce pendant 15 min.

Ces protocoles sont détaillés dans les sections *Materials and methods* de différents articles (partie 4.2, (§ 2.2, p. 114) et 6.2 (§ 2.2, p. 155).

Les solutions de protéines sériques pouvaient éventuellement subir différents traitements qui sont détaillés dans la partie 6.2 (§ 2.2, p. 155). Le plus courant d'entre eux était le traitement thermique. Ce dernier était fait à l'aide d'un bain-marie à l'échelle laboratoire (80 °C pendant 30 min puis refroidissement à température ambiante) et par le passage dans un système d'échangeur à plaques et chambrage à l'échelle pilote (92 °C pendant 6 min).

Les solutions de protéines sériques étaient utilisées pour fabriquer les émulsions ou enrichir les yaourts en protéines sériques, et le lait reconstitué pour fabriquer les yaourts brassés.

Fabrication d'émulsions H/E à l'échelle laboratoire

L'émulsification est très régulièrement utilisée au laboratoire, avec en général, une première étape de pré-émulsification (rotor/stator) et une deuxième étape d'émulsification (ultrasons). Habituellement, elle est appliquée à des systèmes de 250 mL faits d'huile liquide (principalement de tournesol ou de colza) et de protéines sériques laitières ou autres émulsifiants. Ce procédé a été adapté pour fabriquer des émulsions laitières (crèmes *à façon*). La fonte de la matière grasse laitière et ses fractions (solides à température ambiante), le type et la quantité de protéines sériques (natives ou agrégées thermiquement) et l'ajustement des paramètres de pré-émulsification et d'émulsification pour fabriquer 1500 mL de crème ont été plus particulièrement étudiés. Le protocole de fabrication de crèmes *à façon* suivant a finalement été retenu :

- *Solubilisation des protéines sériques (WPI) (à J1) (voir le protocole ci-dessus) :* A partir de la littérature (Bos and Van Vliet, 2001; Cho et al., 1999; Raikos, 2010) et d'essais préliminaires, la concentration en

protéines sériques à viser dans la crème finale a été fixée à 1,2 % (en poids). Cette teneur a permis d'assurer une bonne émulsification (stabilisation de l'interface suffisamment efficace pour avoir des petits globules gras et éviter leur coalescence) tout en minimisant la quantité de protéines sériques résiduelles dans la phase continue (pour pouvoir tester l'effet de l'interface distinctement de l'effet de la phase continue). La quantité maximale de protéines apportée par la crème dans la phase continue des yaourts brassés modèles a été estimée à 6-10% de la teneur totale en protéine.

- *[Facultatif] Traitement thermique des protéines sériques (à J2)* *(voir le protocole ci-dessus)*.
- *Préparation des ingrédients de la crème (à J2) :* Dans un premier temps, la solution de protéines sériques était chauffée à une température de 40 °C et la matière grasse (MGLA, stéarine ou oléine) était fondue à 60 °C pendant au moins 30 min. La solution de protéines pré-chauffée et la matière grasse fondue étaient ensuite mélangées en fonction des teneurs en protéines et matière grasse visées pour préparer 1500 g de crème (bécher de 2 L). Ce mélange était maintenu à une température comprise entre 40 °C (matière grasse fondue) et 65 °C (contre la dénaturation des protéines sériques) pendant tout le reste du procédé d'émulsification.
- *Pré-émulsification (à J2) :* Le mélange était d'abord placé dans un bain d'eau froide pour éviter qu'il ne chauffe trop pendant l'étape de pré-émulsification (< 65 °C[22]). Il était ensuite pré-émulsifié à l'aide d'un rotor/stator (Polytron 3100 D, Kinematica AG, Suisse) et d'une sonde PTG 36/4 plongée à mi-hauteur du bécher de 2 L. Pour éviter que le mélange ne déborde, la pré-émulsification était systématiquement démarrée à une vitesse de 10.000 rpm, puis la vitesse était augmentée jusqu'à 15.000 rpm et maintenue pendant 5 min.
- *Emulsification (à J2) :* Le mélange pré-émulsifié était immédiatement traité par ultrasons (VCX 130, Sonic & Materials, Royaume-Uni) à l'aide d'une sonde 13MM à 130 W (100%) pendant 15 min effectives par alternance de pulsations actives (10 s) et passives (10 s)[23]. La granulométrie de la crème était ensuite contrôlée puis la crème était réservée au frais (8 °C) avant son utilisation.

Ce protocole a été testé et validé et les résultats obtenus sont montrés dans le Chapitre 4 (§ 4.2.2, p. 122). Il est également utilisé dans les articles présentés dans la partie 6.2 (§ 2.2, p. 155) et dans le Chapitre 8 (§ 2.2, p. 187).

Des émulsions de plus petit volume (150 mL au lieu de 1500 L) ont aussi été préparées à l'échelle laboratoire. Dans ce cas-là, i) la pré-émulsification était faite en démarrant la vitesse du rotor/stator à 5000 rpm puis en l'augmentant à 10.000 rpm pour la maintenir pendant 5 min, et ii) l'émulsification était faite par ultrasons pendant 10 min effectives (par alternance de pulsations actives (10 s) et passives (10 s) à 130 W (100%))[24]. Ce type d'émulsification a été utilisé au cours des expérimentations dont les résultats sont montrés dans le Chapitre 7.

Fabrication de yaourts brassés aux échelles laboratoire (modèle) et pilote

Des yaourts brassés ont été fabriqués soit à l'échelle laboratoire (modèles) soit à l'échelle pilote. La mise au point et la validation du protocole de fabrication à l'échelle laboratoire ont fait l'objet d'un article. Les protocoles de fabrication au laboratoire et au pilote sont détaillés dans le Chapitre 4 (partie 4.2, p. 112).

3.2.2. Méthodes de caractérisation en fonction de l'échelle d'étude du système

L'ensemble des méthodes de caractérisation sont récapitulées dans le Tableau 15 (p. 100), avec des renvois auxquels se référer pour plus de détails. Les quelques méthodes qui ne sont pas précisées ou pas assez détaillées dans les chapitres ou articles sont décrites directement ou dans les parties ci-dessous.

[22] *Température strictement inférieure à la température de début de dénaturation des protéines sériques.*
[23] *Soit environ 78 J.g^{-1} au total.*
[24] *Soit environ 520 J.g^{-1} au total.*

Détermination de la composition en ions (force ionique)

Nous détaillons cette méthode car elle ne suit pas de norme ISO en particulier. Les mesures ont été réalisées par le Laboratoire Interaction Milieux Matériaux en Contact (UMR GENIAL, France). Les échantillons de perméat étaient d'abord minéralisés. Pour cela, 5 mL de perméat et 5 mL de HNO_3 étaient systématiquement mélangés dans des tubes à minéraliser puis placés dans un bloc chauffant (DigiPREP Jr, SCP SCIENCE, Canada) pour être portés à ébullition à 95 °C pendant environ 2h. De l'eau distillée était ensuite ajoutée dans les tubes jusqu'à un volume de 50 mL. Les échantillons obtenus après minéralisation étaient dilués dans un tampon[25] de HCl 1% (préconisé pour la flamme) et $LaCl_3$ 0,1 % pour que leur absorbance soit dans la gamme d'étalonnage. Les éléments K, Na, Ca, Mg et Fe était ensuite dosés (en $mg.L^{-1}$) par absorption atomique flamme (ContrAA 800 D, Analytik Jena, Allemagne). La force ionique de chaque échantillon de perméat était ensuite calculée à partir des concentrations des éléments mesurés par absorption atomique flamme telle que :

$$Force\ ionique = \frac{1}{2}\sum_i C_i\, z_i^2 \qquad \text{Equation 8}$$

où C_i est la concentration molaire (en $mol.L^{-1}$) et z_i la charge de l'ion *i*.

Mesure des propriétés thermiques des fractions de matière grasse

Les propriétés thermiques ont été obtenues par la mesure de l'évolution de l'enthalpie (H, $J.g^{-1}$) en fonction de la température. Ces mesures ont été réalisées par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) (DSC 1, STARe System, Mettler-Toledo, Suisse) pour de la MGLA, de l'oléine ou de la stéarine pures ou pour des émulsions à 60% de MGLA, d'oléine ou de stéarine. Du chlorure de sodium (800 mM) a systématiquement été ajouté aux émulsions afin d'abaisser la température de cristallisation de l'eau contenue dans ces dernières pour éviter qu'elle ne soit confondue avec celle de la matière grasse et assurer une bonne ligne de base pour l'intégration des pics d'enthalpie.

La préparation des échantillons et le protocole de mesure des propriétés thermiques sont détaillés dans l'article présenté dans le Chapitre 8 (§ 2.4, p. 188). Les principales étapes du protocole de mesure étaient les suivantes :

- Pré-fonte à 60 °C pendant 15 min afin d'effacer l'histoire thermique de la matière grasse (pure ou en émulsion) ;
- Cristallisation par différentes cinétiques de refroidissement (Tableau 14) ;
- Fonte par une montée de la température jusqu'à 60 °C à une vitesse de +2 $°C.min^{-1}$.

Tableau 14 : Détails sur les différentes cinétiques de refroidissement appliquées pour cristalliser la matière grasse analysée pure ou en émulsion

Types de refroidissement	Détails
Refroidissement rapide jusqu'à -55 °C	▪ refroidissement à -30 $°C.min^{-1}$ jusqu'à -55 °C ▪ maintien de la température de -55 °C pendant 15 min
Refroidissement rapide jusqu'à 8 °C	▪ refroidissement à -30 $°C.min^{-1}$ jusqu'à 8 °C ▪ maintien de la température de 8 °C pendant 15 min ▪ refroidissement à -75$°C.min^{-1}$ jusqu'à -10 °C (pour améliorer ligne de base de l'enthalpie) ▪ maintien de la température de -10 °C pendant 15 min
Refroidissement lent jusqu'à -55 °C	▪ refroidissement à -1 $°C.min^{-1}$ jusqu'à -55 °C ▪ maintien de la température de -55 °C pendant 15 min
Refroidissement lent jusqu'à 8 °C	▪ refroidissement à -1 $°C.min^{-1}$ jusqu'à 8 °C ▪ maintien de la température de 8 °C pendant 15 min ▪ refroidissement à -75$°C.min^{-1}$ jusqu'à -10 °C (pour améliorer ligne de base de l'enthalpie) ▪ maintien de la température de -10 °C pendant 15 min

[25] *Le tampon utilisé était un tampon de volatilisation. Il a été ajouté au milieu à analyser pour améliorer sa volatilisation dans la source d'atomisation. Il inhibait la formation d'oxyde et la dépression du signal. Il était utile pour doser le Ca et le Mg et pouvait servir de tampon d'ionisation (c.-à-d. pour réduire et stabiliser l'ionisation des atomes libres des éléments dosés) pour chaque élément et en particulier le K et Na.*

Le suivi de la variation d'enthalpie en fonction de la température au cours du refroidissement et du réchauffement permet d'accéder aux propriétés de cristallisation et de fonte de la matière grasse. Etant donné que la température augmente pendant la consommation d'un yaourt, nous avons surtout exploité les propriétés de fusion en fonction du refroidissement appliqué au préalable et de la formulation. Les températures du début (T*onset*, °C), du pic (T*peak*, °C) et de la fin (T*endset*, °C) de fusion ainsi que la variation d'enthalpie (c'est-à-dire l'aire sous le pic de fusion) (ΔH, J.g^{-1}) ont pu être récupérées à l'aide du logiciel STARe Excellence software (Mettler-Toledo, Greifensee, Swiss). L'ordre de grandeur du taux de solide (SFC, %) des émulsions a pu être estimé d'après Lopez, Briard-Bion, Camier, & Gassi (2006), comme :

$$SFC\ (\%) = \frac{\Delta H_{partial}}{\Delta H_{total} \times teneur\ en\ matière\ grasse} \qquad \text{Equation 9}$$

où $\Delta H_{partial}$ (J.g^{-1}) est la variation d'enthalpie des émulsions refroidies au préalable à 8 °C, ΔH_{total} (J.g^{-1}) est la variation d'enthalpie de la matière grasse pure équivalente refroidie au préalable à -55 °C et la teneur en matière grasse est celle des émulsions (c'est-à-dire 0,60 pour des émulsions à 60% de matière grasse).

Propriétés rhéologiques des émulsions

Les émulsions ont été fabriquées selon le protocole du paragraphe 3.2 (*Fabrication d'émulsions H/E à l'échelle laboratoire*). Elles ont ensuite été conservées dans une étuve à 25 ± 1 °C avant d'être analysées par rhéologie (MCR 301, Anton Paar, Autriche) dans les 24 h après leur fabrication.

Une petite quantité de chaque émulsion a été mise en place sur le plan Peltier thermostaté à 25 °C au moyen d'une pipette. Les propriétés rhéologiques ont ensuite été mesurées en écoulement à l'aide d'un plan strié (pour éviter les glissements) avec un gap de 1 mm et un piège à solvant rempli d'eau purifiée. Pour cela, le protocole présenté en Figure 62 a été appliqué avec :

- Un pré-cisaillement à 10 s^{-1} pendant 1 min à 25 °C suivi d'un temps de repos de 5 min à 25 °C ;
- Un refroidissement de 25 à 8 °C à une vitesse de -4 °C.min^{-1} suivi d'un temps de repos de 16 min à 8 °C ;
- La mesure de la viscosité à 8 °C (η_8, Pa.s) avec une vitesse de cisaillement de 0,01 à 5 s^{-1} ;
- Un réchauffement de 8 à 25 °C à une vitesse de +8 °C.min^{-1} suivi d'un temps de repos de 15 min à 25 °C ;
- La mesure de la viscosité à 25 °C (η_{25}, Pa.s) avec une vitesse de cisaillement de 0,01 à 5 s^{-1}.

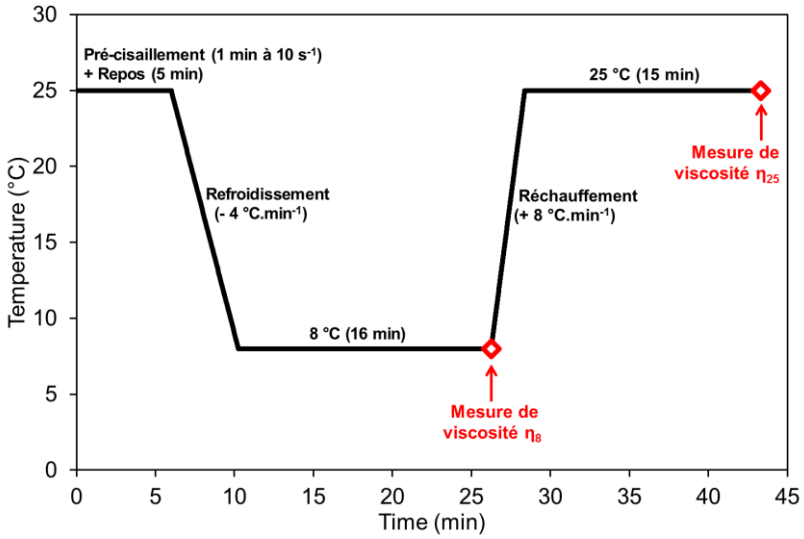


Figure 62 : Evolution de la température et des différentes étapes au cours du protocole de mesure des propriétés rhéologiques des émulsions en écoulement (η_8 et η_{25})

Propriétés sensorielles des yaourts brassés

Certaines propriétés sensorielles ont été mesurées à plusieurs reprises :

- *Au début du projet :* Une caractérisation sensorielle (panel expert) et une évaluation de la préférence (test consommateur) du système d'étude en fonction de sa teneur en matière grasse ont été effectuées. Cette première étape avait pour objectifs de i) mesurer l'impact d'une réduction de la teneur en matière grasse sur les propriétés sensorielles du système d'étude et ii) de comparer les propriétés sensorielles avec les propriétés instrumentales mesurées pour valider leur pertinence par rapport aux conditions de consommation des yaourts brassés et du processus oral. Une méthode de mesure de la proximité à une référence a également été développée au début du projet, avec une présentation monadique séquentielle et aléatoire des échantillons à comparer à la référence identifiée. Cette méthode ne requérait aucun entraînement préalable des panélistes et présentait l'avantage de ne pas imposer de termes spécifiques pour la caractérisation des produits. Elle a fait l'objet d'un poster (p. 211) mais sera peu abordée dans ce manuscrit (§ 4.1.1, p. 106).
- *Au cours du projet :* Plusieurs caractérisations sensorielles (par un panel expert) ont été effectuées sur des produits fabriqués à l'échelle pilote (chez Yoplait) mais les résultats ne sont pas exploités dans ce manuscrit puisque **la caractérisation des yaourts brassés s'est essentiellement effectuée par des mesures instrumentales, après que leur pertinence vis-à-vis du processus oral ait été validée** (Chapitre 4, § 4.1.3, p. 110).

Les détails de ces méthodes sont présentés dans le Tableau 15 et dans le Chapitre 4 (§ 4.1.1, p. 106).

Récapitulatif sur les traitements statistiques utilisés

L'ensemble des tests statistiques ont été réalisées avec le logiciel XLSTAT 2015.1 (Addinsoft, Paris, France) :

- La comparaison des moyennes a été effectuée par une ANOVA[26] (1 facteur) via une comparaison deux à deux (test de Tukey). Les niveaux de significativité choisis étaient $p \leq 0,05$ dans la plupart des cas et $p \leq 0,02$ ou $p \leq 0,1$ dans de rares cas spécifiques (précisés).
- L'étude des corrélations entre les variables (propriétés) et des similitudes entre les observations (échantillons) a été effectuée à partir des mesures quantitatives par analyse en composante principale (ACP) en prenant soin de toujours avoir un nombre d'observations supérieur au nombre variables[27].
- En sensoriel, le regroupement par classes des consommateurs ayant un profil de consommation similaire (par rapport à une ou plusieurs variables quantitatives) a été effectué par classification ascendante hiérarchique (CAH). Cette méthode a été utilisée dans le Chapitre 4 (§ 4.1.1, p. 106).

[26] *L'ANOVA est un test paramétrique. Au vu du nombre de répétitions (< 30) utilisées pour calculer les moyennes à comparer, le suivi de la loi normale ne pouvait pas être strictement vérifié. En toute rigueur, la comparaison des moyennes aurait dû être faite par un test non-paramétrique de type Kruskal-Wallis. Dans la littérature, on retrouve beaucoup plus souvent des ANOVA et nous avons donc fait le choix de ce test statistique pour que les résultats soient comparables avec ce qui est classiquement fait. Cependant, un test de Kruskal-Wallis a systématiquement été effectué en parallèle pour vérifier la fiabilité de l'ANOVA.*

[27] *Cette précaution permet d'assurer la fiabilité des corrélations obtenues à l'issue de l'ACP (au moins un degré de liberté). Cette règle n'était pas vérifiée pour la morphologie mathématique, mais dans ce cas précis, l'ACP est utilisée pour étudier les similitudes entre les observations (échantillons) via leur cartographie.*

Tableau 15 : Synthèse de l'ensemble des méthodes de caractérisation en fonction de l'échelle d'étude du système

Echelle d'étude	Catégorie	Type de caractérisation	Détails sur la méthode de caractérisation	Cf.
Nanoscopique	Composition des ingrédients	Teneur en protéines	Mesure sous-traitée (laboratoire LILANO, expertise produits laitiers, France) et effectuée par la méthode de Kjeldahl d'après NF EN ISO 8968-1 (AOAC, 1974) avec N × 6,38	-
		Composition en protéines	Mesure sous-traitée (laboratoire LILANO, expertise produits laitiers, France) via la détermination de la teneur en azote non caséinique et le calcul des protéines sériques natives d'après ISO 17997-1	-
		Composition en acides gras	Mesure effectuée par chromatographie gazeuse couplée à de la spectroscopie de masse (Trace GC, Polaris Q, Thermo-Finnigan, Royaume-Uni) par une méthode adaptée de NF EN ISO 12966-2	p. 186
		Composition en ions (force ionique)	Mesure effectuée par spectrométrie d'absorption atomique (ContrAA 800 D, Analytik Jena, Allemagne) d'après la méthode explicitée dans le paragraphe 3.2.2	p. 97
	Propriétés physico-chimiques	Taille des protéines	Mesure effectuée par diffusion dynamique de la lumière (DLS) (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Royaume-Uni) quand les particules sont suffisamment monodisperses ou approximées grâce à la mesure de la turbidité (absorbance à 600 nm) par spectrophotométrie (Varian Cary 100, Agilent Technologies, Etats-Unis) lorsque les particules sont trop polydisperses	p. 155
		Indice d'hydrophobicité de surface des protéines	Mesure des complexes fluorescents entre l'ANS et les acides aminés hydrophobes (et accessibles) des protéines par spectrofluorométrie (Cary Eclipse, Agilent Technologies, Etats-Unis)	p. 156
		Potentiel ζ des protéines	Mesure effectuée par électrophorèse laser Doppler (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Royaume-Uni)	p. 156
		Teneur en thiols libres totaux des protéines	Mesure des complexes (couleur jaune) entre le DTNB et les thiols libres par spectrophotométrie (Varian Cary 100, Agilent Technologies, Etats-Unis) après avoir déplié les protéines (urée)	p. 156
		Densité de la matière grasse	Mesure de la masse volumique effectuée à l'aide d'un pycnomètre et d'une balance de précision (± 0,1 mg) à plusieurs températures	-
		Propriétés thermiques de la matière grasse	Mesures effectuées par DSC (DSC 1, STARe System, Mettler-Toledo, Suisse) et détaillées dans le paragraphe 3.2.2 et dans l'article présenté en Chapitre 8 (§ 2.4)	p. 97 p. 188
Nano à microscopique	Propriétés interfaciales	Tension de surface (H/E)	Mesure de l'évolution de la tension de surface au cours du temps d'une goutte d'oléine (goutte montante) dans une solution aqueuse de protéines en mode statique (volume de la goutte fixé) par le tensiomètre Tracker (Teclis, France)	p. 157
		Viscoélasticité interfaciale (H/E)	Mesure de la tension de surface d'une goutte d'oléine (goutte montante) dans une solution aqueuse de protéines en mode dynamique (oscillations de l'aire de la goutte) par le tensiomètre Tracker (Teclis, France)	p. 157
		Charge protéique de surface	Mesure sous-traitée (laboratoire LILANO, expertise produits laitiers, France) et effectuée par la méthode de Kjeldahl d'après NF EN ISO 8968-1 (AOAC, 1974) avec N × 6,38, après avoir récupéré les globules gras stabilisés par l'interface (centrifugations + rinçages)	p. 157
		Potentiel ζ des globules gras	Mesure effectuée par électrophorèse laser Doppler (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Royaume-Uni)	p. 156

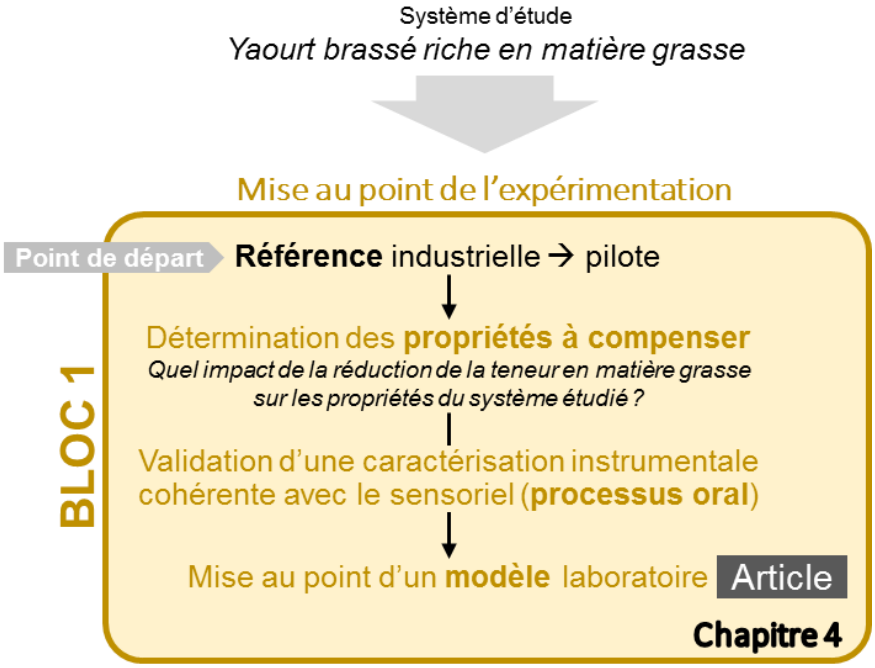
Microscopique (structure)	Observations qualitatives	Observation des globules gras	Caractérisation effectuée à l'aide d'un microscope optique (MZ6, Leica, Allemagne) avec un objectif ×50	p. 155
		Observation des cristaux (matières grasses pures)	Caractérisation effectuée à l'aide d'un microscope optique en lumière polarisée (MZ6, Leica, Allemagne) avec un objectif ×50	-
		Observation de la microstructure des yaourts brassés	Caractérisation effectuée par microscopie laser à balayage à l'aide d'un microscope confocale inverse (TCS SP8 AOBS, Leica, Allemagne) avec un objectif ×40 et le marquage spécifique des protéines et de la matière grasse	p. 189
	Mesures quantitatives	Granulométrie des globules gras	Mesure effectuée par diffraction laser (MasterSizer 2000, Malvern Instruments, Royaume-Uni) soit à partir des émulsions, soit à partir des yaourts brassés après l'ajout de SDS pour désintégrer le réseau protéique au sein des microgels	p. 155 p. 189
		Granulométrie et approximation de la dimension fractale des microgels par diffraction laser	Mesure effectuée par le système MasterSizer 2000 (Malvern Instruments, Royaume-Uni)	p. 131
		Granulométrie, forme et approximation de la dimension fractale des microgels par analyse dynamique d'image (2D)	Mesure effectuée à l'aide de l'unité de dispersion en voie humide LIXELL associée au module d'analyse de la forme et de la taille QICPIC/R (Sympatec GmbH, Allemagne)	p. 132
		Suivi de la structuration des gels laitiers au cours de leur gélification	Suivi effectuée par *diffusing wave spectroscopy* (DWS) (Rheolaser LAB6® Formulaction, France) pendant l'acidification des gels laitiers, juste après avoir ajouté la GDL	p. 116
	Analyses quantitatives	Granulométrie, forme et approximation de la dimension fractale des microgels par reconstruction 3D	Reconstruction 3D et son analyse quantitative effectuée à partir de l'ensemble des images microscopiques (x, y) mesurées sur la hauteur (z) par le logiciel Scan IP™ Simpleware Ltd. (Synopsys, France)	p. 132
		Morphologie mathématique	Analyse quantitative des images confocales (du réseau protéique uniquement) par le logiciel MatLab (The MathWork, France)	p. 189 p. 193
Macroscopique	Propriétés instrumentales	Propriétés rhéologiques des émulsions	Mesures effectuées par rhéologie (MCR 301, Anton Paar, Autriche) avec une géométrie plan-plan strié et d'après le protocole détaillé dans le paragraphe 3.2.2	p. 98
		Texture par rétro-extrusion des yaourts (fermes ou brassés)	Mesures faites pour faire le lien avec ce qui peut se passer à la cuillère et effectuées par rétro-extrusion (environ 30 g de produit, gap de 1,5 mm) à l'aide d'un texturomètre (TA.HD, Stable Micro System, Royaume-Uni) et d'une cellule de 5 kg	p. 116
		Propriétés rhéologiques des yaourts brassés	Mesures faites pour faire le lien avec ce qui peut se passer en bouche et effectuées par rhéologie (MCR 301, Anton Paar, Autriche) avec une géométrie plan-plan strié et d'après un protocole prenant en compte les conditions du processus oral	p. 116 p. 189
		Propriétés de lubrification des yaourts brassés	Mesures faites pour faire le lien avec ce qui peut se passer au moment de la déglutition (film en bouche) et effectuées par tribologie (Nanotribomètre NTR2, CSM, Suisse) avec une bille de 2 mm de PTFE[28] et une surface de PDMS[29]	p. 189
	Propriétés sensorielles (yaourt)	Caractérisations sensorielles	Caractérisations sous-traitées (laboratoire d'analyse sensorielle EUROSYN[30], France) et effectuées par 12 panélistes entraînés	p. 99 p. 106
		Evaluation de la préférence	Caractérisation sous-traitée (laboratoire d'analyse sensorielle EUROSYN[5], France) et effectuée par 150 femmes de 18 à 55 ans (cible) qui consomment la référence industrielle (commerciale) au moins deux fois par semaine	p. 99 p. 106
		Analyse de proximité par rapport à une référence	Analyse basée sur la comparaison de produits à une référence (cible) et effectuées à l'aide de cabines sensorielles et de caches pots ; Sa mise en place est détaillée dans la partie Valorisations scientifiques	p. 211

[28] *PTFE : polytetrafluoroethylene.*
[29] *PDMS : polydimethylsiloxane.*
[30] *Partenaire de Yoplait.*

Chapitre 4 : Mise au point de l'expérimentation

Ce premier chapitre de résultats présente les travaux menés dans le cadre du **premier bloc expérimental**, au travers de :

- L'évaluation de **l'impact d'une réduction de la teneur en matière grasse** sur les propriétés sensorielles et les mesures instrumentales (prenant en compte les conditions de processus oral) du yaourt brassé riche en matière grasse (référence de yaourt brassé riche en matière grasse) `[Partie rédigée]`
- La **comparaison des propriétés sensorielles et instrumentales** pour pouvoir valider la **pertinence des conditions de mesures** instrumentales pour le reste du travail de thèse `[Partie rédigée]`
- La **conception d'une mini-ligne de fabrication de yaourt brassé modèle (échelle laboratoire)** qui soit pertinente par rapport à l'échelle pilote et qui permette de tester les leviers identifiés `[Partie basée sur article et partiellement rédigée]`



4.1. Impact d'une réduction de la teneur en matière grasse sur les propriétés du yaourt brassé riche en matière grasse

Une référence industrielle de yaourt brassé riche en matière grasse (10%)[31] a été choisie pour mesurer l'impact de la réduction de sa teneur en matière grasse sur ses propriétés instrumentales et sensorielles. Pour cela, la référence industrielle a été reproduite à l'échelle pilote (référence pilote) chez Yoplait (procédé parfaitement maîtrisé). En même temps, quatre autres échantillons ont été fabriqués en réduisant progressivement la teneur en matière grasse de la référence pilote (par pas de -1% sur la teneur totale en matière grasse) (Figure 63).

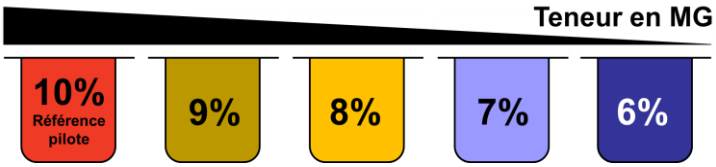


Figure 63 : Echantillons fabriqués à l'échelle pilote afin de mesurer l'impact d'une réduction de la teneur en matière grasse sur une référence pilote de yaourt brassé à 10% de matière grasse

Les propriétés sensorielles des cinq échantillons ont été mesurées pour pouvoir évaluer l'impact de la réduction de la teneur en matière grasse sur ces dernières.

Peu d'études ont associé les caractérisations des propriétés rhéologiques et des propriétés de lubrification des yaourts brassés dans des conditions qui prennent en compte le processus oral. A l'occasion de son post-doctorat, Delphine Huc-Mathis a développé une méthode originale associant ces deux types de caractérisation instrumentale (Huc et al., 2016). Ces travaux ont servi de base pour mesurer l'impact de la réduction de la teneur en matière grasse sur les propriétés instrumentales du yaourt brassé riche en matière grasse.

Les propriétés instrumentales et sensorielles ont ensuite été comparées pour vérifier la pertinence des caractérisations instrumentales par rapport aux propriétés sensorielles et donc au processus oral. Le Tableau 16 reprend l'ensemble des propriétés qui ont été mesurées pour chacun des cinq échantillons fabriqués chez Yoplait.

Tableau 16 : Ensemble des mesures effectuées pour caractériser les cinq échantillons, évaluer l'impact d'une réduction de la teneur en matière grasse sur les propriétés sensorielles et instrumentales du yaourt brassé riche en matière grasse et juger de la pertinence des propriétés instrumentales choisies par rapport aux propriétés sensorielles (détails en Chapitre 3, p. 91)

Types de propriétés	Mesures effectuées
Propriétés sensorielles	Caractérisation sensorielle (panel expert)
	Evaluation de la préférence en fonction de la teneur en matière grasse
Propriétés instrumentales microscopiques	Observation de la structure par microscopie confocale à balayage laser
	Mesure de la taille des globules gras par diffraction laser
	Mesure de la taille des microgels par diffraction laser
Propriétés instrumentales macroscopiques	Mesure des indicateurs de texture par rétro-extrusion (plateau, pente, aire) à 10 °C
	Mesure des propriétés rhéologiques (G'_0, η_0, G'_f, η_f) ▪ *Une première étape de mesure des propriétés à 10 °C (G'_0 et η_0 à 60 s^{-1}) au début du protocole rhéologique prenant en compte le processus oral ;* ▪ *Une deuxième étape d'augmentation de la température de 10 à 25 °C sous un cisaillement de 60 s^{-1} ;* ▪ *Une dernière étape de mesure des propriétés à 25 °C (η_f à 60 s^{-1} et G'_f) à la fin du protocole rhéologique prenant en compte le processus oral*
	Mesure du coefficient de frottement (μ) à 10 $mm.s^{-1}$ à 25 °C

[31] *Référence commercialisée sur le marché.*

4.1.1. Impact sur les propriétés sensorielles

La caractérisation sensorielle des cinq échantillons a été sous-traitée à Eurosyn, partenaire de Yoplait. Les différents termes utilisés viennent de l'entraînement historique du panel sensoriel et ont été choisis pour pouvoir évaluer la diversité sensorielle des produits industriels et notamment des produits brassés. Le profil aromatique (5 attributs significatifs) et le profil de texture (9 attributs significatifs) des échantillons ont été réalisés par un panel entraîné. Seuls les attributs de texture ont été retenus dans le cadre de la thèse et le Tableau 17 donne leurs définitions.

Tableau 17 : Définition des attributs de texture (significatifs pour la caractérisation des 5 échantillons) utilisés par les panélistes pour caractériser les échantillons

Attributs de texture	Définition
Filant *(ropiness)*	Propension du produit à former un filet de yaourt entre la cuillère et le contenant lorsqu'on soulève la cuillère pour la sortir du yaourt
Empreinte à la cuillère *(gelified)*	La capacité du produit à maintenir l'empreinte d'une cuillère pressée à sa surface
Résistance à la cuillère *(resistance)*	Propriété du produit à résister à la cuillère
Cassant *(cohesiveness)*	La capacité du produit à se déformer sous cisaillement plutôt que de se rompre ou se découper nettement en bouche
Collant au palais *(adhesiveness to palate)*	La force nécessaire pour retirer complètement l'échantillon du palais à l'aide de la langue
Epais en bouche *(firmness)*	La force nécessaire pour comprimer le produit entre la langue et le palais
Fondant *(mixes with saliva)*	La quantité d'échantillon qui se mélange à la salive après manipulation en bouche
Glissant *(slipperiness)*	La facilité avec laquelle l'échantillon glisse autour de la langue pendant la compression en bouche
Film gras *(oily film)*	La quantité de film gras laissée sur les surfaces internes de la bouche après la déglutition

Il est intéressant de noter que le terme *crémeux* ne fait pas partie des attributs de texture. Cela est cohérent avec l'état de l'art, selon lequel le *crémeux* est un terme intégrateur qui a des répercussions sur plusieurs modalités sensorielles et dont on ne peut pas se servir comme moyen de mesure en tant que tel. Les termes *épais en bouche* (*firmness*), *cassant* (*cohesiveness*) et *film gras* (*oily film*) sont en bon accord avec les attributs donnés par la littérature pour décrire le *crémeux* (de Wijk et al., 2006; Frøst and Janhøj, 2007; N J Richardson and Booth, 1993; Tomaschunas et al., 2012). La méthode de caractérisation évoquée en Chapitre 3 (p. 99) et ayant fait l'objet d'un poster présenté en congrès (p. 211) a également été utilisée pour caractériser les cinq échantillons. Cette méthode a permis à 11 panélistes non entraînés de générer librement des termes pour caractériser les échantillons sur l'aspect visuel, la manipulation à la cuillère et la prise en bouche. A nouveau, le terme *crémeux* (en bouche) n'est pas spécialement ressorti pour classer les échantillons puisqu'il n'a été généré que 4 fois par les panélistes, alors que le terme *compact* (en bouche) a été généré 15 fois, le terme *épais* (en bouche) 13 fois, le terme *onctueux* (à la cuillère) 16 fois, le terme *ferme* (à la cuillère) 8 fois, le terme *résistance* (à la cuillère) 7 fois et le terme *lisse* (visuel) 9 fois.

Pour chacun des attributs sensoriels, les panélistes ont donné une note entre 0 et 10. Le Tableau 18 montre comment les différents attributs sensoriels évoluent lors d'une réduction de la teneur en matière grasse du yaourt brassé. Il donne également les corrélations qui existent entre les différents attributs de texture.

Tableau 18 : Matrice de Pearson avec les coefficients de corrélation entre les différents attributs sensoriels de texture et lors de la réduction de la teneur en matière grasse ; Les valeurs en **gras** indiquent que les attributs sont significativement corrélés / anti-corrélés ($p < 0,05$)

	Réduction matière grasse	Cassant	Collant au palais	Epais en bouche	Fondant	Glissant	Film gras	Filant	Empreinte à la cuillère	Résistant à la cuillère
Réduction matière grasse	1									
Cassant	**+0,968**	1								
Collant au palais	**-0,994**	**-0,970**	1							
Epais en bouche	**-0,997**	**-0,983**	**+0,994**	1						
Fondant	**+0,959**	**+0,915**	**-0,930**	**-0,958**	1					
Glissant	**+0,958**	**+0,892**	**-0,933**	**-0,952**	**+0,994**	1				
Film gras	**-0,993**	**-0,955**	**+0,982**	**+0,984**	**-0,937**	**-0,937**	1			
Filant	**+0,990**	**+0,933**	**-0,990**	**-0,982**	**+0,946**	**+0,959**	**-0,977**	1		
Empreinte à la cuillère	**-0,994**	**-0,960**	**+0,999**	**+0,992**	**-0,938**	**-0,944**	**+0,981**	**-0,995**	1	
Résistance à la cuillère	**-0,995**	**-0,981**	**+0,996**	**+0,999**	**-0,952**	**-0,948**	**+0,978**	**-0,984**	**+0,994**	1

Tous les attributs sont positivement ou négativement corrélés entre eux. Pour tous les attributs, les cinq échantillons sont classés en fonction de leur teneur en matière grasse. La réduction de la teneur en matière grasse modifie donc les propriétés sensorielles de texture des yaourts brassés riches en matière grasse. Elle engendre une diminution du *collant au palais*, de l'*épaisseur en bouche*, du *film gras*, de l'*empreinte* et de la *résistance à la cuillère*. A l'inverse, elle entraîne une augmentation du *cassant*, du *fondant*, du *glissant* et du *filant* du produit. Ces résultats sont cohérents avec ce qui est montré dans l'état de l'art (Cayot et al., 2008; Tomaschunas et al., 2012).

Parallèlement à la caractérisation sensorielle, l'évolution de l'appréciation (note hédonique) en fonction de la teneur en matière grasse a été mesurée (Eurosyn). Pour cela, cent-cinquante consommatrices de 18 à 55 ans (cible) consommant la référence industrielle au moins deux fois par semaine ont été recrutées. Il leur a été demandé de donner une note hédonique entre 0 et 10 pour chacun des cinq échantillons. L'évolution de leur appréciation en fonction de la teneur en matière grasse a été individuellement étudiée pour chacune d'entre elles. Quinze des consommatrices ont semblé ne pas faire de lien direct entre leur appréciation des échantillons et la teneur en matière grasse (notes hédoniques très variables). Plusieurs raisons peuvent expliquer cela :

- Les notes hédoniques ont été données aléatoirement ;
- Les échantillons ont été évalués sur d'autres critères, et ce n'est pas la matière grasse qui a compté ;
- La note hédonique a été biaisée par l'ordre de présentation des échantillons.

Ces quinze consommatrices ont été exclues de l'analyse et les préférences des cent-trente-cinq autres consommatrices ont été étudiées. Pour cela, une classification ascendante hiérarchique a été effectuée et a permis d'identifier trois groupes de consommatrices avec des typologies différente de l'évolution de leur appréciation en fonction de la teneur en matière grasse (Figure 64).

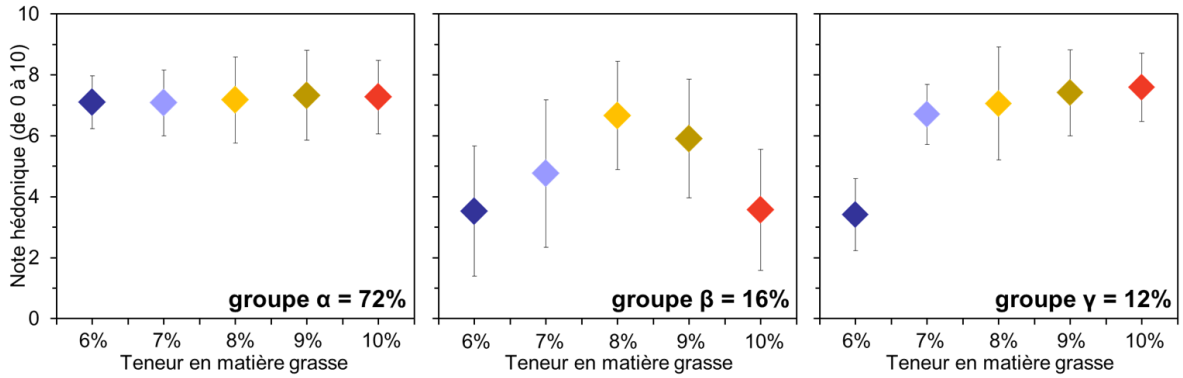


Figure 64 : Evolution de la note hédonique en fonction de la teneur en matière grasse de yaourt brassé de référence pour évaluer la préférence par les trois différents groupes (α, β, γ) de consommatrices (135 sur 150 retenues) identifiés

Un des groupes de consommatrices (α) est largement majoritaire (72%). Pour ce groupe, l'appréciation des consommatrices ne varie globalement pas en fonction de la teneur en matière grasse, avec tout de même une faible tendance à augmenter avec la teneur en matière grasse. Les deux autres groupes (β et γ) de consommatrices sont plus minoritaires (16 et 12%). Pour ces deux groupes, l'appréciation des consommatrices est beaucoup plus sensible à la teneur en matière grasse. Globalement, les consommatrices du groupe β apprécient peu les échantillons présentés (notes hédoniques faibles) et leur préférence correspond à un optimum autour de 8% de matière grasse. Les consommatrices du groupe γ sont, quant à elles, sensibles aux faibles teneurs en matière grasse et leur appréciation chute pour des teneurs inférieures à 7% de matière grasse. Cette chute de leur appréciation s'explique certainement par un seuil de perception en-dessous duquel les consommatrices commencent à percevoir des différences – qui peuvent être liées à la texture mais aussi à l'aromatique puisque la matière grasse contient de nombreux arômes (Le Calvé et al., 2015).

Si on moyenne l'ensemble des notes hédoniques pour chaque échantillon, la préférence des consommatrices interrogées correspond à un optimum qui se situe entre 8 et 9% de matière grasse. Cependant, au vu des différents groupes de consommatrices, la préférence globale est à prendre avec précaution. Globalement, on peut dire que la réduction de la teneur en matière grasse peut dégrader l'appréciation des consommatrices pour le produit. Il est donc important de faire évoluer les propriétés pour limiter la modification des propriétés sensorielles des yaourts lors d'une réduction de la teneur en matière grasse.

4.1.2. Impact sur les propriétés mesurées instrumentalement

Propriétés microscopiques

La mesure de la taille des microgels par diffraction laser n'a pas montré de différence en fonction de la teneur en matière grasse. Pour les cinq échantillons, les distributions de taille obtenues étaient monomodales, avec des diamètres médians de microgels autour de 20 µm. De même, la mesure de la taille des globules gras n'a pas montré de différence en fonction de la teneur en matière grasse puisque les distributions de taille des globules gras possédaient toutes un léger épaulement avec un premier pic autour de 0,2 µm (probablement des micelles de caséines) et un deuxième autour de 0,5 µm (taille des globules gras).

Les microstructures des échantillons ont été observées (5 répétitions[32]) par microscopie confocale à balayage laser en marquant spécifiquement les protéines et la matière grasse. La Figure 65 montre les microstructures typiques obtenues pour les deux échantillons aux bornes, à 6 et 10% de matière grasse.

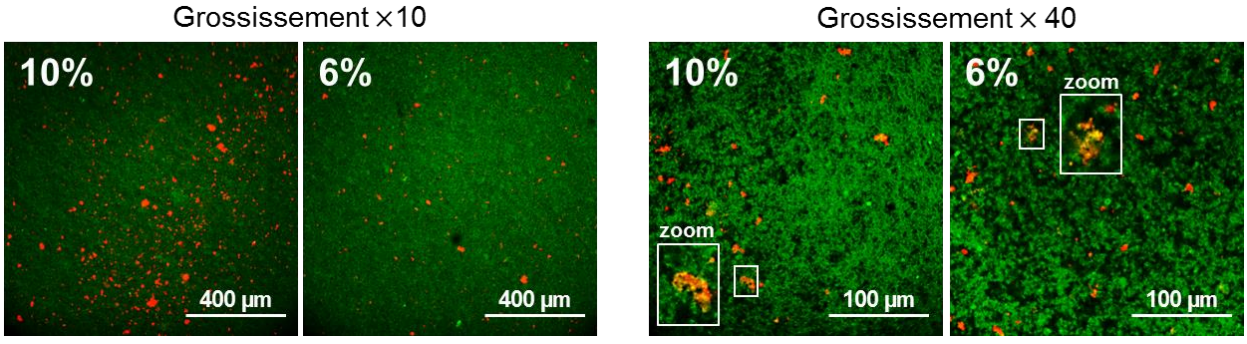


Figure 65 : Images confocales des échantillons aux bornes (teneurs en matière grasse maximale de 10% et minimale de 6%) observées avec des objectifs ×10 et ×40) ; Les globules gras apparaissent en rouge, les protéines en vert, les zones où la matière grasse et les protéines sont co-localisées apparaissent en jaune-orange et les zones contenant du sérum apparaissent en noir

[32] *5 images prises à partir d'une seule lame d'un même pot.*

Les microstructures obtenues sont caractéristiques de ce qui est montré dans la littérature pour des systèmes de types émulsion gélifiée (Liu et al., 2015) et yaourt brassé (Huc et al., 2016). Aux deux grandissements, on observe un réseau protéique (tapis) avec de la matière grasse dispersée sous forme de globules gras plutôt agrégés. Les microgels ne sont pas distinguables les uns des autres. De plus :

- *Avec l'objectif x10 :* Les différences concernent surtout la matière grasse et l'échantillon 10% contient plus de matière grasse que l'échantillon 6%.
- *Avec l'objectif x40 :* Les zones jaunes sur les deux zooms indiquent que des protéines et de la matière grasse sont co-localisées, ce qui est typique de globules gras stabilisés par des protéines à l'interface. On ne voit plus de différence concernant la quantité de matière grasse à ce grandissement. En revanche, l'échantillon 6% semble plus poreux que l'échantillon 10%. Cette différence de porosité peut s'expliquer par une teneur en matière sèche plus importante dans l'échantillon 10% (40% de matière grasse en plus) que dans l'échantillon 6%. D'autre part, la littérature a montré que les globules gras pouvaient participer au réseau via l'interface (Sodini et al., 2004) et ainsi renforcer la structure. Dans le cas de l'échantillon à 10% de matière grasse, la plus grande quantité de globules gras a pu également renforcer le réseau et participer à sa densification.

La microstructure varie donc en fonction de la teneur en matière grasse. Elle varie à la fois au niveau de la matière grasse, ce qui est logique, et au niveau du réseau protéique / porosité de la structure.

Propriétés macroscopiques

L'évolution des propriétés macroscopiques (rétro-extrusion, rhéologie, tribologie) mesurées en fonction de la teneur en matière grasse ont été comparées pour voir à quel point elles étaient corrélées (Tableau 19).

Tableau 19 : Matrice de Pearson avec les coefficients de corrélation entre les mesures instrumentales de texture (force au plateau *(ou consistance)* en N, pente *(ou résistance)*), de rhéologie (G'_0 et G'_f en Pa, η_0 et η_f en Pa.s) et de tribologie (μ mesuré à 10 $mm.s^{-1}$) ; Les valeurs en **gras** indiquent que les propriétés sont significativement corrélées / anti-corrélées ($p < 0,02$)

	G'_0	G'_f	η_0	η_f	μ	Plateau	Pente
G'_0	1						
G'_f	**+ 0,998**	1					
η_0	**+ 0,998**	**+ 1,000**	1				
η_f	**+ 0,997**	**+ 1,000**	**+ 1,000**	1			
μ	- 0,908	- 0,902	- 0,894	- 0,897	1		
Plateau	**+ 0,956**	**+ 0,948**	**+ 0,948**	**+ 0,940**	- 0,852	1	
Pente	**+ 0,936**	**+ 0,940**	**+ 0,940**	**+ 0,933**	- 0,800	**+ 0,981**	1

D'après la matrice de Pearson, les indices de texturométrie mesurées par rétro-extrusion (plateau, pente, aire) sont corrélés entre eux, tout comme le sont les données rhéologiques (G'_0, G'_f, η_0, η_f) entre elles. Dans le cas de la réduction de la teneur en matière grasse, les données de texturométrie et de rhéologie sont également corrélées entre elles. Le coefficient de friction (μ) évolue dans le sens inverse des données de texture (rétro-extrusion et rhéologie) en fonction de la teneur en matière grasse mais il n'y est pas corrélé. D'expérience sur d'autres systèmes (de type yaourt) et pour d'autres leviers que la variation de la teneur en matière grasse, les données de texture et de tribologie sont complémentaires (Huc et al., 2016).

Afin d'étudier plus précisément l'effet de la réduction de la teneur en matière grasse sur les propriétés macroscopiques du yaourt brassé riche en matière grasse, les évolutions du plateau, G'_0, G'_f, η_0, η_f et de μ ont été tracées en fonction de la teneur en matière grasse (Figure 66).

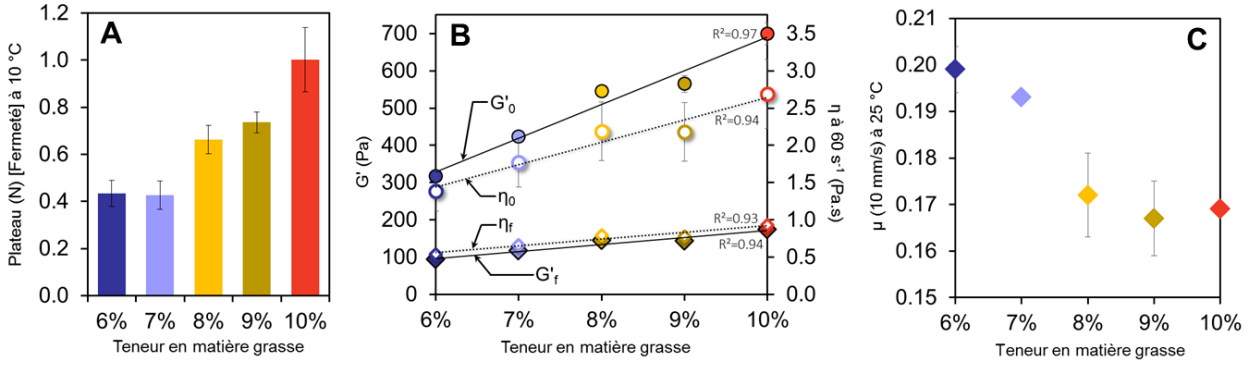


Figure 66 : Evolution des mesures instrumentales de (A) texture (plateau), (B) rhéologie (G'_0, G'_f, η_0, η_f) et (C) tribologie (μ) en fonction de la teneur en matière grasse ; Les R^2 indiqués en B sont ceux obtenus par régressions linéaires (droites continues pour G' et droites pointillées pour η)

La force au plateau mesurée par rétro-extrusion est sensible à ± 2% de matière grasse et ne permet pas de distinguer les produits à ± 1% de matière grasse (Figure 66 A). Cette mesure montre que plus les échantillons contiennent de la matière grasse, et plus ils sont consistants.

Les propriétés rhéologiques G'_0, G'_f, η_0 et η_f évoluent toutes linéairement en fonction de la teneur en matière grasse et elles sont plus discriminantes au début (à 10 °C et avant cisaillement) qu'à la fin (à 25 °C et après cisaillement à 60 s^{-1}) du protocole rhéologique (Figure 66 B). De plus, les propriétés rhéologiques des échantillons à 10% de matière grasse évoluent plus fortement que celles des produits à 6% de matière grasse entre le début (G'_0 et η_0) et la fin (G'_f et η_f) du protocole rhéologique prenant en compte le processus oral. Ceci peut s'expliquer par le fait que la matière grasse, présente en plus grande quantité dans l'échantillon 10%, fond entre 10 et 25 °C, faisant ainsi plus fortement perdre de la texture au produit.

Le coefficient de friction (Figure 66 C), quant à lui, n'évolue pas de manière linéaire en fonction de la teneur en matière grasse. Il existe un seuil entre 7 et 8% de matière grasse, en-dessous duquel, le coefficient de friction augmente, c'est-à-dire que la capacité de lubrification de l'échantillon diminue. Ce seuil est assez classique en tribologie sur des systèmes de type émulsion gélifiée et se situe souvent au-delà de 8% de matière grasse d'après ce qui est rapporté dans la littérature (Chojnicka-Paszun et al., 2012; Chojnicka et al., 2009). Il peut s'expliquer par la sensibilité de l'appareil de mesure et sa capacité à mesurer des coefficients de friction au-delà d'un seuil de lubrification – directement lié à la teneur en matière grasse.

La réduction de la teneur en matière grasse a donc un impact sur l'ensemble des propriétés macroscopiques mesurées instrumentalement dans des conditions qui prennent en compte le processus oral. Elle fait diminuer la force au plateau mesurée en retro-extrusion, diminuer les propriétés rhéologiques et augmenter le coefficient de friction mesuré par tribologie. Il s'agit maintenant de voir comment ces propriétés sont reliées aux propriétés sensorielles.

4.1.3. Comparaison entre les propriétés sensorielles et instrumentales

Au vu des fortes corrélations entre les propriétés instrumentales macroscopiques, seuls la force au plateau (rétro-extrusion), les modules conservatifs G'_0 et G'_f (propriétés rhéologiques) et le coefficient de friction μ (tribologie) ont été sélectionnés parmi l'ensemble des mesures instrumentales. Une analyse en composante principale (ACP) a été effectuée à partir des moyennes de ces propriétés pour les cinq échantillons. Les données sensorielles ont été projetées comme variables supplémentaires afin de pouvoir comparer les données instrumentales et sensorielles (Figure 67).

L'ACP obtenue représente plus de 98% de l'information, avec près de 95% portée par l'axe F1 au travers des propriétés instrumentales que sont la force au plateau, G'_f, G'_0 et μ. Le cercle des corrélations obtenu permet de retrouver les informations des Tableau 18 et Tableau 19. Il indique que les données sensorielles sont directement corrélées aux données instrumentales et de manière encore plus forte avec les modules conservatifs G'_0 et G'_f. Le coefficient de friction est légèrement moins corrélé avec les données sensorielles et c'est le terme *cassant* qui semble s'en rapprocher le plus. Les conditions de mesures choisies – et prenant en compte le processus oral – sont donc tout à fait pertinentes dans le cadre de l'étude. Elles permettent d'expliquer les données sensorielles et ont ainsi pu être validées sur le yaourt brassé riche en matière grasse.

D'autre part, la cartographie classe les produits selon l'axe F1, dans un ordre qui dépend de la teneur en matière grasse. Les échantillons à 8% et à 9% de matière grasse sont relativement proches et se distinguent moins entre eux que le reste des échantillons.

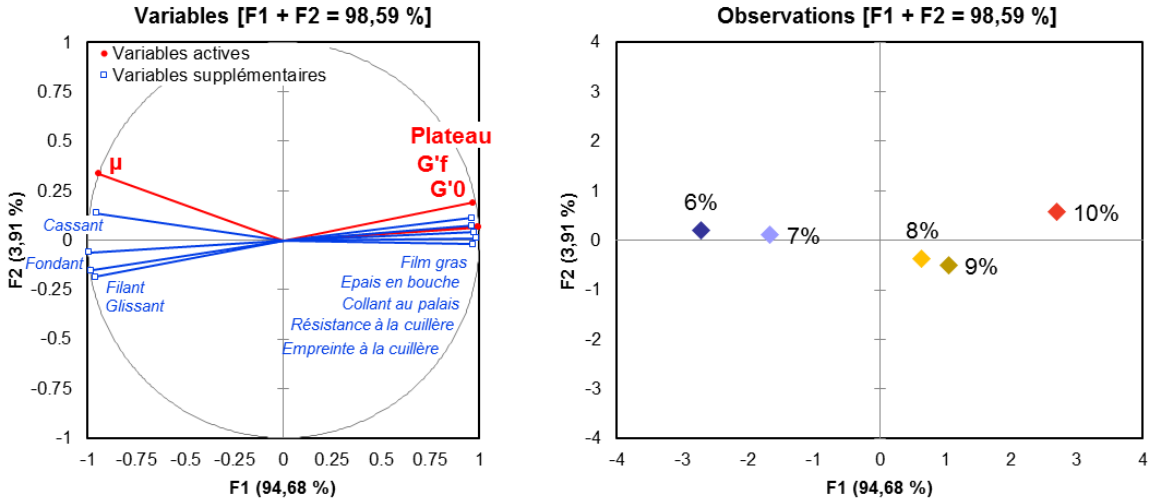


Figure 67 : Cercle des corrélations des propriétés instrumentales (à gauche) avec les attributs sensoriels projetés en tant que variables supplémentaires, et cartographie des échantillons correspondante (à droite)

L'analyse de cette ACP permet de retrouver certains éléments de la littérature présentés en Figure 51 (p. 76) (Huc et al., 2016; Liu et al., 2015; Sonne et al., 2014). Par exemple, la tribologie est corrélée avec la perception d'un *film gras* et les mesures de texture (rétro-extrusion et rhéologie) sont corrélées avec les caractéristiques sensorielles d'*épaisseur en bouche*, de *résistance à la cuillère*, de *cassant*, etc. Ces résultats ont fait l'objet d'un poster (Valorisations scientifiques, p. 211).

En conclusion, la préférence des consommateurs (cible) peut être dégradée par une réduction de la teneur en matière grasse et c'est pour cette raison qu'il est important de préserver les propriétés regroupées sous le terme de *crémeux*. La réduction de la teneur en matière grasse impacte à la fois les propriétés sensorielles et instrumentales des yaourts brassés. Les propriétés sensorielles et les mesures instrumentales telles qu'elles ont été mesurées sont fortement corrélées. Utiliser des mesures instrumentales pour évaluer les propriétés de texture des yaourts est donc pertinent pour le yaourt brassé riche en matière grasse.

4.2. Mise au point d'un modèle laboratoire

4.2.1. Adaptation du procédé pilote à l'échelle laboratoire [ARTICLE]

L'état de l'art a montré l'importance qu'a le procédé sur la structuration des gels laitiers (microstructure) et *in fine* sur leurs propriétés macroscopiques (notamment rhéologiques). La maîtrise de la structuration du produit au cours du procédé est donc essentielle pour pouvoir tester des leviers de manière pertinente. Ce paragraphe montre les travaux qui ont été menés pour mettre au point un modèle laboratoire (mini-ligne de fabrication de yaourts brassés riches en matière grasse). Pour cela, des références ont été fabriquées à l'échelle pilote (Yoplait) et les opérations unitaires ont été adaptées à l'échelle laboratoire en se basant sur les propriétés des références pilotes (ingénierie inverse). Ces travaux ont donné lieu à l'article présenté ci-dessous.

Cet article est publié dans *Journal of Food Engineering* (*https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.12.018*)

Rational design of a versatile lab-scale stirred milk gel using a reverse engineering logic based on microstructure and textural properties

Marine Moussier, Delphine Huc-Mathis, Camille Michon, Véronique Bosc
Ingénierie Procédés Aliments, AgroParisTech, Inra, Université Paris-Saclay, 91300 Massy, France

Abstract

The textural properties of stirred yogurts (i.e. stirred milk gels) are directly linked to their microstructure. In this study, a logic of reverse engineering was used to design a lab-scale process producing real-like stirred milk gels (1.5 kg batch). A reference of stirred fermented milk gel was produced at pilot scale (100 kg batch). The conditions of lab-scale homogenization (sonication), acidification (glucono-δ-lactone concentration) and stirring (filter, pumping rate, ultra-smoothing) were adjusted to obtain size distributions of fat droplets and of microgels and rheological properties similar to those of the pilot reference. The final lab-scale process was validated by comparing the properties of stirred milk gels produced at lab and pilot scales with two fat contents (6 and 10 wt%). Although the stirred milk gels obtained at the two scales differed slightly in microgel sizes and in rheological properties, they were similarly ranked according to their fat content.

Keywords: Formulation, physico-chemical properties, stirred milk gel, rheology, process, fat reduction.

Highlights

- A lab-scale process was set up for stirred milk gel using a rational design method.
- Homogenization, acidification and stirring were adjusted based on pilot references.
- The microstructure and the rheological properties were the targeted properties.
- The relevance of model stirred milk gel was validated by varying the fat content.
- The lab-scale process enabled testing of parameters set at larger scales.

1. Introduction

Fermented milks are obtained by using lactic acid bacteria, which leads to a reduction in pH from 6.5 to 4.5. They are usually manufactured mainly from milk ingredients and the bacteria have to be viable, active and abundant in the final product (FAO/WHO, 2011). Several million tons of yoghurts and other fermented milk products are produced and consumed every year and are important from both an economic and nutritional point of view. Stirred milk gels have been widely studied, especially for their sensory quality of creaminess, mouth coating or smoothness (Cayot et al., 2008; Lee and Lucey, 2006). To be processed into a stirred fermented gel, milk undergoes several typical and well documented unit operations with different physico-chemical conditions that considerably modify the microstructure (Lee and

Lucey, 2010; Mokoonlall et al., 2016; Sodini et al., 2004) (see details in Fig. 1). At first, raw milk is a complex colloidal system composed of an aqueous phase (lactose, minerals and solubilized whey proteins), suspended casein micelles and fat dispersed as droplets about 5 µm in diameter. It is a liquid oil-in-water emulsion in which the interface between the aqueous phase and the dispersed fat is a native membrane containing proteins, polar lipids, enzymes and other minor components (Lopez et al., 2014). The raw milk is centrifuged to separate it into skim milk (about 3.5 wt% protein) and cream (about 35 wt% fat and 2 wt% protein). The resulting cream and skim milk are then mixed to obtain a mix with a target composition (in terms of fat and protein contents). Skim milk powder (SMP) (about 35 wt% protein) can be used to adjust the protein content. The resulting mix is pasteurized through a thermal treatment about 85 °C for 30 min or 95 °C for 5 min (FAO, 2013) leading to the destruction of microorganisms, aggregation of whey proteins and creation of whey protein/κ-casein complexes. The mix is then homogenized under dynamic pressure generally between 10 and 20 MPa (Sodini et al., 2004), which reduces the fat droplets to less than 1 µm and modifies the native interface through the adsorption and reorganization of whey proteins and caseins (Loveday et al., 2013). The pasteurized and homogenized mix is inoculated with lactic bacteria to reduce the pH from 6.5 to the isoelectric point of milk proteins, around 4.5. During this acidification step, electrostatic repulsions are eliminated and the micellar calcium is solubilized, allowing the proteins to form a three-dimensional network in which fat droplets can interact via their interface. The stirring stage transforms the resulting emulsion-filled gel into a concentrated dispersion of microgels of between 10 and 100 µm in diameter (Lee and Lucey, 2010; Sodini et al., 2004). Finally, the stirred milk gel is cooled, packaged and stored at 4-10 °C.

