Institut National Agronomique Paris-Grignon

Ecole Doctorale ABIES

Unité Mixte de Recherche Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires

(INRA – INA P-G)

Thèse pour obtenir le grade de

Docteur de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon

Discipline : Sciences des Aliments

Présentée par

Anne SAINT-EVE

COMPREHENSION DE LA LIBERATION ET DE LA PERCEPTION DES COMPOSES D'AROME EN CONDITION DE CONSOMMATION : CAS DU YAOURT BRASSE AROMATISE

Soutenue le 02 juin 2006

Composition du jury :

Dr A. Boelrijk	NIZO Food Research, Pays-Bas	Rapporteur
Dr P. Cayot	ENSBANA, Dijon	Rapporteur
Dr J. Delarue	ENSIA, Massy	Président du jury
Dr N. Martin	INA, Paris Grignon	Directeur de Thèse
Dr I. Souchon	INRA, Grignon	Co-Directeur de Thèse

Remerciements

Je remercie Georges Corrieu, directeur de l'UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires pour m'avoir accueillie au sein de son équipe pendant ces trois années.

J'exprime toute ma reconnaissance et mon plus grand respect à Isabelle Souchon pour avoir assuré l'encadrement de cette thèse, pour m'avoir fait confiance, soutenue et encouragée. Je la remercie de m'avoir fait bénéficier de ses larges compétences, et notamment de ses précieux et judicieux conseils scientifiques. Merci particulièrement pour son dynamisme, son enthousiasme et la dynamique d'équipe qu'elle a su instaurer autour de ce travail.

Je remercie tout particulièrement Nathalie Martin pour son encadrement malgré la distance. Merci pour ses conseils scientifiques et les discussions enrichissantes qui ont ponctué ce travail. Les compétences et les connaissances qu'elle a su me transmettre ont été des atouts indéniables à la bonne réalisation de ce travail de recherche.

Je remercie Madame Alexandra Boelrijk et Monsieur Philippe Cayot pour m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail de thèse.
Je remercie également Monsieur Julien Delarue d'avoir accepté d'être président du jury de cette thèse.

Merci aux partenaires industriels de ce projet pour leur participation et leur présence au cours de ce travail : Samia Haddad (Yoplait), Nadine Vallet (Danone), Nathalie Martin et Hugues Brévard (Nestlé) et Fabrice Lemasson (Lactalis).

Un grand merci à Marine Lemoigne, Clémentine Lauverjat et Cécile Kulak, qui dans le cadre de leur DEA, ont contribué à l'avancée de ce travail. Merci pour leur enthousiasme, leur soutien et leur amitié.

Un merci spécial à Madame la Baronne, pour son aide dans la préparation des séances d'analyses sensorielles, pour sa gentillesse et son attention.
Merci à Frédéric pour sa précieuse aide lors des nombreuses, très nombreuses fabrications de yaourts…

Un immense merci à Samuel Atlan pour les nombreux échanges scientifiques et surtout pour son soutien permanent et ses encouragements.
Je remercie également toute « l'équipe yaourt » du LGMPA : Cécile Lévy, Enkelejda Paci Kora, Isabelle Déléris, Alexandre Juteau-Vigier, Cristian Tréléa et Michèle Marin pour leurs conseils et discussions enrichissantes au cours de ce travail.
Merci à Eric Latrille pour m'avoir formé si passionnément à la recherche et plus particulièrement à la fabrication des yaourts. Merci à Cécile Lévy pour m'avoir transmis sa passion de l'analyse sensorielle et pour son soutien tout au long de la thèse.

Merci à Anne-Gaëlle Valade, Etienne Sémon et Elisabeth Guichard pour leur accueil au sein de l'UMR FLAVIC dans le cadre de l'étude « nosespace ».
Je remercie Hervé Guillemin pour avoir développé un programme de traitement des données de cette étude.

Je tiens également à remercier tous ceux qui, à divers titres, m'ont aidé directement et indirectement durant cette thèse.

Je tiens à remercier l'ensemble des participants du réseau CANAL-ARLE, et plus spécifiquement l'équipe BIA ISD de l'INRA de Nantes (Claude Génot, Anne Meynier et Sébastien Bongard), pour le partage de leurs connaissances scientifiques.

Merci aux sujets des analyses sensorielles pour avoir participé aux nombreuses et régulières séances ! Merci d'avoir dégusté tant de yaourts à la fraise…

Je tiens à remercier Samuel, Benjamin et Fabrice pour leur amitié, et également Clémentine, Sophie, Fernanda, Stéphanie, Wang Yu, Mathieu et Haythem.
Je tiens à remercier toutes les personnes du laboratoire pour ces 4 années passées dans une ambiance chaleureuse.

Je tiens à remercier mes amis dont le soutien m'a souvent été réconfortant.

Je remercie du fond du cœur Matthieu et ma famille qui m'ont soutenue, encouragée et motivée tout au long de mes études. Merci pour tout, simplement.

TABLE DES FIGURES

INTRODUCTION :

Figure 1 : Représentation schématique des groupes de travail du réseau technologique CANAL – ARLE
Figure 2 : Démarche expérimentale pour mieux comprendre la perception en lien avec la viscosité complexe du gel.
Figure 3 : Démarche expérimentale pour mieux comprendre la perception en lien avec la nature de l'emballage.

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE :

Figure 4 : Diagramme général de fabrication des yaourts et des laits fermentés (Techniques de l'ingénieur F6 315-7, par Beal et Sodini, 2003).
Figure 5 : Diagramme schématique montrant le mécanisme de dégradation de la structure du yaourt par cisaillement dans le cas de yaourts produits avec des souches non productrices d'exopolysaccharides (1) ou produits avec des souches productrices d'exopolysaccharides (EPS) (2) (Hess *et al.*, 1997).
Figure 6 : Représentation des perceptions olfactives par voies orthonasale et rétronasale.
Figure 7 : Représentation schématique de la muqueuse olfactive. Localisation (a) et structure (b) de l'épithélium olfactif.
Figure 8 : Paramètres caractérisant une courbe temps-intensité.
Figure 9 : Schéma représentatif d'une analyse « nosespace ».
Figure 10 : Représentation schématique d'un appareil d'APCI-MS.
Figure 11 : Représentation schématique d'un appareil de PTR-MS
Figure 12 : Représentation schématique du système de bouche artificielle (Nassl *et al.*, 1995).
Figure 13 : Représentation du simulateur d'arôme rétronasal (système RAS) pouvant incorporé de la salive artificielle, régulé l'agitation, le flux d'air et la température (Roberts et Acree, 1995).
Figure 14 : Représentation schématique de la gorge artificielle par Weel *et al.* (2004).
Figure 15 : Muscles de la mastication (Netter, Atlas d'anatomie).
Figure 16 : Déroulement de la déglutition (Netter, Atlas d'anatomie).
Figure 17 : Les trois étapes du processus d'ingestion d'un aliment liquide, suivi par IRM. (a) phase préparatoire à l'ingestion, (b) phase pharyngeale de l'ingestion, (c) expiration qui suit immédiatement l'ingestion. (Buettner *et al.*, 2002).
Figure 18 : Profil de libération du butyrate d'éthyle (a) et du 2.5-diméthyle Pyrazine (b) après consommation d'une solution aromatisée à 100mg/kg de chaque composé. Le profil de l'acétone (c) marqueur de la respiration, permet de mettre en évidence les expirations.

MATERIELS ET METHODES :

Figure 19 : Courbe de calorimétrie différentielle à balayage obtenue sur les trois lots de matière grasse laitière anhydre utilisée pendant la thèse (de -40°C à 60°C à 1°C/min).
Figure 20 : Représentation schématique de l'installation de traitement thermique du mélange laitier.
Figure 21 : Fermenteur de 7L utilisé pour la fabrication des yaourts. Positions des sondes de pH et de température utilisées pour le suivi des fermentations.
Figure 22 : Suivi du pH au cours de la fermentation (en minutes) pour les trois produits de compositions différentes en protéines (yaourt MPO, yaourt CAS et yaourt WP).

Figure 23 : Cliché obtenu par microscopie optique sur le yaourt enrichi en caséinates (CAS) dilué dans une solution de EDTA + SDS + Urée et coloré avec du rouge de nil.
Figure 24 : Représentation schématique du module cône-plan utilisé avec le rhéomètre Rheostress (RS1, Haake).
Figure 25 : Viscosité complexe (Pa.s) en fonction de la contrainte (Pa) pour le yaourt enrichi en caséinate qui a subi un faible traitement mécanique. Trois zones peuvent être distinguées : un plateau initial (a), une zone linéaire de pente négative (b), et un plateau final (c).
Figure 26 : Présentation de la cellule de cisaillement.
Figure 27 : Libération de l'acétate d'éthyle dans le yaourt WP à fort traitement mécanique dans la cellule de cisaillement en conditions isothermes à 10°C non agitées puis agitées.
Figure 28 : Installation des sujets lors des analyses APCI-MS en conditions de dégustation.
Figure 29 : Cinétique de libération de l'hexanoate d'éthyle mesurée par analyse APCI-MS pour le yaourt enrichi en caséinate, lorsque celui est dégusté par un sujet. 0: lors de l'introduction du yaourt en bouche, 1: à l'ingestion, 2: à la persistance, P1: Phase 1 lorsque le yaourt est dans la cavité buccale, P2: Phase 2: après ingestion du yaourt.
Figure 30 : Schéma illustrant la mise au point des yaourts de composition variable en protéine.

RESULTATS ET DISCUSSION

Figure P1-1: Box plots of the F-product values for texture (a) and olfactory (b) attributes for the different profiles. (F-limit is the threshold for significance).
Figure P1-2: Consensus between panelists by representation of F-product*subject to box plot for the three profile types.
Figure P1-3: Percent of deviation between MPO yogurt and CAS yogurt or WP yogurt sensory intensities on the significant texture attributes by three-way ANOVA.
Figure P1-4: Complex viscosity and confidence intervals at low shear stress of 0.1Pa (η*0) shear stress of yogurts at 10°C.
Figure P1-5: Percent of deviation between MPO yogurt and CAS yogurt or WP yogurt sensory intensities on the significant olfactory attributes by three-way ANOVA.
Figure P1-6: a-Product mapping of the factorial discriminant analysis with CAS yogurt (♦), MPO yogurt (■) and WP yogurt (o), b-Variables (six olfactory attributes) map, obtained with the comparative profile with a reference.
Figure P1-7: Percent of deviation of the significant aroma compounds by the SPME method (one-way ANOVA) between MPO yogurt and CAS or WP yogurts.

Figure P2-1: Storage modulus G' and loss modulus G'' of the three yogurts as a function of the angular speed.
Figure P2-2: Shear stress as a function of increasing and decreasing shear rate for the three yogurts at 10°C: ○ CAS yogurt, □ MPO yogurt and Δ WP yogurt.
Figure P2-3: Microstructure of the three yogurts obtained from milk bases enriched with WP yogurt (a), MPO yogurt (b) and CAS yogurt (c) (white bar is 50µm).
Figure P2-4: Proportionality between the aroma compound concentration and the FID response with a PDMS fiber.
Figure P2-5: Stabilization time at 37°C of aroma compounds between the PDMS fiber and the headspace phase in yogurt MPO.
Figure P2-6: Flavor release (peak areas) from the three yogurts (CAS, MPO and WP yogurts) for the significant aroma compounds (seven on the 17 of the studied strawberry flavor) determined by the headspace SPME method.

Figure 31 : Écarts moyens d'intensité de l'attribut épais entre les yaourts CAS et WP calculés par rapport au produit de référence MPO (=(CAS ou WP - MPO / MPO)*100)), en pourcentage (attribut significatif selon l'analyse de variance à 2 facteurs (produit, sujet, traité comme facteur aléatoire) ($p < 0.05$)).
Figure 32 : Module élastique G' et module visqueux G'' pour les trois yaourts TM+ en fonction de la fréquence à 10°C.
Figure 33 : Viscosités complexes (et écart-type) à contrainte nulle (0.1Pa) obtenues à 10°C pour les trois yaourts CAS, MPO et WP à fort traitement mécanique.
Figure 34 : Contrainte (Pa) en fonction de la vitesse de cisaillement (1/s) croissante, puis décroissante pour les trois yaourts "MT+" à 10°C : ● yaourt CAS, □■ yaourt MPO et ▲ yaourt WP.
Figure 35 : Écart moyen d'intensité perçue entre les yaourts TM- et TM+ en pourcentage (écart = (TM- - TM+ / TM+)*100) pour les 3 compositions (yaourts CAS, MPO et WP) en pourcentage pour les attributs significatifs selon le test de Student ($p < 0.05$).

Figure P3-1: Release curves for ethyl hexanoate from CAS yogurt, when consumed by a subject using in-nose/APCI-MS analysis.
Figure P3-2: Overall intensity perceived for the six yogurts at the three times of the consumption: i) at introduction in mouth of the sample, ii) at swallowing, iii) at the persistence. (Means with standard deviation).
Figure P3-3: Overall aroma intensity perceived by the subjects for the yogurts varying by their mechanical treatment and averaged by protein composition. (Means with standard deviation).
Figure P3-4: Overall intensity perceived for the six yogurts varying by the protein composition (CAS yogurt, MPO yogurt and WP yogurt) with low mechanical treatment (MT- yogurts) on the significant sensory attributes by ANOVA. (Means with standard deviation).
Figure P3-5: Mechanical treatment effect (MT- for low mechanical treatment and MT+ for high mechanical treatment) on the average values of the three yogurts and averaged across subjects for the maximum intensity of aroma release after swallowing for the significant aroma compounds by ANOVA. (Means with standard deviation).
Figure P3-6: PCA plots (a: variables plot, b: individuals plot) on the sensory (at swallowing and at persistence) and APCI-MS (ions 87, 89, 101, 117, 137, 145 and 173) scores of the six yogurts.
Figure P3-7 : Profile concentration of aroma compounds in the mouth or in the throat during yogurt consumption.

Figure 36 : Libération de l'hexanoate d'éthyle dans les yaourts MPO MT-, WP MT- et WP MT+ au cours du temps en conditions agitées dans la cellule de cisaillement à 10°C.

Figure P4-1: PCA biplot on the descriptive quantitative analysis scores of the 0% fat yogurts. a-variable map, b-product map.
Figure P4-2: Influence of time of storage (2nd, 14th and 28th day of storage) on significant olfactory attributes averaged by packaging and subjects intensities for low fat stirred yogurt.
Figure P4-3: Influence of time of storage (2nd, 14th and 28th day of storage) on significant aroma compounds released (in peak area) measured by SPME method at 4°C for low fat stirred yogurt.
Figure P4-4: Influence of packaging type (glass, PS and PP) on significant aroma compounds released (in peak area) measured by SPME method at 4°C at the 14th day of storage for low fat stirred yogurt.

Figure P4-5: PCA biplot on the descriptive quantitative analysis scores of the 4% fat yogurts. a-variable map, b-product map.

TABLE DES TABLEAUX

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE :

Tableau 1 : Composition chimique moyenne du lait de vache (Tamime et Robinson, 1999).
Tableau 2 : Composition protéique du lait (Données CIDIL).

MATERIELS ET METHODES :

Tableau 4 : Composition en composés d'arôme de la formule fraise et leurs propriétés physicochimiques.
Tableau 5 : Concentration en composés d'arôme dans le propylène glycol de la solution mère utilisée pour l'aromatisation des yaourts.
Tableau 6 : Composition des yaourts et quantité (en g) des matières premières utilisées. Les quantités des ingrédients sont données pour 1L d'eau.
Tableau 7 : Diamètres moyens (et écart-type) des gouttelettes lipidiques obtenues par granulométrie laser sur les yaourts enrichis en caséinates (CAS), en poudre de lait (MPO) et en protéines sériques (WP) dilués dans une solution de EDTA + SDS + Urée.
Tableau 8 : Diamètres moyens (et écart-type) des gouttelettes lipidiques obtenues par microscopie optique sur les yaourts enrichis en caséinates (CAS), en poudre de lait (MPO) et en protéines sériques (WP) dilués dans une solution de EDTA + SDS + Urée et colorés avec du rouge de nil.
Tableau 9 : Liste des 34 attributs utilisés pour l'analyse descriptive quantitative. O: odeur (perception orthonasale), A: arôme (perception retronasale), S: Saveur, V: texture à la cuillère, B: texture en bouche.
Tableau 10 : Définition et protocole de dégustation des descripteurs de texture évalués par les sujets lors de l'analyse descriptive quantitative.
Tableau 11 : Composition des matrices yaourts utilisées pour l'étude emballage.
Tableau 12 : Récapitulatif des produits étudiés lors de l'étude emballage (facteur de variation : temps de stockage, type d'emballage et taux de matière grasse).
Tableau 13 : Liste des descripteurs sélectionnés pour les profils sensoriels de l'étude emballage.
Tableau 14 : Concentration des composés d'arôme dans le yaourt et le rapport m/z correspondant à leur ions moléculaires protonés.
Tableau 15 : Composés d'arôme et certaines de leurs propriétés physicochimiques utilisés dans l'étude de la taille des gouttelettes lipidiques.
Tableau 16 : Quantité (en surface de pics et leur écart-type) des composés d'arôme libérés dans l'espace de tête mesurée par chromatographie en phase gazeuse pour l'étude de l'influence de la taille des gouttelettes lipidiques sur la volatilité des composés d'arôme.

RESULTATS ET DISCUSSION

Table P1-1: Premix composition for yogurt preparation
Table P1-2: Aroma compound composition of strawberry aroma mixed with propylene glycol and their concentrations (mg/kg) in yogurt.
Table P1-3: List of the 34 attributes used for the descriptive analyses. O: odor (orthonasal perception), A: aroma (retronasal perception), T: Taste, V: visual texture (with a spoon), M: texture in mouth.
Table P1-4: Significant product effect of the ANOVA for the three types of sensory profiles - Fisher values and associated probabilities.

Table P1-5: List of the attributes selected by stepwise analyses for the three profile types from the olfactory attributes to discriminate the three yogurts.
Table P1-6: Sensory attributes for which there is not a good agreement between the panelists over the intra-session and inter-session repetitions.

Table P2-1: Premix composition for preparation of the three yogurts.
Table P2-2: Aroma compound composition of strawberry aroma mixed with propylene glycol and their physicochemical properties.
Table P2-3: Complex viscosity (Pa.s) and confidence intervals at a low shear stress of 0.1Pa (η*0) and at 50Pa (η*50) shear stress of yogurts at 10°C.
Table P2-4: Partition coefficients of aroma compounds for the three yogurts at 4°C.

Tableau 17 : Coefficients de partage air/yaourt obtenus à 4°C par la méthode PRV pour les trois yaourts ayant subi un traitement mécanique fort.
Tableau 18 : Viscosités complexes (Pa.s) des yaourts « MT+ » et « MT- » et pourcentage d'écart (=(MT+ - MT- / MT-)*100) à contrainte nulle (0.1 Pa) obtenues à 10°C pour les trois yaourts CAS, MPO et WP.
Tableau 19 : Quantité libérée (en surface de pics) obtenue par la méthode SPME à 4°C pour les composés d'arôme présentant un effet significatif du traitement mécanique dans les trois yaourts et pourcentage d'écart (=(MT - MT- / MT-)*100).

Table P3-1: Premix composition for yogurt preparation varying in the protein composition.
Table P3-2: Aroma compound concentration in yogurts and their m/z values corresponding to their protonated molecular ions.
Table P3-3: Complex viscosity determined at low shear stress (0.1Pa) and thickness perception evaluated by the 8 subjects for the six yogurts.
Table P3-4: Average parameter values for the release curves of yogurts varying by their protein composition with low mechanical treatment (MT- yogurts) with a significance of 5% or 10% by ANOVA.

Tableau 20 : Résultats de l'ANOVA à un facteur (produit) pour chaque composé d'arôme libéré dans les trois matrices (yaourt WP MT-, yaourt WP MT+, yaourt MPO MT-). Quantités mesurées en conditions dynamiques par APCI-MS.

Table P4-1: Premix composition for yogurt preparation.
Table P4-2: Aroma compound composition of strawberry aroma mixed with propylene glycol and their concentrations (mg/kg) in yogurts.
Table P4-3: List of the 30 attributes used for the descriptive analyses. O: odor (orthonasal perception), A: aroma (retronasal perception), T: Taste, M: texture in mouth.
Table P4-4: Probability levels (%) associated with means and SNK comparison test for the sensory (3-way ANOVA (Product, group, subject(group)) and instrumental variables (2-way ANOVA (product, repetition)) showing significant effects on 0% and 4% fat yogurt at the 2nd day of storage conditioned in glass packaging.

Nomenclatures

c^*	Concentration critique ($g.L^{-1}$)
$C_i^{matrice}$	Concentration du composé i dans la matrice ($g.m^{-3}$) ou ($mg.L^{-1}$)
C_i^{gaz}	Concentration du composé i dans la phase gazeuse en équilibre avec la matrice ($g.m^{-3}$)
I_{max}	Intensité maximale du descripteur (-)
$k_{i,gaz/matrice}$	Coefficient de partage gaz matrice pour le composé i (-)
$k_{i,gaz/yaourt}$	Coefficient de partage gaz yaourt pour le composé i (-)
Log P	Logarithme du coefficient de partage octanol/eau
P_i^{sat}	Pression de vapeur saturante du composé i à la température du système (Pa)
S_{50-60}	Surface sous la courbe entre les 50 et 60 secondes après la mise en bouche du produit
t	Temps (s)
T	Température (°C)
t_{max}	Temps correspondant à l'intensité maximale (s)
t_{tot}	Durée de la perception (s)
V	Volume phase gazeuse (m^3)

Alphabet Grec

$\dot{\gamma}$	Vitesse de cisaillement (s^{-1})
η^*	Viscosité complexe (Pa.s)
η^*_0	Viscosité complexe à faible contrainte (Pa.s)
η^*_{100}	Viscosité complexe à contrainte 100 Pa (Pa.s)
τ	Contrainte de cisaillement (Pa)

Abréviations

A	Arôme évalué par voie rétronasale
AUC1	Area under the curve (surface sous la courbe) de la phase 1
AUC2	Area under the curve (surface sous la courbe) de la phase 2
ACP	Analyse en Composantes Principales
ANOVA	Analyse de variances
APCI-MS	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation Mass spectrometry

CA	Composés d'arôme
CAS	Caséinates
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CPG-FID	Chromatographie en phase gazeuse – Détecteur à ionisation de flamme
HPMC	Hydroxy propyl méthyl cellulose
HS	Headspace
$I_{agitées}$	Intensité maximale du signal APCI-MS lors de l'agitation du yaourt
$I_{non\ agitées}$	Intensité maximale du signal APCI-MS en conditions non agitées
G	Glass (verre)
MG	Matière grasse
MPO	Milk Powder (poudre de lait)
MS	Matière sèche
MT	Traitement mécanique
O	Odeur évaluée par voie orthonasale
p	Probabilité
P1	Phase 1 lorsque le yaourt est dans la cavité buccale
P2	Phase 2 après ingestion du yaourt
PCA	Principal Component Analysis
ppm	Milligramme par kilogramme
PP	Polypropylène
PRV	Phase Ratio Variation
PS	Polystyrène
PTR-MS	Proton Transfert Reaction Mass spectrometry
QDA	Quantitative Descriptive Analysis
S	Saveur
SM	Spectromètre de Masse
SNK	Test de comparaisons multiples de Student-Newman-Keuls
SPME	Solid Phase Microextraction
TI	Time intensity (Temps intensité)
V	Texture Visuelle à la cuillère
WP	Whey protein (protéines sériques)

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS **1**

INTRODUCTION **6**

DEMARCHE **10**

I. ELEMENTS BIBLIOGRAPHIQUES **14**

I.1 LE MODELE D'ETUDE : LE YAOURT BRASSE AROMATISE 14

I.1.1 Caractérisation et fabrication du yaourt *14*

I.1.1.1 Définition et réglementation 14

I.1.1.2 Composition et procédés de fabrication 15

I.1.2 Structure et texture du yaourt *18*

I.1.2.1 Influence de la composition en protéines sur la structure des yaourts 19

I.1.2.2 Influence du traitement mécanique sur la structure des yaourts 20

I.1.3 Libération et perception des composés d'arôme dans le yaourt brassé *21*

I.1.3.1 Influence de la composition en protéines sur la libération des composés d'arôme et la perception olfactive des yaourts 22

I.1.3.2 Influence du traitement mécanique sur la libération des composés d'arôme et la perception olfactive des yaourts 23

I.2 LA PERCEPTION OLFACTIVE ET LES METHODES DE MESURE SENSORIELLE 25

I.2.1 La perception olfactive *25*

I.2.2 Méthodes d'analyse sensorielle pour mesurer l'intensité de la perception au cours du temps *27*

I.3 METHODES DE MESURE ET LIBERATION DES COMPOSES D'AROME EN CONDITION DE CONSOMMATION ... 31

I.3.1 Méthodes d'analyse « hors ligne » de la libération des composés d'arôme en condition de consommation *31*

I.3.2 Méthodes d'analyse en temps réel de la libération des composés d'arôme en condition de consommation *33*

I.3.2.1 Principe 33

I.3.2.2 Les méthodes spectrométriques permettant l'analyse en temps réel 33

I.3.3 Les simulateurs buccaux pour l'étude de la libération des composés d'arôme *36*

I.4 MECANISMES ET PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES IMPLIQUES DANS LA LIBERATION DES COMPOSES D'AROME ET LA PERCEPTION 40

I.4.1 Les mécanismes de mastication et de déglutition *40*

I.4.1.1 La mastication 40

I.4.1.2 La déglutition 41

I.4.1.2.1 La phase orale 42

I.4.1.2.2 La phase pharyngée 43

I.4.1.2.3 La phase oesophagienne 43

I.4.2 Les paramètres physiologiques en bouche influençant la libération des composés d'arôme *43*

I.4.2.1 Effet de la salive sur la libération des composés d'arôme et la perception 43

I.4.2.2 Effet de la mastication sur la libération des composés d'arôme et la perception 45
I.4.2.3 Effet de la déglutition sur la libération des composés d'arôme et la perception 46
I.4.2.4 Effet de la fréquence et du flux respiratoire sur la libération des composés d'arôme et la perception 48
I.4.2.5 Effet des interactions entre les composés d'arôme et les muqueuses sur la libération des composés d'arôme et la perception 49
I.4.2.6 Effet de l'échauffement du produit lors de la mastication sur la libération des composés d'arôme et la perception 50
I.4.3 Conclusion 51
I.5 FACTEURS PHYSICOCHIMIQUES IMPLIQUES DANS LA LIBERATION DES COMPOSES D'AROME 52

II. MATERIELS ET METHODES 56

II.1 LA FABRICATION DES YAOURTS BRASSES AROMATISES 56
II.1.1 Les matières premières entrant dans la fabrication des yaourts 56
II.1.1.1 Les poudres 56
II.1.1.2 Les matières grasses 56
II.1.1.3 L'eau 57
II.1.1.4 Les composés d'arômes 57
II.1.2 La composition des yaourts 59
II.1.3 La fabrication des yaourts 60
II.1.3.1 La reconstitution des laits 60
II.1.3.2 Le traitement thermique des mixes avant fermentation 60
II.1.3.3 La fermentation des yaourts 61
II.1.3.4 Le traitement mécanique 62
II.1.3.5 L'aromatisation des yaourts 63
II.1.3.6 Le stockage et le conditionnement 63
II.2 CARACTERISATION DES MATRICES PAR MESURES INSTRUMENTALES 64
II.2.1 La caractérisation des propriétés physiques 64
II.2.1.1 Mesure de la taille des gouttelettes lipidiques 64
II.2.1.1.1 Objectif de ces mesures 64
II.2.1.1.2 Granulométrie laser 64
II.2.1.1.3 Microscopie optique 66
II.2.1.2 Mesure du pH 67
II.2.1.3 Mesure des propriétés mécaniques 67
II.2.1.3.1 Matériel et conditions opératoires 67
II.2.1.3.2 Mesures en régime harmonique 68
II.2.1.4 Analyse de la microstructure 71
II.2.2 Détermination de la libération des composés d'arôme par analyse de l'espace de tête 71
II.2.2.1 Détermination des coefficients de partage : méthode PRV 72
II.2.2.2 Libération des composés d'arôme par la méthode SPME en conditions statiques 73
II.2.2.3 Conditions opératoires chromatographiques pour l'analyse des composés d'arôme 74
II.2.3 Analyses statistiques des résultats physicochimiques 74
II.3 CARACTERISATION SENSORIELLE DES MATRICES 75
II.3.1 Influence de la composition protéique des yaourts sur leurs propriétés sensorielles 75
II.3.1.1 Objectif 75

II.3.1.2 Analyses discriminatives ... 75
II.3.1.3 Analyses descriptives quantitatives ... 76
II.3.1.3.1 Les sujets et l'environnement de la dégustation ... 76
II.3.1.3.2 Entraînement du panel et organisation des séances ... 77
II.3.1.3.3 Modes de présentation des échantillons ... 78
II.3.1.4 Analyses statistiques ... 79
II.3.2 Influence du traitement mécanique sur les propriétés sensorielles des yaourts ... 80
II.3.2.1 Objectif ... 80
II.3.2.2 Les sujets et les produits ... 80
II.3.2.3 Méthodologie et organisation des séances ... 81
II.3.2.4 Analyses statistiques ... 81
II.3.3 Influence du type d'emballage au cours du stockage sur les propriétés sensorielles des yaourts 82
II.3.3.1 Objectif ... 82
II.3.3.2 Les sujets et les produits ... 82
II.3.3.3 Méthodologie et organisation des séances ... 83
II.3.3.4 Analyses statistiques ... 84
II.4 CINETIQUES DE LIBERATION DES COMPOSES D'AROME EN CONDITIONS *IN VITRO* ET *IN VIVO* ET PERCEPTION TEMPORELLE AU COURS DE LA CONSOMMATION ... 85
II.4.1 Rôle du cisaillement sur la cinétique de libération des composés d'arôme : mesures in vitro ... 85
II.4.1.1 La cellule de cisaillement ... 85
II.4.1.2 Protocole : Isothermes en conditions non agitées et agitées ... 86
II.4.1.3 Traitement des résultats et analyses statistiques ... 86
II.4.2 Cinétiques de libération des composés d'arôme en bouche lors de la consommation des yaourts : mesures In vivo ... 87
II.4.2.1 Organisation des séances ... 87
II.4.2.2 Protocole de dégustation ... 88
II.4.2.3 Analyse de la libération des composés d'arôme présents dans la cavité nasale par APCI-MS ... 88
II.4.2.4 Traitement des résultats APCI-MS ... 90
II.4.2.5 Évaluation sensorielle temporelle au cours de la dégustation ... 91
II.4.2.6 Analyses statistiques ... 91
II.5 ÉTUDES PRELIMINAIRES : MISE AU POINT DES MATRICES ET CHOIX DES FACTEURS ... 92
II.5.1 Influence de la taille des gouttelettes lipidiques sur la libération de composés d'arôme et la perception ... 92
II.5.1.1 Détermination de la quantité de composés d'arôme libérée ... 93
II.5.1.2 Analyse discriminative ... 93
II.5.2 Choix des facteurs et mise au point des matrices ... 93
III. RESULTATS ET DISCUSSION ... 95
III.1 QUELLE EST L'INFLUENCE DE LA VISCOSITE COMPLEXE MODIFIEE PAR LA COMPOSITION EN PROTEINES ET LE TRAITEMENT MECANIQUE SUR LES PROPRIETES SENSORIELLES ET LES CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES DE YAOURTS BRASSES AROMATISES ? ... 95
III.1.1 Influence de la composition en protéines sur les propriétés sensorielles et les caractéristiques physicochimiques de yaourts brassés aromatisés ... 98

III.1.1.1 Effet de la composition en protéines sur les propriétés sensorielles et les caractéristiques physicochimiques des yaourts à faible traitement mécanique ... 98
III.1.1.1.1 Influence des protéines sur la perception des yaourts brassés aromatisés. ... 98
Influence Of Proteins On The Perception Of Flavored Stirred Yogurts. ... *99*
III.1.1.1.2 La viscosité complexe induite par des variations de la composition en protéines influence la libération des composés d'arôme de yaourts brassés aromatisés ... 123
Complex viscosity induced by protein composition variation influences the Aroma Release of Flavored Stirred Yogurt ... *124*
III.1.1.1.3 Conclusion sur l'effet de la composition en protéines des yaourts MT- ... 145
III.1.1.2 Effet de la composition en protéines sur les propriétés sensorielles et les caractéristiques physicochimiques des yaourts à fort traitement mécanique ... 146
III.1.1.2.1 Propriétés sensorielles ... 146
III.1.1.2.2 Propriétés rhéologiques ... 148
III.1.1.2.3 Libération de composés d'arôme ... 151
III.1.1.2.4 Conclusion sur l'effet de la composition protéique des yaourts MT+ sur les propriétés sensorielles et physicochimiques des yaourts ... 152
III.1.2 Influence de la viscosité complexe modifiée par l'application d'un traitement mécanique fort sur les propriétés sensorielles et les caractéristiques physicochimiques de yaourts brassés aromatisés . *154*
III.1.2.1 Effet du traitement mécanique sur les propriétés sensorielles des yaourts ... 154
III.1.2.2 Effet du traitement mécanique sur les propriétés physicochimiques des yaourts ... 155
III.1.2.2.1 Viscosité complexe ... 155
III.1.2.2.2 Coefficients de partage des composés d'arôme mesurés par PRV ... 156
III.1.2.2.3 Libération des composés d'arôme mesurée par SPME ... 156
III.1.2.3 Conclusion sur l'effet du traitement mécanique ... 157
III.1.3 Conclusion sur l'effet de la viscosité complexe sur la libération des composés d'arôme en conditions statiques et sur la perception ... *159*
III.2 QUELLE EST L'INFLUENCE DE LA VISCOSITE COMPLEXE MODIFIEE PAR LA COMPOSITION ET LE TRAITEMENT MECANIQUE SUR LA LIBERATION DE COMPOSES D'AROME EN CONDITIONS DYNAMIQUES ET LA PERCEPTION TEMPORELLE DE YAOURTS BRASSES AROMATISES ? ... 162
III.2.1 La viscosité complexe des yaourts brassés aromatisés influence la libération des composés d'arôme en bouche et la perception temporelle lors de la consommation. ... *165*
Flavored Stirred Yogurts complex viscosities influences Real-Time Aroma Release In The Mouth And Temporal Sensory Properties During Eating. ... *166*
III.2.2 Effet du cisaillement sur la libération des composés d'arôme en conditions in vitro ... *193*
III.2.2.1 Les conditions de l'étude *in vitro* ... 193
III.2.2.2 Effet du cisaillement sur la libération des composés d'arôme des yaourts de viscosité complexe variable ... 194
III.2.2.2.1 Conditions non agitées ... 194
III.2.2.2.2 Conditions agitées ... 195
III.2.2.3 Conclusion sur l'effet du cisaillement sur la libération des composés d'arôme ... 195
III.2.3 Discussion et conclusion sur l'effet de la viscosité complexe sur la libération des composés d'arôme en conditions dynamiques ... *197*

III.3 QUELLE EST L'INFLUENCE DE L'EMBALLAGE SUR LA LIBERATION DES COMPOSES D'AROME ET LA PERCEPTION DE YAOURTS A 0% ET 4% DE MATIERE GRASSE AU COURS DE LEUR CONSERVATION ? 202

The Packaging influences the sensory and physicochemical properties of flavoured stirred yogurt during storage. *204*

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES **227**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Avant-propos

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du réseau technologique CANAL ARLE (Conception Assistée de Nouveaux Aliments, Arôme, Libération, Emballage), cofinancé par le Ministère Français de la Recherche. Ce réseau rassemble 10 laboratoires publics et 15 partenaires privés. Il a pour objectif d'identifier les mécanismes physiques et physicochimiques expliquant la stabilité des arômes dans des matrices alimentaires conservées dans différents emballages, leur libération et leur perception en condition de mastication.

Les partenaires ont été choisis en raison de leur complémentarité pour mener à bien une étude pluridisciplinaire qui repose sur une approche multi-échelle.

Le projet s'appuie sur deux approches :

- une approche générique sur des systèmes simplifiés qui prend en compte les interactions à trois échelles (moléculaire, mésoscopique, macroscopique),
- une approche par matrices représentatives d'aliments réels : jus de fruit, gel de polyosides (base fruit sur sucre) et gel concentré protéique (fromage), émulsion gélifiée (yaourt brassé), produit sec et concentré à base d'amidon (génoise).

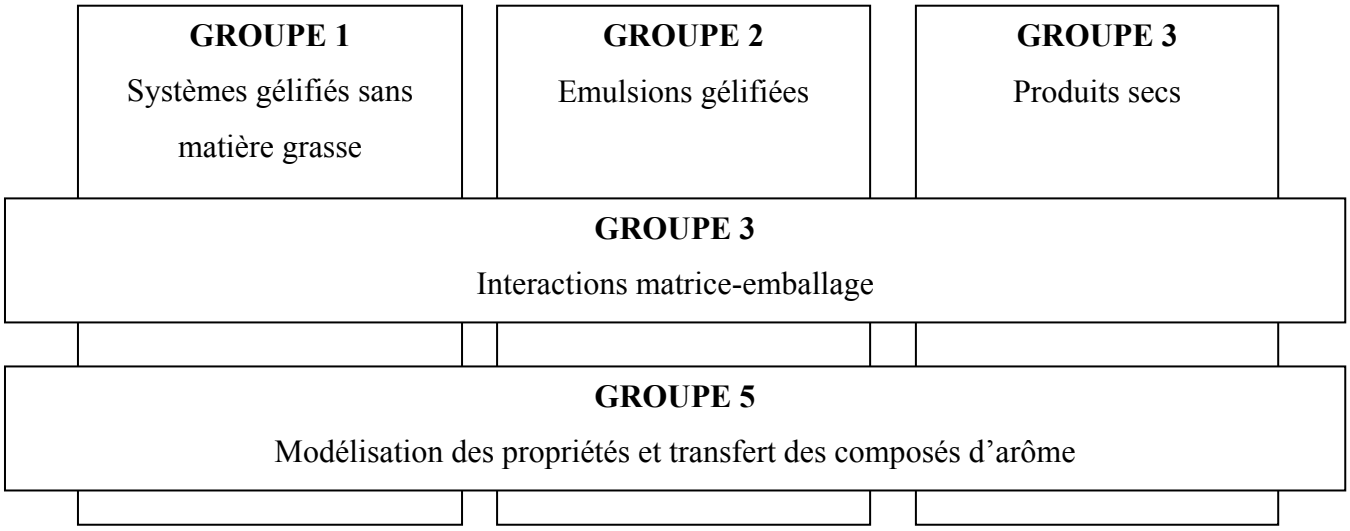


Figure 1 : Représentation schématique des groupes de travail du réseau technologique CANAL – ARLE

Les travaux de recherche conduits par les différents partenaires dans le cadre du projet CANAL ARLE sont organisés en cinq groupes de travail (Figure 1) :

- Groupe 1 : Systèmes gélifiés sans matière grasse (gel de polyosides et gel protéique),
- Groupe 2 : Émulsions gélifiées (application aux produits laitiers frais),
- Groupe 3 : Interactions matrice – emballage (groupe transversal),
- Groupe 4 : Produits secs et concentrés,
- Groupe 5 : Modélisation des propriétés et transfert des composés d'arôme (groupe transversal).

Ce projet de thèse s'inscrit dans le groupe de travail n° 2.
Les partenaires de ce groupe de travail sont l'Unité Mixte de Recherche Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (LGMPA - INRA Grignon), le laboratoire de Biopolymère Interactions Assemblages-Interfaces et Systèmes Dispersés (BIA-ISD - INRA Nantes), le laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Sensorielle de l'Aliment (IMSA - ENSBANA, Dijon), l'UMR Flaveur Arôme Vision et Comportement du consommateur (FLAVIC - INRA Dijon) pour les laboratoires publics et Danone, Lactalis, Nestlé, Yoplait-SODIAAL pour les partenaires privés.

Les travaux proposés par le groupe 2 ont pour but de mieux comprendre et de prédire l'impact de la structure et des propriétés rhéologiques des produits alimentaires comportant une phase lipidique émulsionnée (produits laitiers) sur le comportement des composés d'arômes et sur la perception de la flaveur et de la texture. Il s'agit d'identifier les mécanismes physiques et physicochimiques expliquant la libération et la perception de l'arôme dans ce type de produit. L'acquisition de ces données est nécessaire à la construction de modèles de prédiction de la libération des composés d'arôme, à l'équilibre et en conditions dynamiques, et allant jusqu'à la perception olfactive de produits laitiers à rhéologie complexe. L'objectif final est d'améliorer la maîtrise de leurs qualités sensorielles.

De nombreuses collaborations avec des partenaires du réseau CANAL ARLE ont été réalisées dans le cadre de ce travail de thèse :

- BIA-ISD - INRA Nantes (Anne Meynier et Claude Génot) : des échanges réguliers ont permis d'élaborer la formule fraise utilisée dans cette étude, de travailler sur des matières premières identiques, de valider différentes méthodologies et d'échanger les

résultats. Dans ce laboratoire, partenaire privilégié du groupe 2, s'est déroulé, en parallèle, une thèse sur des produits laitiers gélifiés modèles (Sébastien Bongard).

- UMR FLAVIC - INRA Dijon (Anne-Gaëlle Valade, Etienne Sémon, Isabelle Andriot et Elisabeth Guichard) : outre les nombreux échanges méthodologiques, le travail expérimental du suivi en ligne de la libération des composés d'arôme par Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry a été réalisé à l'INRA de Dijon.
- UMR Sécurité et Qualité des Aliments Emballés (SCALE) - INRA Massy (Violette Ducruet) : une étude sur l'impact du type d'emballage sur la perception des yaourts a également été réalisée dans le cadre de cette thèse. Elle a été conduite en collaboration avec le groupe 3 de CANAL-ARLE.
- Il est également à noter des collaborations étroites existantes entre ce travail et celui du groupe modélisation (LGMPA - thèse Samuel Atlan). La localisation des personnes sur un même lieu de travail a bien évidemment facilité des échanges très enrichissants.

Cette thèse a fait l'objet de publications, de communications orales et de posters :

Articles dans des périodiques à comité de lecture

- A. Saint-Eve, C. Lévy, N. Martin and I. Souchon. (2006). "Influence of proteins on the perception of flavoured stirred yogurts." Journal of Dairy Science, 89: 922-933.
- A. Saint-Eve, A. Juteau, N. Martin, S. Atlan and I. Souchon (2006). "Complex viscosity induced by protein composition influences the aroma release of flavored stirred yogurt ?" Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 3997-4004.
- S. Atlan, I.C. Trelea, A. Saint-Eve, I. Souchon and E. Latrille. (2006) "Processing gas chromatographic data and confidence interval calculation for partition coefficients determined by the Phase Ratio Variation (PRV) method." Journal of chromatography A 1110, 146-155.
- A. Saint-Eve, N. Martin, H. Guillemin, E. Semon, E. Guichard and I. Souchon, "Flavored stirred yogurts complex viscosity influences the real-time aroma release in mouth and the temporal sensory properties during eating" Journal of Agricultural and Food Chemistry. (accepté le 20 juillet 2006).
- A. Saint-Eve, C. Lévy, M. Le Moigne, V. Ducruet and I. Souchon. "Sensory properties of flavoured stirred yogurt as affected by packaging material and storage time" International Dairy Journal : soumis septembre 2006.

Articles en préparation

- S. Coïc, A. Saint-Eve, F. Aramendy, C. Plessis, I. Souchon and V. Ducruet "Sorption of aroma compounds by dairy food packaging during shelf life." International dairy journal ou Journal of chromatography A.

Communications dans des congrès

- A. Saint-Eve, N. Martin, C. Lévy and I. Souchon (2005). "How can protein ratio affect physical properties, aroma release and perceptions in yoghurt?" 11th Weurman Flavour Research Symposium, Eds. Bredie and Petersen, Elsevier. Rodskilde, Denmark. (communication orale + texte intégral).
- A. Saint-Eve, C. Lévy, M. Le Moigne, S. Coic, V. Ducruet and I. Souchon (2005). "The integration of the packaging material in the formulation of flavoured yogurts: how to choose the kind of polymer in accordance with the yogurt composition?" 11th Weurman Flavour Research Symposium, Eds. Bredie and Petersen, Elsevier. Rodskilde, Denmark. (poster + texte intégral).

- A. Saint-Eve, C. Lévy, I. Souchon and N. Martin "Comparison of different presentation modes in a sensory descriptive analysis to quantify subtle differences in olfactory characteristics of flavoured stirred yogurts varying in their matrix composition". Poster présenté au 6th Pangborn Sensory Science Symposium – UK - 7-11 août 2005.

Autres communications

- A. Saint-Eve, N. Martin, C. Levy and I. Souchon "Formulation of flavoured yogurts: role of proteins and physical properties on perception". COST 921- Dijon - 7-8 avril 2005.
- A. Saint-Eve, E. Paci Kora, N. Martin and I. Souchon « Intérêt des approches couplées physico-chimiques et sensorielles pour l'étude des interactions texture-flaveur dans des yaourts brassés aromatisés ». Réseau ITF « Interaction Texture Flaveur », Nantes, Novembre 2005.

Introduction

L'homme perçoit son environnement grâce à ses sens. Lors de la consommation d'un aliment, la vue, le toucher, l'ouïe, le goût et l'odorat contribuent à la perception globale du produit. Les propriétés organoleptiques des aliments, telles que la texture[1], l'arôme[2] et la saveur[3], constituent des critères de qualité déterminants de l'acceptabilité et des préférences des consommateurs.

Au cours de la consommation d'un aliment, les composés d'arôme présents dans la matrice alimentaire sont entraînés par voie gazeuse dans la cavité nasale lors de la manipulation du produit en bouche. Ces composés d'arôme sont susceptibles de se lier aux récepteurs au niveau de l'épithélium olfactif. Les interactions qui en résultent vont être à l'origine de la perception olfactive de l'aliment.

Les caractéristiques physicochimiques des produits alimentaires influencent les perceptions olfactives. Les variations de la composition d'un produit entraînent généralement une modification de sa structure, de ses propriétés rhéologiques, mais aussi de la rétention et de la libération des composés d'arôme par la matrice alimentaire. Par conséquent, la perception olfactive du produit se trouve modifiée. Un changement de composition de la matrice nécessite alors la recherche d'une nouvelle aromatisation des produits.

La formulation de nouveaux aliments reste encore empirique et, de ce fait, est longue et coûteuse. La maîtrise de la formulation aromatique des aliments constitue aujourd'hui une étape importante du processus de développement de nouveaux aliments. Ainsi, la compréhension des mécanismes qui régissent la perception olfactive est indispensable pour formuler des aliments aux qualités organoleptiques mieux maîtrisées.

Les composés d'arôme sont des molécules de petites tailles, appartenant à un grand nombre de familles chimiques, ayant comme propriétés communes d'être volatile et odorante dans des

[1]Texture : ensemble des propriétés rhéologiques et de structure (géométrie et de surface) d'un produit alimentaire, perceptible par les mécanorécepteurs, les récepteurs tactiles et, éventuellement par les récepteurs visuels et auditifs.

[2]Arôme et odeur : propriété organoleptique perceptible par voie orthonasale (odeur) ou rétronasale (arôme) lors de la dégustation.

[3]Saveur : sensation perçue par l'organe gustatif lorsqu'il est stimulé par certaines substances solubles.

conditions normales de pression et de température. Ces composés sont présents en faible concentration dans le produit et peuvent interagir avec les composants de la matrice alimentaire. Lors de la mise en bouche du produit, de nombreuses et complexes manipulations du produit vont conduire à la libération des molécules responsables des stimuli sensoriels.

En bouche, l'aliment va être progressivement déstructuré, broyé et dilué par la mastication et la salive. Ces étapes vont alors influencer la libération des composés d'arôme par la matrice alimentaire. La libération des composés d'arôme, et par conséquent la perception olfactive d'un produit, dépend donc également des conditions physiologiques de consommation des individus.
Ainsi, de nombreux paramètres doivent être pris en compte pour comprendre les mécanismes à l'origine de la perception olfactive : paramètres physicochimiques liés au produit et paramètres physiologiques liés au sujet. Des méthodes *in vivo* de mesure en ligne de la libération des composés d'arôme dans la cavité nasale d'individus au cours de la consommation d'un produit alimentaire sont donc indispensables pour mieux comprendre la part relative au produit et à l'individu expliquant les propriétés sensorielles. En parallèle, la perception de ces produits peut être évaluée.

De nombreuses études portent sur le rôle de la structure et des propriétés rhéologiques des aliments dans la libération des composés d'arôme et leur perception. Leur analyse montre, pour certaines études, que les modifications de composition de la matrice influencent à la fois les propriétés rhéologiques des matrices et la libération des composés d'arôme. En effet, les composants non volatils des matrices alimentaires (épaississant, matière grasse, protéine) peuvent interagir de façon spécifique avec les composés d'arôme (Guichard, 2002). Certaines études ont montré que ces interactions physicochimiques pouvaient être à l'origine des modifications des propriétés olfactives des produits possédant des propriétés rhéologiques et des textures distinctes (Pangborn and Szczesniak, 1974, Wendin *et al.*, 1997, Andriot *et al.*, 2000). Ainsi, les propriétés physicochimiques des composés d'arôme dans les matrices alimentaires (interactions, libération) peuvent être à l'origine de leurs propriétés sensorielles.
Cependant, d'autres études, en conditions *in vivo*, appuient l'hypothèse d'interactions sensorielles. Elles ont montré que les concentrations en composés d'arôme dans la cavité nasale ne sont pas affectées par la concentration en agent de texture lors de la consommation de gels de protéines de lactosérum (Weel *et al.*, 2002), de solutions de gomme de guar (Cook *et al.*, 2003) et d'hydroxy-propyl-méthyl-cellulose (Cook *et al.*, 2003, Hollowood *et al.*,

2002). Or l'intensité de la perception olfactive rétronasale de ces gels ou de ces solutions diminue en présence des agents de texture, ce qui suggère l'existence d'interactions sensorielles entre la perception d'arôme et la perception de texture (Weel *et al.*, 2002, Cook *et al.*, 2003, Hollowood *et al.*, 2002).

Enfin, les modèles d'études des travaux antérieurs sont souvent des systèmes de composition et de structure simples, qui sont éloignés de la complexité des aliments réels.

C'est dans ce contexte qu'a été défini l'objectif principal de notre travail : **comprendre le rôle de la structure et des propriétés rhéologiques sur la libération des composés d'arôme et la perception olfactive d'un produit réel.**

Le choix de notre modèle d'étude s'est porté sur le yaourt brassé. En effet, les yaourts, identifiés comme aliments bénéfiques pour la santé, sont aujourd'hui des produits de grande consommation. La dynamique actuelle de ce marché concurrentiel oblige les industriels à formuler sans cesse de nouveaux produits laitiers frais. Par ailleurs, de nombreux paramètres technologiques (composition en protéines, matière grasse, sucres ou traitements thermique et mécanique etc.) entraînent une modification de la structure et des propriétés rhéologiques du yaourt et par conséquent modifient ses caractéristiques sensorielles. Ainsi, le yaourt brassé offre, par son intérêt en tant que produit de consommation et par ses caractéristiques rhéologiques et de texture, un modèle de choix pour répondre à notre objectif.

Par ailleurs, afin d'aider à la conception de produits alimentaires de qualités organoleptiques souhaitées, il paraît nécessaire d'intégrer, dès sa conception, les propriétés des composés d'arôme et leurs évolutions au cours de la conservation et de la consommation des produits laitiers frais.
L'emballage protège le produit alimentaire et préserve ses qualités organoleptiques tout au long de sa conservation. Cependant, l'adsorption de composés d'arôme par les matériaux d'emballage peut influencer la perception olfactive du produit. A notre connaissance, l'influence de l'emballage sur les caractéristiques physicochimiques et sensorielles des produits laitiers frais a été peu étudiée. Les produits avec un temps de conservation plus long tels que le jus d'orange ont porté plus d'attention (Pieper *et al.*, 1992, Linssen *et al.*, 1992). De plus, très peu d'études se sont intéressées aux propriétés sensorielles des yaourts aromatisés au cours de leur stockage.

C'est dans ce contexte que le deuxième objectif de ce travail a été défini : **comprendre le rôle de la nature de l'emballage sur les propriétés physicochimiques et les propriétés sensorielles d'un yaourt brassé aromatisé au cours de son stockage.**

Pour répondre à ces objectifs, nous avons choisi de suivre une démarche pas à pas. Pour cela, une double approche, fondée sur des caractérisations physicochimiques et sensorielles des matrices, a été mise en œuvre en conditions statiques, puis en conditions dynamiques de consommation. Enfin, le rôle de l'emballage sur les propriétés physicochimiques et sensorielles des yaourts a été étudié au cours du temps de stockage du produit. L'ensemble de cette démarche est détaillé dans une partie qui suit cette introduction.

La première partie du manuscrit est consacrée à l'état des connaissances. En premier lieu, la fabrication et la caractérisation du produit cible de cette étude, le yaourt brassé aromatisé, sont présentées. Puis, les méthodes mises en œuvre dans la littérature de suivi des quantités de composés d'arôme libérés dans la cavité nasale en condition de consommation sont décrites. Ces techniques ont montré que la libération des composés d'arôme en bouche et la perception olfactive dépendent de nombreux paramètres. Les données bibliographiques sur ces paramètres d'origine physiologique liés à l'individu et ceux d'origine physicochimique liés au produit sont alors présentées.

La seconde partie du manuscrit présente les matériels et méthodes mis en œuvre dans le cadre du travail expérimental. La fabrication des matrices, les protocoles de caractérisation des propriétés rhéologiques et physicochimiques des produits, et les méthodes sensorielles utilisées sont détaillés. Certains travaux préliminaires nécessaires à la compréhension de la démarche suivie sont également présentés.

Les résultats des principaux travaux expérimentaux effectués au cours de cette thèse sont exposés dans la troisième et dernière partie du manuscrit.
Celle-ci est composée de trois chapitres respectant les principales étapes de la démarche expérimentale suivie (étude des caractéristiques physicochimiques en « conditions statiques », en « conditions dynamiques », puis étude concernant l'emballage). Les résultats sont présentés sous forme de publications et de compléments de résultats en français. L'ensemble des résultats obtenus en conditions *in vivo* et *in vitro* est intégré et discuté pour comprendre les mécanismes physiques de la libération des composés d'arôme à l'origine de la perception.

Démarche

Pour répondre à l'objectif principal de ce travail de thèse (comprendre le rôle de la structure et des propriétés rhéologiques sur la libération des composés d'arôme et la perception olfactive d'un produit réel), voici la démarche que nous avons suivie :

Le modèle d'étude choisi est un produit complexe : le yaourt brassé aromatisé. L'arôme fraise choisi pour cette étude est une formule complexe contenant 17 composés d'arôme, appartenant à un large spectre de familles chimiques.
Nous avons choisi de modifier la structure et les propriétés rhéologiques de nos produits par la variation de deux facteurs : la composition en protéines et le traitement mécanique. En effet, les travaux antérieurs du laboratoire et de la littérature ont montré que la composition en protéines laitières influence les caractéristiques de structure et les propriétés rhéologiques des produits.
Nous avons ensuite voulu dissocier l'effet de la structure de l'effet composition. C'est pourquoi, nous avons choisi de faire varier le niveau de traitement mécanique appliqué à un produit de même composition.

Nous avons suivi une démarche en deux étapes (Figure 2) afin de répondre aux questions suivantes :

1- Quelle est l'influence des propriétés rhéologiques du yaourt sur la libération des composés d'arôme en conditions statiques et sur ses propriétés sensorielles ?

Dans un premier temps, la variation de structure des produits a été obtenue par modification de la composition en protéine des yaourts. La caractérisation des propriétés sensorielles des différentes matrices a été réalisée par des méthodes d'analyse descriptive quantitative. Ce travail a permis de quantifier l'impact de la composition en protéines sur les perceptions de texture, de saveur, d'odeur et d'arôme.
En parallèle, les produits de composition variable ont été caractérisés par différentes méthodes physicochimiques. La microstructure des produits a été décrite, ainsi que leurs propriétés rhéologiques. Puis la libération des composés d'arôme en conditions statiques a été déterminée et quantifiée dans les yaourts de composition variable.

Suite à cette étude, nous nous sommes interrogés sur les mécanismes responsables des propriétés olfactives des yaourts de composition variable. Les différences de perception olfactive quantifiées entre les yaourts peuvent être dues, à la fois, aux interactions physicochimiques entre les composés d'arôme et les protéines et à un effet de structure, induit par la composition en protéines.

Afin de différencier l'effet de la structure de l'effet de la composition, une seconde étude a été réalisée sur des yaourts de même composition mais ayant subi un traitement mécanique variable. Les propriétés rhéologiques, la libération des composés d'arôme en conditions statiques dans les matrices et les propriétés sensorielles des yaourts ayant subi différents traitements mécaniques ont alors été caractérisés.

2- Quelle est l'influence de la viscosité complexe des yaourts sur les caractéristiques physicochimiques en conditions dynamiques et sur les propriétés sensorielles au cours de la consommation ?

Une étude en conditions *in vivo* a été réalisée pour quantifier les composés d'arôme libérés par les produits et disponibles dans la cavité nasale de sujets en conditions de consommation. En parallèle, la perception olfactive a été évaluée aux principaux temps de la consommation des produits de propriétés rhéologiques variables par un panel de sujets.

Les données de libération *in vivo* et de perception temporelle ont été reliées afin de comprendre le rôle des propriétés rhéologiques des produits sur la libération des composés d'arôme et la perception olfactive en conditions réelles de consommation.

Puis, afin de s'approcher des conditions en bouche, tout en contrôlant les conditions appliquées au produit (température et agitation), une cellule expérimentale a été utilisée pour évaluer l'impact du cisaillement et donc de la déstructuration du gel sur la libération des composés d'arôme.

6 yaourts aromatisés à la fraise de viscosité complexe variable

Enrichissement en protéines	**Yaourt WP**	**Yaourt MPO**	**Yaourt CAS**
Traitement mécanique faible			
Traitement mécanique fort			

Effet traitement mécanique

Effet composition en protéines

Effet viscosité complexe des gels sur propriétés physicochimiques	**Effet viscosité complexe des gels sur perception**
Propriétés physiques	**Analyse descriptive quantitative**
- Propriétés rhéologiques - Microstructure par microscopie électronique à balayage (INRA LGPTA).	- Analyse descriptive quantitative avec un panel de sujets entraînés. - Description et quantification de la perception olfactive et de texture
Rétention des composés d'arôme en conditions statiques	
- Mesure des coefficients de partage par la méthode PRV (Phase Ratio Variation). - Comparaison de la rétention des 17 composés d'arôme par les matrices par SPME (Solid Phase Microextraction).	
Libération des composés d'arôme en conditions dynamiques	**Caractérisation sensorielle temporelle**
- Mesures *in vivo* de la libération des composés d'arôme par APCI-MS au cours de la consommation des produits par des sujets (UMR FLAVIC). - Mesure *in vitro* de la libération des composés d'arôme par APCI-MS en conditions d'agitation. Utilisation d'une cellule de cisaillement (UMR FLAVIC).	- Evaluation de l'intensité aromatique globale à différents temps de la consommation du yaourt (mise en bouche, ingestion et persistance), réalisée en parallèle des mesures APCI-MS.

Figure 2 : Démarche expérimentale pour mieux comprendre la perception en lien avec la viscosité complexe du gel.

Pour répondre au deuxième objectif de ce travail de thèse, qui est l'influence de l'emballage et du temps de stockage du yaourt sur ses propriétés physicochimiques et sensorielles, la démarche suivante a été suivie :

Nous nous sommes intéressés à l'impact de différents emballages (polypropylène, polystyrène et un témoin verre) sur la perception aromatique des yaourts à 0% et 4% de matière grasse par une démarche couplant analyses physicochimiques et sensorielles (Figure 3).

De plus, le yaourt étant un produit qui évolue au cours du temps et dont la date limite d'utilisation optimale (DLUO) est de 28 jours, une double caractérisation physicochimique et sensorielle a alors été réalisée au cours de la conservation.

6 yaourts aromatisés au cours du temps de stockage (2, 14 et 28 jours)

	Verre	Polypropylène	Polystyrène
0% matière grasse			
4% matière grasse			

Effet matière grasse

Effet emballage

Caractérisation physicochimique	**Caractérisation sensorielle**
Propriétés physiques	**Analyse descriptive quantitative**
- Propriétés rhéologiques - Mesures de pH	- Analyse descriptive quantitative avec un panel de sujets entraînés. - Description et quantification de la perception de saveur, olfactive et de texture
Rétention des composés d'arôme en conditions statiques	
- Comparaison de la rétention des 17 composés d'arôme par les matrices par SPME (Solid Phase Microextraction).	

Figure 3 : Démarche expérimentale pour mieux comprendre la perception en lien avec la nature de l'emballage.

I. CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

L'objectif de cette partie est de réaliser un bilan des connaissances et des méthodes sur le rôle de la structure de la matrice alimentaire et les mécanismes pouvant expliquer la perception. Pour cela, les étapes du procédé de fabrication et la caractérisation du yaourt brassé aromatisé, produit cible de cette étude, sont présentées. Puis, les méthodes de suivi des quantités de composés d'arôme libérés dans la cavité nasale en condition de consommation sont exposées. Par ailleurs, la libération des composés d'arôme en bouche et la perception olfactive dépendent de nombreux paramètres d'origine physiologique liés à l'individu et d'origine physicochimique liés au produit. L'influence de ces différents paramètres est alors présentée.

I.1 Le modèle d'étude : le yaourt brassé aromatisé

Le choix du modèle d'étude s'est porté sur le yaourt brassé aromatisé. Il s'agit d'un produit de grande consommation pour lequel de larges variations de propriétés rhéologiques et de texture peuvent être obtenues. Nous rappellerons dans cette première partie l'état des connaissances (principaux résultats) concernant ce produit et le rôle des paramètres de composition et de procédés influençant sa structure et ses propriétés rhéologiques. Puis, le comportement des composés d'arôme dans ce type de matrice et leur perception seront étudiés.

I.1.1 Caractérisation et fabrication du yaourt

I.1.1.1 Définition et réglementation

Selon la réglementation française, un lait fermenté est un produit laitier composé exclusivement de matières premières d'origine laitière (lait et constituants du lait), ayant subi une pasteurisation et une fermentation par des micro-organismes spécifiques et caractérisé par une teneur en acide lactique minimale (0.6%). Il peut être additionné de certains ingrédients lui conférant une saveur spécifique (sucre, arôme, préparations de fruits), à condition que cette addition n'excède pas 30% du poids du produit fini.

En France, la norme AFNOR NF V 04-600 (2001) définit le yaourt ou yoghourt comme un "lait fermenté obtenu, selon des usages loyaux et constants, par le développement des seules bactéries lactiques thermophiles spécifiques dites *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* qui doivent être ensemencées et se trouver vivantes dans le produit fini à raison d'au moins 10 millions de bactéries par gramme rapportées à la partie lactée".