By varying the formulation, several studies have shown that the textural or sensory (firmness, graininess perception, etc.) properties of stirred milk gels were directly driven by their microstructure (microgel size, fat droplet size, protein network thinness, etc.) (Abhyankar et al., 2014; Cayot et al., 2008; Foucquier et al., 2012; Lee and Lucey, 2010; Mokoonlall et al., 2016). Genovese et al. (2007) broadly reviewed the impact of size, shape and hardness of particles on the instrumental texture of food dispersions. In addition, by combining instrumental measurements and sensory characterization (trained panelists), Janhoj et al. (2009) showed that perceived creaminess was negatively correlated with perceived graininess and hence with the measured size of the microgels dispersed in a milk gel system. It can be both insufficient and costly to vary factors at a large scale when formulating. Smaller scales offer more versatility and flexibility at lower cost. However, in these studies there were still some discrepancies between small and large scale processes. For example, in the lab, even though this step can significantly modify the structure of microgel particles (Mokoonlall et al., 2016), stirring was generally performed either by blending (by hand, in a blender or using an overhead stirrer) or by extrusion (needle) with non-evaluated reproducibility. There is currently no documented process that was specifically designed and validated to well mimic a large scale process typical of that commonly used (i.e. in terms of unit operations, temperatures and shearing) to make stirred fermented milk gels at lab scale using glucono-δ-lactone (GDL) acidification and with a focus on the validity and transferability of the process.

The aim of the present study was to design and validate a lab-scale process to produce stirred milk gels in conditions that match those at pilot scale. A reverse engineering logic based on the structural and textural properties was used and applied step by step (*i.e.* for each unit operation). Several reference samples of stirred fermented milk gels were produced at pilot scale and were carefully characterized to define the target microstructure and rheology. The scale-down rational design was carried out by listing the different unit operations (homogenization, acidification and stirring) comprising the pilot scale process and choosing series of lab-scale unit operations able to perform them. The unit operations were assembled in a small manufacturing line, in which each process step could be studied and used separately. The relevance and sensitivity of this lab-scale process line were proven by comparing stirred milk gel containing different fat and protein concentrations and produced both at lab-scale and with the pilot plant.

2. Materials and methods

2.1. Raw materials

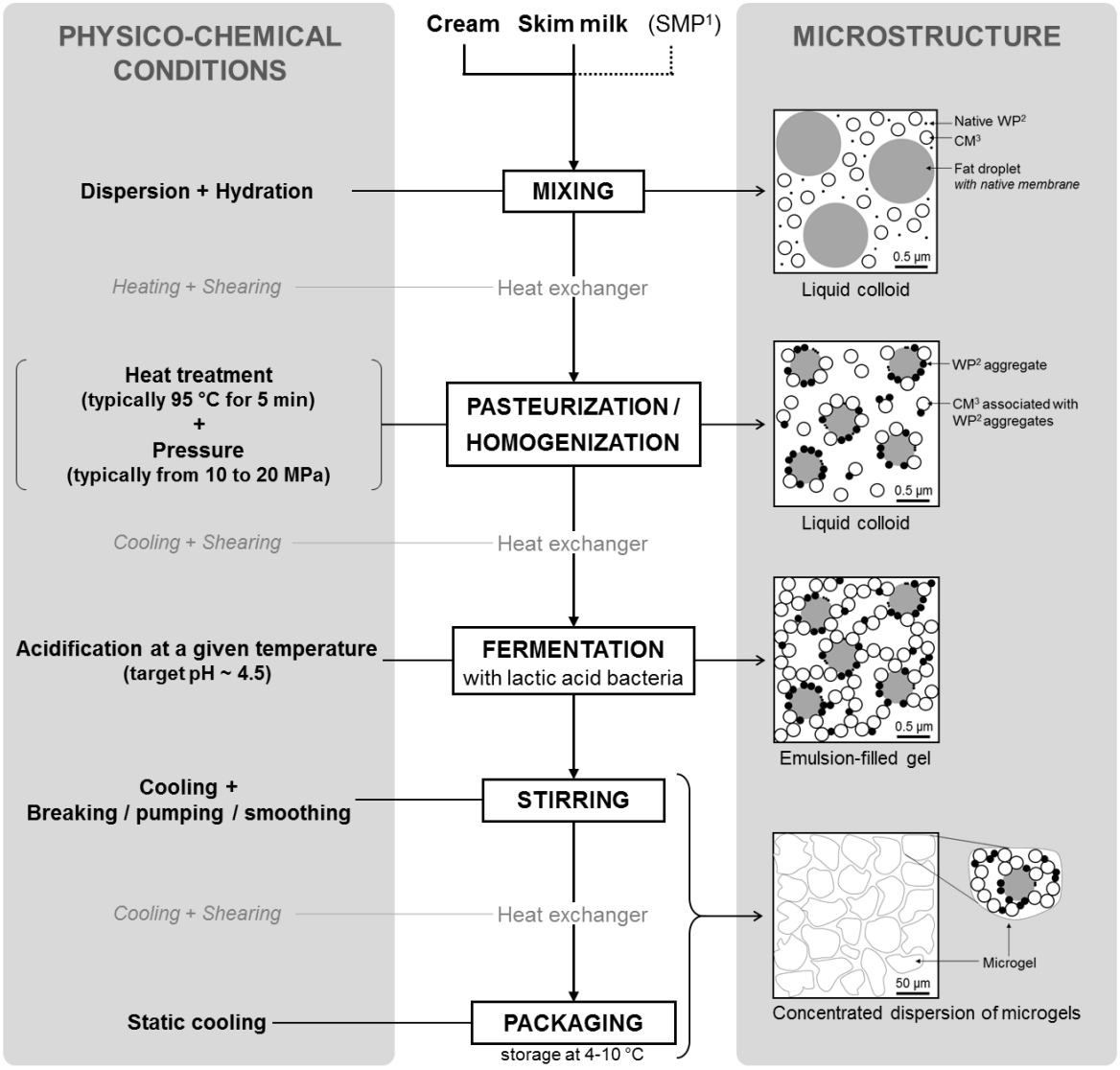
Purified water was obtained using a Milli-Q purification system (Millipore, Merck, Germany) and its conductivity was 6.6×10^{-5} S.m^{-1}. Skim milk powder (SMP, 25.1 wt% proteins, 18.4 wt% caseins, 6.7 wt% whey proteins of which 68.1% native) was provided by Eurosérum (Sodiaal, Port-sur-Saone, France) and additive-free commercial pasteurized liquid cream

(cream) (32.5 wt% fat, 2.2 wt% protein) was purchased from Alsace Lait (Hoerdt, France). Pregelatinized modified rice starch (between 2 and 8 µm in diameter) was provided by the dairy company which made the pilot references. GDL (purity ≥ 99.0%) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

2.2. Manufacture of stirred milk gels at pilot and lab scales

Fermented stirred milk gel references produced at pilot scale (100 kg)

A French dairy company kindly provided a reference of high-fat stirred fermented milk gel produced using their fully controlled pilot process (pilot plant with 100 kg batches). This reference was the result of traditional processing of stirred yoghurt-type products (Fig. 1), including mixing, pasteurization, dynamic homogenization, lactic fermentation at 30 °C and stirring. It was produced from skim milk, cream, SMP and 1.0 wt% starch, with final target contents of 3.1 wt% protein and 10.0 wt% fat (PilotREF(10)). Since fat content is known to impact textural and structural properties, a pilot reference with lower fat content was also manufactured, with a protein content of 3.1 wt% and a fat content of 6.0 wt% (PilotREF(6)). These two references of pilot fermented stirred milk gels were made twice, in two different weeks (four repetitions of each in total). Lactic acidification over time was monitored by the company and lasted 10 ± 1 h.



[1]SMP: Skim milk powder; [2]WP: Whey protein; [3]CM: Casein micelle

Fig. 1: The typical unit operations of stirred fermented milk production are listed in the middle column, from ingredients at the top to the conditioning at the bottom. The physico-chemical conditions applied throughout the process are listed

on the left hand column. The matrix microstructure and its changes during the process are schematized in the right hand column. Adapted from FAO (2013); Lee and Lucey (2010); Mokoonlall et al. (2016); Sodini et al. (2004)

Stirred acid milk gel made at lab scale (1.5 kg) and tested parameters

Depending on the desired composition, the mix was prepared from reconstituted skim milk, with or without cream and rice starch. The reconstituted skim milk was prepared by dispersing SMP in purified water under continuous stirring at 250 rpm for 15 min at room temperature and then kept overnight at 8 °C to ensure proper hydration. Depending on the required fat content, cream was added to the reconstituted skim milk and the mix was achieved aiming for a constant final protein content of 3.1 wt%. In some of the mixes, 1.0 wt% of rice starch was added. The pasteurization heat-treatment was carried out in a thermostatically controlled water bath, by holding the sample temperature at 80 ± 2 °C for 30 min. Homogenization was performed by sonication (20 kHz, VCX 130, Sonic & Materials, UK) at 130 W for 15 effective minutes with 10 s pulses and a 13 mm probe. These sonication parameters were selected in preliminary tests on dairy emulsions to obtain droplet sizes similar to those of commercial creams. They remained to be validated on the system under study. Once homogenized, the mix was cooled and then acid-gelled with GDL added at different concentrations (0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.30, 1.50 wt%), under a constant temperature of 30 ± 1 °C (heat chamber). This temperature was chosen in order to be representative of the pilot process. After the resulting set gel was checked to be sure the pH was below 4.5 ± 0.1, it was stored for one week at 8 °C or stirred before being stored in the same conditions as the set gel (termed 'lab stirred milk gel'). Different types of stirring were tested using different pump flow rates, two filter pore sizes and with or without ultra-smoothing. The gel was first coarsely broken up with a spatula, poured into a beaker (1 L), pumped through a peristaltic pump at different flow rates (50, 100, 200, 300 mL.min^{-1}) (L/S Precision Console, Masterflex, Gelsenkirchen, Germany) via two successive pipes (one 40 cm in length with a diameter if 7 mm, and one 100 cm in length with a 3 mm diameter) and then through one plastic mesh filters placed in filter holder (0.5 or 1 mm pores). When the pre-stirred gel was ultra-smoothed, it was passed once through a rotor/stator (Polytron PT 3100 D, PTG 36/4 probe, Kinematica AG, Switzerland) at 1,500 rpm, in batches of 250 mL. Finally, the stirred gels were placed in 100 mL pots at 26 ± 1.2 °C and stored at 8 ± 1.0 °C for one week. Details on the composition and a summary of the parameters tested in each unit operation are listed in Table 1. Two batches of the final lab-scale stirred milk gels with 10 wt% fat (LabREF(10)) and with 6 wt% fat (LabREF(6))) were made in two different weeks (i.e. two repetitions of each).

Table 1: Summary of the parameters tested and corresponding sample names. The protein content of all the samples was 3.1 *wt%* and pasteurization was performed at 80 °C for 30 min. The amounts of fat, rice starch and GDL are given in *wt%*, the pumping rate in *mL.min*$^{-1}$, the filter pore size *mm* and ultra-smoothing in *rpm*

Unit operation	Fat	Rice starch	GDL	Sonication (S)	Pumping (P)	Filter pore size (F)	Ultra-smoothing (US)	Nomenclature
Homogenization	10.0	-	1.30	Yes	-	-	-	S
Acidification	10.0	-	0.50	Yes	-	-	-	0.50
	10.0	-	0.75	Yes	-	-	-	0.75
	10.0	-	1.00	Yes	-	-	-	1.00
	10.0	-	1.25	Yes	-	-	-	1.25
	10.0	-	1.50	Yes	-	-	-	1.50
Stirring	10.0	1.0	1.00	Yes	200	0.5	-	P200-F0.5
	10.0	1.0	1.00	Yes	200	1	-	P200-F1
	10.0	1.0	1.00	Yes	200	1	1500	P200-F1-US
	10.0	1.0	1.00	Yes	50	1	1500	P50-F1-US
	10.0	1.0	1.00	Yes	100	1	1500	P100-F1-US
	10.0	1.0	1.00	Yes	300	1	1500	P300-F1-US
Final lab-scale stirred milk gel	10.0	1.0	1.00	Yes	200	1	1500	LabREF(10)
	6.0	1.0	1.00	Yes	200	1	1500	LabREF(6)

2.3. Analysis of particle size distribution by laser diffraction

The particle size distributions were obtained by laser diffraction with a MasterSizer 2000 (Malvern Instruments, UK). The size distributions of the fat globules were measured either in the cream, mixes or milk gels (Mie theory, 1.33 RI for water, 1.47 RI for milk fat) (three repetitions of each). The mixes and cream were diluted 1:10 in purified water and the milk gels were diluted 1:10 in a 1 wt% sodium dodecyl sulfate (SDS) solution to disrupt both the protein network and the aggregation of the fat droplets. The size distributions of the microgels were measured in the stirred milk gels (Fraunhofer theory because microgels are bigger than the laser beam, which is 633 nm), by diluting them (1:10) in purified water (three repetitions of each). The size below which there were 50% (median diameter, d(0.5), µm) and 90% (d(0.9), µm) of the sample particles and the width of the distribution (span, Equation 10) were recovered.

$$span = \frac{d(0.9) - d(0.1)}{d(0.5)} \qquad \text{Equation 10}$$

2.4. Monitoring of gelation by DWS during acidification

The acidification kinetics were monitored over time using a multichannel C3060 system (Consort bvba, Turnhout, Belgium). Probes were placed in the products just before GDL was added (pH about 6.5) and maintained until a pH of 4.5 was reached, when possible. Immediately after GDL was added, gelation was monitored using DWS measurement over time (Rheolaser LAB6®, Formulaction, Toulouse, France) using the protocol of Rohart et al. (2016). This DWS method made it possible to obtain the elasticity index (EI, nm^{-2}) from the mean square displacement of particles at low decorrelation time (< 0.1 s), the median diameter of the moving particles (i.e. the fat droplets) measured by laser diffraction (2 µm) and the diameter of a model particle used for calibration (TiO2, 1 µm). Since the variability of the acidification kinetics was only ± 1.0% (according to 10 repetitions carried out before the present study), monitoring of the optimization of acid gelation with different GDL concentrations was made once.

2.5. Measurement of textural properties

Texture analysis by back-extrusion

Part of the textural properties were measured using a back-extrusion test performed with a TA.HD texture analyzer (Stable Micro System, Godalming, UK). Samples were prepared in 40 mL plastic cups (weight about 30 g, internal diameter 28 mm). Set acid milk gels were poured directly into the cups after GDL was added (before acid gelation) whereas stirred milk gels were poured into the cups after stirring (three repetitions of each). Milk gels were compressed using a flat disc (25 mm diameter, height 2 mm) at a crosshead speed of 1 $mm.s^{-1}$ and a depth of 20 mm (1.5 mm gap). During compression, the normal force (N) increased quite linearly until it reached a plateau. The value of the average force of the plateau (F_P, N) was chosen to represent the firmness of the sample.

Rheological properties in conditions close to the oral process

Rheological properties of the stirred milk gels (at lab and pilot scales) were evaluated under conditions that imitated the oral process as much as possible, using the method of Huc et al. (2016). After standardized mixing (consisted in mixing each pots using a small teaspoon rotated four times from the bottom to the top of the pot), a small amount of each sample was placed on a MCR 301 rheometer (Anton Paar, Graz, Austria) at a temperature of 10 °C, using a plate-plate system (steel serrated parallel plate, diameter 5 cm). Measurements were carried out while the temperature was increased from 10 °C to 25 °C (1 mm gap). First, the viscoelastic properties were measured (0.01-10 Hz frequency, 0.1 % strain). Second, viscosity was measured at 60 s^{-1} while the temperature was increased from 10 °C to 25 °C (0.6 °C.s^{-1} heating rate), then the viscoelastic properties were measured at 25 °C (0.01-10 Hz frequency, 0.1 % strain) after 1 min at 25 °C under 60 s^{-1} shearing. Three repetitions were made for each sample. Several indicators were chosen to describe the rheological properties: viscosity (η_0, Pa.s) and storage moduli (G'_0, Pa, 1 Hz) at the beginning of the mimicked oral process, and viscosity (η_f, Pa.s) and storage moduli (G'_f, Pa, 1 Hz) at the end of the mimicked oral process.

2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using XLSTAT 2015.1 software (Addinsoft, Paris, France). Analysis of variance (one way ANOVA) was performed to evaluate differences between average values using Tukey's test. A significance level of $p < 0.05$ was used. Principal component analysis (PCA) was used to map samples by analyzing several properties simultaneously.

3. Results and discussion

Since the present study used a logic of reverse engineering, the measured parameters were compared with those of stirred fermented gel references made at pilot scale, except for the back-extrusion measurement (because the transfer of the pilot-scale stirred milk gels into 40 mL cups would distort this measurement). However, the rheological analysis enabled the reliable comparison of the textural properties of the pilot- and lab-scale samples (Table 2).

3.1. Selection of the lab scale process parameters

Effect of sonication on the size distribution of fat droplets

Fig. 2 shows the size distributions of fat droplets and distinguishes the cream, with a more monodispersed distribution and a median diameter of 3.3 µm, from all the other samples, which had smaller droplets (d(0.5) close to 0.5 µm). The size distributions of the pilot reference treated by high pressure (PilotREF(10)) and the lab-scale stirred milk gel treated by sonication (LabREF(10)) both displayed a shoulder with a first peak close to 0.2 µm and a second peak close to 0.5 µm. The mix obtained just after sonication of the cream (S-Mix) displayed a single peak, around 0.5 µm. The size distributions of the lab-scale samples treated by sonication (LabREF(10) and S-Mix) were broader than one of the pilot reference, with a tail up to larger diameters equivalent to those of fat droplets in cream.

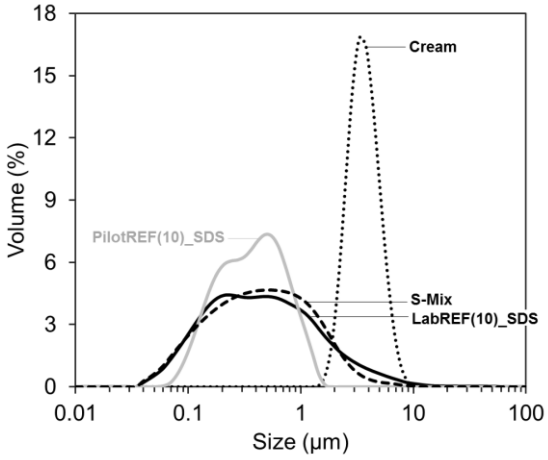


Fig. 2: Impact of sonication (S) on the size distribution of the fat droplets in the cream (dotted line) measured in the mix (S-Mix, dashed line). Comparison between the fat droplet size distributions in the lab-scale milk gel (LabREF(10)_SDS, solid line) and in the pilot reference (PilotREF(10)_SDS, pale grey solid line)

A median diameter of 0.2 ± 0.05 µm was obtained from skim milk (results not shown, 1:10 dilution in 1% SDS solution, 1.473 RI), suggesting that the first peak of the distributions of the pilot reference and of the lab-scale milk gel corresponds to components of the size of casein micelles, which have a median size of around 0.2 µm (Laurence Donato and Guyomarc'h, 2009). The sizes obtained after the high pressure treatment at pilot scale were as expected, in accordance with the literature (Floury et al., 2000). The results also showed that sonication reduced the size of fat droplets in the same range as pilot homogenization, but the final size distribution was larger (increased polydispersity). Sonication (lab-scale) reduces the droplet size mainly close to the probe, and by cavitation and by the resulting turbulence, whereas high pressure homogenization (pilot-scale) does it very uniformly by shearing, micro-turbulence and cavitation. This difference in the transmission of energy to the emulsion possibly explain the observed differences in size distributions. The results are consistent with the literature, where homogenization was shown to be more effective than sonication under similar conditions for emulsions of sunflower oil (20 %) stabilized with whey protein isolate (Calligaris et al., 2018).

Effect of GDL concentration on acidification kinetics and on the textural properties of the resulting set milk gel

The amount of GDL clearly influenced the kinetics of acidification and gelation of the lab-scale set milk gel (Fig. 3). The GDL acidification kinetics shown in Fig. 3 A all began with a marked decrease in pH, which subsequently slowed down and levelled off. The 4.5 target pH was never reached with 0.50 wt% GDL, but was reached in 9 h to 1 h 15 when the concentration of GDL increased from 0.75 to 1.50 wt%. The final pH reached after 18 h of acidification was 4.9, 4.4, 4.2, 3.9 and 4.0 for 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 and 1.50 wt% GDL respectively. The GDL acidification kinetics were also faster than the pilot fermentation kinetics, which reached the target pH of 4.5 in 10 h. The acidification kinetics obtained with GDL differed from that during pilot lactic fermentation, which began with a lag time (bacterial growth), then decreased, slowed down and ended with post-acidification in the product (Fig. 3 A).

The acidification kinetics obtained with GDL are in good agreement with those shown in the literature (Jacob et al., 2011; J.A. Lucey et al., 1998; Rohart and Michon, 2016). It is known that the pH transitions

that occur during acidification are associated with different phenomena (solubilization of micellar calcium phosphate, dissociation then re-association of the micellar caseins, suppression of electrostatic repulsion and interaction of casein micelles) leading to gelation (Lee and Lucey, 2010). The different kinetics of pH reduction by lactic ferments or with different concentrations of GDL can therefore influence these phenomena and produce different microstructures (Azim et al., 2010; Jacob et al., 2011; J.A. Lucey et al., 1998). The elasticity index was monitored using the non-invasive DWS method provides information about the impact of kinetics on gelation and the structure depending on the GDL concentration.

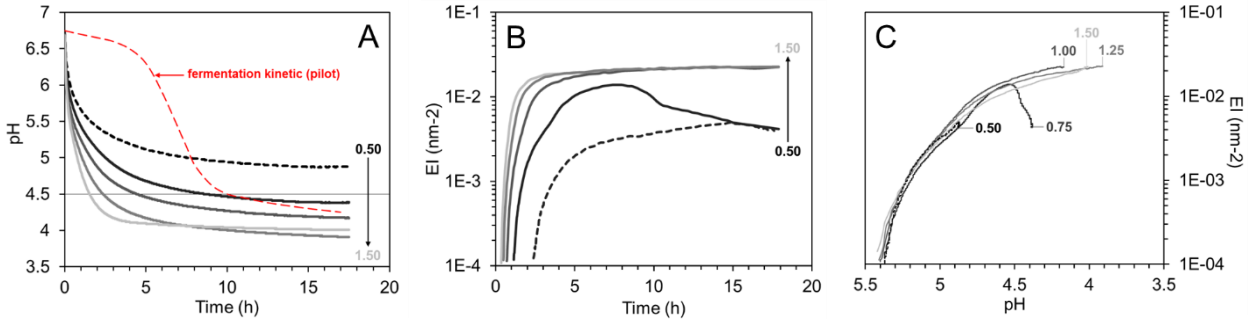


Fig. 3: **(A)** Acidification kinetics (GDL) of the lab-scale set milk gel and the fermentation kinetic of the pilot-scale set milk gel with a target pH of 4.5 (horizontal line). **(B)** Changes in the elasticity index over time (gelling). **(C)** Changes in the elasticity index during acidification. The increase in the concentration of GDL is shown by the change in the color of the curves from dark to pale grey. The variability of the acidification kinetics was ± 1.0%

The elasticity indexes shown in Fig. 3 B allow gelation to be monitored over time. They all started to increase after a lag time which decreased from 2 h 30 to 30 min when the concentration of GDL increased from 0.50 to 1.50 wt%. These curves also distinguish the samples with 0.50 and 0.75 wt% GDL, for which the elasticity indexes reached a plateau before decreasing to 4.2×10^{-3} nm^{-2}, from the other samples, for which the elasticity indexes all reached a same higher plateau of 2×10^{-2} nm^{-2}. The final plateau of the elasticity index was reached in 8 h, 3 h 45 and 2 h 45 for 1.00 wt%, 1.25 wt% and 1.50 wt% GDL, respectively, the times at which the pH reached 4.5. Fig. 3 C shows that EI, reflecting gelation, started to increase from a pH of 5.5 in all the samples. Finally Fig. 3 C highlights the fact that the EI obtained with 0.50 wt% GDL decreased without ever reaching a pH of 4.5 and the EI obtained with and 0.75 wt% GDL decreased as soon as the pH of 4.5 was reached.

The decrease in the elasticity index may be due to syneresis occurring within the gel leading to its brittleness and/or collapse, but it could also be due to the expulsion of serum due to syneresis on the surface and/or on the walls of the glass tube during the measurement by DWS (Rohart et al., 2016). Back-extrusion measurements were carried out on the set gels after seven days of storage (4 °C) and the resulting normal force values at the plateau increased from 0.7 ± 0.1 N for 0.50 % GDL to 1.1 ± 0.1 N for 0.75 wt%, before reaching a maximum value of 1.6 ± 0.2 N for 1.00, 1.25 and 1.75 wt% GDL. These results show that the decrease in the elasticity index of gels formed with 0.50 and 0.75 wt% GDL was due to their brittleness certainly caused by less cohesiveness of the gels. Moreover, since the amounts of 1.25 and 1.50 wt% GDL meant that the 4.5 target pH was reached too rapidly (< 3 h) compared to the pilot reference (10 h), the amount of 1.00 wt% was most suitable for 3.1 wt% protein and was thus selected as the standard value for all further experiments. This value is in accordance with the literature, where a pH of 4.5 was also obtained with 1 % GDL and 3.5 wt% protein in acidified milk (Azim et al., 2010).

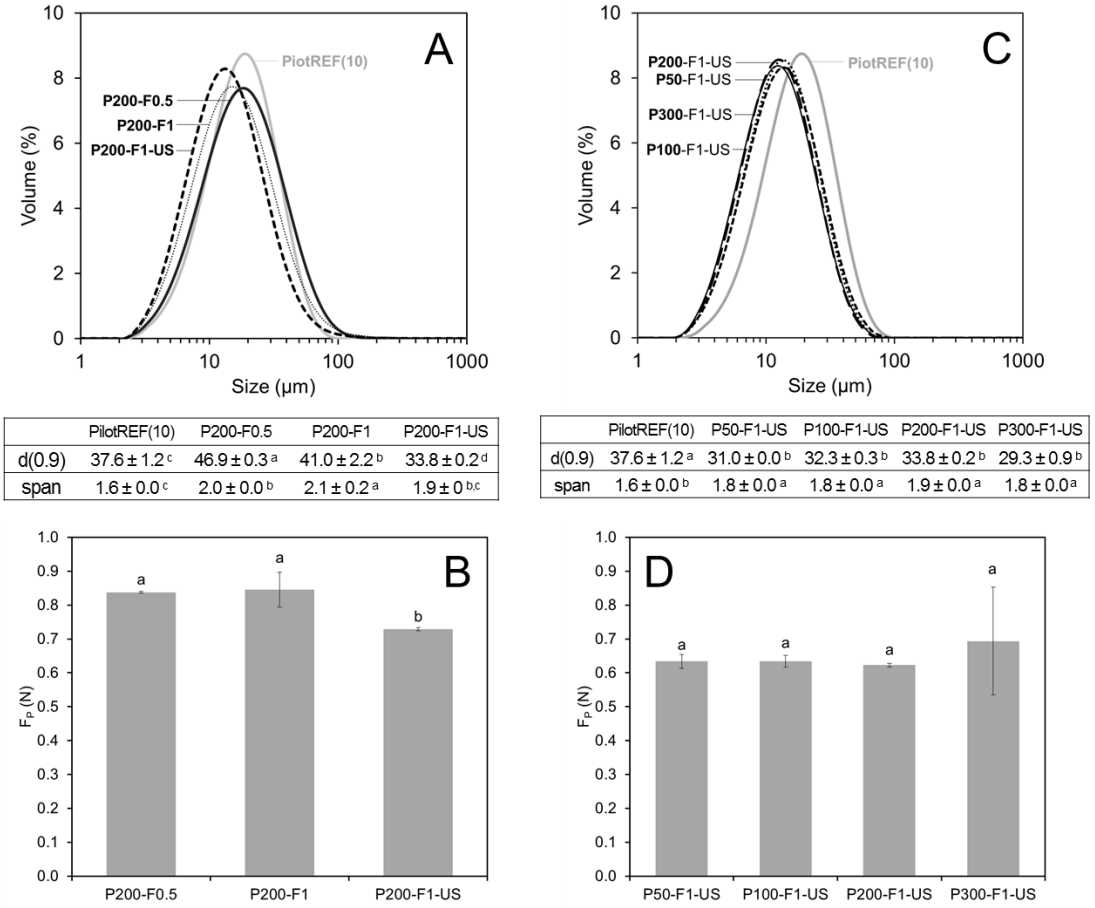
Effect of the stirring parameters on the size distributions of the microgels and the texture of stirred milk gels

All the stirrings applied made it possible to obtain microgel sizes quite close to those of the pilot reference for the lab-scale stirred milk gels (Fig. 4). Based only on the median diameters, the stirring steps without ultra-smoothing led to a d(0.5) of around 19 µm (P200-F0.5) and 16 µm (P200-F1), which were closer to the pilot reference (PilotREF(10)) (18 µm) than the sample treated with ultra-smoothing (P200-F1-US), for which the d(0.5) was around 14 µm (Fig. 4 A). However, the overall size distributions of the two samples without ultra-smoothing contained larger particles (d(0.9) > 41 µm

and span > 2.0) than the pilot reference and the ultra-smoothed sample (d(0.9 < 38 µm and span < 1.9) (table below Fig. 4 A). In addition, Fig. 4 B shows that the textural variability of the P200-F1 sample was greater than that of the two other samples. Fig. 4 B also shows that ultra-smoothing significantly reduced the texture of P200-F1-US, compared to the two other samples.

The size distributions of the microgels obtained with the present lab scale stirring steps were smaller than those reported in the literature (by hand, with a blender or overhead stirrer, using needle extrusion), which usually ranged between 20 and 150 µm (Cayot et al., 2008; Chever et al., 2014; Laiho et al., 2017). The processes investigated in this study are therefore closer to the pilot reference, which underwent industrial-type stirring. In the literature, several authors demonstrated that the presence of particles larger than 40 µm led to the product being perceived as "grainy" or that the presence of particles larger than 150 µm even seemed to limit the perception of "creamy" (Cayot et al., 2008; Hahn et al., 2012b). These criteria led to choose stirring with ultra-smoothing, especially since grains were visible in the samples without ultra-smoothing after seven days of storage.

The samples obtained with the pump flow rates of 50, 100, 200 and 300 mL.min^{-1} (1 mm filter (F1) and ultra-smoothing) did not differ significantly either in the sizes of the microgels (Fig. 4 C), or in d(0.9) and spans, or in the plateau values measured by back-extrusion (Fig. 4 D). The variability of the plateau value obtained with a pump flow rate of 300 mL.min^{-1} was the only one parameter that differed, i.e. was higher than the others. A flow rate of 200 mL.min^{-1} was thus chosen to work with the fastest possible pump flow rate, without having too much variability. The final lab-scale process selected was the one of P200-F1-US, with pasteurization at 80 °C for 30 min, homogenization by sonication (130 W for 15 effective minutes with a 10 s pulse), acidification with 1.0 wt% GDL and stirring after gelling using filter pores 1 mm in diameter, pump flow rate of 200 mL.min^{-1} and ultra-smoothing at 1,500 rpm.



	PilotREF(10)	P200-F0.5	P200-F1	P200-F1-US
d(0.9)	37.6 ± 1.2 ^{c}	46.9 ± 0.3 ^{a}	41.0 ± 2.2 ^{b}	33.8 ± 0.2 ^{d}
span	1.6 ± 0.0 ^{c}	2.0 ± 0.0 ^{b}	2.1 ± 0.2 ^{a}	1.9 ± 0 ^{b,c}

	PilotREF(10)	P50-F1-US	P100-F1-US	P200-F1-US	P300-F1-US
d(0.9)	37.6 ± 1.2 ^{a}	31.0 ± 0.0 ^{b}	32.3 ± 0.3 ^{b}	33.8 ± 0.2 ^{b}	29.3 ± 0.9 ^{b}
span	1.6 ± 0.0 ^{b}	1.8 ± 0.0 ^{a}	1.8 ± 0.0 ^{a}	1.9 ± 0.0 ^{a}	1.8 ± 0.0 ^{a}

Fig. 4: Effect of pore sizes of filters and ultra-smoothing (**A**, **B**) and of the pump flow rates (**C**, **D**). Size distribution of microgels with corresponding d(0.9) and span below (**A**, **C**) and average value of the normal force at the plateau measured by back-extrusion (F_P force, N) after 7 days of storage of stirred acid milk gels (**B**, **D**)

3.2. Comparison of the lab-scale stirred milk gel with the pilot reference based on the impact of a reduction in the fat content

The final lab-scale process was used to produce two batches of lab-scale stirred milk gels with 6 wt% fat (LabREF(6)A and LabREF(6)B) and two other batches with 10 wt% fat (LabREF(10)A and LabREF(10)B). In parallel, the reference pilot-scale process was used to produce two batches of pilot-scale stirred milk gels with 6 wt% fat (PilotREF(6)A and PilotREF(6)B) and two other batches with 10 wt% fat (PilotREF(10)A and PilotREF(10)B). Both the rheological properties and the microgel sizes were systematically measured three times in all the batches and averaged (Fig. 5). The properties of the two batches (A and B) of all types of stirred milk gels (LabREF(6), LabREF(10), PilotREF(6) and PilotREF(10)) were averaged (Table 2).

The rheological indicators (G'_0, G'_f, G'_0, η_f) obtained at lab scale were lower than those obtained at pilot scale (PilotREF(10) > LabREF(10) and PilotREF(6) > LabREF(6)). The microgels of the lab-scale stirred milk gels were slightly larger than those of the pilot references (PilotREF(10) < LabREF(10) and PilotREF(6) < LabREF(6)) (Table 2). However, the impact of the reduction in fat content from 10 to 6 wt% on the rheological properties did not differ significantly between lab and pilot scales (*i.e.* the reduction in firmness was of similar order in both cases). The size of the microgels increased with the reduction in fat and this increase was slightly higher in the pilot reference than in the lab-scale stirred milk gel. Since the orders of the reduction in firmness and of the increase in microgel size were similar at both pilot- and lab-scales, the designed lab-scale stirred milk gel is therefore representative of the pilot reference.

The principal component analysis (PCA) plotted in Fig. 5 mapped the samples as a function of all of the properties detailed in Table 2 for two batches (A and B) of each (LabREF(10), LabREF(6), PilotREF(10) and PiloteREF(6)). The selected 2D projection (F1; F2) displays more than 95% of the total information. According to the correlation loading plot (Fig. 5 A), the F1 axis explained more than 86% of the total information, through the rheological properties, and a diagonal axis was linked to the median diameter of the microgels. Consequently, the score plot (Fig. 5 B) shows that the samples were mainly distributed on F1 and that they were mainly distinguished based on the production scale (lab or pilot scale) and the fat content (6 or 10 wt%). It also shows that products made with 10 wt% fat were more variable than the products made with 6 wt% fat on the F1 axis from one production session to another. Finally, it shows that the pilot products varied more than the lab products on the microgel axis from one production to another.

Table 2: Rheological (G'_0, G'_f, η_0, η_f) and structural indicators (median diameter d(0.5) of the microgels) of lab-scale stirred milk gel and the pilot reference with 10 and 6 wt% fat contents. The impact of fat reduction corresponds to the rate of variation (%) between 10 wt% and 6 wt% of fat in the lab or pilot products. Values with different letters in the same row differ significantly ($p < 0.05$). Values with a different number of asterisk(s) (*) in the same row differ significantly ($p < 0.05$)

	LabREF(10)	LabREF(6)	*Impact of fat reduction (%)*	PilotREF(10)	PilotREF(6)	*Impact of fat reduction (%)*
G'_0 (Pa)	350 ± 40 ^{b}	180 ± 10 ^{c}	*- 49 ± 8**	500 ± 40 ^{a}	200 ± 35 ^{c}	*- 59 ± 7**
G'_f (Pa)	100 ± 25 ^{b}	60 ± 6 ^{c}	*- 45 ± 8**	140 ± 15 ^{a}	70 ± 10 ^{c}	*- 52 ± 10**
η_0 (Pa.s)	1.6 ± 0.3 ^{b}	0.9 ± 0.1 ^{c}	*- 45 ± 5**	2.6 ± 0.2 ^{a}	1.2 ± 0.2 ^{c}	*- 55 ± 7**
η_f (Pa.s)	0.8 ± 0.1 ^{b}	0.5 ± 0.1 ^{b}	*- 40 ± 7**	1.7 ± 0.1 ^{a}	0.9 ± 0.1 ^{c}	*- 50 ± 10**
d(0.5) of microgels (µm)	19 ± 5 ^{a,b}	22 ± 1 ^{a}	*+ 12 ± 6**	17 ± 3 ^{b}	20 ± 3 ^{a}	*+ 22 ± 3***

As previously demonstrated, the fat droplet distribution in the lab-scale stirred milk gel displayed bigger fat sizes than the pilot reference. This may explain part of the differences in the rheological properties between lab and pilot scales, since smaller and more monodispersed droplets tend to strengthen the protein network (Ye and Taylor, 2009). Moreover, differences in heat treatment and homogenization may change the quantity and quality of the proteins adsorbed at the interface (Cano-Ruiz and Richter, 1997; Millqvist-Fureby et al., 2001; O'Sullivan et al., 2014) and the nature of the interface affects the textural properties. For example, reports in the literature showed that when whey proteins were adsorbed as heat-aggregated, they strengthened the dairy matrix more than if they were adsorbed as native proteins (Cho et al., 1999). As shown previously, the acidification kinetics differed

between the lab-scale stirred milk gel acidified by GDL and the fermented pilot references. The literature reports that the microstructure and hence the rheological properties of the milk gels obtained by GDL acidification or fermentation were not the same (Lucey et al., 1998). In addition, lactic bacteria may produce exopolysaccharides, which are known for their texturizing properties (Bouzar et al., 1997) and this may also explain why the pilot references was firmer (rheological properties) than the lab-scale stirred milk gels. In addition, GDL acidification is known to be less variable than acidification by fermentation, which probably explains the greater variability of the pilot references. Finally, the greater variability with 10% fat may be due to a higher concentration of fat droplets, whose size and interface may vary from one production to another.

In addition, mixes were made by emulsifying either anhydrous milk fat (AMF, melting temperature of 30 °C) or its low-melting fraction (olein, melting temperature of 7-14 °C) in skim milk. The final lab-scale process and the reference pilot-scale process were both used to make stirred milk gels from the AMF and olein mixes. The use of olein instead of AMF resulted in a decrease in the firmness at 8 °C (G'_0 and η_0) of the lab-scale stirred milk gels (-45%) and of the pilot-scale stirred milk gels (-55%) (results not shown). These results are evidence for the relevance and efficiency of the final lab-scale process to test and vary other levers of formulation.

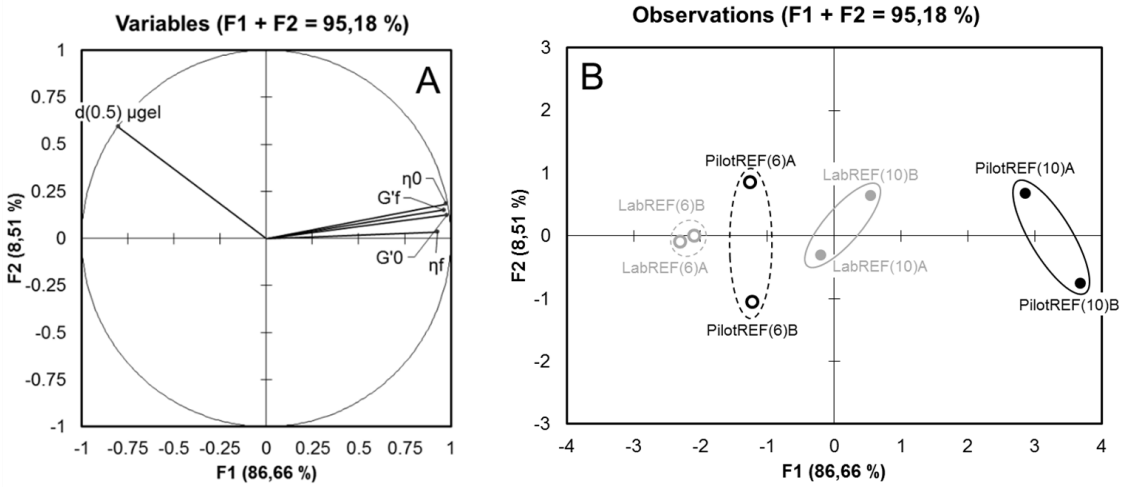


Fig. 5: Correlation loading plot of the rheological (G'0, G'f, η0, ηf) and structural indicators (median diameter of the microgel "d(0.5) µgel") (**A**) and corresponding score plot of the lab and pilot stirred milk gels with 10 and 6 wt% fat contents and two different batches labeled with the letters A and B (**B**).

4. Conclusions

The lab-scale process designed using a logic of reverse engineering made it possible to reliably mimic what occurred at pilot scale since the microstructural and textural properties of the lab-scale stirred milk gels were consistent with the pilot references (fermented milk gels). This lab process makes it possible to test twice as many recipes per production day with more than 60 times less raw materials than required for the pilot process. The final lab-scale stirred milk gels were less firm than the pilot reference, probably because the size distributions of their fat droplets were slightly wider and their acidification kinetics were not exactly the same as for lactic fermentation. However, the lab-scale stirred milk gel were less variable and were just as sensitive to variations in formulation as the pilot reference. The rational design of the lab scale process resulted in a lab-scale process line (1.5 kg batches), in which part or all of the unit operations can be varied and tailored. Moreover, it is versatile and flexible, making it possible to test parameters that could otherwise be difficult and expensive to test at larger scales. It is therefore a good formulation tool, which allows performing screening designs and which is adaptable to other stirred gel type particle systems.

Acknowledgements: The authors thank the dairy company for kindly providing the pilot fermented stirred milk gel. The authors thank Mélanie Ngo (AgroParisTech, France) and Jean-Baptiste Thomazo (AgroParisTech, France) for their contribution in the production of some of the samples and/or their analysis. This work was supported by Single Interministry Fund (France) through a collaborative R&D project certified by Vitagora and Valorial competitiveness clusters.

4.2.2. Complexification du modèle laboratoire

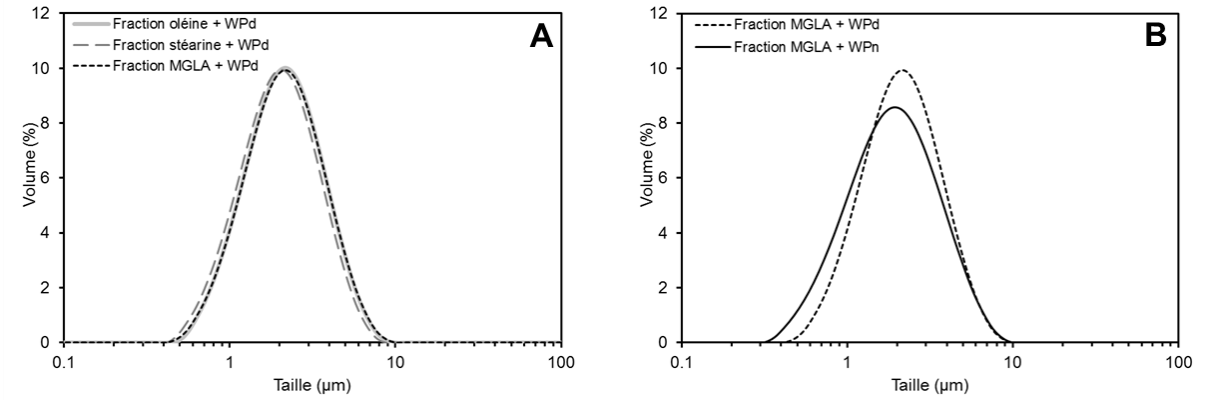
La mini-ligne de fabrication mise en place à l'échelle laboratoire – et présentée ci-dessus – a été mise au point pour transformer un mix de départ fait de lait écrémé reconstitué et de crème du commerce en yaourt brassé modèle. Les protéines de l'interface et la fraction de matière grasse laitière qui composent les globules gras figurent parmi les leviers identifiés pour moduler les propriétés des yaourts brassés riches en matière grasse. Il était donc important de pouvoir formuler des crèmes *à façon* pour moduler la composition de l'interface et de la matière grasse. Le procédé laboratoire a donc été complexifié afin de lui apporter encore plus de flexibilité.

Le procédé d'émulsification laboratoire présenté en Chapitre 3 (§ 3.2.1, p. 95) a été mis en œuvre. Plusieurs critères ont été vérifiés pour pouvoir valider ce procédé :

- ***Distributions de taille cohérentes et constantes*** *:* Elles devaient être dans les mêmes ordres de grandeur qu'une crème commerciale (distribution monomodale avec un diamètre médian entre 1 et 5 µm) et ne devaient pas varier de manière significative en fonction de l'interface et du type de matière grasse.
- ***Evaluation de l'effet dénaturant du procédé d'émulsification laboratoire sur les protéines sériques :*** L'état physico-chimique des protéines de l'interface a été identifié comme un levier pour moduler les propriétés des yaourts brassés et les protéines sériques natives et agrégées thermiquement étaient les deux principaux types de protéines utilisés pour stabiliser l'interface. Il était important que le procédé d'émulsification ne soit pas trop dénaturant (modification des propriétés) vis-à-vis des protéines sériques natives pour être capable d'évaluer correctement l'impact de l'interface sur les propriétés des émulsions et des yaourts brassés.

Crèmes *à façon* obtenues par l'émulsification laboratoire en fonction de l'interface et de la fraction de matière grasse laitière

Différentes crèmes ont été préparées selon le protocole d'émulsification laboratoire. Plusieurs fractions de matière grasse laitières (MGLA, oléine, stéarine) ont été émulsionnées par des protéines sériques natives (WPn) ou agrégées thermiquement (WPd). Les distributions granulométriques des crèmes obtenues ont été mesurées par diffraction laser et sont présentées en Figure 68.



	D [4,3]	D [3,2]	d (0,1)	d (0,5)	d (0,9)
Oléine + WPd	2,6	2,0	1,1	2,3	4,5
Stéarine + WPd	2,4	1,8	1,0	2,1	4,2
MGLA + WPd	2,6	2,0	1,1	2,3	4,5

	D [4,3]	D [3,2]	d (0,1)	d (0,5)	d (0,9)
MGLA + WPd	2,6	2,0	1,1	2,3	4,5
MGLA + WPn	2,4	1,7	0,9	2,0	4,4

Figure 68 : Distributions de taille obtenues des crèmes *à façon* fabriquées par émulsification laboratoire (A) à partir de protéines sériques natives (WPn) et des différentes fractions de matière grasse laitière (MGLA, oléine, stéarine) ou (B) à partir de MGLA et de protéines sériques natives ou agrégées (WPn, WPd)

L'ensemble des distributions de taille obtenues sont monomodales et avec des diamètres médians entre 2,0 et 2,3 µm. Ces tailles de globules gras sont similaires à celles qu'on peut trouver pour des crèmes laitières

classiques. De plus, à même type de protéines à l'interface (protéines sériques agrégées WPd), les distributions de taille sont identiques quelle que soit la fraction de matière grasse laitière (Figure 68 A). Il y a une légère différence entre les crèmes de MGLA stabilisées par des protéines sériques natives (WPn) ou agrégées (WPd) à l'interface (Figure 68 B). Les globules gras stabilisés avec des WPn sont légèrement plus petits que ceux stabilisés par des WPd. Les distributions obtenues sont cohérentes par rapport à celle d'une crème commerciale et elles sont proches quelles que soit l'interface et la fraction de matière grasse laitière utilisées. Sur ces critères, le procédé d'émulsification laboratoire a donc pu être validé.

Un essai a également été fait pour comparer les distributions obtenues par ultrasons et homogénéisation classique. Pour cela, l'étape de traitement par ultrasons a été remplacée par une homogénéisation classique (homogénéisateur de paillasse) à 40 MPa (10 MPa au 2ème étage et 30 MPa au 1er étage) pour émulsifier de la MGLA avec des protéines sériques agrégées. Les tailles des globules gras obtenues par homogénéisation classique étaient légèrement plus petites (diamètre médian d'environ 0,8 µm) mais aussi légèrement plus polydisperses que celles obtenues par ultrasons. Comme les ultrasons étaient plus facile à mettre en œuvre que l'homogénéisation classique (plus rapide, moins de nettoyage), ils ont donc été choisis comme opération unitaire de référence pour l'émulsification laboratoire.

Impact de l'émulsification laboratoire sur les propriétés des protéines sériques

Des solutions de protéines sériques (eau distillée, 1,2% de WPn ou de WPd) ont été préparées puis le procédé d'émulsification laboratoire leur a été appliqué (sans matière grasse). Des prélèvements de 40 ml ont été effectués au début (t0), après l'étape de pré-émulsification par le rotor/stator (R/S), après 5 min (US5), 10 min (US10), 20 min (US20) et 30 min (tf) d'ultrasons. Pour chacun des prélèvements, les propriétés physico-chimiques présentées dans le Tableau 20 ont été mesurées pour être comparées.

Tableau 20 : Ensemble propriétés physico-chimiques mesurées pour caractériser les protéines sériques en solution au cours de l'émulsification laboratoire (protocoles sont détaillés en Chapitre 3, p. 91)

Paramètre mesuré	Méthode
Ordre de grandeur de la taille des protéines par turbidité (-)	Mesure de l'absorbance (600 nm)
Charge de surface (mV)	Mesure du potentiel ζ
Indice d'hydrophobicité de surface (-)	Méthode ANS
Quantité de thiols libres totaux (µmol SH.g^{-1})	Méthode d'Ellman

Une ACP a été effectuée à partir des propriétés physico-chimiques mesurées pour les différents prélèvements (Figure 69). L'ACP obtenue représente plus de 99% de l'information, avec près de 92% portée par l'axe F1. Le cercle des corrélations indique que les propriétés physico-chimiques sont principalement représentées sur l'axe F1 et sont toutes corrélées ou anti-corrélées entre elles.

La cartographie des différents prélèvements permet de clairement distinguer deux groupes, avec un premier constitué des prélèvements de la solution de protéines natives (WPn) et un deuxième constitué des prélèvements de la solution de protéines agrégées (WPd). Au sein de chaque groupe, l'emplacement des prélèvements sur la cartographie varie en fonction du moment auquel le prélèvement a été effectué pendant le procédé d'émulsification laboratoire. La projection des différents points correspondant aux prélèvements sur F1 (92% de l'information) permet de distinguer plusieurs groupes :

- *Pour la solution de WPn :* le prélèvement WPn_t0, un groupe constitué des prélèvements WPn_R/S, WPn_US5, WPn_US10 et WPn_US20, puis le prélèvement WPn_tf.
- *Pour la solution de WPd :* le prélèvement WPd_t0, un groupe constitué des prélèvements WPd_R/S, WPd_US5, WPd_US10, WPd_US20, puis le prélèvement WPd_tf.

Sur la cartographie, les points correspondants aux prélèvements de la solution de WPn sont plus éloignés entre eux que les points qui correspondent aux prélèvements de la solution de WPd. Même s'il reste éloigné des prélèvements de solution de WPd, le prélèvement WPn_tf est celui qui s'en rapproche le plus parmi les différents prélèvements de la solution de WPn.

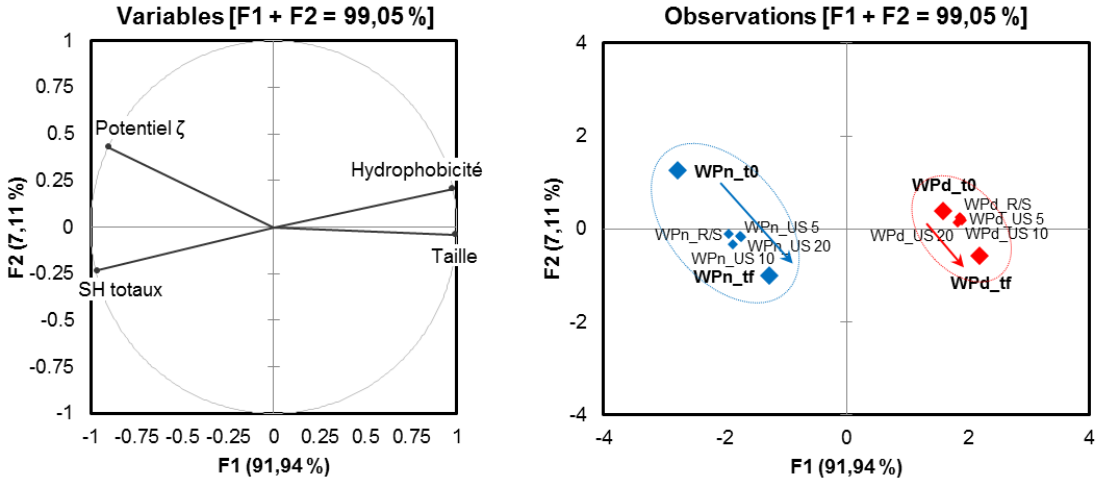


Figure 69 : Cercle des corrélations des propriétés des protéines (à gauche) et cartographie des différents prélèvements de protéines sériques natives (WPn, ■) et agrégées (WPd, ■) au cours du procédé d'émulsification laboratoire (à droite)

Les propriétés physico-chimiques des protéines sériques natives et agrégées se modifient légèrement au cours du procédé d'émulsification laboratoire. Les protéines sériques tendent à devenir plus hydrophobes et à voir leur taille augmenter au cours du procédé d'émulsification laboratoire. A l'inverse, leur potentiel ζ et leur quantité de thiols libres totaux diminuent. Ces évolutions des propriétés suggèrent que les protéines sériques s'agrègent au cours de l'émulsification laboratoire.

Les protéines sériques natives sont plus sensibles au procédé d'émulsification laboratoire que les protéines sériques déjà agrégées thermiquement. Elles sont légèrement dénaturées (légère agrégation) pendant le procédé mais leur dénaturation n'atteint clairement pas le niveau de dénaturation (et de légère agrégation) des protéines traitées thermiquement. L'effet dénaturant du procédé d'émulsification sur les protéines sériques natives est assez faible et surtout nettement inférieur à l'effet dénaturant d'un traitement thermique.

Les propriétés physico-chimiques des protéines sériques natives et agrégées thermiquement évoluent surtout au cours de l'étape de pré-émulsification (rotor/stator) et dans les dernières 10 min d'ultrasons (entre US20 et tf). La dénaturation des protéines sériques par les ultrasons est assez bien connue et les résultats obtenus sont en accord avec la littérature (Shen et al., 2017). La dénaturation induite par le procédé d'émulsification laboratoire s'explique très certainement par le cisaillement et l'échauffement local engendrés par le rotor/stator et les ultrasons.

Conclusions et messages clés du chapitre

La **préférence des consommateurs (cible)** peut être dégradée par une réduction de la teneur en matière grasse et c'est pour cette raison qu'il est important de préserver les propriétés regroupées sous le terme de ***crémeux***.

La **réduction de la teneur en matière grasse modifie les propriétés** instrumentales et sensorielles des yaourts brassés suivantes :

- **La microstructure** : augmentation de la porosité et formation d'un réseau protéique plus lâche ;
- **La texture :** réduction de la consistance mesurée par rétro-extrusion (force au plateau) et rhéologie (viscosité) ;
- **Les propriétés de lubrification :** augmentation du coefficient de friction mesuré par tribologie ;
- **La perception sensorielle** : diminution du *collant au palais*, de l'*épaisseur en bouche*, du *film gras*, de l'*empreinte* et de la *résistance à la cuillère*, et augmentation du *cassant*, du *fondant*, du *glissant* et du *filant*.

Les **propriétés sensorielles et les mesures instrumentales sont fortement corrélées**. La **pertinence des conditions de mesure choisies** a pu être validée, ce qui permet de considérer les mesures instrumentales comme un **bon outil de caractérisation** pour évaluer les propriétés des yaourts dans le reste du travail de thèse.

Une **mini-ligne de fabrication de yaourts brassés modèles à l'échelle laboratoire** a été conçue pour être **représentative** du procédé pilote, aussi **sensible** aux variations de composition et de procédé, et plus **flexible** pour tester l'ensemble des leviers identifiés (Figure 70).

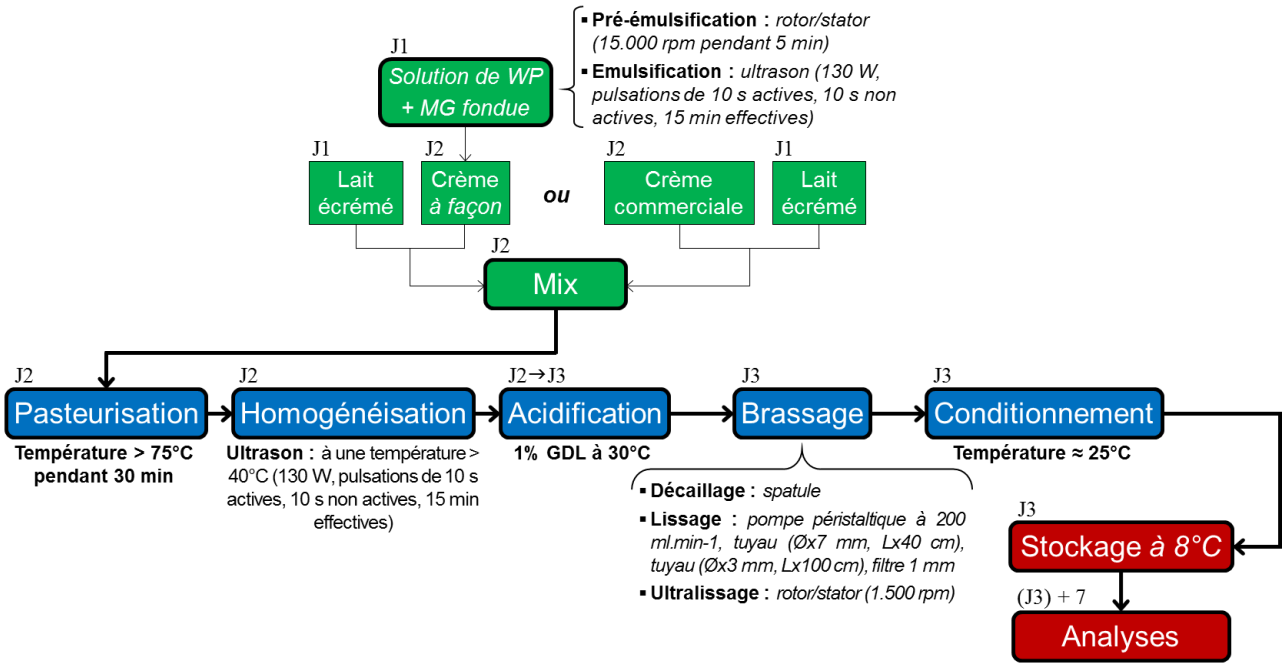


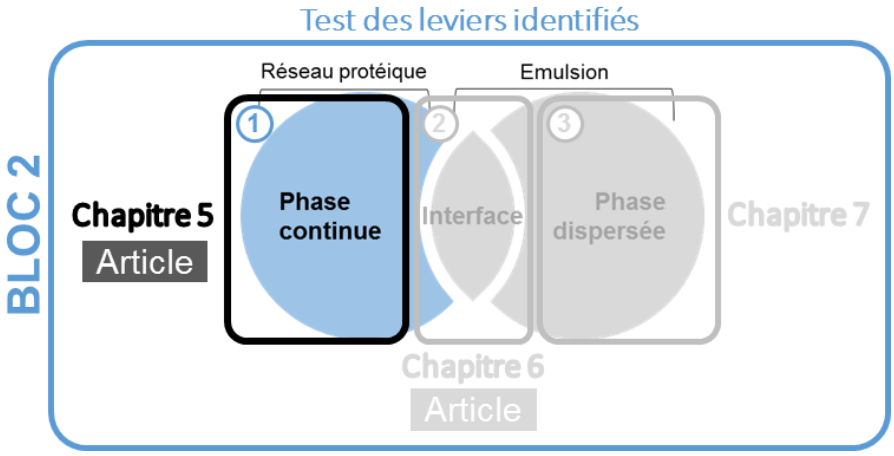
Figure 70 : Procédé laboratoire de fabrication de yaourt brassé modèle avec ou sans émulsification *à façon*

Bien que la **réduction de la teneur en matière grasse de 10 à 6%** (-40% de matière grasse) soit **drastique**, elle a servi de **repère** dans les chapitres de résultats 5, 6, 7 et 8. Les différents **leviers ont été testés sur des yaourts brassés à 6%** de matière grasse afin de mesurer leur **capacité à rattraper les propriétés de la référence cible (yaourt brassé à 10% de matière grasse)**.

Chapitre 5 : Etude de la dispersion de microgels constitutive du yaourt brassé

Ce chapitre présente les travaux sur les microgels constitutifs du yaourt brassé, menés pour répondre à plusieurs objectifs :

- Réussir à caractériser les microgels en termes de **taille, de forme et de dimension fractale en comparant plusieurs techniques** `[Partie basée sur article]`
- Evaluer l'intérêt de **modifier la structure des microgels** pour faire varier les propriétés des yaourts brassés `[Partie rédigée]`



5.1. Caractérisation de la taille, de la forme et de la dimension fractale des microgels [ARTICLE]

Les propriétés des microgels impactent les propriétés macroscopiques des yaourts brassés. Il est donc important de savoir bien les caractériser. Dans la littérature, ce sont surtout la distribution de taille (caractérisée par diffraction laser) et la microstructure (analysée par microscopie) des microgels qui sont étudiées. Nous avons donc mené des travaux pour caractériser la taille, la forme et la dimension fractale des microgels de yaourts brassés du commerce. Pour cela la diffraction laser, l'analyse d'images dynamique 2D (morphogranulométrie) et la reconstruction 3D de microgels (à partir d'images confocales) ont été utilisées et comparées. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'un article.

Cet article est publié dans *Food Structure* (*https://doi.org/10.1016/j.foostr.2019.100107)*

What do the microgels of stirred yogurt really look like? Comparison of laser diffraction, 2D dynamic image analysis and 3D reconstruction

Marine Moussier[a], Valérie Guénard Lampron[b], Kévin Lachin[a], Gabrielle Moulin[a], Sylvie L. Turgeon[b], Camille Michon[a], Delphine Huc-Mathis[a], Véronique Bosc[a]

[a] *Ingénierie Procédés Aliments, Inra, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 91300 Massy, France*
[b] *Dairy Science and Technology Research Centre (STELA), Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF), Université Laval, Quebec City, Qc, G1V 0A6, Canada*

Abstract

Stirred yogurts can be considered as concentrated dispersions of microgels. The size, shape and fractal dimension of these microgels are known to have a direct impact on textural and sensory properties of stirred yogurts, consequently their thorough characterization is of interest. Different techniques can be used including laser diffraction (LD), 2D dynamic image analysis or 3D reconstruction from z-stack confocal images. The aim of this study was to compare the ability of the three techniques to describe the size, shape and fractal dimension of the stirred yogurt microgels. Two stirred yogurts with different compositions, one fat free (0.1 %) and one high fat (9.3 %), were used. The microgel size distributions obtained were similar using LD, 2D image analysis and 3D reconstruction. Additionally, 2D image analysis and 3D reconstruction enabled visualization of the microgels and access to their shape through morphological factors such as roughness index. The microgels observed were non-spherical, rough and heterogeneous in shape. All three techniques also made it possible to determine the fractal dimension of the microgels, but 2D image analysis displayed lower values than LD and 3D reconstruction.

Keywords: Size, shape, stirred yogurt microgels, laser diffraction, 2D dynamic image analysis, 3D reconstruction.

Highlights

- Microgel size distributions were similar using LD, 2D and 3D techniques.
- Microgels were non-spherical, rough and heterogeneous with the 2D and 3D analyses.
- Estimations of the fractal dimension were more reliable using LD and 3D than 2D.
- LD was relevant, fast and versatile in accessing size and fractal dimension.
- 2D was faster and 3D more accurate in accessing both shape and fractal dimension.

1. Introduction

From a structural point of view, stirred yogurts are concentrated dispersions of microgels (soft particles) whose diameters range from 10 to 100 µm (Sodini, Remeuf, Haddad, & Corrieu, 2004; Van Marle, 1998). In presence of fat, each microgel can itself be considered as an emulsion-filled gel, with fat dispersed as droplets that interact with the protein network via the interface located on the surface of fat globules and mainly composed of milk proteins. The term "microgels" is used for the entities obtained after the set yogurt is stirred. Structurally speaking, these microgels are "aggregates" of primary particles of fat droplets and proteins (mainly whey protein / casein micelle complexes). It is established that

stirring causes profound changes in the textural and sensory properties of the yogurts by breaking the continuous gel (*i.e.* set yogurt) into microgels (soft particles) (Cayot, Schenker, Houzé, Sulmont-Rossé, & Colas, 2008; Lee & Lucey, 2006). (Shewan and Stokes, 2013) have also demonstrated that the properties of soft particle concentrated dispersions are directly impacted by the properties of the dispersed particles (microgels in the case of stirred yogurts): their hardness, size distribution or shape. Having access to reliable data on particle size distribution (PSD), the distributions of shape factors and average mass fractal dimension of the microgels is thus of interest to understand the textural properties of stirred yogurts.