En 2005, la consommation de yaourts en France était de 21.1 kilogrammes par habitant. La production de yaourts s'élevait à 1.309 millions de tonnes *(Source Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière CNIEL)*.

I.1.1.2 Composition et procédés de fabrication

La principale matière première pour la fabrication des yaourts est le lait dont, pour l'essentiel, le lait de vache. Il est constitué d'environ 88% d'eau et de 12% de matière sèche totale contenant des glucides, des protéines, des lipides et des minéraux (Tamime and Robinson, 1999). La composition chimique moyenne du lait est rapportée dans le Tableau 1.

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

Tableau 1 : Composition chimique moyenne du lait de vache (Tamime et Robinson, 1999).

Les protéines sont les constituants du lait participant à la structuration du gel lors de la transformation du lait en yaourt. La matière protéique ou MPV (Matière Protéique Vraie) représente en moyenne 95% de la MAT (Matière Azotée Totale), les 5% restant étant de l'azote non protéique (urée, acides aminés, créatine). La MPV d'un lait frais se répartie en deux grandes catégories :

- Les caséines. Elles sont présentes sous forme d'une structure supra moléculaire : la micelle de caséines. Elles sont les principaux constituants protéiques (82%). Une propriété importante des micelles est de pouvoir être déstabilisée par voie acide ou par voie enzymatique et de permettre la coagulation; elle constitue le fondement de la transformation du lait en fromages et en laits fermentés.
- Les protéines sériques, qui sont également appelées protéines solubles, puisqu'elles ne précipitent pas sous l'effet d'une acidification. Ces protéines solubles ne coagulent pas par voie enzymatique, mais sont sensibles à la chaleur et dénaturées à

partir de 62°C. Elles se caractérisent en outre par une forte hydrophilie qui leur confère des propriétés fonctionnelles originales (pouvoirs hydratant et foisonnant) et par une valeur nutritionnelle élevée. La β-lactoglobuline est la protéine sérique la plus abondante (45%).

Plus précisément, la composition en protéines du lait est présentée dans le Tableau 2.

Protéines	*Concentration (g/L)*	*Distribution (%)*
MAT	**34**	**100**
Protéines	**32**	**94**
Caséines	**26**	**82**
-Cas-α_{s1}, Cas-α_{s2}	12	46
-Cas-β, -Cas-γ	10.5	41
-Cas-κ	3.5	13
Protéines sériques	**6**	**18**
-β Lactoglobuline	2.7	45
-α-Lactoglobuline	1.5	25
-Sérumalbumine	0.3	5
-Immunoglobuline	0.7	12
-Protéoses-peptone	0.8	13
Azote non protéique	**2**	**6**

Tableau 2 : Composition protéique du lait (Données CIDIL).

Le ratio Protéines Sériques / Caséines est donc proche de 20/80 dans un lait frais (soit 0.23).

Afin de modifier les propriétés rhéologiques et par conséquent de texture du produit, le lait peut être enrichi avec différentes fractions protéiques : poudre de lait, concentré de protéines sériques ou caséinates. Les caséinates solubles variés (sels alcalins de sodium, potassium, ammonium) ou insolubles (sels de calcium) peuvent être obtenus par neutralisation des caséines par des bases diverses (Cayot and Lorient, 1998).

Les procédés de fabrication des yaourts et laits fermentés se caractérisent par trois grandes étapes (Figure 4) :

- La préparation du lait appelée mixe incluant des étapes d'homogénéisation et de traitement thermique,
- La fermentation,
- Les traitements thermiques post-fermentaires du produit.

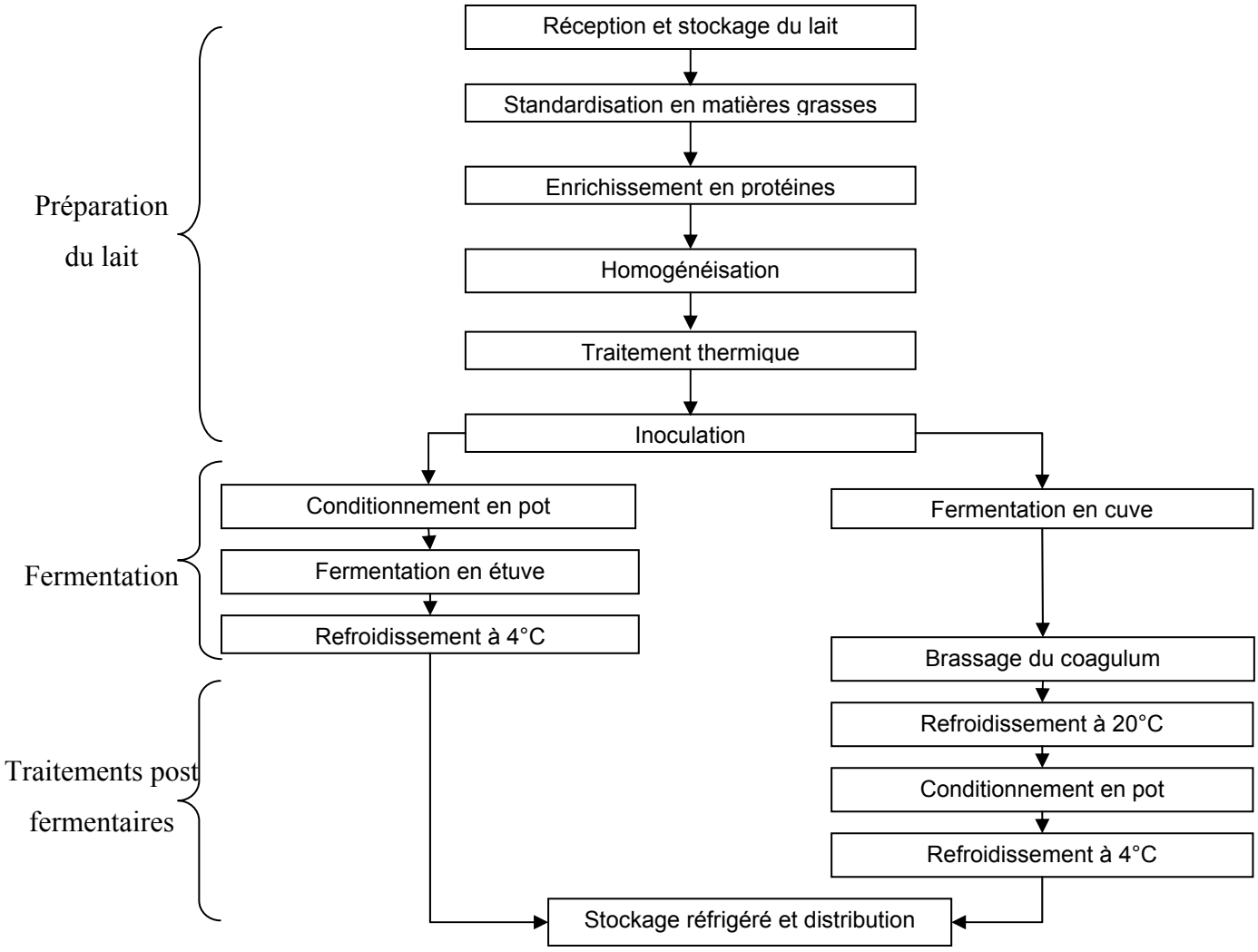


Figure 4 : Diagramme général de fabrication des yaourts et des laits fermentés (Techniques de l'ingénieur F6 315-7, par Beal et Sodini, 2003).

La transformation du lait en yaourt résulte de la mise en place d'une structure complexe et d'un changement important des propriétés rhéologiques : le produit passe d'un état liquide newtonien à un état de gel viscoélastique dont la déstructuration est irréversible.

La gélification acide se déroule en plusieurs étapes. Le pH initial du lait est d'environ 6.7, puis progressivement il descend jusqu'à 4.6 lors de la fermentation. Tandis que la micelle de caséine est stable au pH normal du lait et à température ambiante, au fur et à mesure de l'acidification lente du lait, cet édifice supramoléculaire devient instable et conduit à la formation d'un gel. Le déplacement de l'équilibre acido-basique entraîne une diminution progressive de la charge ionique des micelles jusqu'à devenir nulle. En parallèle, une solubilisation du phosphate de calcium micellaire est observée, entraînant la dissolution de la

structure micellaire. Ainsi, la solubilité et la capacité d'hydratation des caséines se trouvent fortement diminuées.

Le pH auquel commence la gélification du lait dépend de la température et des prétraitements thermiques du lait (Tamime and Robinson, 1985). Entre pH 6.7 et pH 5.8, les micelles de caséines semblent garder leur intégrité, leur forme et leur taille. De pH 5.8 à 5.5, les micelles se rapprochent les unes des autres sous l'effet de la chute du potentiel ζ et commencent à former des groupes de micelles. En dessous d'un pH de 5.5, des changements importants de forme et de dimension s'opèrent : des agrégats de micelles apparaissent. Les particules de caséines s'associent en bandes multiples par formation de liaisons hydrophobes, hydrogènes et électrostatiques. Lorsque le pH atteint 5, la solubilisation du calcium micellaire est totale. A pH 4.9, la gélification est complète. Les particules formées constituent un réseau gélifié retenant la phase aqueuse. A un pH inférieur au point isoélectrique des caséines (pH=4.6), le réseau tridimensionnel formé de chaînes et d'agrégats caséiques est stabilisé et n'évolue pratiquement plus. L'agrégation des micelles de caséine à pH 4.6 est irréversible (cité par Cayot and Lorient, 1998).

Pendant la phase de coagulation, les protéines sériques dénaturées participent à la construction du réseau gélifié, en se fixant à la surface des micelles de caséines.

I.1.2 Structure et texture du yaourt

La maîtrise du comportement rhéologique du yaourt est nécessaire pour appréhender la qualité en terme de texture des produits finis. En effet, lors des étapes de fabrication, le yaourt subit des contraintes (cisaillement lors des brassages, pompages, variation de température etc.) qui vont influencer sa structure et ses propriétés rhéologiques et qui doivent être maîtrisées.

La structure et la texture du yaourt ont été largement étudiées dans la littérature (Tamime and Robinson, 1999, Sodini *et al.*, 2004). Le yaourt brassé est constituée d'une dispersion concentrée d'agrégats protéiques qui détermine sa structure (van Marle, 1998). Il est défini comme un gel viscoélastique. Son comportement rhéologique est non-newtonien : sa viscosité dépend de la vitesse de cisaillement ou de la contrainte exercée.

Les propriétés physiques des yaourts peuvent être influencées par de nombreux facteurs : la composition du mixe laitier (en protéine mais également en matière grasse) et les traitements physiques thermique et d'homogénéisation, les ferments, les conditions de fermentation, le

traitement mécanique lors du refroidissement (incluant brassage, pompage et conditionnement), ainsi que la reprise en texture au cours du stockage.

Pour cette étude, nous avons choisi deux facteurs de variation de la structure et des propriétés rhéologiques des gels : la composition en protéines et le traitement mécanique appliqué au yaourt après fermentation. Dans la partie qui suit, nous aborderons uniquement ces deux facteurs et leur influence sur la structure et les propriétés rhéologiques du produit.

I.1.2.1 Influence de la composition en protéines sur la structure des yaourts

La nature et la teneur en protéines laitières jouent un rôle important sur les propriétés physiques et la perception de texture des yaourts. Ces facteurs ont été étudiés par de nombreux auteurs (Tamime *et al.*, 1999, Sodini *et al.*, 2004).

Les modifications de microstructure du réseau gélifié des produits laitiers peuvent être mises en évidence par microscopie électronique à balayage (MEB). Un réseau protéique fin, homogène avec des pores de petites tailles est observé dans le cas de yaourts enrichis en poudre de lait. Par opposition, l'ajout de caséinates de sodium dans le mixe laitier conduit à une structure protéique hétérogène et lâche (Tamime *et al.*, 1984, Puvanenthiran *et al.*, 2002, Remeuf *et al.*, 2003).

Les données de la littérature sur l'influence du ratio protéines sériques / caséinate sur les mesures de viscosité apparaissent contradictoires (Sodini *et al.*, 2004). Certains auteurs observent une augmentation de la fermeté du gel lorsque ce ratio augmente (Kailasapathy and Supriadi, 1998, Puvanenthiran *et al.*, 2002). D'autres études rapportent qu'à des taux constants en protéines totales, l'ajout de caséinates à la place de poudre de lait dans le mixe augmente fortement la viscosité du yaourt (Guinee *et al.*, 1995, Cho *et al.*, 1999, Guzmán-González *et al.*, 2000, Patocka *et al.*, 2004). Ces différences peuvent s'expliquer par le taux de dénaturation des protéines sériques et les micelles de caséines utilisées dans les études. Lors du processus de gélification par acidification du lait, les interactions formées entre les protéines sériques et les micelles de caséines vont alors être modifiées.

Les variations du type de protéines laitières et de leurs concentrations peuvent également modifier la perception de texture des produits (Tamime *et al.*, 1984, Kailasapathy and Supriadi, 1998, Sodini *et al.*, 2004). Les yaourts enrichis en caséinates ont une texture visuelle plus lâche, alors que les yaourts enrichis en poudre de lait apparaissent plus lisses (Tamime *et al.*, 1984). L'augmentation du ratio protéines sériques / caséinates conduit à la production de yaourt perçu comme granuleux (Kailasapathy and Supriadi, 1998).

I.1.2.2 Influence du traitement mécanique sur la structure des yaourts

Au cours de la fabrication d'un gel brassé, les différents traitements et, en particulier, les cisaillements, créés par les étapes de pompage, entraînent la déstructuration partielle du gel. Plusieurs hypothèses ont été évoquées pour expliquer ce phénomène de déstructuration du gel (Hess *et al.*, 1997, van Marle, 1998). Ce comportement peut être lié à une dégradation du réseau caséique en agrégats de petites tailles. Par ailleurs, il a été montré que les yaourts fabriqués avec des souches productrices d'exopolysaccharides exigaient plus d'énergie mécanique pour rompre les interactions entre exopolysaccharides et micelles que les interactions entre micelles (Hess *et al.*, 1997). Ces yaourts sont alors moins sujets à la déstructuration que les yaourts produits avec des souches non productrices d'exopolysaccharides. Un schéma de la dégradation des réseaux protéiques lors de l'application d'un traitement mécanique est proposé par Hess *et al.* (1997) en Figure 5.

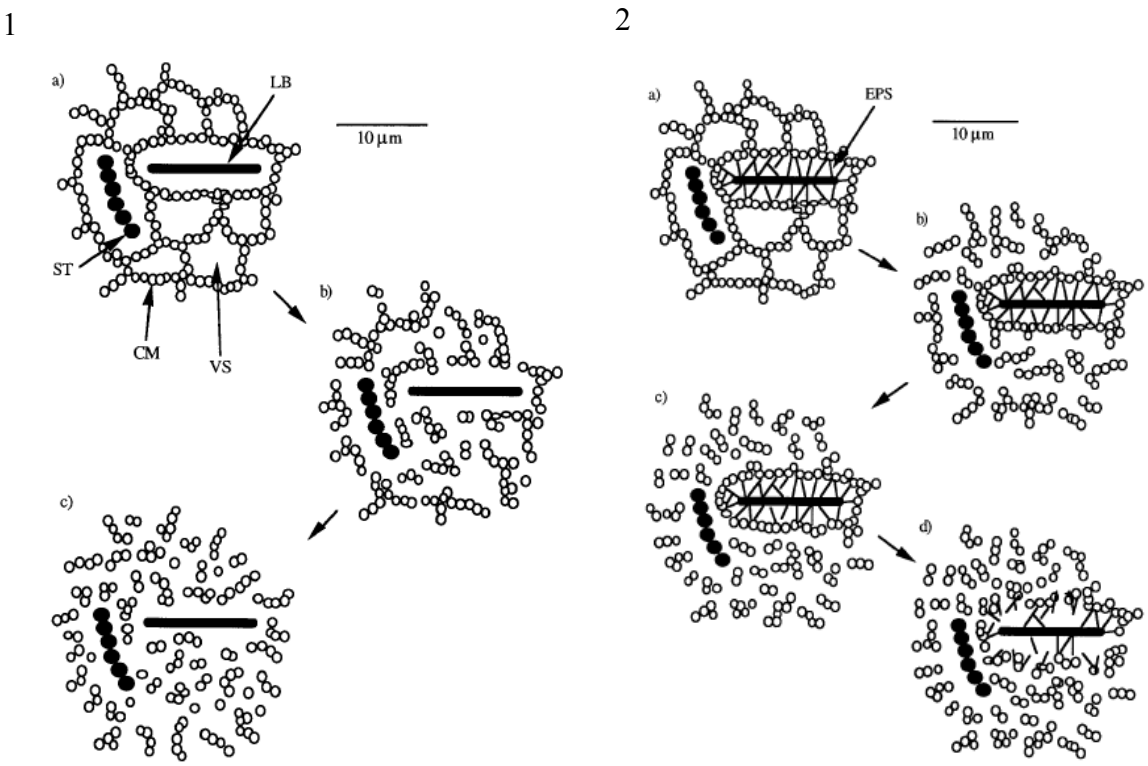


Figure 5 : Diagramme schématique montrant le mécanisme de dégradation de la structure du yaourt par cisaillement dans le cas de yaourts produits avec des souches non productrices d'exopolysaccharides (1) ou produits avec des souches productrices d'exopolysaccharides (EPS) (2) (Hess et al., 1997).
CM : casein micelles, ST : Streptococcus thermophilus, LB : Lactobacillus Thermophilus, VS : void spaces (espaces vides)

Le traitement mécanique entraîne une fragmentation du réseau du gel natif, provoquant ainsi une diminution de sa viscosité (van Marle, 1998, Cayot and Lorient, 1998). Une baisse de

300% de la viscosité apparente à 100 s^{-1} a été observée entre le gel natif et le yaourt brassé par Afonso et Maria (1999).

La rupture du réseau protéique est fonction de l'intensité du traitement mécanique et de la température à laquelle il est appliqué. En effet, même si l'effet est faible, un yaourt présente une plus grande résistance à la déstructuration à température élevée (50°C) qu'à faible température (10°C) (Rönnegard and Dejmek, 1993).

I.1.3 Libération et perception des composés d'arôme dans le yaourt brassé

Une molécule d'arôme est définie comme « une molécule organique de faible masse moléculaire (inférieure à 400 g/mol), dont la pression partielle dans les conditions normales de température et de pression, est suffisamment élevée pour que cette molécule soit partiellement à l'état gazeux et puisse, au contact de la muqueuse olfactive provoquer un stimulus » (Richard, 1992).

Les molécules odorantes appartiennent donc à la classe des composés organiques volatils. Elles présentent des structures chimiques très diverses, parmi lesquelles on peut citer les hydrocarbures terpéniques, les alcools aliphatiques et cycliques, saturés et insaturés, les acides organiques, les esters, les cétones, les aldéhydes, les composés soufrés, les lactones, ainsi que divers hétérocycles azotés et oxygénés.

La caractérisation physicochimique des composés d'arôme dans une matrice nécessite la détermination de propriétés thermodynamiques (équilibre aux interfaces) et de propriétés cinétiques (coefficient de diffusion au sein d'une même phase et coefficient de transfert entre deux phases).

Les constituants non volatils du yaourt (protéines, sucres, épaississants…) peuvent interagir avec les composés d'arôme. Ils peuvent déplacer les équilibres thermodynamiques composés d'arôme / matrice et influencer la mobilité des composés d'arôme au sein de la matrice et donc la perception olfactive induite.

Dans cette partie, nous nous focaliserons uniquement sur les interactions entre les protéines laitières et les composés d'arôme et leur conséquence sur la libération des composés d'arôme et la perception olfactive. En effet, le rôle des autres constituants du yaourt et en particulier de la matière grasse sur la libération et la perception des composés d'arôme est largement décrit dans la littérature. Mais la matière grasse ne constitue pas un facteur d'étude choisi dans ce travail, même si cette dernière a un rôle important sur la structure des gels laitiers.

I.1.3.1 Influence de la composition en protéines sur la libération des composés d'arôme et la perception olfactive des yaourts

Les protéines sont susceptibles de se lier avec les composés d'arôme par des interactions spécifiques. Dans la majorité des cas, elles provoquent une diminution de leurs volatilités (Guichard, 2002).

De nombreuses études ont examinées les interactions entre la β-lactoglobuline et les composés d'arôme (Guichard, 2002, Hansen and Booker, 1996). Ces études ont été, pour la plupart, menées sur des protéines en milieu modèle. Les β-lactoglobulines sont susceptibles d'interagir avec de nombreux composés d'arôme appartenant à diverses familles chimiques : les esters (Jouenne and Crouzet, 2000, Charles *et al.*, 1996), les cétones (O'Neill and Kinsella, 1987), les alcools et les aldéhydes (Jouenne and Crouzet, 2000). Par contre, les β-lactoglobulines n'interagissent ni avec les méthyl-pyrazynes ni avec les acides à courtes chaînes (Pelletier *et al.*, 1998, Sostmann and Guichard, 1998).

Les interactions mises en jeu peuvent être des liaisons réversibles (de nature hydrophobe ou électrostatique) ou irréversibles (réaction de la fonction carbonyle avec des groupements NH_2 libres).

La littérature est moins abondante en ce qui concerne les interactions physicochimiques entre les composés d'arôme et les caséines. Ces interactions dépendent de la nature chimique des composés d'arôme et de la concentration en caséines. L'acétaldéhyde interagit avec les caséines par des liaisons réversibles (Farès *et al.*, 1998). La rétention de l'heptanal augmente avec la concentration en caséinates (Fischer and Widder, 1997). Tous les aldéhydes ne montrent pas de liaisons réversibles avec les protéines. En effet, des liaisons covalentes entre l'hexanal et le trans-2-hexenal et les protéines laitières (protéines sériques et caséinates de sodium) ont été mises en évidence par Meynier *et al.*, (2004). Ces liaisons ont un impact plus important sur la volatilité du trans-2-hexenal présent dans une solution contenant ces protéines que sur celle de l'hexanal. Farès *et al.* ont révélé la formation de liaisons entre le diacétyle et les caséinates de sodium (Farès *et al.*, 1998). La rétention du diacétyle dépend de la concentration en caséinates. Elle n'est pas affectée à de faibles concentrations en caséinate (5 g/L), et diminue à des concentrations plus fortes (50 g/L) (Landy *et al.*, 1995). D'autre part, l'acétate d'éthyle n'interagit pas avec les caséinates de sodium dans des milieux aqueux, contrairement au butyrate d'éthyle et à l'hexanoate d'éthyle, esters à chaîne carbonée plus longue (Landy *et al.*, 1995, Farès *et al.*, 1998).

A notre connaissance, des données sur la libération des composés d'arôme dans des systèmes « yaourt » sont disponibles dans la littérature (Decourcelle *et al.*, 2005, Nongonierma *et al.,* 2005, Paci Kora *et al.,* 2004). Cependant, ces études n'apportent pas d'éléments sur le comportement des composés d'arôme vis-à-vis des protéines dissociées (protéines sériques et caséinates) d'un mélange de ces protéines.

Certains auteurs vont plus loin dans la caractérisation de ces interactions physicochimiques composés d'arôme-protéines et étudient leur impact sur les propriétés olfactives. Par exemple, l'addition de protéines sériques à des solutions de saccharose aromatisées avec de la vanilline ou du benzaldéhyde conduit à une diminution de l'intensité olfactive (Hansen and Heinis, 1991). Par contre, l'ajout de caséinates n'a pas d'influence sur l'intensité de ces solutions (Hansen and Heinis, 1992). Par ailleurs, l'addition de β-lactoglobuline n'a pas d'effet sur l'intensité de l'odeur de la vanilline, mais diminue significativement l'intensité olfactive de l'eugénol (Reiners *et al.*, 2000).

La plupart des études précédentes traite de systèmes modèles et non de produits complexes. De plus, peu de travaux ont étudié en parallèle l'influence des protéines sur la libération des composés d'arôme en conditions statiques et sur la perception olfactive (Andriot *et al.*, 2000).

I.1.3.2 Influence du traitement mécanique sur la libération des composés d'arôme et la perception olfactive des yaourts

L'effet de la structure sur la libération des composés d'arôme a été étudié à nombreuses reprises (Pangborn and Szczesniak, 1974, Baines and Morris, 1987, Wendin *et al.*, 1997). Mais, à notre connaissance, la variation de structure des produits dans ces études est uniquement due à une modification de la composition. Très peu d'études se sont intéressées à l'effet du traitement mécanique pour une même composition sur la libération des composés d'arôme.

Un effet significatif du traitement mécanique a été mis en évidence sur le seul coefficient de partage de la γ-octalactone dans des yaourts à 0% de matière grasse parmi les 5 composés d'arôme de la formule aromatique utilisée dans cette étude (Paçi Kora *et al.*, 2004). Lorsque le traitement mécanique appliqué augmente, le coefficient de partage du composé augmente d'environ 30%. L'hypothèse de l'existence d'une interaction spécifique entre ce composé d'arôme et un site de fixation du réseau caséique pourrait expliquer ce résultat. Cette interaction serait donc modifiée par le traitement mécanique.

Ainsi, les constituants du yaourt, notamment les protéines, interagissent avec les composés d'arôme et modifient leur libération du produit vers la phase gazeuse. La perception olfactive résultante peut donc être modifiée. Mais la plupart des études examinent l'influence de la structure sur la libération des composés d'arôme et la perception olfactive en milieux modèles. Par ailleurs, la modification de la structure des produits est obtenue très souvent en modifiant la composition des produits.

C'est pourquoi dans ce travail, nous avons choisi d'étudier l'influence des propriétés rhéologiques sur les propriétés physicochimiques et les propriétés sensorielles d'un produit complexe : le yaourt brassé aromatisé. Pour cela, les propriétés rhéologiques des produits sont modifiées par des variations de la composition en protéines et du traitement mécanique.

Après avoir présenté les principales connaissances relatives à la structure du gel et au comportement des composés d'arôme et leur perception dans ces matrices, il est nécessaire de faire un bilan des mécanismes de la perception et des méthodes d'évaluation sensorielle. L'étude de ces mécanismes et de ces méthodes permettra de mieux comprendre la dynamique de libération des composés d'arôme et des perceptions associées lors de la consommation d'un produit.

I.2 La perception olfactive et les méthodes de mesure sensorielle

La consommation d'un produit stimule simultanément les systèmes visuel, olfactif, gustatif, somato-sensoriel et trigéminal. Cependant, dans cette partie, nous focaliserons notre attention sur le système olfactif en proposant un état des connaissances sur les mécanismes responsables de la perception olfactive et sur les méthodes sensorielles permettant de caractériser les perceptions olfactives lors de la consommation d'un produit.

Selon la norme NF ISO 5492 (AFNOR, 2002), l'arôme et l'odeur sont les propriétés organoleptiques perceptibles par l'organe olfactif. On distingue odeur et arôme selon que la perception est issue de l'entraînement des composés d'arôme dans la cavité nasale respectivement, par voie directe (orthonasale) lors du flairage, ou par voie indirecte (rétronasale) lorsque l'aliment se trouve en bouche (Figure 6).

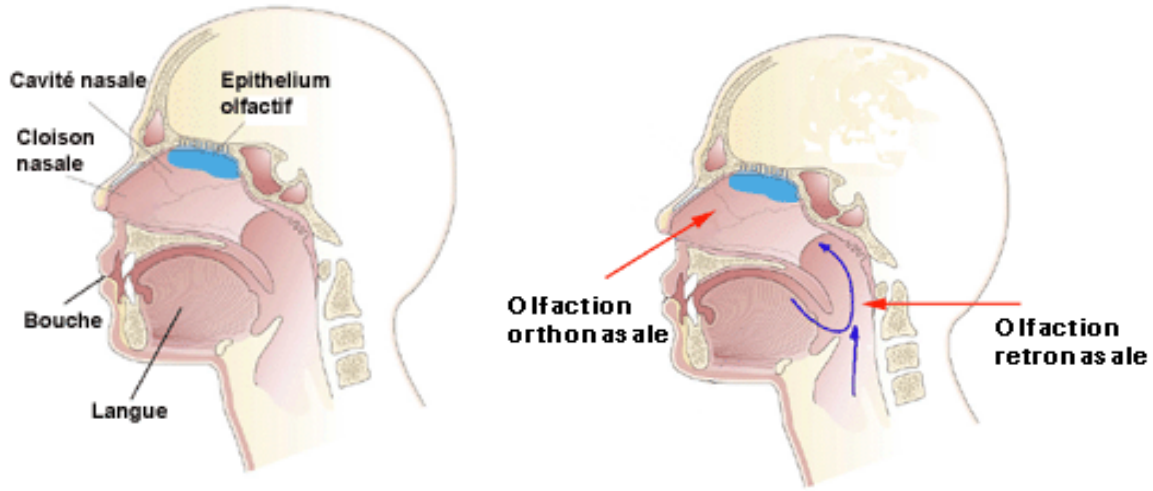


Figure 6 : Représentation des perceptions olfactives par voies orthonasale et rétronasale.

Les principales caractéristiques de la perception olfactive sont exposées ci-dessous.

I.2.1 La perception olfactive

Le stimulus est « un agent externe ou interne capable de provoquer la réaction d'un système excitable » (Robert, 1995).

Le système olfactif comprend quatre parties : la muqueuse olfactive, le bulbe olfactif, les centres olfactifs primaires et les centres olfactifs secondaires et tertiaires. La muqueuse

olfactive (Figure 7) est une région différenciée de la cavité nasale qui contient les récepteurs olfactifs.

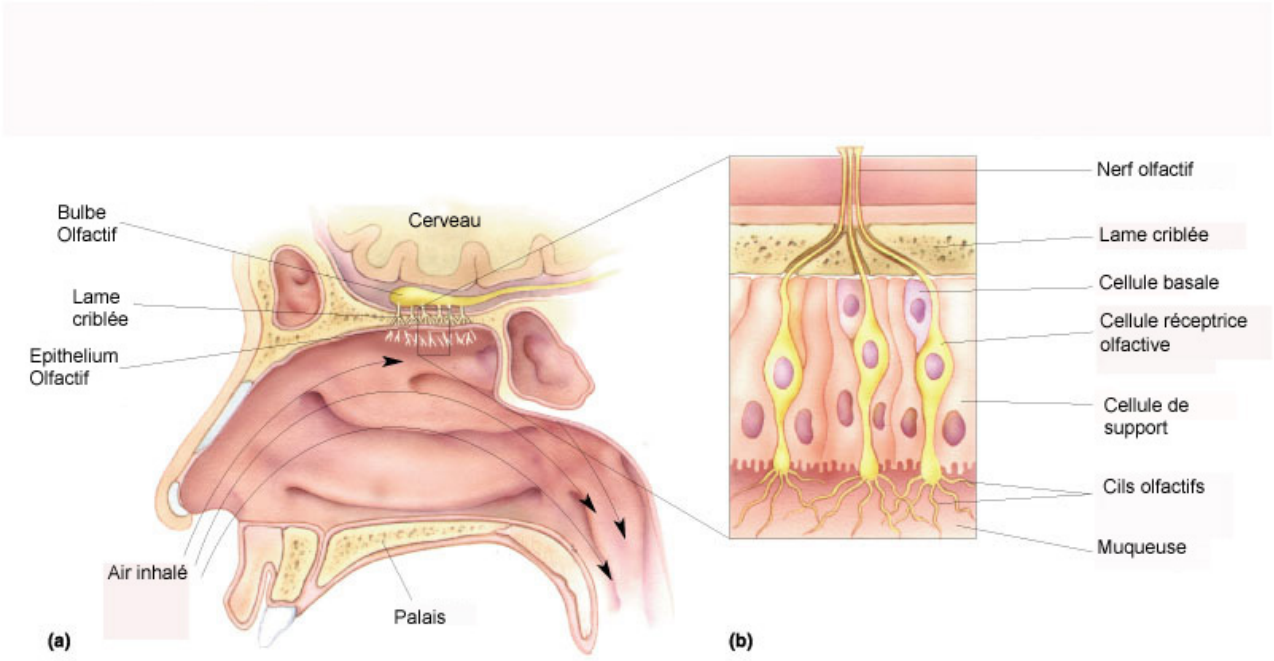


Figure 7 : Représentation schématique de la muqueuse olfactive. Localisation (a) et structure (b) de l'épithélium olfactif. (Document CNRS - Université Claude Bernard, dessin A.Holley).

L'épithélium olfactif est constitué de 3 types de cellules: les cellules basales, les cellules de soutien et les neurorécepteurs olfactifs (Holley, 1994).

- les cellules basales assurent le renouvellement des cellules sensorielles.
- les cellules de soutien permettent d'isoler les neurorécepteurs les uns des autres.
- les neurorécepteurs olfactifs comportent des extrémités dendritiques terminées par des cils dans la cavité nasale. Ces cils baignent en permanence dans le mucus olfactif et portent les sites récepteurs des composés d'arôme.

La perception olfactive est créée par le contact des composés d'arôme avec les neurorécepteurs. Ces derniers envoient alors un signal aux centres nerveux. La distribution spatiale des signaux forme « une image olfactive » qui caractérise en fait la qualité de l'odeur (Holley and Sicard, 1994). Ainsi, dans le bulbe olfactif comme à la périphérie du système olfactif, chaque odeur est représentée par l'activité d'un ensemble spécifique de neurones.

La stimulation olfactive se définit par une qualité propre, relative aux propriétés physicochimiques du composé d'arôme.

L'odeur peut être décrite selon son intensité et sa qualité. La dimension d'intensité est fonction de la concentration du stimulus olfactif. La qualité désigne la « note » olfactive.
Ces deux aspects, qualitatif et quantitatif, font référence respectivement aux pouvoirs de détection et de discrimination des stimuli olfactifs.
Quelques études ont été menées sur les composantes de la qualité de mélange d'odeurs. Ainsi Laing *et al.* ont montré que les sujets humains ne sont pas capables de discriminer et d'identifier plus de trois ou quatre odeurs dans un mélange, quelque soit le niveau d'expertise des sujets (Laing and Francis, 1989, Laing, 1994). Ces résultats ont comme principal intérêt de nous montrer qu'un mélange odorant, du point de vue perceptif, ne peut être simplement réduit à la somme de ces composants. Certains composants du mélange peuvent prédominer, ou imprimer leurs qualités au mélange, d'autres vont avoir tendance à s'effacer, ne pouvant plus être identifiés. Dans ce dernier cas, soit les odeurs sont "masquées" par les autres, toute information portée par elles étant perdues, soit elles se "mélangent" les unes aux autres pour donner de nouvelles notes odorantes (fusion).

I.2.2 Méthodes d'analyse sensorielle pour mesurer l'intensité de la perception au cours du temps

Lorsqu'on s'intéresse à une qualité sensorielle complexe ou multidimensionnelle, les méthodes descriptives permettent de décrire « leur perception avec attribution d'une valeur d'intensité pour chaque propriété » (AFNOR, ISO 13 299, juin 1995). Le but de l'analyse descriptive quantitative est de fournir une véritable carte d'identité sensorielle des objets et de déterminer la nature et dans la plupart des cas le degré de leurs différences (Barthelemy, 2003).
Dans ces méthodes d'analyse descriptive classique, il est demandé aux sujets de ne donner qu'une évaluation par descripteur. Aussi l'information relative à l'évolution temporelle est absente de ce type de mesure. Pourtant, la perception d'un aliment est un processus dynamique, dont l'intensité évolue au cours du temps. Entre le moment où un aliment pénètre dans la cavité buccale et le moment où il est ingéré, son arôme, sa saveur ou encore sa texture évoluent en raison de sa déstructuration.
Afin de compléter les analyses descriptives classiques, l'attention du sujet peut être focalisée sur des moments de la dégustation, avec quantification de la perception à ces temps donnés. La méthode de temps-intensité (TI) offre une alternative intéressante pour suivre l'évolution de la perception au cours de la mastication et mieux comprendre le mécanisme de la

perception. En effet, cette méthode permet de mesurer le niveau, la durée et l'intensité perçue d'un attribut sur une période de temps défini.
L'épreuve se déroule en partie comme pour une analyse descriptive quantitative durant laquelle le sujet utilise une échelle linéaire continue. Sa spécificité est que le sujet indique en continue sa perception à chaque instant.
La méthode de temps-intensité a été utilisée pour des évaluations de la flaveur (Lee and Pangborn, 1986) ou de la texture (Larson-Powers and Pangborn, 1978).

Les données TI se présentent sous la forme d'une courbe : intensité perçue pour un descripteur en fonction du temps d'évaluation (Figure 8). L'exploitation et l'interprétation de ces données sont délicates. En effet, l'expérimentateur se retrouve en présence de milliers de données. De plus, chaque sujet a sa propre signature lorsqu'il réalise une épreuve de temps-intensité (Palsgard and Dijksterhuis, 2000). Les différences entre sujets sont parfois plus importantes que les différences entre produits. Un « moyennage » des courbes est donc absolument impossible. Il est nécessaire de conserver la spécificité des sujets et des produits, et de mesurer la part de chacun des facteurs.

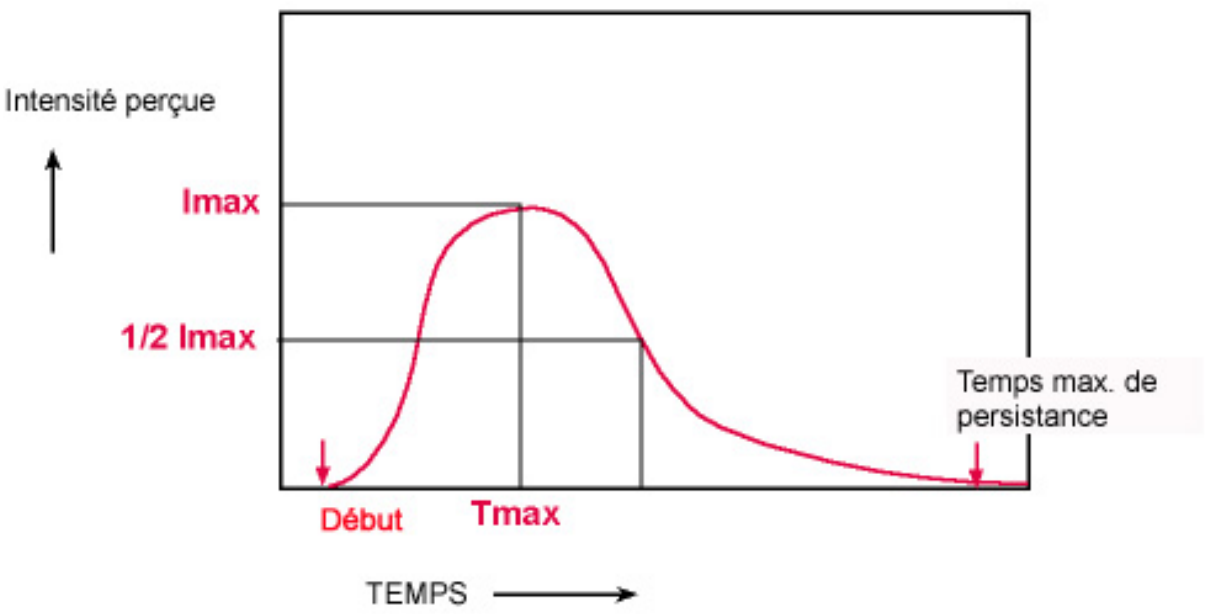


Figure 8 : Paramètres caractérisant une courbe temps-intensité.

De nombreuses techniques d'analyse des résultats TI ont été proposées, que l'on peut grouper en deux classes (Giboreau, 2001) :

- l'extraction de paramètres quantitatifs individuels. Les paramètres suivants sont fréquemment cités : intensité maximale (I_{max}), temps pour atteindre l'intensité

maximale (t_{max}), la surface de la courbe de l'intensité en fonction du temps sur toute la durée de réponse etc.,

- le traitement global des courbes : Les courbes temps-intensité sont souvent moyennées sur tous les sujets pour obtenir une courbe moyenne par produit.

D'une manière générale, le « moyennage » des courbes risque de conduire à l'exploitation de données erronées.

Une des critiques de la méthode temps-intensité est que les résultats obtenus ne rendent pas compte de la perception dans sa globalité, puisque chaque point obtenu est dépendant du point précédent. C'est pourquoi des techniques discontinues d'évaluation des intensités au cours de la consommation se développent (Pionnier *et al.*, 2004, Schlich and Cordelle, 2005).

La méthode de temps-intensité ne permet d'évaluer qu'un seul descripteur à la fois. Afin d'éviter les biais possibles dus à l'évaluation d'un seul attribut (phénomène de congruence), certains auteurs ont mis en place une nouvelle méthodologie de temps-intensité. Dans l'étude de Pionnier *et al.*, les sujets évaluent l'intensité de plusieurs attributs. Chaque attribut est noté à un temps différent de la période de mesure au cours de la mastication de fromages modèles (Pionnier *et al.*, 2004). Les courbes temps-intensité des différents attributs sont ensuite reconstituées. La superposition de ces courbes permet alors de comparer, par exemple, la dynamique d'une odeur par rapport à une autre, mais aussi d'une odeur par rapport à une saveur ou une caractéristique texturale.

Plus récemment, la méthode de Dominance Temporelle des Sensations (DTS) a été développée par Schlich et Cordelle. Lors de la consommation d'un aliment, le sujet est face à plusieurs échelles correspondant aux différentes modalités sensorielles à évaluer. Cette méthode consiste alors pour le sujet à choisir l'attribut dominant à chaque instant de la consommation et à en évaluer l'intensité sur l'échelle adaptée, et ceci jusqu'à ce que les perceptions disparaissent (Schlich and Cordelle, 2005).

Les méthodes d'analyse sensorielle permettent l'évaluation de la perception au cours du temps de la consommation d'un produit alimentaire. Cependant, l'exploitation des données issues de la méthode de temps-intensité s'avère délicate. C'est pourquoi, dans ce projet de thèse, notre choix s'est porté sur l'évaluation de l'intensité aromatique à trois moments importants de la consommation : à l'introduction du produit en bouche, à l'ingestion et 60 secondes après la mise en bouche correspondant à l'évaluation de la persistance.

Afin de comprendre la dynamique des perceptions au cours de la consommation, il est nécessaire de disposer des méthodes permettant de mesurer la cinétique de libération des composés d'arôme du produit vers la phase vapeur. La troisième partie de ce bilan bibliographique concerne donc les méthodes de mesure permettant de quantifier les cinétiques de libération des composés d'arôme en conditions *in vitro* ou *in vivo*, c'est-à-dire en condition de consommation.

I.3 Méthodes de mesure et libération des composés d'arôme en condition de consommation

Les méthodes permettant de quantifier la libération des composés d'arôme de la matrice alimentaire vers la phase aqueuse peuvent être rassemblés en deux groupes :

- Les méthodes que nous appellerons « statiques » pour lesquelles l'objectif est de quantifier la libération des composés d'arôme dans la matrice et ceci de façon indépendante du temps. Ces méthodes sont réalisées généralement en conditions d'équilibre et permettent de déterminer les coefficients de partage air/matrice. Pour ces méthodes, les produits se trouvent généralement dans des conditions non agitées. Ces méthodes sont largement décrites dans la littérature (Paci Kora, 2004) et ne seront pas détaillées ici.
- Les méthodes dites « dynamiques » dont l'objectif est de décrire la cinétique de libération des composés d'arôme au cours du temps. Ces méthodes peuvent être réalisées dans des conditions *in vitro*, c'est-à-dire en condition d'agitation et de température contrôlées, mais également en condition de consommation. Ces nouvelles méthodes *in vivo* prennent ainsi en compte les conditions réelles de consommation d'un produit : mastication, dilution par la salive, échauffement du produit, etc. (Taylor and Linforth, 1996).

Ce sont ces dernières méthodes que nous présenterons dans cette partie.

Le suivi des quantités de composés d'arôme libérés par le produit en condition de consommation peut être réalisé par des techniques indirectes nécessitant un prélèvement « hors ligne » de la quantité de composés d'arôme libérés ou par des techniques « en ligne » ou « en temps réel » permettant l'analyse en temps réel de la cinétique de libération.

I.3.1 Méthodes d'analyse « hors ligne » de la libération des composés d'arôme en condition de consommation

Le principe de ces méthodes est basé sur une adsorption sélective des composés d'arôme pendant un temps donné sur un support hydrophobe. Après adsorption, les composés d'arôme sont désorbés par chauffage et analysés par chromatographie en phase gazeuse. Les principaux facteurs de variation des conditions opératoires sont les types de polymères utilisés

(polymère poreux de type Tenax ou fibre SPME), le temps de contact avec l'air contenu dans la cavité nasale ou buccale et la fréquence des prélèvements.

Tout d'abord, des techniques de piégeage des composés d'arôme sur un polymère poreux adsorbant (type Tenax) ont été développées pour analyser les composés présents dans l'air expiré des sujets (Linforth *et al.*, 1994, Ingham *et al.*, 1995). Les faibles concentrations de composés d'arôme dans les produits alimentaires conduisent à de relatives faibles quantités dans l'air expiré des sujets et donc à des temps de piégeage des échantillons sur le polymère adsorbant relativement long (plusieurs secondes). Par conséquent, les quantités collectées correspondent à un profil moyen des composés d'arôme libérés au cours de la période de mastication d'un sujet. Dans certains cas, il est nécessaire de recueillir sur le polymère adsorbant l'air expiré de plusieurs sujets pour une même période de mastication. Ceci permet de compenser le manque de sensibilité de la méthode et donc de diminuer sa variabilité (Ingham *et al.*, 1995).

Grote et Pawliszyn (1997) ont appliqué la technique SPME (Solid Phase MicroExtraction) à l'analyse des quantités d'éthanol, d'acétone et d'isoprène présents dans l'air expiré des sujets. Dans leur étude, la fibre est placée dans la bouche des sujets. Les composés volatils sont piégés pendant 30 secondes, puis analysés par chromatographie en phase gazeuse. Les auteurs ont montré l'efficacité de leur méthode : quantification des extraits, bonne répétabilité, rapidité et simplicité des mesures (Grote and Pawliszyn, 1997).

La technique SPME a également été appliquée à l'analyse de la libération des composés d'arôme présents dans la cavité nasale lors de la consommation de fromages modèles (Pionnier *et al.*, 2005). La méthode consistait à échantillonner l'air expiré par les sujets pendant 8 secondes, sur une fibre SPME, à différents temps de la consommation.

La principale limite de ces méthodes est qu'il ne s'agit pas de mesure en temps réel, et que la courbe de libération obtenue correspond à des valeurs moyennées sur un intervalle de temps ou sur plusieurs individus. Afin d'avoir une information plus quantitative et également plus sensible, des méthodes « en ligne » ont été développées pour mesurer les cinétiques de libération des composés d'arôme dans la cavité buccale au cours de la consommation des produits.

I.3.2 Méthodes d'analyse en temps réel de la libération des composés d'arôme en condition de consommation

I.3.2.1 Principe

Ces méthodes, également appelées technique « nosespace », consistent à analyser et quantifier l'air expiré par le nez d'un individu au cours de la consommation d'un produit alimentaire. Les techniques en temps réel permettent d'avoir accès à l'évolution de la libération des composés d'arôme dans la cavité nasale en conditions de consommation (Figure 9). Elles ont pu être développées suite à l'apparition des méthodes spectrométriques sensibles pouvant être réalisées à pression atmosphérique et en présence de vapeur d'eau.

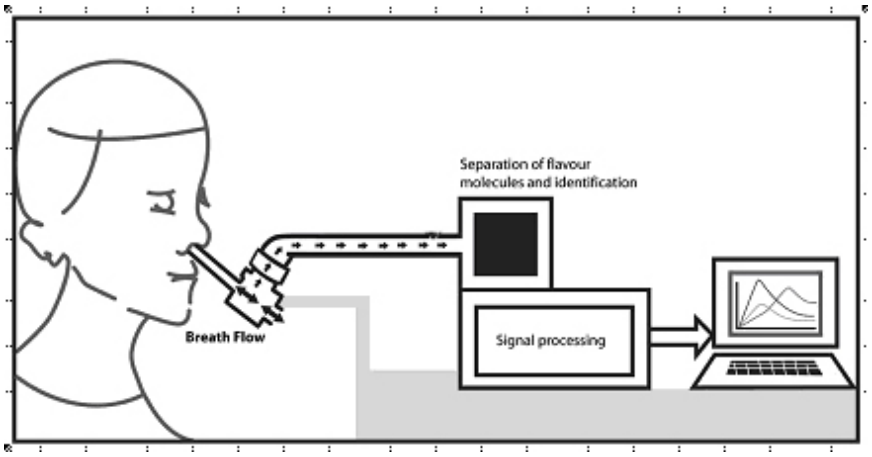


Figure 9 : Schéma représentatif d'une analyse « nosespace » (Harvey and Barra, 2003).

I.3.2.2 Les méthodes spectrométriques permettant l'analyse en temps réel

Au milieu des années 1990, des spectromètres de masse faisant appel à des techniques d'ionisations chimiques douces, ont été développés. Ces nouvelles techniques, la PTR-MS (Proton Transfert Reaction – Mass Spectrometry) et l'APCI-MS (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation – Mass Spectrometry), fonctionnent en présence d'eau et de dioxygène et sont utilisées pour analyser une majorité de composés organiques volatils.

Ces technologies s'appuient sur une ionisation chimique des composés d'arôme, et non pas sur une ionisation par impact d'électron. L'eau n'est donc plus un obstacle (comme pour la spectrométrie de masse classique) mais devient au contraire nécessaire au bon fonctionnement du procédé.

Les techniques APCI-MS et PTR-MS ont été développées respectivement par Linforth et Taylor (Taylor and Taylor, 1998) et Lindinger (Lindinger *et al.*, 1998).

En ce qui concerne la technique APCI-MS, une pompe Venturi alimentée en diazote permet l'entrée des réactants (composés d'arôme) issus de l'air expiré par le nez du sujet. Ainsi à chaque minute, plusieurs millilitres d'air sont injectés dans le système. La décharge au niveau d'une aiguille Corona provoque la formation d'ions H_3O^+. L'ionisation des composés d'arôme s'effectue par un mécanisme de transfert de charges entre le gaz de nébulisation (azote) et l'eau (présente dans les effluves nasales) (Figure 10). L'ionisation de H_2O en H_3O^+ et l'ionisation chimique des composés d'arôme à partir de H_3O^+ ont lieu dans le même tube. A l'extrémité de ce tube se trouve le spectromètre de masse pour mesurer les quantités des ions du milieu. L'air extérieur est aspiré à grande vitesse dans la source où une aiguille à effet Corona est maintenue à haut voltage, et ionise les substances présentes dans l'air.

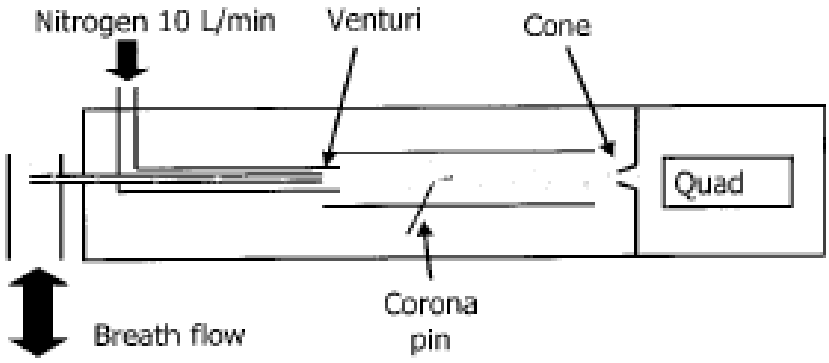


Figure 10 : Représentation schématique d'un appareil d'APCI-MS.

L'utilisation de spectromètre de masse équipé d'une source d'ionisation par transfert de protons (PTR-MS) permet également l'analyse en ligne des composés d'arôme au cours de la consommation. Avec cette source, les ions H_3O^+ sont formés séparément des effluves nasales à analyser, en utilisant la vapeur d'eau comme source moléculaire d'ions.

L'appareil PTR-MS se compose de trois parties (Figure 11) (Lindinger *et al.*, 1998) :

- La source d'ions,
- La chambre réactionnelle où les réactions entre les ions H_3O^+ et les composés d'arôme sont contrôlées à pressions et températures définies,
- Le détecteur d'ion.

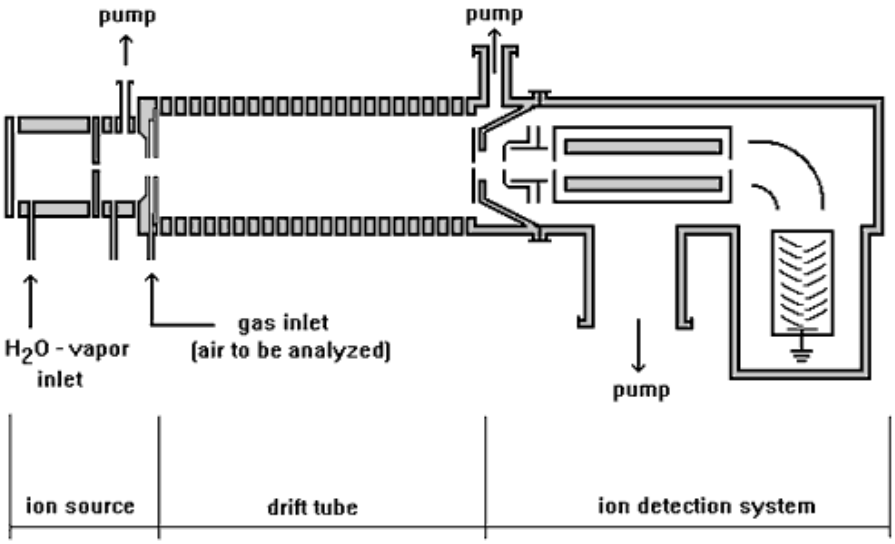


Figure 11 : Représentation schématique d'un appareil de PTR-MS**.**

La PTR-MS est une technique plus complexe que l'APCI-MS du fait de la séparation entre la production d'ions H_3O^+ et la production d'ions secondaires. Ceci permet d'assurer un contrôle très précis de l'ionisation, ce qui est rarement le cas dans le cadre de l'APCI-MS. De plus, un calibrage très délicat est nécessaire avec un appareil APCI-MS (Harvey and Barra, 2003), alors qu'il ne l'est pas avec la PTR-MS (Lindinger *et al.*, 1998). L'APCI-MS ne donne que rarement des résultats quantitatifs en raison de transferts de charges parasites entre les ions issus de composés d'arôme à faible affinité pour les protons et des molécules de composés d'arôme très avides de protons (Boscaini *et al.*, 2003).

La PTR-MS et l'APCI-MS différencient les composés par leur masse moléculaire et sont unidimensionnelles. Ces méthodes permettent le suivi en ligne de composés d'arôme connus. Elles ne sont pas destinées à l'identification de molécules et ne remplacent pas les méthodes bidimensionnelles telles que la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Ces deux techniques ne permettent pas de différencier les composés d'arôme de même poids moléculaires. L'analyse est donc limitée aux composés d'arôme de poids moléculaires distincts (Buhr *et al.*, 2002). La plupart des analyses « nosespace » sont souvent réalisées sur des produits aromatisés avec des arômes « modèles », dont les poids moléculaires ne

coïncident pas avec ceux des composés endogènes au produit alimentaire (Brauss *et al.*, 1999).

De plus, certains composés d'arôme présents en très faibles concentrations ne peuvent pas être suivis par ces techniques car ils sont en dessous du seuil de détection des appareils de mesure (Mei *et al.*, 2004, Boland *et al.*, 2006).

La compétition entre composés d'arôme pour l'ionisation dans la source peut entraîner une suppression du signal d'un des composés. Ces compétitions pourraient entraîner des biais dans le calibrage pour une analyse quantitative. Mais peu de travaux rapportent l'effet de ces compétitions (Pionnier, 2003).

Cependant, la sensibilité, la rapidité et la robustesse des méthodes de mesure en ligne APCI-MS et PTR-MS font de ces technologies des outils puissants pour la détermination en ligne des quantités de composés d'arôme libérés. Dans le cadre de notre travail, nous avons utilisé la technique d'analyse par APCI-MS, disponible à l'INRA de Dijon, pour suivre les composés d'arôme libérés dans la cavité nasale des sujets en conditions de consommation.

Ces méthodes de mesure en ligne peuvent être également couplées à des systèmes *in vitro* simulant les différents mécanismes de la bouche au cours de la consommation de produit, et ceci dans des conditions contrôlées.

I.3.3 Les simulateurs buccaux pour l'étude de la libération des composés d'arôme

De nombreux modèles de simulateur buccal ont été développés ces 10 dernières années (Piggott and Schaschke, 2001). L'objectif de ces systèmes est de se rapprocher autant que possible des conditions réelles de consommation et de libération des composés d'arôme en bouche. La plupart des systèmes développés tiennent compte de différents paramètres, tels que le contrôle de la température, l'ajout de salive artificielle et sa composition, l'agitation, le brassage ou la mastication. Ces simulateurs buccaux permettent d'étudier des paramètres et des mécanismes physicochimiques, sans être soumis à la variabilité des sujets.

Différents systèmes de complexité variable ont été proposés, pour des aliments liquides ou solides (Ingham *et al.*, 1995, Roberts and Acree, 1995, Van Ruth *et al.*, 1995, Hansson *et al.*, 2003).

Un dispositif de bouche artificielle qui simule le processus de mastication pour étudier la libération de composés d'arôme dans des aliments liquides a été mis au point par Nassl *et al.*

(1995) (Figure 12). Cette étude a permis de mettre en évidence l'importance de l'agitation sur la libération des composés d'arôme dans des émulsions huile dans eau (Nassl *et al.*, 1995).

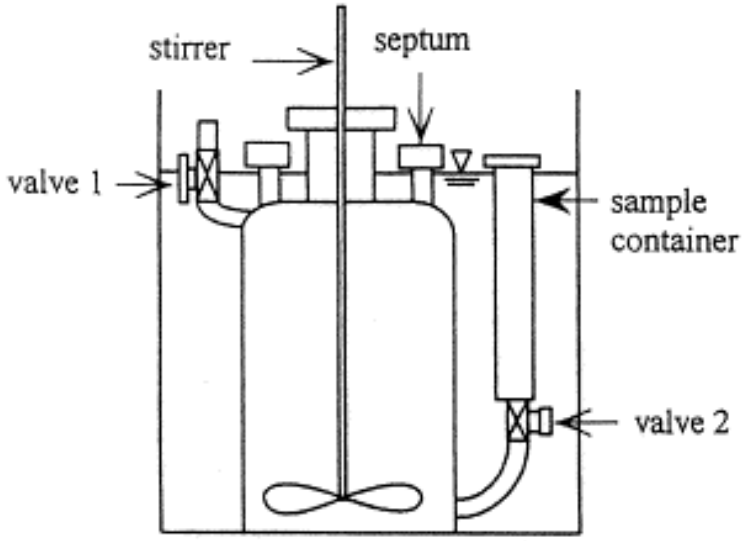


Figure 12 : Représentation schématique du système de bouche artificielle (Nassl et al., 1995).

Un simulateur d'arôme rétronasal (RAS) couplé à un spectromètre de masse – olfactomètre (GC-O) a été développé par Robert *et al.* (1995) (Figure 13). Ce dispositif a révélé les effets du volume de salive et du cisaillement du produit sur la libération des composés d'arôme dans une boisson (Roberts and Acree, 1995).

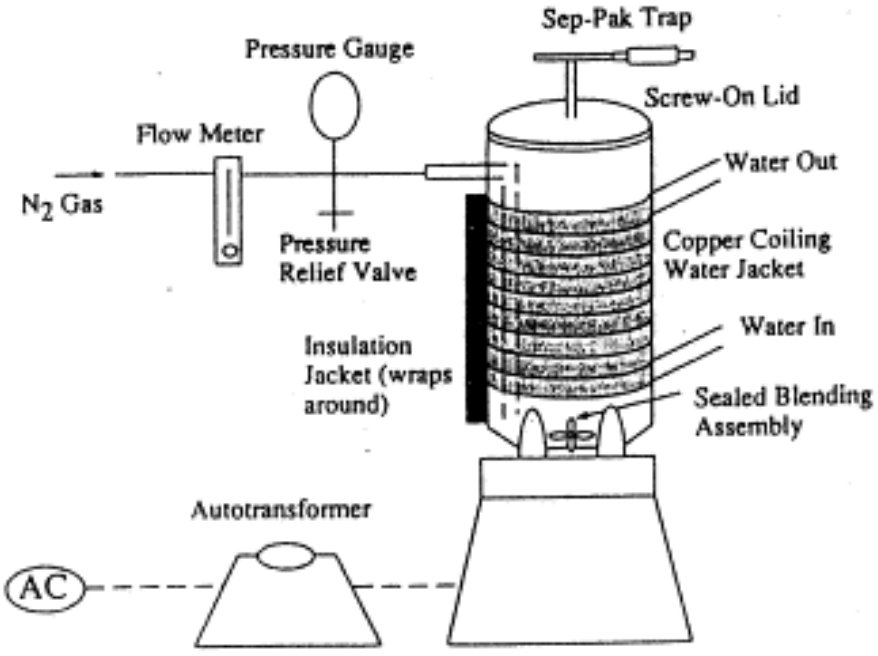


Figure 13 : Représentation du simulateur d'arôme rétronasale (système RAS) pouvant incorporé de la salive artificielle, régulé l'agitation, le flux d'air et la température (Roberts et Acree, 1995).

Odake *et al.* (1998) ont étudié la libération des composés d'arôme (diacétyle et 2-heptanone) dans des crèmes desserts à l'aide d'un masticateur dynamique. Ce système mime les mouvements de la bouche et, selon les auteurs, pourrait prédire la libération des composés d'arôme de façon plus précise que d'autres systèmes, spécifiquement pour les produits visqueux (Odake *et al.*, 1998).

Plus récemment, un système de gorge artificielle a été mis au point par Weel *et al.* (Weel *et al.*, 2004). Ce dispositif simule la déglutition, suivie de la respiration. Il se compose d'un tube vertical en verre pouvant être fermé par un clapet en caoutchouc (Figure 14). Les auteurs ont montré que la déglutition était l'étape primordiale dans la libération des composés d'arôme de produits liquides. Les effets du flux d'air, du temps de contact entre la matrice et la surface du tube et la présence de salive ont été étudiés. Les résultats obtenus sont en accord avec des mesures réalisées en conditions *in vivo*. Ces travaux ont montré que les propriétés de surface des matériaux utilisés (verre ou caoutchouc) peuvent fortement influencer le profil de libération des composés d'arôme.