Laser diffraction (LD) particle size analysis (or static light scattering) is commonly used to access the size distribution of stirred yogurt microgels (Chung et al., 2014; Hahn et al., 2012a; Huc et al., 2016; Nöbel et al., 2016). This technique measures particles ranging from 0.02 to 2,000 µm in diameter. To do so, a laser beam of known wavelength (λ = 633 nm) irradiates the suspension to be analyzed, and detectors located at specific angles collect the intensity of the light scattered by the particles. Assuming spherical particles with homogenous composition, the software then uses the Mie theory to deduce a theoretical PSD from the light scattering results obtained with LD. To successfully use the Mie theory, knowledge of the refractive and absorbance indexes of the dispersed medium is required (Malvern Instruments Ltd., 2007). In the specific case of the stirred yogurt microgels, these optical indexes are difficult to access. The question of the consistency of the LD size measurement of complex systems like stirred yogurt microgels thus naturally arises. As this technique does not enable access to shape, other techniques of image analysis can be used, compared and possibly combined with LD to obtain the most accurate results possible.

2D dynamic image analysis is a recently developed technique that enables precise access to the PSD and to the shape of different types of particles (Carugo et al., 2015; Mallipeddi et al., 2014; Perez et al., 2017). This technique can be compared to a modern microscope using a pulsed light source and a high speed mega-pixel camera (Köhler et al., 2008; List et al., 2011). Unlike laser diffraction analysis, image analysis directly records the properties of the image of each particle to determine diameter and shape factors. 2D image analysis thus appears to be an appropriate tool to access data concerning the morphology of stirred yogurt microgels. Many shape factors are described in the literature for non-spherical microgels (convexity, roundness, circularity, sphericity or roughness) and the definitions of these factors depends on the equipment and analytical technique used (Hentschel and Page, 2003; Podczek, 1997; Yan and Su, 2017). However, the roughness index was the most often used, because it is relevant regarding surface heterogeneity.

A variety of microscopic techniques are used to assess the microstructure of stirred yogurts (Mortazavian et al., 2009). These include transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM) and confocal laser scanning microscopy (CLSM), sometimes associated with image analysis (Torres et al., 2012). Both TEM and SEM are high resolution techniques, but sample preparation can be complex and quite expensive. Moreover, structure artefacts due to the sample preparation are very often suspected. CLSM is a low-invasive alternative requiring the staining of the compounds to be observed. In particular, this technique makes it possible to obtain a series of two-dimensional images (x, y) by z-stacking. Using the appropriate software, these images can be compiled and computed into a 3D representation. This technique was recently applied to food systems such as continuous model gels (whey protein isolate/polysaccharide) (van den Berg et al., 2008) or soft apple cells (Leverrier et al., 2017). However, to the best of our knowledge, CLSM associated with 3D reconstruction has not yet been used to assess the size and shape of the microgels of stirred yogurts.

Laser diffraction, 2D dynamic image analysis and 3D reconstruction can also be used to extract information on the structure of the samples by means of the mass fractal dimension (D_f). This structural parameter is closely linked to the concept of fractal geometry (object having a structure independent of the scale of observation) and thus compactness. Fractal geometries were first mathematically introduced by Mandelbrot (1975) in the mid-1970s and later used in the field of colloid and aggregates, thus opening a new way of characterizing the structure of aggregates in terms of occupancy rate and compaction of the structure in the volume of the aggregates (Andoyo et al., 2015; Mellema et al., 2002) or roughness and sphericity of the aggregates (Raper and Amal, 1993; Torres et al., 2012). It has been accepted for many years (Forrest and Witten, 1979) that aggregates can be described as fractal-like structures, meaning their mass scales

with a characteristic radius through the use a specific dimension named the mass fractal dimension. Unlike the topological dimension, which is stricly an integer (between 1 and 3), the fractal dimension is usually a non-integer number. The use of accurate fractal dimensions thus makes it possible to replace the conventional sphericity assumptions that can be used in modelling the relationship between structural and textural properties.

As LD measurements are the most widely used in the dairy field, but have limitations, the first objective of this study was to analyze its suitability for heterogeneous (in composition) and irregularly shaped systems like microgels. This analyze of reliability was made by comparing the LD results with the ones obtained with 2D image analysis and 3D reconstruction (from confocal images). The other objective was to compare the ability of the three different techniques to provide information on the size, shape and fractal dimension of stirred yogurt microgels. For this purpose, a fat free and a high fat commercial yogurts were selected and diluted in purified water. The size distributions and the fractal dimensions of the microgels were determined using all three techniques, whereas their shape factors (length and roughness index distributions) were determined only using 2D and 3D image analyses. The different results obtained were then compared and analyzed as a function of the technique.

2. Materials and methods

2.1. Stirred yogurt sampling

Two types of plain stirred yogurts from different commercial brands were purchased in the market. *Perle de Lait* (Yoplait, France) was chosen for its high fat (F) content and its classic protein (P) content (9.3 g/100g fat, 3.2 g/100g protein). *Taillefine Le Brassé 0%* (Danone, France) was selected because it is fat free and has a quite high protein content (0.1 g/100g fat, 4.5 g/100g protein). For the rest of the study, the stirred yogurt samples are referred as FP3 for *Perle de Lait* and P4.5 for *Taillefine Le Brassé 0%*. FP3 and P4.5 were chosen to have a similar aging time (based on their similar expiration dates). They were stored in the same conditions (i.e. at 4 °C). All the measurements were performed on two consecutive days. Purified water used for the dilutions was obtained using a Milli-Q purification system (Millipore, Merck, Germany). It was checked and proved that the level of dilution did not have a significant impact on the results. To achieve good sampling and homogeneity, each yogurt was gently mixed using a small spoon rotated 4 times from the bottom of the pot towards the top, with a quarter turn between each movement. For this study, three dilutions were performed from different pots of a same batch of FP3 and of P4.5.

2.2. Laser diffraction analysis

Stirred yogurts were diluted 1:10 (*w/w*) with purified water in a 100 mL pot and the microgels were dispersed by reversing the pot several times. Size distributions were measured by laser diffraction with a MasterSizer 2000 (Malvern Instruments, UK). To achieve a constant level of obscuration, only some drops of 1:10 diluted stirred yogurts were poured in dispersant tank for the measurement (three repetitions), resulting in a total dilution of 1:100. A refractive index of 1.33 for water and 1.46 for the microgels (refractive index of milk proteins), and a absorption index of 0.01 for the microgels were used (Huc et al., 2016). Several data were deduced from the PSD (Malvern Instruments Ltd., 2007): size volume distribution, particle sizes representing less than 10% (*d(0.1),* µm), 50% (median diameter *d(0.5)*, µm) and 90% (*d(0.9)*, µm) of the sample, volume (*D[4,3]*, µm) and surface (Sauter mean diameter *D[3,2]*, µm) weighted mean diameters (*D[m,n]*, Eq. 1) and width of the distribution (span, Eq. 2).

$$D[m,n] = \left[\frac{\sum volume_i \times {d_i}^{m-3}}{\sum volume_i \times {d_i}^{n-3}}\right]^{\frac{1}{m-n}} \quad \text{Eq. 1}$$

$$span = \frac{d(0.9) - d(0.1)}{d(0.5)} \quad \text{Eq. 2}$$

In addition, it was also possible to extract the fractal dimension of the microgel aggregates from the scattering data. The light scattered by porous aggregated structures entails more modeling complexity than the scattering of solid homogenous spheres. One way to overcome this problem is to use the Rayleigh-Gans-Debye theory (Gregory, 2009; Sorensen, 2001). Assuming the primary particles that comprise the aggregate behave like Rayleigh scatterers (*i.e.* the diameter of the initial particles is much smaller than the wavelength of the incident beam λ), it is possible to introduce a structure factor *S(q)* in the expression of the light scattered intensity *I(q)* so that (Eq. 3):

$$I(q) \propto S(q) * P(q) \quad \text{Eq. 3}$$

where *P(q)* is the form factor and is due to primary particles. q (m^{-1}) is the scattering vector and is expressed by Eq. 4, where ϑ is the scattering angle and *n* the refractive index of the dispersing medium.

$$q = 4\pi\frac{n}{\lambda}sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad \text{Eq. 4}$$

As q^{-1} represents the characteristic length probed with the light scattering measurement, information on the aggregate structure can only reasonably be extracted for q^{-1} values so that $r_0 << q^{-1} << R_{ag}$, where r_0 denotes the characteristic size of the primary particles, and R_{ag} (m) the characteristic size of the aggregates. Under this condition, the structure factor depends on the fractal dimension, and it is thus possible to write the proportionality relation between the intensity of the light scattered and the structure factor as stated by Eq. 5.

$$I(q) \propto q^{-D_f} \quad \text{Eq. 5}$$

Using a Log-Log scale plot, it was thus possible to access the mean mass fractal dimension of the sample by simply determining the slope of the scattering plot in the above-mentionned q^{-1} region (see Fig. 10 in Supplementary material). This theory has been successfully applied in several studies involving colloidal suspensions, particularly latexes, well calibrated in size and shape (Burns et al., 1997; Lachin et al., 2017; Selomulya et al., 2001). More closely connected with the food and dairy industries, some successes have been achieved in the light scattering study of model casein and micellar casein aggregates (Chardot et al., 2002; Panouillé et al., 2005; Vétier et al., 2003b).

2.3. 2D dynamic image analysis

Dynamic image analysis was performed using a QICPIC/R modular particle size and shape analyzer and a LIXELL wet dispersing unit (Sympatec GmbH, DE). A precision M4 lens measuring from 1 to 750 µm with a 0.5 mm cuvette was used. Stirred yogurts were diluted 1:2000 (*w/w*) with purified water in a 1000 mL beaker to disperse the microgels and the microgels dispersed were then stirred at 100 rpm for 1 min and pumped into the dispersing unit with a peristaltic pump (Masterflex L/S Model 77201-60, Cole-Parmer, FR) at a flow rate of 25 mL.min^{-1}. For each dilution, two 30-second image acquisitions were performed at 10 Hz. The images were processed using PAQXOS application software (PAQXOS, Version 2.2.2, Sympatec GmbH, DE). Size measurement data such as volume distribution, *d(0.1)*, *d(0.5)*, *d(0.9)*, *D[4,3]* and *D[3,2]* were retrieved from the image analysis. The diameters of the equivalent surface circle of microgels and maximum (F_{max}, µm) and minimum (F_{min}, µm) Feret diameters, derived respectively using the maximum and minimum distance between two tangents of the contour of the particle, were determined by the software. The width of the distribution (span) was calculated by Equation 2. The software was also able to determine shape factors including the roughness index (Eq. 6).

$$roughness\ (2D) = \frac{equivalent\ circle\ perimeter}{real\ perimeter} \quad \text{Eq. 6}$$

The results of the dynamic image analysis made it possible to measure fractal dimensions. Some studies have already proposed methods of calculating two-dimensional fractal dimensions (D2) from image analysis (Jiang and Logan, 1991; Serra and Casamitjana, 1998). The two-dimensional fractal dimension was determined by the relationship between the area (A) of the microgels and their maximum Feret diameter (Fmax) (Eq. 7). In the specific case of the calculation of the two-dimensional fractal dimensions, the microgels below 10 µm in diameter were not selected due to their low image resolution (1 µm = 1 pixel). For each yogurt analysis, 7,000 microgel images were randomly selected and classified according to their roughness index. For each class of roughness, a plot Log(*A*) vs. Log(F_{max}) was performed. A weighted average of these classes was performed to determine a representative D_2 value of all measured stirred yogurts.

$$A \propto Fmax^{D_2} \quad \text{Eq. 7}$$

Using simulated aggregates, Lee & Kramer (2004) found a relationship between the two-dimensional fractal dimension (D_2) obtained from image analysis and the three-dimensional fractal dimension (D_3) from the laser diffraction results (Eq. 8). The equation was validated by comparing experimental D_3 (laser diffraction and electrical sensing) with simulated D_3 on different particles, particularly spherical ones (Baalousha, Manciulea, Cumberland, Kendall, & Lead, 2008; Lee & Kramer, 2004).

$$D_3 = 1.391 + 0.01e^{2.164D_2} \quad \text{Eq. 8}$$

2.4. 3D reconstruction from confocal images

Acquisition by confocal microscopy and 3D processing

The stirred yogurts were first diluted 1:100 (*w/w*) with purified water in a 100 mL pot, and the microgels were then gently dispersed by reversing the pot several times. The proteins that made up the microgels were then stained by mixing 250 µL of this solution with 2.5 µL of DyLight 488 nm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (one repetition

per dilution). Confocal images were acquired with a TCS SP8 AOBS inversed confocal laser scanning microscope (CLSM) (Leica, Solms, Germany) equipped with a Helium-Neon laser (458 nm excitation wavelength) and an Argon laser (633 nm excitation wavelength). From 93 to 195 images (x,y) were acquired by z-scan (0.8 µm steps) with a magnification ×40. For each sample, the z-stacks obtained were combined and processed to reconstitute the 3D microgels using Scan IP™ software (version 7.0, build 2656, © 2000–2014 Simpleware Ltd.). The different processing steps are based on the work of Leverrier et al. (2017) and are illustrated in Fig. 6. The 2D confocal images (x, y) of each z-series were first combined into a 3D reconstruction. A median filter was then applied to the background of the images (neighborhood radius of 1 × 1 × 1 pixel) to eliminate noise. By comparison with the initial confocal images, a threshold was eventually chosen to select the level of grey that differentiated the stained microgels from the background. The 3D reconstitutions shown here were chosen as being representative of the replications.

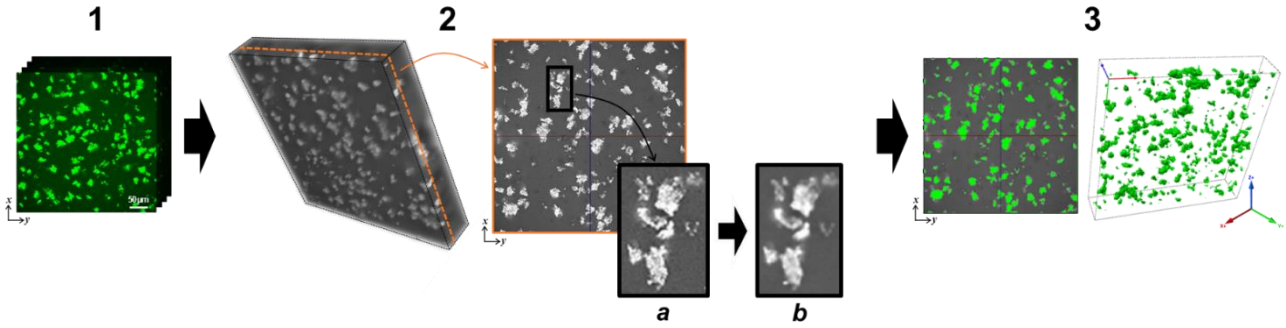


Fig. 6: Processing steps used to reconstitute the 3D microgels of stirred yogurt: 1) z-acquisition of 2D confocal images (x, y) (proteins in green); 2) 3D reconstruction and application of a median filter (a → b); 3) 3D identification of the microgels

Data computation from 3D reconstruction

From the 3D reconstructions, Scan IP™ software provided several data on both size and shape, some of which were either recovered or processed in this study. First, the software provided the number of individual microgels identified in the 3D reconstruction and their corresponding volume (µm³). In order to obtain the size distribution of the microgels in equivalent sphere, their volumes were discretized (logarithmic scale). To ensure good quality discretization, at least eight classes were required to plot each distribution (*i.e.* with volume fractions greater than 0%), with a minimum of two classes per decade. Like with laser diffraction, *d(0.1)* (µm), *d(0.5)* (median diameter, µm), *d(0.9)* (µm), *D[3,2]*, *D[4,3]* and span were retrieved from the reconstituted size distribution. From the volume of each microgel, their equivalent sphere diameter (Eq. 9) then the surface of their equivalent sphere (Eq. 10) were calculated. A roughness index of the microgels was calculated by dividing the surface of an equivalent sphere by the real surface (µm²) given by the software (Eq. 11). For each microgel, the volumes of the oriented bounding ellipsoid and the corresponding minor, medial and major lengths (µm) were also obtained using the same software. The distributions of the roughness index, minor length and major length were plotted by discretizing the data (using the volume of equivalent sphere).

$$equivalent\ sphere\ diameter\ (\mu m) = \sqrt[3]{\frac{6 \times volume}{\pi}} \quad \text{Eq. 9}$$

$$equivalent\ sphere\ surface\ (\mu m^2) = \pi \times \left(\sqrt[3]{\frac{6 \times volume}{\pi}}\right)^2 \quad \text{Eq. 10}$$

$$roughness\ (3D) = \frac{surface\ of\ equivalent\ sphere}{real\ surface} \quad \text{Eq. 11}$$

It was also possible to use the data provided by the 3D processing to estimate the mean fractal dimension of the sample concerned. By definition of the fractal scaling, the mass of a fractal aggregate m_{ag} (kg) composed of initial particles of radius r_0 (m) and mass m_0 (kg) can be linked to the characteristic cluster size R_{ag} so that (Bushell et al., 2002; Gregory, 2009; Lazzari et al., 2016) (Eq. 12):

$$n_p = \frac{m_{ag}}{m_0} = k_0 . \left(\frac{R_{ag}}{r_0}\right)^{D_f} \quad \text{Eq. 12}$$

where n_p stands for the original number of particles in the aggregate. The radius of gyration is often taken as the characteristic aggregate size. However, as mentioned by Lazzari et al. (2016), any characteristic

length of the aggregate can be used instead. The shape of the relation remains identical, but the effective value of k_0 changes. The effective density ρ_e of a fractal aggregate (taking its porosity into account) is proportional to R_{ag} as presented by Eq. 13 (Gregory, 2009):

$$\rho_e \propto {R_{ag}}^{3-D_f} \quad \text{Eq. 13}$$

The 3D reconstruction did not allow the determination of the mass of each single aggregate. However, it provided values for the volume of each aggregate V_{ag} (m^3) and its surface envelope S_{ag} (m^2). In this study, it was chosen to use the ratio V_{ag}/S_{ag} as the characteristic length of the aggregates. By combining the two last mentioned relations (Eq. 12 and Eq. 13), it was then possible to find a proportionality relation between the volume of the aggregates and its volume-over-surface ratio so that (Eq. 14):

$$V_{ag} \propto \left(\frac{V_{ag}}{S_{ag}}\right)^{D_f/3-D_f} \quad \text{Eq. 14}$$

Thus, by plotting Log(V_{ag}) vs. Log(V_{ag}/Sag) (see Fig. 10 in Supplementary material) for all the stirred yogurt microgels, and extracting the slope of the linear correlation, it was possible to estimate the average mass fractal dimension of the microgels.

2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using XLSTAT 2015.1 software (Addinsoft, Paris, France). Analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate differences between values using Tuckey's test. A significance level of $p < 0.05$ was used.

3. Results and discussion

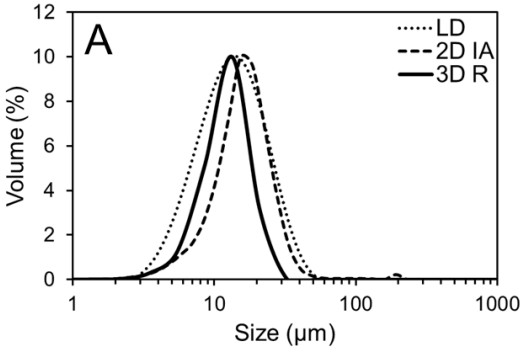
The size distribution, shape and fractal dimension of the stirred yogurt microgels were measured using the three techniques (laser diffraction and/or 2D image analysis and 3D reconstruction) and are reported in the following tables and figures in order to evaluate the suitability, advantages and limitations of the three techniques. The two stirred yogurts (FP3 and P4.5) are rarely compared since they are intentionally chosen as being different to compare techniques in two systems representative of the variety of stirred yogurt microstructures.

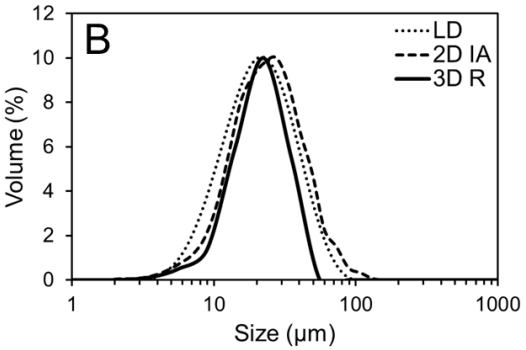
3.1. Comparison of microgel size distributions (LD, 2D, 3D)

Fig. 7 shows the size distributions obtained using the three measurement techniques and, below, some data that are characteristic of these distributions. For both FP3 (Fig. 7 A) and P4.5 stirred yogurts (Fig. 7 B), the distributions obtained by laser diffraction, 2D image analysis and 3D reconstruction were all unimodal and rather overlapped for a given stirred yogurt. The FP3 microgels were smaller than those of the P4.5 stirred yogurt, with a median size between 10 and 16 µm for FP3 and between 17 and 24 µm for P4.5. These results mainly indicate that the three techniques are consistent. Moreover, the orders of magnitude of the obtained sizes are in accordance with measurements made by some authors who used laser diffraction or CLSM for different stirred yogurts (Cayot et al., 2008; Hahn et al., 2015; Huc et al., 2016). The differences between the two stirred yogurts (Fig. 7 A and B) were certainly mainly due to their composition and their stirring process, which are known to have the most impact on microgel size (Mokoonlall, Nöbel, & Hinrichs, 2016; van Marle, van den Ende, de Kruif, & Mellema, 1999).

Although unimodal and in the same size ranges (similar order of magnitude), the distributions obtained also showed some differences depending on the measurement technique used, mainly for bigger sizes. For the FP3 stirred yogurt (Fig. 7 A), the LD measurement displayed the broadest distribution resulting in a significantly higher span. The size distributions obtained from 2D image analysis and 3D reconstruction had similar spans, but the 2D sizes were significantly bigger (d(0.5), d(0.9), D[4,3]). For the P4.5 stirred yogurt (Fig. 7 B), the 3D distribution differed from that of the LD and 2D distributions, in particular by being significantly narrower (smaller span) and by displaying fewer big microgels (smaller d(0.9) and D[4,3]). Several authors also reported that the size distributions differed with the technique used when the particles were non-spherical particles. Yu & Hancock (2008) showed that the LD size distributions of elongated microcrystalline cellulose particles (150-250 µm) were wider than their 2D distributions measured by dynamic image analysis. Califice et al. (2013) demonstrated that 2D dynamic image analysis tended to overestimate/underestimate the size of non-spherical particles (50-500 µm elongated metallic particles) compared to 3D reconstruction values

obtained from X-ray microtomography images. The literature explained the differences in size distributions by both the measurement technique and the method of calculation used (Califice et al., 2013; Köhler et al., 2008; Tinke et al., 2008; Yu and Hancock, 2008). In the present study, LD hypothesized that the particles analyzed were spherical. The calculation of the 2D diameter corresponded to the diameter of a circle of equal projection area (EQPC) and depended on the orientation of the microgel when measured. With 3D reconstruction, the measurement was protein-specific (CLSM staining) and the calculated diameter corresponded to the diameter of the equivalent sphere in volume (and did not depend on the orientation of the microgel). All these differences between the techniques likely explain the slight discrepancies shown in Fig. 7 for each of the stirred yogurts and suggest their microgels were not spherical. Further analysis of the microgel shape was thus performed to better understand the differences in size distribution, to compare the techniques and to characterize the stirred yogurt microgels more precisely.





	LD[1]	2D IA[2]	3D R[3]
Particle number	-	> 500 000	254 – 379
D[3,2] (µm)	12.1 ± 0.9 ^{a,b}	13.6 ± 1.4 ^{a,b}	11.2 ± 0.7 ^{b}
D[4,3] (µm)	16.1 ± 1.2 ^{b}	18.0 ± 0.7 ^{a}	13.1 ± 1.2 ^{c}
d(0.1) (µm)	6.8 ± 0.5 ^{b}	8.5 ± 1.1 ^{a}	5.9 ± 0.4 ^{b}
d(0.5) (µm)	14.3 ± 1.1 ^{b}	16.2 ± 1.5 ^{a}	10.5 ± 0.8 ^{c}
d(0.9) (µm)	28.0 ± 2.0 ^{a}	26.6 ± 2.2 ^{a}	15.9 ± 2.5 ^{b}
Span	1.5 ± 0.04 ^{a}	1.1 ± 0.0 ^{b}	0.9 ± 0.2 ^{b}

	LD[1]	2D IA[2]	3D R[3]
Particle number	-	> 500 000	67 – 233
D[3,2] (µm)	18.6 ± 0.3 ^{a,b}	19.2 ± 0.7 ^{a}	17.8 ± 1.1 ^{b}
D[4,3] (µm)	25.4 ± 0.4 ^{b}	27.5 ± 1.0 ^{a}	21.8 ± 2.0 ^{c}
d(0.1) (µm)	10.3 ± 0.2 ^{b}	11.1 ± 0.3 ^{a}	9.3 ± 0.7 ^{c}
d(0.5) (µm)	22.2 ± 0.3 ^{b}	23.7 ± 1.2 ^{a}	16.9 ± 1.2 ^{c}
d(0.9) (µm)	45.1 ± 0.8 ^{b}	48.4 ± 1.6 ^{a}	27.9 ± 3.2 ^{c}
Span	1.6 ± 0.04 ^{a}	1.6 ± 0.0 ^{a}	1.1 ± 0.1 ^{b}

Abbreviations: [1]LD: laser diffraction, [2]2D IA: 2D dynamic image analysis, [3]3D R: 3D reconstruction

Fig. 7: Size distributions obtained using laser diffraction (dotted lines), 2D dynamic image analysis (dashed lines) and 3D reconstruction (solid line). The tables give the diameters and descriptive parameters corresponding to the different size distributions. The table on the left shows data for the FP3 microgels (A) and the table on the right shows data for the P4.5 microgels (B). Values with different letters in the same row differ significantly at $p < 0.05$

3.2. Comparison of the shape of the microgels (2D, 3D)

2D image analysis and 3D reconstruction were both used to determine the microgel shape. Fig. 8 A illustrates how the characteristic lengths were obtained from 2D (F_{max} and F_{min}) and 3D (major and minor) analyses. Fig. 8 B*(a)* and C*(a)* below show the distributions of the different lengths for FP3 and P4.5 stirred yogurts, respectively. These length distributions are classically used to provide information about the shape (spherical or elongated) of the particles (Califice et al., 2013; Yu and Hancock, 2008). When microgels are spherical, the maximum length is obviously the same as the minimum length (Yu and Hancock, 2008). Here, minor and F_{min} length distributions were smaller than major and F_{max} distributions for FP3 and P4.5, indicating that stirred yogurt microgels are not spherical, as previously suspected based on differences in size distributions obtained with LD, 2D dynamic image analysis and 3D reconstruction. These results are in agreement with the fresh cheese microgels observed by Hahn et al. (2014) using CLSM, which were also irregular in shape. In addition, the P4.5 length distributions obtained from the 2D image analysis were broader than those obtained from 3D reconstruction. The differences between the 3D lengths (i.e. between minor and major) were more important than the differences between the 2D lengths (i.e. between F_{min}

and F_{max}). These results reveal some differences between the 2D and 3D distributions that can mainly be explained by the way the lengths were obtained with each technique (Fig. 8 A). From the 2D image analysis, F_{min} and F_{max} lengths could be biased by the orientation of microgels when measured (orientated lengthwise due to the flow). A similar concern has been expressed for irregular concrete aggregates (Cepuritis et al., 2017). With 3D reconstruction, the microgel may not be in direct contact with the ellipsoid edge to encompass the entire microgel (in length, width and thickness) (Fig. 8 (A)). This technique may therefore overestimate the minor and major lengths. Based on X-ray microcomputed tomography, Cepuritis et al. (2017) reported that 3D minor and major lengths depended on the dimension of the rectangular box enclosing the particle. In addition, in the present study, there were more differences between the two techniques for the P4.5 stirred yogurt. This result showed that P4.5 stirred yogurt microgels are more heterogeneous in shape (with more different types of elongation) than FP3 ones.

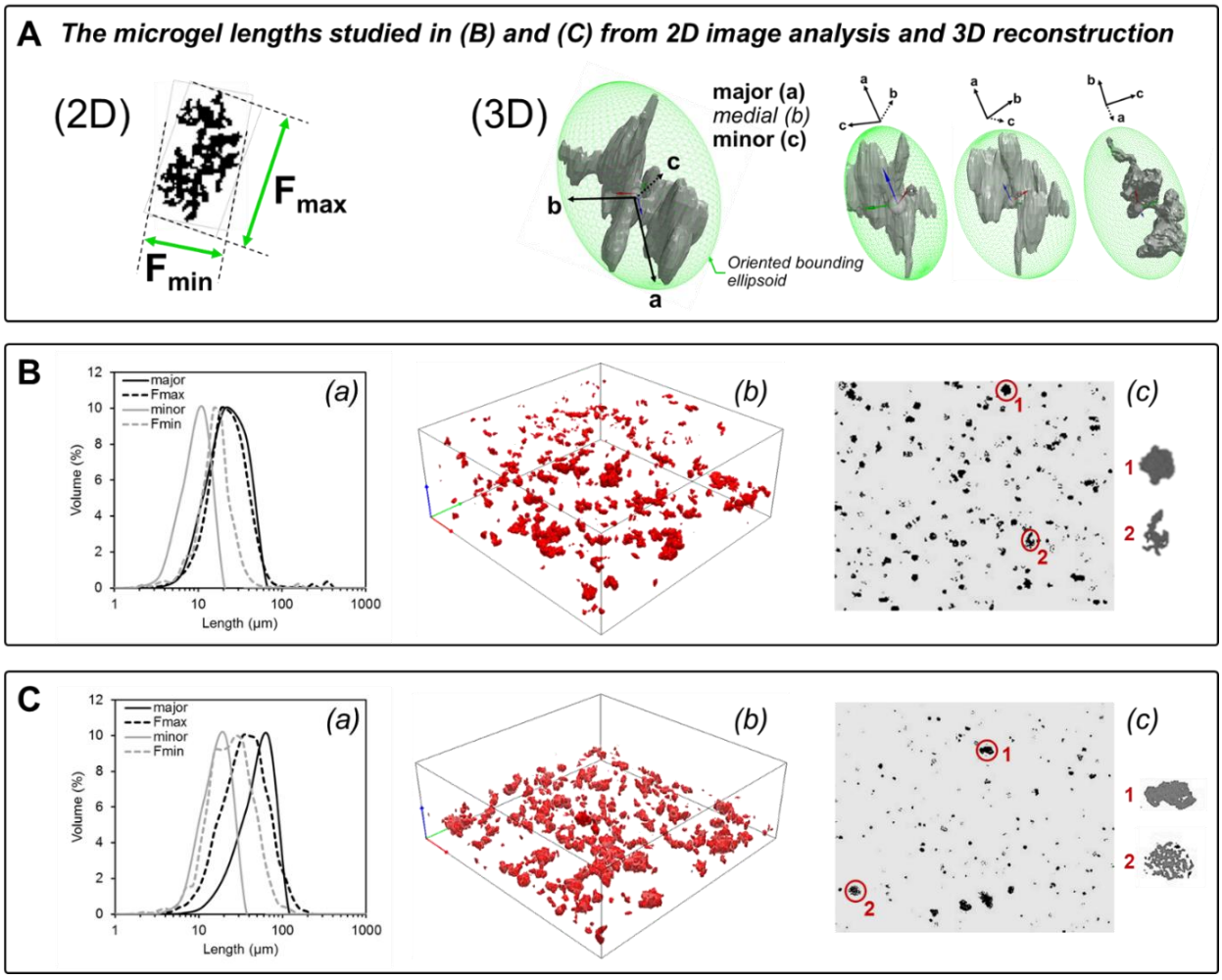


Fig. 8: Details of microgel lengths (major, Fmax, minor, Fmin) (A) studied for FP3 (B) and P4.5 (C) stirred yogurts through: (a) the length distributions (average curves) obtained from 2D image analysis (dashed lines) and 3D reconstruction (solid lines), (b) the 3D reconstructions and (c) a screenshot of the movie processed throughout 2D image analysis

Images *(b)* and *(c)* in Fig. 8 B and C, show the stirred yogurt microgels obtained using 3D reconstruction (from the z-stack confocal images) and 2D images analysis, respectively, confirming that the microgels were very heterogeneous in size and shape. This is in agreement with the results of Hahn et al. (2015), who observed CLSM images of fresh cheese under different processing conditions. 2D images of FP3 and P4.5 stirred yogurts also showed different degrees of microgel compactness (Fig. 8 *(c)*). For example, the enlarged #1 microgels obtained from the screenshots (2D image analysis) appear to be more compact than the #2 ones (Fig. 8 B *(c)* and Fig. 8 C *(c)*).

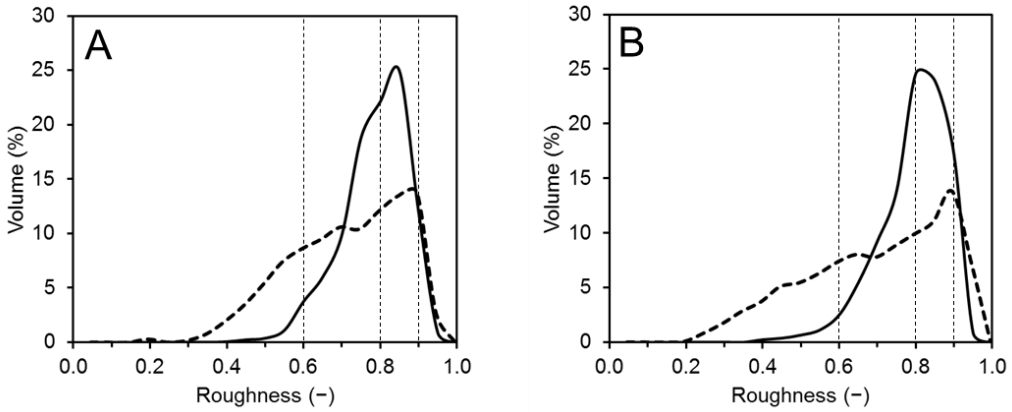


Fig. 9: Weighted average curves (three repetitions) of the roughness index distributions obtained from 2D image analysis (dashed lines) and 3D reconstruction (solid lines) for FP3 (A) and P4.5 (B) stirred yogurts

Fig. 9 presents the roughness index distributions obtained for FP3 (A) and P4.5 (B) stirred yogurts. The roughness index value ranges from 0 to 1 and describes the surface unevenness on the microgels. The index tends towards 1 for microgels with no unevenness (*i.e.* a smooth circle (2D) or sphere (3D)).

For each technique considered independently, the roughness distributions of the two stirred yogurts were globally similar, even if that of P4.5 was slightly broader. The differences in the yogurt compositions and stirring processes could explain this slight difference in roughness distributions. However, there were bigger differences between the 2D and 3D roughness distributions. Using 3D reconstruction, the distributions were narrow and unimodal, with a median roughness of 0.8, whereas using 2D images analysis, they displayed a main peak with a shoulder, with a first peak at 0.6 and a second one at 0.8-0.9. The 2D distributions were also broader (from 0.2-0.3 to 1) than 3D ones (0.4-0.5 to 1). These results indicate that the stirred yogurt microgels appears less uniform in roughness with 2D images analysis. The difference could be explained by the processing steps used to reconstitute the 3D microgels. The application of a median filter and the selection of a threshold (Fig. 6) could smooth the microgel surfaces (i.e. the boundary between the background and the microgels) and therefore underestimate the width of the roughness distributions.

Although these microgels tended towards a smooth surface (roughness mostly between 0.7 and 0.8), the range of widths of the distribution underlined the heterogeneity of the stirred yogurt microgels that can be linked to microgel size. Some studies already linked the shape of the particles such as the roughness index, to their size (Yan and Shi, 2014; Zhou and Wang, 2017). In the present study, the roughness index decreased (*i.e.* surface unevenness was greater) in bigger microgels (data not shown). Rougher microgels are probably due to the bigger size (> 30 µm) of microgels that were mostly measured using 2D analysis rather than 3D reconstruction (subsection 3.1).

3.3. Comparison of the microgel fractal dimension (LD, 2D, 3D)

All three techniques were used to estimate the microgel fractal dimension of the two stirred yogurts (FP3 and P4.5). For the LD measurements, the slopes were extracted with very high regression coefficients (higher than 0.99). For 3D reconstruction, the linear regression also proved to be very high, with values systematically higher than 0.96. With 2D dynamic image analysis, the two-dimensional fractal dimensions (D_2) were also extracted with very high regression coefficients, i.e. higher than 0.91. These high values indicated excellent fitting, thus allowing high confidence in the results obtained using these techniques (Table 3).

Table 3: Average fractal dimensions obtained from laser diffraction, 2D image analysis and 3D reconstruction. Values with different letters in the same column differ significantly at $p < 0.05$

Technique	FP3	P4.5
Laser diffraction	2.31 ± 0.01 *a*	2.37 ± 0.03 *a*
2D image analysis	2.05 ± 0.02 *c*	2.08 ± 0.02 *c*
3D reconstruction	2.26 ± 0.01 *b*	2.27 ± 0.03 *b*

The average of the mass fractal dimensions (D_f) obtained from LD and 3D reconstruction were similar even if significantly different, with values around 2.3 for the two samples. These values are in good agreement with values reported in the literature for

fermented stirred milk gels (van Marle et al., 1999). In conventional studies on Brownian aggregation of particles (generally latex suspensions), the obtained D_f values are discussed in the frame of two limiting regimes. Such studies are conducted under low volume concentrations during aggregation (typically $10^{-3} – 10^{-4}$ %), ensuring the validity of the theory. When there is no energy barrier between the colliding particles, each collision leads to aggregation. This regime is called "diffusion limited aggregation" (DLA) and results in loose open structures with D_f around 1.7 – 1.8. When the repulsion forces are still significant, the particles can penetrate the aggregate structure before adhering. This regime is called "reaction limited aggregation" (RLA) and leads to denser aggregates, with D_f around 2.1. In the present study, the volume fractions of milk proteins (before dilution) were higher than 1% in both stirred yogurts (FP3 and P4.5), which explains why the values obtained were significantly higher (Bremer et al., 1989). In addition, the colloidal calcium phosphate, which ensures the structure integrity of the casein micelles, dissolves during acidification. This dissolution results in the loosening of the micelles (increasing their volume), which likely promotes the compaction of the protein aggregates due to loss of repulsive interactions and thus leads to denser structures (Andoyo et al., 2015).

The D_f value calculated from 3D reconstruction could be considered as the most accurate of the three techniques, because it relies on direct visualization of the aggregates and assumes no strong assumption. However, the LD technique proved to be a very good alternative technique to obtain D_f as the differences between LD and 3D were very small. However, the values obtained using 2D image analysis and the equation proposed by Lee & Kramer (2004) differed more from 3D measurements. Estimating D_f from 2D image analysis using this equation thus appears to be questionable in the case of stirred yogurt microgels. Lee & Kramer (2004) reported underestimation of D_f in the case of *E. coli* aggregates and explained that it was partly because *E. coli* were not spherical, which could also be the case of the stirred yogurt microgels. The 3D and LD techniques are thus recommended over 2D analysis.

3.4. Comparison of the advantages and limitations of LD, 2D and 3D

To complete the comparison of the performances of the three techniques, Table 4 summarizes the size distribution range, the measurement conditions, the time needed for measurement and data treatment per sample, the properties obtained directly or calculated from the data as well as the assumptions and weaknesses.

While LD, 2D image analysis and 3D reconstruction proved to be quite consistent in characterizing stirred yogurt microgels, Table 4 shows that they each had their advantages and limitations. The LD technique mainly assumes that the analyzed particles are homogeneous and spherical, which has been shown (subsection 3.1) to lead to overestimation of the bigger particles and/or underestimation of the smaller particles when measuring the microgel sizes of the stirred yogurts. Moreover, this technique requires refractive and adsorption indexes, which can be difficult to estimate for complex systems composed of different ingredients. However, in the case of the stirred yogurt microgels, these indexes were not problematic since no variation in the size distribution was observed when their values varied (due to the sufficiently large size of the microgels). Although LD obviously does not allow access to shape factors, it is quick and user-friendly for accessing the size distribution and the fractal dimension. It also makes it possible to measure particles less than a micron in size, which is not the case of the 2D and 3D techniques presented here (limited by their optical geometry characteristic).

As mentioned above, 2D dynamic image analysis cannot reasonably measure sizes smaller than 1 µm, and this needs to be taken into account when studying food structures that can be below this threshold (colloidal systems, for example). The first limitation is that although the mass fractal dimension can be estimated using a specific relation reported in the literature, (subsection 3.3) its use was shown to be questionable in the case of the stirred yogurt microgels. Moreover, the time required to process the data is quite long, and this technique analyzes the projected areas (2D) of the measured particles, which may depend on their orientation during measurement. On the other hand, it has the advantage of allowing a very large number of particles to be analyzed, which should offsets the orientation bias. Moreover, it enables relatively rapid measurement and direct access to the size and shape properties. It provided a 2D view of the particles that revealed that the microgels were not spherical, but showed varying degrees of roughness, and were sometimes porous (fractal dimension) in stirred yogurt.

Table 4: Comparison of laser diffraction, 2D image analysis and 3D reconstruction. Information **in bold** indicates the advantages of each technique

Technique	Laser diffraction	2D image analysis	3D reconstruction
Equipment	MasterSizer 2000 (Malvern)	QICPIC/R and LIXELL (Sympatec)	CLSM (Leica) and Scan IP™ (Simpleware)
Size range	**0.02 to 2,000 µm**	1 to 750 µm (M4 lens)	0.532 µm (*i.e.* pixel) to a few millimeters
Measurement conditions	Dilution 1:100, Agitation, Pumping	Dilution 1:2000, Agitation, Pumping	Dilution 1:100, **Staining**
Measuring time per sample	**10 min**	**30 sec**	30 min
Time needed for data treatment per sample	**10 min**	30 min	1 h
Properties obtained directly	Size	**Size, Shape factors, Visualization of microgel projection (2D)**	-
Calculated properties	Fractal dimension	Fractal dimension	Size, Shape factors, Fractal dimension, **realistic visualization of the microgels (3D)**
Assumptions and limitations	(i) Particles considered as homogeneous and spherical (ii) Need for refractive and absorption indexes (iii) No access to particle shape	(i) Data based on projected areas of the particles (depending on their orientation) (ii) Low camera resolution (iii) Need for low concentrations of particles	(i) Threshold to select pixels of interest (identification of the stained particles) (ii) Small number of particles (iii) Time consuming data processing

The smallest size that can be measured with 3D reconstruction depends on the resolution of the microscope and may be high (i.e. allowing to observe small sizes) in food structure analysis. Data acquisition is time consuming and the analysis of the properties of size, shape and fractal dimension requires complete data processing. Moreover, a threshold has to be chosen to select pixels of interest (identification of the stained microgels). The results showed in subsections 3.1, 3.3 and 3.3 demonstrated that the choice made for this study was appropriate in the case of the stirred yogurt microgels studied here. One of the advantages of the 3D technique (using CLSM) is the limited shear undergone by the particles. This is particularly relevant for the study of brittle systems such as stirred yogurt microgels and most food matrices. Based on molecule staining, it also allows the selection of specific compounds within the particles and tailored measurement of the structure. The main strength of 3D reconstruction is that it enables full visualization of the particles, with no orientation bias or sphericity assumption. This specificity was particularly useful in the present study since it offered the opportunity to clearly observe the diverse sizes and shapes of the yogurt microgels.

4. Conclusions

Laser diffraction, 2D dynamic image analysis and 3D reconstruction were shown to be relevant and complementary for the characterization of the size (through PSD), shape and fractal dimension of heterogeneous (in composition) and irregularly shaped systems like stirred yogurt microgels. By comparing LD with 2D image analysis and 3D reconstruction on two different stirred yogurts, we showed that LD was fully relevant to access the size distribution and the mean mass fractal dimension of non-spherical yogurt microgels. The use of 2D dynamic image analysis and 3D reconstruction also raised the question of the characterization of the shape of the stirred yogurt microgels. While rarely used for food systems, 2D dynamic image analysis proved to be advantageous to visualize the microgels and quickly estimate their morphological parameters. 3D reconstruction also has very useful features as it enables access to shape factors while avoiding the possible bias resulting from particle orientation using 2D analysis. However, the 3D technique usually entails time consuming sample preparation and analysis, and is thus not really to be recommended for routine analysis. This comparison of the three techniques provides useful guidelines for studying complex food systems. Moreover, these techniques can offer new perspectives to accurately explain the relationship between the microstructure and the macro-scale properties (such as flow properties) of a food system at each step of its processing chain.

Supplementary material

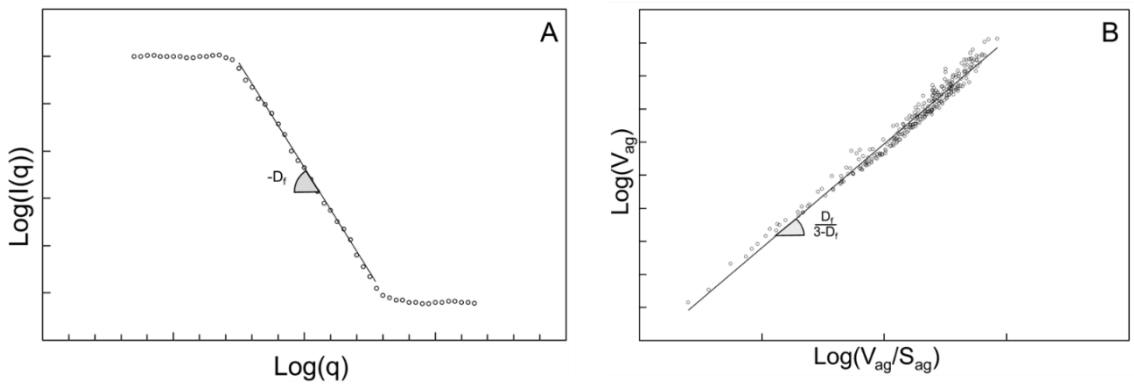


Fig. 10: Graph of principle used to obtain the fractal dimension from the laser diffraction data (A) and the 3D reconstruction data (B) where q (m^{-1}) is the scattering vector, $I(q)$ is the light scattered intensity, V_{ag} (m^3) is the volume and S_{ag} (m^2) the surface envelope of each aggregate

Acknowledgements : This work was funded by a single interministerial fund (France) through a collaborative R&D project certified by Vitagora and Valorial competitiveness clusters as well as by the research programs of the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies, Novalait Inc., the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ), and the Fondation Famille-Choquette. The authors would like to thank Philippe Violle, sales manager of Sympatec France, for his help and advice with the dynamic image analysis processing. The authors also thank Paul Menut and Artemio Plana-Fattori for sharing their experience and contributing to the development and improvement of this paper.

5.2. Modification des propriétés des microgels et impact sur les yaourts brassés

D'après la littérature, les propriétés macroscopiques des yaourts brassés dépendent directement de la structure des microgels obtenus après brassage (Hahn et al., 2015; Nöbel et al., 2014). La structure des microgels dépend de la microstructure du gel ferme avant brassage. Le ratio caséines/protéines sériques (ratio cas/WP) est l'une des variables permettant de modifier cette microstructure (Andoyo et al., 2015; Chever et al., 2014). Cependant, peu d'auteurs ont mesuré son impact sur la structure des microgels de yaourts brassés (Krzeminski et al., 2011). Cette partie présente donc les travaux dans lesquels le ratio cas/WP, ainsi que l'état physico-chimique des protéines, ont été modulés dans le but de modifier la structure des microgels. Nous nous sommes servis des techniques étudiées dans l'article ci-dessus afin de caractériser les propriétés de structure des microgels obtenus. Les propriétés rhéologiques et le coefficient de friction des yaourts brassés ont ensuite été mesurés et mis en relation avec les propriétés de structure des microgels.

Deux solutions contenant 3,1 wt% de protéines sériques solubilisées dans du perméat ont été préparées dans à l'échelle pilote (Yoplait) d'après le protocole présenté en Chapitre 3 (p. 95). Les deux conditions suivantes ont été présélectionnées pour générer différents états physico-chimiques des protéines sériques :

- Aucun traitement pour garder les protéines sériques natives : WPn.
- Un traitement thermique (T) à 92 °C pendant 6 min suivi d'une homogénéisation haute pression dynamique à 100 MPa (HP) pour obtenir des protéines sériques dénaturées et agrégées : WP(T+HP).

Les propriétés physico-chimiques des deux solutions ont été mesurées et sont présentées dans le Tableau 21. Elles montrent notamment que les agrégats formés dans la solution WP(T+HP) avaient une plus grande hydrophobicité de surface, un potentiel ζ plus important et une concentration totale en thiols libres plus élevée que les protéines sériques natives de la solution WPn.

Etant donné que l'agrégation thermique des protéines sériques se fait – en partie – par la formation de ponts disulfures, on aurait pu s'attendre à avoir une concentration totale en thiols libres plus faible pour la solution WP(T+HP) que pour la solution WPn. La concentration plus élevée obtenue pour la solution WP(T+HP) pourrait s'expliquer par une modification de la conformation des protéines à l'issue :

- de la réaction de Maillard (traitement thermique des protéines en présence du lactose contenu dans le perméat), avec une réduction des ponts disulfures et la formation de groupements thiols ;
- des très hautes pressions (100 MPa) appliquées après l'agrégation thermique, qui pourraient avoir rompu les ponts disulfures et ainsi avoir libéré des groupements thiols.

Tableau 21 : Propriétés physico-chimiques des solutions de protéines sériques fabriquées à l'échelle pilote sans traitement (WPn) ou avec un traitement thermique suivi d'un traitement haute pression dynamique (WP(T+HP))

	WPn	WP(T+HP)
Ordre de grandeur de la taille (nm)	< 10	≈ 500
Dimension fractale (-)	-	2,07 ± 0,01
Indice d'hydrophobicité de surface $\times 10^4$ (-)	5,0 ± 0,1	8,3 ± 0,1
Potentiel ζ (mV)	- 18,7 ± 1,6	- 23,3 ± 0,1
SH libres totaux ($\mu mol.g^{-1}$)	34,7 ± 0,9	66,7 ± 2,5

Dans les produits laitiers, le ratio cas/WP de référence est d'environ 80/20 et le ratio de 60/40 a été choisi pour cette étude afin de tester l'impact d'une variation du ratio cas/WP, sans pour autant basculer dans une proportion inverse. Trois formules différentes de yaourt brassé (3,1 wt% de protéines, 6,0 wt% de matière grasse) ont été fabriquées à l'échelle pilote (Yoplait) à partir de lait écrémé, de crème, des deux solutions de protéines sériques et d'amidon de riz d'après le protocole présenté en Chapitre 3 (p. 96). Chaque formule a été produite deux fois. La Figure 71 détaille les différentes formules fabriquées.

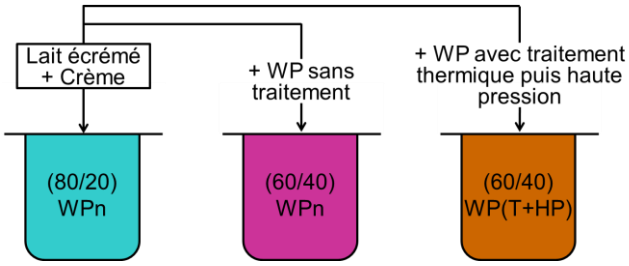


Figure 71 : Différentes formules de yaourt brassé pilote fabriquées afin de mesurer l'impact du ratio cas/WP, en fonction de l'état physico-chimique des protéines sériques, sur les microgels et les propriétés macroscopiques des yaourts brassés

Pour pouvoir faire le lien entre formulation, structure et texture, les microgels des yaourts brassés ont d'abord été caractérisés (propriétés microscopiques) puis les propriétés macroscopiques de yaourts brassés ont ensuite été mesurées. Le Tableau 22 présente l'ensemble des mesures qui ont été effectuées.

Tableau 22 : Ensemble des mesures effectuées pour caractériser les microgels et les yaourts brassés pilotes obtenus en faisant varier le ratio cas/WP et l'état physico-chimique des protéines sériques (détails en Chapitre 3, p. 91)

Types de propriétés	Mesures effectuées
Propriétés instrumentales microscopiques	Observation de la structure des yaourts brassés par microscopie confocale à balayage laser (aucune dilution)
	Reconstruction 3D des microgels de yaourt brassé (dilution 1/100)
	Estimation d'un indice de sphéricité médian (sph(0,5)) *Pour chaque microgel, l'indice de sphéricité a été estimé comme le ratio minor/major de l'ellipsoïde orienté qui le délimite. La médiane (sph(0,5)) a été calculée à partir de l'ensemble des indices de sphéricité des microgels d'un échantillon.*
	Estimation de la dimension fractale par diffraction laser
	Mesure de la taille des microgels par diffraction laser
Propriétés instrumentales macroscopiques	Mesure des propriétés rhéologiques (G'_0, η_0, G'_f, η_f) ▪ *Une première étape de mesure des propriétés à 10 °C (G'_0 et η_0 à 60 s^{-1}) au début du protocole rhéologique prenant en compte le processus oral ;* ▪ *Une deuxième étape d'augmentation de la température de 10 à 25 °C sous un cisaillement de 60 s^{-1} ;* ▪ *Une dernière étape de mesure des propriétés à 25 °C (η_f à 60 s^{-1} et G'_f) à la fin du protocole rhéologique prenant en compte le processus oral*
	Mesure du coefficient de frottement (μ) à 10 mm.s^{-1} à 25 °C

5.2.1. Impact du ratio cas/WP sur les microgels en fonction de l'état physico-chimique des protéines sériques

Les microstructures des yaourts brassés pilotes ont été observées (2×3 répétitions[33]) par microscopie confocale à balayage laser et la dimension fractale des microgels a été estimée par diffraction laser. La Figure 72 montre les microstructures typiques obtenues pour les trois formules et les dimensions fractales correspondantes (en-dessous).

Les microstructures obtenues sont cohérentes avec celles observées par Liu et al. (2015) pour des émulsions gélifiées et Huc et al. (2016) pour des yaourts brassés. Elles présentent un réseau protéique dans lequel la matière grasse est dispersée sous forme de globules gras plutôt agrégés. Les microstructures des trois formules sont similaires au niveau de la matière grasse mais différentes au niveau du réseau protéique :

- Le réseau protéique de la formule (80/20) WPn est homogène.
- Le réseau protéique de la formule (60/40) WP(T+HP) est assez hétérogène, avec des zones plus lâches et des zones denses (en surbrillance) qui correspondent certainement aux agrégats de protéines sériques (500 nm) obtenus par le traitement préalable (température puis haute pression 100 MPa).
- Le réseau protéique de la formule (60/40) WPn est le plus dense de tous. Il est assez homogène et les microgels sont plus faciles à distinguer.

[33] *Une seule lame a été préparée par production (2 productions × 3 formules = 6 lames) et 3 prises d'image ont été effectuées pour chaque lame.*

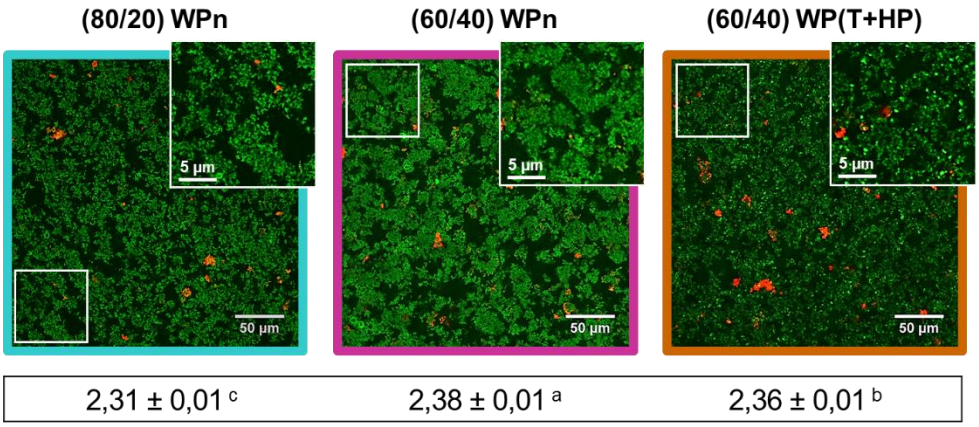


Figure 72 : Images confocales des yaourts brassés pilotes (objectif × 40) avec un agrandissement sur une zone (encadré blanc) pour chacune ; Les globules gras apparaissent en rouge, les protéines en vert, les zones où la matière grasse et les protéines sont co-localisées en jaune-orange et les zones contenant du sérum en noir ; Les dimensions fractales des microgels de chacune des formules de yaourt brassé pilote sont indiquées dans l'encadré en-dessous (les valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$) sont indiquées avec des lettres différentes)

La littérature ne permet pas d'établir clairement l'écart à partir duquel deux dimensions fractales sont considérées comme différentes. D'après l'état de l'art (Chapitre 1, p. 55), la valeur de la dimension fractale pourrait être impactée par i) la méthode de mesure (détails en Chapitre 5, p. 137), ii) la composition (mélange de protéines dont certaines agrégées/associées et présence de matière grasse) et iii) le procédé (variation des répulsions électrostatiques pendant l'acidification, agrégation des protéines sériques engendrée par traitement thermique, cisaillement). Andoyo et al. (2015) ont montré que ce sont surtout les micelles de caséines qui dominent la dimension fractale de gels laitiers.

Ici, les dimensions fractales obtenues pour les trois formules sont significativement différentes du point de vue statistique, et peuvent indiquer des tendances. La dimension fractale moyenne de la formule (80/20) WPn est la plus faible, celle de la formule (60/40) WP(T+HP) est intermédiaire et celle de la formule (60/40) WPn est la plus élevée. Plus la dimension fractale est élevée et plus le taux d'occupation (compacité) de la structure est important. Les dimensions fractales obtenues indiquent donc que le réseau de la formule de (60/40) WPn est le plus dense, celui de la formule (60/40) WP(T+HP) est de densité intermédiaire et celui de la formule (80/20) WPn est le moins dense. Les valeurs obtenues sont cohérentes avec les différences observées par microscopie au niveau des réseaux protéiques des trois formules.

Le ratio cas/WP a un impact sur la microstructure des yaourts brassés. Lorsque les protéines sériques sont natives (WPn), une augmentation de la proportion de protéines sériques (60/40) entraîne une plus grande compacité du réseau protéique. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par Andoyo et al. (2015) et Torres et al. (2012). Ils peuvent s'expliquer par :

- l'augmentation du nombre de complexes formés par les micelles de caséines et les protéines sériques et, par conséquent, la réduction de la déstructuration/coalescence des micelles de caséines pendant l'acidification (Figure 19) ;
- l'augmentation des interactions (notamment hydrophobes) au sein du réseau due à la présence des protéines sériques.

L'impact du ratio cas/WP dépend aussi de l'état physico-chimique des protéines sériques. A même ratio (60/40), les protéines sériques agrégées (WP(T+HP)) représentent moins d'entités que les protéines sériques natives. Par conséquent, les protéines sériques agrégées peuvent faire de moins nombreuses interactions que les protéines sériques natives, bien qu'elles aient une hydrophobicité de surface plus importante. Cela explique probablement que le réseau protéique formé avec des protéines sériques agrégées soit moins compact (taux d'occupation moins élevé) qu'avec les protéines sériques natives.

La taille et l'aspect des microgels ont été analysés plus en détails (Figure 73). Les microgels obtenus par reconstruction 3D sont hétérogènes en tailles et en formes pour chacune des trois formules. Visuellement, les

microgels de la formule (80/20) WPn sont plus gros que ceux des deux autres formules et les microgels de la formule (60/40) WPn semblent être plus gros que ceux de la formule (60/40) WP(T+HP).

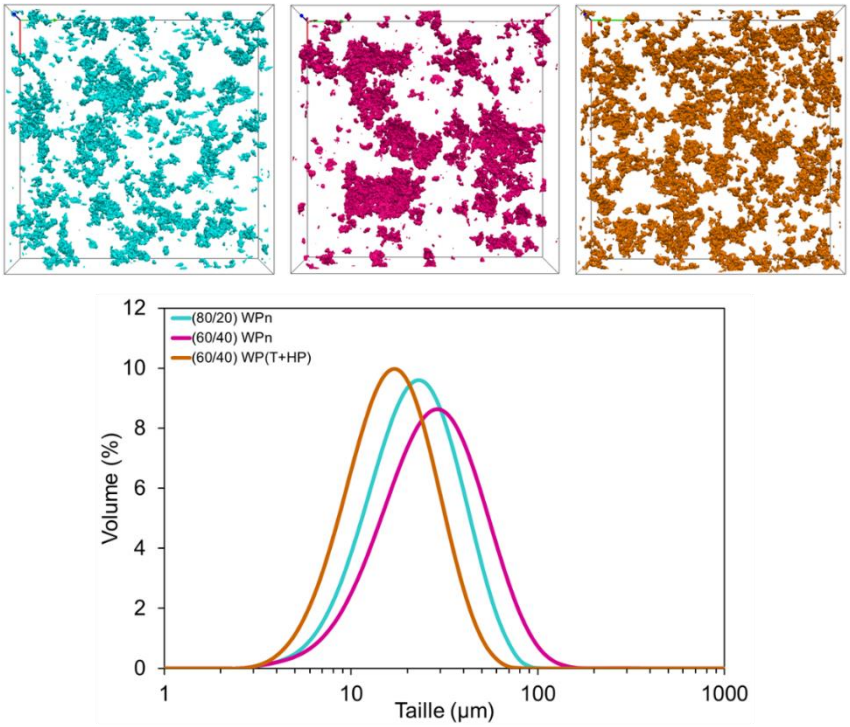
Les distributions de taille des microgels obtenues par diffraction laser permettent de quantifier ces différences visuelles et indiquent que :

- les microgels de la formule (60/40) WP(T+HP) sont les plus petits, avec un diamètre médian d'environ 18 µm ;
- les microgels de la formule (80/20) WPn sont de tailles intermédiaires, avec un diamètre médian autour de 23 µm ;
- les microgels de la formule (60/40) WPn sont les plus gros, avec un diamètre médian autour de 29 µm.

Les différents diamètres (D[4,3], D[3,2], d(0,1), d(0,5) et d(0,9)) sont significativement différents d'une formule à l'autre. Les valeurs de span (non montrées ici) sont comprises entre 1,5 et 1,7 et celle de la formule (60/40) WPn est légèrement plus élevée (1,7) que celles des deux autres formules (1,5).

Les différences de taille de microgels obtenues d'une formule à l'autre s'expliquent très certainement par des capacités différentes des réseaux protéiques à résister au cisaillement pendant le brassage. Bien qu'ils soient légèrement plus polydisperses, les gros microgels de la formule (60/40) WPn suggèrent que son réseau protéique a bien résisté au cisaillement, très probablement grâce aux plus fortes interactions et à sa plus grande compacité. Le réseau moins compact de la formule (80/20) WPn a vraisemblablement moins résisté au cisaillement du brassage, donnant de plus petits microgels. Dans le cas de la formule (60/40) WP(T+HP), les microgels obtenus après brassage sont les plus petits alors que le niveau de compacité du réseau est intermédiaire. La plus grande friabilité de cette formule au brassage pourrait s'expliquer par plusieurs phénomènes :

- il y a moins d'interactions au sein du réseau protéique, ce qui le rend plus fragile ;
- le réseau protéique est plus hétérogène, avec l'existence de zones moins résistantes qui peuvent fragiliser localement la structure.



	D [4,3]	D [3,2]	d (0,1)	d (0,5)	d (0,9)
(80/20) WPn	26,4 ± 1,7 ^{b}	19,3 ± 1,0 ^{b}	10,9 ± 0,6 ^{b}	23,4 ± 1,5 ^{b}	46,1 ±3,1 ^{b}
(60/40) WPn	33,4 ± 3,3 ^{a}	22,8 ± 1,7 ^{a}	12,4 ± 0,9 ^{a}	28,8 ± 2,8 ^{a}	60,4 ±6,5 ^{a}
(60/40) WP(T+HP)	19,8 ± 0,7 ^{c}	15,0 ± 0,8 ^{c}	8,6 ± 0,6 ^{c}	17,8 ± 0,9 ^{c}	34,2 ±1,2 ^{c}

Figure 73 : Visualisation par reconstructions 3D, distributions de taille et différents diamètres des microgels des yaourts brassés pilotes

Par ailleurs, l'indice de sphéricité médian (sph(0,5)) a été estimé à partir de la reconstruction 3D des microgels pour les trois formules. Il était différent d'une formule à l'autre, avec une valeur de 0,65 pour la formule (60/40) WPn, 0,60 pour la formule (60/40) WP(T+HP) et 0,55 pour la formule (80/20) WPn. Etant donné que l'indice tend vers 1 quand les microgels sont sphériques, les valeurs obtenues indiquent que les microgels de la formule (60/40) WPn étaient les plus sphériques et ceux de la formule (80/20) WPn les moins sphériques.