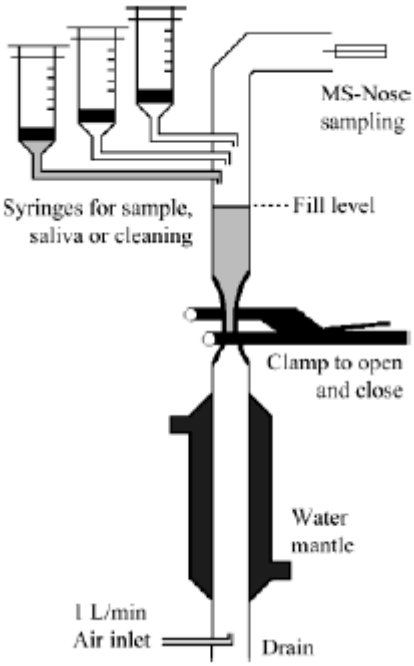


Figure 14 : Représentation schématique de la gorge artificielle par Weel et al. (2004).

Les bouches artificielles ou simulateurs de mastication peuvent être reliés à des systèmes de mesures en ligne pour l'obtention de profils *in vitro*. Ils permettent de simuler et surtout de standardiser la façon de manipuler le produit en bouche. La libération de composés d'arôme en bouche peut être ainsi simulée tout en s'affranchissant de la

variabilité inter individuelle (sujet différents) et intra individuelle (pour un même sujet lors de répétitions).

Après avoir décrit les outils méthodologiques disponibles dans la littérature pour étudier la libération des composés d'arôme en condition de consommation, nous nous sommes attachés à présenter l'état des connaissances concernant les mécanismes impliqués dans la libération des composés d'arôme et la perception liés à l'individu d'une part et au produit d'autre part.

I.4 Mécanismes et paramètres physiologiques impliqués dans la libération des composés d'arôme et la perception

La perception olfactive rétronasale est un processus complexe qui dépend de la physiologie du sujet. En effet, la libération des composés d'arôme, pendant la mastication, peut être influencée par la température, le pH de la bouche, la salive et les possibles adsorptions par les muqueuses buccales (Buettner and Schieberle, 2000).

I.4.1 Les mécanismes de mastication et de déglutition

I.4.1.1 La mastication

La mastication a pour fonction de réduire l'aliment en petites particules et de les agréger entre elles grâce à l'incorporation de salive, pour constituer un bol alimentaire compact qui puisse être dégluti (Prinz and Lucas, 1995). Elle permet d'augmenter la surface d'échange entre le produit et l'air en bouche.

Les aliments apportés en bouche sont coupés, déchirés et broyés par les dents. Les muscles masticateurs bilatéraux sont des muscles puissants qui permettent de mobiliser l'articulation temporo-mandibulaire. Ils sont au nombre de quatre (Figure 15) :

- Muscle masseter,
- Muscle temporal,
- Muscle ptérygoïdien latéral,
- Muscle ptérygoïdien médial.

Leurs contractions provoquent la fermeture de la cavité orale par un mouvement d'élévation de la mandibule.

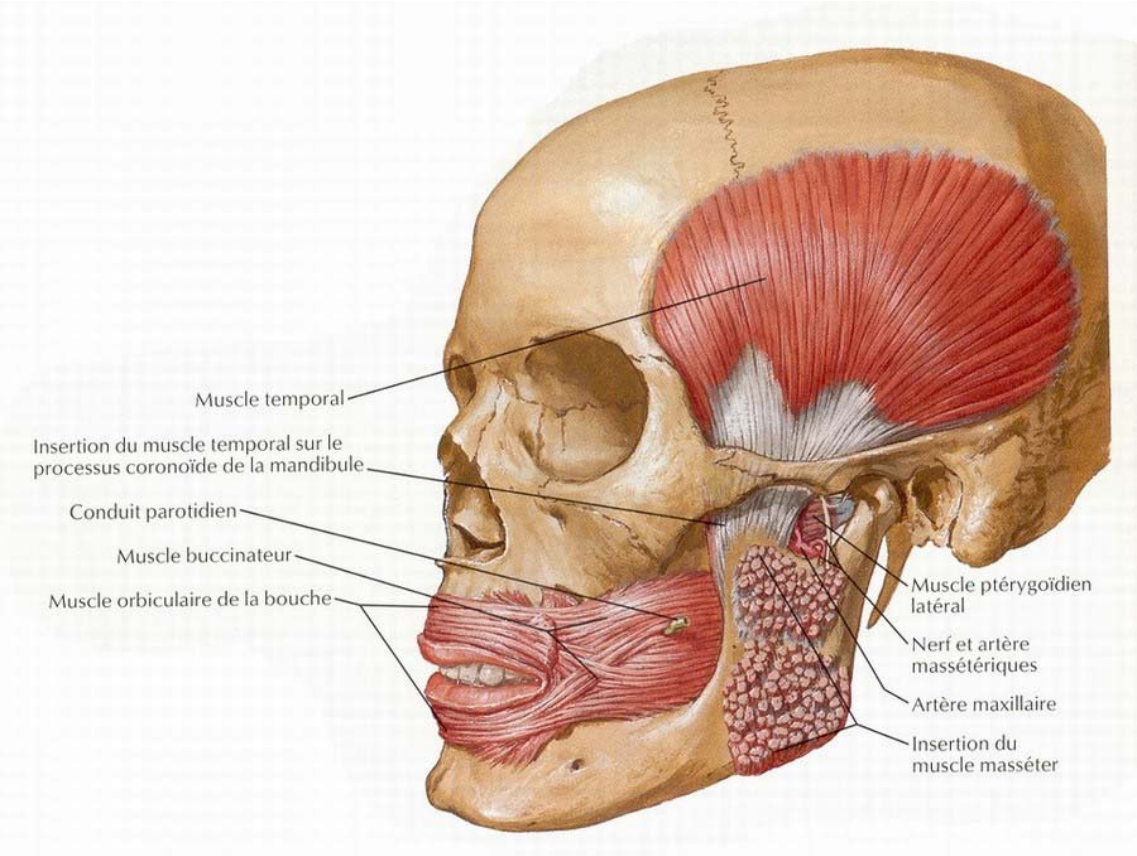


Figure 15 : Muscles de la mastication (Netter, Atlas d'anatomie).

La langue par sa souplesse et sa dextérité permet d'amener la nourriture entre les dents et d'écraser le bol alimentaire contre le palais. Elle assure également la formation du bol alimentaire qui doit être dégluti. Seuls les aliments suffisamment broyés et prêts à former un bol correct sont assemblés et mêlés à la salive. Le reste des aliments est renvoyé sous les dents.

Il est difficile de parler de mastication lors de la consommation d'un yaourt. L'aliment est dans ce cas prêt à être dégluti et ne subit qu'un cisaillement entre la langue et le palais. Si la mastication a été relativement bien étudiée dans la littérature, les mouvements de la langue pour des produits visqueux sont, à notre connaissance, quasi inexistants.

I.4.1.2 La déglutition

La déglutition est l'ensemble des mécanismes qui permet le transport des aliments de la cavité buccale vers l'estomac (Bleeckx, 2002). Elle se déroule en trois phases successives (Figure 16) :

- Phase orale,
- Phase pharyngée,

- Phase oesophagienne.

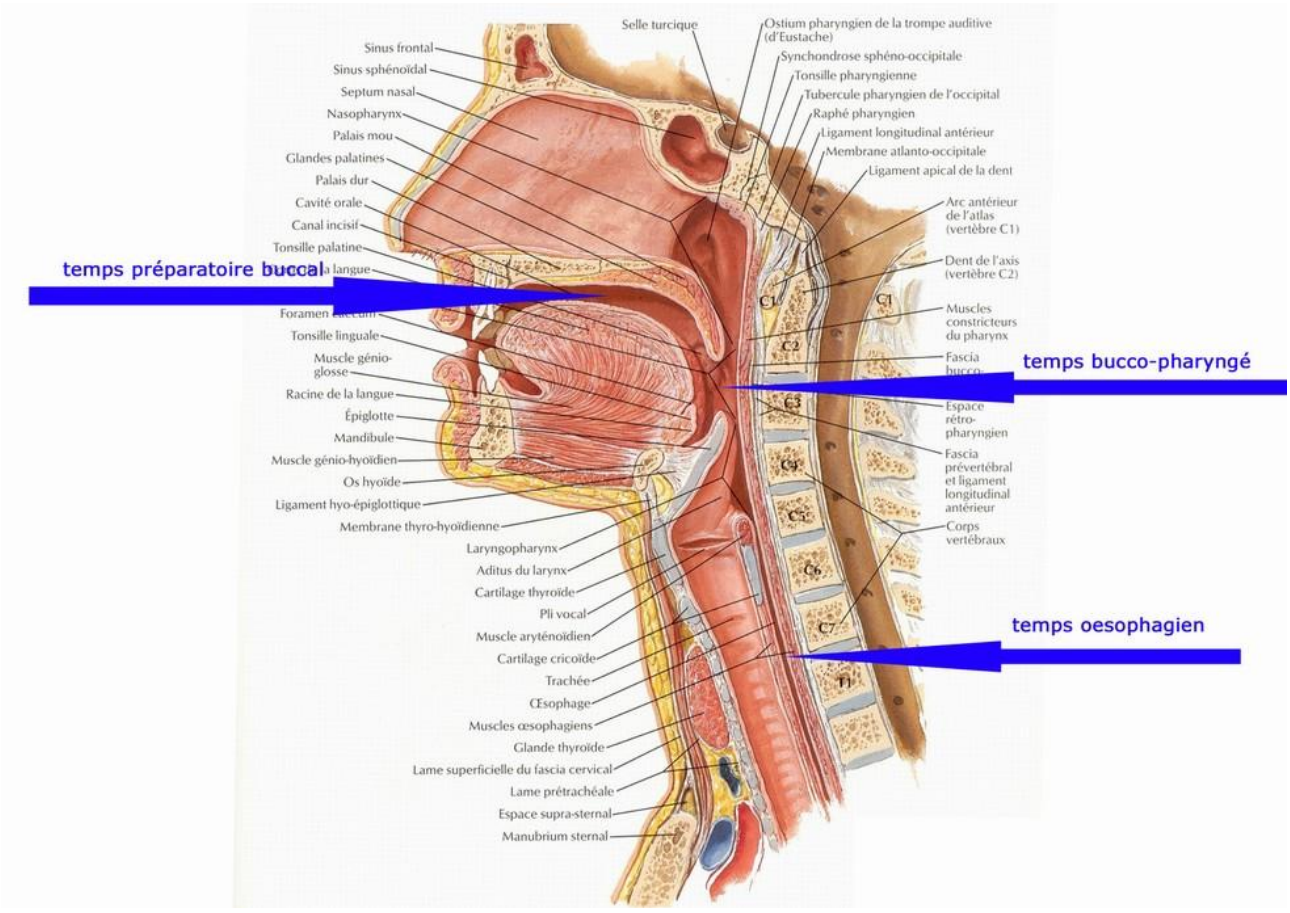


Figure 16 : Déroulement de la déglutition (Netter, Atlas d'anatomie).

I.4.1.2.1 La phase orale

Première étape de la déglutition, c'est une phase dite volontaire. Elle se déroule en deux temps :

- La préparation du bol alimentaire :

  La mastication, décrite précédemment, permet la formation du bol alimentaire. Ce temps préparatoire buccal est de durée variable selon la consistance des aliments et leur état d'hydratation.

- La phase de propulsion du bol alimentaire :

  Le bol alimentaire est chassé par un mouvement d'élévation de l'apex (pointe) et de mouvement antéro-postérieur de la langue, associé à un recul de la racine linguale. Le voile du palais est abaissé durant cette phase et assure la continence buccale avec la base linguale.

I.4.1.2.2 La phase pharyngée

Cette étape est dite « automatico-réflexe ». Elle dure environ 0.7 seconde (Buettner *et al.,* 2001). Elle débute par le réflexe de déglutition. Toutes les structures du carrefour aéro-digestif se mettent en jeu de façon parfaitement synchrone pour assurer la progression du bol alimentaire vers l'oesophage et protéger les voies aériennes.

Lorsqu'il se déclenche, ce réflexe provoque :

- L'élévation du voile du palais qui quitte sa position basse d'accolement avec la racine de la langue pour fermer la partie nasale du pharynx,
- L'arrêt de la fonction respiratoire : cette apnée commence avant l'entrée du bol dans la partie orale du pharynx et se termine après sa pénétration dans l'œsophage,
- Le recul de la racine de la langue pour protéger le larynx et propulser les aliments qui ont pénétré dans la partie orale du pharynx,
- Le péristaltisme pharyngé qui chasse la nourriture vers l'œsophage,
- L'abaissement de l'épiglotte pour assurer l'étanchéité du larynx,
- La dilatation du sphincter supérieur de l'œsophage pour livrer passage aux aliments.

I.4.1.2.3 La phase oesophagienne

Troisième étape de la déglutition, elle est dite réflexe. Elle commence par l'ouverture du sphincter supérieur de l'œsophage et se termine à la pénétration du bol alimentaire dans l'estomac.

Cette phase dure 8 à 20 secondes.

I.4.2 Les paramètres physiologiques en bouche influençant la libération des composés d'arôme

Plusieurs paramètres physiologiques sont susceptibles d'influencer la libération des composés d'arôme en bouche et la perception olfactive.

I.4.2.1 Effet de la salive sur la libération des composés d'arôme et la perception

La salive est le suc sécrété par les glandes salivaires sous-maxillaires, sublinguales et parotidiennes. Elle est composée de 99% d'eau et de 1% de composés dissous. Elle contient des constituants inorganiques : sels minéraux, ions H+, thiocyanes etc…et de nombreuses protéines.

La salive a un rôle bactéricide et digestif. Elle permet l'hydratation et la cohésion du bol alimentaire. Par lubrification du tube digestif, elle facilite la propulsion du bol alimentaire vers l'œsophage. La mastication déclenche les mécanismes sécrétoires de la salive.
La sécrétion salivaire est en grande partie contrôlée par le système nerveux autonome (Bleeckx, 2002). Le pH de la salive excrétée est de 7. Après brossage des dents, le pH de la cavité buccale est compris entre pH 5 et 6, et après alimentation il est voisin de pH 4.
Le flux et la composition salivaire varient considérablement d'un individu à l'autre (Pangborn and Lundgren, 1977) : la production de salive est de 800 mL à 1500 mL / 24h. Le débit salivaire est de 0.3 à 0.5 mL/min. Il peut atteindre 7.4 mL/min pendant la déglutition. Il est fonction de nombreux paramètres (hydratation, position du corps, exposition à la lumière, climat, odeurs, cigarette, moment de la journée…) (Van Ruth *et al.*, 2003).

L'hydratation et la dilution des aliments par la salive peuvent influencer le partage entre les composés d'arôme, l'aliment, la salive et l'air en bouche. La salive peut ainsi avoir un rôle prédominant sur la volatilité des composés d'arôme et la perception sensorielle.
La composition et la teneur en salive dans un système modèle aqueux influencent la volatilité des composés d'arôme. Les sels de la salive affectent la libération des composés d'arôme. Les composés d'arôme plutôt polaires (diméthylsulfide, 1-propanol et diacétyle) sont libérés en plus grande quantité en présence de salive (effet « salting out »), contrairement aux composés d'arôme plutôt hydrophobes qui interagissent avec les protéines salivaires (Van Ruth *et al.*, 2001). Les quantités libérées de certains aldéhydes (2-méthylpropanal, 2-3 methylbutanal et hexanal) sont diminuées de 42% en moyenne dans du paprika rouge en présence de salive dans un système *in vitro* (Van Ruth *et al.*, 2003).
L'ajout de salive synthétique dite « salive artificielle » diminue les valeurs de coefficients de partage des composés polaires (8 à 30% de diminution pour le diacétyle et la 2-butanone) dans des gels de pectine et augmente ceux des composés hydrophobes (200 à 400% d'augmentation pour la 2-octanone et la 2-décanone) dans des gels de gélatine (Boland *et al.*, 2004). Ces résultats peuvent être expliqués par l'augmentation du caractère hydrophile du système en présence de salive. Par contre, dans des gels d'amidon, l'effet de la salive sur les coefficients de partage dépend de la famille chimique des composés d'arôme. Les coefficients de partage des esters et des aldéhydes diminuent en présence de salive, alors que ceux des cétones et des alcools augmentent.
Ainsi, les études réalisées dans des simulateurs de mastication montrent que les paramètres salivaires (flux et fréquence) influencent la libération des composés d'arôme

dans un aliment. Ces effets sont dépendants de la nature des composés d'arôme et des caractéristiques physicochimiques de l'aliment.

L'effet du flux salivaire sur la perception au cours de la consommation d'un chewing-gum aromatisé à la cerise a été étudié par Guinard *et al.* par des mesures sensorielles de type « temps-intensité » (Guinard *et al.*, 1997). L'augmentation du flux salivaire (stimulé par des concentrations différentes d'acide citrique dans le produit) augmente le temps nécessaire pour atteindre l'intensité maximale de la perception « cerise », mais n'influence pas l'intensité maximale perçue.
Par ailleurs, aucun effet significatif du flux salivaire sur les perceptions sucrée, acide et fruitée n'a été mis en évidence par Bonnans et Noble (1995) dans des solutions aqueuses (Bonnans and Noble, 1995). Les mêmes conclusions ont été observées par Engelen (2003). Aucune corrélation significative entre le flux salivaire et les propriétés sensorielles n'a été observée sur des crèmes dessert. Selon ces auteurs, les différences interindividuelles entre sujets ne sont pas attribuées à la quantité de salive excrétée (Engelen *et al.*, 2003).

L'effet de la teneur et de la composition de la salive sur la perception olfactive n'a pas été clairement montré. Cependant ceci peut être expliqué par les difficultés expérimentales à mettre en évidence l'effet de ce facteur sur la libération des composés d'arôme et la perception olfactive en conditions *in vivo*.

I.4.2.2 Effet de la mastication sur la libération des composés d'arôme et la perception

La mastication stimule la sécrétion de salive, augmente la surface d'échange entre l'aliment et les muqueuses d'une part, et entre l'aliment et la phase vapeur de la cavité buccale d'autre part, et accélère la libération des composés d'arôme en bouche (Hills and Harrisson, 1995).
Les caractéristiques physiques d'un produit influencent les processus de mastication et de déglutition. Les produits secs et durs exigent des cycles de mastication plus nombreux. Pour ces produits, le temps de mastication est plus long avant la déglutition, afin d'atteindre un taux de déstructuration du produit suffisant ainsi qu'une quantité de salive suffisante pour déglutir le bol alimentaire (Engelen *et al.*, 2005).
De plus, les sujets présentent une très grande variabilité interindividuelle des temps et mouvements masticatoires lorsqu'ils mastiquent librement. Ces variations conduisent à des différences de perception de texture et d'arôme des produits alimentaires (Brown *et al.*, 1994).

Les profils de libération des composés d'arôme varient significativement selon les composés et les vitesses masticatoires. Aux fortes vitesses masticatoires, on constate une augmentation des quantités de composés d'arôme libérés liée au déchirement et au mélange de l'aliment. L'influence de la fréquence masticatoire sur la libération des composés d'arôme par PTR-MS a été étudiée en conditions *in vitro* dans un simulateur de mastication et en conditions *in vivo*. Trois niveaux de fréquences masticatoires ont été analysés avec le simulateur (0, 26 et 52 mouvements/minute) et deux niveaux de fréquences masticatoires ont été imposés aux sujets (mastication libre et à fréquence imposée : les sujets devaient mastiquer de façon synchrone avec le masticateur : 52 mouvements/minute). Une plus grande quantité de composés d'arôme (augmentation de 35% en moyenne) est libérée lorsque la fréquence de mastication augmente (van Ruth *et al.*, 2004). De plus, la mastication influence davantage la libération des composés hydrophiles d'huile de tournesol (50 et 70% de variation pour le 2-butanone, l'acétate d'éthyle et le diacétyle) que celle des composés hydrophobes (10 à 20% de variation) en conditions dynamiques (Van Ruth and Buhr, 2004).

La durée de mastication a une influence significative sur le profil de libération des composés d'arôme en bouche (Buettner and Schieberle, 2000). Ces résultats ont été confirmés par ceux de Mayr *et al.* (2003). Les quantités de 2-E-hexenal et d'hexanal mesurées dans la cavité nasale des sujets augmentent régulièrement quand le temps de mastication augmente (Mayr *et al.*, 2003). Ces résultats ont été observés lors de la consommation de bananes vertes.

Ainsi la durée, la fréquence et l'intensité de mastication sont liées aux caractéristiques physiques du produit dégusté. De manière générale, une augmentation de ces paramètres conduit à une libération plus importante des composés d'arôme et peut se traduire par une perception olfactive plus intense.

I.4.2.3 Effet de la déglutition sur la libération des composés d'arôme et la perception

Plus un aliment est liquide, plus la quantité d'aliment en bouche est importante et plus les déglutitions sont rapprochées et nombreuses (Buettner *et al.*, 2002).

Land (1996) a montré que l'action de déglutir est immédiatement suivie d'une expiration de 5 à 15 mL d'air (Land, 1996). Selon ces auteurs, les composés d'arôme atteignent la cavité nasale au moment de l'expiration qui suit la déglutition. Buettner *et al.* (2001) ont confirmé cette hypothèse par vidéofluoroscopie et imagerie par résonance magnétique (IRM) en temps

réel (Buettner *et al.*, 2001) (Figure 17). Ainsi, l'expiration qui suit immédiatement la déglutition contient une quantité de composés d'arôme abondante, car l'air expiré est resté en contact avec l'aliment en bouche (Land, 1996, Buettner *et al.*, 2002, Normand *et al.*, 2004).

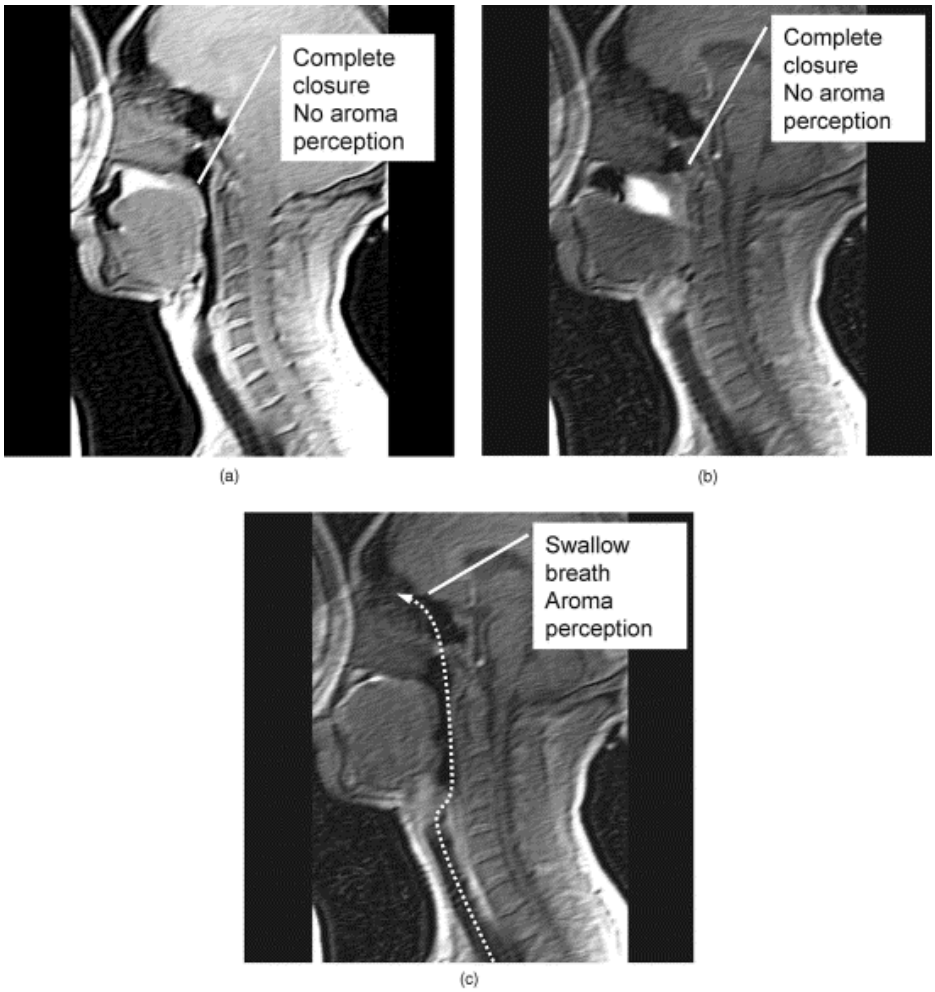


Figure 17 : Les trois étapes du processus d'ingestion d'un aliment liquide, suivi par IRM. (a) phase préparatoire à l'ingestion, (b) phase pharyngeale de l'ingestion, (c) expiration qui suit immédiatement l'ingestion. (Buettner et al., 2002).

L'expiration qui suit la déglutition conduit à une perception olfactive plus intense que les expirations ultérieures (Buettner *et al.*, 2002).

Land (1996) et Buettner *et al.* (2002) rapportent aussi que les composés d'arôme peuvent atteindre la cavité nasale lors de la mastication quand le voile du palais est abaissé avant la déglutition, mais que ce phénomène reste minoritaire.

L'expiration consécutive à la déglutition du bol alimentaire apporte les quantités maximales de composés d'arôme dans la cavité nasale. Elle est ainsi à l'origine des

intensités de perceptions olfactives maximales perçues lors de la consommation d'un produit.

I.4.2.4 Effet de la fréquence et du flux respiratoire sur la libération des composés d'arôme et la perception

La fréquence respiratoire a un impact sur les quantités de composés d'arôme libérés (Pionnier *et al.*, 2004). Les sujets à forte fréquence respiratoire libèrent de plus grandes quantités d'heptan-2-one et d'hexanoate d'éthyle lors de la consommation de fromages modèles. L'hypothèse suivante a alors été formulée : les fortes fréquences respiratoires contribuent à augmenter la libération des composés d'arôme les plus volatils dans la phase gazeuse. Ce résultat a été confirmé par Haahr *et al.* (2004). En effet, des corrélations positives entre la fréquence respiratoire et la libération des composés d'arôme ont été observées sur des chewing gums aromatisés avec les composés menthone et menthol (Haahr *et al.*, 2004).

Dans un système de bouche artificielle, l'augmentation du flux d'air au dessus d'une solution de maltodextrine aromatisée conduit à une augmentation significative des quantités de composés d'arôme libérés, surtout pour les plus volatils (Rabe *et al.*, 2004).

Par contre, dans un système de gorge artificielle, une augmentation du débit gazeux (0.2 à 1.8 L/min) conduit à une diminution des quantités de composés d'arôme libérés (Weel *et al.*, 2004). Les mêmes conclusions ont été observées en conditions *in vivo*. Pour ces mesures, un protocole strict était imposé à des sujets entraînés. Le flux respiratoire était contrôlé par la quantité d'air expiré est mesuré par APCI-MS (relié à la surface du premier pic après déglutition). Lors des mesures d'APCI-MS, l'air est prélevé dans le système modèle ou dans le nez du sujet avec un flux d'aspiration constante. Les auteurs expliquent ainsi ces résultats par le fait que les composés d'arôme sont alors dilués lorsque ce débit augmente, conduisant à des concentrations mesurées plus faibles. Seule une partie de l'air expiré par le système de gorge artificielle ou par les sujets est échantillonnée, lorsque le débit d'air augmente.

En conditions *in vivo*, les profils de quantités de composés d'arôme présents dans la cavité nasale lors des différentes expirations qui suivent la déglutition d'une boisson sont dépendants de la nature des composés d'arôme. Par exemple, le butyrate d'éthyle et le 2,5-dimethylpyrazine ne présentent pas les mêmes courbes de libération au cours des différentes expirations (Figure 18) (Hodgson *et al.*, 2005, Buettner and Schieberle, 2000, Buettner *et al.*, 2002).

Les fortes variations inter-individuelles de fréquence et de flux respiratoire sont à l'origine des différences de libération des composés d'arôme lors de la consommation. De plus, l'augmentation de ces deux paramètres conduit pour les composés d'arôme les plus volatils à une augmentation de leur libération en conditions *in vitro* comme *in vivo*.

I.4.2.5 Effet des interactions entre les composés d'arôme et les muqueuses sur la libération des composés d'arôme et la perception

Après déglutition d'aliments semi-solides et solides, un film visqueux peut se déposer sur les parois du pharynx. L'épaisseur et la persistance de ce film dépendent fortement de la texture de l'aliment (Buettner *et al.*, 2002). Les composés d'arôme continueraient ainsi à être libérés par ce film lors des différentes expirations qui succèdent à la déglutition du bol alimentaire. Ces libérations de composés d'arôme sont ainsi à l'origine de la persistance aromatique. Les mêmes phénomènes sont observés lors de la déglutition d'aliments liquides, mais de façon moins importante du fait de leur faible viscosité, conduisant à un film plus fin (Hodgson *et al.*, 2005, Normand *et al.*, 2004).

Par ailleurs, les composés d'arôme peuvent interagir avec les muqueuses de la cavité buccale et du pharynx et ainsi être à l'origine de la persistance olfactive. Les composés d'arôme seraient libérés par les muqueuses au cours du temps.

Lors de l'exposition de solutions aromatisées dans la cavité buccale, 30 à 40% de composés d'arôme sont susceptibles de se lier avec les muqueuses de la cavité buccale par adsorption après un séjour en bouche (Buettner *et al.*, 2002). Haahr *et al.* ont étudié la libération des composés d'arôme et la persistance olfactive lors de la consommation de chewing gum aromatisé à la menthe. 10 minutes après leur mastication, plus de 20% par rapport à la concentration maximale dans la salive de menthone et de menthol sont encore présents dans la salive des sujets. Une heure après, des traces de ces composés sont encore décelées, confirmant les interactions entre les composés d'arôme et la muqueuse buccale (Haahr *et al.*, 2004). Les auteurs expliquent ce résultat par une adsorption des composés d'arôme sur les tissus de la muqueuse buccale. Cet effet est encore plus marqué pour le composé le plus hydrophobe (menthone).

Buettner et Mestres rapporte une forte relation entre la persistance olfactive (temps maximal de détection des notes aromatiques d'un mélange) après déglutition et les quantités de composés d'arôme encore présents et détectables dans la cavité buccale. Pour cela, les auteurs ont mis en place un « système de criblage d'odeur buccal » (Buccal Odor Screening System :

BOSS) afin de prélever et quantifier au cours du temps les composés d'arôme présents dans la cavité buccale (Buettner and Mestres, 2005).

Par contre l'impact de ces interactions « muqueuses – composé d'arôme » est remis en question par Rabe *et al.*. Ces auteurs ont étudié l'influence de la présence ou non de cellules humaines épithéliales de la muqueuse buccale dans des solutions aqueuses aromatisées sur la libération de composés d'arôme dans un système de bouche artificielle. Mais aucun effet significatif de la présence de ces cellules sur la libération des composés d'arôme n'a été mis en évidence (Rabe *et al.*, 2004). Ce système est toutefois loin des conditions réelles et est peu représentatif du système « bouche ».

L'étude de la littérature montre qu'il n'y a pas de consensus quant à l'impact des interactions entre muqueuses et composés d'arôme, suggérant la complexité des mécanismes à l'origine de la persistance en conditions réelles de consommation. Cependant, la cavité buccale semble agir comme un réservoir de composés d'arôme qui libère au cours du temps les composés.

I.4.2.6 Effet de l'échauffement du produit lors de la mastication sur la libération des composés d'arôme et la perception

Lors de la mise en bouche, un aliment consommé froid subit un échauffement. L'augmentation de la température dans un intervalle de 10°C à 20°C peut affecter de manière significative la volatilité des composés d'arôme (Overbosch *et al.*, 1991, Roberts and Acree, 1995). En effet, la volatilité d'un composé d'arôme dépend pour partie de sa pression de vapeur saturante qui augmente de façon exponentielle avec la température (Reid *et al.*, 1987) Le temps de séjour de l'aliment en bouche détermine l'augmentation de la température et, par conséquent, la volatilité des composés d'arôme.