5.2.2. Impact du ratio cas/WP sur les propriétés macroscopiques des yaourts brassés

Les propriétés rhéologiques des yaourts brassés pilotes ont été mesurées à l'échelle macroscopiques, au début (G'_0, η_0) et à la fin à la fin (G'_f, η_f) du protocole prenant en compte les conditions de température et de cisaillement du processus oral (Figure 74). Les formules (80/20) WPn et (60/40) WPn ont des propriétés rhéologiques similaires (pas significativement différentes), qui sont jusqu'à deux fois plus élevées que celles de la formule (60/40) WP(T+HP). La formule (60/40) WP(T+HP) était donc moins ferme que les deux autres.

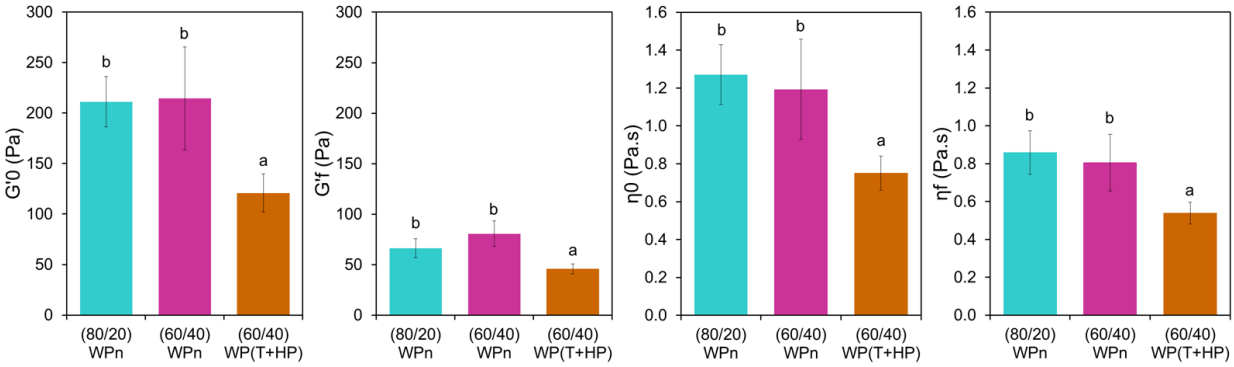


Figure 74 : Propriétés rhéologiques des yaourts brassés pilotes (les valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$) sont indiquées avec des lettres différentes)

Même si la littérature a montré qu'une augmentation de la proportion de protéines sériques rendait les gels laitiers plus fermes (Andoyo et al., 2015; Chever et al., 2014), elle n'a pas d'effet de renforcement des propriétés rhéologiques des yaourts brassés. Dans le cas des protéines sériques agrégées (WP(T+HP)), un ratio de 60/40 a même donné une valeur de module conservatif plus basse qu'avec un ratio de 80/20. Il est possible d'expliquer ces différences par la microstructure et les caractéristiques des microgels. D'une part, les microgels de la formule (60/40) WPn étaient plus compacts (donc potentiellement plus rigides) et plus gros (et donc moins nombreux) que ceux de la formule (80/20) WPn. Dans la formule (60/40) WPn l'augmentation potentielle du module conservatif – en lien avec une plus grande rigidité des microgels – a probablement été compensée par le fait d'avoir des gros microgels moins nombreux. D'autre part, la microstructure moins homogène et plus déstructurée (plus petits microgels) de la formule (60/40) W(T+HP) sont certainement à l'origine d'un module conservatif moins élevé.

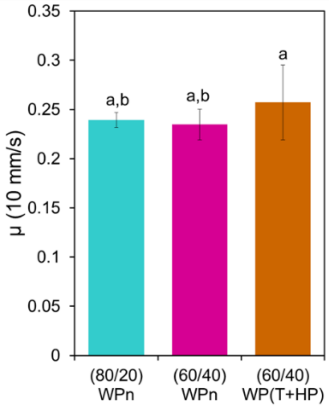


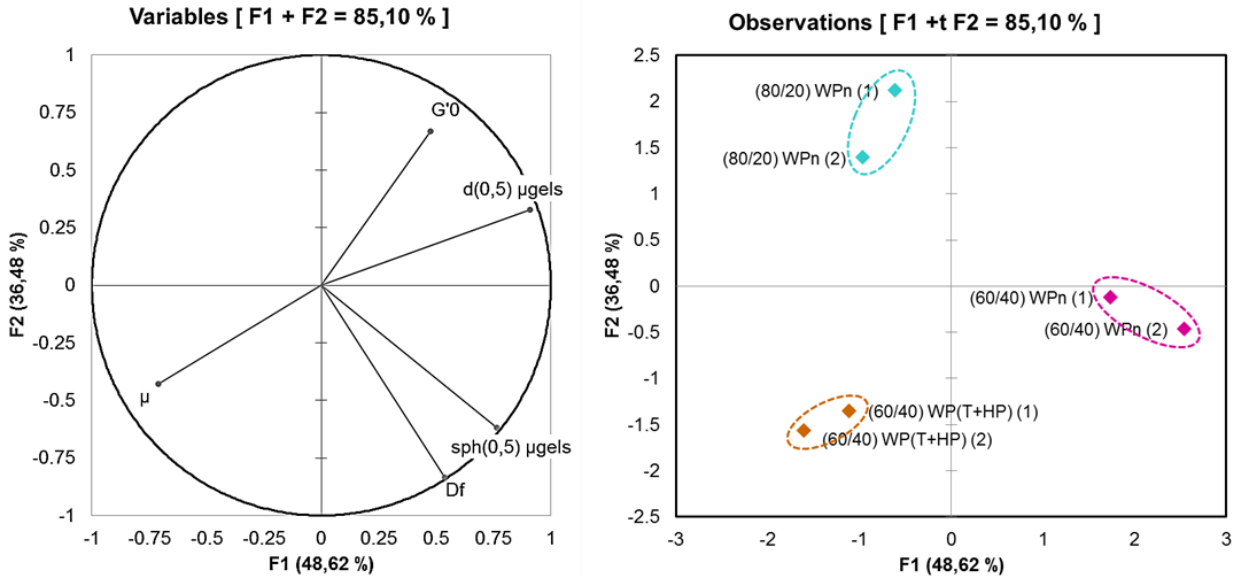
Figure 75 : Coefficients de friction des yaourts brassés pilotes mesurés par tribologie (les valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$) sont indiquées avec des lettres différentes)

Les coefficients de friction obtenus par tribologie (Figure 75) sont assez proches pour les trois formules, avec celui de la formule (60/40) WP(T+HP) légèrement plus élevé et plus variable que les deux autres. Cette tendance est probablement due à plusieurs phénomènes :

- La présence d'une plus grande quantité de sérum, moins lubrifiant, dans les zones plus lâches de la microstructure de (60/40) WP(T+HT).
- La présence de gros agrégats protéiques submicroniques (≈ 500 nm) dans la formule (60/40) WP(T+HT), pouvant ajouter des zones de friction au moment de la mesure.

5.2.3. Lien entre la structure des microgels et les propriétés des yaourts brassés

Pour faire le lien entre les propriétés des microgels et les propriétés macroscopiques des yaourts brassés, une ACP et une matrice des corrélations (Pearson) ont été réalisées. Le paramètre G'_0 a été choisi pour représenter l'ensemble des propriétés rhéologiques qui étaient toutes corrélées entre elles. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 76.



Variables	Df	d(0,5) µgels	sph(0,5) µgels	G'0	µ
Df	1				
d(0,5) µgels	0,20	1			
sph(0,5) µgels	**0,93**	0,47	1		
G'0	- 0,26	0,61	0,29	1	
µ	0,01	**- 0,76**	-0,21	- 0,34	1

Figure 76 : Cercle des corrélations des propriétés microscopiques et macroscopiques (en haut à gauche), cartographie des yaourts brassés pilotes correspondants (en haut à droite) et matrice de Pearson avec les coefficients de corrélation entre les différentes propriétés mesurées (en bas) ; Les valeurs en **gras** indiquent que les propriétés sont significativement corrélées / anti-corrélées ($p < 0,10$)

La projection sélectionnée (F1 ; F2) représente environ 85% de l'information, dont plus de 48% est portée par l'axe F1 et plus de 36% par l'axe F2. Les différentes variables mesurées sont bien réparties sur le cercle des corrélations. Le tableau de contribution des variables (non montré) permet de dire que la taille médiane des microgels (d(0,5) µgels) et le coefficient de frottement (µ) sont surtout représentés sur F1, le module élastique (G'_0) et la dimension fractale sont surtout représentés sur F2, et l'indice de sphéricité médian des microgels (sph(0,5) µgels) est à la fois représenté sur F1 et sur F2. La matrice des corrélations permet d'identifier les relations qui existent entre les différentes propriétés mesurées (variables) :

- *Entre les propriétés microscopiques :* L'indice de sphéricité et la dimension fractale sont très bien corrélés. Cela est tout à fait cohérent avec la définition de la dimension fractale, dont la valeur maximale est de 3 dans le cas d'un agrégat sphérique. La taille médiane des microgels est, quant à elle, complémentaire à l'indice de sphéricité médian et à la dimension fractale des microgels.
- *Entre les propriétés macroscopiques :* Les propriétés rhéologiques et tribologiques ne sont pas corrélées entre elles et sont donc complémentaires pour caractériser les yaourts brassés dont le ratio cas/WP et l'état physico-chimique des protéines sériques ont été modifiés.
- *Entre les propriétés microscopiques et macroscopiques :* D'une part, la taille médiane des microgels est anti-corrélée au coefficient de friction. D'autre part, même si les propriétés rhéologiques (G'_0) ne sont pas significativement corrélées à la taille médiane des microgels, elles tendent à augmenter quand les microgels sont plus gros. Cela est cohérent avec la Hahn et al. (2015), qui montrent également cela pour des microgels inférieurs à 100 µm.

Sur la cartographie, les deux productions d'une même formule sont très proches, ce qui indique qu'elles ont des propriétés similaires (bonne reproductibilité). Les différentes formules sont réparties sur l'ensemble de la cartographie et sont bien discriminées les unes des autres.

Les modifications du ratio cas/WP et de l'état physico-chimique des protéines sériques (pré-traitement) ont permis de générer diverses structures de microgels. Dans les conditions utilisées, les propriétés macroscopiques des yaourts brassés obtenus étaient différentes d'une formule à l'autre, mais les modifications du ratio cas/WP et de l'état physico-chimique des protéines sériques (pré-traitement) n'ont ni augmenté la viscosité (ou le module conservatif), ni baissé le coefficient de friction par rapport à la référence (formule (80/20) WPn). Certains auteurs ont montré que le degré de dénaturation des protéines sériques, la taille des agrégats de protéines sériques, le ratio cas/WP et le moment d'incorporation des protéines sériques sont autant de facteurs qui pouvaient également influencer la structure et la texture de systèmes laitiers brassés (Ipsen, 2017; Laiho et al., 2017; Torres et al., 2011). Il existe donc des pistes d'optimisation des conditions pour de futures études. Les travaux présentés dans ce chapitre apportent et valident des outils méthodologiques combinés en partie 5.1 (p. 129) pour :

- faire le lien entre structure et propriétés macroscopiques des yaourts brassés ;
- mieux comprendre les mécanismes de structuration de la matrice.

Conclusions et messages clés du chapitre

Les propriétés macroscopiques des dispersions concentrées de particules (yaourts brassés) sont pilotées par les propriétés de structure des particules (microgels) : taille, forme (dont la rugosité), dimension fractale (compacité du réseau).

Les microgels de yaourts brassés peuvent être finement caractérisés en termes de taille, de forme et de dimension fractale grâce à **l'utilisation et la combinaison de la diffraction laser, de l'analyse dynamique d'images (2D) et de la reconstruction 3D à partir d'images confocales** :

- La distribution de taille des microgels peut être calculée à partir de la diffraction laser, de l'analyse dynamique d'images (2D) et de la reconstruction 3D. Cependant, la diffraction laser est plus rapide et plus polyvalente (0,2 à 2000 µm) que les deux autres techniques.
- La dimension fractale des microgels peut être estimée de manière fiable grâce à la diffraction laser et la reconstruction 3D.
- L'évaluation de la forme et la visualisation des microgels peuvent se faire à l'aide de l'analyse dynamique d'images (2D) et de la reconstruction 3D. Elles sont plus rapides avec l'analyse dynamique d'images (2D) mais plus précise et complète avec la reconstruction 3D.

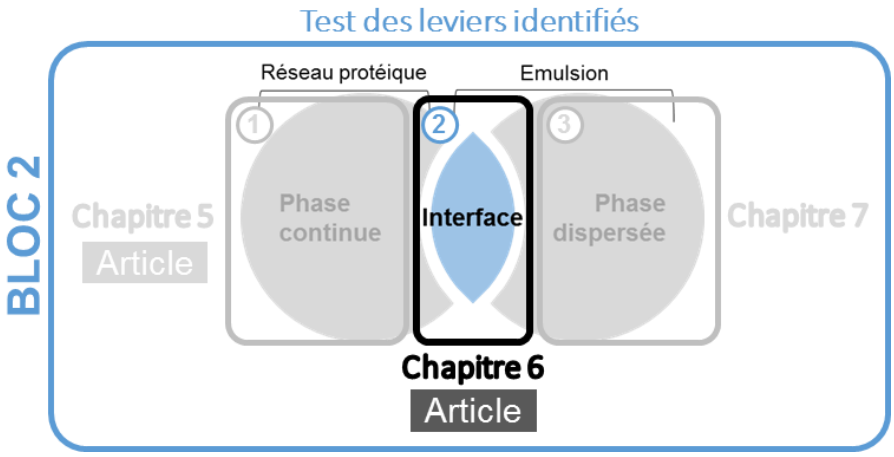
Les différentes techniques ont montré que les microgels sont des particules **assez hétérogènes, non sphériques, irrégulières en surface (rugueuses), avec des tailles comprises entre 5 et 100 µm et une dimension fractale autour de 2,30**.

Les **modifications du ratio cas/WP avec des protéines sériques natives ou des protéines sériques agrégées** permettent de modifier les **propriétés de structure des microgels** et de faire varier les **propriétés rhéologiques et tribologiques des yaourts brassés**. Les conditions testées n'ont permis **ni d'augmenter la viscosité (ou le module conservatif) des yaourts brassés, ni de diminuer leur coefficient de friction** (pas d'amélioration du crémeux). Même s'il existe des pistes d'optimisation de la structure des microgels pour de futurs travaux, les conditions testées ne sont pas les plus intéressantes pour répondre aux objectifs de la thèse. Elles n'ont donc pas été retenues pour être exploitées dans le chapitre final de combinaison de plusieurs leviers (Chapitre 8).

Chapitre 6 : Etude de l'interface

Les travaux menés sur les leviers liés à l'interface se sont focalisés sur les protéines sériques laitières et ce chapitre présente ces travaux, avec deux objectifs :

- Montrer l'intérêt de **modifier l'interface dans les yaourts brassés** `[Partie rédigée]`
- Comprendre **comment l'interface se structure** en fonction de l'état physico-chimique des protéines sériques et de la phase continue `[Partie basée sur article]`



6.1. Impact d'une modification de l'interface sur le yaourt brassé

La littérature en général et plus particulièrement les travaux de Cho et al. (1999) ont constitué un point de départ pour évaluer l'impact de l'interface sur le yaourt brassé riche en matière grasse. Des yaourts brassés modèles à 6% de matière grasse ont été fabriqués à l'échelle laboratoire à partir de crèmes *à façon*. Les crèmes *à façon* ont elles-mêmes été obtenues par l'émulsification de MGLA dans de l'eau purifiée contenant des protéines sériques soit natives (WPn) soit agrégées thermiquement (WPd) pour stabiliser l'interface. La Figure 77 reprend les grandes étapes de fabrication des yaourts brassés modèles et les protocoles sont détaillés en Chapitre 3 (p. 95-96).

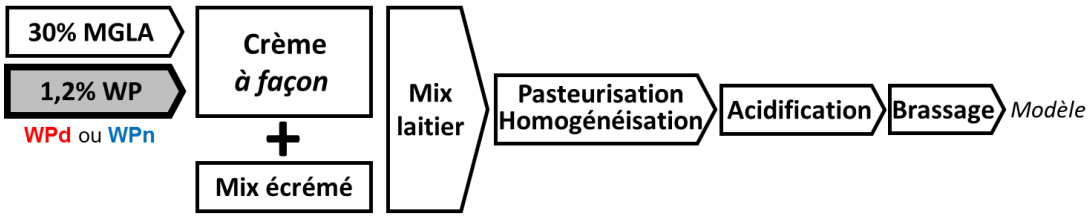


Figure 77 : Fabrication de yaourts brassés modèles avec différentes interfaces obtenues via la formulation de crèmes *à façon* à partir de MGLA et de WPn ou de WPd

Les propriétés rhéologiques des yaourts brassés modèles ont été mesurées à J+7 en utilisant le protocole rhéologique validé en Chapitre 4 et prenant en compte les conditions du processus oral (Chapitre 3, p. 91). La Figure 78 montre les résultats obtenus, avec G'_0 (module conservatif à 10°C et avant cisaillement), η_0 (viscosité à 10°C et au début du cisaillement à 60 s^{-1}), η_f (viscosité à 25°C et à la fin du cisaillement à 60 s^{-1}) et G'_f (module conservatif à 25°C obtenu après un cisaillement à 60 s^{-1}).

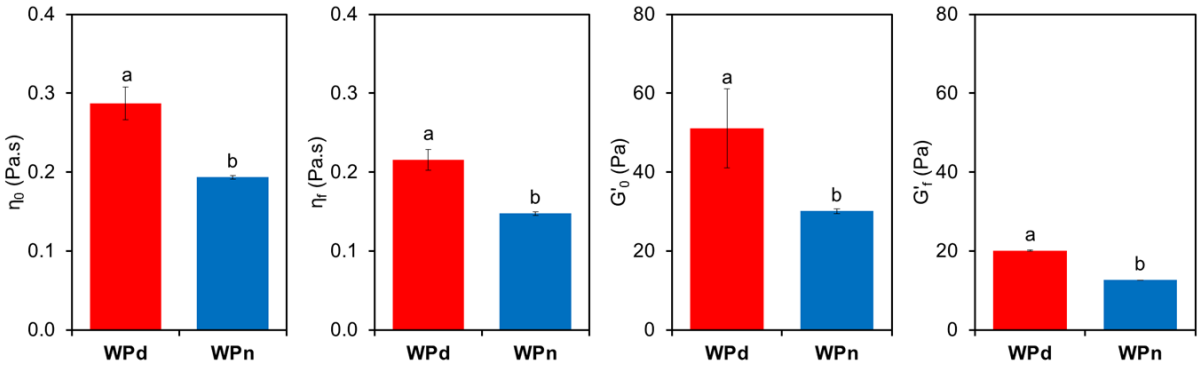


Figure 78 : Propriétés rhéologiques des yaourts brassés modèles avec des protéines sériques natives (WPn) ou agrégées thermiquement (WPd) à l'interface (les valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$) sont indiquées avec des lettres différentes)

La composition de l'interface a un impact sur les propriétés rhéologiques des yaourts brassés modèles. Lorsque l'interface est composée de protéines sériques agrégées, les yaourts brassés modèles sont plus fermes (η_0, η_f, G'_0 et G'_f presque deux fois plus grands) que quand elle est composée de protéines sériques natives. La quantité maximale de protéines de la phase continue apportée par la crème a été estimée à environ 6-10% de la teneur totale en protéines dans les yaourts brassés (Chapitre 3, p. 95). Les effets observés peuvent donc être attribués aux protéines de l'interface et ils pourraient s'expliquer par des interactions plus fortes entre le réseau protéique et les globules gras lorsque les protéines sériques adsorbées à l'interface sont agrégées thermiquement (Liu et al., 2015; Sala et al., 2007). Ces résultats sont en accord avec ce qui est montré par la littérature (Cho et al., 1999).

D'après la littérature, les interactions apparaissent majoritairement au cours de l'acidification, lors de la structuration de la matrice en un réseau tridimensionnel (Famelart et al., 2004; Lee and Lucey, 2010; Sodini et al., 2004). Afin de mettre en évidence l'impact des interactions entre le réseau protéique et les globules gras (via l'interface) sur les propriétés rhéologiques des yaourts brassés, plusieurs yaourts brassés modèles ont été fabriqués en modifiant le moment d'incorporation de la crème. Au préalable, des crèmes *à façon* ont été fabriquées à partir de MGLA émulsifiée dans de l'eau purifiée contenant de protéines sériques agrégées pour stabiliser l'interface (Figure 79).

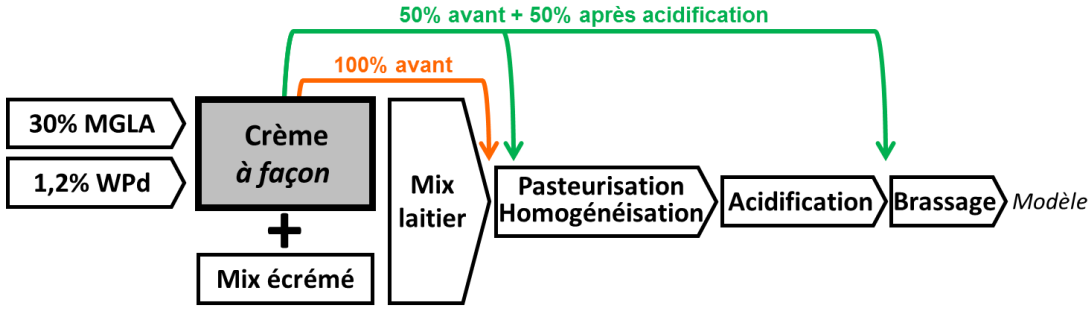


Figure 79 : Fabrication de yaourts brassés modèles avec différents moments d'incorporation de la crème (100% avant *ou* 50% avant + 50% après) pour mettre en évidence l'impact du degré d'interaction entre l'interface et le réseau protéique (protocoles détaillés en Chapitre 3, p. 95 et 96)

Les propriétés rhéologiques des yaourts brassés modèles obtenus ont été mesurées à J+7 (Figure 80). Il y a une nette différence entre les yaourts dans lesquels 100% de la crème *à façon* ont été ajoutés avant acidification (interactions maximisées) et les yaourts dans lesquels 50% ont été ajoutés avant et 50% après acidification (moins de globules gras en interaction directe avec le réseau protéique via l'interface). Dans le cas où les interactions sont maximisées (100% avant), la texture des yaourts brassés modèle est plus ferme, avec des valeurs de η_0, η_f, G'_0 et G'_f deux fois plus grandes que lorsque les interactions sont plus faibles (50% avant + 50% après).

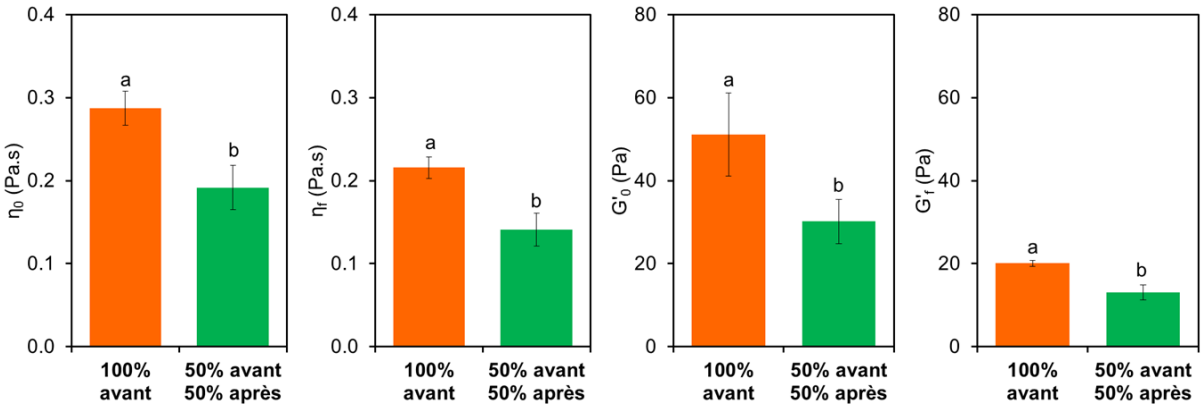


Figure 80 : Propriétés rhéologiques des yaourts brassés modèles avec un fort (100% avant) ou un plus faible (50% avant + 50% après) degré d'interaction entre l'interface et le réseau protéique (les valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$) sont indiquées avec des lettres différentes)

Il y a donc un lien entre les interactions du réseau protéique avec les globules gras, et les propriétés rhéologiques des yaourts brassés. Il semble possible de moduler ces interactions via l'état physico-chimique des protéines sériques adsorbées à l'interface.

Il a donc été intéressant de comprendre comment l'interface se structurait en fonction des propriétés physico-chimiques des protéines sériques afin de mieux expliquer les différences de degré d'interaction obtenues en fonction de l'état physico-chimique des protéines sériques.

6.2. Structuration de l'interface [ARTICLE]

L'état de l'art a montré que l'adsorption et l'organisation des protéines laitières à l'interface variaient en fonction de leur état et des conditions physico-chimiques du milieu, avec pour conséquence des structures d'émulsions différentes. Pour étudier l'impact de l'état physico-chimique des protéines sériques sur la structuration de l'interface, des solutions de protéines sériques (dans de l'eau purifiée ou du perméat) ont été traitées par différents procédés dénaturants. Les propriétés interfaciales des protéines sériques et leur capacité à former et structurer des émulsions ont ensuite été étudiées. Ces travaux ont donné lieu à un article.

Cet article est publié dans *Food Hydrocolloids* (*https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.052*)

Multi-scale understanding of the effects of the solvent and process on whey protein emulsifying properties: Application to dairy emulsion

Marine Moussier[a], Véronique Bosc[a], Camille Michon[a], Violaine Pistre[b], Cyril Chaudemanche[b], Delphine Huc-Mathis[a]
[a] *Ingénierie Procédés Aliments, Inra, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 91300 Massy, France*
[b] *Vienne Technical Center, Yoplait/General Mills, Chemin des Mines, 38200 Vienne, France*

Abstract

The combined effects of solvent and processing on whey protein isolate (WPI) emulsifying properties were investigated using a multi-scale approach in realistic conditions. WPI was solubilized in purified water or permeate then no treated, heat treated, mechanically treated (rotor/stator-sonication) or treated by dynamic pressure (16, 100, 350 MPa). Afterward, the treated WPI solutions were used to make emulsions. The approach revealed links between physico-chemical and interfacial properties of the WPI, and the final structure of the resulting emulsions. As expected, the heat treatment caused great changes, with the aggregation of the proteins and the increase in the exposure of hydrophobic zones of the aggregates. The high dynamic pressure of 350 MPa also led to changes in physico-chemical properties, but the mechanical treatment only caused few changes. The adsorption kinetics and reorganization of WPI at the interface depended on their aggregation state, hydrophobicity, ζ-potential and total free SH. All the non-aggregated WPI adsorbed as a thick film at the oil/water interface except the ones treated at 350 MPa, which adsorbed as a thinner film. The sample treated at 100 MPa might have the most close-packed interfacial film, with the highest amount of protein loaded. When aggregated, the whey proteins needed more time to adsorb at the interface and few reorganized once adsorbed. The final interfacial elasticity was higher in water than in permeate. Depending on the solvent, heating and pressure, the variety of physico-chemical properties obtained resulted in different emulsion structures: stable, more or less aggregated or slightly coalesced. A diagram based on the solvent and processing effects was proposed to link organizations at the three studied scales.

Keywords: Physico-chemical properties, heat treatment, high pressure, structure, interfacial properties, rheology.

Highlights

- WPI emulsifying properties are investigated as a function of process and solvent.
- Rotor-stator/sonication causes little changes in WPI physical-chemical properties.
- Dynamic HP (350 MPa) decreases the protein loading and interfacial elasticity.
- Surface pressure and elasticity strongly decrease in permeate compared to water.
- Several emulsion structures are generated and summarized as a multi-scale scheme.

1. Introduction

Whey proteins isolates (WPI) are obtained from dairy co-products through well optimized chains of a sustainable manufacturing. There are widely used in bakery, beverage and dairy industries because they are versatile ingredient with interesting nutritional, gelling, foaming and emulsifying properties (Ramos et al., 2016). In particular, they can be used as an innovative texture ingredient or fat replacer (Smithers, 2015). The term 'whey proteins' (WP) covers all soluble milk proteins, the main ones being β-lactoglobulin (β-LG) (≈ 50 %), α-lactalbumin (α-LA) (≈ 25 %), bovine serum albumin (≈ 10 %), immunoglobulin (≈ 10 %) and lactoferrin (≈ 5 %). When native, they are 5 nm globular proteins with an average isoelectric point around 5 (Singh et al., 2014). The β-LG conformation and its denaturation upon physical or chemical treatments has been widely studied. However, to be sustainable and cost-effective at industrial scale, it is more interesting to use raw ingredients such as WPI, rather than purified β-LG.

WP can be used as an emulsifier with different types of fat and after different pre- and post-treatments. In the case of oil in water (O/W) dairy emulsions, milk fat droplets are dispersed in permeate containing lactose, minerals, soluble whey proteins and caseins in suspension. During processing, dairy emulsions undergo thermo-mechanical treatments depending on the scale (laboratory, pilot, industrial) and the target properties (size distribution of fat droplets, stability). At the interface, the native membrane containing various compounds including mono and diglycerides is partially replaced by whey proteins and caseins during the processing of dairy products. Plenty of studies showed that process and solvent influence the emulsifying properties of WPI and the structure of the emulsions they formed. Overall, the effects of lactose (1-20 %), shearing and heat treatment on the denaturation and the aggregation of whey protein concentrate (WPC) are well known (Spiegel, 1999). The impact of sonication is currently the subject of an increasing number of studies and its impact (34 $W.cm^{-2}$, 2 min) on the size, conformation, hydrodynamic radius and emulsifying properties of WPI (0.1-5 % in water) has been demonstrated (O'Sullivan et al., 2014). Although few studies have been conducted on dynamic high pressure, the impact of pressures up to 300 MPa on the physico-chemical and functional properties (solubility, foam stability, air in water interfacial properties) of WPI (3%) solubilized in deionized water have been established (Bouaouina et al., 2006). The competition between milk proteins and low molecular weight emulsifiers at the interface has been demonstrated as well has the impact of the dispersed phase composition (type of fat and interface) on the size distribution of fat droplets and the rheological properties of the emulsion (Granger et al., 2005). The interfacial composition in α-LA and β-LG and the flocculation of emulsions made from WPI (20% soybean oil) has been thoroughly investigated as a function of NaCl content and heat treatment (Ye, 2010). The impact of both pH (4-6) and NaCl content on the structure and properties of corn oil emulsion (flocculation, viscosity, stability) made from WPI has also been demonstrated (Demetriades et al., 1997).

Most existing studies worked on the impact of either composition or process. They sometimes combined the two, but with only one type of process or one composition factor. The majority of them investigated the properties at one or two scales. None used a multi-scale approach to understand the links between the WPI properties and their functions in dairy emulsion systems. In addition, most of them used simplified solvents (purified water or controlled salt solution) whereas the impact of the factors of composition and their interactions are essential to understand mechanisms. Moreover, the comparison of different processes have rarely been studied, despite the fact they are known to generate a variety of different physico-chemical properties.

The aim of the present study was thus to understand the combined effect of solvent and different processes on the emulsifying properties of WPI and, as a consequence, on its ability to stabilize emulsions. An innovative multi-scale approach was used in realistic conditions of process and solvent through three characteristic scales. At nanoscale, the physico-chemical properties of the protein (average size diameter, ζ-potential, surface hydrophobicity index, amount of total free thiols) were investigated using different complementary techniques. At microscale, the adsorption and reorganization of proteins at the interface were monitored and interpreted using the results obtained at nanoscale. Finally, emulsion structures were characterized in the range of 1 to 20 µm and interpreted using the results obtained at smaller scales.

2. Material and methods

2.1. Raw materials

Purified water was obtained using a Milli-Q purification system (Millipore, Merck, Germany), with a conductivity of 6.6×10^{-5} S.m^{-1}. The oleic fraction of anhydrous milk fat (olein) (low fusion temperature 7-14 °C, 9.0×10^5 density (ρ_{olein}, g.m^{-3})) was kindly provided by Beuralia (Sodiaal, Quimper, France). The lactose was purchased from Thermo Fisher Scientific (Villebon sur Yvette, France) and the NaCl salt from Sea salt (France). Commercial WPI (80.5 wt% WP of which 99.4 % native, 9.7 wt% caseins, 3.0 wt% lactose max., 3.0 wt% mineral matter with 300 mg/100g Ca^{2+}, 3.8-6 wt% water) was purchased from Lactalis (Laval, France). Whey permeate (permeate) (0.29 wt% WP of which 41.1 % native, 0.008 wt% caseins, 5.6 wt% lactose, 0.6 wt% mineral matter with 34 mg/100g Ca^{2+}, 93.5 wt% water, 0.11 M ionic strength) was kindly provided by Yoplait (Le Mans, France). WPI and permeate were obtained from milk by membrane separation technique, *i.e.* without modifying the pH.

Table 5: Composition, treatment and naming of the samples

Sample	Solvent	Treatments		
		Heat (HT[3])	Pressure (PT[4])	Mechanical (RSS[5])
NAT[1]-H_2O	H_2O[2]	-	-	-
HT[3]-H_2O[2]	H_2O[2]	80°C for 30 min	-	-
NAT[1]	Permeate[6]	-	-	-
HT[3]	Permeate[6]	80°C for 30 min	-	-
RSS-H_2O[2]	H_2O[2]	-	-	Rotor/Stator + Sonication
HTRSS[3,5]-H_2O[2]	H_2O[2]	80°C for 30 min	-	Rotor/Stator + Sonication
RSS[5]	Permeate[6]	-	-	Rotor/Stator + Sonication
HTRSS[3,5]	Permeate[6]	80°C for 30 min	-	Rotor/Stator + Sonication
PT(16)[4]	Permeate[6]	-	16.3 MPa	-
PT(100)[4]	Permeate[6]	-	100 MPa	-
PT(350)[4]	Permeate[6]	-	350 MPa	-

Abbreviations: [1]NAT: native, [2]H_2O: purified water, [3]HT: heat-treated, [4]PT: pressure-treated, [5]RSS: Rotor/Stator + Sonication, [6]Permeate: whey permeate.

2.2. Processing of whey protein solutions and emulsions

Composition, preparation and treatment of whey protein solutions

Solutions of 1.7 wt% whey protein were prepared either at laboratory scale or at pilot scale. Lab scale solutions were made by dispersing WPI in either permeate or purified water under continuous stirring for 15 min at room temperature and then kept overnight at 8 °C to ensure proper hydration. Some of the solutions were heat treated in a thermostatically controlled water bath at 80 °C for 30 min. Some others were treated using a lab scale emulsification process: Polytron PT 3100 D rotor/stator (PTG 36/4 probe, Kinematica AG, Switzerland) at 15,000 rpm for 5 min and VCX 130 sonication (13 mm probe, Sonic & Materials, UK) at 130 W for 15 effective min (pulses of 10/10 s active/blank cycles). The temperature was controlled to always keep it below the limit of denaturation of whey proteins (65 °C). Pilot scale solutions were prepared by dispersing WPI in permeate using a Rayneri (VMI, France) dispersing system for 15 min. The solutions were then treated with dynamic high pressures (16.3, 100 or 350 MPa) at temperatures maintained below 70 °C. Treatment and solvent conditions are listed in Table 5.

Preparation of emulsion

Oil-in-water emulsion with 30 wt% fat was prepared with selected whey protein solutions (1.2 wt% final protein concentration in emulsions). Olein was melted in a thermostatically controlled water bath at 60 °C before emulsification. The whey protein solution was tempered at room temperature. Pre-homogenization was performed with a Polytron PT 3100 D rotor/stator (PTG 36/4 probe, Kinematica AG, Switzerland) at 15,000 rpm for 5 min. The resulting coarse emulsion was immediately treated with a VCX 130 sonication (13MM probe, Sonic & Materials, UK) at 130 W for 15 effective min (10 s pulses) in order to produce a fine emulsion. The temperature was maintained below the whey protein denaturation temperature (65 °C).

2.3. Determination of particle type and size

Protein size estimation

The protein sizes of the WPI solutions were first measured by dynamic light scattering (DLS), which is the reference method in this case. Fig. 11 shows the

results obtained for permeate and untreated WPI (*i.e.* native) in purified water (NAT-H_2O) and in permeate (NAT). Permeate and WPI contained residues of caseins. The size distributions shown in Fig. 11 indicate that permeate contained residues of casein micelles and probably WP aggregates, whereas WPI contained residues of non-micellar caseins. They also clearly show that the presence of residual big particles in permeate hindered any detection of the many small native proteins. The protein size measurement by DLS was therefore biased by the polydispersity conditions, which in accordance with the literature (Tomaszewska et al., 2013). For this reason, it was chosen to use turbidity measurement to estimate the size orders of magnitude while limiting bias due to sample polydispersity (Melik and Fogler, 1983). For each WPI solution, the absorbance at 600 nm was measured using a Varian Cary 100 spectrophotometer (Agilent Technologies, USA) (3 repetitions), as an indicator of the turbidity (Shen et al., 2017). Absorbance was checked to be in the Beer-Lambert linear conditions.

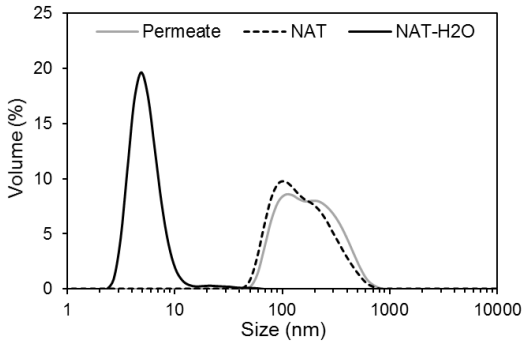


Fig. 11: Protein size distributions measured by DLS for permeate, native WPI in purified water (NAT-H_2O) and native WPI in permeate (NAT). Average values from three repetitions, with a maximum standard deviation of ± 1 nm for small proteins (NAT-H_2O) and of ± 10 nm for big proteins (Permeate, NAT)

Fat droplet size distribution

The size distribution of fat droplets was measured with a MasterSizer 2000 (Malvern Instruments, UK), based on the laser diffraction principle (1.33 RI for water used as dispersant, 1.47 RI for milk fat). Samples were diluted 1:10 either with purified water (H_2O) or with 1 wt% sodium dodecyl sulfate (SDS) solution. The SDS was used to break up the potential fat droplet aggregates. Given that all the size distributions obtained were monomodal, the median diameter (d(0.5), µm) is characteristic. The span, representing the dispersion of the size distribution, was also calculated:

$$span = \left(\frac{d(0.9) - d(0.1)}{d(0.5)}\right) \qquad \text{Equation 11}$$

In parallel, emulsions were diluted 1:10 and three snapshots per sample were taken using a MZ6 light microscope (Leica, Germany) at a magnification of × 50.

2.4. ζ-potential measurement

ζ-potential was measured with the Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) (3 repetitions). For samples of WPI solutions, the obtained electrophoretic mobility was automatically converted into ζ-potential by Zetasizer Software 7.03 based on the Henry equation (Malvern Instruments, UK). The WPI solutions were not diluted whereas the emulsion samples were diluted 1:1000 with purified water.

2.5. Determination of the surface hydrophobicity index

The surface hydrophobicity index of the whey protein samples was determined using 8-anilino-1-naphtalene sulfonic (ANS), a method as described by Shen et al. (2017). Each sample was diluted in a phosphate buffer (50 mM, pH 6.8) to obtain protein concentrations ranging from 0.002 to 1.7 wt%. Then 20 µl of ANS reagent (8 mM ANS acid in phosphate buffer, pH 6.8) was added to 4 ml of each diluted solution. Immediately after the addition of ANS reagent, the fluorescence of each sample was measured with a Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer (Agilent Technologies, USA). Measurements were performed with excitation at 390 nm and emission at 480 nm. The RFI was calculated for each concentration as $\left(\frac{F-F_0}{F_0}\right)$, where F is the measured fluorescence and F_0 is the blank fluorescence (ANS reagent in phosphate buffer with no whey protein). The surface hydrophobicity index (SHI) of a whey protein solution corresponded to the initial slope of RFI plotted against protein concentrations. Three repetitions were performed for each sample.

2.6. Determination of total free thiol groups (SH)

The total free thiol (SH) groups were determined using Ellman's method as described by Shen et al. (2017) and Segat et al. (2014). To measure total free SH content, 0.5 ml of whey protein solution were

added to 2.5 ml of Tris-glycine (86 mM Tris, 90 mM glycine, 4 mM EDTA, pH 8.0) containing 8 M urea. Next, 20 µl of Ellman's reagent (4 mg.ml^{-1} DNTB in Tris-glycine buffer) were added to the whey protein solution previously diluted in buffer. The resulting solution was incubated for 15 min at room temperature. Optical density was measured by absorbance at 412 nm (A_{412}) with a Varian Cary 100 spectrophotometer (Agilent Technologies, USA) (3 repetitions). The concentration of total free thiol groups (µmol SH.g^{-1}) was calculated from the following equation:

$$[\mathrm{SH}]_{(\mu\mathrm{mol\ SH.g^{-1}})} = \frac{73.53 \times A_{412} \times d}{C} \quad \text{Equation 12}$$

where A_{412} is absorbance at 412 nm, d is the dilution factor, C is the concentration of whey protein solution (mg.ml^{-1}) and 73.53 is Ellman's constant (M^{-1}.cm^{-1}) derived from $10^6/(1.36\times10^4)$ (1.36×10^4, the molar absorptivity constant) (Ellman, 1959).

2.7. Interfacial properties

Surface tension measurement

The surface tension (σ, mN.m^{-1}) was measured in static mode using the Tracker tensiometer (Teclis, Tassin, France). Measurements were performed in a rising mode with an 18 µl olein droplet. Measurements were performed in triplicate over 10,000 s and the temperature was set at 25 ± 1 °C. The olein droplet was blown from a Teflon syringe into whey protein solution samples poured in a glass cuvette. Whey protein samples were 1:1000 diluted either with purified water (NAT-H_2O, HT-H_2O) or in model-permeate (6 wt% lactose, 0.1 M NaCl) (NAT, HT, RSS, PT(100), PT(350)). The Bond number was always higher than 0.2, meaning that the droplets displayed the required Laplacian profile. For each measurement, the surface pressure (π, mN.m^{-1}) was calculated from the surface tension measured as $\pi(t) = \sigma_0 - \sigma(t)$, where σ_0 is the initial surface tension. It was checked that the solvent (NaCl-Lactose or H_2O) had no impact on surface pressure kinetics.

Measurement of surface viscoelasticity

Surface tension measurements were also performed in dynamic mode using the same Tracker tensiometer (Teclis, Tassin, France). The measurements were based on axisymmetric drop shape analysis at the oil/water interface. They were performed in triplicate using olein droplets with a reference area set at 31 mm² (corresponding to a volume of 18 µl). Oscillations were performed during the global surface tension kinetics using a 10 s period and a 5 % deformation amplitude. These conditions were chosen in order to carry out the measurement in the linear domain. After 10 s, three active cycles were acquired (duration 30 s), followed by six blank cycles (60 s), throughout monitoring kinetics (10,000 s). The real part of the surface dilatational modulus (E = E' + i E'', mN.m^{-1}) was obtained for each active cycle. For each group of three active cycles, the dilatational storage modulus (E', mN.m^{-1}) was calculated by averaging the real parts of these three active cycles.

2.8. Quantification of protein loading

The protein content at the surface of the fat droplet was determined by using the Kjeldahl method (AOAC, 1974, N×6.38) (C_{prot}, mg.100g^{-1}). The emulsions were centrifuged twice (14,239 × *g*, 25 min, 20° C) in order to remove all proteins that were not part of the interface. At the end of the first centrifugation cycle, the continuous phase was carefully removed from the tube. Purified water was then added to the dispersed phase and carefully homogenized before the second centrifugation. Protein loading (Γ, mg.m^{-2}) (Equation 13) was calculated by combining the protein content at the fat droplet surface (C_{prot}, mg.100g^{-1}), the number of fat droplets contained in 100 g ($\mathcal{N}_{100\,g}$) (Equation 14) and the surface area of an individual fat droplet ($S_{fat\ droplet}$, m²) (Equation 15). $\mathcal{N}_{100\ g}$ and $S_{fat\ droplet}$ were approximated from the olein density (ρ, g.m^{-3}) and the diameter of an individual fat droplets ($d(0.5)_{SDS}$, µm).

$$\Gamma = \frac{C_{prot}}{\mathcal{N}_{100\,g} \times S_{fat\ droplet}} \quad \text{Equation 13}$$

$$\mathcal{N}_{100\,g} = \frac{100\ g}{\frac{4}{3}\pi\left(\frac{d(0.5)_{SDS}}{2}\right)^3 \times \rho_{olein}} \quad \text{Equation 14}$$

$$S_{fat\ droplet} = 4\pi\left(\frac{d(0.5)_{SDS}}{2}\right)^2 \quad \text{Equation 15}$$

2.9. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using XLSTAT 2015.1 software (Addinsoft, Paris, France). Analysis of variance (ANOVA) was performed to evaluate differences between average values using Tuckey's test. A significance level of $p < 0.05$ was used. Principal component analysis (PCA) was used to analyze links between variables.

3. Results and discussion

3.1. Physico-chemical properties of WPI from nano to submicron scale

Complementary techniques were used to characterize the impact of several thermo-mechanical treatments on WPI samples. Results are reported in Fig. 12.

Fig. 12 A shows the order of magnitude of the protein sizes through the absorbance values of the WPI solutions measured at 600 nm (turbidity indicator). Three main groups can be distinguished on the basis of protein size. The group of small-sized proteins included all the pressure treated proteins (PT(16), PT(100), PT(350)) and the native proteins in water (NAT-H_2O), whereas the group of medium-sized proteins included all the RSS treated ones (RSS-H_2O, RSS) and the native ones in permeate (NAT). The group of larger proteins corresponded to all the heat-treated WPI (HT-H_2O, HTRSS-H_2O, HT, HTRSS). Compared to the size of native proteins measured in water (NAT-H_2O), traces of casein micelles and aggregated whey proteins would be expected to cause overestimation of the major protein size (*i.e.* native WP) in permeate (NAT). The decrease in size obtained with high pressure is consistent with the results reported in the literature and can be explained by a high pressure disruption of the casein micelles (Bouaouina et al., 2006; Cadesky et al., 2017). Some local overheating was measured during the RSS process and may explain the slight increase in size observed with some heat-aggregation. In addition, sonication is reported in the literature to slightly aggregate whey proteins (Shen et al., 2017) and to disrupt casein micelles (O'Sullivan et al., 2014). Since the disruption of casein micelles should happen in permeate, it may explain why the RSS process increases the size less than in water. The bigger sizes measured of heat-treated proteins indicate their aggregation. This is in complete agreement with the well-documented literature on the heat-aggregation of the proteins (Wijayanti et al., 2014). The aggregation phenomenon was stronger in permeate, which can be explained in several ways. The higher ionic strength and the presence of Ca^{2+} in permeate result in a screening of the electrostatic repulsion and a bridging between proteins (Nicolai, 2016). The presence of sugar is also known to strengthen the aggregation by increasing protein-protein hydrophobic interactions (Semenova et al., 2002) and the presence of traces of caseins (including micelles) in permeate can lead to the formation of bigger aggregates through bindings between whey proteins and κ-caseins (L. Donato and Guyomarc'h, 2009).

In all the experiments conducted for the present study, the maximum level of residual caseins was estimated at 10 % (90 % whey protein). Due to the measurement method, they had an impact on the sizes. Nevertheless, the impact of these traces of caseins on the rest of the properties was very small and they are disregarded in the rest of this paper.

The surface hydrophobicity indexes fall into two groups (Fig. 12 B). All heat treated proteins had surface hydrophobicity indexes of around 10^5 whatever the solvent (HT-H_2O, HTRSS-H_2O, HT, HTRSS). Non-heat-treated proteins (NAT-H_2O, RSS-H_2O, NAT, RSS, PT(16), PT(100)) had surface hydrophobicity indexes of around 4×10^4 with PT(350), which had an even smaller surface hydrophobicity index (2.5×10^4). Surface hydrophobicity was thus mainly driven by heat treatment. A small additional effect was obtained with high pressure treatment (350 MPa). Heat-induced aggregates were 10 times larger than individual native proteins while at the same time their surface hydrophobicity index was only multiplied by 3 or 4. Although heat treatment forces exposure of more hydrophobic zones, the vast majority of these zones are involved in the formation of aggregates with hydrophobic cores (Shen et al., 2017). The small effect of pressure at 350 MPa also implies that conformation changes take place. El-Salam, El-Shibiny, & Salem (2009) reported a threshold of 300 MPa above which any changes induced in WP are irreversible. Unlike the results shown in Fig. 12 B, one study found that 300 MPa pressure caused a slight increase in WP surface hydrophobicity by causing their unfolding (Bouaouina et al., 2006). However, in that study, WP were solubilized in purified water, which involved lower electrostatic repulsions and hence different changes in physico-chemical properties.

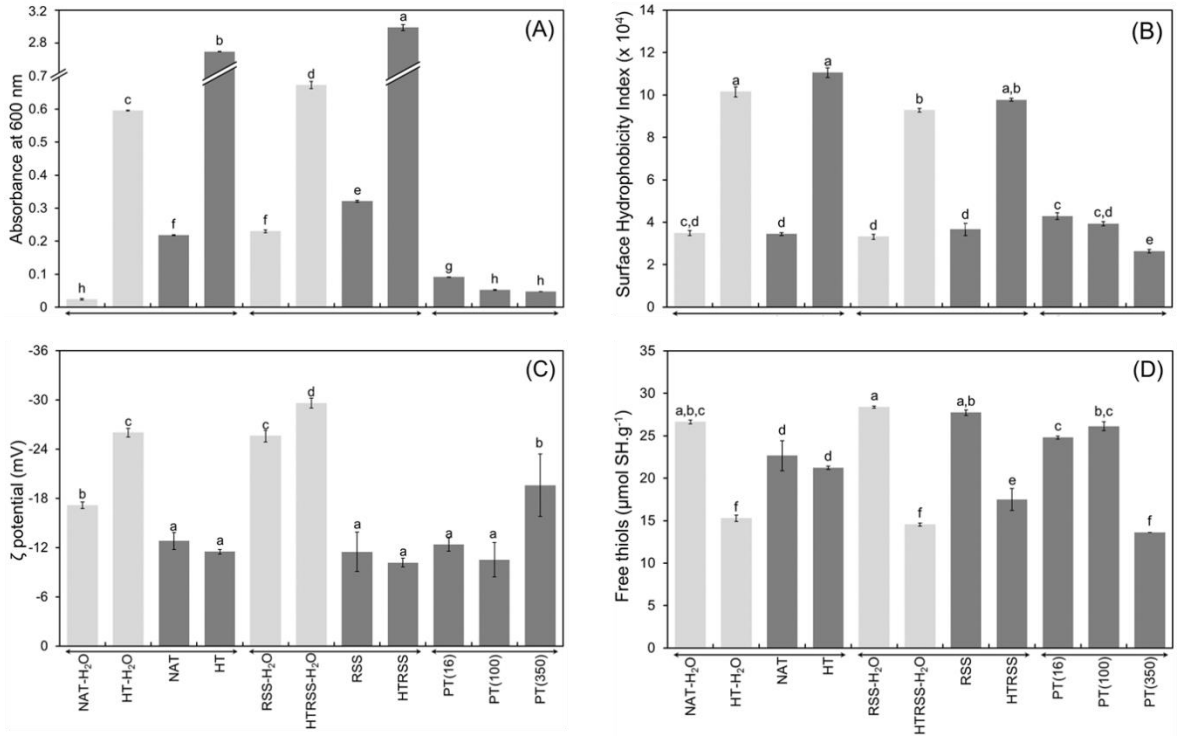


Fig. 12: Effects of solvent and thermo-mechanical treatments on the physico-chemical characteristics of WPI proteins: (**A**) Size order of magnitude through absorbance at 600 nm (turbidity), (**B**) Surface hydrophobicity index, (**C**) ζ-potential, (**D**) Total free thiols. Pale gray bars ( ) represent samples in H_2O and dark gray bars (■) samples in permeate. Values with different letters are significantly ($p < 0.05$) different

Regarding ζ-potential, the proteins solubilized and treated in water (HT-H_2O, RSS-H_2O, HTRSS-H_2O) showed the highest ζ-potential values (Fig. 12C). In addition to PT(350), native proteins in water (NAT-H_2O) had intermediate ζ-potential values. All the other proteins solubilized in permeate (NAT, HT, RSS, HTRSS, PT(16), PT(100)) had the lowest ζ-potential values. The composition of the solvent thus had the main effect, and the effect of high pressure (350 MPa) was secondary. The decrease in the absolute value of ζ- in permeate can be explained by the screening of negative charges on proteins, in particular by Ca^{2+}, which specifically interacts with α-LA and β-LG. In water, the rotor/stator/sonication effects are in accordance with effects reported in the literature (Shen et al., 2017).

Fig. 12 D shows that there were several groups of concentrations of total free thiols. NAT-H_2O, RSS-H_2O, RSS, PT(16) and PT(100) had the highest concentrations, ranging from 25 to 30 µmol $SH.g^{-1}$. NAT and HT had a concentration of around 20-25 µmol $SH.g^{-1}$. Finally, HTRSS-H_2O, HT-H_2O, HT-RSS and PT(350) all had a concentration below 20 µmol $SH.g^{-1}$. The decrease in total free SH is representative of changes in protein functionality, since it varies with the formation of intra- and inter- protein S-S bridges. The effect of heat treatment was significant in water, indicating that aggregation occurred through the formation of S-S bridges. In permeate, the heat treatment had little effect, indicating that aggregation did not take place through S-S bridges. Values in water and permeate differed significantly but their total free thiol levels remained close. These results also indicate that rotor/stator/sonication (RSS) had little effect on the physico-chemical properties of the proteins. Compared to native WPI samples, the pressure of 100 MPa caused a slight increase in total free SH, while at 350 MPa it caused a sharp decrease. This implies that 350 MPa pressure causes changes in conformation.

To objectivize the effect of the different treatments on the physico-chemical properties, a principal component analysis (PCA) was plotted (Fig. 13). The selected 2D projection shows more than 87 % of the total information. Samples are well distributed on the map (Fig. 13 A) indicating that a wide range of physico-chemical properties was generated by the treatments applied. Native and RSS samples are grouped on the map, meaning that RSS has little impact on protein properties. The most significant changes were caused either by the high pressure of 350 MPa or by the heat treatment. The correlation circle (Fig. 13 B) shows the physico-chemical properties. They are well distributed over

the correlation circle, meaning that they are well represented and can be interpreted. Aggregation occurred through hydrophobic interactions and the formation of disulfide bridges. Except for the PT(350) sample, the ζ-potential depended mainly on the solvent (water or permeate), independently of aggregation. Aggregation and surface hydrophobicity mainly depended on the heat treatment. The total free thiol content depended on both heat treatment and pressure (350 MPa). Given the distribution of the samples on the map (Fig. 13 A), some (NAT, RSS, PT(100), PT(350), HT, NAT-H_2O, HT-H_2O) were selected from each group to be studied for a more detailed study of the effect of the physico-chemical properties, at higher scales.

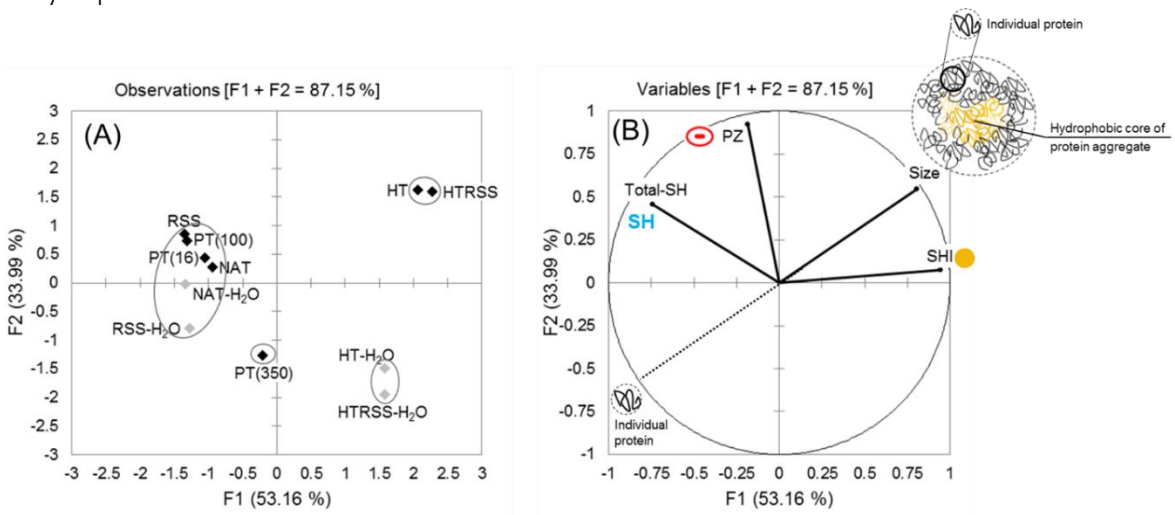


Fig. 13: (**A**) Principal component map of H_2O (♦) and permeate (♦) samples. Different groups of samples are symbolized by grey circles; (**B**) Correlation circle of physico-chemical properties with schematic representations of aggregated protein, an individual protein macromolecule and the symbols used below to represent free thiol groups (**SH**), surface hydrophobicity (●) and protein charge (⊖). These schemas will be used with the other results to represent the interfacial mechanisms

3.2. WPI interfacial properties at mesoscale

Fig. 14 shows the effects of solvent and heat treatment on interfacial properties (NAT, NAT-H_2O, HT, HT-H_2O samples) through the surface pressure kinetics (Fig. 14 A) and the changes in the storage module (E') versus surface pressure (π) (Fig. 14 B). First of all, the four curves presented in Fig. 14 A follows the same type of kinetics. Initially, the surface pressures started at zero and then began to increase after lag time of varying duration (T1). From a second characteristic time (T2), the surface pressures increased strongly and continuously until reaching a pseudo-equilibrium plateau. The literature indicates that the lag time is the time needed to unorderly cover the interface, the marked increase in surface pressure occurs during the interfacial reorganization of proteins and the adsorption of new ones, and the plateau is reached when the interface is structured, with possible relaxation and adsorption of multi-layers (Beverung et al., 1999).

Whatever the solvent, native proteins showed a shorter lag time (< 5 s) than aggregated ones (20 s). This was mainly due to the slower diffusion of bigger particles such as aggregates toward the interface (size effect). Moreover, at the same protein concentration, aggregated proteins had fewer entities than native proteins. However, in a purely diffusional adsorption model, the diffusion coefficient is related to both size and concentration. The probability that the aggregates would encounter the interface was therefore lower than for native proteins. In the same solvent, the increase in surface pressure from T2 was less steep for native proteins than for aggregated ones. This slope depends on both the surface activity of proteins and on their flexibility to reorganize at the interface, indicating that aggregated WPI had a better surface activity, even though they were less flexible. There were two sub-levels of final surface pressure depending on the solvent. The final surface pressure in water (≈ 8 $mN.m^{-1}$) was higher than that in permeate (≈ 5-6 $mN.m^{-1}$), indicating that the interface was better stabilized when WPI was in water than when it was in permeate. For the same type of oil (medium chain triglyceride oil), the order of magnitude of the final surface pressures obtained is consistent with that reported in the literature (Schröder et al., 2017). For the same type of treatment (native or aggregated

proteins) the slopes of the increase in surface pressure were steeper in water than in permeate (NAT-H_2O > NAT and HT-H_2O > HT). In permeate, the presence of ions influences the ability of proteins to adsorb and reorganize at the interface, probably by screening their charges and by modifying their solubility and hydrophobicity (Yano et al., 2016).
In addition, all the samples displayed a shoulder during the increase in their surface pressure. The changes in slope could be due to adsorption of different types of macromolecules (Huc-Mathis et al., 2017). The native proteins displayed a shoulder at about 4.4 mN.m^{-1} (450 s) in water and about 3 mN.m^{-1} (250 s) in permeate. As whey proteins are a mix of several proteins, at least two of them have different adsorption kinetics. These may be α-LA and β-LG whose proportions are the largest among WPI (Ye, 2010, 2008). The aggregated proteins (HT and HT-H_2O) displayed a slight shoulder at around 4.2 mN.m^{-1} (1,300 s). In this case too, two types of macromolecules adsorbed successively at the interface, possibly first residual native WP and then aggregates.

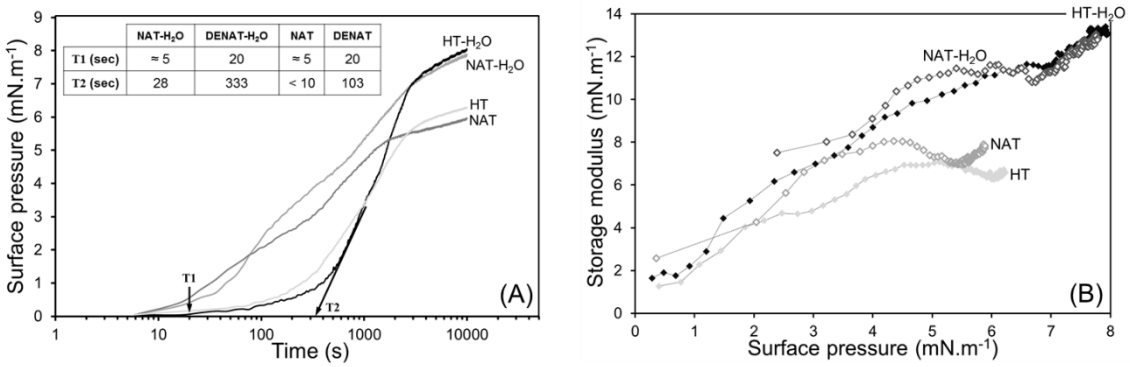


Fig. 14 : Evaluation of the effects of solvent (H_2O, permeate) and heat treatment (HT) on the interfacial properties; (**A**) Changes in the surface pressure (V = 18 µl, 25°C) for olein in whey protein solutions (dilution 1:1000). Average values from three repetitions, with a maximum reproducibility value of 0.613 mN.m^{-1} for all the solutions tested. Two characteristic times were determined: 1) T1, corresponding to the true lag time (when the value of the surface tension varied by more than 5% from its starting value); 2) T2, corresponding to the crossing of the x-axis by the tangent to the surface pressure first acceleration; (**B**) Changes in the storage modulus with surface pressure during oscillatory measurements of whey protein at the olein interface. Average values from three repetitions, with a reproducibility ranging from 0.001 to 2.18 mN.m^{-1} for all the solutions tested

Since the surface pressure increases with an increase in the concentration of proteins adsorbed at the interface, Fig. 14 B can be interpreted as changes in the interfacial storage modulus (E') versus the concentration of adsorbed protein (Domenek et al., 2008; Mezdour et al., 2008, 2007). When the surface pressure was low, the storage modulus started from a low level and increased to a maximum value at pseudo-equilibrium. There were two final levels of E' that were solvent dependent. The E' reached at pseudo-equilibrium was higher in water (≈ 13 mN.m^{-1}) than in permeate (≈ 6-8 mN.m^{-1}). It was therefore the solvent that strongly influenced the organization of the macromolecules at the interface at equilibrium. The increase in E' was higher for native proteins than for heat-induced aggregates. Protein aggregates behave like Pickering particles and little reorganization takes place at the interface (Destribats et al., 2014) whereas native WPI can undergo profound reorganization through conformation changes (Day et al., 2014). Depending on the composition of the solvent, the initial storage modulus levels of the native protein differed. In water, the E' value was immediately quite high (≈ 7.5 mN.m^{-1}), whereas in permeate, the initial value of E' was much lower (≈ 2.5 mN.m^{-1}). Unlike native proteins in permeate, the E' of native proteins in water continued to increase strongly until the end. This could mean that in water, the proteins adsorb themselves at the interface and unfolds, which leads to a high level of entanglement at equilibrium. On the contrary, the WP in permeate may adsorb at the interface in a more folded form leading to much less entanglement at equilibrium. In air in water system, the literature also showed that an increase in ionic strength causes a decrease in intra- and inter-protein electrostatic repulsion of WPI, thereby facilitating their flattening at the interface (Mahmoudi et al., 2010). Changes in the heat-treated protein storage modulus also depended on the composition of the solvent. In water, E' increased strongly and regularly whereas in permeate, E' increased less and varied

only slightly at the end. This suggests that in water, the proteins adsorbed at the interface reorganize easily, whereas in permeate, only part of the proteins reorganize slightly. Like with the aggregates obtained in permeate and water in the present study, Destribats et al. (2014) also found two modes of adsorption for whey protein microgels (4 wt%, 85°C, 30 min) depending on the presence of salt (0 or 150 mM NaCl). Almost complete adsorption of the particles was obtained when there was no salt, whereas in the presence of salt, only 50% of the particles adsorbed.

Fig. 15 shows the effect of the rotor/stator/sonication (RSS) and pressure treatments (PT) on the interfacial properties of the WPI in permeate. The changes in surface pressure with time in Fig. 15 A show the same trends as in Fig. 14 A. The PT(350), PT(100) and RSS curves are quite similar and display the same behavior as NAT sample. The two characteristic times (T1 and T2) did not differ either. Only the final surface pressure levels differed slightly with the RSS one around 5 $mN.m^{-1}$, the PT(100) one around 5.5 $mN.m^{-1}$, and both the PT(350) and NAT ones around 6 $mN.m^{-1}$. The interface was similarly stable with NAT, RSS, PT(100) and PT(350) samples. The diffusion, reorganization and protein concentration after interfacial saturation were also similar in the four samples.

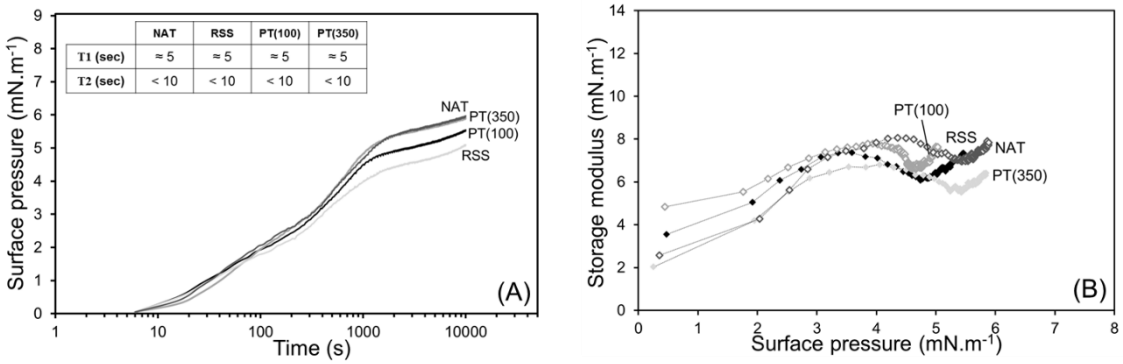


Fig. 15 : Evaluation of the effects of mechanical (RSS) and pressure treatments (PT) on the interfacial properties; (**A**) Changes in the surface pressure (V = 18 µl, 25°C) for olein in whey protein solutions (dilution 1:1000). Average values from three repetitions, with a maximum reproducibility value of 0.613 $mN.m^{-1}$ for all the solutions tested. Two characteristic times were determined: 1) T1, corresponding to the true lag time (when the value of the surface tension varied by more than 5% from its starting value); 2) T2, corresponding to the crossing of the x-axis by the tangent to the surface pressure first acceleration; (**B**) Changes in the storage modulus with surface pressure during oscillatory measurements of whey protein at the olein interface. Average values from three repetitions, with a reproducibility ranging from 0.001 to 2.18 $mN.m^{-1}$ for all the solutions tested

However, the changes in the viscoelastic properties of the interface differed depending on the emulsification process and the pressure intensity (Fig. 15 B). Two final E' levels are shown with the PT(350) one (6 $mN.m^{-1}$), lower than the PT(100), RSS and NAT ones (≈ 8 $mN.m^{-1}$), showing that the proteins were less entangled at the interface when processed at 350 MPa. Although the final levels of E' for the NAT, PT(100) and RSS were similar, their behavior differed during the absorption kinetics. Variations in the RSS storage modulus occurred earlier and more rapidly. NAT storage modulus varied less. PT(100) proteins reorganized more easily than other proteins and eventually become more strongly structured close to the equilibrium. The RSS proteins reorganize very rapidly and NAT proteins reorganize to a lesser extent. Proteins are known to form an elastic film due to their intra- and intermolecular interaction (electrostatic repulsions, hydrophobic interactions, S-S bridges) (Graham and Phillips, 1979). The observed differences may thus be due to differences in physico-chemical properties.

3.3. Emulsion structures observed in the 1 to 20 micron range

The lab scale process (RSS) was used to emulsify olein fat with NAT-H_2O, NAT, PT(100), PT(350), HT-H_2O and HT samples. Emulsion structures are shown in Fig. 16. The images were obtained by optical microscopy. Emulsions were characterized by their median droplet diameter in water and in SDS, the span of their droplet size distribution (Equation 11), their protein loading (Γ) and their ζ-potential (Table 6). Since the HT emulsion was strongly aggregated (Fig. 16), its data differed markedly from those of other emulsions. Thus HT properties were not taken into account in the ANOVA calculations.

The different emulsion structures in Fig. 16 show that the emulsification process does have an influence. The diameters of the droplets in the images show varying degrees of polydispersity depending on the quality of the solvent and on the processing conditions. In the same way, droplets may be spread out in the continuous phase or interconnected to form droplet aggregates of different sizes. The results grouped in Table 6 enable those differences to be quantified. Measured in water, the median diameters ranged from 2.1 to 70.4 µm. When they were measured in SDS, they were smaller, ranging from 0.7 and 11.5 µm, pointing to droplet aggregation. From d(0.5) measured in water, the calculated span ranged from 1.7 to 3.4, whereas in SDS, it ranged from 2.3 to 43.6. Protein loading indicates the amount of adsorbed proteins and ranged from 1.0 to 39.1 $mg.m^{-2}$. ζ-potential is linked to the emulsion stability and ranged from -21.3 and +7.2 mV. Their high standard deviations are due to the low stability of the emulsions resulting in some aggregation or coalescence.

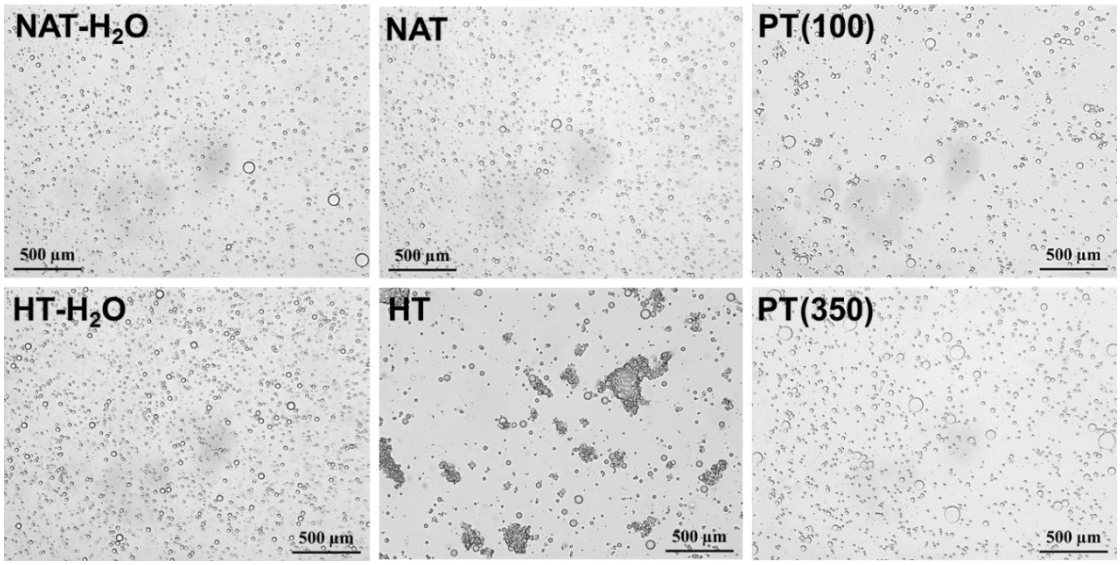


Fig. 16: Optical micrographs of emulsions stabilized with WPI samples. Magnification x 50 [RSS emulsification: *rotor/stator (15,000 rpm ; 5 min) and sonication (130 W ; 15 effective min ; pulses of 10 s intervals)*]

Whatever the composition of the solvent, the emulsion structures obtained with native WPI (NAT-H_2O, NAT) were similar, with small droplets, all of very similar sizes (Fig. 16). The median diameters of NAT-H_2O and NAT droplets measured in water were similar and ranged from 2.1 to 2.2 µm (Table 6). These sizes are typical of sizes reported in the literature, *i.e.* between 0.5 and 10 µm (Ye, 2008). Their spans measured in water were similar, between 1.8 and 2.4. The difference between the median diameters measured in water and in SDS was slightly bigger for NAT than for NAT-H_2O, suggesting the droplets aggregate more in permeate. Protein loadings were similar and ranged between 1.8 and 1.9 $mg.m^{-2}$, in good agreement with values reported in the literature (Cho et al., 1999; Raikos, 2010). The value of the ζ-potential of NAT-H_2O was -21.3 mV whereas that of NAT was -14.9 mV. This means that emulsions stabilized with native WP in water should be more stable over time than in permeate due to higher repulsion between adsorbed proteins. However the picture of NAT-H_2O and NAT in Fig. 16 reveals no obvious differences in droplet aggregation, so the differences must be small.

Like native WPI, proteins aggregated in water (HT-H_2O) produced an emulsion with small droplets very close in size, and little aggregation (Fig. 16). However, the difference between the median diameter of aggregated proteins measured in water and in SDS was bigger than for native ones, meaning more aggregation of droplets occurs when proteins are heat-aggregated (Table 6). The HT-H_2O ζ-potential was -7.3 mV, resulting in less repulsion, which is in good agreement with a higher level of droplet aggregation. In permeate, the emulsion obtained with aggregated WPI (HT) was polydispersed with strongly aggregated droplets, whose median diameter was 70.4 µm. This strong aggregation of the droplets is in good agreement with the results obtained by Chevalier & Bolzinger (2013), who showed that emulsions stabilized with particles can aggregate more easily, especially in presence of

salts. Γ was very high, with a value of 39.1 mg.m^{-2}. Destribats et al. (2014) showed that WP aggregates have more difficulty adsorbing at the interface in presence of salt (NaCl), so the value obtained here must be biased by the strong aggregation of the droplets.

Table 6: Structure and properties of emulsions made from 30 wt% olein and the different WPI solutions with RSS emulsification (*rotor/stator (15,000 rpm; 5 min) and sonication (130 W; 15 effective min; pulses of 10 s intervals)*. The values in the same row, having different letters, differ significantly ($p < 0.05$)

	NAT-H_2O	HT-H_2O	NAT	HT	PT(100)	PT(350)
d(0.5)[1] (µm) W[2]	2.1 ± 0.1^{c}	3.1 ± 0.2^{a}	2.2 ± 0.0^{b,c}	70.4 ± 10.6	2.4 ± 0.1^{b}	3.0 ± 0.7^{a}
d(0.5)[1] (µm) SDS[3]	1.5 ± 0.2^{a}	1.4 ± 0.2^{a}	1.1 ± 0.1^{b}	11.5 ± 4.8	1.3 ± 0.1^{a,b}	0.7 ± 0.1^{c}
Span W[2]	2.4 ± 1.0^{a}	1.8 ± 0.3^{a}	1.8 ± 0.0^{a}	3.4 ± 0.2	2.19 ± 0.4^{a}	1.7 ± 0.2^{a}
Span SDS[3]	2.7 ± 0.6^{b}	2.3 ± 0.2^{b}	2.8 ± 0.5^{a,b}	43.6 ± 20.6	2.3 ± 0.1^{b}	3.5 ± 0.2^{a}
Γ (mg.m^{-2})	1.8 ± 0.0^{a,b}	1.4 ± 0.8^{a,b}	1.9 ± 0.2^{a,b}	39.1 ± 6.9	2.1 ± 0.3^{a}	1.0 ± 0.1^{b}
ζ-potential (mV)	-21.3 ± 1.3^{c}	-7.3 ± 3.7^{a}	-14.9 ± 3.9^{b,c}	7.2 ± 2.5	-12.2 ± 4.9^{a,b}	-10.0 ± 9.3^{a,b}

Abbreviations: [1]d(0.5): median diameter of droplet size distribution, [2]W: measurement with 1:10 dilution of samples in purified water, [3]SDS: measurement with 1:10 dilution of samples in purified sodium dodecyl sulfate.

PT(100) emulsion also showed some aggregation but with only slight polydispersity of droplet size (Fig. 16). Γ was 2.1 mg.m^{-2}, which is slightly higher than with native whey proteins. Like native whey proteins, PT(100) ones may adsorb as a thick interfacial film, and are probably more closely packed. PT(350) emulsion had some bigger fat droplets with higher polydispersity than other emulsions (Fig. 16). With a protein loading of 1.0 mg.m^{-2}, the PT(350) whey proteins that stabilize fat droplets likely adsorb as a thinner film. The slight coalescence observed in PT(350) emulsion is consistent with the results obtained by Fredrick, Walstra, & Dewettinck (2010), who showed that if the interfacial film is too thin or the cross-linking of adsorbed protein is not strong enough, aggregation can lead to coalescence. Moreover, ζ-potential values of PT(350) and PT(100) ranged between -12.2 and -10.0 mV, meaning that because of lower protein repulsion, these emulsions are less stable than those formed with native WPI.

Compared with PCA mapping (Fig. 13), the groups of emulsions obtained based on their microstructure were not the same as the groups based on the physico-chemical properties of proteins. The structure and stability of the final emulsions highly depend on the adsorption and reorganization of proteins at the interface during emulsification. Moreover, depending on the interfacial close-packing, hydrophobicity of proteins, possible S-S interactions, electrostatic repulsions, the amount of proteins in the continuous phase and the presence of divalent cations (Ca^{2+}), adsorbed proteins can interact and lead to varying degrees of droplet aggregation (Lam and Nickerson, 2013; Surel et al., 2014).

3.4. Multi-scale organizations of processed WPI

Fig. 17 is a schematic representation of the different organizations observed at the three scales studied depending on the type of solvent and on the process. The figure interprets both the result and the hypotheses formulated. In water, due to the low concentration of ions that screen intra-protein electrostatic repulsions, the hydrodynamic volume of native proteins is most likely greater. When the native proteins adsorbed at the interface, they appeared to unfold, and then to become highly entangled. The resulting interfacial film combined with the strong electrostatic repulsion certainly explains the good stability of the resulting emulsion. In permeate, the native proteins should be more folded in on themselves due to the screening of their charges. In this case, they appeared to be less unfolded and less entangled at the interface. Even if the electrostatic repulsion was reduced in permeate compared to in water, the final emulsion was stable, certainly due to the interfacial film formed. The PT(100) proteins appeared to adsorb more at the interface. Given their high level of free SH, they may be able to create more inter- or intra-molecular S-S bridges. The resulting interfacial film is certainly more closely packed and thus forms a good barrier against coalescence. However, the film probably also facilitates mechanical anchoring of the fat droplets and hence more aggregation. The PT(350) proteins appeared to be less entangled at the interface. Although the electrostatic repulsion was quite high and the possibility of S-S bridging was low, the risk of coalescence was high because the interface formed is likely thinner and less resistant. In water, the heat

induced aggregates appeared to adsorb well and to form a thick interfacial film. Probably due to the very high electrostatic repulsion and the limited possibility of disulfide bridging, the resulting emulsion was stable. In permeate, the heat induced aggregates probably adsorbed less at the interface. In this case, the strong aggregation observed in the resulting emulsion may be explained by the mechanical anchoring of droplets covered by a thick interface, the low electrostatic repulsion and the high potential for the formation of disulfide bridges.

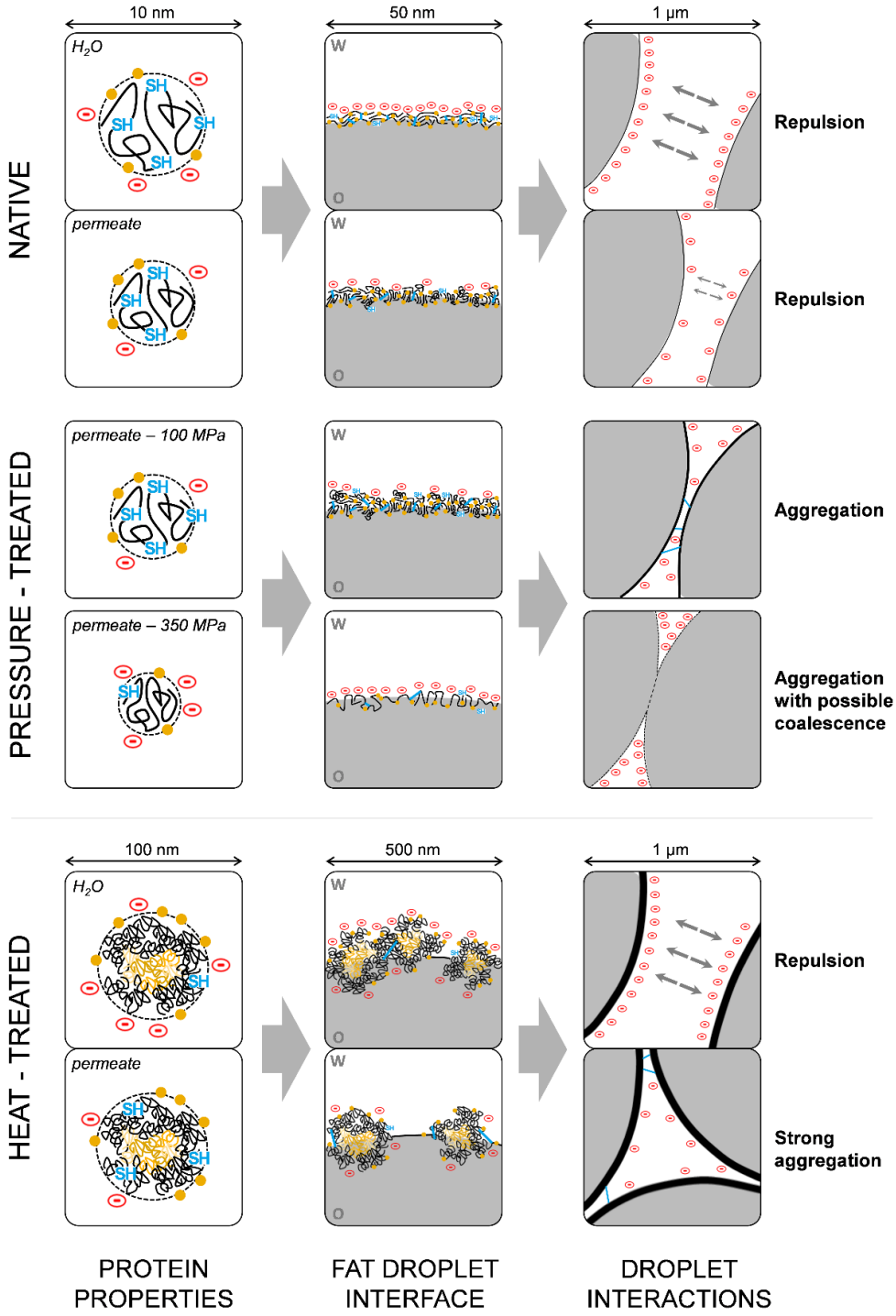


Fig. 17: Schematic representation of emulsions at different spatial scales and under different solvent and process conditions. Aggregated proteins scales (100 nm, 500 nm, 1 µm) are different from those of other proteins (10 nm, 50 nm, 1 µm). The WPI is shown with their differing properties of total free SH (SH), surface hydrophobicity (●), charge (⊖) and size. The individual and aggregated protein hydrodynamic volume is indicated by the dotted circles (- - -). Protein aggregates are represented with their hydrophobic core in yellow. The disulfide bridges are represented by a blue line (—).

4. Conclusions

The multi-scale approach presented here enables new interpretations of the WPI emulsifying properties that can be represented in a schematic diagram. These results highlight different interfacial organization and emulsion stabilization depending on the composition of the solvent and on processing conditions.

The study showed that the rotor/stator/sonication process had little effect on the emulsifying properties of whey proteins compared to the effect of the solvent composition, while high pressure and heat-treatment had a strong impact on the final structures of the protein and emulsion. As expected, heat treatment led to the biggest changes in physico-chemical properties with the aggregation of WPI, but high pressure also caused some changes in properties. At 100 MPa, slight changes increased total free SH, whereas at 350 MPa, both total free SH, surface hydrophobicity and charge were modified. The composition of the solvent and the resulting changes in the physico-chemical properties led to different adsorption kinetics and interfacial reorganization of whey proteins. The emulsions made with the differently treated WPI had various structures and interactions between droplets differed, depending on the thickness of the film, electrostatic repulsion and the possibility of disulfide bridging.

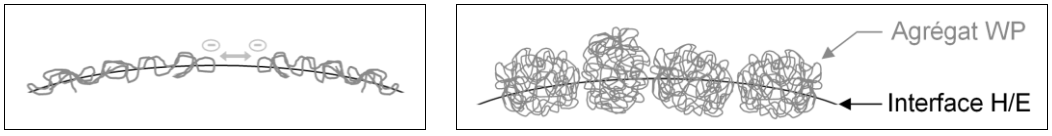
These results underline the importance of the effect of permeate and hence the limitations of working using water as a model. They also demonstrate the effects of using new techniques such as very high pressure.

Acknowledgements : The authors thank Mr. Bouchaib Marfouk (Yoplait, France) and Mr. Jonathan Nicolas (Yoplait, France) for their contribution and their technical help in obtaining whey permeate and processing whey proteins. The authors thank Stéphane Besançon (UMR GENIAL, France) for the time spent measuring ionic strengths. This work is sustained by Single Interministry Fund (France) through a collaborative R&D project certified by Vitagora and Valorial competitiveness clusters.

Autres pistes de réflexion (en complément des interprétations p. 163-165 – en lien avec le Table 6 et la Fig. 17)

La charge protéique de surface (Γ, mg.m^{-2}) obtenue avec des protéines sériques agrégées thermiquement dans du perméat (HT) était nettement plus élevée qu'avec des protéines sériques agrégées thermiquement dans de l'eau purifiée (HT-H_2O). Ceci a principalement été expliqué par le fait que les globules gras étaient fortement agrégés dans l'échantillon HT, et auraient ainsi piégé des agrégats protéiques non adsorbés entre eux – biaisant ensuite la mesure de la charge protéique de surface (séparation des globules gras de la phase continue par centrifugations puis mesure de la teneur en protéines par la méthode de Kjeldahl). D'après les travaux de thèse de Loiseleux (2017), la différence de charge protéique de surface entre les échantillons HT et HT-H_2O aurait également pu s'expliquer de la manière suivante :

- *Dans l'eau (HT-H_2O) : les agrégats obtenus étaient peu denses et se seraient étalés à l'interface (avec des répulsions électrostatiques), donnant ainsi une charge protéique de surface peu élevée ⟶ schéma (1)*
- *Dans le perméat (HT) : les agrégats obtenus étaient denses et se seraient moins étalés à l'interface (moins de répulsions électrostatiques), donnant ainsi une charge protéique de surface très élevée ⟶ schéma (2)*



(1) HT-H_2O (2) HT

Conclusions et messages clés du chapitre

Les protéines sériques de l'interface ne structurent pas le yaourt brassé de la même manière selon si elles sont natives ou si elles sont agrégées thermiquement. Il semblerait que les protéines sériques natives interagissent peu avec le réseau protéique au moment de la gélification. A l'inverse, les protéines sériques agrégées semblent interagir de manière plus importante avec le réseau protéique, donnant des yaourts brassés plus fermes. **L'état physico-chimique des protéines sériques adsorbées à l'interface** permet de moduler les **interactions entre le réseau protéique et les globules gras** et fait ainsi varier les **propriétés rhéologiques des yaourts brassés**.

Pour comprendre pourquoi les propriétés macroscopiques du yaourt brassé étaient différentes en fonction de l'état physico-chimique des protéines sériques, la **structuration de l'interface H/E a été étudiée en fonction des propriétés des protéines sériques**, via une étude **multi-échelle**. Les propriétés physico-chimiques des protéines sériques et de leur environnement (milieu) ont un impact sur :

- L'**adsorption** et l'**organisation** des protéines sériques à l'interface
- La **structure** et la **stabilité** des émulsions H/E

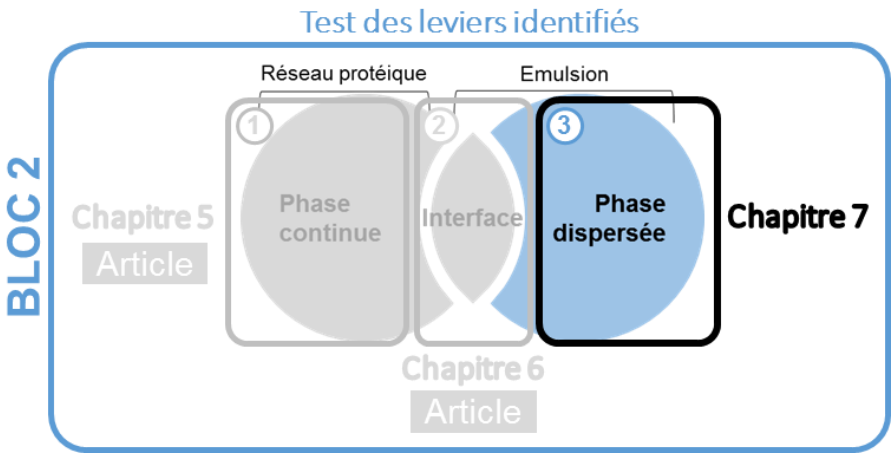
Ces travaux permettent de faire des **liens entre les différentes échelles, depuis les propriétés des protéines, jusqu'à la structure des émulsions**. Ils suggèrent également que la structuration de l'interface en fonction des propriétés physico-chimiques des protéines sériques et de leur environnement pourrait impacter la **répartition des globules gras au sein du réseau protéique** (plus ou moins agrégés ou coalescés) et la **déformabilité des globules gras** au sein des yaourts brassés. Les différences de niveaux de viscosité (ou module conservatif) obtenues pour les yaourts brassés en fonction de l'état physico-chimique des protéines sériques adsorbées à l'interface pourraient donc être aussi liées à ces phénomènes, en plus du degré d'interaction entre réseau et interface.

L'interface est un levier intéressant et il est combiné à d'autres leviers en Chapitre 8 pour analyser plus en détails son impact sur la microstructure et les propriétés macroscopiques (rhéologie et tribologie) des yaourts brassés.

Chapitre 7 : Etude de la phase dispersée

Ce chapitre présente les leviers testés pour moduler les différentes propriétés de la phase dispersée et évaluer leur intérêt au travers de :

- L'impact de l'émulsification de la matière grasse laitière et de la vitesse de refroidissement sur les **propriétés thermiques** des émulsions `[Partie rédigée]`
- L'impact des fractions de matière grasse et de l'interface sur le **comportement rhéologique** des émulsions `[Partie rédigée]`



7.1. Cristallisation et fusion de la matière grasse laitière en fonction de la formulation et de la vitesse de refroidissement

Les différentes fractions de matière grasse laitière (Chapitre 3, § 3.1.2, p. 93) et l'état physico-chimique des protéines sériques (WP) adsorbées à l'interface ont été utilisés pour faire varier les propriétés de la phase dispersée. Chaque fraction de matière grasse laitière (MGLA, oléine, stéarine) a été émulsifiée dans de l'eau purifiée en présence de protéines sériques (natives, agrégées thermiquement) pour avoir des teneurs finales de 60% de matière grasse et de 1,2% de protéines (protocole p. 95). Dans un premier temps, les profils de fusion des fractions pures et des différentes émulsions ont été mesurés par DSC et les taux de solide à 8 °C ont été calculés à partir des données de DSC (Chapitre 3, § 3.2.2, p. 97). Dans un deuxième temps, plusieurs vitesses de refroidissement ont été testées pour évaluer leur impact sur l'état cristallin de la matière grasse et leur capacité à modifier le profil de fusion de cette dernière.

7.1.1. Impact de l'émulsification

Les thermogrammes de fusion de la MGLA, de la stéarine et de l'oléine pures ont été mesurés au cours d'une augmentation de la température et sont présentés en Figure 81. Ils montrent les plages de fusion des différentes fractions de matière grasse laitière.

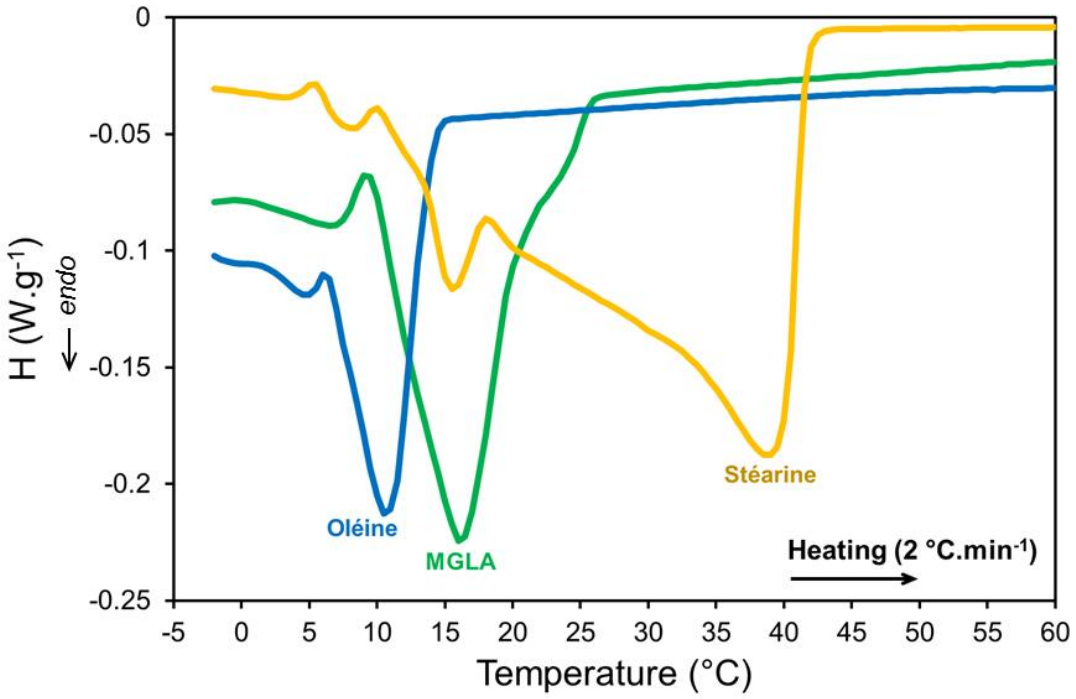


Figure 81 : Thermogrammes des fractions de matière grasse pures obtenus par le suivi de l'enthalpie (H, W.g-1) lors d'une augmentation de la température (après une cristallisation par refroidissement rapide jusqu'à 8°C d'après le protocole présenté en Chapitre 3, p. 97)

La MGLA, l'oléine et la stéarine pures possèdent des plages de fusion assez étendues avec des pics de fusion différents. Le principal pic de fusion de l'oléine est autour de 10 °C, celui de la MGLA autour de 16 °C et celui de la stéarine autour de 40 °C. La plage de fusion de l'oléine est la moins large et celle de la stéarine est la plus large. La plage de fusion de la MGLA a une largeur intermédiaire et recouvre une partie (et pas la totalité) des plages de fusion de l'oléine et de la stéarine. Les plages obtenues pour les trois fractions sont cohérentes avec la littérature (Lopez and Ollivon, 2009).

Les différences observées sont dues à la composition en acides gras des TAG de chacune des fractions, qui impacte leur capacité à cristalliser et à fondre. Cette composition a été mesurée pour les trois fractions (Chapitre 8, Table 7, p. 187) et les proportions d'acides gras à longue chaîne et d'acides gras insaturés de l'oléine sont plus importantes que celles de la stéarine. La littérature rapporte que le mélange de plusieurs types de TAG (longueurs et degrés d'insaturations des acides gras) peut entraîner la formation de cristaux mixtes (co-cristallisation), notamment dans le cas de la matière grasse laitière (Breitschuh and Windhab, 1998; Marangoni and Lencki, 1998). La MGLA est composée à la fois d'oléine et de stéarine et leur co-cristallisation a donc certainement entraîné la formation de cristaux mixtes, dont la plage de fusion est intermédiaire et ne recouvre pas totalement celles de l'oléine et de la stéarine pures.

Les trois matières grasses ont été émulsifiées. Les températures caractéristiques des plages de fusions des fractions pures et émulsifiées par des protéines sériques agrégées sont présentées et comparées dans le Tableau 23.

Tableau 23 : Températures de début (Tonset), de pic (Tpeak) et de fin (Tendset) de fusion de la MGLA, de l'oléine et de la stéarine pure ou en émulsion au cours de leur fusion (après une cristallisation par refroidissement rapide jusqu'à -55°C d'après le protocole présenté en Chapitre 3, p. 97) ; Dans une même colonne, les valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$) sont indiquées avec des lettres différentes

		Tonset (°C)	*Tpeak* (°C)	*Tendset* (°C)
Pures	Stéarine	20,3 ± 0,4 a	38,8 ± 0,6 a	41,6 ± 0,4 a
	MGLA	9,3 ± 0,5 b	16,4 ± 0,4 b	21,3 ± 0,5 b
	Oléine	4,7 ± 0,3 c	10,7 ± 0,1 c	13,8 ± 0,1 c
Emulsions stabilisées par des WP agrégées thermiquement	Stéarine	22,2 ± 4,2 a	38,4 ± 0,8 a	41,3 ± 0,8 a
	MGLA	8,4 ± 0,6 b	16,1 ± 0,1 b	21,1 ± 0 b
	Oléine	1,4 ± 2,3 c	10,1 ± 0,4 c	13,4 ± 0,3 c

Les températures de début, de pic et de fin de fusion ne sont pas significativement différentes entre les fractions pures et émulsifiées. Tout comme les fractions caractérisées pures (Figure 81), les trois fractions émulsifiées ont des plages de fusion larges et différentes les unes des autres (Tableau 23[34]). Il est intéressant de noter que les états des trois fractions sont différents dans la gamme correspondant à l'évolution de la température en bouche, de 8 et 25 °C :

- L'oléine est quasiment totalement fondue (liquide) à 8 °C ;
- La MGLA démarre à peine sa fusion et se trouve donc majoritairement cristallisée à 8 °C. Elle fond totalement entre 8 et 25 °C (passage en bouche) ;
- Le principal pic de fusion de la stéarine démarre à 22 °C mais une petite quantité de cette dernière fond en-dessous de 22 °C, au même niveau que les pics de l'oléine et de la MGLA (résidus d'oléine et de MGLA dans la stéarine). La stéarine est encore majoritairement cristallisée à 25 °C et ne fond très peu entre 8 et 25 °C (passage en bouche).

La littérature indique que l'organisation de la matière grasse sous forme de globules gras (émulsification) peut engendrer des différences dans la cristallisation de cette dernière (McClements, 2012, 2005). Il est probable que le taux de solide des fractions pures soit plus élevé que celui des globules gras, à une même température. Nous n'avons pas pu vérifier cette hypothèse à cause de la méthode d'obtention du taux de solide par DSC. Les taux de solide à 8 °C dans les émulsions stabilisées par des protéines sériques natives et agrégées thermiquement ont été calculés à partir des données de DSC (SFC, Equation 9, p. 98). Ils sont montrés et comparés en Figure 82.

Que ce soit avec des protéines sériques natives ou agrégées à l'interface, le taux de solide des globules gras à 8 °C est d'environ 50% avec la MGLA et inférieur à 2% avec l'oléine. Dans le cas de la stéarine, le taux de solide des globules gras à 8 °C varie en fonction de l'état physico-chimique des protéines sériques à l'interface. Sa

[34] *Les plages de fusions complètes ont été mesurées et sont présentées dans le Chapitre 8 (Fig. 19, p. 196).*

valeur est d'environ 75% quand les protéines sériques sont natives et d'environ 50% lorsqu'elles sont agrégées. Ces différences liées à l'état des protéines sont analysées plus en détails en Chapitre 8 (§ 3.1, p. 190) mais les résultats suggèrent, dès lors, des différences dans les cristaux présents au sein des globules gras à 8°C.

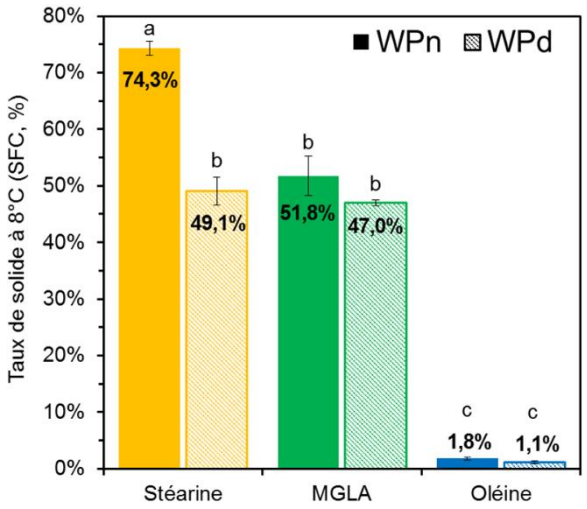


Figure 82 : Taux de solide à 8 °C (calculés) de la stéarine, la MGLA et l'oléine stabilisées par des protéines sériques natives (WPn) ou agrégées thermiquement (WPd) calculés (les valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$) sont indiquées avec des lettres différentes)

La fusion des globules gras dépend fortement de la fraction de matière grasse laitière. De même, le taux de solide à 8 °C dépend beaucoup de la fraction de matière grasse laitière et peut également varier en fonction de l'interface. Ces deux variables peuvent donc avoir un effet intéressant sur les propriétés thermiques des émulsions et nous les avons retenues comme variables d'intérêt à moduler pour évaluer leur capacité à modifier les propriétés des yaourts brassés.

7.1.2. Impact de la vitesse de refroidissement

Les émulsions de MGLA, de stéarine et d'oléine ont été chauffées à 60 °C puis soumises soit à un refroidissement lent (1 °C.min^{-1}), soit à un refroidissement rapide (30 °C.min^{-1}) jusqu'à -55 °C par DSC (d'après le protocole présenté en Chapitre 3, p. 97). La vitesse de refroidissement de 30 °C.min^{-1} a été choisie comme étant représentative de ce qui se passe au cours d'un procédé classique de fabrication de yaourt brassé. La vitesse de refroidissement de 1 °C.min^{-1} a été choisie comme étant une limite maximale, en-dessous de laquelle l'industriel n'ira jamais (durée de procédé, coût). Les températures caractéristiques de début, de pic et de fin de fusion (Tableau 24) ainsi que le taux de solide à 8 °C (Figure 83) ont ensuite été déterminés à partir des thermogrammes obtenus en fusion (2 °C.min^{-1}) suite aux refroidissements imposés au moment de la cristallisation des émulsions.

Tableau 24 : Températures de début (T*onset*), de pic (T*peak*) et de fin (T*endset*) de fusion de la MGLA, de l'oléine et de la stéarine en émulsion au cours de leur fusion après une cristallisation par refroidissement rapide ou lent jusqu'à -55 °C ; Dans une même colonne, les valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$) sont indiquées avec des lettres différentes

		T*onset* (°C)	T*peak* (°C)	T*endset* (°C)
Refroidissement rapide (30 °C.min^{-1})	Stéarine	22,2 ± 4,2 a	38,4 ± 0,8 a	41,3 ± 0,8 a
	MGLA	8,4 ± 0,6 b	16,1 ± 0,1 b	21,1 ± 0 b
	Oléine	1,4 ± 2,3 c	10,1 ± 0,4 c	13,4 ± 0,3 c
Refroidissement lent (1 °C.min^{-1})	Stéarine	21,8 ± 4,9 a	38,8 ± 0,2 a	41,7 ± 0,3 a
	MGLA	8,1 ± 0 b	16,4 ± 0,1 b	21 ± 0,1 b
	Oléine	2,9 ± 2 c	8,8 ± 2,3 c	11,6 ± 2,9 c

Pour les émulsions de MGLA, de stéarine et d'oléine, les températures de début, de pic et de fin de fusion ne sont pas significativement différentes en fonction de la vitesse de refroidissement. La plage de fusion n'est donc pas directement impactée par la vitesse de refroidissement.

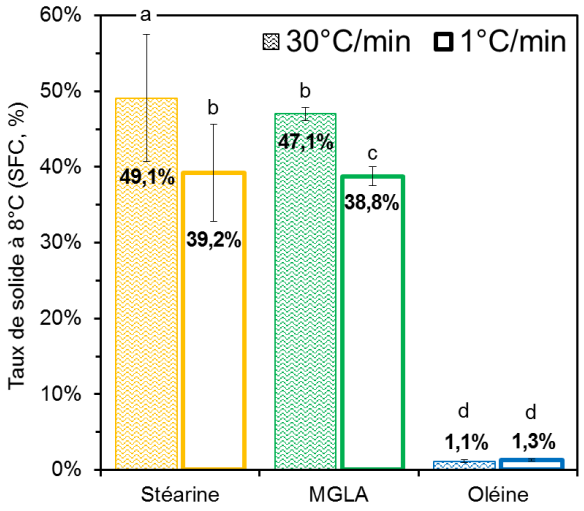


Figure 83 : Taux de solide à 8 °C des émulsions de stéarine, de MGLA et d'oléine stabilisées par des protéines sériques agrégées thermiquement et cristallisées par un refroidissement lent (1 °C/min) ou rapide (30 °C/min) jusqu'à 8°C (les valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$) sont indiquées avec des lettres différentes)

Les globules gras d'oléine sont quasiment totalement fondus à 8 °C (liquide) et la vitesse de refroidissement n'a, logiquement, pas d'impact sur leur taux de solide à 8 °C (< 2%). A l'inverse, les taux de solide des globules gras de MGLA et de stéarine à 8 °C varient en fonction de la vitesse de refroidissement, avec des valeurs plus élevées lorsque le refroidissement est rapide. Dans l'état de l'art, il a été montré que plus la vitesse de refroidissement est rapide, plus la surfusion[35] est importante (Truong et al., 2014), et donc plus les cristaux au sein des globules gras (lait) sont petits (Lopez et al., 2002). Les différences de taux de solide obtenues peuvent s'expliquer par la formation de différents cristaux en fonction de la vitesse de refroidissement.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons observé l'aspect des cristaux de stéarine et de MGLA pures en fonction de la vitesse de refroidissement par microscopie optique en lumière polarisée. Nous n'avons pas pu observer les cristaux directement au sein des globules gras car la résolution du microscope n'était pas assez élevée. La stéarine et la MGLA pures ont été chauffées à 40 °C au microscope à l'aide d'une cellule de contrôle de la température (Peltier). Elles ont ensuite été refroidies jusqu'à 8 °C à une vitesse de 1 °C.min^{-1} (refroidissement lent) ou 10 °C.min^{-1} (refroidissement le plus rapide possible avec la cellule de contrôle de la température du microscope). L'apparition des cristaux au fur et à mesure du refroidissement a été filmée et la Figure 84 montre des captures d'écran à 40 °C, 30 °C, 10 °C et 8°C.

Les cristaux de MGLA apparaissent autour de 10 °C quand elle est refroidie lentement et entre 10 et 8 °C lorsqu'elle est refroidie rapidement (Figure 84). Les cristaux de stéarine apparaissent entre 40 et 30 °C quelle que soit la vitesse de refroidissement, mais ils semblent plus nombreux à 30 °C dans le cas d'un refroidissement lent.

A 8 °C, les cristaux de stéarine sont les plus petits et les plus nombreux de tous les cristaux formés. Avec la résolution du microscope, il est difficile de faire la différence entre les cristaux de stéarine formés avec un refroidissement lent et ceux formés par un refroidissement rapide. Les cristaux de MGLA formés par un refroidissement lent paraissent plus gros et moins nombreux que ceux formés à l'issue d'un refroidissement rapide.

[35] *Terme défini dans l'état de l'art (Chapitre 1, p. 67).*

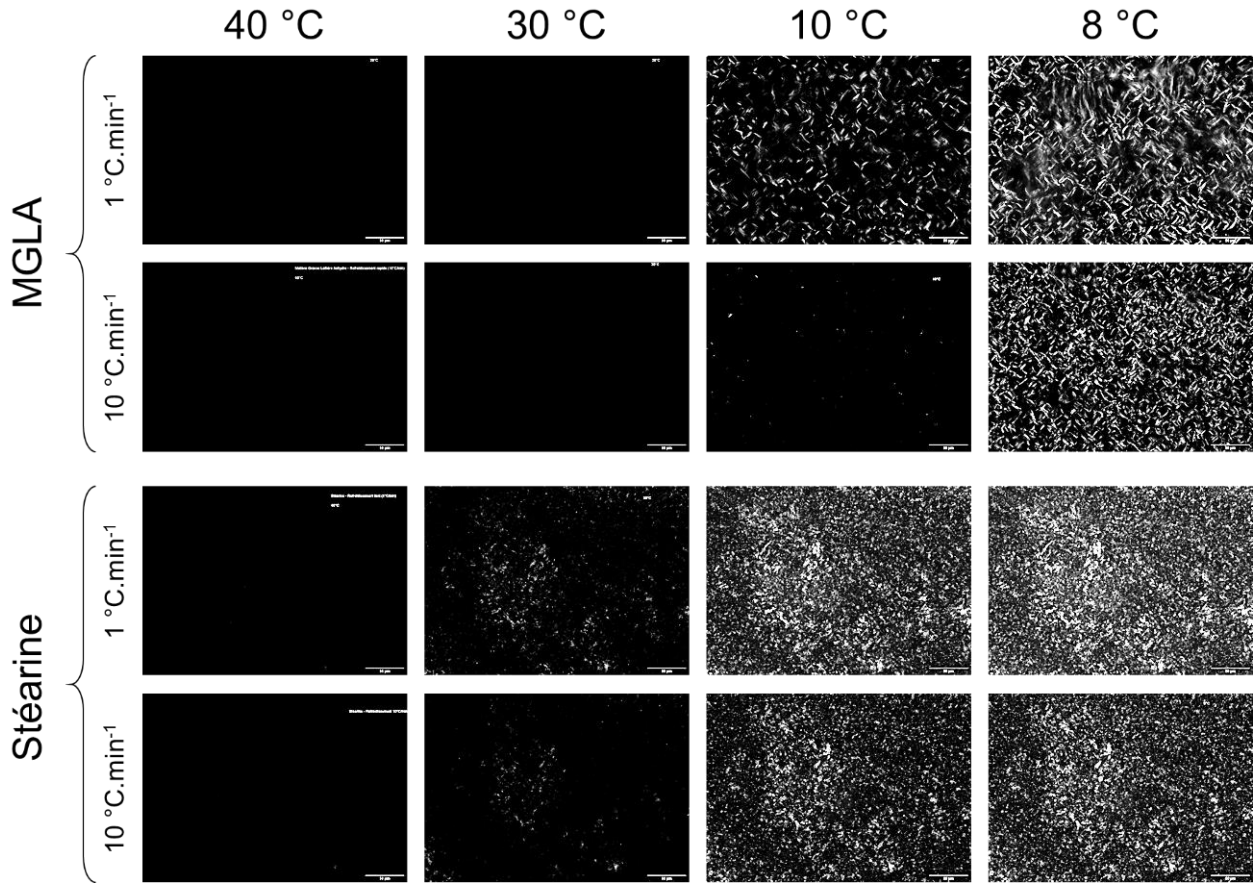


Figure 84 : Observation de l'évolution des cristaux de MGLA et de stéarine pures refroidies lentement (1 °C.min^{-1}) ou rapidement (10 °C.min^{-1}) de 40 à 8 °C par microscopie optique en lumière polarisée (barres d'échelle = 50 µm)

Premièrement, la cristallisation se fait à plus basse température lorsque le refroidissement est plus rapide. D'après Truong et al. (2014), ce décalage serait notamment dû à une surfusion de la matière grasse lorsque la cristallisation se fait suffisamment lentement (refroidissement lent).

Deuxièmement, les résultats indiquent que la taille et le nombre des cristaux (à 8 °C) dépendent de la vitesse de refroidissement. Les différences engendrées expliquent que les taux de solide des globules gras à 8 °C soient plus importants après un refroidissement rapide (30 °C.min^{-1}) qu'après un refroidissement lent (1 °C.min^{-1}). Les plus petits cristaux, qui se forment à l'issu d'un refroidissement rapide, permettent probablement une cristallisation plus importante dans l'espace restreint des globules gras et mènent donc à un taux de solide plus important.

La littérature indique aussi qu'un refroidissement lent facilite la formation immédiate de polymorphismes stables mais que les polymorphismes moins stables formés au cours d'un refroidissement rapide évoluent vers les formes les plus stables avec le temps (Fredrick et al., 2011; Rye et al., 2005).

La vitesse de refroidissement a un impact sur la cristallisation des matières grasses. Néanmoins, il faudrait rallonger de manière importante le temps du procédé de fabrication du yaourt brassé pour obtenir des différences, avec un risque d'évolution des cristaux au cours du stockage et donc un lissage des effets. L'impact étant globalement modéré, nous avons choisi de ne pas retenir la vitesse de refroidissement comme variable d'intérêt pour le reste du travail.

7.2. Comportement rhéologique des émulsions en fonction de leur formulation

Plusieurs auteurs relient la rigidité des globules gras avec le taux de solide et/ou la composition de l'interface (Houzé et al., 2005; Kim and Mason, 2017; Oliver et al., 2015b). Cependant, à notre connaissance, il n'existe pas d'étude réellement consacrée au comportement rhéologique des émulsions laitières faites à partir de différentes fractions de matière grasse laitière et stabilisées par différents types de protéines laitières. Les résultats présentés dans cette partie proviennent de travaux qui avaient pour objectif de voir si la fraction de matière grasse et l'interface pouvaient avoir un effet sur le comportement rhéologique des émulsions et, implicitement, sur le comportement mécanique et les interactions des globules gras. Nous avons choisi de n'étudier que les propriétés rhéologiques des émulsions d'oléine et de stéarine parce qu'elles avaient les propriétés thermiques les plus différentes.

D'après l'état de l'art (Quemada, 2006), la viscosité relative d'un milieu dispersé augmente avec la fraction volumique des particules. Cette augmentation est faible et proportionnelle à la fraction volumique quand le milieu est dilué et semi-dilué, puis elle diverge à partir d'une fraction volumique critique, quand le milieu est suffisamment concentré. L'évolution de la viscosité en milieu concentré dépend fortement des propriétés des particules telles que leur taille, leur polydispersité, leur déformabilité et leurs interactions (Barnes, 2000; Kim and Mason, 2017; Shewan and Stokes, 2013).

Dans le cas des émulsions de matières grasses laitières stabilisées par des protéines sériques, les globules gras sont plus ou moins cristallisés et ils sont stabilisés par une interface chargée (potentiel ζ, § 3.3, p. 162). Pour mesurer l'évolution de la viscosité des émulsions en fonction de la fraction volumique, des émulsions à 60% de stéarine ou d'oléine et 1,2% de protéines sériques (WPI) natives ou agrégées thermiquement ont été préparées d'après le protocole présenté en Chapitre 3 (p. 95). Elles ont ensuite été diluées dans de l'eau purifiée pour obtenir différentes fractions volumiques de matière grasse. Les fractions volumiques (ϕ) ont été calculées telles que :

$$\varphi = \frac{V_{GG}}{V_{total}} = \frac{M_{GG}}{\rho_{GG}} \times \frac{\rho_{emulsion}}{M_{emulsion}} = \%_{GG} \times \frac{\rho_{emulsion}}{\rho_{GG}} \qquad \text{Equation 16}$$

où V_{GG} est le volume occupé par les globules gras (m^3), V_{total} est le volume total de l'émulsion, M_{GG} est la masse de globules gras (g), $M_{emulsion}$ est la masse totale de l'émulsion (g), ρ_{GG} est la masse volumique de la matière grasse qui compose les globules gras (oléine ou stéarine[36]) ($kg.m^{-3}$), $\rho_{emulsion}$ est la masse volumique de l'émulsion et qui vaut environ 1×10^3 $kg.m^{-3}$, et $\%_{GG}$ est la teneur en matière grasse dans l'émulsion (% en poids pour poids).

7.2.1. Impact de la fraction de matière grasse laitière

Pour étudier l'impact de la fraction de matière grasse laitière sur le comportement rhéologique des émulsions, des émulsions de stéarine et d'oléine stabilisées par des protéines sériques agrégées thermiquement ont été préparées. Leurs viscosités à 8 °C et 25 °C ont ensuite été mesurées[37] en suivant le protocole présenté en Chapitre 3 (p. 98) et l'aspect des émulsions après les mesures de viscosité a été pris en photo. Les résultats obtenus sont montrés en Figure 85 pour la stéarine et en Figure 86 pour l'oléine.

Il est possible de distinguer trois zones sur la courbe d'évolution de la viscosité de l'émulsion de stéarine à 8 °C en fonction de la fraction volumique (Figure 85). En-dessous de la fraction volumique critique ϕ* de 55%, la viscosité mesurée a des valeurs inférieures à 1,0 Pa.s et son augmentation est assez faible (zone I). Au-delà de ϕ*, l'augmentation de la viscosité s'accélère (zone II) puis elle ralentit à partir d'une fraction volumique ϕ** d'environ 58% (zone III). Lorsque l'émulsion de stéarine est réchauffée à 25 °C, deux cas se différencient.

[36] *Les masses volumiques de la MGLA, la stéarine et l'oléine sont présentées en Chapitre 3 (§ 3.1.2, p. 91).*

[37] *Pour rappel : les émulsions ont été conservées à 25 °C (étuve) avant les mesures de viscosité pour s'assurer que la matière grasse ne cristallise pas. Elles ont été refroidies à 8 °C directement sur le socle du rhéomètre (Peltier).*

Lorsque la fraction volumique est inférieure à ϕ**, le niveau de viscosité récupère la viscosité initiale, avec des valeurs inférieures à 1,0 Pa.s. A l'inverse, quand la fraction volumique est supérieure à ϕ**, le niveau de viscosité ne récupère pas la viscosité initiale, avec des valeurs proches des viscosités mesurées à 8 °C.

Les photos des émulsions de stéarine montrent une prise en masse de l'émulsion à l'issue des mesures de viscosité à 8 °C pour des fractions volumiques supérieures à 58%. La prise en masse est plus forte pour une fraction volumique de 63% que pour une fraction volumique de 58%. Lorsqu'elle est réchauffée à 25 °C, l'émulsion de stéarine redevient complètement fluide pour une fraction volumique de 58%. A l'inverse, elle ne redevient pas complètement fluide pour une fraction volumique de 63% et reste alors prise en masse.

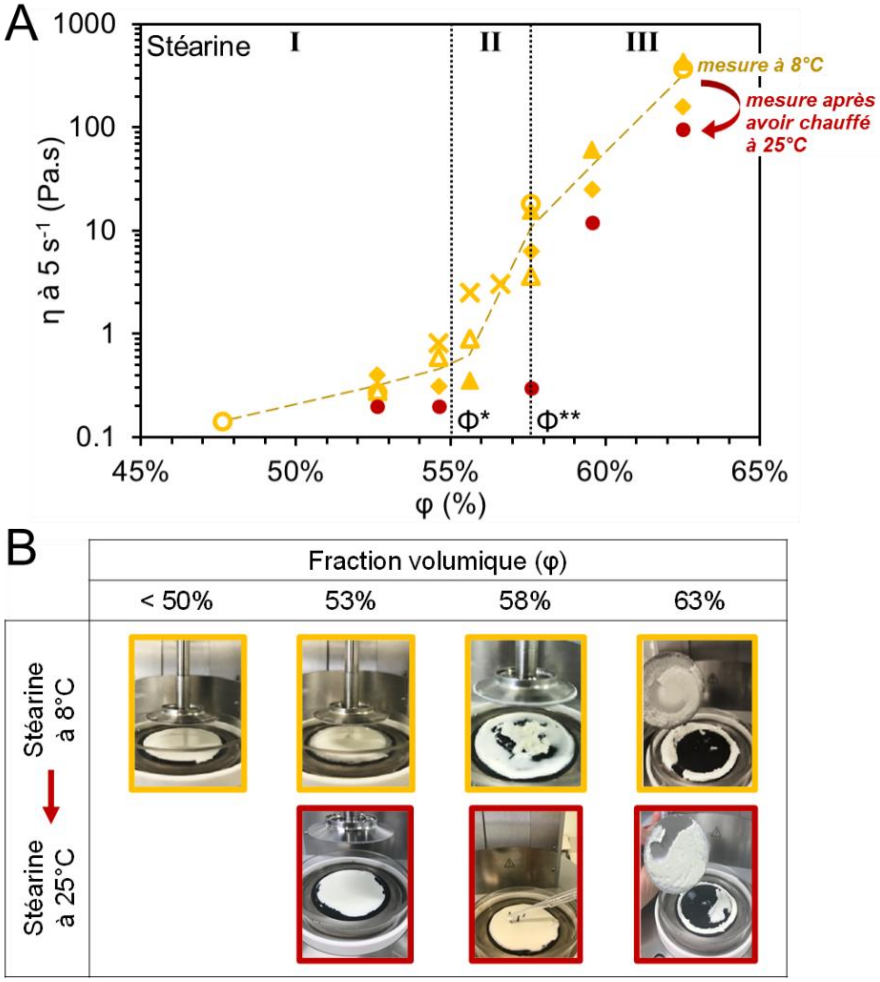


Figure 85 : (A) Evolution de la viscosité (η) à 8 °C (5 s^{-1}) ou après chauffage à 25 °C (rouge) d'une émulsion de stéarine en fonction de la fraction volumique de stéarine (ϕ) et (B) aspect de l'émulsion à l'issue des mesures de viscosité en fonction de la fraction volumique de stéarine (*en-dessous*)

L'évolution de la viscosité dans les zones I et II correspond au comportement rhéologique classique d'un système dispersé, avec d'abord sa faible augmentation en milieu dilué et semi-dilué (ϕ < ϕ*) puis sa divergence au moment où la fraction volumique d'encombrement est atteinte (ϕ ≥ ϕ*) (Shewan, 2014). La divergence de la viscosité à partir de ϕ* pourrait aussi s'expliquer par l'apparition de jamming électrostatique (chevauchement des couches d'écrantage) puisque la charge de surface des globules gras stabilisés par des protéines sériques agrégées est faible (≈ -7 mV) (Chapitre 6, Table 6, p. 164) (Kim and Mason, 2017).

L'augmentation moins abrupte de la viscosité à partir de ϕ** pourrait s'expliquer par i) la coalescence partielle des globules gras et/ou ii) l'apparition de jamming électrostatique (chevauchement des couches d'écrantage) et interfacial (enchevêtrement des interfaces) (Kim and Mason, 2017). La prise en masse visible pour une

fraction volumique supérieure ou égale à ϕ** suggère une interaction des globules gras et corrobore ainsi les hypothèses du « jamming » et, surtout, de la coalescence partielle.

Lorsque l'émulsion est réchauffée à 25 °C, sa viscosité est inférieure à 1 Pa.s pour des fractions volumiques supérieures à ϕ* (et allant jusqu'à ϕ**). A 25 °C, les globules gras de stéarine commencent à fondre (Tableau 23), leur taux de solide diminue et les globules gras deviennent alors plus déformables. Cette évolution de la déformabilité des globules gras à 25 °C explique très certainement l'augmentation de la fraction volumique d'encombrement ($\phi^*_{(25\,°C)} > \phi^*_{(8\,°C)}$) à partir de laquelle la viscosité diverge.

Au-delà de ϕ**, la viscosité diminue peu lorsque l'émulsion est réchauffée à 25 °C, ce qui suggère qu'il y a de la coalescence partielle résiduelle dans ce cas. La photo de l'émulsion ayant une fraction volumique de globules gras de 63% conforte cette hypothèse.

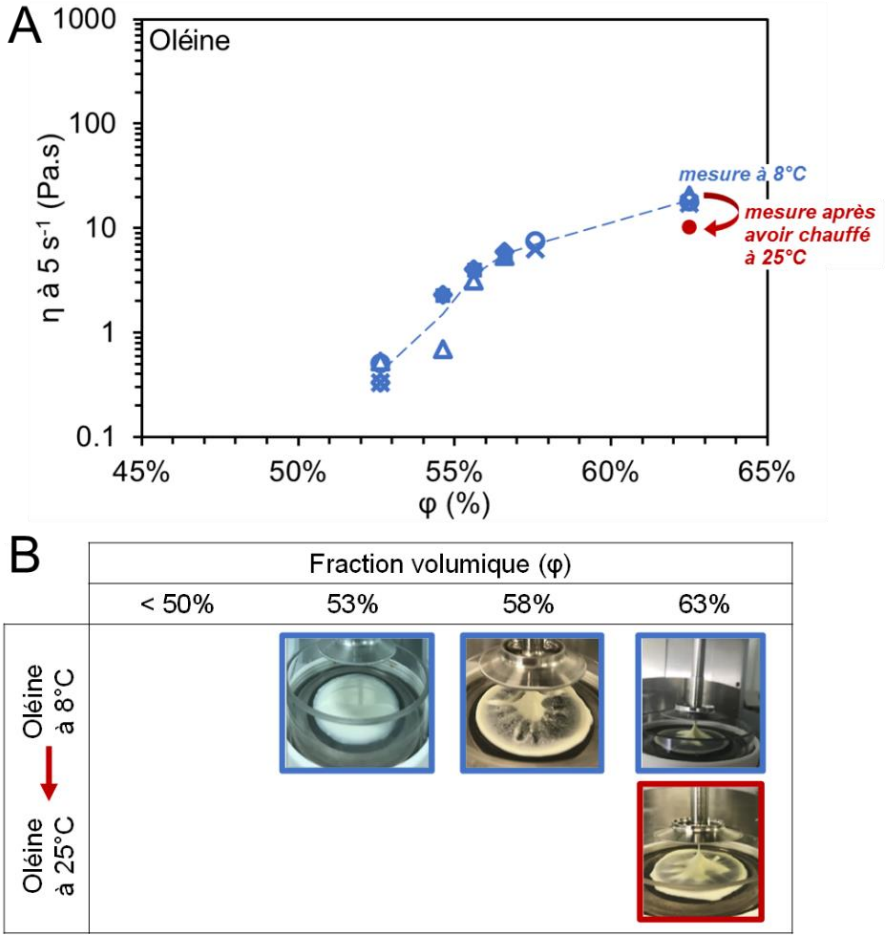


Figure 86 : (A) Evolution de la viscosité (η) à 8 °C (5 s^{-1}) ou après chauffage à 25 °C (rouge) d'une émulsion d'oléine en fonction de la fraction volumique d'oléine (ϕ) et (B) aspect de l'émulsion à l'issue des mesures de viscosité en fonction de la fraction volumique d'oléine (*en-dessous*)

Il est plus difficile de distinguer des zones dans l'évolution de la viscosité de l'émulsion d'oléine à 8 °C en fonction de la fraction volumique (Figure 86). La viscosité augmente avec la fraction volumique et cette augmentation semble ralentir à partir d'une fraction volumique de 56%. Deux scénarii pourraient expliquer cette évolution de la viscosité :

- La fraction volumique d'encombrement est inférieure à 54% et les mesures de viscosité ont été effectuées après que cette dernière ait divergé.
- La fraction volumique d'encombrement est supérieure à 63% et la divergence de la viscosité n'a pas encore été atteinte dans les conditions de mesures utilisées.

Contrairement à l'émulsion de stéarine, l'émulsion d'oléine reste fluide à 8 °C, même à fortes concentrations (photos). Les globules gras d'oléine ont un taux de solide qui est très faible à 8 °C, ce qui réduit la probabilité d'avoir de la coalescence partielle. La viscosité de l'émulsion avec une fraction volumique de globules gras de 63% n'évolue pratiquement pas lorsqu'elle est réchauffée à 25 °C. Les globules gras d'oléine évoluent très peu entre 8 et 25 °C puisqu'ils sont déjà fondus à 8 °C. Il est donc tout à fait cohérent de ne pas mesurer de différence de viscosité entre 8 et 25 °C. Les photos des émulsions ne montrent d'ailleurs pas de différence d'aspect de l'émulsion d'oléine à 8 °C et après l'avoir réchauffée à 25 °C. Dans les deux cas l'émulsion d'oléine est fluide.