L'étude d'Engelen *et al.* illustre l'effet de la température sur la perception de texture de crèmes desserts et de mayonnaise (Engelen *et al.*, 2003).

En bouche, 10g de yaourt à 10°C atteignent 21°C en 5 secondes (Decourcelle *et al.*, 2005). De plus, la température du yaourt en bouche ne dépend pas de sa viscosité (Paci Kora *et al.*, 2004).

I.4.3 Conclusion

Les caractéristiques physiologiques de la mastication et de la déglutition présentent une grande variabilité inter individuelle. Les paramètres physiologiques, tels que la salive, la mastication, la déglutition, les interactions avec les muqueuses, jouent un rôle non négligeable dans la libération des composés d'arôme en bouche. Ils doivent être pris en compte pour expliquer les mécanismes de la perception olfactive au cours de la consommation. Les études réalisées jusqu'à présent en conditions *in vitro* montrent la difficulté d'expliquer l'influence de ces paramètres physiologiques sur la libération des composés d'arôme. De plus, il est difficile de considérer ces paramètres de manière indépendante en conditions *in vivo*.

Les paramètres physiologiques n'expliquent pas, à eux seuls, la libération et la perception. Il est également nécessaire de prendre en compte les facteurs physicochimiques liés au produit.

I.5 Facteurs physicochimiques impliqués dans la libération des composés d'arôme

En bouche, la libération des composés d'arôme peut être influencée par différents paramètres et notamment par les propriétés physicochimiques des composés d'arôme et de la matrice.

La nature des composés d'arôme influence le profil de libération « nosespace » en conditions de consommation (Mayr *et al.*, 2003). Ces variations résultent d'interactions spécifiques entre les muqueuses et les composés d'arôme qui ont lieu dans la bouche du sujet. Elles dépendent des propriétés des molécules d'arôme (Hodgson *et al.)* (Figure 18).

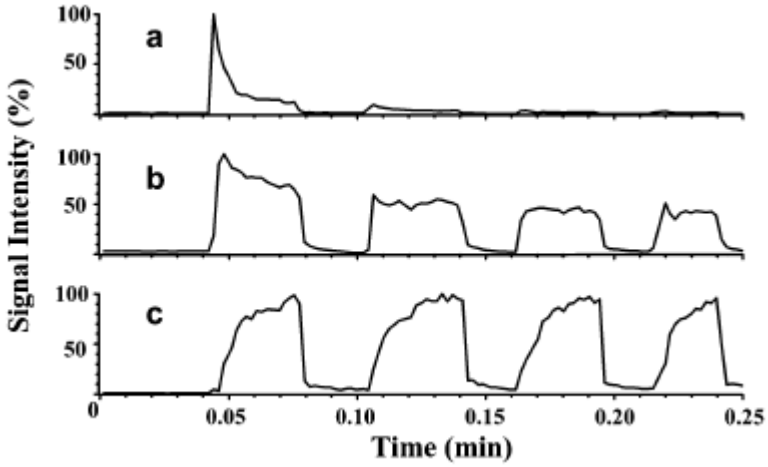


Figure 18 : Profil de libération du butyrate d'éthyle (a) et du 2.5-diméthyle Pyrazine (b) après consommation d'une solution aromatisée à 100mg/kg de chaque composé. Le profil de l'acétone (c) marqueur de la respiration, permet de mettre en évidence les expirations.

Les interactions entre les composés d'arôme et les composants non volatils (sucres, protéines,…) peuvent être responsables d'une diminution de l'intensité de perception de l'arôme. L'influence des composants de la matrice sur la libération des composés d'arôme en conditions statiques a été largement étudiée dans la littérature et abordée en partie 1, en particulier sur le rôle des protéines.

Différentes études « nosespace » ont permis de mettre en évidence l'influence de la composition sur la libération des composés d'arôme dans des gels laitiers : effet de la matière grasse (Brauss *et al.*, 1999), des protéines (Mestres *et al.*, 2005), des agents épaississants et des sucres (Mei *et al.*, 2004, Boland *et al.*, 2006).

De plus, afin d'étudier l'impact des caractéristiques physiques des matrices sur la libération des composés d'arôme et la perception olfactive, une évaluation sensorielle des matrices peut

être réalisée en parallèle des mesures « nosespace » (Hollowood *et al.*, 2002, Mestres *et al.*, 2005).

Les principales études par mesure « nosespace » abordant l'effet de la composition des matrices sur la libération des composés d'arôme sont présentées dans le Tableau 3.

Nous avons répertorié une quinzaine d'études dans la littérature. Il s'agit d'études relativement récentes.
Parmi ces études, on distingue 3 groupes de résultats :

- Certaines études montrent un effet des propriétés de structure et de texture des produits sur la perception olfactive, mais la libération des composés d'arôme mesurée en temps réel ne permet pas d'expliquer cette perception. Les auteurs concluent à l'existence d'interactions sensorielles.
- D'autres études montrent un effet des propriétés rhéologiques et de structure des matrices à la fois sur la libération des composés d'arôme mesurée en temps réel et sur les propriétés sensorielles. Il existe donc un lien d'origine physicochimique entre les quantités de composés d'arôme libérés dans la cavité nasale et la perception olfactive.
- Enfin, certaines études montrent un effet des matrices sur la libération des composés d'arôme dans la cavité nasale, mais par contre aucun effet sur la perception n'est observé, suggérant que les variations de libération sont inférieures au seuil de perception des sujets.

Les travaux expérimentaux révèlent que la libération des composés d'arôme lors de la consommation dépend notamment des caractéristiques physicochimiques de la matrice dans laquelle sont ajoutées les composés d'arôme.
Le développement des méthodes de suivi en ligne des quantités de composés d'arôme libérés dans la cavité nasale de sujets lors de la consommation ou dans des systèmes de bouche ou de gorge artificielle permet d'appréhender les mécanismes à l'origine de la libération de ces composés. Cependant, il parait nécessaire de relier ces données de libération aux propriétés sensorielles de l'aliment.

Facteurs	Conditions expérimentales	Résultats	Etudes
Matière grasse	trans-2-hexenyl acetate, anethole, terpineole 1 sujet NS, 10 sujets Senso APCI-MS et TI, **Yaourts à** 0.2, 3.5 et 10% MG	Yaourt sans MG libère les CA plus rapidement et dans des quantités supérieures que les yaourts à 3.5 et 10%MG.	Brauss et al., 1999
Agents épaississants	Arôme fraise et benzaldéhyde 13 sujets, APCI-MS et Int. **Solution HPMC (0.0625-2%)**	Quand concentration en agent de texture augmente (>concentration critique), alors l'intensité sensorielle diminue. Pas d'effet de la concentration en agent de texture sur les quantités de CA libérés dans la cavité nasale.	Hollowood et al., 2002
Protéines	Butyrate d'éthyle et diacétyle 10 sujets, APCI-MS et TI **Solution de lactosérum** (4, 7.5 et 11%)	Quand la concentration en agent de texture augmente, l'intensité sensorielle diminue. Pas d'effet de la concentration en lactosérum (agent de texture) sur les quantités de CA libérés dans la cavité nasale.	Weel et al., 2002
Agents épaississants	Acétate d'isoamyle, 15 sujets, APCI-MS et Int. **Solutions HPMC** (c* :5.7g/L)**, guar, l-carraghénane** (c* : 4.8g/L)	Quand la concentration de l'agent de texture est supérieure à c*, l'intensité aromatique perçue est diminuée. Pas d'effet de l'agent de texture sur les quantités de CA dans la cavité nasale.	Cook et al., 2003
Agents épaississants	11 CA 1 sujet et bouche artificielle, PRT-MS **4 gels de pectines** (% de pectine)	La concentration des CA dans la cavité nasale des gels fermes est inférieure à celle des gels moins fermes. Importance de la mastication sur la libération des composés d'arôme	Hansson et al., 2003
Agents épaississants	11 CA système de bouche artificielle, PTR-MS **Gels gélatine, amidon, pectine**	Le gel le plus rigide (gélatine) a les coefficients de partage des CA les plus faibles et les les quantités de CA libérés les plus faibles dans la cavité nasale. Pas de différence de libération des composés d'arôme entre amidon et pectine	Boland et al., 2004
Agents épaississants	15 CA 5 sujets, PTR-MS et Int. **Crèmes desserts variant par le type et la concentration de caroboxymethyl cellulose**	Les gels les plus fermes ont les les quantités de CA les plus élevées dans la cavité nasale et sont perçus moins sucrés, moins intenses en odeur et plus intenses en arôme. Int. odeur corrélée avec les quantités de CA mesurée par HS statique. Arôme corrélé avec les quantités de CA dans la cavité nasale.	Van Ruth et al., 2004
Agents épaississants et sucres	6 CA (fraise) 2 sujets, PTR-MS **12 formulations de yaourts**	Effet sucre + important que effet épaississant sur les quantités de CA libérés dans la cavité nasale. Sucre (ajout 10%) diminue la volatilité de 30-50% du butyrate d'éthyle, Z-3-hexenol et ethyl-3-methylbutyrate.	Mei et al., 2004
Sucre et agent de texture	Arôme 4 CA 7 sujets, APCI-MS et TI **6 Crèmes dessert avec 3 textures et 2 niveaux de sucre**	Intensité aromatique perçue est influencée par la teneur en sucre et la texture. Pas de différence du sucre sur la libération des CA dans la cavité nasale et peu d'influence de la texture sur la libération des CA.	Lethuaut et al., 2004
Protéines	1 CA (butyrate d'éthyle) 7 sujets, PTR-MS et TI **Gels de Protéines Sériques** (4 et 10%)	PTR-MS : pas d'effet de la concentration en protéines sur la libération du butyrate d'éthyle Senso : intensité des gels à 4% > intensité des gels à 10%	Mestres et al., 2005

Matière grasse et agents épaississants	10 CA, 5 sujets, APCI-MS **solution HPMC à 0, 4 et 20g/kg de matière grasse**	La matière grasse provoque une diminution des quantités de CA dans la cavité nasale. Pas d'effet de l'agent épaississant sur les quantités de CA libérés 1 minute après ingestion (persistance)	Hodgson et al., 2005
Agents épaississants	Arôme fraise, 10 sujets, PTR-MS, 4 positions de la sonde dans la cavité nasale **Crème dessert à 0.1 et 1% Carboxymethylcellulose (CMC)**	Crème dessert à 0.1% CMC libère de plus grande quantité de CA et plus tôt que crème à 1% dans la cavité nasale. La concentration en CA dans la cavité nasale dépend de la position de la canule de prélèvement.	Frasnelli et al. 2005
Agents épaississants et sucres	16 CA (mais 4 CA suivis) 12 sujets, PTR-MS + Senso **Gels pectine et gélatine**	La nature des hydrocolloïdes affecte les quantités de CA dans la cavité nasale. L'augmentation de la fermeté des gels de pectine provoque une diminution du coefficient de partage et de la perception fraise, et une augmentation de Imax et de l'attribut épais	Boland et al., 2006
Teneur présure	Arôme fromage (10 CA) 13 sujets APCI-MS et Senso **3 Fromages modèles de texture variable**	Différence de libération des composés d'arôme dans la cavité nasale (modèle fromager le plus ferme libère moins de CA que le moins ferme). Pas de différence d'intensité perçue entre les 3 modèles fromager.	Gierczinski et al., 2006

APCI-MS : Atmospheric Pressure Chemical Ionisation – Mass Spectrometry, PTR-MS : Proton Transfer Reaction – Mass Spectrometry, CA : composés d'arôme, NS : "nosespace", Int. : évaluation de l'intensité perçue, TI : méthode temps-intensité, HMPC : hydroxy-Propyl-methyl-cellulose, HS : headspace.

Tableau 3b *:* Principales études abordant l'effet de la composition des matrices sur la libération des composés d'arôme par mesure « nosespace »

En conclusion, cette revue bibliographique montre que la perception olfactive est un phénomène complexe, dépendant de nombreux facteurs : paramètres physiologiques, caractéristiques physiques de la matrice alimentaire et propriétés physicochimiques des composés d'arôme.

Nous avons répertorié les techniques de mesures permettant d'étudier la libération des composés d'arôme en temps réel lors de la consommation d'un produit, mais aussi de suivre l'évolution de l'intensité de la perception au cours du temps. Des publications récentes montrent l'intérêt de ces méthodes pour mieux comprendre la part relative liée au produit et à l'individu expliquant la perception.

Afin d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes physicochimiques à l'origine de la perception olfactive, nous avons choisi d'étudier le rôle de la structure et des propriétés rhéologiques d'un yaourt brassé aromatisé sur la libération des composés d'arôme responsables des propriétés sensorielles en conditions statiques et au cours de la consommation.

II. MATERIELS ET METHODES

Cette partie présente les protocoles utilisés pour l'ensemble de la thèse. Certains travaux et résultats préliminaires ayant conduit au choix des différents facteurs de l'étude sont également présentés. Ils permettent de mieux comprendre la démarche choisie pour répondre aux objectifs fixés.

II.1 La fabrication des yaourts brassés aromatisés

II.1.1 Les matières premières entrant dans la fabrication des yaourts

Les yaourts ont été formulés à partir de matières premières commerciales de qualité alimentaire : eau, protéines laitières, lactose, matière grasse, sucre et composés d'arôme.

II.1.1.1 Les poudres

La poudre de lait utilisée est une poudre de lait écrémé « low heat ». Les protéines sériques sont un concentré contenant 80% de protéines. Les caséinates de sodium contiennent environ 1.3% de sodium.

La poudre de lait, le concentré de protéines sériques, les caséinates de sodium et le lactose proviennent de la société Ingredia (Arras, France). Les mêmes lots de poudre ont été utilisés tout au long de ce travail.

Ces poudres ont été conditionnées sous vide en sachet de 200g et stockées à température ambiante pour toute la durée de l'étude.

Le sucre utilisé est du sucre en poudre Daddy (SucreUnion, Paris, France).

II.1.1.2 Les matières grasses

La matière grasse utilisée est de la matière grasse laitière anhydre (MGLA) provenant de chez Lactalis (Isigny, France).

Pour caractériser la MGLA, des mesures de calorimétrie différentielle à balayage ont été réalisées par le laboratoire BIA-ISD de l'INRA de Nantes qui a travaillé sur les mêmes lots de matière grasse. Une courbe de calorimétrie différentielle à balayage a été obtenue sur les trois lots de matière grasse laitière anhydre. Elle permet de déterminer le pourcentage de cristallinité et le taux de fusion de la matière grasse en fonction de la température (Figure 19). La température de fusion des lots utilisés est de 40°C.

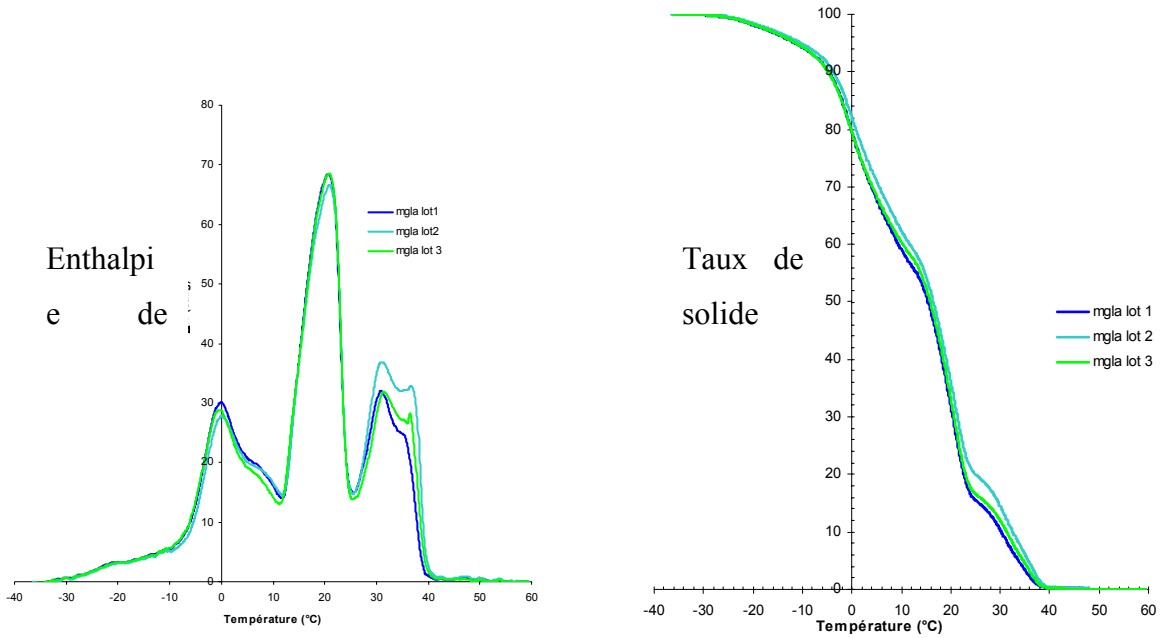


Figure 19 : Courbe de calorimétrie différentielle à balayage obtenue sur les trois lots de matière grasse laitière anhydre utilisée pendant la thèse (de -40°C à 60°C à 1°C/min).

La matière grasse laitière anhydre utilisée a été conditionnée en flacon de 1kg et stockée à 4°C tout au long du travail de thèse.

II.1.1.3 L'eau

Afin d'être le plus reproductible possible lors des fabrications de yaourts, nous souhaitions avoir une teneur en minéraux constante. Ainsi, le choix de l'eau utilisée pour la fabrication s'est portée sur de l'eau Volvic (Danone, France).

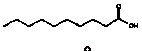
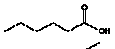
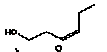
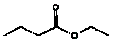
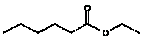
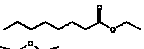
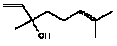
II.1.1.4 Les composés d'arômes

La formule fraise utilisée contient 17 composés d'arôme préparés en mélange dans le propylène glycol.

Le choix des 17 composés d'arôme et de la composition de la formule fraise a été réalisé au sein du réseau technologique CANAL-ARLE en concertation avec des aromaticiens, en se basant sur les critères suivants :

- L'appartenance à des classes chimiques différentes,
- Des propriétés physico-chimiques différentes,
- Des notes aromatiques bien distinctes,
- Des composés d'arôme tous détectables par chromatographie en phase gazeuse.

La composition de l'arôme fraise et certaines des caractéristiques physicochimiques des composés d'arôme sont présentées dans le Tableau 4.

Composés d'arôme	*Structure chimique*	*Numéro CAS*	*Concentration dans le yaourt (mg/kg)*	*Log P 1 a*	*Coefficient de partage à dilution infinie dans l'eau * 10^3 (sans dimension, 25°C)*
Acide butanoïque		107-92-6	2.21	0,79	0.0394 a
Acide décanoïque		334-48-5	1.11	4,09	1.7 a
Acide hexanoïque		142-62-1	1.12	1,92	0.294 a
Z-3-hexenol		928-96-1	23.68	1,61	
Diacétyle		431-03-8	4.34	-1.34	0.547 b
Acetate d'éthyle		141-78-6	17.88	0,73	5.48 a
Butanoate d'éthyle		105-54-4	27.24	1,85	16.3 a
Hexanoate d'éthyle		123-66-0	22.44	2,83	29.5 c
Octanoate d'éthyle		106-32-1	1.14	3,81	65 a
Furaneol		3658-77-3	18.47	0,82	0.000349 a
g-décalactone		706-14-9	2.52	2,72	
Hexanal		66-25-1	1.01	1,78	8.61 d
Limonène		138-86-3	2.23	4,57	
Linalol		78-70-6	1.88	2,97	0.879 a
Maltol		118-71-8	32.53	0,09	
Cinnamate de méthyle		1754-62-7	2.2	2,62	1.05 a
Vanilline		121-33-5	15.72	1,21	0.000987 a

1: Log P = Log du coefficient de partage d'un composé entre l'eau et l'octanol - valeurs calculées.
a: EPI Estimation Programs Interface v3.10,
b: Voutsas, 2001, c: Athes et al., 2004, d: Buttery et al., 1969
Tableau 4 : Composition en composés d'arôme de la formule fraise et leurs propriétés physicochimiques.

Les mêmes lots de composés d'arôme et de propylène glycol ont été utilisés tout au long de ce travail.

Les 17 composés d'arôme de la formule fraise (acide butanoïque, acide décanoïque, acide hexanoïque, acétate d'éthyle, butyrate d'éthyle, hexanoate d'éthyle, octanoate d'éthyle, cinnamate de méthyle, hexanal, Z-3-hexenol, linalool, maltol, vanilline, limonène, diacétyle, furanéol®, γ-décalactone) et le propylène glycol proviennent de la société Aldrich (Steinheim, Germany).

Une solution mère de la formule fraise contenant les 17 composés d'arôme dans le propylène glycol a été préparée par pesée à l'aide d'une balance Precisa (Mettler Toledo, Poissy,

France). Les concentrations de la solution mère sont précisées dans le Tableau 5. Cette solution mère était conservée à 4°C pendant une durée de 2 à 3 mois. Des contrôles réguliers de sa stabilité ont été réalisés par chromatographie en phase gazeuse.

Composés	Concentration ppm (mg/kg)
Limonène	2325.0
Butyrate d'éthyle	27792.9
Hexanoate d'éthyle	22896.9
Acétate d'éthyle	18253.5
Octanoate d'éthyle	1198.4
Cinnamate de méthyle	2285.0
Hexanal	1032.3
Z-3-hexenol	24161.4
Linalool	1947.6
Diacétyle	4444.3
Acide butanoïque	2302.5
Acide décanoïque	1154.3
Acide hexanoïque	1096.0
Maltol	33185.5
Vanillin	16166.4
Furaneol®	18806.3
g-Decalactone	2555.1

Tableau 5 : Concentration en composés d'arôme dans le propylène glycol de la solution mère utilisée pour l'aromatisation des yaourts.

II.1.2 La composition des yaourts

Six yaourts brassés aromatisés ont été étudiés. Les facteurs choisis pour obtenir les différentes matrices étaient :

- La composition en protéines (3 niveaux), afin d'obtenir des gels de structures et de propriétés rhéologiques différentes,
- Le traitement mécanique (2 niveaux), afin d'obtenir des gels de propriétés rhéologiques différentes mais de composition identique.

Les six produits possédaient des teneurs identiques en matière sèche (22.5%), matière grasse (4%) et protéines totales (5.4%).

Seule une fraction de protéines enrichissant le lait variait entre les trois yaourts :

- Enrichissement en caséinate de sodium (yaourt CAS),
- Enrichissement en poudre de lait (yaourt MPO),
- Enrichissement en protéines sériques (yaourt WP).

Le yaourt MPO est considéré dans cette étude comme le produit de référence.

La composition des trois yaourts est présentée dans le Tableau 6.

Ingrédients	*yaourt CAS*	*yaourt MPO*	*yaourt WP*
Eau	1 L	1 L	1 L
Poudre de lait	100 g	135 g	100 g
Lactose	21 g	-	21 g
Caseinate de sodium	14 g	-	-
Protéines sériques	-	-	14 g
Matière grasse laitière anhydre	40 g	40 g	40 g
Sucre (saccharose)	50 g	50 g	50 g
Teneur en protéines totales (% m/m)	5.4%	5.4%	5.4%
Matière sèche (% m/m)	22.50%	22.50%	22.50%

Tableau 6 : Composition des yaourts et quantité (en g) des matières premières utilisées. Les quantités des ingrédients sont données pour 1L d'eau.

II.1.3 La fabrication des yaourts

II.1.3.1 La reconstitution des laits

La première étape de la fabrication des yaourts est l'homogénéisation de la matière grasse laitière anhydre. Elle est pratiquée avec un homogénéisateur à deux étages (APV, France) à des pressions de 660 et 60 bars, à 60°C.

La matière grasse est initialement chauffée dans un bain marie à 60°C. L'eau et les protéines (fractions d'enrichissement WP, CAS et MPO) sont mélangées puis homogénéisées avec la matière grasse. Deux passages dans l'homogénéisateur sont effectués, afin d'obtenir une population homogène de gouttelettes lipidiques (de l'ordre de 700 nm).

Après refroidissement des émulsions à 4°C, le complément en poudre est ajouté (lactose, poudre de lait et saccharose).

Les laits sont ensuite stockés une nuit à 4°C pour des contraintes d'emploi du temps.

II.1.3.2 Le traitement thermique des mixes avant fermentation

Les différents laits subissent un traitement thermique de 92°C pendant 5 minutes, dans un échangeur thermique constitué de deux serpentins en série (Figure 20). Le premier serpentin est plongé dans un bain d'huile à 102°C pour le préchauffage et le deuxième dans un bain d'eau à 92°C pour le maintien du lait à la température de 92°C pendant 5 minutes.

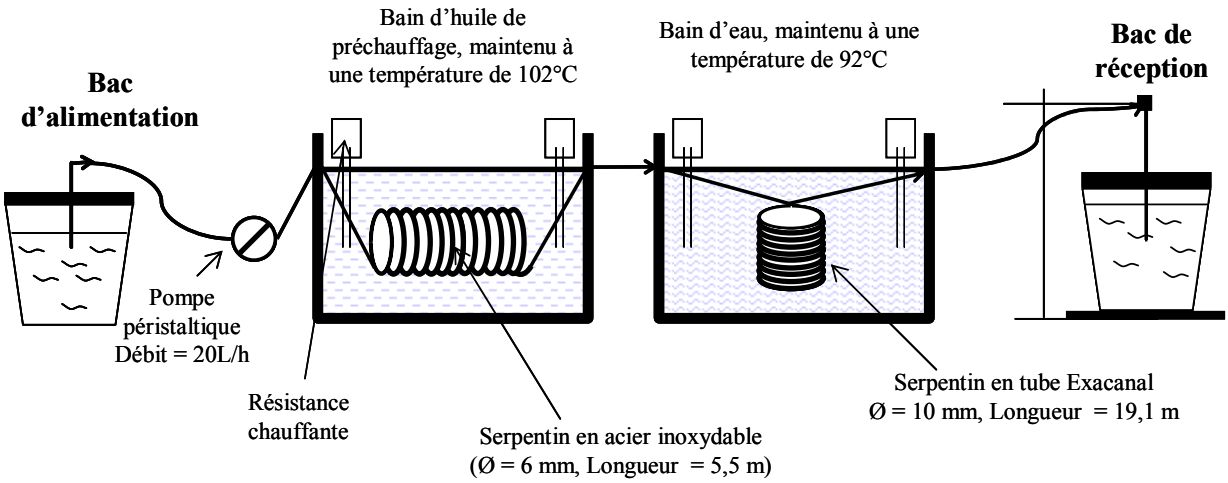


Figure 20 : Représentation schématique de l'installation de traitement thermique du mélange laitier.

II.1.3.3 La fermentation des yaourts

Les fermentations sont réalisées dans des fermenteurs de 7 litres (SGi, France) (Figure 21). Après refroidissement à la température de fermentation du lait (44°C), le lait est ensemencé avec les souches de *Lactobacillus delbrueckii* sous-espèce *bulgaricus* (LB 18 incorporé à 0.005%, Chr Hansen, France) et de *Streptococcus thermophilus* (ST7 et ST143 incorporés à 0.01%, Chr Hansen, France).

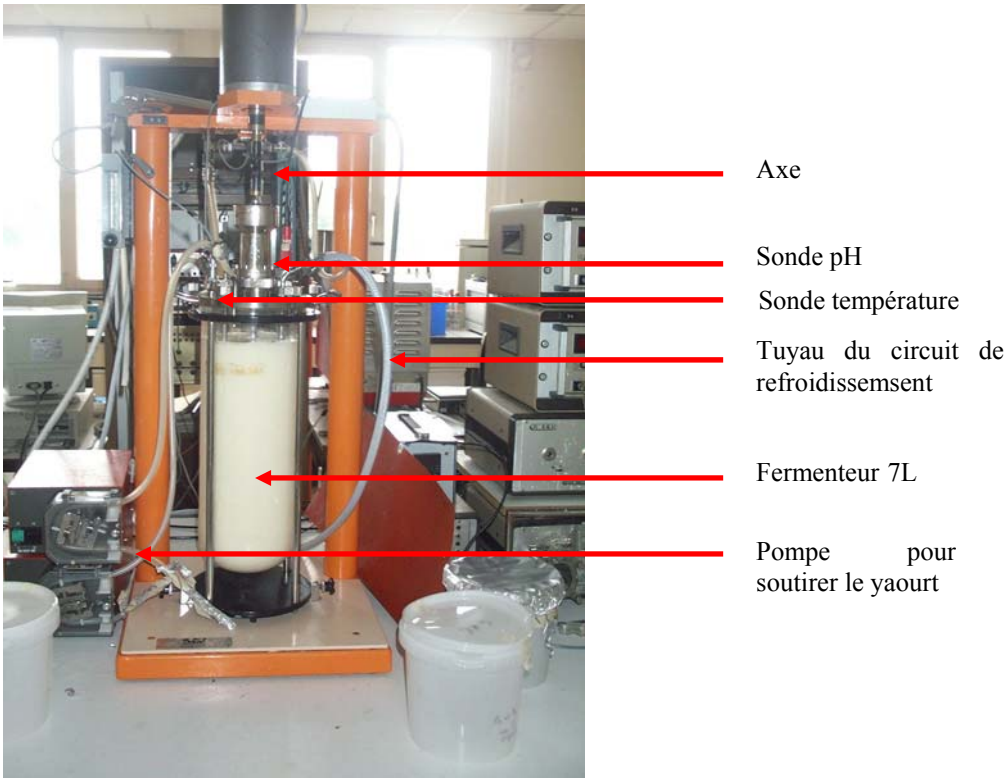


Figure 21 : Fermenteur de 7L utilisé pour la fabrication des yaourts. Positions des sondes de pH et de température utilisées pour le suivi des fermentations.

Le pH et la température sont suivis au cours de la fermentation (Figure 22). Lorsque le pH atteint un pH cible de 4.6, le yaourt est extrait par pompage et refroidi dans une chambre froide à 4°C en pots de 1.5 kg. Ce premier soutirage réalisé à l'aide d'une pompe péristaltique (débit 20L/h) correspond au faible niveau de traitement mécanique appliqué aux yaourts. Il est décrit avec précision dans le paragraphe 1.1.3.4.

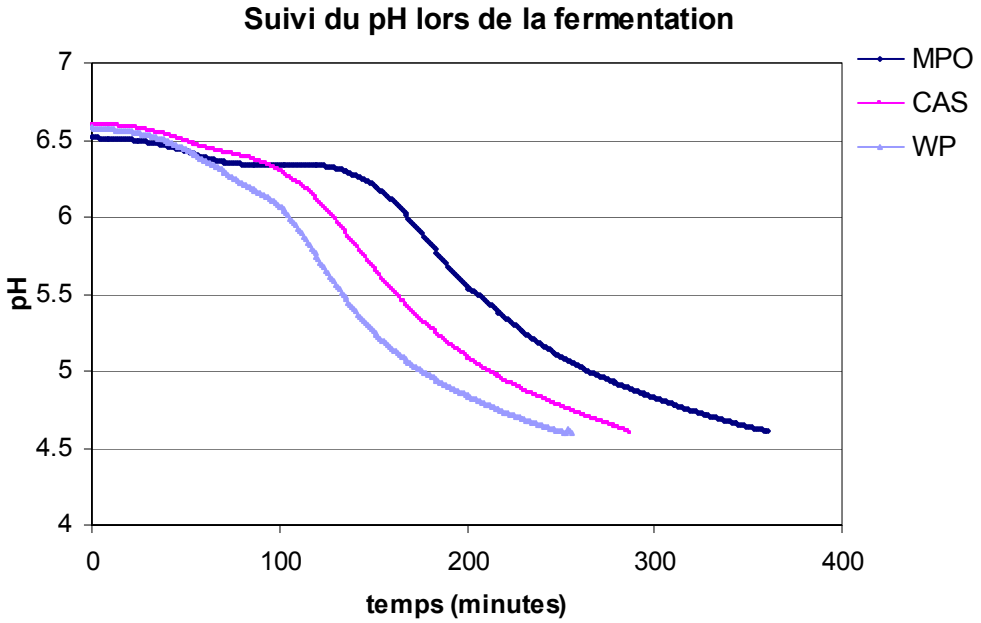


Figure 22 : Suivi du pH au cours de la fermentation (en minutes) pour les trois produits de compositions différentes en protéines (yaourt MPO, yaourt CAS et yaourt WP).