La comparaison des comportements rhéologiques des émulsions de stéarine et d'oléine révèle la présence de plusieurs phénomènes (Figure 87) :

- *En conditions diluées :* Les viscosités de l'émulsion de stéarine et de l'émulsion d'oléine sont assez proches, malgré des taux de solide différents. Les propriétés de la phase continue dominent le comportement de l'émulsion et il y a une légère contribution de la concentration en globules gras, sans effet de la nature de la matière grasse constituant ces globules gras.
- *En conditions semi-diluées (intermédiaires) :* Les viscosités de l'émulsion de stéarine sont inférieures aux viscosités de l'émulsion d'oléine. Les globules gras d'oléine étant plus déformables que ceux de stéarine, leurs interactions interfaciales sont probablement plus nombreuses.
- *En conditions concentrées :* Les viscosités de l'émulsion de stéarine sont supérieures aux viscosités de l'émulsion d'oléine. Les globules gras d'oléines sont plus déformables que ceux de stéarine. De plus, la coalescence partielle qui a lieu entre les globules gras de stéarine contribue très certainement à l'augmentation de la viscosité de l'émulsion à travers l'apparition d'agrégats de globules gras rigides[38].

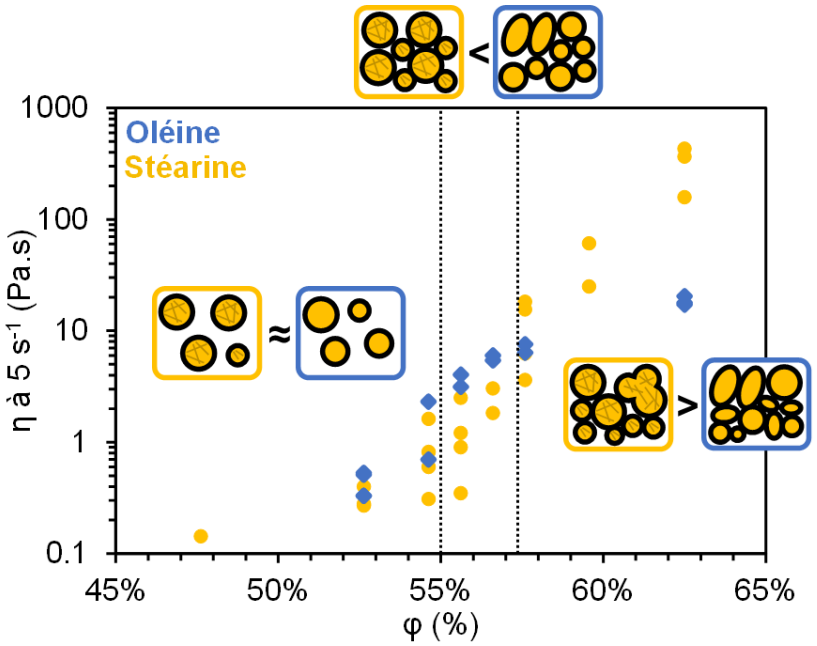


Figure 87 : Comparaison des comportements rhéologiques des émulsions d'oléine (losanges bleus) et de stéarine (ronds jaunes) au travers de l'évolution de leurs viscosités (η) à 8 °C (5 s^{-1}) en fonction de la fraction volumique

7.2.2. Impact de l'interface

Pour étudier l'impact de l'interface sur le comportement rhéologique des émulsions, des émulsions de stéarine stabilisées par des protéines sériques natives ou agrégées thermiquement ont été préparées. Leurs viscosités à 8 °C ont été mesurées en suivant le protocole présenté en Chapitre 3 (p. 98) et les résultats obtenus sont montrés en Figure 88.

[38] *Dans la plupart des publications, les systèmes étudiés en milieu concentré sont monodisperses et la polydispersité est connue pour diminuer la faction volumique d'encombrement (Kim and Mason, 2017). Les émulsions d'oléine et de stéarine analysées ici ont des polydisperses similaires et sont donc comparables. Les schémas des émulsions présentés en Figure 87 représentent cette polydispersité pour plus de réalisme.*

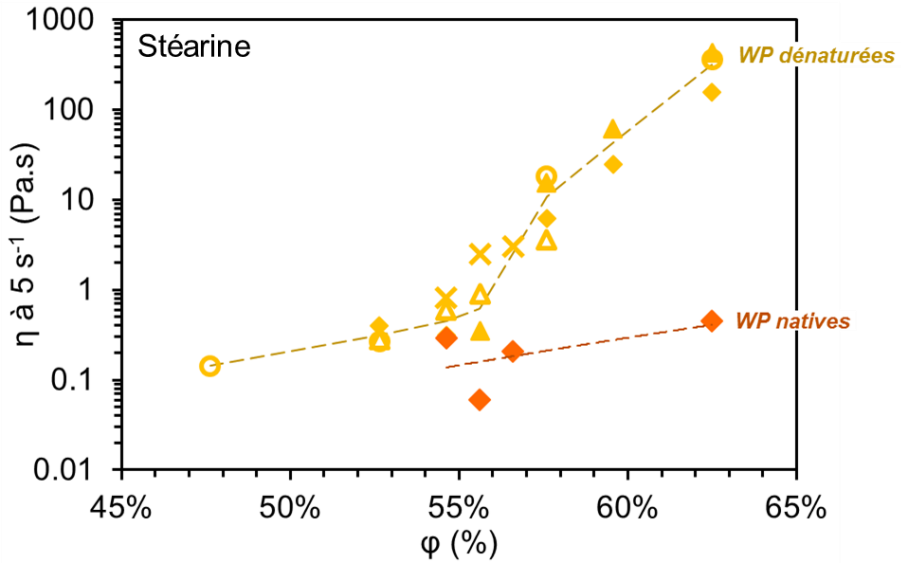


Figure 88 : Evolution de la viscosité (η) à 8 °C (5 s^{-1}) d'émulsions de stéarine stabilisées par des protéines sériques natives (WP natives) (orange) ou agrégées (WP dénaturées) thermiquement (jaune) en fonction de la fraction volumique (ϕ)

La viscosité à 8 °C de l'émulsion de stéarine stabilisée par des protéines sériques natives augmente légèrement avec la fraction volumique. Elle ne diverge pas et reste à des valeurs inférieures à 1 Pa.s dans les conditions étudiées. Ces valeurs de viscosité à 8 °C sont toutes inférieures aux viscosités à 8 °C de l'émulsion de stéarine stabilisée par des protéines sériques agrégées thermiquement. La fraction volumique d'encombrement de l'émulsion stabilisée par des protéines sériques natives est nettement supérieure à celle de l'émulsion stabilisée par des protéines sériques agrégées thermiquement.

L'interface a un véritable impact sur le comportement rhéologique de l'émulsion de stéarine. Cet impact peut s'expliquer par plusieurs phénomènes :

- *Charge de surface :* Elle est plus élevée lorsque les protéines sériques adsorbées à l'interface sont natives (≈ -21 mV) que quand elles sont agrégées thermiquement (≈ -7 mV) (Chapitre 6, Table 6, p. 164). Les forces de répulsion électrostatique sont donc plus importantes avec des protéines sériques natives et résistent probablement plus au phénomène de jamming électrostatique des globules gras. Cette résistance au jamming électrostatique peut expliquer l'augmentation de la fraction volumique d'encombrement lorsque l'interface est composée de protéines sériques natives.
- *Tailles des protéines :* Elle est plus élevée lorsque les protéines sériques sont agrégées thermiquement (> 100-200 nm) que quand elles sont natives (< 10 nm) (Chapitre 6, p. 158). Les agrégats de protéines sériques agrégées sont très certainement à l'origine d'un fort jamming interfacial et de frottements qui pourraient expliquer la viscosité plus élevée.

Par ailleurs, le taux de solide des globules gras de stéarine stabilisés par des protéines sériques natives (75%) est supérieur à celui des globules gras stabilisés par protéines sériques agrégées thermiquement (50%). D'après Fredrick, Walstra, & Dewettinck (2010), un taux de solide autour de 20-30% favorise la coalescence partielle des globules gras alors qu'un taux de solide trop élevé (> 50-60%) lui est défavorable. Les globules gras de stéarine stabilisés par des protéines sériques natives ont donc probablement fait moins de coalescence partielle, ce qui pourrait également expliquer la plus faible viscosité lorsque les protéines sériques de l'interface sont natives.

Enfin, la phase continue contient des protéines résiduelles qui ne sont pas adsorbées à l'interface, et les protéines sériques agrégées ont pu contribuer plus fortement à augmenter la viscosité de la phase continue par rapport aux protéines sériques natives qui sont nettement plus petites[39].

[39] *Même si les protéines natives sont beaucoup plus nombreuses que les protéines sériques agrégées, leur conformation globulaire très compacte ne leur permet pas de contribuer à la viscosité (viscosité intrinsèque très faible).*

Conclusions et messages clés du chapitre

Dans la gamme correspondant à **l'évolution de la température en bouche (entre 8 et 25 °C)**, l'oléine est déjà fondue (liquide) à 8 °C, la MGLA est cristallisée à 8 °C et fond totalement entre 8 et 25 °C, et la stéarine reste majoritairement cristallisée à 25 °C. **A 8 °C, le taux de solide des globules gras** de MGLA est d'environ 50% et celui des globules gras d'oléine est inférieur à 2%. Le taux de solide des globules gras de stéarine varie en fonction de l'état physico-chimique des protéines sériques à l'interface, avec une valeur d'environ 75% quand elles sont natives et d'environ 50% lorsqu'elles sont agrégées.

En **conditions semi-diluées (intermédiaires)**, les **viscosités (8 °C)** de l'émulsion de stéarine sont inférieures aux viscosités de l'émulsion d'oléine. A 8 °C, l'émulsion de stéarine prend en masse lors de la mesure de viscosité mais elle redevient complètement fluide en repassant à 25 °C. Les viscosités (8 °C) de l'émulsion de stéarine stabilisée par des protéines sériques natives sont nettement inférieures à celles de l'émulsion de stéarine stabilisée par des protéines sériques agrégées. En **conditions concentrées**, les viscosités (8 °C) de l'émulsion de stéarine sont supérieures à celles de l'émulsion d'oléine. A 8 °C, l'émulsion de stéarine prend en masse lors de la mesure de viscosité et elle ne redevient pas complètement fluide en repassant à 25 °C (coalescence partielle résiduelle). Les viscosités (8 °C) de l'émulsion de stéarine stabilisée par des protéines sériques natives sont largement inférieures à celles de l'émulsion de stéarine stabilisée par des protéines sériques agrégées. Les différences de **comportements rhéologiques** en fonction du type de matière grasse et de la nature de l'interface peuvent s'expliquer par différents taux de solide à 8 °C (engendrant différents niveaux de coalescence partielle), différentes capacités à faire du jamming et différentes contributions de la phase continue en fonction de l'état physico-chimique des protéines sériques non adsorbées à l'interface.

La Figure 89 résume nos **interprétations des mécanismes** et fait le lien entre la composition de la matière grasse et de l'interface, les propriétés thermiques à 8 °C et le comportement rhéologique à 8 °C.

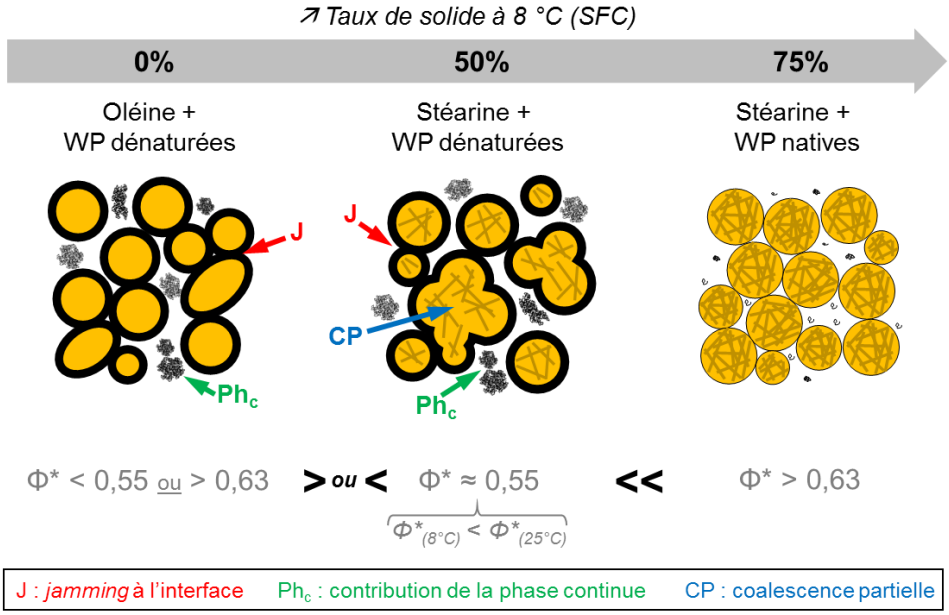
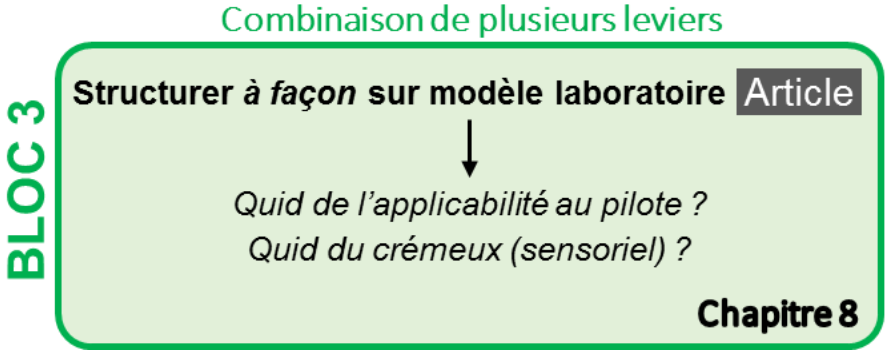


Figure 89 : Interprétation des comportements rhéologiques en fonction du taux de solide (dépendant de la fraction de matière grasse laitière) et de la capacité de l'interface à faire de l'ancrage et à interagir (dépendante de la nature de l'interface)

L'état physico-chimique des protéines sériques à l'interface ainsi que le type de matière grasse ont été retenus comme variables d'intérêt pour moduler les propriétés thermiques et le comportement rhéologique des globules gras. A l'inverse, la vitesse de refroidissement n'a pas été retenue car son effet n'était pas majeur.

Chapitre 8 : Combinaison de plusieurs leviers pour structurer *à façon*

Les expérimentations menées dans le cadre du bloc 2 (test des leviers) ont montré que la **nature de l'interface et la composition des globules gras en matière grasse** peuvent être des leviers intéressants pour moduler les propriétés de texture des yaourts brassés. La littérature a montré, pour des systèmes modèles tels que les émulsions gélifiées non brassées ou les émulsions H/E, que ces deux leviers pouvaient être interdépendants (Chojnicka et al., 2009; Liu et al., 2015; Guido Sala et al., 2009). Ce dernier chapitre présente les travaux dans lesquels **ces deux leviers ont été modulés en même temps pour mesurer leur impact combiné sur les propriétés du yaourt brassé** modèle (laboratoire).



[Article]

L'objectif des travaux présentés était de réussir à structurer *à façon* le yaourt brassé pour moduler ses propriétés macroscopiques (mesurées dans des conditions prenant en compte le processus oral). Pour cela, des crèmes ont été fabriquées en modifiant à la fois l'interface (protéines sériques natives ou agrégées thermiquement) et la matière grasse (MGLA, stéarine ou oléine). A partir des différentes crèmes, des yaourts brassés modèles (laboratoire) à deux niveaux de matière grasse (6% et 10%) ont été fabriqués puis caractérisés. L'approche multi-échelle adoptée a permis de mesurer l'impact de la formulation sur la structure et la texture des yaourts brassés. Des interprétations des mécanismes ont été proposées. Ces travaux ont fait l'objet d'un article.

Cet article est publié dans *International Dairy Journal* (*https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.04.007*)

Tailoring cream by modifying the composition of the fat and interfacial proteins to modulate the stirred milk gel texture

Marine Moussier[a], Delphine Huc-Mathis[a], Camille Michon[a], Cyril Chaudemanche[b], Véronique Bosc[a]
[a] *Ingénierie Procédés Aliments, Inra, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 91300 Massy, France*
[b] *Vienne Technical Center, Yoplait/General Mills, Chemin des Mines, 38200 Vienne, France*

Abstract

The formulation-structure-texture relationship in stirred emulsion-filled food gels has rarely been analyzed, let alone in realistic conditions. By studying thermal (calorimetry), structural (laser diffraction, confocal microscopy and mathematical morphology analysis) and textural (rheology and tribology) properties, this work advanced the understanding of this relationship in stirred gels made entirely from milk ingredients. Indeed, tailoring the fat composition (AMF, olein or stearin fractions) and interfacial proteins (native or heat-aggregated WPI) in cream resulted in different properties. Crystallization of the fat droplets and probably their interactions (aggregation or partial coalescence), pore size, microgel size and the coarseness of the protein network in stirred milk gels were all modified by the cream formulation. The changes in properties led to different textures and lubrication behaviors of the stirred milk gels. The highlighted relationships between formulation, structure and texture are recapitulated in a concluding diagram.

1. Introduction

Fatty dairy gels are complex systems in which fat is dispersed as droplets in a protein network. When stirred, this emulsion-filled gel becomes a concentrated dispersion of microgels between 10 and 100 µm in diameter (Lee and Lucey, 2010; Sodini et al., 2004). This type of food system is known for its sensory qualities and several authors reported that a reduction in fat content altered both flavor and textural properties, with reduced perception of the creamy flavor, oily film, consistency, creaminess, thickness or even firmness. Other authors demonstrated that reducing the fat content also reduced the storage modulus, apparent viscosity (at 100 s^{-1}), yield stress and lubrication properties (by increasing the friction coefficient) of different types of emulsion filled gel systems (Le Calvé et al., 2015; Liu et al., 2015; J A Lucey et al., 1998; Sodini et al., 2004; Tomaschunas et al., 2012). Maintaining these properties is therefore essential if the fat content is to be reduced in such systems.

To be processed into stirred milk gel, milk undergoes typical unit operations involving different physico-chemical conditions, which modify the microstructure (Lee and Lucey, 2010; Sodini et al., 2004). Firstly, the milk is usually separated into skim milk and cream by centrifugation. Skim milk (about 3.5 wt% protein) is a colloidal suspension of casein micelles (30 to 600 nm in diameter (Cayot and Lorient, 1998)) also containing solubilized native whey proteins (WP) (about 5 nm in diameter), lactose and minerals. The cream is an oil-in-water emulsion (with about 35 wt% fat and 2 wt% proteins), in which the fat is dispersed as droplets about 5 µm in diameter, stabilized by a native membrane (Lopez et al., 2014). In standard dairy gel processing, the cream, the skim milk and sometimes skim milk powder (SMP)

(with about 35 wt% protein) are mixed to obtain the target composition. The resulting mix is then pasteurized, homogenized (usually by high pressure homogenization with pressures from 10 to 20 MPa) and gelled by acidification through fermentation. Pasteurization leads to the heat-aggregation of whey proteins and also to interactions between whey proteins and casein micelles via their κ-caseins (L. Donato and Guyomarc'h, 2009). As a result of homogenization, the fat droplet size decreases to less than 1 µm and the native membrane is partially replaced and newly formed by whey proteins (WP) and caseins (Cano-Ruiz and Richter, 1997). During acidification, the reduction in the pH from 6.5 to 4.5 reduces electrostatic repulsion between casein micelles and casein micelle/whey protein complexes, allowing them to interact and leading to the formation of a three-dimensional network. Micellar calcium (from calcium phosphate nanoclusters) is solubilized, thereby reducing interactions between caseins in the micelles. When applied, stirring breaks the continuous gel (i.e. set milk gel) into a concentrated dispersion of microgels about 10 µm in diameter (i.e. stirred milk gel) (Lee and Lucey, 2010; Sodini et al., 2004).

Many studies have demonstrated the impact of the interface and of fat composition on the texture of emulsion-filled gel systems. First, an increase in the solid fat content (SFC) was shown to increase the hardness of the droplets and hence the firmness of model emulsion-filled gels (Liu et al., 2015; Oliver et al., 2015b) and of set milk gels (Barrantes et al., 1996; Houzé et al., 2005). The fat droplets can also participate in the network via their interface, and the interaction between the proteins that form the gel network and the proteins adsorbed at the oil-in-water interface has been demonstrated in the case of model emulsion-filled gels (Sala et al., 2007). In set milk gel, a threshold amount of 40% of the native membrane replaced by milk proteins was shown to increase its storage modulus (G') (M. C. Michalski et al., 2002). More specifically, Cho, Lucey, & Singh, (1999) showed that the matrix was firmer (higher G') when whey protein concentrate (WPC) adsorbed at the interface was heat-aggregated than when it was native, which may be due to different interaction forces. In addition, some studies on emulsions showed that the interfacial composition impacted the crystallization of fat in the droplets (Palanuwech and Coupland, 2003; Truong et al., 2014). Most of these studies were conducted either on model systems or on set milk gels, whereas little is known about the combined effects of the interface and the fat compositions on the properties of stirred milk gels in realistic conditions.

The aim of this study was to understand the impact of the compositions of fat and interfacial proteins on the textural and structural properties of stirred milk gel systems, by designing tailored creams. On the one hand, the study was carried out under realistic formulation conditions, by using dairy ingredients and a process similar to that of stirred yogurts. On the other hand, measurement conditions of stirred milk gels were chosen to take into account oral processing during the consumption of stirred yogurts. The fat composition was controlled by using different fractionated milk fats and the interface by using either native or heat-aggregated whey protein isolate (WPI). First, the effect of the formulation on the thermal properties (fusion, solid fat content) and on the structural properties (fat droplet sizes) of the creams was evaluated. The impact of the different creams obtained on the textural properties (rheology, tribology), then structural properties (microgel sizes, protein network coarseness and pore size) of the resulting stirred milk gels were evaluated next. Finally, the relationship between formulation, structure and texture was analyzed and is presented in a final diagram.

2. Materials and methods

2.1. Raw materials

Purified water was obtained using a Milli-Q purification system (Millipore, Merck, Germany), with a conductivity of 6.6×10^{-5} S.m^{-1}. The skim milk powder (SMP) (18.4 wt% caseins, 6.7 wt% WP of which 68.1 % native) was provided by Eurosérum (Sodiaal, Port-sur-Saone, France). The whey protein isolate powder (WPI) (80.5 wt% WP of which 99.4 % native, 9.7 wt% caseins) was purchased from Lactalis (Laval, France) (95 wt% protein in dry matter) and the glucono-δ-lactone (GDL) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). The pregelatinized modified rice starch was provided by Yoplait (Vienne, France) and the anhydrous milk fat (AMF), its low melting temperature fraction (olein) and its high melting temperature fraction (stearin) were provided by Beuralia (Sodiaal, Quimper, France). The degree of unsaturation of the fats and their proportion of C18 fatty acids are listed in Table 7. Fatty acid composition was determined by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS, Trace GC, Polaris Q, Thermo-Finnigan, Altricham, UK), with a ZB-WAX column (method adapted from NF EN ISO 12966-2).

Table 7: Composition of the fats used determined by GC-MS with the average values ± standard deviation of 3 repetitions

Type of fat	AMF	Olein	Stearin
Degree of unsaturation (%)	34.3 ± 0.8	41.4 ± 4.1	25.4 ± 2.7
C18:0 (stearic acid) (%)	11.0 ± 1.4	8.2 ± 1.2	12.9 ± 2.2
C18:1 (oleic acid) (%)	30.0 ± 0.5	36.4 ± 3.9	22.4 ± 2.6
C18:2 (linoleic acid) (%)	2.3 ± 0.1	2.5 ± 0.2	1.5 ± 0.2

2.2. Preparation of the creams

Solutions of WPI were prepared to reach a protein concentration of 1.2 wt% in the final creams. Each solution was prepared by dispersing WPI in Milli-Q water under continuous stirring for 15 min at room temperature and then kept overnight at 8 °C to ensure proper hydration. Some of the solutions were heat-treated under stirring at 80 °C for 30 min in a thermostatically controlled water bath. The resulting protein aggregates were approximately 100 nm in diameter (Dynamic light scattering, Nanosizer ZS, Malvern Instruments, UK, 1:100 dilution with Milli-Q water). Oil-in-water emulsions were prepared with either 60 wt% fat (for thermal analysis with DSC) or 30 wt% fat (for stirred milk gel production and all the other analyses). For this purpose, either the AMF, olein or stearin was melted at 60 °C for 30 min in a thermostatically controlled water bath before emulsification, and the corresponding WPI solution was tempered at 50 °C. After mixing the melted fat and the WPI solution, pre-homogenization was performed with a rotor/stator (Polytron PT 3100 D, PTG 36/4 probe, Kinematica AG, Switzerland) at 15,000 rpm for 5 min. The resulting coarse emulsion was immediately treated by sonication (VCX 130, 13MM probe, Sonic & Materials, UK) at 130 W for 15 effective min (10 s pulses) to produce a fine emulsion. The temperature was maintained below the irreversible denaturation temperature of the whey proteins and the maximum temperature measured throughout the emulsification process never exceeded 55 ± 2 °C. All the information concerning the creams is listed in Table 8. In three different weeks, each type of cream with 30 wt% fat was produced once, i.e. three repetitions of each. Creams with 60 wt% fat were made twice for thermal analysis.

Table 8: Composition, treatment and labeling of the creams and stirred milk gels

Treatment applied to aggregate the proteins in WPI solution	Type of fat	Labeling of the creams with 30 *or* 60 wt% fat	Fat content(s) of stirred milk gel (wt%)	Labeling of the stirred milk gels
No treatment (native)	AMF	AMF	6 *or* 10	AMF(6) *or* AMF(10)
No treatment (native)	OL	OL	6	OL(6)
No treatment (native)	ST	ST	6	ST(6)
HT at 80 °C for 30 min	AMF	HTAMF	6 *or* 10	HTAMF(6) *or* HTAMF(10)
HT at 80 °C for 30 min	OL	HTOL	6	HTOL(6)
HT at 80 °C for 30 min	ST	HTST	6	HTST(6)

Abbreviations: HT (heat-treatment), AMF (anhydrous milk fat), OL (olein fraction), ST (stearin fraction).

2.3. Preparation of the stirred milk gels

Reconstituted skim milk was prepared by dispersing SMP in Milli-Q water under continuous stirring for 15 min at room temperature and then kept overnight at 8 °C to ensure proper hydration. Different milk mixes were prepared from the reconstituted skim milk and the different creams previously obtained, also adding 1 wt% of rice starch (as added in a reference recipe). The mixes were made to reach a target fat content of 6 or 10 wt%, and a target protein content of 3.1 wt%. Stirred milk gels were produced from each milk mix using the lab-scale process developed by Moussier et al. (2019b). The milk mixes were heat-treated in a thermostatically controlled water bath at 80 °C for 30 min under stirring and then sonicated (VCX 130, 13MM probe, Sonic & Materials, UK) at 130 W for 15 effective min (10 s pulses) to reproduce the homogenization step. Once homogenized, they were cooled down to 30 °C and then acid-gelled for about 5 h (30 °C) by addition of 1 wt% GDL. After making sure the resulting gels had a pH below 4.55, they were stirred. The gels were first coarsely broken up with a spatula, poured into a beaker (1 L) and passed at 200 $mL.min^{-1}$ through two successive pipes (a first 40 cm long with a diameter of 7 mm, a second 100 cm long with a diameter of 3 mm) then through a

filter (1 mm pores) using a peristaltic pump (L/S Precision Console, Masterflex, Gelsenkirchen, Germany). By batches of 250 mL, the pre-stirred gels were ultra-smoothed by passing them once (from bottom to top) through a rotor/stator (Polytron PT 3100 D, PTG 36/4 probe, Kinematica AG, Switzerland) at 1,500 rpm. The stirred gels were finally placed in 100 mL pots at 26 ± 1.2 °C and stored at 8 °C for one week before being analyzed. In three different weeks, each type of stirred milk gel was produced once, giving a total of three repetitions of each. All the information concerning the samples of stirred milk gel is listed in Table 8.

2.4. Thermal analysis

The thermal properties were analyzed using differential scanning calorimetry (DSC) (DSC 1 STARe System, Mettler-Toledo, Greifensee, Swiss) and each measurement was systematically made three times. Calibration was done using indium (initial melting temperature of 156.60 ± 0.30 °C, melting enthalpy variation of 28.45 ± 1.0 J.g^{-1}). Approximately 20 mg of the pure bulk fat and 12 mg dry matter of the creams (60 wt% fat, 1.2 wt% proteins) were hermetically sealed in 40 µl aluminum crucibles (Mettler-Toledo, Greifensee, Swiss). In the case of the creams, 0.8 M of NaCl was added to each to delay the crystallization of water and hence improve the baseline. To avoid water pressure during heating-cooling-heating kinetics, a hole was made in the crucibles using a needle. Two types of heating-cooling-heating kinetics were performed to account for the conditions of production and consumption of stirred milk gels as far as possible (Fig. 18). A temperature of 8 °C was chosen as the standard temperature of household refrigerators, a cooling rate of 30 °C.min^{-1} as the average cooling rate throughout yogurt production and a heating rate of 2 °C.min^{-1} as a compromise to be close to that of the mouth but also to be able to correctly measure melting behavior. Cooling down to 8 °C was followed by a quick quenching at -10 °C to obtain a good baseline for the data treatment. The calorimetric parameters retrieved were those of melting. STARe Excellence software (Mettler-Toledo, Greifensee, Swiss) was used to obtain the peak (T*peak*, °C) and final (T*endset*, °C) melting temperatures as well the total variation in enthalpy (ΔH, J.g^{-1}). Based on the work of Lopez, Briard-Bion, Camier, & Gassi (2006), the order of magnitude of solid fat content (SFC) formed by the emulsified AMF, olein and stearin fractions at 8 °C was calculated using the following melting enthalpy ratio:

$$SFC\ (\%) = \frac{\Delta H_{partial}}{\Delta H_{total}} \qquad \text{Equation 17}$$

where ΔH*partial* (J.g^{-1}) is the variation in the melting enthalpy of creams measured after cooling to 8 °C and ΔH*total* (J.g^{-1}) is the one measured after cooling bulk fats down to -55 °C.

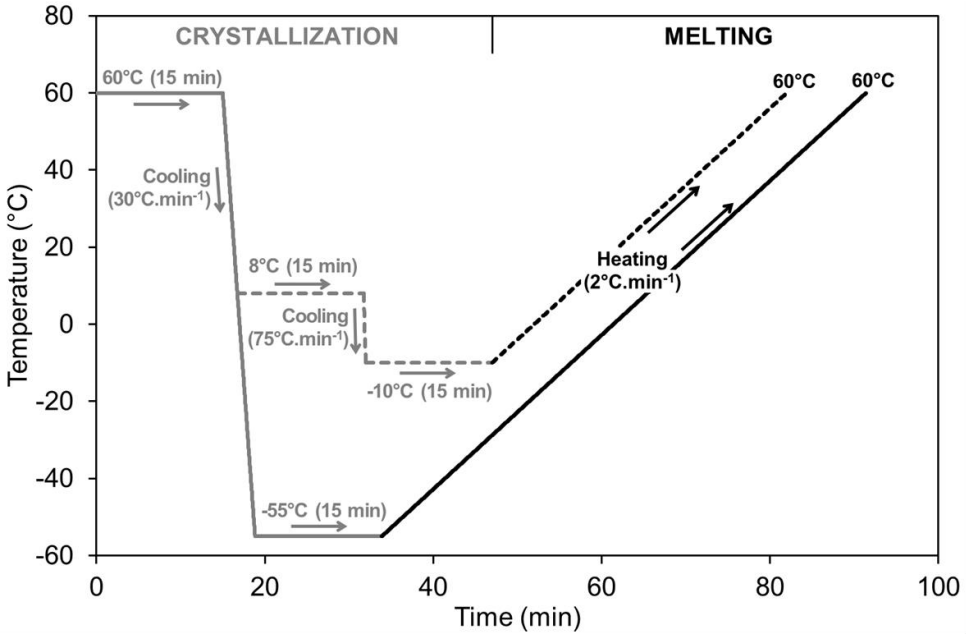


Fig. 18: Cooling and heating kinetics used to study the crystallization (grey lines) and fusion (black lines) properties of milk fats with cooling either to -55 °C (solid line) or to 8 and then to -10 °C (dotted line)

2.5. Characterization of the microstructure

Particle size distribution by laser diffraction

The particle size distributions were obtained by laser diffraction with a MasterSizer 2000 (Malvern Instruments, UK). The size distributions of fat droplets were measured in the creams (Mie theory, 1.33 RI for water, 1.47 RI for milk fat) while the size distributions of the microgels were measured in the stirred milk gels (Fraunhofer theory). The creams (or stirred milk gels) were previously diluted 1:10 *(w/w)* with Milli-Q water. To achieve a constant level of obscuration (between 13 and 15%), only some drops of 1:10 diluted creams (or stirred milk gels) were poured in the dispersant tank for the measurement (three repetitions). The median diameters of fat droplets (or microgels) (d(0.5), µm) and the width of the distributions (span, Equation 10) were recovered.

$$span = \frac{d(0.9) - d(0.1)}{d(0.5)} \qquad \text{Equation 18}$$

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) and quantitative analysis by mathematical morphology

Confocal images were obtained with a TCS SP8 AOBS inversed confocal microscope (Leica, Solms, Germany) equipped with a helium-neon laser (458 nm excitation wavelength) and an argon laser (633 nm excitation wavelength). A two-step labeling protocol was implemented to stain fat and proteins, using the specific affinity properties of Bodipy 665/676 nm (Invitrogen, Carlsbad, NM, USA) and DyLight 488 nm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), respectively. For each measurement, the fat image (in red) was superimposed on the protein image (in green). The images shown in this article were chosen as representative of the five replicates performed for each stirred milk gel. The replicates were obtained all at once for each type of stirred milk gel.

Quantitative analysis of the microstructure was possible from the protein confocal images using mathematical morphology, based on pixel transformations by dilations and erosions of an element with a side length of (2n+1) pixels (element side of 3 pixels with n = 1, 40 erosions, 40 dilatations) (Fenoul et al., 2008). In the present study, the successive dilatations provided information about the step-by-step disappearing speed of dark objects, which corresponded to the pores (serum and fat). Successive erosions provided information about the step-by-step disappearing speed of light objects, corresponding to the protein network. The images were processed using the program and the method of interpretation developed for cakes by Dewaest et al. (2017) using MatLab software (The MathWorks, France) and XLSTAT 2015.1 software (Addinsoft, Paris, France). A set of 183 confocal images (×40 magnification, 1 pixel = $(0.569)^2$ µm^2) obtained from 35 different recipes, including eight from the present study, were analyzed to dispose of sufficient data for statistical interpretation and hence quantitative analysis of the microstructure. The 80 total grey level values obtained from the 40 dilatations and 40 erosions of the 183 confocal images were analyzed using principal component analysis (PCA). The position of each image in the PC1-PC2 plan was obtained. Using the PC1 and PC2 loadings of principal components plotted against micrometers, it was possible to interpret the microstructure of the confocal images. It provided information about object sizes ranging from 2.2 to 85.5 µm. In the present study, the pore size and the coarseness of protein network both changed according to the principal components PC1 and PC2. However, the diagonals (D1 and D2) made it possible to interpret the microstructure, and the coordinates of the confocal images on D1 and D2 were calculated.

2.6. Analysis of the texture using rheology and tribology taking oral processing into account

The texture was evaluated in conditions that took oral processing into account through shearing, temperature, and the small gaps chosen. The measurements were made by combining rheology and tribology, using the method developed by Huc, Michon, Bedoussac, & Bosc (2016). After a standardized mixing step, the sample was loaded onto the controlled Peltier plate of a MCR 301 rheometer (Anton Paar, Graz, Austria) set at 10 °C. Measurements were made using a plate-plate system (steel serrated parallel plate, 5 cm in diameter) with a gap of 1 mm and with an increase in temperature from 10 °C to 25 °C, mimicking the increase in temperature that takes place in the mouth. The viscoelastic properties were first measured at 10 °C (0.01-10 Hz frequency, 0.1% strain chosen in the linear viscoelastic domain). In the second step, viscosity was measured at 60 s^{-1} while the temperature was increased from 10 °C to 18 °C (0.6 °C.s^{-1} heating rate) and then the viscoelastic properties were measured at 25 °C (0.01-10 Hz

frequency, 0.1% strain that was still in the linear viscoelastic domain) after 1 min at 25 °C under 60 s^{-1} shearing. Three repetitions were measured for each sample. Several indicators were chosen to describe the rheological properties: viscosity (η_0, Pa.s) and storage moduli (G'_0, Pa, 1 Hz) at the beginning of the mimicked oral processing, viscosity (η_f, Pa.s) and storage moduli (G'_f, Pa, 1 Hz) at the end of the mimicked oral processing, and changes in the properties during measurement through the ratios Rη (η_f / η_0) and RG' (G'_f /G'_0). In addition, friction was also measured using a nanotribometer NTR2 (CSM, Peseux, Switzerland) fitted with a polytetrafluoroethylene (PTFE) ball (2 mm in diameter) and a polydimethylsiloxane (PDMS) surface in contact. The temperature was set at 25 °C (Peltier control system). A sample 250 mm in height was loaded onto the PDMS and a 30 mN normal force load charge was applied with the PTFE ball sliding along a distance of 4 mm at a velocity of 10 mm.s^{-1} for 15 cycles. The friction coefficient was calculated by dividing the friction tangential force measured (F_t) by the applied normal force (F_n) ($\mu = F_t / F_n$). At least five repetitions were done per type of stirred milk gel. Only 10 cycles were retained for the evaluation of the friction coefficient, by averaging their values. Between each measurement, the surfaces were washed with ethanol and rinsed extensively with distilled water and then wiped dry.

2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using XLSTAT 2015.1 software (Addinsoft, Paris, France). Analysis of variance (ANOVA) was performed to evaluate differences between average values using Tuckey's test. Significance levels of $p \leq 0.05$ or $p \leq 0.1$ were used. Principal component analysis (PCA) was used to analyze all the texture properties measured in instrumental conditions that mimicked oral processing.

3. Results and discussion

3.1. Thermal properties and sizes of fat droplets in the creams

Although the main sizes of fat droplets in the cream were generally similar (ranging from 1.4 µm to 2.1 µm), the fat droplets stabilized with native proteins were slightly smaller than the fat droplets stabilized with heat-aggregated proteins (Table 9). This difference in fat droplet sizes depending on the state of aggregation of the interfacial proteins has also been reported in the literature for emulsions made from rapeseed oil (3% fat) and whey protein concentrate (WPC) (3% protein) (Millqvist-Fureby et al., 2001). This can be explained because once the proteins are heat-aggregated, they form fewer particles than when they are native and the amount of emulsifying material is consequently reduced. However, the results obtained by Truong et al., (2014) suggest that this difference in size was not sufficient to cause differences in fat droplet properties such as fat crystallization. This result enabled to focus on the effects of the fat fraction and of interfacial proteins on the emulsion properties for the remainder of the present study.

Table 9: Median diameters (d(0.5)) and span of the size distributions of fat droplets in the creams (30 wt% fat) (measured in Milli-Q water). Values with different letters in one column are significantly different at $p \leq 0.05$

Creams	d(0.5) (µm)	span
HTAMF(10)	2.1 ± 0.0 ^{a}	1.5 ± 0.1 ^{c}
AMF(10)	1.4 ± 0.2 ^{c}	2.3 ± 0.4 ^{a}
HTAMF(6)	2.1 ± 0.0 ^{a}	1.5 ± 0.1 ^{c}
AMF(6)	1.4 ± 0.2 ^{c}	2.3 ± 0.4 ^{a}
HTST(6)	2.1 ± 0.1 ^{a}	1.6 ± 0.1 ^{b,c}
ST(6)	1.7 ± 0.0 ^{b}	1.6 ± 0.2 ^{b,c}
HTOL(6)	2.1 ± 0.1 ^{a}	1.5 ± 0.1 ^{c}
OL(6)	1.6 ± 0.1 ^{b,c}	1.8 ± 0.0 ^{b}

As the differences in the composition of the creams were expected to impact their thermal properties, they were studied as a function of the type of fat and of the protein adsorbed at the interface (Fig. 19). The results showed that the melting profiles of the creams made from olein, AMF and stearin were different and all corresponded to wide melting ranges with one main melting peak (Fig. 19 A). The three fat fractions started their melting between 0 °C and 5 °C and stopped around 11 °C for olein, 20-25 °C for AMF and 41 °C for stearin. This showed that olein was already melted at 8 °C whereas AMF melted during the increase in temperature from 8 °C to 25 °C (the temperature range representative of oral processing). Stearin only melted very slightly, and remained mainly crystallized in this temperature range. The melting profiles also showed that there was no difference due to the type of protein adsorbed at the interface (native or heat-aggregated). In addition, the SFC of cream calculated at 8 °C differed with the fat fraction (Fig. 19 B). It was

close to 0% for olein and between 45% and 50% for AMF. In the case of stearin, it varied significantly with the interface, with a value of 75% when the interfacial WPI was native and 50% when it was heat-aggregated. The composition of the fat thus had a major impact on the thermal properties of the tailored creams, whereas the type of protein adsorbed at the interface only influenced certain thermal properties (i.e. the SFC of the creams of stearin).

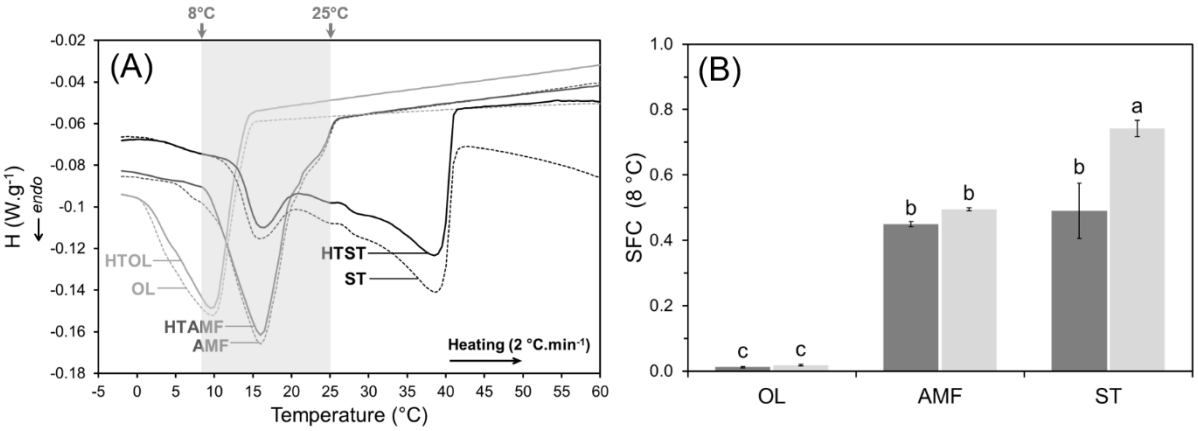


Fig. 19: (A) Average enthalpy profiles during the melting (heating at 2 °C.min-1) of creams (60 wt% fat) cooled at 8 °C (-10 °C), with stearin (ST), AMF or olein (OL) and stabilized either with native WPI (dashed line) or with heat-aggregated (HT) ones (solid line). The range of temperature mimicking oral processing (between 25 and 8 °C) is indicated with a pale grey rectangle. (B) Solid fat content (8 °C) of fat emulsified either with native (pale grey) or with heat-aggregated WPI (dark grey)

The melting profiles obtained for the creams made from the three fat fractions correspond to those expected and are in accordance with those reported in the literature for similar systems (Lopez et al., 2006; Truong et al., 2015). The SFC values obtained at 8 °C are also consistent with the values of 20%, 40% and 60% reported in the literature for olein, AMF and stearin emulsions, respectively (Lopez et al., 2006; Truong et al., 2015). These differences depending on the fat fractions can be linked to their fatty acid composition (Table 7). Indeed, the more unsaturated and the longer the fatty acids, the more difficult the crystallization. Hence, at 8 °C, the fat crystals melted at lower temperature when the SFC was lower. Only one paper by Palanuwech & N. Coupland (2003) reported that crystallization onset temperature increased when a cocoa butter emulsion was stabilized by heat-aggregated WPI (90 °C for 30 min) instead of native WPI, which is in accordance with the results obtained in the present study. In the case of the stearin droplets stabilized with heat-aggregated proteins, the increase in the onset crystallization temperature coupled with the decrease in SFC, suggests that the protein aggregates contributed to the initiation of crystallization, while limiting crystal growth by steric hindrance.

3.2. Rheological and lubrication properties of stirred milk gels

The different creams were used to make stirred milk gels and to evaluate the impact of the fat content, fat fraction and interfacial proteins on the properties of texture (G'_0, G'_f, η_0 and η_f) and lubrication (μ) of the stirred milk gels. The different properties were measured in conditions taking oral processing into account and the results are listed in Table 10. First, the stirred milk gels were similarly ranked according to their rheological properties and three groups differed, mainly depending on their fat fraction and fat content. The first group consisted of the two olein stirred milk gels (HTOL(6), OL(6)), with the lowest viscosities and storage moduli. The second group consisted of the stirred milk gels with intermediate viscosities and storage moduli (AMF(6), HTAMF(6), ST(6), HTST(6)). The third group consisted of the stirred milk gels with the highest fat content (AMF(10), HTAMF(10)), having the highest viscosities and storage moduli. In addition, the viscosities and storage moduli of the stirred milk gels made from AMF tended to be higher when the interfacial proteins were heat-aggregated. This effect was even

more marked (and significant) with a higher fat content.

The effect of the fat content observed is consistent with that already demonstrated for stirred yogurts (Krzeminski et al., 2011). The protein-stabilized fat droplets are fillers known to contribute to the protein network thus explaining the reinforcement of the rheological properties of the stirred milk gel when its fat content is increased (10% instead of 6%). In addition, the literature reported that the fat fraction and interfacial proteins also had an impact on the stiffness of emulsion-filled gels (Liu et al., 2015; Oliver et al., 2015b; Sala et al., 2007) and set milk gels (Cho et al., 1999; Houzé et al., 2005). To the best of our knowledge, this impact has not yet been demonstrated for stirred systems. However, it has been reported that the viscosity of concentrated dispersions was higher when the particles were stiffer (Barnes, 2000). The results obtained in the present study can thus be interpreted by assuming that the stiffer the initial set milk gel, the stiffer its microgels after stirring, and consequently the higher the viscosity and the storage modulus of the stirred milk gel. Some authors reported that an increase in the droplet solid fat content increased the fat droplet hardness and hence the stiffness of the emulsion-filled gel (Liu et al., 2015; Oliver et al., 2015b). In the present study, it can thus be supposed that the olein stirred milk gels had the lowest viscosities and storage moduli because their droplets were liquid at 10 °C and 25 °C, contrary to the AMF and stearin stirred milk gels (whose droplets were at least partly crystallized). Furthermore, Cho et al. (1999) reported an increase in viscosity and storage modulus when the interfacial proteins were heat-aggregated, and the results shown in Table 10 are in good agreement with their results. Liu et al. (2015) and Sala et al. (2007) reported that stronger interactions between the dispersed and continuous phases tended to increase the stiffness of emulsion-filled gels. In the present study, it can thus be assumed that the fat droplets interacted more with the protein network when the interfacial WPI were heat-aggregated. Since we demonstrated in a previous work that heat-aggregated WPI are bigger and more hydrophobic than native ones (Moussier et al., 2019a), the increased interactions between the protein interface and the protein network were probably due to more hydrophobic interactions (Nguyen et al., 2014) and/or stronger mechanical anchoring. In the specific case of stearin, Truong et al. (2015) showed the droplets to be irregular in shape due to the formation of large fat crystals. This may have reduced the interaction between the stearin droplets and the protein network (spatial hindrance), thus limiting the "strengthening" effect of the interfacial heat-aggregated WPI. With olein, the fat droplets were liquid and the effect of the strengthening interface was probably offset, underlining the combined effect of the interface and fat compositions.

Table 10: Textural properties through (i) the storage moduli and the apparent viscosities at the beginning (G'_0, η_0) and at the end (G'_f, η_f) of rheological oral processing, and (ii) the changes they underwent (RG', Rη) between the beginning and the end of rheological oral processing. The friction coefficient (μ) obtained by tribology at 25 °C. Values in the same column with different letters are significantly different at $p \leq 0.05$

Stirred milk gels	G'_0 (Pa)	G'_f (Pa)	η_0 (Pa.s)	η_f (Pa.s)	RG'	Rη	μ
HTAMF(10)	190 ± 20 ^{a}	70 ± 15 ^{a}	0.99 ± 0.04 ^{a}	0.69 ± 0.03 ^{a}	0.36 ± 0.05 ^{c}	0.7 ± 0.03 ^{d}	0.21 ± 0.02 ^{c}
AMF(10)	160 ± 20 ^{b}	60 ± 5 ^{a}	0.82 ± 0.07 ^{b}	0.59 ± 0.04 ^{b}	0.37 ± 0.02 ^{c}	0.72 ± 0.01 ^{c,d}	0.19 ± 0.01 ^{c}
HTAMF(6)	90 ± 10 ^{c}	30 ± 2 ^{b,c}	0.54 ± 0.04 ^{c}	0.41 ± 0.03 ^{c,d}	0.37 ± 0.02 ^{c}	0.75 ± 0.02 ^{b,c}	0.21 ± 0.02 ^{c}
AMF(6)	80 ± 5 ^{c,d}	30 ± 5 ^{c}	0.47 ± 0.02 ^{c,d}	0.36 ± 0.01 ^{c,d}	0.4 ± 0.01 ^{b,c}	0.76 ± 0.01 ^{b}	0.23 ± 0.02 ^{b,c}
HTST(6)	90 ± 10 ^{c}	40 ± 5 ^{b,c}	0.53 ± 0.05 ^{c}	0.39 ± 0.03 ^{c,d}	0.43 ± 0.01 ^{b}	0.74 ± 0.02 ^{b,c}	0.32 ± 0.06 ^{a}
ST(6)	100 ± 30 ^{c}	40 ± 10 ^{b}	0.56 ± 0.14 ^{c}	0.43 ± 0.1 ^{c}	0.44 ± 0.02 ^{b}	0.77 ± 0.02 ^{b}	0.27 ± 0.02 ^{b}
HTOL(6)	60 ± 15 ^{d}	35 ± 5 ^{b,c}	0.4 ± 0.07 ^{d}	0.33 ± 0.06 ^{d}	0.61 ± 0.04 ^{a}	0.83 ± 0.01 ^{a}	0.23 ± 0.02 ^{b,c}
OL(6)	60 ± 5 ^{d}	30 ± 5 ^{b,c}	0.41 ± 0.03 ^{d}	0.34 ± 0.03 ^{d}	0.59 ± 0.02 ^{a}	0.83 ± 0.01 ^{a}	0.19 ± 0.01 ^{c}

Changes in the rheological properties after the temperature was increased from 10 °C to 25 °C (under 60 s^{-1} shearing) were measured using the parameters RG' and Rη (Table 10), which tended towards 0 when the properties varied strongly along the measurement, and towards 1 when they varied only slightly. The stirred milk gels were similarly ranked based on RG' and on Rη, resulting in three main groups that depended mainly on the fat fraction. The RG' and Rη values of stirred milk gels were the lowest with AMF, intermediate with stearin and the highest with olein. In the case of the stirred milk gels made from AMF, the Rη values were even lower for a higher fat content. It was demonstrated in subsection 3.1 that AMF melted completely between 10 °C and 25 °C, whereas the states of stearin (remaining crystallized) and olein (already almost completely melted) did not change much in this temperature range. The differences in RG' and Rη obtained can thus be linked to the thermal properties of the fat fractions.

The friction coefficient (μ) was measured at 25 °C and made it possible to distinguish the stirred milk gels made from stearin (ST(6), HTST(6)) whose μ was significantly higher, from all the other stirred milk gels (Table 10). Several authors demonstrated that the friction coefficient decreased when an oily film was formed after the coalescence of the fat droplets at small gap friction (Chojnicka-Paszun et al., 2012). Since stearin was mainly crystallized at 25 °C, it may not have formed the lubricating oily film, resulting in a higher friction coefficient than with olein and AMF, both of which were completely melted at 25 °C. This effect was strengthened when interfacial WPI was heat-aggregated, probably because the resulting thicker interfacial film was even more resistant to coalescence under shearing in a very small gap.

3.3. Structural properties of stirred milk gels

The microgel median diameters of the stirred milk gels ranged from 11 μm to 21 μm depending on the fat content and on the state of proteins adsorbed at the interface (Table 11). The microgels were smaller when the fat droplet interface was composed of heat-aggregated WPI and when the stirred milk gel contained more fat (i.e. 10 wt%). However, there was no significant effect of the type of fat on the size of the stirred milk microgels.

The order of magnitude of the microgel sizes obtained was close to the sizes reported in the literature (Abhyankar et al., 2014). These results show that stirring resulted in smaller microgels when the texture of the set gel obtained after acidification was strengthened by parameters such as fat content or heat-aggregated WPI at the interface. This is consistent with literature reporting that model emulsion-filled gels were more brittle under stirring if they were stiffer, breaking down into smaller pieces (Chojnicka et al., 2009). Knowing that tailoring the cream affected the stirred milk microgels, it was then decided to analyze in more detail how the proteins, fat droplets and serum were structured in the stirred milk gel matrices.

Table 11: Average diameters (d(0.5)) and span of the size distributions of the microgels of the stirred milk gels. Values with different letters in the same column are significantly different at $p \leq 0.05$

Stirred milk gels	d(0.5) (μm)	span
HTAMF(10)	11 ± 1 ^{d}	1.8 ± 0.3 ^{a}
AMF(10)	15 ± 2 ^{c}	1.6 ± 0.1 ^{b}
HTOL(6)	17 ± 3 ^{b,c}	1.4 ± 0.1 ^{b}
HTAMF(6)	16 ± 2 ^{c}	1.6 ± 0.1 ^{b}
HTST(6)	15 ± 2 ^{c}	1.5 ± 0.1 ^{b}
OL(6)	20 ± 1 ^{a,b}	1.5 ± 0.1 ^{b}
AMF(6)	20 ± 2 ^{a}	1.5 ± 0.1 ^{b}
ST(6)	21 ± 3 ^{a}	1.5 ± 0.2 ^{b}

All the micrographs in Fig. 20 show a protein network (in green), in which the microgels are not visible individually, dispersed fat (in red), serum-filled pores (in black) and fat-protein co-location zones (in yellowish-orange). In all of the micrographs, the fat droplets are aggregated with some yellowish-orange zones typical of dispersed fat stabilized by proteins. The fat droplet aggregates are either separate entities such as microgels (10-20 μm, arrow 2 in Fig. 20) or are embedded in the global protein network (arrow 3 in Fig. 20). The structures are typical of model emulsion-filled gels (Liu et al., 2015) and of stirred yogurts (Huc et al., 2016) described in the literature. There are no visible differences between the micrographs depending on fat fractions (AMF, stearin and olein), and all the micrographs are similar with respect to the distribution of fat droplet aggregates. However, the global protein networks of the stirred milk gels containing more fat or aggregated WPI at the interface appeared to be thinner and less porous. A quantitative analysis was then performed using mathematical morphology in order to provide an objective basis for the structure and to quantify the differences (Fig. 21).

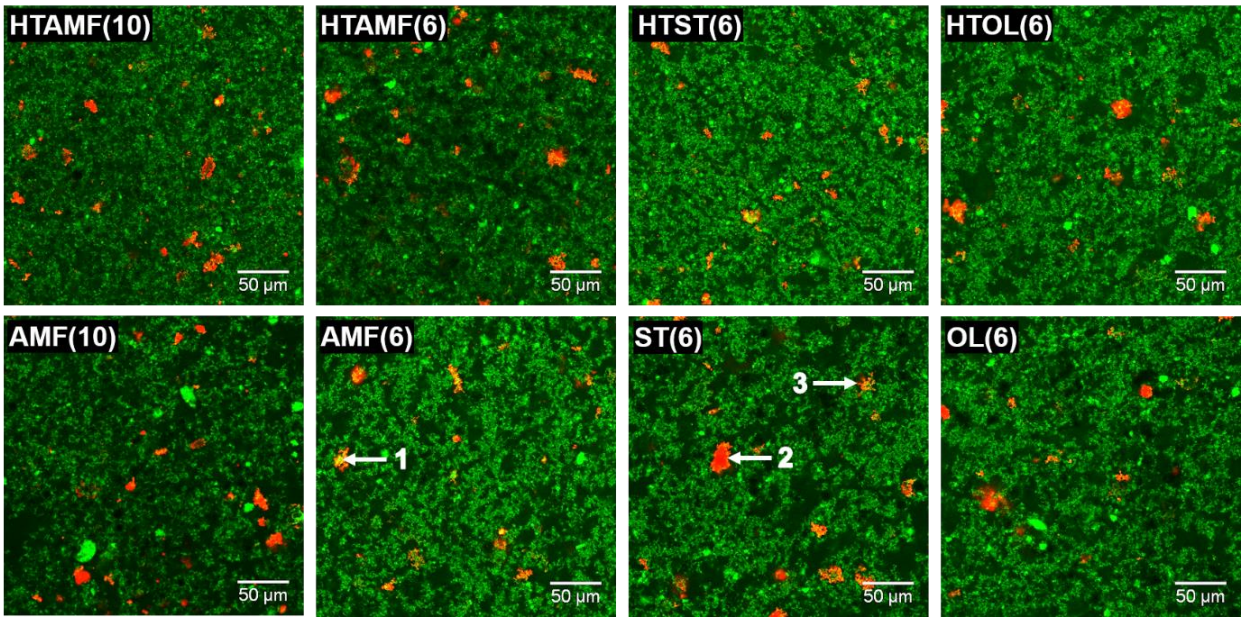


Fig. 20: Images of the different types of stirred milk gels obtained by CLSM. Magnification ×40. Scale bar = 50 µm. Fat droplets are shown in red, the global protein network in green, areas where proteins and fat are co-located are yellowish-orange (arrow 1) and areas containing only serum are black. There are highly aggregated fat droplets in the serum (arrow 2) and embedded in the protein matrix (arrow 3)

The mathematical morphology analysis was performed using the confocal images of the global protein network only, with fat appearing as dark objects (as did serum-filled pores). A 2D score plot (PC1, PC2) was selected from the PCA of the grey level sums (for all dilatations and erosions) obtained using mathematical morphology (Fig. 21 A). The corresponding score plot displays more than 73% of the total information and the stirred milk gel micrographs used for mathematical morphology are well distributed on it, indicating a diversity of the microstructures. The analysis of the PC1 and PC2 loadings (Fig. 21 C) provided interpretations of the axes with respect to the sizes of dark objects (i.e. pores) and light objects (i.e. the protein network). According to these size interpretations, both the dark and light object sizes varied simultaneously on the PC1 and PC2 axes. However, the diagonals D1 and D2 made it possible to distinguish the sizes of the dark and light objects, thereby facilitating the interpretation about the microstructure. Among all the points on the PC1-PC2 mapping, the most discriminating ones (at the extremities) were chosen to interpret D1 and D2 axes (*a*, *b*, *c*, *d*, *e*). The confocal images corresponding to the *a*, *b*, *c*, *d*, and *e* points display different microstructures (Fig. 21 B). As was the case in Fig. 20, the microgels are not visible on any of the confocal images. The images a and *b* show a very thin protein network and small pores, whereas image *d* shows a coarse protein network and large pores. In between, images *c* and *e* both display a quite thin protein network (locally), with small pores in *c* and larger ones in *e*. Based on these discriminating confocal images and the sizes obtained from the loadings, D1 was identified as an axis representing the coarseness of protein network (from thin to coarse) and D2 the size of the pore (from small to large). This quantitative interpretation of the microstructure is similar to the levels of organization that Mellema, Walstra, van Opheusden, & van Vliet (2002) described for skim milk gels (through aggregation and microsyneresis / pores).

All the points of the PC1-PC2 mapping corresponding to the stirred milk gels in the present study (black ellipse in Fig. 21 A) were projected on the D1 and D2 diagonals and their coordinates were collected. The average and standard deviation of the D1 and D2 scores were then calculated for each stirred milk gel (Fig. 22). The D1 scores (Fig. 22 A) had larger standard deviations than D2 scores (Fig. 22 B), meaning greater variability of the images for a given stirred milk gel from the point of view of the coarseness of the protein network. However, the D1 scores differed more from one stirred milk gel to another and were therefore easier to interpret than D2 scores, for which smaller variations were

observed. The high standard deviations of the scores can be explained by the variability when the confocal images were taken. High variability of scores is quite common in mathematical morphology but they nevertheless make it possible to identify trends and to quantitatively interpret the microstructure (Dewaest et al., 2017; Fenoul et al., 2008).

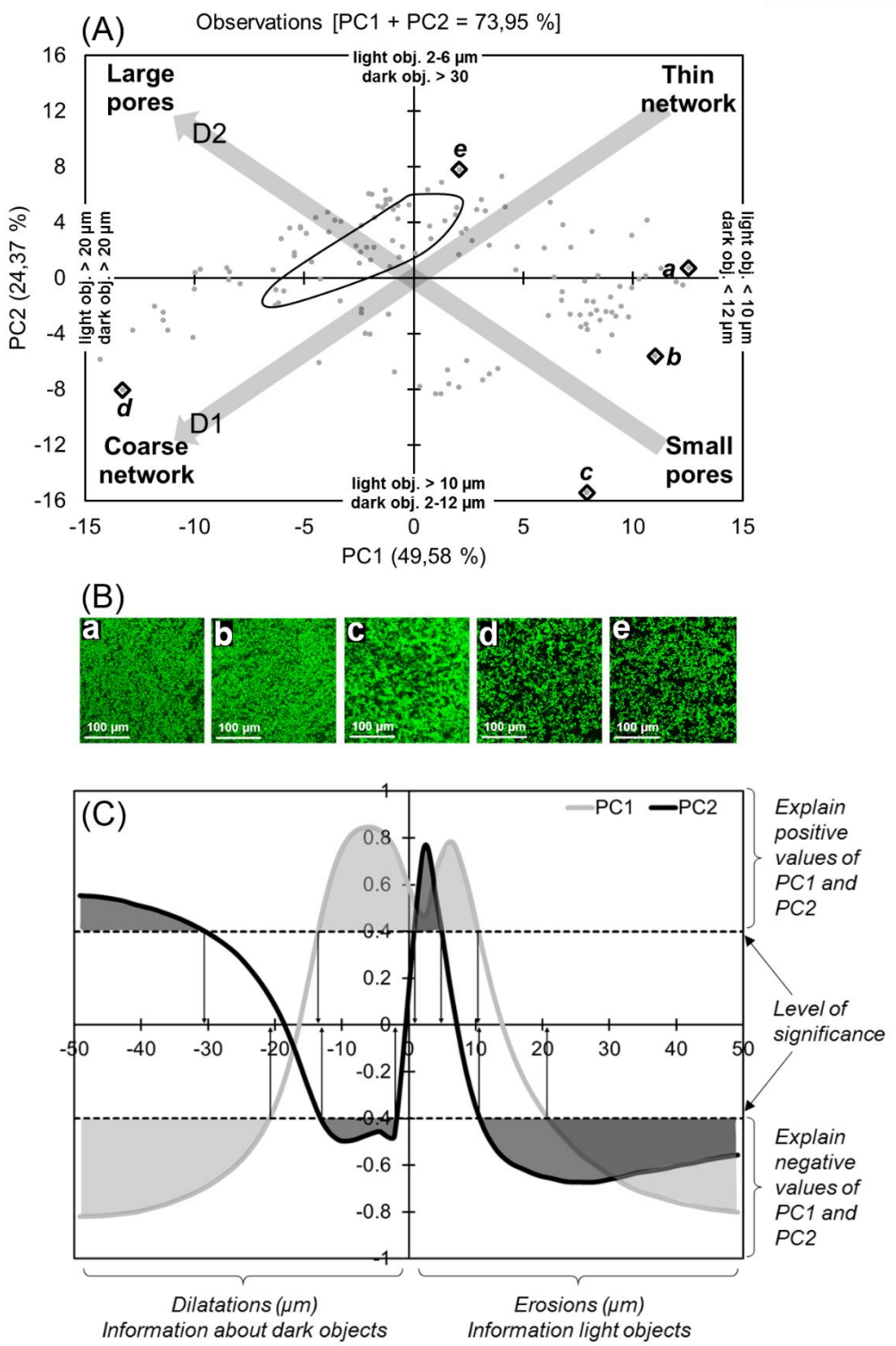


Fig. 21: Mathematical morphology analysis of the protein organization at microscopic scale. (A) PC1-PC2 mapping of stirred milk gels obtained from the PCA and the confocal images, with the ellipse (black line) outlining the area where the stirred milk gels studied in this work are located on the map. (B) Samples a to e illustrate the axes. (C) Loadings of PC1 and PC2 versus micrometers of the size of the structuring element transformation (more details on erosions, dilatations and mathematical morphology are given in subsection 2.5

The protein network coarseness displayed no clear trend (D1, Fig. 22 A) based on fat content. However, the protein networks were globally thinner when the interfacial proteins were heat-aggregated WPI. This effect was even stronger for stirred milk gels made from stearin and olein (HTST(6) < ST(6) and HTOL(6) < OL(6)). Although not statistically significant, the pores (D2 scores, Fig. 22 B), were slightly larger when the fat content was higher. This makes sense, because fat was not taken into account in mathematical morphology analysis, and therefore appeared as pores (in black) on the confocal images. In addition, at the same fat content, the pores in stirred milk gels having heat-aggregated WPI at the interface were larger with olein and AMF (OL(6) < HTOL(6) and AMF(6) < HTAMF(6)) but smaller with stearin (HTST(6) < ST(6)).

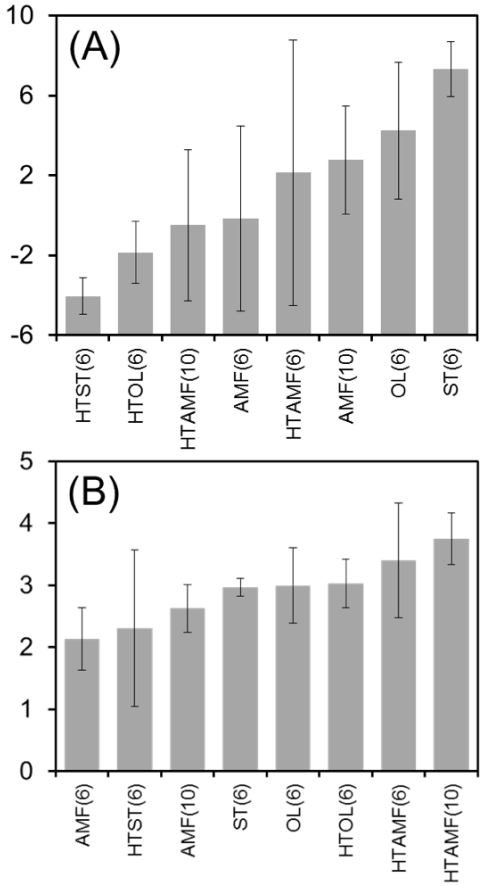


Fig. 22: (A) D1 scores (coarseness of the protein network) and (B) D2 scores (size of the pores) from the mathematical morphology analysis of the stirred milk gel confocal images

These quantitative results indicate that heat-aggregated WPI increased the interactions within the matrix, leading to thinner networks. They confirm our qualitative analysis of the confocal images of the stirred milk gels (Fig. 20). The larger pores quantified for olein and AMF suggest greater syneresis (Mellema et al., 2002; Renan et al., 2009) in the presence of heat-aggregated WPI at the interface, probably due to the stronger interactions in the matrix – via the interface (Cho et al., 1999). In the case of stearin, this effect was not confirmed. It was shown in subsection 3.1 (Fig. 19) that the stearin droplet SFC was not the same if the interfacial proteins were native (SFC of 75%) or heat-aggregated (SFC of 50%). Fredrick, Walstra, & Dewettinck (2010) reported an optimum SFC between 20% and 50%, at which partial coalescence is promoted and above which partial coalescence is much less likely. Palanuwech & N. Coupland (2003) also demonstrated that emulsion destabilization (partial and total coalescence) was possible with aggregated WPI at the interface. In the present study, it is likely that interactions between stearin droplets were enhanced when the interfacial proteins were aggregated WPI through easier partial coalescence, limiting interactions with the protein network and therefore syneresis (i.e. larger pores). It was showed in subsection 3.1 that SFC of the AMF droplets stabilized either with native or heat-aggregated proteins was around 50%. Based on the literature, we expected the partial coalescence of the AMF droplets to be similar to that assumed for stearin droplets stabilized with heat-aggregated WPI, but this was not the case. This result suggests that the types of crystals formed with AMF and stearin were not the same, resulting in different partial coalescence of the droplets.

3.4. Relationship between the stirred milk gel formulation and their structural and textural properties

The variables measured at the different scales were analyzed together in order to see if (and how) they were correlated, and to what extent tailoring the cream made it possible to produce different stirred milk gels. A previous correlation test showed that properties G'_0, G'_f, η_0 and η_f, as well as properties RG' and Rη, were correlated. The properties G' and RG' were therefore selected among all the rheological properties. The previous correlation test also showed that the microgel median size determined by laser diffraction (d(0.5) µgels) and the coarseness of the protein network determined by mathematical morphology (D1) were correlated. This correlation indicated that the thinner the protein network, the smaller the microgels. The properties D2 and d(0.5)

µgels were thus selected as the microstructure indicators for this multi-scale analysis.

The principal component analysis (PCA) plotted in Fig. 23 gives a mapping of the stirred milk gels as a function of all the chosen variables. The selected 2D projection (F1; F2) displays 73% of the total information. According to the correlation loading plot (Fig. 23 A), the F1 axis explains more than 44% of the total information and displays the rheological properties (G'_0 and RG'), SFC (8°C) and d(0.5) µgels. The F2 axis explains almost 29% of the total information through µ(25°C) and D2. Overall, the variables are distributed all around the correlation loading plots, indicating that the studied properties were complementary.

Based on the table listing the Pearson's correlation coefficients (Table 12), G'_0 and RG' were anti-correlated, meaning that the higher the storage modulus of the stirred milk gels, the bigger the decrease in the storage modulus in conditions that account for oral processing. Moreover, the friction coefficient was not correlated with the rheological properties. The two measurement are complementary in characterizing stirred milk gels, as already shown by Huc et al. (2016). Regarding structural properties, no correlation was found between microgel size (d(0.5 µgels) and pore size (D2). This result indicates that the pore size obtained by mathematical morphology is complementary to the microgel size and that there is no direct relationship between these two structural indicators. In addition, Pearson's correlation coefficients revealed different links between the structural and textural (lubrication and rheology) properties. In particular, µ (25°C) was slightly correlated with SFC(8 °C) and anti-correlated with D2. G'_0 was correlated with SFC(8°C) and anti-correlated with d(0.5) µgels. Conversely, RG' was highly anti-correlated with SFC(8°C) and correlated with d(0.5) µgels.

Furthermore, the samples are well distributed on the score plot in Fig. 23 B, indicating that a range of stirred milk gels with different properties was produced by tailoring cream. Different groups can be defined according to both F1 and F2, depending on fat fraction (AMF, olein or stearin), interface (native or heat-aggregated WPI) and fat content (6 or 10 % fat). The stirred milk gels made from olein or containing more fat differed from the other samples on the F1 axis, depending on the rheological properties, the SFC and the size of the microgels. These gels had a small G'_0, a small SFC and a high RG' (i.e. small changes in G' between 8 and 25 °C). On the F2 axis, the stirred milk gels made from stearin differed from the other samples, with a high level of µ(25°C) and small pore size (D2). The stirred milk gels made from AMF all had the same SFC(8°C) but different G'_0 depending on the interface and the fat content: heat-aggregated or a higher fat content led to smaller µ(25°C) and higher G'_0.

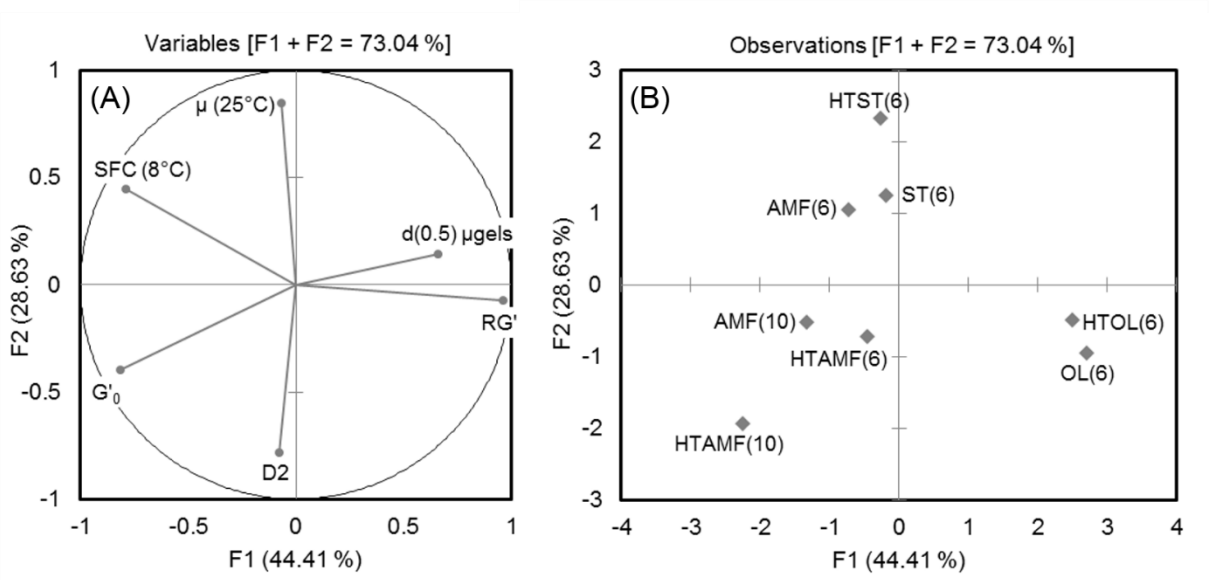


Fig. 23: (A) Correlation loading plot of the functional properties (G'0, RG', µ (25°C)), microstructure indicators (median diameter of the microgels d(0.5) µgels, pore size D2) and solid fat content at 8 °C (SFC (8°C)) and (B) score plot of the different types of stirred milk gels produced

Table 12: Pearson's correlation coefficients between the properties used in Fig. 23 (values in bold indicate significant correlations between properties at $p \leq 0.1$)

Variables	G'_0	RG	μ (25°C)	SFC (8°C)	d(0.5) μgels	D2
G'_0	1	-	-	-	-	-
RG	**- 0.67**	1	-	-	-	-
μ (25°C)	- 0.20	- 0.06	1	-	-	-
SFC (8°C)	+ 0.46	**- 0.82**	+ 0.41	1	-	-
d(0.5) μgels	- 0.48	+ 0.59	+ 0.11	- 0.19	1	-
D2	+ 0.39	- 0.01	- 0.41	- 0.16	+ 0.07	1

The structural parameters and the measured textural properties thus proved to be complementary for the characterization of the stirred milk gels obtained by tailoring the formulation via the fat content, the state of the interfacial protein and the fat composition. The relationship between formulation, structure and texture shown here for realistic dispersions of emulsion-filled microgels, contributes additional results to the literature, in which this relationship has only been shown for model systems up to now (Liu et al., 2015; Oliver et al., 2015b). The resulting effects at different scales are summarized in Fig. 24. First, the change in the fat fraction mainly modified the thermal properties (both melting and SFC), and these modifications affected the final properties of the stirred milk gels at different levels. Still strongly crystallized at 25 °C, stearin generated the highest friction coefficients of the stirred milk gels. As olein was already melted and liquid at 10 °C, it led to the lowest rheological properties. The rheological properties of the stirred yogurts made from olein and stearin changed little between 8 and 25 °C (i.e. high values of RG'), certainly due to the small variations in the SFCs of these two types of fat over this temperature range. By melting between 10 °C and 25 °C, AMF caused the biggest changes in the rheological properties (i.e. lowest RG') in this temperature range. The interface mainly impacted the coarseness of the protein network and the size of the microgels. The heat-aggregated WPI (at the interface) likely increased interactions of the fat droplets among themselves (within the droplet aggregates) and with the protein network (when embedded in the network). This increase in interactions probably strengthened the structure and enhanced its stiffness, which certainly increased its brittleness during stirring and consequently led to smaller microgels (Chojnicka et al., 2009). The small microgels tended to increase the stiffness of stirred milk gels, which may be due to improved homogeneity of the microgels, as shown by Hahn et al. (2015) for stirred milk gels. Finally, big pores tended to decrease friction coefficient, certainly because of the presence of larger amount of serum surrounding the stirred-milk microgels. In the specific case of stearin, the in depth study of the microstructure suggested that droplets increased their partial coalescence when interfacial WPI were heat-aggregated instead of native (due to a more suitable SFC) and this may also explain the slight increase in the friction coefficient then measured. Regarding olein, the droplets were liquid and certainly poorly texturizing, which offset the strengthening effect of heat-aggregated WPI (at the interface). The study thus highlighted that the interface and fat fraction had a combined effect on the stirred milk gel properties.

4. Conclusions

While emulsion-filled gels are relatively well analyzed in the literature, the dispersions of emulsion-filled microgels obtained after stirring have rarely been studied. The aim of the present study was to measure the effects of tailoring the fat fraction (AMF, olein or stearin) and interfacial protein (native or heat-aggregated WPI) of the fat droplets (in cream) on the properties of stirred milk gels. By using a multi-scale approach, this work clearly demonstrated the existence of a relationship between formulation, the structural and macroscopic properties of stirred milk gels. It provided new interpretations that highlight some structuring mechanisms of this complex system, depending on both the fat fraction and the interface. In particular, the present study has shown that crystallized fat droplets can reinforce the texture whereas liquid droplets tended to weaken it. The

level of interactions between the interface and the protein network can be driven by the type of the adsorbed proteins and can modify both the thinness of the protein network and the rheological properties of the stirred milk gel. In addition, small microgels may have been formed when the protein network was thinner, likely because they were less deformable when stirred. As the stirred milk gels were realistically formulated and characterized in conditions that took oral processing (temperature increase under constant shearing) into account, this study suggest that tailoring cream would modify sensory properties and provide interesting levers for future innovations.

Acknowledgements: The authors would like to thank Mélanie Ngo, Morgane Tertre and Congcong Jiang for their contribution to the stirred milk gels and measurements. The authors also thank Marie-Noëlle Maillard for her expertise and the time she devoted to the presentation and measurement of fatty acid compositions (chromatography coupled to mass spectrometry) and Gabrielle Moulin for sharing her experience and spending time measuring microstructures (confocal laser scanning microscopy).

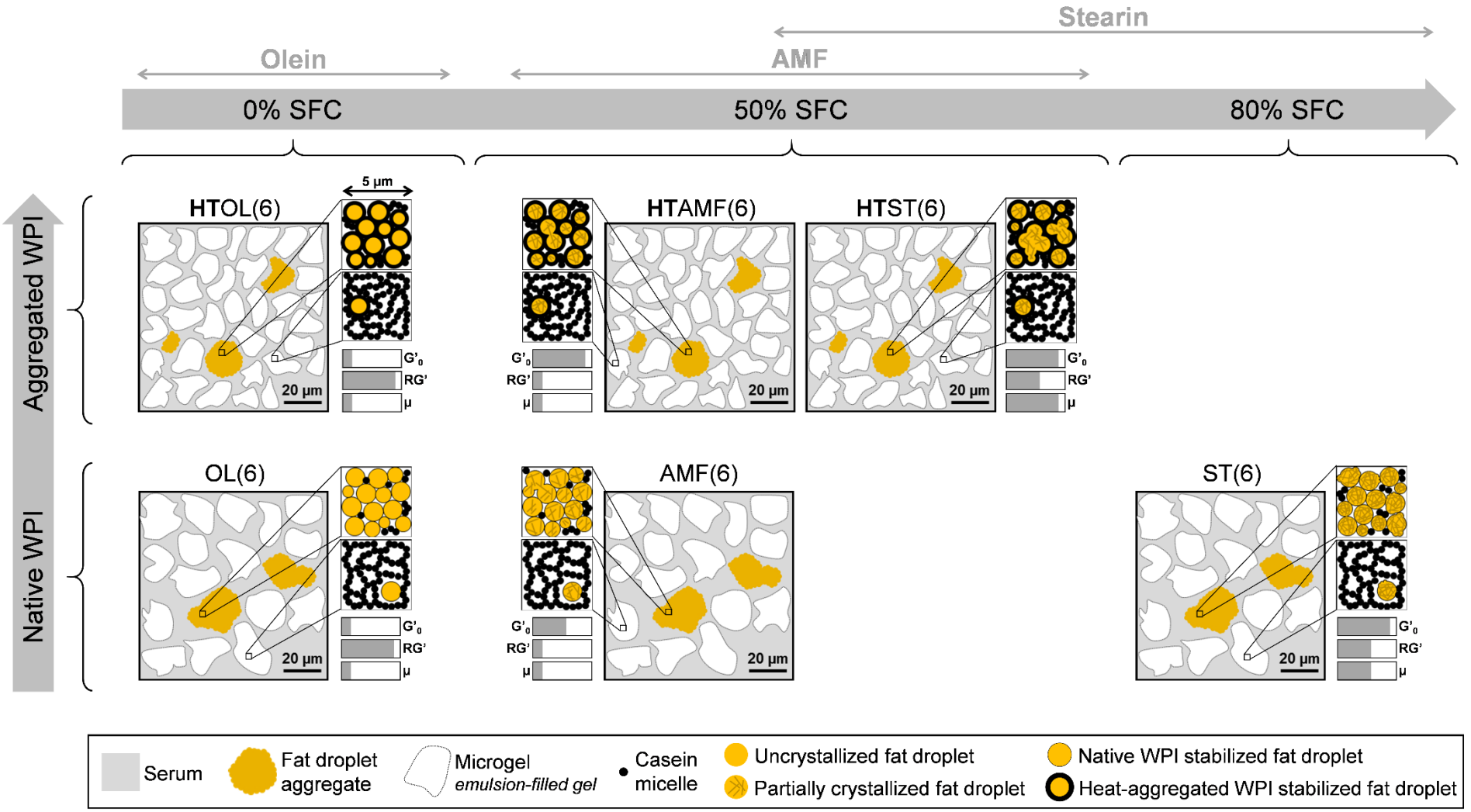


Fig. 24: Diagram showing the relationship between the formulation, structure and texture of 6% fat stirred milk gels (the effect of fat increase being better known). Different creams tailored in terms of fat fraction (AMF, olein or stearin) and interfacial proteins (native or heat-aggregated WPI) led to different thermal properties (SFC) and different stirred milk gel structures (pore size, microgel size, protein network coarseness, interactions of the fat droplets between themselves or with the protein network). All these differences resulted in different textural and lubrication properties (G'0, RG' and µ) of the stirred milk gels measured in conditions that accounted for oral processing

Conclusions et messages clés du chapitre

La modification de **l'interface et du type de matière grasse au sein des globules gras permettent de modifier la structure et les propriétés macroscopiques des yaourts brassés** modèles :

- *L'effet de l'interface :* Elle modifie surtout les **interactions des globules gras entre eux (au sein des agrégats) et avec le réseau protéique (lorsqu'ils sont enchâssés dans le réseau)**, ce qui engendre des modifications de la structure des yaourts brassés (Figure 90). Avec la MGLA, la viscosité (ou le module conservatif) des yaourts brassés dont les protéines sériques de l'interface sont agrégées est plus forte qu'avec des protéines natives.

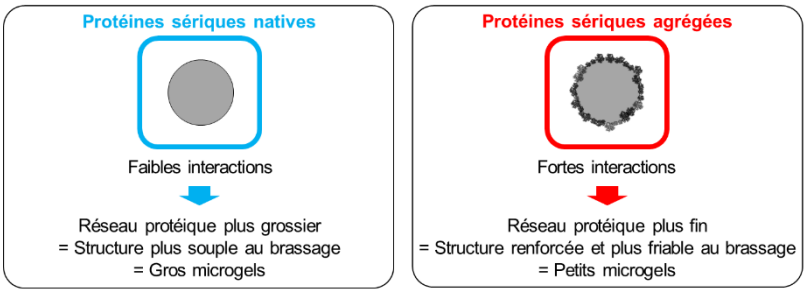


Figure 90 : Principaux impacts de l'interface sur la structure des yaourts brassés (modèles)

- *L'effet de la matière grasse :* Elle modifie principalement les **propriétés de fonte et le taux de solide (SFC) des globules gras**, ce qui impacte les propriétés finales des yaourts brassés (Figure 91).

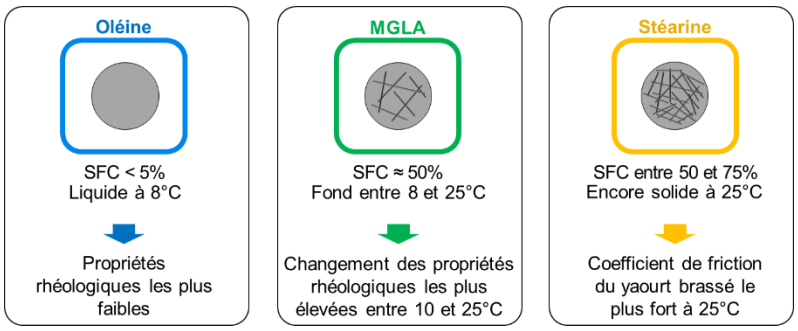


Figure 91 : Principaux impacts du type de matière grasse sur les propriétés macroscopiques des yaourts brassés modèles (laboratoire), en fonction de leurs propriétés thermiques

- *Les **effets combinés matière grasse / interface** :* Les globules gras de stéarine semblent faire plus de coalescence partielle avec des protéines sériques agrégées que natives à l'interface (taux de solide plus adéquat). Les globules gras d'oléine sont liquides (quelle que soit l'interface), ce qui compense l'effet renforçant (texturant) des protéines sériques agrégées à l'interface. D'après le Chapitre 7, quand la fraction volumique des globules gras est élevée (comme au sein des agrégats), l'oléine reste fluide alors que la stéarine prend en masse à 8 °C et ne redevient pas complétement fluide en repassant à 25 °C (changement de l'organisation des globules gras). Ce résultat est cohérent avec le coefficient de frottement (25 °C) plus élevé qui a été obtenu avec la stéarine.

Conclusion générale et perspectives

Le projet SLIM avait pour buts i) d'innover en concevant des yaourts brassés et crèmes glacées allégés en matière grasse mais perçus de façon similaire à des produits à haute teneur en matière grasse, ii) d'aboutir à des solutions d'émulsification et de structuration de la matière grasse et iii) de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu grâce au développement d'outils analytiques et sensoriels d'aide à la décision. Le projet s'est focalisé sur la texture des produits allégés.

La thèse était centrée sur les yaourts brassés riches en matières grasses (> 5%) et avait pour premier objectif de maintenir leur texture crémeuse lors d'une réduction de leur teneur en matière grasse. Pour répondre à cet objectif, le travail s'est orienté sur la structuration de la matrice des yaourts brassés riches en matière grasse (> 5%) par des leviers de composition et de procédé, et ce, sans avoir recours à des additifs.

Structurer pour innover

A-t-il été possible de structurer les yaourts brassés pour maintenir leur texture crémeuse lors d'une réduction de leur teneur en matière grasse ?

Cadre de travail et outils

La texture crémeuse est une combinaison d'un certain niveau de consistance (*épaisseur en bouche*, *résistance à la cuillère*) et d'une perception du gras en bouche (*fondant*, *film gras*, *collant au palais*). Ces caractéristiques sensorielles ont été évaluées à travers des grandeurs instrumentales, après que les conditions de mesure aient été validées comme étant pertinentes par rapport aux propriétés sensorielles. Le niveau de consistance des yaourts brassés a été évalué en mesurant leurs propriétés rhéologiques (viscosité, module conservatif). La capacité des yaourts brassés à former un film gras en bouche a, quant à elle, été évaluée en mesurant le coefficient de friction par tribologie.

Un outil de fabrication de yaourts brassés modèles a été conçu à l'échelle laboratoire. La mini-ligne développée a permis de fabriquer des produits complètement maîtrisés (composition et procédé) avec une grande flexibilité des essais tout en restant cohérent avec l'échelle pilote (procédé de référence). La démarche de conception de cet outil de fabrication a fait l'objet d'un article soumis dans *Journal of Food Engineering* (p. 112). Cet outil a été la base de tout le travail de thèse pour tester l'ensemble des leviers identifiés. Les leviers ont chacun été testés sur des systèmes plus ou moins simplifiés avant d'être associés pour évaluer leur impact combiné sur les yaourts brassés riches en matière grasse.

Effets des leviers pour structurer *à façon* les yaourts brassés riches en matière grasse

La composition et la structure de l'interface se sont avérées être des leviers intéressants pour moduler la structure et les propriétés macroscopiques des yaourts brassés qui sont liées au crémeux. L'état physico-chimique des protéines sériques adsorbées à l'interface a été modulé et a permis de modifier la structuration de l'interface. Les mécanismes de structuration de l'interface et de stabilisation des émulsions par des protéines sériques ayant différents états physico-chimiques ont été finement étudiés. Ce travail de compréhension a été rendu possible par des pré-traitements très hautes pressions des protéines sériques que Yoplait a effectués et par l'étude des propriétés à différentes échelles. Il a fait l'objet d'un article aujourd'hui publié dans *Food Hydrocolloids* (p. 153). L'état physico-chimique des protéines sériques adsorbées à l'interface a également permis de modifier la structuration de yaourts brassés fabriqués en utilisant de la matière laitière anhydride. Les différences de structure engendrées ont permis de faire varier le niveau de consistance des yaourts brassés. Ces différences ont été attribuées à i) différents degrés d'interaction entre l'interface et le réseau protéique, ii) différents niveaux de déformabilité des globules gras et iii) différents types d'interaction entre les globules gras – selon l'état physico-chimique des protéines sériques.

La composition de la matière grasse laitière a montré un effet intéressant sur les propriétés intrinsèques des globules gras, dépendant aussi de la nature de l'interface. Le taux de solide à 8 °C des globules gras de matière

grasse laitière anhydre était d'environ 50% et il était inférieur à 2% pour les globules gras d'oléine. Le taux de solide des globules gras de stéarine variait entre 50 et 75% en fonction de l'interface. Dans la gamme de température correspondant à l'évolution de la température en bouche, l'oléine était liquide et n'évoluait pas, la matière grasse laitière anhydre fondait, et la stéarine restait majoritairement cristallisée. La déformabilité des globules gras et leur interaction a varié en fonction de la composition de l'interface et du taux de solide de la matière grasse. Les globules gras d'oléine (liquides) se sont révélés être plus déformables que ceux de stéarine (cristallisés). Les globules gras stabilisés par des protéines sériques natives étaient plus déformables que ceux stabilisés par des protéines sériques agrégées thermiquement. Les globules gras de stéarine stabilisés par des protéines sériques agrégées thermiquement ont fait plus de coalescence partielle. Globalement, les interactions par jamming semblaient plus fortes avec des protéines sériques agrégées thermiquement qu'avec des protéines sériques natives. Finalement, la stéarine a réduit l'effet lubrifiant de la matière grasse à 25 °C dans les yaourts brassés et l'oléine a diminué le niveau de consistance de ces derniers. Ces travaux sur l'effet de la composition de la matière grasse nous ont donc apporté des leviers d'action supplémentaires pour jouer sur la texture et la perception de la matière grasse dans les yaourts brassés.

L'état physico-chimique des protéines sériques adsorbées à l'interface a impacté la taille des microgels, alors plus petits lorsque les protéines étaient agrégées thermiquement plutôt que natives. La modification du ratio caséines/protéines sériques avec des protéines sériques natives ou agrégées thermiquement a également permis de modifier les propriétés de structure des microgels. Cependant, les conditions testées n'ont permis ni d'augmenter la consistance des yaourts brassés, ni de diminuer leur coefficient de friction.

L'ensemble de ces leviers et leurs liens de cause à effet peuvent être résumés sous la forme du schéma présenté en Figure 92.

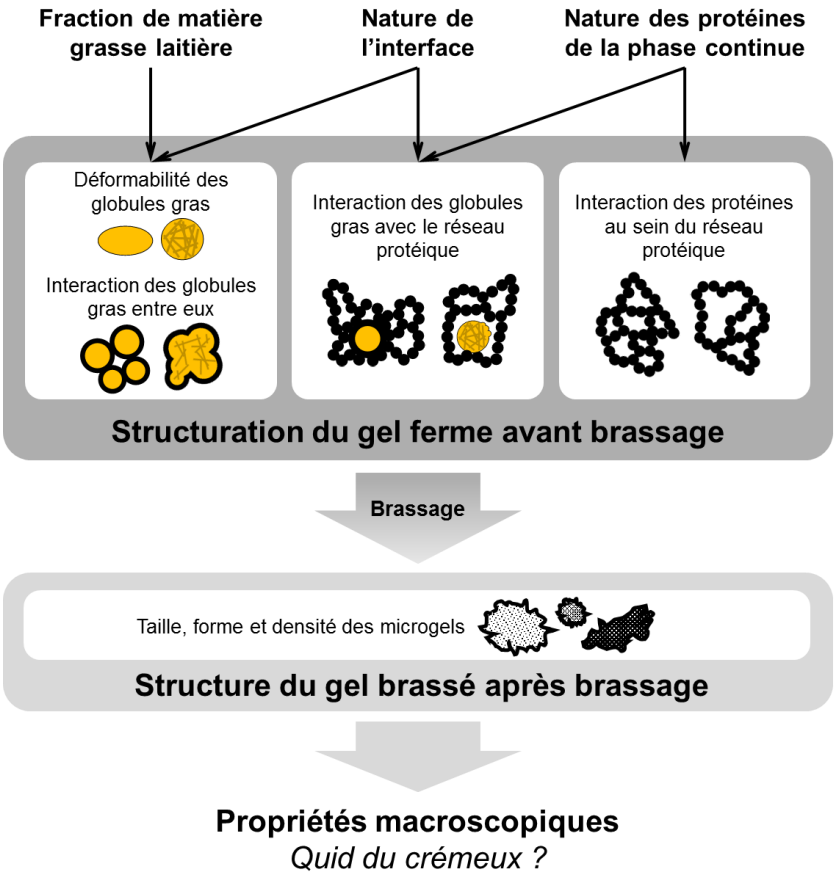


Figure 92 : Modulation de la structure par les différents leviers identifiés pour créer des propriétés macroscopiques innovantes

La taille et la répartition des globules gras ont finalement été étudiées comme des conséquences des autres leviers. Ce levier a fait l'objet d'une étude spécifique dans le cadre du projet SLIM (résultats confidentiels) et s'est révélé être pertinent pour moduler les propriétés des yaourts brassés qui sont liées à leur texture crémeuse.

Hiérarchisation, pistes d'optimisation et perspectives des leviers pour structurer *à façon*

Il est fondamental de noter que tous les leviers sont interdépendants les uns des autres. Il est donc difficile de les hiérarchiser. Cependant, dans les conditions testées, l'interface et l'état de la matière grasse étaient les deux leviers les plus intéressants pour moduler la texture des yaourts brassés. Ces deux leviers ont été regroupés pour mesurer leur effet combiné. Ce travail a clairement démontré l'interdépendance de ces deux leviers et leur impact sur la structuration et les propriétés de texture des yaourts brassés. Par exemple, lorsque les protéines sériques qui stabilisent l'interface étaient natives, la stéarine a permis de rattraper 25% de la viscosité des yaourts brassés perdue lors de la réduction de 10 à 6% de leur teneur en matière grasse. Quand les protéines sériques étaient agrégées thermiquement, la stéarine ne permettait plus de rattraper la viscosité. Ce travail a été rendu possible par la maîtrise du type de protéines placées à l'interface via la reconstitution *à façon* des crèmes puis des yaourts, sur la base du procédé laboratoire précédemment évoqué. Il a fait l'objet d'un article soumis dans *International Dairy Journal* (p. 185).

Si la liste des leviers testés visait à être exhaustive, il est possible d'explorer leurs effets dans des gammes plus larges que ce qui a été fait dans ce travail. D'autres conditions pourraient être testées pour pousser les effets des leviers jusqu'aux extrêmes. De nouvelles matières grasses pourraient être employées et d'autres protéines pourraient être utilisées pour stabiliser l'interface. Si la diminution du ratio caséines/protéines sériques ne s'est pas révélée efficiente pour modifier les propriétés des yaourts brassés, il existe des pistes d'optimisation pour continuer d'étudier ce levier. Par exemple, il pourrait être intéressant d'étudier différents états physico-chimiques des protéines sériques en combinaison avec d'autres ratios caséines/protéines sériques que ceux testés et avec différents moments d'incorporations des protéines sériques au cours du procédé. De plus, excepté dans le cas du prétraitement des protéines sériques, les conditions du procédé sont restées fixes. Il serait intéressant de modifier certains paramètres du procédé tels que le brassage pour modifier la structure et donc la consistance des yaourts brassés. Au début du projet, la teneur en protéine ne devait pas être modifiée. Néanmoins, il s'agit d'un levier très classique, qui pourrait moduler la structure et la texture des yaourts brassés. Des premiers tests sur ce levier ont été réalisés à l'échelle laboratoire et une augmentation de la teneur en protéines de 3,1 à 4,1% dans le yaourt brassé a permis de rattraper près de 60% de la viscosité perdue lors de la réduction de 10 à 6% de leur teneur en matière grasse.

Maintien de la texture crémeuse des yaourts brassés riches en matière grasse lors d'une réduction de leur teneur en matière grasse

La réduction de la teneur en matière grasse de - 40% choisie comme référence était extrêmement ambitieux. Les leviers testés ont permis de compenser seulement une partie de la perte de texture crémeuse dans des conditions aussi drastiques de diminution de la quantité de matière grasse. En revanche, la texture crémeuse a pu être maintenue grâce à des leviers de procédé pour une réduction de la teneur en matière grasse de -10%, ce qui constitue une belle réussite pour le projet SLIM.

Comme les mesures instrumentales ont été effectuées dans des conditions prenant en compte le processus oral, nous pouvons faire des hypothèses sur les conséquences sensorielles de la structuration *à façon* et proposer des leviers qui permettent d'optimiser la texture vers plus de crémeux :

- *Niveau de consistance :* Une interface composée de protéines sériques agrégées thermiquement permet d'augmenter le module conservatif et la viscosité du yaourt brassé et serait donc à privilégier par rapport à des protéines sériques natives. La teneur en protéines pourrait également être augmentée puisqu'elle permet de renforcer la structure et d'augmenter le module conservatif et la viscosité du yaourt brassé. La diminution du ratio caséine/protéines sériques est connue pour augmenter la rigidité des yaourts fermes. Bien qu'il n'a pas permis d'augmenter, dans les conditions utilisées, la viscosité des yaourts brassés, il pourrait très certainement être optimisé. A l'inverse, l'oléine est à éviter puisqu'elle a tendance à réduire la viscosité des yaourts brassés.

– *Perception du gras en bouche :* l'état de la matière grasse a eu un impact sur les propriétés de lubrification des yaourts brassés et pourrait être un levier intéressant pour modifier la perception du gras en bouche. Il pourrait être associé à la taille et à l'interface des globules gras pour que son effet soit renforcé et que la formation d'un film gras en bouche soit facilitée. D'après les propriétés de lubrification mesurées, la stéarine pourrait diminuer la perception d'un film gras en bouche. Les propriétés thermiques et l'évolution des propriétés rhéologiques entre 10 et 25 °C suggèrent, quant à elles, que la matière grasse laitière anhydre est la fraction qui apporterait le plus de fondant aux yaourts brassés en bouche.

En faisant aussi varier la teneur en protéines, il pourrait donc être intéressant de travailler sur l'optimisation du ratio caséine/protéines sériques, sur la taille des globules gras et sur la composition de l'interface dans un yaourt où la matière grasse serait la matière grasse laitière anhydre. Un plan d'expérience pourrait même être mené pour mesurer précisément les effets et leurs interactions.

Comprendre pour mieux structurer

Quels ont été les apports de connaissance de l'approche multi-échelle menée dans des conditions réalistes sur les mécanismes de structuration des yaourts brassés ?

Approche multi-échelle menée dans des conditions réalistes pour mieux comprendre la structuration du yaourt brassé riche en matière grasse

L'étude de la construction de la structure aux différentes échelles a été initialement choisie pour comprendre les mécanismes mis en jeu et développer des outils généralisables à d'autres matrices. Les expérimentations ont été menées dans des conditions les plus réalistes possibles de composition et de procédé tout en maitrisant les productions – d'où le choix d'une acidification par la glucono-δ-lactone. La Figure 93 synthétise l'ensemble de la caractérisation mise en place aux différentes échelles pour mieux comprendre les mécanismes de structuration et faire le lien avec les propriétés macroscopiques.

L'ensemble des caractérisations a permis de confirmer que le yaourt brassé est une dispersion concentrée de microgels. Plusieurs outils de caractérisation des particules sont à la disposition des chercheurs. La diffraction laser, l'analyse dynamique d'images et la reconstruction 3D (à partir d'images confocales) ont été sélectionnées. Une réflexion a été menée sur leur pertinence pour caractériser les microgels qui sont complexes (forme, composition) et dans une gamme de taille allant de quelques centaines de nanomètres à quelques centaines de micromètres. Cette réflexion a fait l'objet d'un article soumis pour publication dans *Food Structure* (p. 129). Ces travaux ont permis de décrire précisément les microgels comme des particules assez hétérogènes, non sphériques, irrégulières en surface (rugueuses), avec des tailles comprises entre 5 et 100 µm et une dimension fractale autour de 2,30. A une échelle inférieure, la structure des microgels est de type émulsion gélifiée avec un mélange i) de nombreux morceaux de réseau protéique avec des globules gras enchâssés à l'intérieur et ii) de quelques gros agrégats de globules gras plus ou moins en interaction avec le réseau protéique qui les entoure. Enfin, comme évoqué plus haut, l'étude de la composition et de la structure de l'interface reliée à l'observation des émulsions a permis l'identification des leviers de procédé à tester pour modifier la texture des yaourts brassés.

L'approche multi-échelle est contraignante à mettre en œuvre et demande du temps de mesure, de traitement des données et d'interprétation des résultats. En revanche, elle permet de comprendre les mécanismes de structuration du yaourt brassé pour faire le lien avec les propriétés macroscopiques. Les résultats qui en sont issus pourront être comparés à ceux obtenus sur d'autres matrices que celle du yaourt brassé, structurées sous forme de dispersion de particules ou d'émulsion gélifiée. Cette démarche générique pourrait permettre de piloter la texture, voire d'aller vers des textures innovantes, en intervenant de façon ciblée sur les propriétés de structure aux différentes échelles. L'intégralité des mesures instrumentales ont été effectuées dans des conditions prenant en compte le processus oral. A l'échelle macroscopique, les propriétés mesurées sont très bien corrélées avec les propriétés sensorielles, ce qui constitue un avantage supplémentaire.

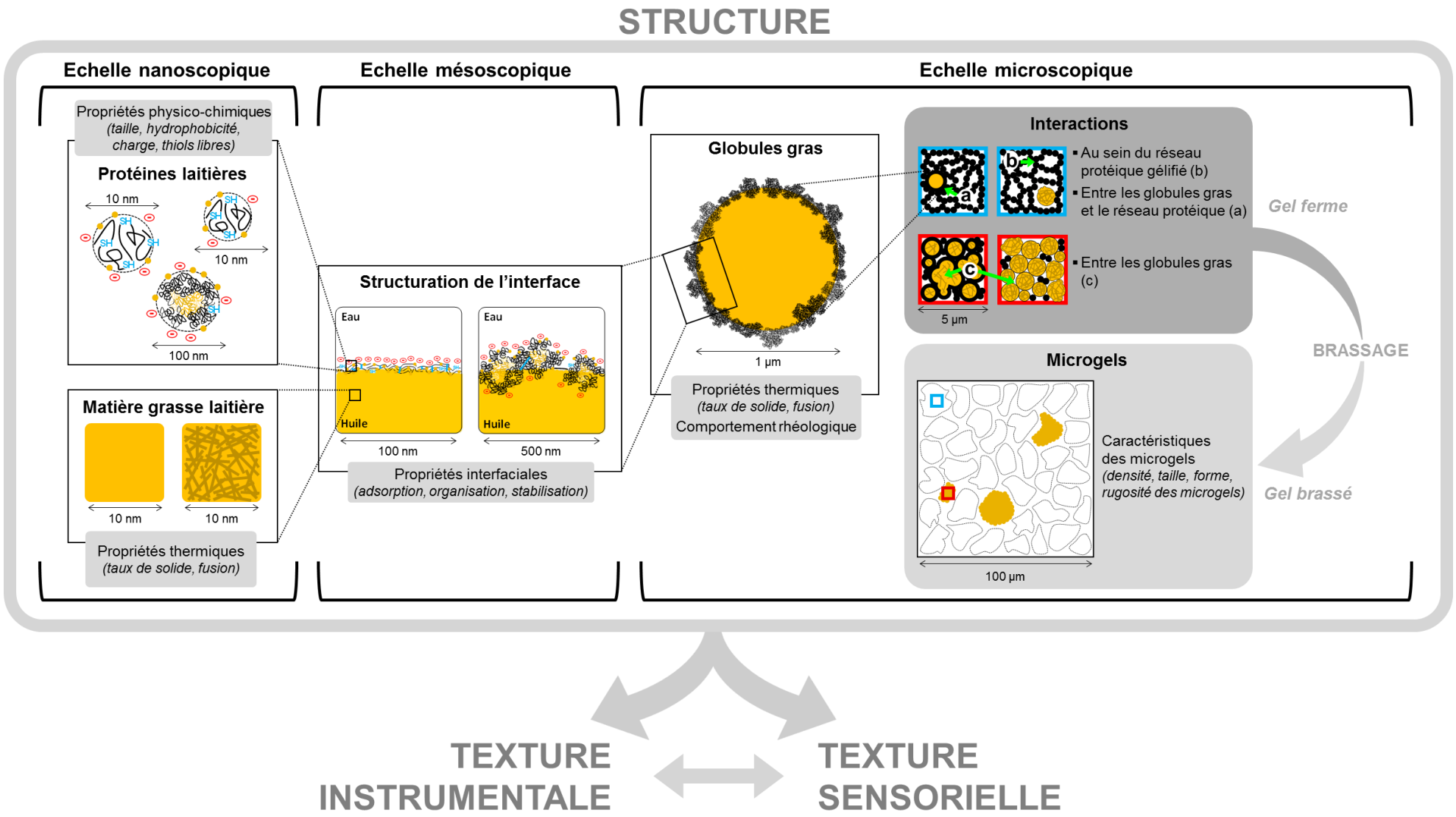


Figure 93 : Caractérisation de la structure aux différentes échelles pour mieux comprendre les mécanismes de structuration de la matrice et leur impact sur la texture à l'échelle macroscopique

Dans un système où tous les ingrédients sont en interaction les uns avec les autres, il nous a semblé plus adéquat de ne pas trop simplifier le système et d'étudier plusieurs leviers en même temps pour pouvoir apporter des conclusions robustes et applicables à plus grande échelle. Néanmoins, cette approche sur système réel peut, en partie, limiter la compréhension des mécanismes et certaines caractérisations nécessitent de le simplifier un minimum. Nous avons choisi de préparer les crèmes dans de l'eau purifiée plutôt que dans du perméat, or, il a été démontré dans le Chapitre 6 que l'environnement pouvait avoir un impact important sur la structuration de l'émulsion. Il pourrait donc être intéressant de poursuivre les investigations en prenant en compte cet aspect.

Mieux comprendre pour moduler les propriétés macroscopiques

Dans la littérature, peu d'études portent sur les yaourts brassés en comparaison avec le nombre important d'articles sur les yaourts fermes. Certains leviers connus pour modifier les propriétés des yaourts fermes se sont avérés moins intéressants sur des systèmes brassés. Le ratio caséine/protéines sériques en est un exemple typique. Bien comprendre les mécanismes de structuration est donc essentiel pour pouvoir optimiser les leviers et les adapter à des systèmes brassés. Le lien entre la structure du gel ferme avant brassage et la structure de la dispersion de microgels après brassage est intéressant à étudier au regard des conditions de composition et de procédé (notamment le brassage). De plus, la rigidité des microgels pourrait être très intéressante à évaluer pour compléter les mesures de leur taille, de leur forme, de leur rugosité et de leur dimension fractale. Une première piste pour y accéder pourrait consister à concentrer les microgels par centrifugation pour mesurer ensuite les propriétés rhéologiques de la suspension très concentrée en microgels en régime harmonique. Une deuxième piste pourrait consister à mesurer la pression osmotique maximale du yaourt brassé par dialyse. Cette deuxième piste est plus complexe à mettre en œuvre mais pourrait éviter de déstructurer les microgels par une centrifugation trop forte. Par la suite, les propriétés rhéologiques macroscopiques des yaourts brassés pourraient être modélisées en fonction de la phase continue (sérum autour) et des propriétés des microgels, elles-mêmes variées par la composition et le procédé.

La caractérisation sensorielle (sous-traitée à Eurosyn) utilisée comme point de départ à ce travail est pertinente par rapport à la démarche d'entreprise de Yoplait. Elle a permis de caractériser la texture des yaourts brassés et de les distinguer de manière cohérente en fonction de leur teneur en matière grasse. Cependant, l'ensemble des termes sensoriels étaient corrélés entre eux et la caractérisation aurait donc pu être simplifiée en utilisant moins de termes. Nous avons développé une méthode dans le cadre du travail de thèse (poster, p. 211) qui ne demande aucun entraînement spécifique des panélistes et présente donc l'avantage d'être moins coûteuse et plus proche du jugement du consommateur final que la méthode plus classique qui est habituellement utilisée par l'industriel. De plus, notre méthode prend la multi-dimensionnalité en compte sans passer par des termes spécifiques qui pourraient être réducteurs ou pas assez représentatifs de la diversité des produits. Par ailleurs, le test de mesure de la préférence de 150 consommatrices qui a été fait constitue une étude robuste. Trois types de comportement face à la modification de la teneur en matière grasse de la référence ont pu être mis en évidence. Si l'appréciation du groupe majoritaire de consommatrices ne variait globalement pas en fonction de la teneur en matière grasse, elle variait pour deux autres plus petits groupes. Il pourrait être intéressant d'étudier d'où viennent ces différents comportements vis-à-vis de la matière grasse et donc d'analyser comment les consommatrices auraient relié leur appréciation à des caractéristiques sensorielles. Cela permettrait de mieux expliquer pourquoi les consommateurs aiment ou n'aiment pas les produits étudiés. De même, la préférence des différents groupes de consommatrices pourrait être reliée aux propriétés mesurées instrumentalement pour identifier les caractéristiques instrumentales importantes à prendre en compte par rapport à la préférence des consommateurs.

Enfin, les propriétés macroscopiques des yaourts brassés ont été modulées par la structuration *à façon* de la matrice sans avoir recours à des additifs. L'approche, les caractérisations et les résultats sur les leviers pourraient tout à fait servir des démarches *clean label* de formulation de produits laitiers fermentés. Plus largement, de nombreux systèmes alimentaires et cosmétiques sont constitués de particules de tailles submicroniques à millimétriques et plusieurs des résultats obtenus ou des techniques mises en œuvre dans ce travail pourraient être réinvestis et combinés pour développer des textures innovantes.

Valorisations scientifiques

Publications dans des revues internationales à comité de lecture

- Moussier M., Huc-Mathis D., Michon C., Bosc V. (2019). **Rational design of a versatile lab-scale stirred milk gel using a reverse engineering approach based on microstructure and textural properties.** *Journal of Food Engineering*. [PUBLIÉ]
  https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.12.018

- Moussier M., Guénard-Lampron V., Lachin K., Moulin G., Turgeon S.L., Michon C., Huc-Mathis D., Bosc V. (2019). **What do the microgels of stirred yogurt really look like? Comparison and combination of laser diffraction, 2D image analysis and 3D reconstruction.** *Food Structure* [PUBLIÉ]
  https://doi.org/10.1016/j.foostr.2019.100107

- Moussier M., Bosc V., Michon C., Pistre V., Chaudemanche C., Huc-mathis D. (2019). **Multi-scale understanding of the effects of the solvent and process on whey protein emulsifying properties : Application to dairy emulsion.** *Food Hydrocolloids*. [PUBLIÉ]
  https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.052

- Moussier M., Huc-Mathis D., Michon C., Chaudemanche C., Bosc V. (2019). **Tailoring cream by modifying the composition of the fat and interfacial proteins to modulate the stirred milk gel texture.** *International Dairy Journal*. [PUBLIÉ]
  https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.04.007

Communications lors de congrès internationaux

- Moussier M., Sieffermann J-M., Huc-Mathis D., Michon C., Chaudemanche C., Demetri N., Bosc V. (2016). **Impact of fat reduction in high-fat yogurt: sensory and instrumental screening**. *4th International Conference on Food Oral Processing (Lausane, Suisse)*. [POSTER]

- Moussier M., Reichl P., Bosc V., Huc-Mathis D., Michon C., Chaudemanche C., Sieffermann J-M. (2016). **Development of a sensory method for a quick and everyday way to screen products without any specific training of panelists**. *7th European Conference on Sensory and Consumer Research (Dijon, France)*. [POSTER]

- Moussier M., Bosc V., Michon C., Chaudemanche C., Huc-Mathis D. (2018). **Effects of the solvent and process on whey protein interfacial properties: from the physical-chemical characteristics to the emulsion microstructure**. *17th Food Colloid Conference (Leeds, Royaume-Uni)*. [POSTER]

- Moussier M., Huc-Mathis D., Michon C., Chaudemanche C., Bosc V. (2018). **Tailored structuring of stirred yogurt type dairy foods using realistic formulation and process levers**. *32nd EFFoST International Conference (Nantes, France)*. [CONFÉRENCE ORALE]

Les différents posters sont présentés dans les pages suivantes.

Impact of fat reduction in high-fat yogurt: sensory and instrumental screening

M. Moussier, J-M. Sieffermann, D. Huc-Mathis, C. Michon, V. Bosc

C. Chaudemanche, N. Demetri

UMR Ingénierie Procédés Aliments *(JRU Food & Process Engineering)*

Context

Fat content reduction is an economic and nutritional challenge for dairy industry.

The **fat is known to greatly participate to texture and creaminess properties of products**, in particular **yogurts** [1,2]. Those properties being essential for the **consumers liking** [3], it is important not to deteriorate them.

A large number of studies on yogurts deals with low-fat and no-fat ones. However, few studies deal with **high-fat yogurts** (*i.e.* above 5 wt%), specifically defined by their **creaminess**.

Research questions

- What is the **impact of fat reduction on the sensory and instrumental properties** of **high-fat yogurts** ?
- **What sort of link(s)** could be made between **sensory properties and instrumental measurements** (in conditions mimicking oral processing) ?

Materials & Methods

Samples

Pilot-scale fermented dairy products (*i.e.* yogurts) with a fat contents > 5 wt%

Progressive reduction of fat content by steps of 1 wt%

A control · B · C · D · E

1 Sensory analysis: **(a) Conventional profiling method** (12 texture panellists) ● **(b) Hedonic scorings** (150 consumers)

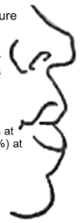
2 Instrumental measurements: **Rheology** and **tribology** analysis in conditions mimicking **oral processing** [4] as much as possible :

(a) Rheology [shearing + temperature]

On the same taking of sample:
(1) Small deformations in linear region (1 Hz, 0.1%) at 10°C ● **(2)** Flow properties at constant shear rate (60 s^{-1}), from 10 to 25°C ● **(3)** Small deformations (1 Hz, 0.1%) at 25°C

(b) Tribology [tongue in contact with palate]

Soft lubrication cell ; Temperature of 20°C ; Normal force of 3N ; Sliding speed between 0.01 and 1000 mm/s (ramp log profile)

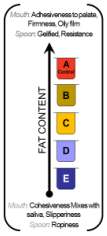


Results obtained for high-fat yogurts in oral processing conditions

(1) Sensory results

(a) Texture profiling (from 0 to 10)

Texture attributes (significant = 9/14) ; Pearson's correlation coefficients.



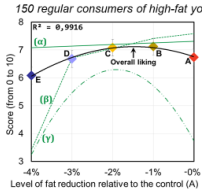
	Fat content	Cohesiveness	Adhesiveness to palate	Firmness	Mixes with saliva	Slipperiness	Oily film	Ropiness	Gelified	Resistance
Fat content	1									
Cohesiveness	**-0.968**	1								
Adhesiveness to palate	**+0.994**	**-0.970**	1							
Firmness	**+0.997**	**-0.983**	**+0.994**	1						
Mixes with saliva	**-0.959**	**+0.915**	**-0.930**	**-0.958**	1					
Slipperiness	**-0.958**	**+0.892**	**-0.933**	**-0.952**	**+0.994**	1				
Oily film	**+0.993**	**-0.955**	**+0.982**	**+0.984**	**-0.937**	**-0.937**	1			
Ropiness	**-0.990**	**+0.933**	**-0.990**	**-0.982**	**+0.946**	**+0.959**	**-0.977**	1		
Gelified	**+0.994**	**-0.960**	**+0.999**	**+0.992**	**-0.938**	**-0.944**	**+0.981**	**-0.995**	1	
Resistance	**+0.995**	**-0.981**	**+0.996**	**+0.999**	**-0.952**	**-0.948**	**+0.978**	**-0.984**	**+0.994**	1

*Values in **bold** are significant at Pc 0.05*

- Five samples are classified according to their fat content, for every attributes.
- All attributes are positively or negatively correlated to each other.

(b) Overall liking (from 0 to 10)

150 regular consumers of high-fat yogurts (2x /week) → 135 consumers selected for analysis (15/150 = noise)

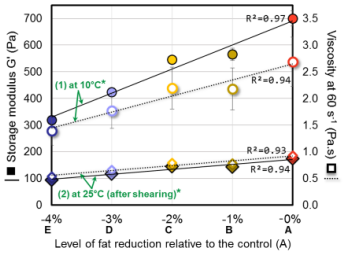


AHC on the 135 consumers selected → 3 groups of consumers:
(α) → n=97 ↔ 71,9% → Consumers liking all products, independently of fat content.
(β) → n=21 ↔ 15,6% → Consumers whom overall liking increases with fat content.
(γ) → n=17 ↔ 12,6% → Consumers whom overall liking corresponds to an optimum.

- There is an optimum of the overall liking.
- The optimum does not correspond to the fattest sample: it is around levels -1% and -2% of fat reduction.

(2) Instrumental results

(a) Rheology



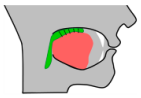
- G' and η (60s^{-1}) are linearly linked to fat content.
- The evolution of yogurts properties between conditions (1) and (2) is not the same according to the fat content.
- Rheological properties are more discriminant at 10°C.

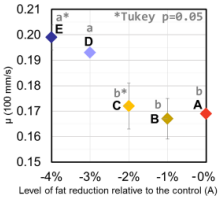
* Properties at (1) the beginning of food oral processing and, (2) the end of food oral processing [4]

(b) Tribology

Friction coefficient = μ (100 mm/s)

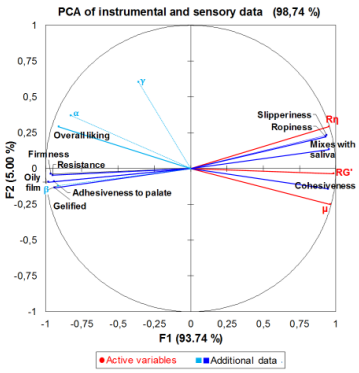
- Regarding tribology, there is no linear evolution of lubrication properties.
- There is a threshold of lubrication properties between levels -3% and -2% of fat reduction.

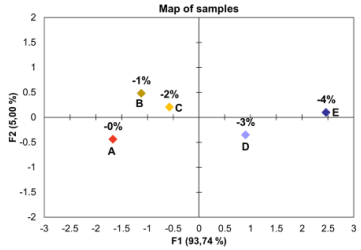




(3) Comparison of the results

Evolution of yogurt properties in mouth is estimated from measurements (in oral processing conditions) through the ratios i) Rη $\left(\frac{\eta_{60s^{-1}}(25°C)}{\eta_{60s^{-1}}(10°C)}\right)$ and ii) RG' $\left(\frac{G'(25°C)}{G'(10°C)}\right)$





In this products space:
- Ratios Rη + RG' and μ(100 mm/s) are good parameters to represent sensory texture attributes.
- The overall liking is mainly negatively correlated with the lubrication properties (μ).

Take-home messages

- For **analytical** measurements and **texture profiling** → **classification of samples is closely linked to fat content**. **Samples are discriminated, even at high-fat contents**.
- **Rheological properties are linearly impacted** by fat reduction. According to fat content → **different evolution** of yogurts **properties in mouth mimicking conditions**.
- **Threshold of lubrication properties** ← between levels -3% and -2% of fat reduction.
- Existence of an **overall liking optimum**, surprisingly **not reached for the fattest** sample.
- In this products space and regarding **texture attributes** used by the expert panel → **fat brings properties of firmness, resistance, adhesiveness and oily film**. Less-fat samples mix better with saliva, are more slippery, ropy and cohesive.
- In this products space, **instrumental data** (mimicking oral processing conditions) **and sensory texture attributes = well correlated** ; The **overall liking** = mainly **correlated with tribology**.

References

[1] Le Calvé, B. et al. Fat Perception: How Sensitive are We? J. Texture Stud. 46, 200–211 (2015).
[2] Lucey, J. A., Munro, P. A. & Singh, H. Rheological Properties and Microstructure of Acid Milk Gels as Affected by Fat Content and Heat Treatment. J. Food Sci. 63, 660–664 (1998).
[3] Richardson-Harman, N. J. et al. Mapping consumer perceptions of creaminess and liking for liquid dairy products. Food Qual. Prefer. 11, 239–246 (2000).
[4] Huc, D., Michon, C., Bedoussac, C. & Bosc, V. Design of a multi-scale texture study of yoghurts using rheology, and tribology mimicking the eating process and microstructure characterisation. Int. Dairy J. 61, 126–134 (2016).

Contact
Marine MOUSSIER
UMR Ingénierie Procédés Aliments
AgroParisTech, INRA, Université Paris Saclay
1 rue des Olympiades, 91300, Massy
marine.moussier@agroparistech.fr

4th International Conference on Food Oral Processing
● Lausanne, Switzerland ●
From 3rd to 6th July 2016

Partner
Cyril CHAUDEMANCHE
Centre Yoplait de Développement
Chemin des Mines, 38200, Vienne
cyril.chaudemanche@yoplait.fr

SLIM • *Indulgent dairy products lighted with new emulsification strategies and food designing tools*
This project is sustained by Single Interministry Fund (France)
Collaborative R&D project certified by Vitagora and Valorial competitiveness clusters

Development of a sensory method for a quick and everyday way to screen products without any specific training of panellists

M. Moussier, P. Reichl, V. Bosc, D. Huc-Mathis, C. Michon, J-M. Sieffermann — C. Chaudemanche, N. Demetri

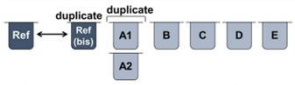
UMR Ingénierie Procédés Aliments *(JRU Food & Process Engineering)*

Objectives

Conventional profiling methods used for sensory studies are reliable tools to characterize samples through mastered attributes. As they require trained panellists, it could be difficult to use them as everyday screening methods. **The present study aims to design a quick screening method comparing some products to a reference without any specific training of the participants.** It is applied to yogurts and more specifically to high-fat yogurts.

1/ Development of a quick and everyday screening method

Materials & Methods

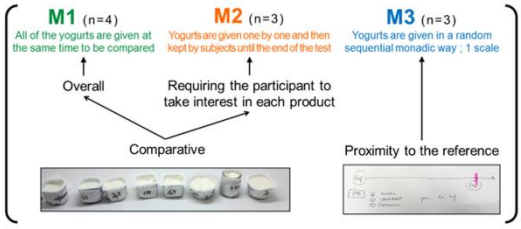


7 yogurts were compared to a reference (**Ref**). Products were selected on the market to consider the variations of the future space studied. They were presented **in blind**.

- **Naïve subjects** (*i.e. without any specific expertise about yogurts or sensory field*).
- Sensory **cabins**.

(a) Comparison of 3 possible methods

Each subject tested only one of the three methods ; yogurts distances to the reference were measured ; subjects were asked to explain why the products were similar or different to the reference.



Results and comparison of the methods

Test duration: M1* ≈ M2 ≈ M3 ≈ 15 min (quick methods).
** Except for some individuals in method 1 : up to 47 min due to the comparative evaluation.*

Ranks of yogurts: M1 ; M3 → pairs of duplicates are grouped ; M3 is more discriminant.

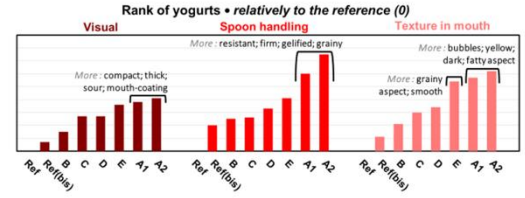
Number of generated terms: M3 (8) > M1 (6) > M2 (4) ; Lack of information for generated texture terms (mouth? spoon?).

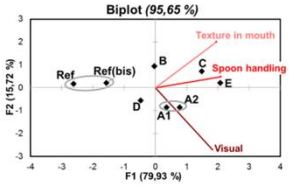
Remarks of subjects: Easier to have a scale to compare yogurts with the reference (M3) ; Improvement of products' presentation (some products packaging might have been easily identified).

(b) Selection of the final method

The selected method was based on M3 with the following modifications :

- **3 scales of comparison** with the reference corresponding to the three steps of the product manipulation : i) visual, ii) spoon handling, iii) texture in mouth aspect (no graduations).
- **Products were left to the subjects throughout the test** (monadic evaluation).
- Subjects had to **explain the differences or similarities to the reference** using their **own word(s)** (n=10).





Test duration: From 10 to 36 min for 7 yogurts to compare to the reference (3 min 20 sec / yogurt).

Other remarks: Texture in mouth and Spoon handling axes are correlated. Visual axis is more different.

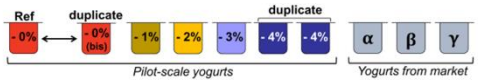
This final method is coherent because it allows grouping the pairs of duplicates. It allows giving a first idea of the proximity to a reference and the nature of the differences in a short enough time = **Proximity method**.

2/ Validation of the proximity method

Materials & Methods

(a) The proximity method

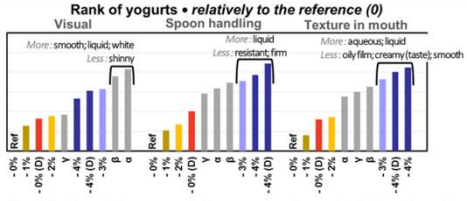
The proximity method was applied to high-fat yogurts (*i.e.* > 5% fat content) : **pilot-scale yogurts** with a progressive reduction of fat content by steps of 1 wt% & high-fat **commercial yogurts** ; Naïve subjects (n=11) :



(b) Conventional profilings *(to compare with proximity method)*

- Texture profiling (n=12).
- Aroma profiling (n=12).
- Applied on the pilot-scale yogurt only ; No duplicates.

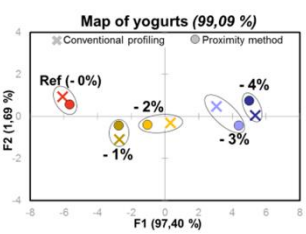
(a) Results of the proximity method

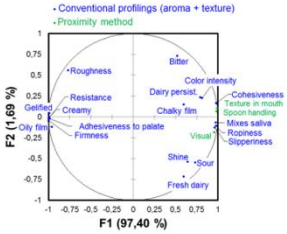


- Between 27 and 49 min needed to compare the 9 yogurts to the reference (4 min 42 sec / yogurt).
- The position of the reference's duplicate (-0%(D)) shows the range of fat content in which the subjects were not able to distinguish the products from the reference.

(b) Comparison with conventional profilings

The proximity method was compared with conventional profilings (aroma + texture) to be validated → For that, General Procrustes Analysis (GPA) was done on the results obtained.





According to GPA, the results obtained with the proximity method are close to the ones obtained with the conventional profiling methods.

Conclusion

Although conventional profiling methods are necessary to accurately select products, the proximity method is a **useful tool**. **Without any specific training, it allows screening during the first steps of a product development** and **quickly exclude candidates which are too different from a reference**.