II.1.3.4 Le traitement mécanique

Afin de générer des propriétés rhéologiques différentes pour des yaourts de même composition en protéines, deux traitements mécaniques d'intensité différente sont appliqués.

Après l'arrêt de la fermentation, le soutirage, à l'aide d'une pompe péristaltique (Mettler Toledo, France) et d'un tuyau de diamètre 6 mm (Exacanal, VWR International, France) de longueur 1 m, permet d'obtenir des yaourts correspondant au *niveau faible de traitement mécanique « MT- »*.

Le deuxième niveau de traitement mécanique est obtenu en pompant le yaourt 24h après la fermentation à 4°C dans les mêmes conditions que décrit précédemment, mais en plaçant un embout conique (diamètre de 0.8 mm et angle de 6°) en sortie du tuyau de pompage. Cette procédure permet d'obtenir le *niveau fort du traitement mécanique « MT+ »*.

II.1.3.5 L'aromatisation des yaourts

Après 24h de stockage à 4°C, les yaourts sont aromatisés avec l'arôme fraise à 0.1% (w/w). Les concentrations des composés d'arôme dans le yaourt sont comprises entre 1.01 et 32.53 mg/kg (Tableau 4).

L'étape d'aromatisation est réalisée avec un robot ménager (Kenwood, Etats-Unis) avec une pale de type K, en conditions contrôlées (2 kg de yaourt par batch pendant 30 secondes, puissance 2.5).

II.1.3.6 Le stockage et le conditionnement

Les yaourts, après aromatisation, sont stockés au minimum 7 jours dans des bocaux en verre dans une chambre froide à 4°C jusqu'à leur analyse. Ce temps est nécessaire à la stabilisation de l'arôme dans le produit (thèse Paci Kora, 2004).

Spécifiquement pour l'étude « emballage », les produits sont conditionnés immédiatement après l'aromatisation à partir d'un même batch, dans trois types d'emballage commerciaux, largement utilisés pour le conditionnement des yaourts,et fournis par la Société Danone (Palaiseau, France) :

- Le verre (G) utilisé comme référence,
- Le polystyrène (PS),
- Le polypropylène (PP).

Chaque pot de yaourt est recouvert d'un opercule adapté :

- Aluminium et polyéthylène pour les pots en verre et les pots en polypropylène,
- Polyéthylène et polypropylène pour les pots en polystyrène.

Le thermo-scellage des opercules est réalisé au fer à repasser. Chaque pot contient 125 g de yaourt. Le conditionnement est réalisé sous hotte à flux laminaire afin de minimiser les risques de contamination. Les yaourts emballés sont ensuite stockés à 4°C.

II.2 Caractérisation des matrices par mesures instrumentales

Deux types de mesures instrumentales ont été utilisés pour caractériser les yaourts :

- Des mesures caractérisant la structure des gels et le comportement rhéologique des yaourts,
- Des mesures permettant de quantifier la rétention des composés d'arôme dans les différents gels.

II.2.1 La caractérisation des propriétés physiques

II.2.1.1 Mesure de la taille des gouttelettes lipidiques

II.2.1.1.1 Objectif de ces mesures

Les mesures de la taille des gouttelettes lipidiques, réalisées lors de l'étape de mise au point des matrices, avaient pour objectifs :

- de connaître la taille des gouttelettes lipidiques au sein du produit,
- d'évaluer leur stabilité au cours du temps,
- de se placer dans des conditions proches d'un produit réel,
- de vérifier la répétabilité des fabrications.

Une analyse de la littérature, ainsi qu'une discussion avec les professionnels partenaires du réseau CANAL ARLE ont fait ressortir que l'étape d'homogénéisation était une des étapes de la fabrication des yaourts avec matière grasse. Par ailleurs, dans certaines études, la taille des gouttelettes lipidiques semble avoir une influence sur la libération des composés d'arôme et sur la perception (Van Ruth *et al.*, 2002, Miettinen *et al.*, 2002). Il nous est donc apparu important, dans une étape préliminaire, d'évaluer l'impact de ce facteur (partie présentée en partie 1.5.1).

La caractérisation de la structure des émulsions a été réalisée par deux méthodes :

- La granulométrie laser,
- La microscopie optique en présence d'un colorant fluorescent.

II.2.1.1.2 Granulométrie laser

La granulométrie laser mesure le mouvement brownien et le relie à la taille des particules. Le mouvement brownien est mesuré en éclairant l'échantillon avec un laser et en analysant l'intensité des fluctuations de la lumière diffusée. Les caractéristiques optiques de la

suspension, analysées par le granulomètre (Mastersizer 3.1, Malvern Instrument, Royaume Uni), permettent de calculer un coefficient de diffusion translationnelle des particules, qui est lui-même relié au diamètre moyen.

Cette technique est basée sur l'analyse de la diffusion de la lumière d'un faisceau laser provoquée par les particules en suspension dans un milieu diluant. Le milieu diluant est dénaturant pour les protéines de manière à désagréger les micelles de caséine.

Le solvant utilisé pour désagréger les micelles de caséines est un mélange d'EDTA (Ethylène DinitroAcétate de Tétrasodium), de SDS (Dodécylsulfate de Sodium) et d'urée.

- L'EDTA est un agent complexant. Il forme un complexe avec les ions calcium, ce qui conduit à la précipitation des protéines (dénaturation des protéines),
- Le SDS est un agent tensio-actif puissant. Il stabilise l'émulsion pendant le temps nécessaire à la mesure. Il charge négativement les couches interfaciales et s'oppose à la floculation des gouttelettes,
- L'urée diminue le nombre de liaisons hydrogènes. Elle permet de dissocier les micelles de caséines et certaines protéines de la membrane des gouttelettes lipidiques.

L'indice de réfraction (IR) du solvant utilisé (urée + SDS + EDTA) est 1.3419, sa viscosité étant de 0.013 Poise.

Les tailles des gouttelettes lipidiques de nos laits, obtenues avant fermentation par granulométrie laser, sont présentées dans le Tableau 7.

Échantillon	***diamètre moyen (d_{32}) (nm)***	***Ecart-type***
yaourt MPO	519.2	32.2
yaourt CAS	520.9	3.9
yaourt WP	538.7	25.7

Tableau 7 : Diamètres moyens (et écart-type) des gouttelettes lipidiques obtenues par granulométrie laser sur les yaourts enrichis en caséinates (CAS), en poudre de lait (MPO) et en protéines sériques (WP) dilués dans une solution de EDTA + SDS + Urée.

Ces mesures de granulométrie ont été réalisées au laboratoire de Chimie Biologie (INRA Grignon). L'équipement de granulométrie laser n'étant pas disponible au laboratoire LGMPA, nous avons souhaité disposer d'une méthode dont nous pouvions disposer en interne, pour caractériser les produits et suivre les fabrications.

II.2.1.1.3 Microscopie optique

La taille des gouttelettes lipidiques a été mesurée par microscopie optique et analyse d'image. Le principe est l'observation par microscopie optique des différents échantillons de laits (avant fermentation) mis en contact avec un colorant fluorescent : le rouge de Nil. Le microscope est de type Elipse E600 (Nikon, Japon). Des prises d'images sont réalisées et traitées à l'aide du logiciel Optimas (Optimas 6.2, Imasys, France) afin de caractériser la population de gouttelettes lipidiques : détermination du diamètre moyen (d_{32}) et de la distribution des tailles.

La Figure 23 illustre un exemple de cliché de microscopie obtenu avant fermentation sur les laits de l'étude. Les tailles des gouttelettes lipidiques obtenues après traitement des images sont présentées dans le Tableau 8.

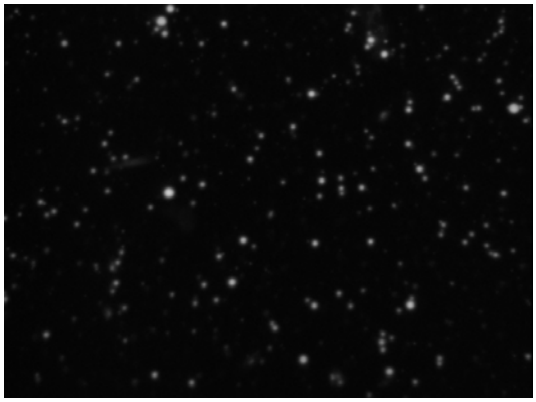


Figure 23 : Cliché obtenu par microscopie optique sur le yaourt enrichi en caséinates (CAS) dilué dans une solution de EDTA + SDS + Urée et coloré avec du rouge de nil.

Échantillon	***diamètre moyen (d_{32}) (nm)***	***Ecart-type***
yaourt MPO	702	234
yaourt CAS	592	203
yaourt WP	561	190

Tableau 8 : Diamètres moyens (et écart-type) des gouttelettes lipidiques obtenues par microscopie optique sur les yaourts enrichis en caséinates (CAS), en poudre de lait (MPO) et en protéines sériques (WP) dilués dans une solution de EDTA + SDS + Urée et colorés avec du rouge de nil.

Les résultats de taille de gouttelettes lipidiques obtenus avec les deux méthodes sont cohérents. Cependant, les écart-types des mesures obtenues par microscopie optique sont plus grands que ceux obtenus par granulométrie laser. La microscopie optique présente l'avantage d'être une méthode visuelle.

II.2.1.2 Mesure du pH

Le pH des yaourts est mesuré à 4°C avec des sondes de pH Mettler (Mettler Toledo, France), étalonnées à 4°C. Lors des mesures, les échantillons sont maintenus à 4°C à l'aide d'un bain thermostaté.

Les mesures de pH des produits dégustés ont été effectuées le même jour que les séances d'analyse sensorielle. Trois répétitions de chaque mesure ont été réalisées.

II.2.1.3 Mesure des propriétés mécaniques

II.2.1.3.1 Matériel et conditions opératoires

Les mesures rhéologiques sont effectuées à l'aide d'un rhéomètre à contrainte imposée Rheostress RS1 (Haake, Allemagne), équipé d'un module cône-plan (figure 24). Le diamètre du cône est de 60 mm et l'angle de 2°. Il est piloté par le logiciel RheoWin Pro version 2.84 (Haake, Allemagne).

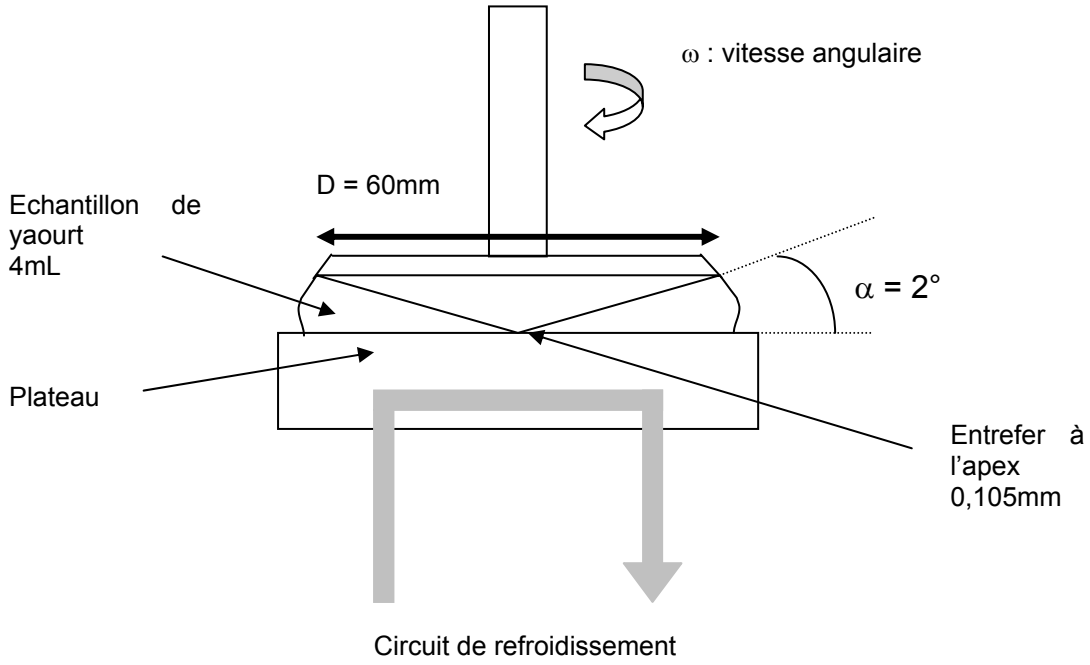


Figure 24 : Représentation schématique du module cône-plan utilisé avec le rhéomètre Rheostress (RS1, Haake).

Les mesures sont réalisées à 10°C entre le 9ème et le 12ème jour de stockage qui correspond à la période de stabilité des propriétés rhéologiques et de la composition de l'arôme du yaourt.

Les yaourts sont stockés à la température de mesure avant l'analyse. Afin d'homogénéiser le contenu et d'éliminer la présence éventuelle de sérum à la surface, chaque pot de yaourt est

délicatement mélangé trois fois de bas en haut à l'aide d'une petite cuillère, tout en tournant le pot de gauche à droite. Ensuite, environ 4 g de yaourt sont disposés au centre du plan du rhéomètre à l'aide d'une seringue. Trois répétitions de l'analyse sont réalisées sur le même pot de yaourt.

Le yaourt est un gel visco-élastique rhéofluidifiant. Trois types de mesures ont été effectués pour le caractériser : des mesures en régime harmonique par l'intermédiaire de balayages en fréquence et de balayages en contrainte et des mesures en régime continu (mesure des propriétés d'écoulement).

II.2.1.3.2 Mesures en régime harmonique

II.2.1.3.2.1 Principe des mesures en régime harmonique

Il est possible d'étudier le produit dans le domaine des faibles déformations en régime sinusoïdal. Trois paramètres sont alors retenus : le module élastique G', le module visqueux G'', et la viscosité complexe η^*. La connaissance des paramètres η^*, G' et G'' apporte des renseignements sur les propriétés mécaniques et sur le niveau d'organisation de la matrice alimentaire. Deux types de mesures sont effectués sur ce principe : le balayage en fréquence qui permet d'obtenir le spectre mécanique de chaque yaourt, et le balayage en contrainte.

Calcul de la déformation avec une géométrie cône-plan :

- Contrainte imposée sinusoïdale : $\tau = \tau_0 \cos(\omega t)$
- Déformation enregistrée : $\gamma = \gamma_0 \sin(\omega t)$

Paramètres calculés :

- composante élastique G' (Pa) : $G' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cos\delta$
- composante visqueuse G'' (Pa) : $G'' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \sin\delta$
- module de cisaillement complexe (Pa.s) : $G^* = \sqrt{\left(G'^2 + G''^2\right)} = \frac{\tau_0}{\gamma_0}$
- viscosité complexe η^* : $\eta^* = \frac{G^*}{\omega} = \frac{1}{\omega}\sqrt{G'^2 + G''^2}$
- angle de déphasage δ (rad) : $\tan\delta = \frac{G''''}{G'}$

Avec :

τ : contrainte (Pa),

γ : déformation (sans unité),

τ_0 : amplitude de la contrainte (Pa),

γ_0 : amplitude de la déformation (sans unité),

ω : vitesse angulaire (rad/s), $\omega = 2\pi f$, avec f = fréquence (Hz).

II.2.1.3.2.2 Obtention des spectres mécaniques

Les yaourts sont caractérisés par un balayage en fréquence. Il s'agit d'une mesure non déstructurante réalisée en régime harmonique. Le produit est soumis à une contrainte constante imposée (2 Pa) à une fréquence croissante (ω = 0.1 à 100 rad/s) afin d'obtenir le degré d'organisation des yaourts. La contrainte utilisée est choisie pour chaque yaourt étudié dans le domaine de linéarité contrainte/déformation.

II.2.1.3.2.3 Réalisation des balayages en contraintes

Chaque échantillon de yaourt brassé est soumis à une rampe de contraintes comprises entre 0.1 et 100 Pa avec une fréquence de 1 Hz. La Figure 25 montre l'allure générale de l'évolution de la viscosité complexe (η^*) en fonction de la contrainte. Les courbes ainsi enregistrées permettent de distinguer trois parties :

- Un plateau initial (a),
- Une zone presque linéaire de pente négative (b),
- Un plateau final (ou de pente très faible) (c).

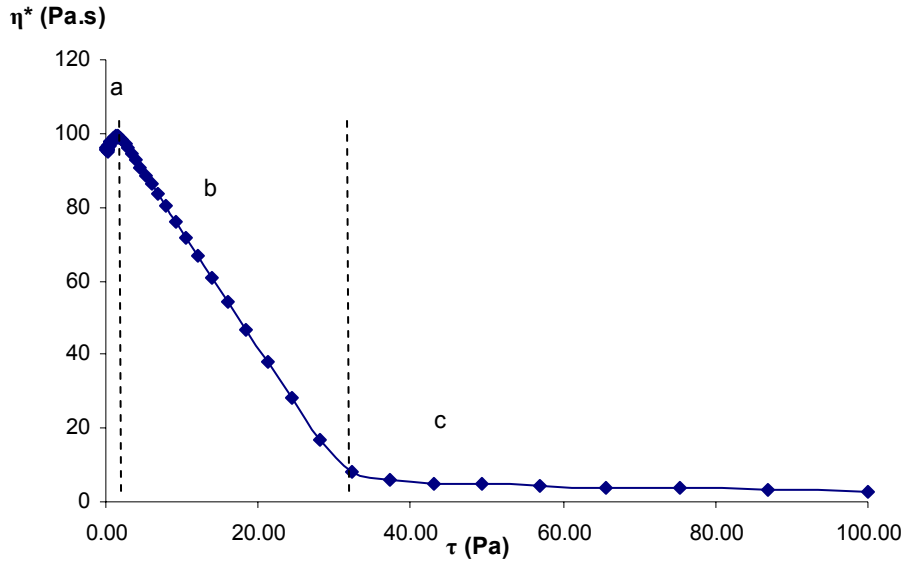


Figure 25 : Viscosité complexe (Pa.s) en fonction de la contrainte (Pa) pour le yaourt enrichi en caséinate qui a subi un faible traitement mécanique. Trois zones peuvent être distinguées : un plateau initial (a), une zone linéaire de pente négative (b), et un plateau final (c).

A partir de ces courbes, 2 variables sont retenues. Tout d'abord, la viscosité complexe initiale η_0^*, est déterminée par la moyenne des points du plateau aux contraintes comprises entre 0.1 Pa et 1 Pa. Puis, la viscosité complexe obtenue pour une contrainte de 50 Pa (η_{50}^*) a été retenue. La corrélation entre viscosité et épaisseur perçue a été étudiée dans la littérature. L'intensité perçue d'épaisseur évaluée à l'aide d'une cuillère est corrélée avec la viscosité complexe obtenue à faible contrainte. Par contre, l'épaisseur perçue en bouche est corrélée avec la viscosité complexe mesurée à de plus fortes contraintes (Skriver *et al.*, 1999, Shama and Sherman, 1973). C'est pourquoi, nous avons choisi d'extraire les données de viscosités complexes à 0.1 Pa (correspondant aux intensités perçues de texture évaluée à la cuillère) et à 50 Pa (correspondant aux intensités perçues de texture en bouche).

II.2.1.3.2.4 Mesures en régime continu : mesure des propriétés d'écoulement

Des boucles de thixotropie sont réalisées sur les produits. Les yaourts sont soumis à une vitesse de cisaillement croissante (de 0 à 100 rad/s), puis décroissante (de 100 à 0 rad/s). Deux cycles successifs de montée et descente de la vitesse de cisaillement sont réalisés.

Cette mesure permet d'observer la perte de structure du yaourt et sa capacité ou non à se restructurer.

II.2.1.4 Analyse de la microstructure

Les trois yaourts ayant subi traitement mécanique faible et dont la composition en protéines varie ont été analysés par microscopie électronique à balayage (MEB). Ces analyses ont été réalisées par le laboratoire de Génie des Procédés et Technologie Alimentaire (INRA de Villeneuve d'Asq).

Après une semaine de stockage à 4°C, des échantillons de yaourts brassés sont prélevés par carottage à l'aide d'une micropipette de Wirettrol de 200 µL et préparés selon la méthode de Kalab (Kalab, 1981). Les échantillons sont alors fixés dans une solution aqueuse de glutaraldéhyde (1.25% v/v) pendant au minimum 48 heures puis rincés avec de l'eau ultra-pure (5 fois pendant 15 minutes).

Les préparations sont ensuite déshydratées et délipidées avec une série graduée d'acétone (500, 750 et 950 $mL.L^{-1}$). Les échantillons déshydratés sont alors séchés en présence de CO2 par la méthode du point critique. Cette méthode se base sur la conversion du CO2 liquide (150 bars à 8°C) en CO2 gazeux (70 bars à 37°C) dans un conteneur fermé en contournant le point critique (31.3°C).

Les échantillons séchés sont ensuite collés sur des supports (fin film d'Araldite) puis fracturés afin de dégager la structure interne des gels. Les préparations sont ensuite rendues conductrices par dépôt d'un film or palladium obtenu par pulvérisation cathodique à l'aide d'un Polaron E 5100 (West Sussex, Great Britain). Les échantillons sont observés avec un microscope électronique à balayage (Hitachi S-3000N, Tokyo, Japan) avec une tension de travail comprise entre 3 et 5 kV. Six grandissements (x 100 et 200 pour les faibles grandissements et x 400, 1000, 2000 et 4000 pour les forts grandissements) sont réalisés pour chaque échantillon.

II.2.2 Détermination de la libération des composés d'arôme par analyse de l'espace de tête

Deux types de mesures ont été réalisés pour déterminer la rétention des composés d'arôme dans les yaourts :

- Mesure de la volatilité et obtention du coefficient de partage gaz / yaourt de chaque composé d'arôme à l'équilibre dans les matrices par la méthode Phase Ratio Variation (PRV).
- Mesure des quantités de composés d'arôme libérées dans l'espace de tête par la méthode Solid Phase Microextraction (SPME). Cette méthode est plus sensible que

la précédente et permet de détecter et quantifier l'ensemble des composés d'arôme de la formule fraise.

II.2.2.1 Détermination des coefficients de partage : méthode PRV

La méthode PRV permet de mesurer les coefficients de partage des composés d'arôme entre l'air et le yaourt. Elle présente l'avantage de pouvoir être utilisée pour une matrice complexe et pour un mélange de molécules d'arôme.

Cette méthode a été décrite par Ettre *et al.* (Ettre *et al.*, 1993).

Le coefficient de partage gaz/matrice est défini par :

$$K_{gm} = \frac{C_g}{C_m}$$

Avec C_g : concentration du composé d'arôme dans la phase gazeuse (mg/m^3), et C_m : concentration du composé d'arôme dans le yaourt (mg/m^3).

La méthode PRV est basée sur l'établissement de bilan de matière à l'équilibre dans des flacons contenant des rapports différents entre les volumes de la phase gaz et de la phase matrice. Ainsi, il est possible d'établir une relation entre le coefficient de partage K_{gm} et le rapport β des volumes des phases gaz et matrice, pour des concentrations à l'équilibre entre les 2 phases. L'équation établie est la suivante :

$$A = \frac{F \cdot C_m^0}{K_{gm}^{-1} + \beta}$$

où F est le facteur de réponse du détecteur permettant de relier le signal mesuré à une quantité, C_m^0 la concentration initiale dans la matrice, A la réponse du détecteur correspondant à la surface des pics mesurés par chromatographie en phase gazeuse et $\beta = \frac{V_g}{V_m}$.

Les échantillons de yaourt sont placés dans des flacons de 22,4 mL (Chromacol, France). Pour chaque matrice, des flacons contenant 50, 200, 500, et 2000 mg de yaourt sont préparés et pesés sur une balance de précision (Precisa, Mettler Toledo, France). Chaque mesure est répétés avec trois flacons du même type. Les flacons sont placés 12h à la température de l'analyse, afin de s'assurer que l'équilibre est atteint. L'espace de tête contenu au-dessus de l'échantillon est alors analysé par chromatographie en phase gazeuse. La détermination des coefficients de partage est réalisée à la température de 4°C.

Les échantillons sont placés sur un portoir thermostaté d'un injecteur automatique CombiPal (CTC Analytics, Suisse), qui permet à l'aide d'une seringue à "gaz" de 2.5 mL (Hamilton,

Suisse) de prélever et d'injecter automatiquement un volume défini de l'espace de tête en équilibre avec le yaourt. Afin d'éviter toute condensation dans le corps de la seringue, celle-ci est maintenue à 37°C. 2 mL de la phase gaz sont prélevés et injectés dans la colonne chromatographique.

Les valeurs des coefficients de partage sont déterminées par régression non-linéaire, suivant la méthode décrite par Atlan *et al.* (Atlan *et al.*, 2006).

II.2.2.2 Libération des composés d'arôme par la méthode SPME en conditions statiques

La méthode PRV présente l'inconvénient de ne pas pouvoir mesurer les coefficients de partage des molécules les moins volatiles (vanilline, maltol, etc.). La méthode SPME présente alors une alternative. Elle permet de mesurer les quantités libérées des différents composés d'arôme de la formule fraise dans la phase vapeur au dessus des yaourts en conditions statiques.

L'analyse SPME est une analyse « headspace » avec pré-concentration par adsorption sur un polymère (fibre) pour améliorer la sensibilité de la mesure. Nous avons fait le choix d'utiliser une fibre en polydimethylsiloxane (PDMS) d'une épaisseur de 100 µm (Supelco, Bellefonte, France) en raison de sa grande répétabilité lors des mesures et entre des fibres provenant de lots différents.

Les flacons « headspace », remplis avec 5 g de yaourt et mis à équilibrer pendant une nuit à 4°C, sont placés sur un portoir à 4°C. Le temps de contact entre la fibre SPME et l'espace de tête a été étudié et a varié entre 1 minute et 4 heures. Les résultats de l'étude de l'influence du temps de contact fibre/espace de tête sur les quantités de composés d'arôme détectées sont présentés dans la publication n°2 (p.124). Suite à cette étude, un temps de contact de 2 heures a été choisi. Pendant ce temps de contact, les flacons sont agités. Un fois le temps défini atteint, la fibre est placée dans l'injecteur du chromatographe à 220 °C pendant 1 minute afin de désorber et d'analyser les composés d'arôme.

Les conditions opératoires chromatographiques sont similaires à celles utilisées pour la méthode PRV. Les résultats obtenus sont exprimés en unité d'aire. Trois répétitions d'analyse de l'espace de tête sont réalisées par produit et par fabrication.

II.2.2.3 Conditions opératoires chromatographiques pour l'analyse des composés d'arôme

La détermination des coefficients de partage par PRV et la mesure des quantités de composés d'arôme libérés par SPME sont réalisées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (CPG-FID), (HP 6890, Allemagne).

Les conditions opératoires utilisées lors des mesures PRV et SPME sont les suivantes :

- Colonne chromatographique semi-capillaire (longueur 30 m, diamètre interne 0,53 mm et épaisseur du film 1µm, (BP 20, Interchim, France),
- Débit d'hélium (gaz vecteur) de 8.6 mL/min,
- Débit d'hydrogène de 40 mL/min,
- Débit d'air de 450 mL/min,
- Débit d'hélium pour le nettoyage de la seringue de 33 mL/min,
- Température de l'injecteur de 220°C,
- Température du détecteur FID de 240°C,
- Programme de température de la colonne : température initiale du four : 50°C, 4°C.min^{-1} jusque 70°C, puis 5°C.min^{-1} jusque 170°C, et 8°C.min^{-1} jusque 220°C. Un palier de 6 min à 220°C termine la mesure, pour une durée totale de 37.25 minutes.

Les chromatogrammes sont traités à l'aide du logiciel HP GC ChemStation (HP, Allemagne).

II.2.3 Analyses statistiques des résultats physicochimiques

L'ensemble des analyses est traité avec le logiciel SAS, version 9.1.

L'effet de la composition protéique ou du traitement mécanique sur les valeurs des coefficients de partage gaz/matrice et les quantités libérées mesurées par SPME a été testé par des analyses de variance (ANOVA) à un facteur (composition ou traitement mécanique).

L'effet de la composition protéique ou du traitement mécanique sur la viscosité complexe et le pH des yaourts a été également testé par une ANOVA à un facteur (composition ou traitement mécanique).

En cas de différences significatives à $p < 0.05$, les intensités moyennes des niveaux de chaque facteur ont été comparées par le test de comparaisons multiples de Student-Newman-Keuls (SNK).

II.3 Caractérisation sensorielle des matrices

Au cours de ce travail, l'analyse sensorielle a été conduite en parallèle des analyses physicochimiques avec pour objectifs :

- De quantifier les différences sensorielles entre les yaourts de structures et viscosités complexes différentes induites par une modification de la composition en protéines (yaourts MT-),
- De quantifier les différences sensorielles de yaourts présentant des viscosités complexes proches (yaourts MT+) mais une composition différente en protéines,
- De quantifier les différences sensorielles entre les yaourts de même composition mais de propriétés rhéologiques différentes (yaourts MT+ et yaourts MT-),
- D'évaluer l'impact de la nature de l'emballage sur les perceptions sensorielles des yaourts au cours de leur stockage (28 jours).

II.3.1 Influence de la composition protéique des yaourts sur leurs propriétés sensorielles

II.3.1.1 Objectif

Afin d'examiner le rôle de la composition en protéine sur les perceptions de texture et d'arôme, nous avons comparé les profils sensoriels des 3 yaourts CAS, MPO et WP ayant subi un traitement mécanique faible (yaourts MT-).

Afin de disposer d'une méthode sensorielle sensible permettant de discriminer au mieux les produits selon leurs propriétés olfactives, un premier travail a consisté à comparer les performances d'un panel de sujets entraînés pour trois modes de présentation des échantillons lors de l'analyse descriptive quantitative.

Pour cette étude, les trois produits MT- ont été évalués par une analyse discriminative, puis par une analyse descriptive quantitative. Les résultats de cette étude sont présentés dans la publication n°1 (p.99).

II.3.1.2 Analyses discriminatives

L'objectif de l'épreuve discriminative est de déterminer si les différences sensorielles entre les produits sont détectables par un jury, étape préalable et indispensable à toute analyse descriptive. Dans ce but, six épreuves triangulaires ont été réalisées pour comparer les

produits deux à deux. Les tests ont été réalisés par 30 sujets non entraînés. Les sujets disposaient de 3 échantillons (un produit étant doublé, l'autre pas). Le choix du produit doublé est équilibré sur l'ensemble du panel. Les sujets devaient alors identifier l'échantillon non répété.

Les paires de produits considérés sont :

- MPO versus CAS,
- MPO versus WP,
- CAS versus WP.

Lors d'une première séance, les sujets ont réalisé les tests par voie orthonasale (par flairage), puis lors d'une seconde séance par voie rétronasale (en bouche).