Contact
Marine MOUSSIER
UMR Ingénierie Procédés Aliments
AgroParisTech, INRA, Université Paris Saclay
1 rue des Olympiades, 91300, Massy
marine.moussier@agroparistech.fr

7th European Conference on Sensory and Consumer Research
• Dijon, France •
From 11th to 14th September 2016

Partner
Cyril CHAUDEMANCHE
Centre Yoplait de Développement
Chemin des Mines, 38200, Vienne
cyril.chaudemanche@yoplait.fr

SLIM • *Indulgent dairy products lighted with new emulsification strategies and food designing tools*
This project is sustained by Single Interministry Fund (France)
Collaborative R&D project certified by Vitagora and Valorial competitiveness clusters

Effects of the solvent and process on whey protein interfacial properties: from the physical-chemical characteristics to the emulsion microstructure

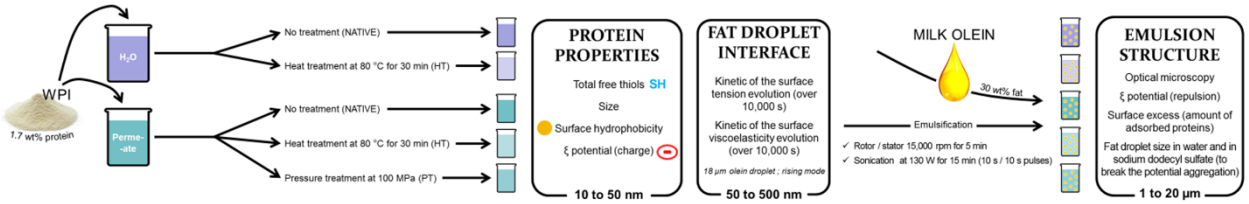
M. Moussier, V. Bosc, C. Michon, D. Huc-Mathis C. Chaudemanche

UMR Ingénierie Procédés Aliments *(JRU Food & Process Engineering)*

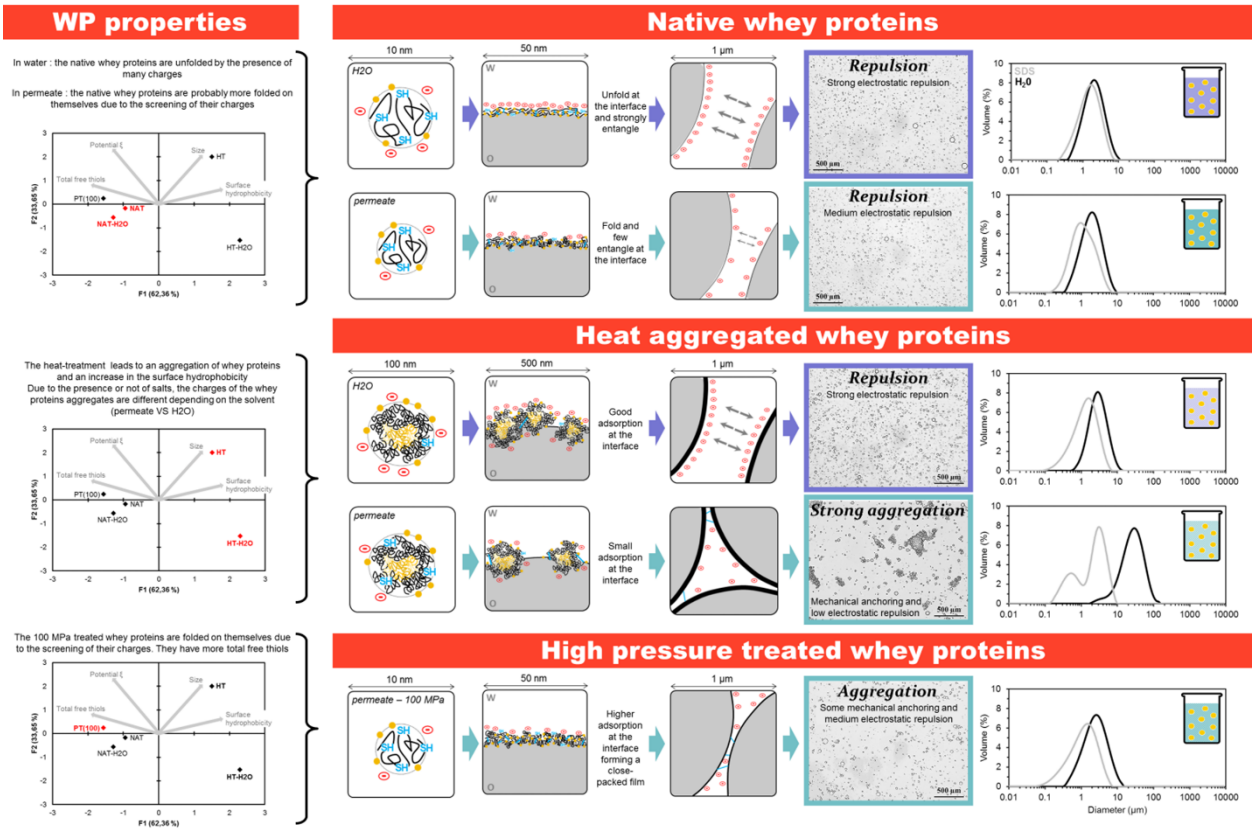
Objectives

- Understand the combined effect of solvent and processing on the emulsifying properties of whey proteins and on their ability to stabilize emulsions.
- Use a multi-scale approach in realistic conditions: 1) nanoscale with the protein conformation ; 2) microscale through the adsorption and reorganization of proteins at the interface ; 3) emulsion structures in the range of 1 to 20 microns.

Materials & Methods



Multiscale understanding of the effects of solvent and process on WPI interfacial properties



Key learnings

The results reveal links between physical-chemical properties, interfacial properties and the final structure of the resulting emulsion. Solvent, high pressure and heat-treatment have impact on the conformation of WPs. It results in different interfacial organization. The emulsions made with the pre-treated WPs have different structures depending on the thickness of the interfacial film, electrostatic repulsion and probably on the disulfide bounding possibilities. These results underline the importance of the effect of the permeate and hence the limitations of working using water as a model. They also demonstrate the effects of using techniques such as very high pressure.

Contact
Marine MOUSSIER
UMR Ingénierie Procédés Aliments
AgroParisTech, INRA, Université Paris Saclay
1 rue des Olympiades, 91300, Massy
marine.moussier@agroparistech.fr

17th Food Colloid Conference
Leeds, UK
From 8th to 11th April 2018

Partner
Cyril CHAUDEMANCHE
Centre Yoplait de Développement
Chemin des Mines, 38200, Vienne
cyril.chaudemanche@yoplait.fr

SLIM • *Indulgent dairy products lighted with new emulsification strategies and food designing tools*
This project is sustained by Single Interministry Fund (France)
Collaborative R&D project certified by Vitagora and Valorial competitiveness clusters

Références bibliographiques

Abd El-Salam, M.H., El-Shibiny, S., Salem, A., 2009. Factors Affecting the Functional Properties of Whey Protein Products: A Review. Food Rev. Int. 25, 251–270. https://doi.org/10.1080/87559120902956224

Abhyankar, A.R., Mulvihill, D.M., Auty, M.A.E., 2014. Combined confocal microscopy and large deformation analysis of emulsion filled gels and stirred acid milk gels. Food Struct. 1, 127–136. https://doi.org/10.1016/j.foostr.2013.12.001

Almanza-Rubio, J.L., Gutiérrez-Méndez, N., Leal-Ramos, M.Y., Sepulveda, D., Salmeron, I., 2015. Modification of the textural and rheological properties of cream cheese using thermosonicated milk. J. Food Eng. 168, 223–230. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.08.002

Amagliani, L., Schmitt, C., 2017. Globular plant protein aggregates for stabilization of food foams and emulsions. Trends Food Sci. Technol. 67, 248–259. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.013

Andoyo, R., Guyomarc'h, F., Cauty, C., Famelart, M.H., 2014. Model mixtures evidence the respective roles of whey protein particles and casein micelles during acid gelation. Food Hydrocoll. 37, 203–212. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.019

Andoyo, R., Guyomarc, F., Burel, A., 2015. Spatial arrangement of casein micelles and whey protein aggregate in acid gels : Insight on mechanisms. Food Hydrocoll. 51, 118–128. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.031

Azim, Z., Corredig, M., Koxholt, M., Alexander, M., 2010. Sol gel transitions during acid gelation of milk containing modified waxy maize starch. Differences between chemical and bacterial acidification measured using rheological and spectroscopic techniques. Int. Dairy J. 20, 785–791. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.04.004

Baalousha, M., Manciulea, A., Cumberland, S., Kendall, K., Lead, J.R., 2008. Aggregation and surface properties of iron oxide nanoparticles: influence of pH and natural organic matter. Environ. Toxicol. Chem. 27, 1875–82. https://doi.org/10.1897/07-559.1

Barnes, H.A., 2000. A handbook of elementary rheology. The University of Wales Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics.

Barrantes, E., Tamine, A.Y., Sword, A.M., Muir, D.D., Kalàb, M., 1996. The Manufacture of Set-type Natural Yoghurt Containing Different Oils - 2 : Rheological Properties and Microstructure. Int. Dairy J. 6, 827–837.

Beal, C., Skokanova, J., Latrille, E., Martin, N., Corrieu, G., 1999. Combined Effects of Culture Conditions and Storage Time on Acidification and Viscosity of Stirred Yogurt. J. Dairy Sci. 82, 673–681. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75283-5

Beverung, C.J., Radke, C.J., Blanch, H.W., 1999. Protein adsorption at the oil/water interface: characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements. Biophys. Chem. 81, 59–80. https://doi.org/10.1016/S0301-4622(99)00082-4

Blank, M.L., Privett, O.S., 1964. Structure of milk fat triglycerides. J. Dairy Sci. 47, 481–488. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(64)88695-1

Bos, M.A., Van Vliet, T., 2001. Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: A review. Adv. Colloid Interface Sci. 91, 437–471. https://doi.org/10.1016/S0001-8686(00)00077-4

Bot, A., Duval, F.P., Bouwman, W.G., 2007. Effect of processing on droplet cluster structure in emulsion gels. Food Hydrocoll. 21, 844–854. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.09.012

Botet, R., 2001. Les fractales en Physique. Techniques 33, 1–18.

Bouaouina, H., Desrumaux, A., Loisel, C., Legrand, J., 2006. Functional properties of whey proteins as affected

by dynamic high-pressure treatment. Int. Dairy J. 16, 275–284. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.05.004

Bouzar, F., Cerning, J., Desmazeaud, M., 1997. Exopolysaccharide Production and Texture-Promoting Abilities of Mixed-Strain Starter Cultures in Yogurt Production. J. Dairy Sci. 80, 2310–2317. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76181-2

Breitschuh, B., Windhab, E.J., 1998. Parameters Influencing Cocrystallization and Polymorphism in Milk Fat. JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc. 75.

Bremer, L.G.B., van Vliet, T., Walstra, P., 1989. Theoretical and experimental study of the fractal nature of the structure of casein gels. J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases 85, 3359–3372. https://doi.org/10.1039/F19898503359

Broyard, C., Gaucheron, F., 2015. Modifications of structures and functions of caseins: a scientific and technological challenge. Dairy Sci. Technol. 95, 831–862. https://doi.org/10.1007/s13594-015-0220-y

Bryant, C.M., McClements, D.J., 2000. Influence of NaCl and CaCl 2 on cold-set gelation of heat-denaturated whey protein. J. Food Sci. 65, 801–804. https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2011.03.103

Bugeat, S., Briard-Bion, V., Pérez, J., Pradel, P., Martin, B., Lesieur, S., Bourgaux, C., Ollivon, M., Lopez, C., 2011. Enrichment in unsaturated fatty acids and emulsion droplet size affect the crystallization behaviour of milk triacylglycerols upon storage at 4°C. Food Res. Int. 44, 1314–1330. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.003

Burns, J.L., Yan, Y., Jameson, G.J., Biggs, S., 1997. A light scattering study of the fractal aggregation behavior of a model colloidal system. Langmuir 13, 6413–6420.

Bushell, G.C., Yan, Y.D., Woodfield, D., Raper, J., Amal, R., 2002. On techniques for the measurement of the mass fractal dimension of aggregates. Adv. Colloid Interface Sci. 95, 1–50. https://doi.org/10.1016/S0001-8686(00)00078-6

Businesscoot, 2018. Le marché du Yaourt en France [WWW Document].

Cadesky, L., Walkling-Ribeiro, M., Kriner, K.T., Karwe, M. V., Moraru, C.I., 2017. Structural changes induced by high-pressure processing in micellar casein and milk protein concentrates. J. Dairy Sci. 100, 7055–7070. https://doi.org/10.3168/jds.2016-12072

Califice, A., Michel, F., Dislaire, G., Pirard, E., 2013. Influence of particle shape on size distribution measurements by 3D and 2D image analyses and laser diffraction. Powder Technol. 237, 67–75. https://doi.org/10.1016/j.powtec.2013.01.003

Calligaris, S., Plazzotta, S., Valoppi, F., Anese, M., 2018. Combined high-power ultrasound and high-pressure homogenization nanoemulsification: The effect of energy density, oil content and emulsifier type and content. Food Res. Int. 107, 700–707. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.017

Campbell, S.D., Goff, H.D., Rousseau, D., 2004. Modeling the Nucleation and Crystallization Kinetics of a Palm Stearin/Canola Oil Blend and Lard in Bulk and Emulsified Form. J. Am. Oil Chem. Soc. 81, 213–219. https://doi.org/10.1007/s11746-004-0884-9

Campos, R., Narine, S.., Marangoni, a. ., 2002. Effect of cooling rate on the structure and mechanical properties of milk fat and lard. Food Res. Int. 35, 971–981. https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00159-X

Cano-Ruiz, M.E., Richter, R.L., 1997. Effect of homogenization pressure on the milk fat globule membrane proteins. J. Dairy. Sci. 80, 2732–2739. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76235-0

Canselier, J., Poux, M., 2004. Procédés d ' émulsification - Mécanismes de formation des émulsions Procédés d ' émulsification Mécanismes de formation des émulsions 33.

Carugo, D., Ankrett, D.N., Zhao, X., Zhang, X., Hill, M., O'Byrne, V., Hoad, J., Arif, M., Wright, D.D.I., Lewis, A.L., 2015. Benefits of polidocanol endovenous microfoam (Varithena®) compared with physician-compounded foams. Phlebology 31, 283–295. https://doi.org/10.1177/0268355515589063

Cayot, P., Fairise, J.F., Colas, B., Lorient, D., Brulé, G., 2003. Improvement of rheological properties of firm acid gels by skim milk heating is conserved after stirring. J. Dairy Res. 70, 423–31. https://doi.org/10.1017/S0022029903006332

Cayot, P., Lorient, D., 1998. Structures et technofonctions des protéines du lait, TEC & DOC. ed. Lavoisier.

Cayot, P., Schenker, F., Houzé, G., Sulmont-Rossé, C., Colas, B., 2008. Creaminess in relation to consistency and particle size in stirred fat-free yogurt. Int. Dairy J. 18, 303–311. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.06.009

Cepuritis, R., Garboczi, E.J., Jacobsen, S., Snyder, K.A., 2017. Comparison of 2-D and 3-D shape analysis of concrete aggregate fines from VSI crushing. Powder Technol. 309, 110–125. https://doi.org/10.1016/j.powtec.2016.12.037

Chardot, V., Banon, S., Misiuwianiec, M., Hardy, J., 2002. Growth kinetics and fractal dimensions of casein particles during acidification. J. Dairy Sci. 85, 8–14. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74046-0

Chevalier, Y., Bolzinger, M.A., 2013. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 439, 23–34. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.02.054

Chevallier, M., Riaublanc, A., Lopez, C., Hamon, P., Rousseau, F., Croguennec, T., 2016. Aggregated whey proteins and trace of caseins synergistically improve the heat stability of whey protein-rich emulsions. Food Hydrocoll. 61, 487–495. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.009

Chever, S., Guyomarc'h, F., Beaucher, E., Famelart, M.H., 2014. High-protein fat-free acid milk gels: Control of protein composition and heat treatment. Int. Dairy J. 37, 95–103. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.02.011

Cho, Y.H., Lucey, J.A., Singh, H., 1999. Rheological properties of acid milk gels as affected by the nature of the fat globule surface material and heat treatment of milk. Int. Dairy J. 9, 537–545. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00123-5

Chojnicka-Paszun, A., de Jongh, H.H.J., de Kruif, C.G., 2012. Sensory perception and lubrication properties of milk: Influence of fat content. Int. Dairy J. 26, 15–22. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.04.003

Chojnicka, A., Sala, G., de Kruif, C.G., van de Velde, F., 2009. The interactions between oil droplets and gel matrix affect the lubrication properties of sheared emulsion-filled gels. Food Hydrocoll. 23, 1038–1046. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.08.008

Chung, C., Degner, B., Julian, D., 2014. Development of Reduced-calorie foods : Microparticulated whey proteins as fat mimetics in semi-solid food emulsions. Food Res. Int. 56, 136–145. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.034

Ciron, C.I.E., Gee, V.L., Kelly, A.L., Auty, M. a E., 2011. Effect of microfluidization of heat-treated milk on rheology and sensory properties of reduced fat yoghurt. Food Hydrocoll. 25, 1470–1476. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.012

Cniel, 2018. L'économie laitière en chiffres.

Coupland, J.N., 2002. Crystallization in emulsions. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 7, 445–450. https://doi.org/10.1016/S1359-0294(02)00080-8

Coutouly, A., Riaublanc, A., Axelos, M., Gaucher, I., 2014. Effect of heat treatment, final pH of acidification, and homogenization pressure on the texture properties of cream cheese. Dairy Sci. Technol. 94, 125–144. https://doi.org/10.1007/s13594-013-0148-z

Croguennec, T., Jeantet, R., Brulé, G., 2008. Fondements physicochimiques de la technologie laitière, TEC & DOC. ed. Lavoisier.

Danthine, S., Blecker, C., Paquot, M., Innocente, N., Danthine, S., Blecker, C., Paquot, M., Innocente, N., Deroanne, C., Anthinea, S.D., Leckera, C.B., Aquota, M.P., Nnocenteb, N.I., Eroannea, C.D., 2000. Evolution des connaissances sur la membrane du globule gras du lait : synth ` ese bibliographique To cite this

version : Évolution des connaissances sur la membrane du globule gras du lait : synthèse bibliographique.

Day, L., Zhai, J., Xu, M., Jones, N.C., Hoffmann, S. V., Wooster, T.J., 2014. Conformational changes of globular proteins adsorbed at oil-in-water emulsion interfaces examined by synchrotron radiation circular dichroism. Food Hydrocoll. 34, 78–87. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.12.015

De Kruif, C.G., Huppertz, T., Urban, V.S., Petukhov, A. V., 2012. Casein micelles and their internal structure. Adv. Colloid Interface Sci. 171–172, 36–52. https://doi.org/10.1016/j.cis.2012.01.002

de Wijk, R.A., Terpstra, M.E.J., Janssen, A.M., Prinz, J.F., 2006. Perceived creaminess of semi-solid foods. Trends Food Sci. Technol. 17, 412–422. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.02.005

Demetriades, K., Coupland, J.N., McClements, D.J., 1997. Physical properties of whey protein stabilized emulsions as related to pH and NaCl. J. Food Sci. 62, 342–347. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb03997.x

Deshmukh, O.S., Van Den Ende, D., Stuart, M.C., Mugele, F., Duits, M.H.G., 2015. Hard and soft colloids at fluid interfaces: Adsorption, interactions, assembly & rheology. Adv. Colloid Interface Sci. 222, 215–217. https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.09.003

Destribats, M., Rouvet, M., Gehin-Delval, C., Schmitt, C., Binks, B.P., 2014. Emulsions stabilised by whey protein microgel particles: towards food-grade Pickering emulsions. Soft Matter 10, 6941–54. https://doi.org/10.1039/c4sm00179f

Devlieghere, F., Vermeiren, L., Debevere, J., 2004. New preservation technologies: Possibilities and limitations. Int. Dairy J. 14, 273–285. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.07.002

Dewaest, M., Villemejane, C., Berland, S., Clément, J., Aliette, V., Michon, C., 2017. Effect of crumb cellular structure characterized by image analysis on cake softness. J. Texture Stud. 1–11. https://doi.org/10.1111/jtxs.12303

Dickinson, E., 2018. On the road to understanding and control of creaminess perception in food colloids. Food Hydrocoll. 77, 372–385. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.014

Dickinson, E., 2016. Exploring the frontiers of colloidal behaviour where polymers and particles meet. Food Hydrocoll. 52, 497–509. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.029

Dickinson, E., 1992. An introduction to food colloids. Oxford science publications, Oxford.

Domenek, S., Petit, E., Ducept, F., Mezdour, S., Brambati, N., Ridoux, C., Guedj, S., Michon, C., 2008. Influence of concentration and ionic strength on the adsorption kinetics of gelatin at the air/water interface. Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 331, 48–55. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2008.06.034

Donato, L., Guyomarc'h, F., 2009. Formation and properties of the whey protein/kappa-casein complexes in heated skim milk - A review. Dairy Sci. Technol. 89, 3–29. https://doi.org/10.1051/dst:2008033

Donato, L., Guyomarc'h, F., 2009. Formation and properties of the whey protein/kappa-casein complexes in heated skim milk - A review. Dairy Sci. Technol. 89, 3–29. https://doi.org/10.1051/dst:2008033

Donato, L., Kolodziejcyk, E., Rouvet, M., 2011. Mixtures of whey protein microgels and soluble aggregates as building blocks to control rheology and structure of acid induced cold-set gels. Food Hydrocoll. 25, 734–742. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.08.020

Douaire, M., Di Bari, V., Norton, J.E., Sullo, a., Lillford, P., Norton, I.T., 2014. Fat crystallisation at oil-water interfaces. Adv. Colloid Interface Sci. 203, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.10.022

Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82, 70–77. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6

Famelart, M.H., Tomazewski, J., Piot, M., Pezennec, S., 2004. Comprehensive study of acid gelation of heated milk with model protein systems. Int. Dairy J. 14, 313–321. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.10.009

FAO/WHO, 2011. Fermented milks CODEX STAN 243-2003, Milk and milk products, second edition. Rome.

FAO, 2013. Milk and dairy products in human nutrition. Rome.

Fenoul, F., Le Denmat, M., Hamdi, F., Cuvelier, G., Michon, C., 2008. Technical Note: Confocal Scanning Laser Microscopy and Quantitative Image Analysis: Application to Cream Cheese Microstructure Investigation. J. Dairy Sci. 91, 1325–1333. https://doi.org/10.3168/jds.2007-0531

Floury, J., Desrumaux, A., Lardieres, J., 2000. Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model. J. Dairy Sci. 1, 127–134. https://doi.org/10.3168/jds.2008-1797

Forrest, S.R., Witten, T.A., 1979. Long-range correlations in smoke-particle aggregates. J. Phys. A. Math. Gen. 12, L109--L117. https://doi.org/10.1088/0305-4470/12/5/008

Foucquier, J., Chantoiseau, E., Le Feunteun, S., Flick, D., Gaucel, S., Perrot, N., 2012. Toward an integrated modeling of the dairy product transformations, a review of the existing mathematical models. Food Hydrocoll. 27, 1–13. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.08.002

Fredrick, E., Moens, K., Heyman, B., Fischer, S., Van der Meeren, P., Dewettinck, K., 2013. Monoacylglycerols in dairy recombined cream: I. The effect on milk fat crystallization. Food Res. Int. 51, 892–898. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.007

Fredrick, E., Van De Walle, D., Walstra, P., Zijtveld, J.H., Fischer, S., Van der Meeren, P., Dewettinck, K., 2011. Isothermal crystallization behaviour of milk fat in bulk and emulsified state. Int. Dairy J. 21, 685–695. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.11.007

Fredrick, E., Walstra, P., Dewettinck, K., 2010. Factors governing partial coalescence in oil-in-water emulsions. Adv. Colloid Interface Sci. 153, 30–42. https://doi.org/10.1016/j.cis.2009.10.003

Frøst, M.B., Janhøj, T., 2007. Understanding creaminess. Int. Dairy J. 17, 1298–1311. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.02.007

Gallier, S., Vocking, K., Post, J.A., Van De Heijning, B., Acton, D., Van Der Beek, E.M., Van Baalen, T., 2015. A novel infant milk formula concept: Mimicking the human milk fat globule structure. Colloids Surfaces B Biointerfaces 136, 329–339. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.09.024

Genovese, D.B., Lozano, J.E., Rao, M.A., 2007. The rheology of colloidal and noncolloidal food dispersions. J. Food Sci. 72. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00253.x

Graham, D.E., Phillips, M.C., 1979. Proteins at liquid interfaces. J. Colloid Interface Sci. 70, 427–439. https://doi.org/10.1016/0021-9797(79)90050-X

Granger, C., Barey, P., Veschambre, P., Cansell, M., 2005. Physicochemical behavior of oil-in-water emulsions: Influence of milk protein mixtures, glycerol ester mixtures and fat characteristics. Colloids Surfaces B Biointerfaces 42, 235–243. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.09.006

Gregory, J., 2009. Monitoring particle aggregation processes. Adv. Colloid Interface Sci. 147–148, 109–123.

Hahn, C., Müller, E., Wille, S., Weiss, J., Atamer, Z., Hinrichs, J., 2014. Control of microgel particle growth in fresh cheese (concentrated fermented milk) with an exopolysaccharide-producing starter culture. Int. Dairy J. 36, 46–54. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.12.011

Hahn, C., Nöbel, S., Maisch, R., Rösingh, W., Weiss, J., Hinrichs, J., 2015. Adjusting rheological properties of concentrated microgel suspensions by particle size distribution. Food Hydrocoll. 49, 183–191. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.03.020

Hahn, C., Sramek, M., Nöbel, S., Hinrichs, J., 2012a. Post-processing of concentrated fermented milk: Influence of temperature and holding time on the formation of particle clusters. Dairy Sci. Technol. 92, 91–107. https://doi.org/10.1007/s13594-011-0046-1

Hahn, C., Wachter, T., Nöbel, S., Weiss, J., Eibel, H., Hinrichs, J., 2012b. Graininess in fresh cheese as affected by post-processing: Influence of tempering and mechanical treatment. Int. Dairy J. 26, 73–77. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.12.013

Hentschel, M.L., Page, N.W., 2003. Selection of descriptors for particle shape characterization. Part. Part. Syst. Charact. 20, 25–38. https://doi.org/10.1002/ppsc.200390002

Holt, C., Horne, D.S., 1996. The hairy casein micelle: Evolution of the concept and its implications for dairy technology. Netherlands Milk Dairy J. 50, 85–111.

Houzé, G., Cases, E., Colas, B., Cayot, P., 2005. Viscoelastic properties of acid milk gel as affected by fat nature at low level. Int. Dairy J. 15, 1006–1016. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.09.007

Huc-Mathis, D., Bousquières, J., Mamou, M., Bonazzi, C., Michon, C., 2017. Multiscale evaluation from one bubble to the foam of surface active properties of cellulose derivatives used for a starchy model sponge cake. Food Hydrocoll. 71, 129–140. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.03.038

Huc, D., Michon, C., Bedoussac, C., Bosc, V., 2016. Design of a multi-scale texture study of yoghurts using rheology, and tribology mimicking the eating process and microstructure characterisation. Int. Dairy J. 61, 126–134. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.05.003

Huppertz, T., Gazi, I., Luyten, H., Nieuwenhuijse, H., Alting, A., Schokker, E., 2017. Hydration of casein micelles and caseinates: Implications for casein micelle structure. Int. Dairy J. 74, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.03.006

Ipsen, R., 2017. Microparticulated whey proteins for improving dairy product texture. Int. Dairy J. 67, 73–79. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.08.009

Jacob, M., Nöbel, S., Jaros, D., Rohm, H., 2011. Physical properties of acid milk gels: Acidification rate significantly interacts with cross-linking and heat treatment of milk. Food Hydrocoll. 25, 928–934. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.09.003

Janhoj, T., Frost, M.B., Prinz, J., Ipsen, R., 2009. Sensory and instrumental characterization of low-fat and non-fat cream cheese. Int. J. Food Prop. 12, 211–227. https://doi.org/10.1080/10942910802252007

Jeantet, R., Croguennec, T., Mahaut, M., Schuck, P., Brulé, G., 2008. Les produits laitiers - 2ème édition, TEC & DOC. ed. Lavoisier.

Jensen, R.G., 2002. The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2000. J. Dairy Sci. 85, 295–350. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74079-4

Jensen, R.G., Sampugna, J., 1966. Triglyceride Structure of Cow's Milk Fat . A Review. J. Dairy Sci. 49, 460–468. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(66)87897-9

Ji, Y. (Donna), Lee, S.K., Anema, S.G., 2011. Effect of heat treatments and homogenisation pressure on the acid gelation properties of recombined whole milk. Food Chem. 129, 463–471. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.099

Jiang, Q., Logan, B.E., 1991. Fractal Dimensions of Aggregates Determined from Steady-State Size Distributions. Environ. Sci. Technol. 25, 2031–2038. https://doi.org/10.1021/es00024a007

Jung, J.-M., Savin, G., Pouzot, M., Schmitt, C., Mezzenga, R., 2008. Structure of Heat-Induced β-Lactoglobulin Aggregates and their Complexes with Sodium-Dodecyl Sulfate. Biomacromolecules 9, 2477–2486. https://doi.org/10.1021/bm800502j

Kilcast, D., Clegg, S., 2002. Sensory perception of creaminess and its relationship with food structure. Food Qual. Prefer. 13, 609–623. https://doi.org/10.1016/S0950-3293(02)00074-5

Kim, H.S., Mason, T.G., 2017. Advances and challenges in the rheology of concentrated emulsions and nanoemulsions. Adv. Colloid Interface Sci. 247, 397–412. https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.07.002

Köhler, U., Stübinger, T., List, J., Witt, W., 2008. Investigations on non-Spherical Reference Material Using Laser Diffraction and Dynamic Image Analysis, Particulate systems analysis.

Krzeminski, A., Großhable, K., Hinrichs, J., 2011. Structural properties of stirred yoghurt as influenced by whey proteins. LWT - Food Sci. Technol. 44, 2134–2140. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.05.018

Lachin, K., Le Sauze, N., Di Miceli Raimondi, N., Aubin, J., Gourdon, C., Cabassud, M., 2017. Aggregation and

breakup of acrylic latex particles inside millimetric scale reactors. Chem. Eng. Process. Process Intensif. 113, 65–73. https://doi.org/10.1016/j.cep.2016.09.021

Lachin, M.K., Schaer, M.E., Lorraine, U.D.E., Montillet, M.A., Nantes, U.D.E., Frances, M.C., Toulouse, I.N.P., Nathalie, M., Sauze, L.E., Sabatier, U.P., Nathalie, M., Di, R., Sabatier, U.P., Mckenna, M.T., Lyon, U., 2016. De la stabilité à la coagulation de latex acrylique : étude des mécanismes et mise en oeuvre en milliréacteur.

Laiho, S., Williams, R.P.W., Poelman, A., Appelqvist, I., Logan, A., 2017. Effect of whey protein phase volume on the tribology, rheology and sensory properties of fat-free stirred yoghurts. Food Hydrocoll. 67, 166–177. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.017

Lam, R.S.H., Nickerson, M.T., 2013. Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure-function approach. Food Chem. 141, 975–984. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.038

Lazzari, S., Nicoud, L., Jaquet, B., Lattuada, M., Morbidelli, M., 2016. Fractal-like structures in colloid science. Adv. Colloid Interface Sci. 235, 1–13. https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.05.002

Le Calvé, B., Saint-Léger, C., Babas, R., Gelin, J.-L., Parker, A., Erni, P., Cayeux, I., 2015. Fat Perception: How Sensitive are We? J. Texture Stud. 46, 200–211. https://doi.org/10.1111/jtxs.12120

Lee, C., Kramer, T.A., 2004. Prediction of three-dimensional fractal dimensions using the two-dimensional properties of fractal aggregates. Adv. Colloid Interface Sci. 112, 49–57. https://doi.org/10.1016/j.cis.2004.07.001

Lee, W.-J., Lucey, J.A., 2006. Impact of Gelation Conditions and Structural Breakdown on the Physical and Sensory Properties of Stirred Yogurts. J. Dairy Sci. 89, 2374–2385. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72310-4

Lee, W.J., Lucey, J.A., 2010. Formation and physical properties of Yogurt. AJAS 23, 1127–1136.

Leverrier, C., Moulin, G., Cuvelier, G., Almeida, G., 2017. Assessment of deformability of soft plant cells by 3D imaging. Food Struct. 14, 95–103. https://doi.org/10.1016/j.foostr.2017.07.002

List, J., Köhler, U., Witt, W., Gmbh, S., Pulverhaus, A., 2011. Dynamic Image Analysis extended to Fine and Coarse Particles. Part. Syst. Anal. 1–5.

Liu, K., Stieger, M., van der Linden, E., van de Velde, F., 2015. Fat droplet characteristics affect rheological, tribological and sensory properties of food gels. Food Hydrocoll. 44, 244–259. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.034

Loiseleux, T., 2017. Compétition interfaciale entre protéines solubles et agrégées : connectivité des gouttelettes et texture des émulsions laitières. Université de Nantes.

Lopez, C., 2011. Milk fat globules enveloped by their biological membrane: Unique colloidal assemblies with a specific composition and structure. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 16, 391–404. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2011.05.007

Lopez, C., 2005. Focus on the supramolecular structure of milk fat in dairy products. Reprod. Nutr. Dev. 45, 497–511. https://doi.org/10.1051/rnd

Lopez, C., Bougaux, C., Lesieur, P., Bernadou, S., Keller, G., Ollivon, M., 2002. Thermal and Structural Behavior of Milk Fat: 3. Influence of Cooling Rate and Droplet Size on Cream Crystallization. J. Colloid Interface Sci. 254, 64–78. https://doi.org/10.1006/jcis.2000.6988

Lopez, C., Bourgaux, C., Lesieur, P., Ollivon, M., 2007. Coupling of time-resolved synchrotron X-ray di ff raction and DSC to elucidate the crystallisation properties and polymorphism of triglycerides in milk fat globules. Dairy Sci. Technol. 87, 459–480. https://doi.org/10.1051/lait

Lopez, C., Briard-Bion, V., Camier, B., Gassi, J.-Y., 2006. Milk Fat Thermal Properties and Solid Fat Content in Emmental Cheese: A Differential Scanning Calorimetry Study. J. Dairy Sci. 89, 2894–2910. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72562-0

Lopez, C., Briard-Bion, V., Ménard, O., 2014. Polar lipids, sphingomyelin and long-chain unsaturated fatty acids from the milk fat globule membrane are increased in milks produced by cows fed fresh pasture based diet during spring. Food Res. Int. 58, 59–68. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.049

Lopez, C., Briard-Bion, V., Ménard, O., Beaucher, E., Rousseau, F., Fauquant, J., Leconte, N., Robert, B., 2011. Fat globules selected from whole milk according to their size: Different compositions and structure of the biomembrane, revealing sphingomyelin-rich domains. Food Chem. 125, 355–368. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.005

Lopez, C., Lesieur, P., Keller, G., Ollivon, M., 2000. Thermal and structural behavior of milk fat 1. Unstable species of cream. J. Colloid Interface Sci. 229, 62–71. https://doi.org/10.1006/jcis.2000.6988

Lopez, C., Madec, M.-N., Jimenez-Flores, R., 2010. Lipid rafts in the bovine milk fat globule membrane revealed by the lateral segregation of phospholipids and heterogeneous distribution of glycoproteins. Food Chem. 120, 22–33. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.065

Lopez, C., Ollivon, M., 2009. Triglycerides obtained by dry fractionation of milk fat. 2. Thermal properties and polymorphic evolutions on heating. Chem. Phys. Lipids 159, 1–12. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2009.02.009

Loveday, S.M., Sarkar, A., Singh, H., 2013. Innovative yoghurts: Novel processing technologies for improving acid milk gel texture. Trends Food Sci. Technol. 33, 5–20. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.06.007

LSA, 2017. L'ultrafrais revoit son marchandising [WWW Document].

Lucey, J.A., Munro, P.A., Singh, H., 1998. Rheological Properties and Microstructure of Acid Milk Gels as Affected by Fat Content and Heat Treatment. J. Food Sci. 63, 660–664. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15807.x

Lucey, J.A., Tamehana, M., Singh, H., Munro, P.A., 1998. A comparison of the formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or glucono-delta-lactone. Food Res. Int. 31, 147–155. https://doi.org/10.1016/S0963-9969(98)00075-1

Mahmoudi, N., Gaillard, C., Boué, F., Axelos, M.A.V., Riaublanc, A., 2010. Self-similar assemblies of globular whey proteins at the air-water interface: Effect of the structure. J. Colloid Interface Sci. 345, 54–63. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.01.036

Mallipeddi, R., Saripella, K.K., Neau, S.H., 2014. Use of fine particle ethylcellulose as the diluent in the production of pellets by extrusion-spheronization. Saudi Pharm. J. 22, 360–372. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.11.001

Malvern Instruments Ltd., 2007. Mastersizer 2000 - User Manual - MAN0384 Issue 1.0.

Mandelbrot, B., 1975. Les objets fractals, forme, hasard et dimension. Flammarion, Paris.

Marangoni, A.G., Lencki, R.W., 1998. Ternary Phase Behavior of Milk Fat Fractions. J. Agric. Food Chem. 46, 3879–3884. https://doi.org/10.1021/jf9801668

Marangoni, A.G., Wesdorp, L.H., 2012. Structure and properties of fat crystal networks, CRC Press. ed. Group, Taylor & Francis.

Mazzanti, G., Marangoni, A.G., Idziak, S.H.J., 2009. Synchrotron study on crystallization kinetics of milk fat under shear flow. Food Res. Int. 42, 682–694. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.009

McClements, D.J., 2012. Crystals and crystallization in oil-in-water emulsions: Implications for emulsion-based delivery systems. Adv. Colloid Interface Sci. 174, 1–30. https://doi.org/10.1016/j.cis.2012.03.002

McClements, D.J., 2005. Food Emulsions: Principles, practises, and techniques, CRC Press. ed.

McMahon, D.J., Brown, R.J., 1984. Composition, Structure, and Integrity of Casein Micelles: A Review. J. Dairy Sci. 67, 499–512. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81332-6

McMahon, D.J., Du, H., McManus, W.R., Larsen, K.M., 2009. Microstructural changes in casein supramolecules during acidification of skim milk. J. Dairy Sci. 92, 5854–5867. https://doi.org/10.3168/jds.2009-2324

McMahon, D.J., McManus, W.R., 1998. Rethinking Casein Micelle Structure Using Electron Microscopy. J. Dairy Sci. 81, 2985–2993. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75862-X

McMahon, D.J., Yousif, B.H., 1993. Effect of whey protein denaturation on structure of casein micelles and their renneatability after ultra-high temperature processing of milk with or without ultrafiltration. Int. Dairy J. 3, 239–256.

Melik, D.H., Fogler, H.S., 1983. Turbidimetric determination of particle size distributions of colloidal systems. J. Colloid Interface Sci. 92, 161–180. https://doi.org/10.1016/0021-9797(83)90125-X

Mellema, M., Walstra, P., van Opheusden, J.H.J., van Vliet, T., 2002. Effects of structural rearrangements on the rheology of rennet- induced casein particle gels. Adv. Colloid Interface Sci. 98, 25–50.

Mezdour, S., Cuvelier, G., Cash, M.J., Michon, C., 2007. Surface rheological properties of hydroxypropyl cellulose at air-water interface. Food Hydrocoll. 21, 776–781. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.09.011

Mezdour, S., Lepine, A., Erazo-Majewicz, P., Ducept, F., Michon, C., 2008. Oil/water surface rheological properties of hydroxypropyl cellulose (HPC) alone and mixed with lecithin: Contribution to emulsion stability. Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 331, 76–83. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2008.07.023

Michalski, M.-C., Michel, F., Sainmont, D., Briard, V., 2002. Apparent ζ-potential as a tool to assess mechanical damages to the milk fat globule membrane. Colloids Surfaces B Biointerfaces 23, 23–30. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0927-7765(01)00203-X

Michalski, M.C., Cariou, R., Michel, F., Garnier, C., 2002. Native vs. Damaged Milk Fat Globules: Membrane Properties Affect the Viscoelasticity of Milk Gels. J. Dairy Sci. 85, 2451–2461. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74327-0

Millqvist-Fureby, A., Elofsson, U., Bergenståhl, B., 2001. Surface composition of spray-dried milk protein-stabilised emulsions in relation to pre-heat treatment of proteins. Colloids Surfaces B Biointerfaces 21, 47–58. https://doi.org/10.1016/S0927-7765(01)00183-7

Moens, K., Masum, A.K.M., Dewettinck, K., 2016. Tempering of dairy emulsions: partial coalescence and whipping properties. Int. Dairy J. 56, 92–100. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.01.007

Mokoonlall, A., Nöbel, S., Hinrichs, J., 2016. Post-processing of fermented milk to stirred products: Reviewing the effects on gel structure. Trends Food Sci. Technol. 54, 26–36. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.05.012

Mortazavian, A.M., Rezaei, K., Sohrabvandi, S., 2009. Application of advanced instrumental methods for yogurt analysis. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 49, 153–163. https://doi.org/10.1080/10408390701764807

Mosca, A.C., Rocha, J.A., Sala, G., van de Velde, F., Stieger, M., 2012. Inhomogeneous distribution of fat enhances the perception of fat-related sensory attributes in gelled foods. Food Hydrocoll. 27, 448–455. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.11.002

Moussier, M., Bosc, V., Michon, C., Pistre, V., Chaudemanche, C., Huc-Mathis, D., 2019a. Multi-scale understanding of the effects of the solvent and process on whey protein emulsifying properties : Application to dairy emulsion. Food Hydrocoll. 87, 869–879. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.052

Moussier, M., Huc-Mathis, D., Michon, C., Bosc, V., 2019b. Rational design of a versatile lab-scale stirred milk gel using a reverse engineering logic based on microstructure and textural properties. J. Food Eng. 249, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.12.018

Murphy, R.W., Farkas, B.E., Jones, O.G., 2016. Dynamic and viscoelastic interfacial behavior of b -lactoglobulin microgels of varying sizes at fluid interfaces. J. Colloid Interface Sci. 466, 12–19. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.12.012

Nguyen, B.T., Chassenieux, C., Nicolai, T., Schmitt, C., 2017. Effect of the pH and NaCl on the microstructure and rheology of mixtures of whey protein isolate and casein micelles upon heating. Food Hydrocoll. 70, 114–

122. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.03.013

Nguyen, N.H.A., Wong, M., Guyomarc'h, F., Havea, P., Anema, S.G., 2014. Effects of non-covalent interactions between the milk proteins on the rheological properties of acid gels. Int. Dairy J. 37, 57–63. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.03.001

Nicolai, T., 2016. Formation and functionality of self-assembled whey protein microgels. Colloids Surfaces B Biointerfaces 137, 32–38. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.05.055

Nicolai, T., Britten, M., Schmitt, C., 2011. β-Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications. Food Hydrocoll. 25, 1945–1962. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.006

Nöbel, S., Hahn, C., Hitzmann, B., Hinrichs, J., 2014. Rheological properties of microgel suspensions: Viscoelastic modelling of microstructural elements from casein micelles to fermented dairy products. Int. Dairy J. 39, 157–166. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.06.001

Nöbel, S., Ross, N.L., Protte, K., Körzendörfer, A., Hitzmann, B., Hinrichs, J., 2016. Microgel particle formation in yogurt as influenced by sonication during fermentation. J. Food Eng. 180, 29–38. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.01.033

Nöbel, S., Weidendorfer, K., Hinrichs, J., 2012. Apparent voluminosity of casein micelles determined by rheometry. J. Colloid Interface Sci. 386, 174–180. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.07.075

O'Sullivan, J., Arellano, M., Pichot, R., Norton, I., 2014. The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of dairy proteins. Food Hydrocoll. 42, 386–396. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.011

Ogden, L.G., Rosenthal, A.J., 1997. Interactions between fat crystals and proteins at the oil/water interface. J. Colloid Interface Sci. 191, 38–47.

Oliver, L., Berndsen, L., van Aken, G.A., Scholten, E., 2015a. Influence of droplet clustering on the rheological properties of emulsion-filled gels. Food Hydrocoll. 50, 74–83. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.001

Oliver, L., Scholten, E., van Aken, G.A., 2015b. Effect of fat hardness on large deformation rheology of emulsion-filled gels. Food Hydrocoll. 43, 299–310. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.031

Palanuwech, J., Coupland, J.N., 2003. Effect of surfactant type on the stability of oil-in-water emulsions to dispersed phase crystallization, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. https://doi.org/10.1016/S0927-7757(03)00169-9

Panouillé, M., Durand, D., Nicolai, T., Larquet, E., Boisset, N., 2005. Aggregation and gelation of micellar casein particles. J. Colloid Interface Sci. 287, 85–93. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.02.008

Perez, M., Décaudin, B., Maiguy-Foinard, A., Barthélémy, C., Lebuffe, G., Storme, L., Odou, P., 2017. Dynamic Image Analysis to Evaluate Subvisible Particles during Continuous Drug Infusion in a Neonatal Intensive Care Unit. Sci. Rep. 7, 1–8. https://doi.org/10.1038/s41598-017-10073-y

Petit, J., Herbig, A.-L., Moreau, A., Delaplace, G., 2011. Influence of calcium on β-lactoglobulin denaturation kinetics: Implications in unfolding and aggregation mechanisms. J. Dairy Sci. 94, 5794–5810. https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2011-4470

Podczek, F., 1997. A shape factor to assess the shape of particles using image analysis. Powder Technol. 93, 47–53.

Poux, M., Canselier, J.-P., 2004. Procédés d 'émulsification: Techniques et appareillage. Tech. L'ingénieur J2 153, 1–14.

Quemada, D., 2006. Modélisation rhéologique structurelle, Tec & Doc. ed.

Raikos, V., 2010. Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interfaces. A review. Food Hydrocoll. 24, 259–265. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.014

Ramos, O.L., Pereira, R.N., Rodrigues, R.M., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., Malcata, F.X., 2016. Whey and Whey

Powders: Production and Uses, 1st ed, Encyclopedia of Food and Health. Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00747-9

Raper, J.A., Amal, R., 1993. Measurement of aggregate fractal dimensions using static light scattering. Part. Part. Syst. Charact. 10, 239–245.

Renan, M., Guyomarc, F., Arnoult-Delest, V., D, P., Brulé, G., Famelart, M.H., 2009. Rheological properties of stirred yoghurt as affected by gel pH on stirring , storage temperature and pH changes after stirring. Int. Dairy J. 19, 142–148. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.09.007

Richardson-Harman, N.J., Stevens, R., Walker, S., Gamble, J., Miller, M., Wong, M., McPherson, A., 2000. Mapping consumer perceptions of creaminess and liking for liquid dairy products. Food Qual. Prefer. 11, 239–246. https://doi.org/10.1016/S0950-3293(99)00060-9

Richardson, N.J., Booth, D.A., 1993. Effect of Homogenization and Fat Content on Oral Perception of Low and High Viscosity Model Creams. J. Sens. Stud. 8, 133–143.

Richardson, N.J., Booth, D.A., 1993. Multiple physical patterns in judgements of the creamy texture of milks and creams. Acta Psychol. (Amst). 84, 93–101. https://doi.org/10.1016/0001-6918(93)90075-3

Rohart, A., Michon, C., 2016. Effect of thermomechanical treatment on microstructure of guar gum/acid milk gels. J. Food Eng. 171, 14–21. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.10.003

Rohart, A., Michon, C., Confiac, J., Bosc, V., 2016. Evaluation of ready-to-use SMLS and DWS devices to study acid-induced milk gel changes and syneresis. Dairy Sci. Technol. https://doi.org/10.1007/s13594-016-0281-6

Roustel, S., 2010. Homogénéisation à haute pression des dispersion alimentaires liquides, in: Techniques de l'ingénieur. p. F2710 1-F2710 12.

Rye, G.G., Litwinenko, J.W., Marangoni, A.G., 2005. Fat crystal networks. Bailey's Ind. Oil Fat Prod. 6, 121–160.

Sala, G., de Wijk, R. a., van de Velde, F., van Aken, G. a., 2008. Matrix properties affect the sensory perception of emulsion-filled gels. Food Hydrocoll. 22, 353–363. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.12.009

Sala, G., van Aken, G.A., Stuart, M.A.C., van de Velde, F., 2007. Effect of droplet-matrix interactions on large deformation properties of emulsion-filled gels. J. Texture Stud. 38, 511–535. https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2007.00110.x

Sala, G., van Vliet, T., Cohen Stuart, M., van de Velde, F., van Aken, G.A., 2009. Deformation and fracture of emulsion-filled gels: Effect of gelling agent concentration and oil droplet size. Food Hydrocoll. 23, 1853–1863. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.03.002

Sala, G., van Vliet, T., Cohen Stuart, M.A., Aken, G.A. va., van de Velde, F., 2009. Deformation and fracture of emulsion-filled gels: Effect of oil content and deformation speed. Food Hydrocoll. 23, 1381–1393. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.11.016

Schmidt, D.G., 1982. Association of caseins and casein micelle structure. Dev. Dairy Chem. 1, 61–86.

Schmitt, C., Bovay, C., Vuilliomenet, A.M., Rouvet, M., Bovetto, L., 2011. Influence of protein and mineral composition on the formation of whey protein heat-induced microgels. Food Hydrocoll. 25, 558–567. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.05.010

Schröder, A., Berton-Carabin, C., Venema, P., Cornacchia, L., 2017. Interfacial properties of whey protein and whey protein hydrolysates and their influence on O/W emulsion stability. Food Hydrocoll. 73, 129–140. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.06.001

Segat, A., Misra, N.N., Fabbro, A., Buchini, F., Lippe, G., Cullen, P.J., Innocente, N., 2014. Effects of ozone processing on chemical, structural and functional properties of whey protein isolate. Food Res. Int. 66, 365–372. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.10.002

Selomulya, C., Amal, R., Bushell, G., Waite, T.D., 2001. Evidence of shear rate dependence on restructuring and breakup of latex aggregates. J. Colloid Interface Sci. 236, 67–77.

Semenova, M.G., Antipova, A.S., Belyakova, L.E., 2002. Food protein interactions in sugar solutions. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 7, 438–444. https://doi.org/10.1016/S1359-0294(02)00079-1

Serra, T., Casamitjana, X., 1998. Structure of the aggregates during the process of aggregation and breakup under a shear flow. J. Colloid Interface Sci. 206, 505–511. https://doi.org/10.1006/jcis.1998.5714

Sharma, R., Singh, H., Taylor, M.W., 1996. Composition and Structure of Fat Globule Surface Layers in Recombined Milk. J. Food Sci. 61, 28–32. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb14719.x

Shen, X., Fang, T., Gao, F., Guo, M., 2017. Effects of ultrasound treatment on physicochemical and emulsifying properties of whey proteins pre- and post-thermal aggregation. Food Hydrocoll. 63, 668–676. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.003

Shewan, H.M., 2014. Rheology of Soft Particle Suspensions. Thesis.

Shewan, H.M., Stokes, J.R., 2014. Analytically predicting the viscosity of hard sphere suspensions from the particle size distribution. J. Nonnewton. Fluid Mech. 222, 72–81. https://doi.org/10.1016/j.jnnfm.2014.09.002

Shewan, H.M., Stokes, J.R., 2013. Review of techniques to manufacture micro-hydrogel particles for the food industry and their applications. J. Food Eng. 119, 781–792. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.06.046

Shizimu, M., 1994. Structure of proteins adsorbed at an emulsified oil surface, in: Symposium of Royal Society of Chemistry, Food Chemistry Group: Food Macromolecules and Colloids.

Silva, E.K., Costa, A.L.R., Gomes, A., Bargas, M.A., Cunha, R.L., Meireles, M.A.A., 2018. Coupling of high-intensity ultrasound and mechanical stirring for producing food emulsions at low-energy densities. Ultrason. Sonochem. 47, 114–121. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.04.020

Silva, P.S., Starov, V.M., Holdich, R.G., 2017. Membrane emulsification: Formation of water in oil emulsions using a hydrophilic membrane. Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 532, 297–304. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.04.077

Singh, H., Boland, M., Thompson, A., 2014. Milk proteins from expression to food, Food Scien. ed. Palmerston North (New Zeland). https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382018-1.00025-3

Smithers, G.W., 2015. Whey-ing up the options - Yesterday, today and tomorrow. Int. Dairy J. 48, 2–14. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.011

Sodini, I., Remeuf, F., Haddad, S., Corrieu, G., 2004. The Relative Effect of Milk Base, Starter, and Process on Yogurt Texture: A Review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 44, 113–137. https://doi.org/10.1080/10408690490424793

Sonne, A., Busch-Stockfisch, M., Weiss, J., Hinrichs, J., 2014. Improved mapping of in-mouth creaminess of semi-solid dairy products by combining rheology, particle size, and tribology data. LWT - Food Sci. Technol. 59, 342–347. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.047

Sorensen, C.M., 2001. Light scattering by fractal aggregates : A review. Aerosol Sci. Technol. 35, 648–687.

Spiegel, T., 1999. Whey protein aggregation under shear conditions – effects of lactose and heating temperature on aggregate size and structure 523–531.

Surel, C., Foucquier, J., Perrot, N., Mackie, A., Garnier, C., Riaublanc, A., Anton, M., 2014. Composition and structure of interface impacts texture of O/W emulsions. Food Hydrocoll. 34, 3–9. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.06.016

Syndifrais, 2018. Communiqué de presse - Augmentation des coûts matières dans le secteur des produits laitiers frais en 2017 et 2018.

Thomar, P., Nicolai, T., 2016. Heat-induced gelation of casein micelles in aqueous suspensions at different pH. Colloids Surfaces B Biointerfaces 146, 801–807. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.07.030

Thouy, R., Jullien, R., 1996. Structure Factors for Fractal Aggregates Built Off-Lattice with Tunable Fractal

Dimension. J. Phys. 6, 1365–1376.

Tinke, A.P., Carnicer, A., Govoreanu, R., Scheltjens, G., Lauwerysen, L., Mertens, N., Vanhoutte, K., Brewster, M.E., 2008. Particle shape and orientation in laser diffraction and static image analysis size distribution analysis of micrometer sized rectangular particles. Powder Technol. 186, 154–167. https://doi.org/10.1016/j.powtec.2007.11.017

Titapiccolo, G.I., Corredig, M., Alexander, M., 2011. Acid coagulation behavior of homogenized milk: effect of interacting and non-interacting droplets observed by rheology and diffusing wave spectroscopy. Dairy Sci. Technol. 91, 185–201. https://doi.org/10.1007/s13594-011-0010-0

Tomaschunas, M., Hinrichs, J., Köhn, E., Busch-Stockfisch, M., 2012. Effects of casein-to-whey protein ratio, fat and protein content on sensory properties of stirred yoghurt. Int. Dairy J. 26, 31–35. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.04.005

Tomaszewska, E., Soliwoda, K., Kadziola, K., Tkacz-Szczesna, B., Celichowski, G., Cichomski, M., Szmaja, W., Grobelny, J., 2013. Detection limits of DLS and UV-Vis spectroscopy in characterization of polydisperse nanoparticles colloids. J. Nanomater. 2013. https://doi.org/10.1155/2013/313081

Torres, I.C., Amigo Rubio, J.M., Ipsen, R., 2012. Using fractal image analysis to characterize microstructure of low-fat stirred yoghurt manufactured with microparticulated whey protein. J. Food Eng. 109, 721–729. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.11.016

Torres, I.C., Janhøj, T., Mikkelsen, B.Ø., Ipsen, R., 2011. Effect of microparticulated whey protein with varying content of denatured protein on the rheological and sensory characteristics of low-fat yoghurt. Int. Dairy J. 21, 645–655. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.12.013

Tran, T., Rousseau, D., 2016. Influence of shear on fat crystallization. Food Res. Int. 81, 157–162. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.022

Trejo, R., Corzo-Martínez, M., Wilkinson, S., Higginbotham, K., Harte, F.M., 2014. Effect of a low temperature step during fermentation on the physico-chemical properties of fat-free yogurt. Int. Dairy J. 36, 14–20. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.12.003

Truong, T., Bansal, N., Sharma, R., Palmer, M., Bhandari, B., 2014. Effects of emulsion droplet sizes on the crystallisation of milk fat. Food Chem. 145, 725–735. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.072

Truong, T., Morgan, G.P., Bansal, N., Palmer, M., Bhandari, B., 2015. Crystal structures and morphologies of fractionated milk fat in nanoemulsions. Food Chem. 171, 157–167. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.113

van den Berg, L., Jan Klok, H., van Vliet, T., van der Linden, E., van Boekel, M.A.J.S., van de Velde, F., 2008. Quantification of a 3D structural evolution of food composites under large deformations using microrheology. Food Hydrocoll. 22, 1574–1583. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.11.002

Van Marle, M., 1998. Structure and rheological properties of yogurt gels and stirred yogurt. University of Twente Netherlands.

van Marle, M.E., van den Ende, D., de Kruif, C.G., Mellema, J., 1999. Steady-shear viscosity of stirred yogurts with varying ropiness. J. Rheol. (N. Y. N. Y). 43, 1643–1662. https://doi.org/10.1122/1.551065

Vanapalli, S.A., Palanuwech, J., Coupland, J.N., 2002. Stability of emulsions to dispersed phase crystallization: Effect of oil type, dispersed phase volume fraction, and cooling rate. Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 204, 227–237. https://doi.org/10.1016/S0927-7757(01)01135-9

Vasbinder, A.J., van de Velde, F., de Kruif, C.G., 2004. Gelation of Casein-Whey Protein Mixtures. J. Dairy Sci. 87, 1167–1176. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73265-8

Vétier, N., Banon, S., Chardot, V., Hardy, J., 2003a. Effect of temperature and aggregation rate on the fractal dimension of renneted casein aggregates. J. Dairy Sci. 86, 2504–2507. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73844-2

Vétier, N., Banon, S., Chardot, V., Hardy, J., 2003b. Effect of Temperature and Aggregation Rate on the Fractal Dimension of Renneted Casein Aggregates. J. Dairy Sci. 86, 2504–2507. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73844-2

Vladisavljević, G.T., 2015. Structured microparticles with tailored properties produced by membrane emulsification. Adv. Colloid Interface Sci. 225, 53–87. https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.07.013

Walstra, P., 1999. Casein sub-micelles : do they exist ? Int. Dairy J. 9, 189–192.

Walstra, P., 1993. Principles of emulsion formation. Chem. Eng. Sci. 48, 333–349.

Walstra, P., Jenness, R., 1984. Dairy Chemistry and Physics. John Wiley & Sons, New York.

Wijayanti, H.B., Bansal, N., Deeth, H.C., 2014. Stability of Whey Proteins during Thermal Processing: A Review. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 13, 1235–1251. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12105

Yan, W.M., Shi, Y., 2014. Evolution of grain grading and characteristics in repeatedly reconstituted assemblages subject to one-dimensional compression. Géotechnique Lett. 4, 223–229. https://doi.org/10.1680/geolett.14.00039

Yan, W.M., Su, D., 2017. Inferring 3D particle size and shape characteristics from projected 2D images: Lessons learned from ellipsoids. Comput. Geotech. 0–1. https://doi.org/10.1016/j.compgeo.2017.11.015

Yano, Y.F., Kobayashi, Y., Ina, T., Nitta, K., Uruga, T., 2016. Hofmeister anion effects on protein adsorption at an air-water interface. Langmuir 32, 9892–9898. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b02352

Ye, A., 2011. Functional properties of milk protein concentrates: Emulsifying properties, adsorption and stability of emulsions. Int. Dairy J. 21, 14–20. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.07.005

Ye, A., 2010. Surface protein composition and concentration of whey protein isolate-stabilized oil-in-water emulsions: Effect of heat treatment. Colloids Surfaces B Biointerfaces 78, 24–29. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.02.001

Ye, A., 2008. Interfacial composition and stability of emulsions made with mixtures of commercial sodium caseinate and whey protein concentrate. Food Chem. 110, 946–952. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.091

Ye, A., Taylor, S., 2009. Characterization of cold-set gels produced from heated emulsions stabilized by whey protein. Int. Dairy J. 19, 721–727. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.06.003

Yu, W., Hancock, B.C., 2008. Evaluation of dynamic image analysis for characterizing pharmaceutical excipient particles. Int. J. Pharm. 361, 150–157. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.05.025

Zhai, J. li, Day, L., Aguilar, M.I., Wooster, T.J., 2013. Protein folding at emulsion oil/water interfaces. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 18, 257–271. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.03.002

Zhou, B., Wang, J., 2017. Generation of a realistic 3D sand assembly using X-ray micro-computed tomography and spherical harmonic-based principal component analysis. Int. J. Numer. Anal. Methods Geomech. 41, 93–109. https://doi.org/10.1002/nag.2548

université PARIS-SACLAY
ÉCOLE DOCTORALE
Agriculture, alimentation, biologie, environnement, santé (ABIES)

Titre : Structuration de la matière grasse dans une matrice protéique laitière en fonction de la composition et du procédé : Influence sur les propriétés du produit

Mots clés : Structure multi-échelle, Gel laitier, Formulation, Procédé, Matière grasse, Protéines

Résumé : Il existe une très grande variété de matrices laitières sur le marché, avec des textures très variées. Parmi elles, les yaourts brassés riches en matière grasse (≥ 5%) sont particulièrement appréciés par les consommateurs pour leur texture crémeuse. Cette dernière est à la fois liée à la consistance et à la perception du gras en bouche (film gras, fondant) et elle est directement pilotée par la structure du produit. Ce travail avait pour objectif de moduler la texture des yaourts brassés riches en matière grasse en les structurant *à façon*, et ce, sans ajouter d'additif.
Ces produits sont des dispersions concentrées de microgels, où chaque microgel est une émulsion gélifiée (globules gras dispersés dans un réseau protéique et pouvant interagir avec celui-ci via l'interface). Plusieurs leviers ont été identifiés pour moduler cette structure complexe et les principaux sont l'état de la matière grasse, la nature et l'état physico-chimique des protéines adsorbées à l'interface, la taille et la rigidité des microgels. Ces leviers ont été modulés par la formulation et le procédé, soit à l'échelle pilote chez un partenaire industriel, soit à l'échelle laboratoire grâce à une mini-ligne de production de yaourts brassés spécialement mise au point. Une approche multi-échelle a été adoptée pour comprendre le lien entre la structure et les propriétés macroscopiques des produits. Les propriétés physico-chimiques des protéines et de la matière grasse laitières ont été caractérisées. Les propriétés interfaciales des protéines sériques ont été mesurées en fonction de leur état physico-chimique. La microstructure a été étudiée au travers de la taille des globules gras et des microgels, de la forme et la dimension fractale des microgels (avec reconstruction 3D) et de la caractérisation quantitative de la structure des yaourts brassés (morphologie mathématique). Les propriétés macroscopiques ont été évaluées en combinant la rhéologie (consistance) et la tribologie (lubrification) dans des conditions prenant en compte le processus oral (cisaillement, température, matériaux). Chaque levier identifié a été testé individuellement et la nature de l'interface comme la composition de la matière grasse des globules gras se sont révélés être intéressants pour modifier les propriétés macroscopiques (consistance et lubrification) des yaourts brassés. Ces deux leviers ont finalement été combinés dans une étude pour prendre en compte leur interdépendance.
L'ensemble des travaux a permis de proposer des mécanismes de structuration des yaourts brassés en fonction des conditions de formulation et de procédé mises en œuvre.

Title : Structuring of fat dispersed in a matrix of milk proteins via the composition and the process: Impact on the final product properties

Keywords : Multiscale structure, Milk gel, Formulation, Process, Fat, Proteins

Abstract: There is a wide variety of dairy matrices on the market, with very different textures. Among them, high fat stirred yogurts (≥ 5%) are particularly appreciated by the consumers for their creamy texture. The creamy texture is linked to both the level of firmness and the fat perception in mouth (oily film, melting) and is directly driven by the structure of the product. The objective of this work was to change the texture of high fat stirred yogurts by tailoring their structure without addition of any additive.
High fat stirred yogurts are concentrated dispersions of microgels, where each microgel is an emulsion-filled gel (i.e. fat droplets dispersed in a protein network and interacting with it via the interface). Several levers were identified in order to modify the structure and the main ones were the state of fat, the composition and the physico-chemical state of the interface, and the size and stiffness of the microgels. These levers were modified through formulation and process, either at pilot- scale (industrial partner) or at lab-scale (mini-line of stirred yogurt production specially developed).
A multi-scale approach was adopted to understand the relationship between the structure and the macroscopic properties. The physico-chemical properties of milk proteins and fat were characterized. The interfacial properties of whey proteins were measured depending on their physico-chemical state. The microstructure was accurately characterized through the sizes of fat droplets and microgels, the shape and fractal dimension of microgels (with 3D reconstruction) and the quantitative analysis of the stirred yogurt microstructure (mathematical morphology). The macroscopic properties were measured by combining rheology (firmness) and tribology (lubrication) in conditions consistent with oral processing (shearing, temperature, materials). Each identified lever was individually tested and the nature of the interface and the composition of fat droplets were proved to be interesting in modifying the macroscopic properties (firmness, lubrication) of stirred yogurts. These two levers were eventually combined in a study to take their interdependence into account. All the work led to the statement of structuring mechanisms of the stirred yoghurts depending on the conditions of formulation and process used.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France