Les résultats ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative de perception entre les produits évalués par flairage. Par contre, en bouche les produits ont été perçus comme différents ($p < 0.01$).

A la fin des tests triangulaires, les sujets ont indiqué les critères qu'ils avaient utilisé pour discriminer les produits. Pour une très forte majorité d'entre eux, les produits ont été discriminés selon leur texture. Ces résultats sont étayés par les résultats de viscosité complexe.

Les tests triangulaires montrent un effet important de la composition en protéines sur les propriétés sensorielles des yaourts en bouche. Suite à ces résultats, une analyse descriptive quantitative des produits a été envisagée.

II.3.1.3 Analyses descriptives quantitatives

II.3.1.3.1 Les sujets et l'environnement de la dégustation

Le panel était constitué de 15 sujets, membres du personnel du laboratoire (6 femmes et 9 hommes, âgés de 22 à 54 ans). Les sujets ont été recrutés selon leur motivation et leur disponibilité pour poursuivre une étude de 4 mois à raison de deux séances par semaine. Six d'entre eux avaient déjà participé à des tests sensoriels sur différents produits dont des produits laitiers. Pour cette étude, les 15 sujets ont suivi des séances préliminaires d'entraînement.

Les séances ont eu lieu tous les mardi et jeudi, de 11h45 à 12h30. Elles se déroulaient dans une salle d'analyse sensorielle spécifique, où la température et l'éclairage sont contrôlés. Chaque cabine est équipée de matériel informatique et du système Fizz (Biosystèmes, 1990), qui permet de gérer les séances et de recueillir les réponses des sujets.

II.3.1.3.2 Entraînement du panel et organisation des séances

Neuf séances d'entraînement ont été réalisées. Elles consistaient à :

- identifier des saveurs de base dans l'eau, puis dans le yaourt, et à classer les yaourts selon l'intensité de leurs saveurs sucrée et acide,
- évaluer des propriétés de texture des yaourts,
- identifier et à reconnaître les qualités d'odeur et d'arôme de chacun des 17 composés d'arôme de la formule fraise en associant les perceptions d'odeur et d'arôme à des attributs appropriés dans l'eau, puis dans le yaourt.

Le panel a été entraîné à l'utilisation d'une échelle de notation linéaire non structurée pour évaluer les intensités des perceptions des yaourts aromatisés.

La génération des attributs utilisés pour le profil sensoriel a été réalisée pendant une séance où l'ensemble des yaourts était présenté. Une liste de 58 attributs a été construite. Lors d'une seconde séance, les sujets se sont accordés sur une liste réduite de 34 attributs (Tableau 9) contenant des attributs de texture à la cuillère, d'odeur, d'arôme, de saveur et de texture en bouche. Les protocoles de dégustation des attributs de texture sont présentés dans le Tableau 10.

Attributs d'odeur	***Attributs d'arôme***	***Attributs de saveurs***	***Attributs de texture à la cuillère***	***Attributs de texture en bouche***
O-Intensité globale	A-Intensité globale	S-Sucré	V-Brillant	B-Granuleux
O-Lactée	A-Lactée	S-Acide	V-Granuleux	B-Epais
O-Fruitée	A-Fruitée		V-Epais	B-Onctueux
O-Solvant	A-Fraise		V-Collant	B-Nappant
O-Verte	A-Kiwi			B-Astringent
O-Beurre	A-Ananas			
O-Caramel	A-Pomme			
O-Vanille	A-Pèche			
O-Animale	A-Solvant			
	A-Vert			
	A-Caramel			
	A-Vanille			
	A-Beurre			
	A-Animal			

Tableau 9 : Liste des 34 attributs utilisés pour l'analyse descriptive quantitative. O: odeur (perception orthonasale), A: arôme (perception retro-nasale), S: Saveur, V: texture à la cuillère, B: texture en bouche.

descripteur	*définition*
Brillant	qualifie l'aspect d'une surface lisse faisant apparaître des reflets lumineux.
Collant	force nécessaire pour décoller le produit qui adhère au dos de la cuillère.
Granuleux	qualifie la perception de la dimension et de la forme des particules d'un produit.
Épais	résistance du produit évaluée en écrasant une cuillerée de produit entre la langue et le palais.
Onctueux	
Nappant	aptitude du produit à former un film tapissant la bouche.
Astringent	caractère râpeux du produit évalué par frottement entre la langue et le palais.

Tableau 10 : Définition et protocole de dégustation des descripteurs de texture évalués par les sujets lors de l'analyse descriptive quantitative.

Les produits étaient présentés dans des pots isothermes en polystyrène (40 g/pot) codés par des nombres à trois chiffres aléatoires et préalablement stockés à 4°C. Les échantillons étaient environ à 10°C lorsqu'ils étaient dégustés par les sujets. Pour se rincer la bouche entre les échantillons, les sujets avaient à leur disposition de l'eau minérale (Evian) et des cracottes (Lu).

Pour les analyses descriptives, l'ordre de présentation des produits était équilibré selon un carré Latin. Pour un même sujet, l'ordre de présentation des échantillons était identique quels que soient la répétition et le type de profil.

II.3.1.3.3 Modes de présentation des échantillons

Trois modes de présentation des échantillons ont été étudiés : monadique, comparative et comparative par rapport à une référence. Chaque type d'évaluation a été répété. Les différents profils et leurs répétitions ont été réalisés selon un ordre différent pour chaque sujet. Le produit référent (MPO) a systématiquement été doublé à chaque séance, ce qui signifie que 4 produits ont été testés lors de chaque séance de profil.

Le profil monadique : les 4 produits ont été présentés les uns après les autres pour chaque sujet. Pour chaque échantillon, les sujets évaluaient l'intensité perçue de chaque attribut sur une échelle non structurée, s'échelonnant de « peu intense » à « très intense ». Les attributs ont été évalués dans l'ordre suivant : texture à la cuillère, odeur, arôme, saveur et texture en bouche.

Le profil comparatif : les 4 produits ont été présentés simultanément à chaque sujet. Les sujets notaient l'intensité de chaque attribut pour les différents yaourts sur une échelle identique à celle utilisée pour le profil monadique. Afin de limiter le réchauffement des produits, deux séries d'échantillons ont été présentées. Les sujets évaluaient les attributs de texture à la cuillère, odeur et texture en bouche avec une première série de pots. Une seconde série de pots servait à évaluer les intensités des attributs d'arôme et de saveur.

Le profil comparatif par rapport à une référence : les quatre produits ont été présentés simultanément aux sujets. Parmi ceux-ci, le produit référent (yaourt MPO) était identifié et codé R. Les trois autres produits étaient codés par trois chiffres aléatoires. Pour chaque attribut sensoriel, les sujets évaluaient l'intensité des trois produits en les comparant au produit de référence. L'intensité de la référence était placée au milieu de l'échelle non structurée allant de « beaucoup moins intense que la référence » à « beaucoup plus intense que la référence ». L'ordre des attributs évalués était identique à celui du profil comparatif. De la même manière que pour le profil comparatif, deux séries de pots ont été distribuées aux sujets.

II.3.1.4 Analyses statistiques

Les analyses sont réalisées avec le logiciel SAS, version 9.1. Deux approches ont été utilisées pour comparer l'efficacité des trois méthodes de profil : une analyse univariée et une analyse multivariée.

Pour chacune des trois procédures, une analyse de variance (ANOVA) à trois facteurs a été réalisée sur chaque attribut d'après le modèle suivant : attribut = produit + répétition + sujet + produit x répétition + sujet x produit. Lorsque des différences significatives sont observées ($p < 0.05$), les moyennes des produits sont comparées par le test de comparaison multiple de Student Newman Keuls (SNK).

L'analyse de variance est une analyse univariée et ne prend pas en compte les corrélations entre les variables sensorielles. Par conséquent, une approche multivariée a aussi été appliquée. La procédure PROC STEPDISC de SAS réalisée est une analyse discriminante pas à pas (« stepwise »). Cette procédure consiste à faire entrer les variables (attributs sensoriels) l'une après l'autre dans le modèle (selon leur corrélation partielle) par sélection progressive, et à chaque étape, à vérifier si les corrélations partielles de l'ensemble des variables déjà introduites sont encore significatives.

Puis, une analyse discriminante linéaire (procédure PROC DISCRIM de SAS) a été réalisée (SAS® User's Guide: Statistics 1990).

Les performances du panel ont également été étudiées. La répétabilité inter-séance et l'homogénéité du panel ont été évaluées sur la base de l'effet répétition et de l'interaction produit x répétition de l'analyse de variance à trois facteurs présentée précédemment. Le consensus entre les sujets a été évalué par l'intermédiaire de l'interaction produit x sujet. Pour cette analyse de variance à trois facteurs, la moyenne entre le produit MPO doublé et la référence a été réalisée. Cependant, la répétabilité intra-séance du panel a été préalablement mesurée par un test de Student entre les deux échantillons répétés du yaourt de référence MPO dans chacun des profils. Le test de Student est considéré significatif pour une probabilité inférieure à $p < 0.05$.

II.3.2 Influence du traitement mécanique sur les propriétés sensorielles des yaourts

II.3.2.1 Objectif

Les trois yaourts MT- fabriqués initialement possèdent des structures et des propriétés rhéologiques très différentes. Afin de masquer ces différences et d'évaluer si les variations de la composition en protéines avaient, dans ce cas, un effet sur les perceptions d'épais et d'intensité aromatique, un traitement mécanique fort a été appliqué. Cette démarche a pour objectif de découpler les effets structure et composition en protéines.

L'influence du traitement mécanique sur les propriétés sensorielles des yaourts de même composition a été examinée en comparant les yaourts MT- et MT+. Les résultats de cette étude sont présentés pour partie dans la publication n°3 (p.166) ainsi que dans le paragraphe III.1.1.2 (p.146)

II.3.2.2 Les sujets et les produits

Le panel était constitué de 20 sujets non entraînés. 13 d'entre eux avaient déjà participé à des tests sensoriels sur des produits laitiers aromatisés.

Les six yaourts (2 niveaux de traitement mécanique et 3 niveaux de composition en protéines) ont été testés.

II.3.2.3 Méthodologie et organisation des séances

La méthode du profil comparatif par rapport à une référence a été utilisée, suivant le protocole présenté en partie II.3.1.4.3. Deux séances ont été nécessaires pour étudier l'effet du traitement mécanique et de la composition en protéines sur les yaourts ayant subi un fort traitement mécanique, comprenant deux répétitions inter-séances.
L'épaisseur en bouche et l'intensité aromatique globale des produits a été évaluée par les sujets.
L'étude a été réalisée en deux parties répondant aux objectifs fixés :

Partie 1 : effet de la composition en protéines sur les yaourts ayant subi un fort traitement mécanique : l'épaisseur et l'intensité aromatique globale des yaourts CAS MT+, WP MT+ et MPO MT+ ont été comparées et quantifiées par rapport à celle du produit de référence MPO MT+,

Partie 2 : effet du traitement mécanique sur les yaourts de même composition. Pour cela, trois tests ont été réalisés :

- effet du traitement mécanique sur les yaourts enrichis en MPO : l'épaisseur et l'intensité aromatique globale des yaourts MPO MT+ et MPO MT- on été comparées et quantifiées par rapport à celle du produit de référence MPO MT+,
- effet du traitement mécanique sur les yaourts enrichis en CAS : l'épaisseur et l'intensité aromatique globale des yaourts CAS MT+ et CAS MT- ont été comparées et quantifiées par rapport à celle du produit de référence CAS MT+,
- effet du traitement mécanique sur les yaourts enrichis en WP : l'épaisseur et l'intensité aromatique globale des yaourts WP MT+ et WP MT- ont été comparées et quantifiées par rapport à celle du produit de référence WP MT+.

II.3.2.4 Analyses statistiques

Une analyse de variance (ANOVA) à trois facteurs a été réalisée sur chaque attribut d'après le modèle suivant : attribut = produit + répétition + sujet + produit x répétition + sujet x produit. Lorsque des différences significatives sont observées ($p < 0.05$), les moyennes des produits ont été comparées par le test de comparaison multiple de Student Newman Keuls (SNK).

II.3.3 Influence du type d'emballage au cours du stockage sur les propriétés sensorielles des yaourts

II.3.3.1 Objectif

L'objectif était de comprendre le rôle de différents types d'emballages sur les caractéristiques sensorielles de yaourts brassés aromatisés au cours de leur stockage, pour des yaourts à deux taux de matière grasse (0% et 4%). Les résultats de cette étude sont présentés dans la publication n°4 (p.204).

II.3.3.2 Les sujets et les produits

Le panel est identique à celui utilisé pour l'étude de l'influence de la composition en protéines sur les propriétés sensorielles des yaourts (partie II.3.1.3.1). Pour cette étude, le panel était séparé en deux groupes : le panel 1 (8 sujets) évaluent les yaourts à 0% de matière grasse et le panel 2 (7 sujets) évaluent les yaourts à 4% de matière grasse. L'entraînement des sujets a été décrit en partie II.3.1.3.2.

Deux types de yaourts, ayant la même composition en poudre que le yaourt MPO, ont été utilisés : yaourt à 0% de matière et yaourt à 4% de matière grasse. La composition exacte des yaourts est détaillée dans le Tableau 11.

Ingredients	***yaourt MPO 4%MG***	***yaourt MPO 0%MG***
Eau (Volvic, Danone)	1 L	1 L
Poudre de lait (Ingredia)	100 g	135 g
Matière grasse laitière anhydre (Lactalis)	40 g	-
Sucre (saccharose) (Sucre Union)	50 g	50 g

Tableau 11 : Composition des matrices yaourts utilisées pour l'étude emballage.

Les yaourts ont été conditionnés dans trois emballages (polystyrène, polypropylène et verre) et dégustés à différents temps de conservation (2ème jour, 14ème jour et 28ème jour de stockage). Un récapitulatif des produits étudiés est présenté dans le Tableau 12.

	Taux de MG	*Emballage*	*Temps de stockage*		*Taux de MG*	*Emballage*	*Temps de stockage*
0gt2	0	Verre	2	4gt2	4	Verre	2
0gt14-r1	0	Verre	14	4gt14-r1	4	Verre	14
0gt14-r2	0	Verre	14	4gt14-r2	4	Verre	14
0ppt14	0	PP	14	4ppt14	4	PP	14
0pst14	0	PS	14	4pst14	4	PS	14
0gt28-r1	0	Verre	28	4gt28-r1	4	Verre	28
0gt28-r2	0	Verre	28	4gt28-r2	4	Verre	28
0ppt28	0	PP	28	4ppt28	4	PP	28
0pst28	0	PS	28	4pst28	4	PS	28

G : verre, PP : polypropylène, PS : polystyrène, t : temps, r : répétition.

Tableau 12 : Récapitulatif des produits étudiés lors de l'étude emballage (facteur de variation : temps de stockage, type d'emballage et taux de matière grasse).

II.3.3.3 Méthodologie et organisation des séances

Les séances ont été organisées suivant le déroulement présenté en partie II.3.1.3.2.

L'objectif de cette étude était à la fois de comparer le type d'emballage et l'évolution de ces intensités au cours du temps de stockage. Il était alors impossible d'utiliser une référence constante pour l'ensemble de l'étude. C'est pourquoi les échantillons ont été présentés de façon monadique lors de l'analyse descriptive quantitative.

Les attributs utilisés pour l'analyse descriptive quantitative des 2ème, 14ème et 28ème jour de stockage sont présentés dans le Tableau 13.

Attributs d'odeur	*Attributs d'arôme*	*Attributs de saveurs*	*Attributs de texture en bouche*
Intensité globale	B-intensité globale	Sucré	Epais
Lacté	B-lacté	Acide	Onctueux
Fruité	B-fruité		Astringent
Beurré	B-fraise		
Caramel	B-kiwi		
Vanille	B-ananas		
Animal	B-pomme		
Solvant	B-pêche		
Défaut	B-note verte		
	B-note beurrée		
	B-note animale		
	B-note solvant		
	B-défaut		
	B-caramel		
	B-vanille		

Tableau 13 : Liste des descripteurs sélectionnés pour les profils sensoriels de l'étude emballage.

Le produit de référence conditionné dans le pot en verre était doublé lors de chaque séance. Quatre produits ont été présentés à chaque séance. L'ordre de présentation des échantillons était organisé selon un carré Latin. Pour un même sujet, l'ordre de présentation était identique quelque soit la répétition et la séance.

Les sujets ont évalué l'intensité perçue pour chaque attribut sur une échelle non structurée s'échelonnant de « peu intense » à « très intense ». Les attributs étaient évalués dans l'ordre suivant : odeur, arôme, saveur et texture en bouche. Les yaourts ont été distribués un par un aux sujets afin d'éviter l'échauffement des produits. Une répétition a été réalisée pour la séance effectuée au 14ème jour de stockage.

II.3.3.4 Analyses statistiques

Les attributs sensoriels ont été analysés par une ANOVA à deux facteurs (traitement mécanique ou composition, sujet). Les sujets sont traités comme un facteur aléatoire. En cas de différences significatives à $p < 0.05$, les intensités moyennes des niveaux de chaque facteur sont comparées par le test de comparaisons multiples de Student-Newman-Keuls (SNK).

II.4 Cinétiques de libération des composés d'arôme en conditions *in vitro* et *in vivo* et perception temporelle au cours de la consommation

II.4.1 Rôle du cisaillement sur la cinétique de libération des composés d'arôme : mesures in vitro

Lors de la mise en bouche, le yaourt subit un cisaillement. Avant la déglutition du produit, la langue applique une contrainte contre le palais. Afin de mieux comprendre le rôle de cette contrainte, des mesures de la cinétique de libération des composés d'arôme en conditions *in vitro* ont été réalisées dans une cellule de cisaillement.
Ces mesures ont été réalisées à l'UMR FLAVIC (INRA Dijon).

II.4.1.1 La cellule de cisaillement

L'analyse de la libération des composés d'arôme dans les différents yaourts en conditions dynamiques a été effectuée avec une cellule de cisaillement. Cette cellule a été développée par l'UMR FLAVIC en collaboration avec la Société Danone dans le cadre de la thèse de Nicolas Decourcelle (Decourcelle *et al.*, soumis). Elle permet de reproduire les contraintes de cisaillement subies par les produits dans des conditions proches de celles qui peuvent se produire en bouche.

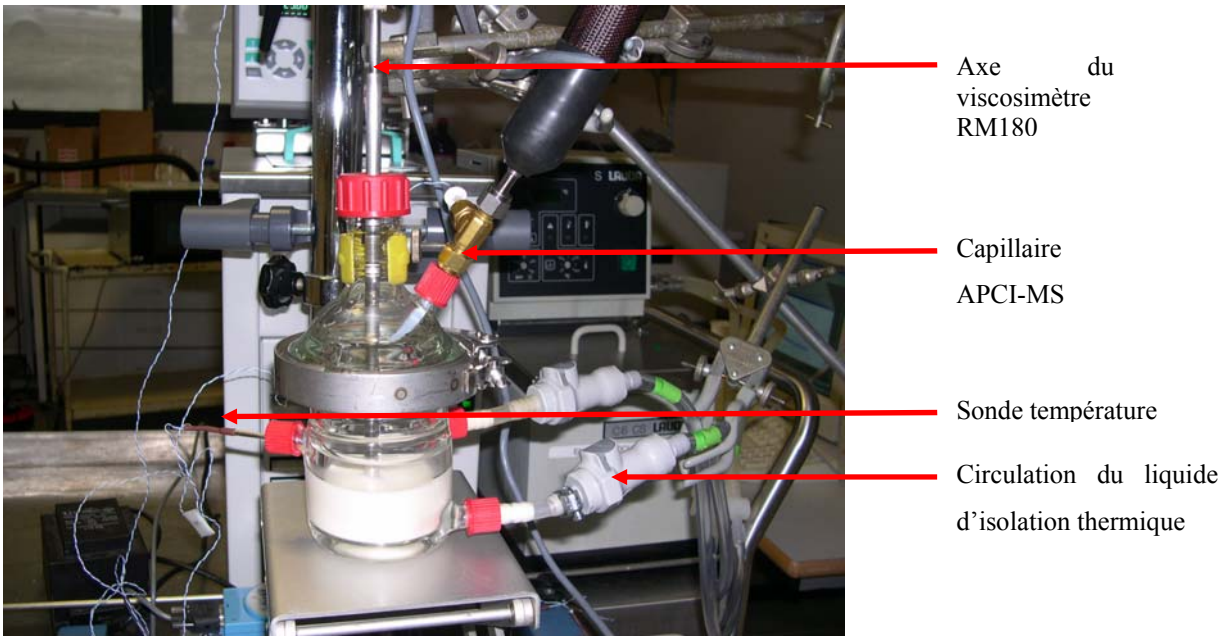


Figure 26 : Présentation de la cellule de cisaillement.

La cellule est une cuve en verre à double enveloppe d'un volume total de 180 cm^3 (Figure 26). 80 g de yaourt ont été utilisés. Une hélice marine baignant dans le yaourt est reliée à un viscosimètre RM 180 (Rheometric Scientific, France) piloté par le logiciel RSI Orchestrator. La vitesse de rotation de l'hélice est de 500 $tr.min^{-1}$, soit une vitesse de cisaillement de 126 s^{-1}.

Un flux d'aspiration de 35 mL/min permet de prélever la phase gazeuse de la cellule, placé sur la partie haute de la cellule. Ce flux est connecté au système d'analyse en ligne par la technique d'APCI-MS.

Deux sondes de température (Thermocouple type K, RadioSpares, France) permettent l'enregistrement du suivi de la température à plusieurs hauteurs de la cellule. La première sonde est située au niveau du capillaire APCI-MS. La seconde sonde de température est introduite par l'entrée présente sur le corps de la cuve et permet de suivre la température à une hauteur de 10 à 15 mm au dessus du yaourt.

II.4.1.2 Protocole : Isothermes en conditions non agitées et agitées

Une première étude en condition isotherme à 10°C a été réalisée. L'acquisition des données de libération dure 10 minutes en conditions non agitées, puis 10 minutes en conditions agitées. Le temps total d'acquisition est d'environ 20 minutes pour chaque yaourt.

Ces données ont été acquises pour :

- le yaourt enrichi en poudre de lait (traitement mécanique faible). Ce yaourt a été choisi car il s'agit du produit « référence » de cette étude,
- les yaourts enrichis en protéines sériques (aux deux niveaux de traitement mécanique). Ces yaourts ont été choisis afin d'observer l'effet de la viscosité complexe sur la libération de composés d'arôme de yaourts de composition en protéines identique.

Deux répétitions de chaque mesure ont été effectuées.

II.4.1.3 Traitement des résultats et analyses statistiques

Un exemple de courbes de réponses obtenues pour le composé acétate d'éthyle (ion m/z=89) dans le yaourt WP à fort traitement mécanique est présenté en Figure 27.

Les paramètres extraits à partir de ces courbes sont:

- Aires sous les deux principales parties de la courbe (non agitées et agitées),
- Intensité avant cisaillement en conditions non agitées ($I_{non\ agitées}$),

- Intensité maximale après mise en route de l'agitation ($I_{agitées}$).

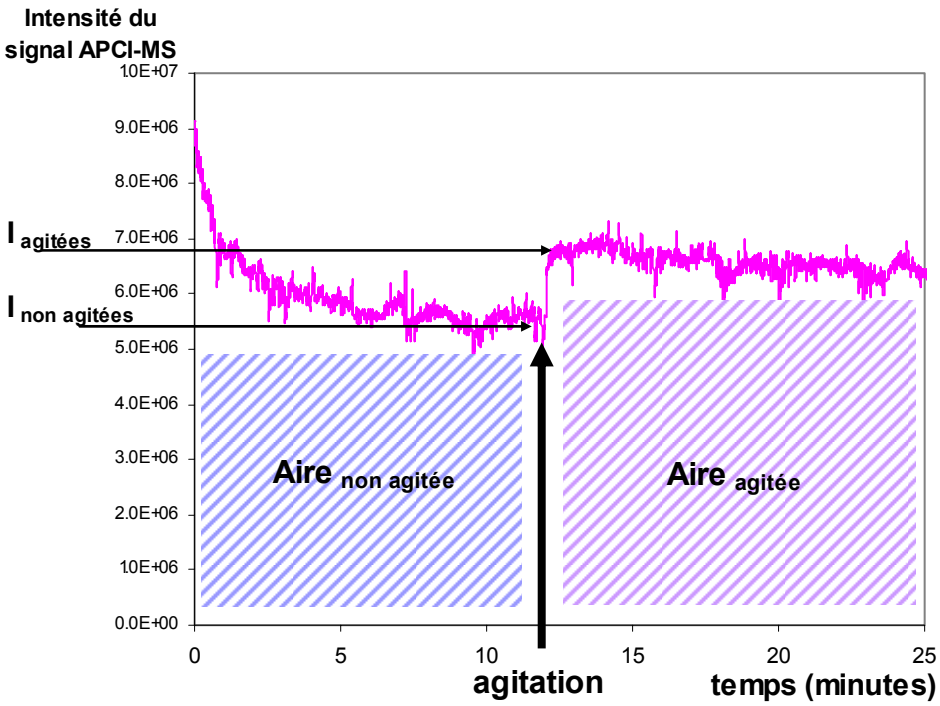


Figure 27 : Libération de l'acétate d'éthyle (ion 89) dans le yaourt WP à fort traitement mécanique dans la cellule de cisaillement en conditions isothermes à 10°C non agitées puis agitées.
$I_{non\ agitées}$: intensité du signal APCI-MS avant cisaillement en conditions non agitées.
$I_{agitées}$: intensité maximale du signal APCI-MS après mise en route de l'agitation.

L'influence des facteurs de variation sur la libération des composés d'arôme a été analysée par une ANOVA à un facteur (traitement mécanique ou composition) pour chaque composé d'arôme. En cas de différences significatives à $p < 0.05$, les intensités moyennes des niveaux de chaque facteur sont comparées par le test de comparaisons multiples de Student-Newman-Keuls (SNK).

II.4.2 Cinétiques de libération des composés d'arôme en bouche lors de la consommation des yaourts : mesures In vivo

II.4.2.1 Organisation des séances

Huit sujets expérimentés (4 femmes et 4 hommes, âgés de 22 à 52 ans) ont été recrutés dans les laboratoires de l'UMR GMPA et de l'UMR FLAVIC pour les analyses en conditions *in vivo*. Tous les sujets ont participé à une séance de familiarisation avec le protocole. Pendant cette séance, les sujets ont dégusté au minimum trois échantillons.

Quatre séances de 1h30, sur deux journées consécutives, pour chaque sujet, ont été réalisées afin d'obtenir 4 répétitions pour les données de libération *in vivo* et huit répétitions pour les données sensorielles (dû aux deux modes d'acquisition utilisés pour suivre les composés d'arôme de la formule fraise).

II.4.2.2 Protocole de dégustation

Un protocole strict a été imposé aux sujets afin de minimiser les variations interindividuelles. Lors de chaque séance, les sujets ont dégusté 12 échantillons de yaourts (5 g) à 10°C. Il leur était demandé de garder le yaourt en bouche pendant 12 secondes, puis d'avaler. Ce temps a été choisi suite à des tests préliminaires réalisés avec 4 sujets. L'objectif était de diminuer la variabilité liée à la température du produit en bouche. En effet, comme présenté dans la partie « Contexte Bibliographique » (paragraphe I.4.2.6, p.50), une étude a montré que la température du yaourt en bouche augmentait de 10 à 21°C en 5 secondes (Paci Kora et al., 2004). Afin de s'affranchir de ces variations de température, un temps de 12 secondes a été imposé aux sujets. L'acquisition des quantités d'arôme libéré continuait jusqu'à 1 minute afin de pouvoir suivre le comportement de ces composés en bouche jusqu'à quasi disparition de leur signal. Les sujets dégustaient les échantillons de yaourt de façon la plus naturelle possible, en conservant la bouche fermée et en respirant dans le tube de jonction relié à l'APCI-MS. Les échantillons de yaourt étaient présentés dans un ordre aléatoire. Les sujets se rinçaient la bouche entre chaque échantillon avec du pain, une pomme et de l'eau. Un temps de repos de 3 minutes minimum était requis entre les échantillons.

II.4.2.3 Analyse de la libération des composés d'arôme présents dans la cavité nasale par APCI-MS

La libération des composés d'arôme est mesurée à pression atmosphérique grâce à un spectromètre de masse Esquire-LC (Bruker Daltonique, Wissembourg, France) avec une source modifiée afin de permettre l'introduction des échantillons sous forme gazeuse due à la présence du système Venturi. Ce système permet de créer une aspiration à débit constant. L'air est prélevé à un flux de 35 mL/min à travers un capillaire métallique désactivé (d.=0.53 mm) (Supelco, Saint Quentin Fallavier, France) chauffé à 150°C. Une pièce en verre en forme de « Y » connecte l'entrée du capillaire d'APCI-MS et une narine des sujets (Figure 28). Lorsque les sujets expirent, 35 mL/min d'air expulsé sont prélevés par le capillaire APCI-MS, correspondant à une pression de 12 psi.

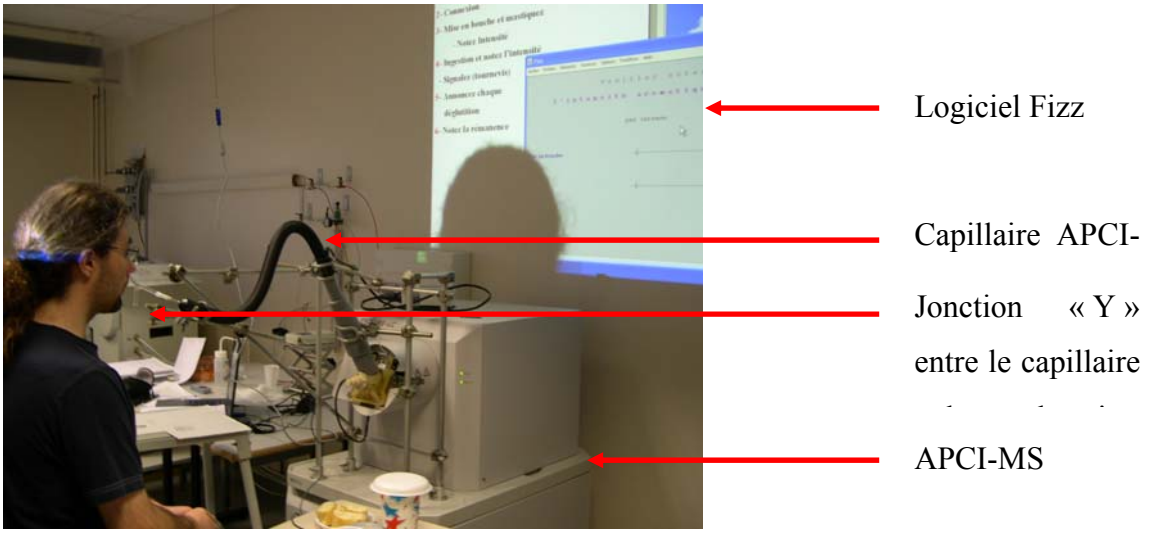


Figure 28 : Installation des sujets lors des analyses APCI-MS en conditions de consommation.

Les composés d'arôme sont détectés à des valeurs de m/z correspondant à leurs ions moléculaires protonés (MH+), présentés en Tableau 14. Certains des ions de mêmes masses moléculaires n'ont pas pu être différenciés. La masse m/z=59 (acétone) a été suivie. Elle permet de suivre les cycles respiratoires de chaque individu au cours de l'analyse. Avant chaque séance, une solution étalon contenant de l'heptan-2-one (15 ppm) est analysée par APCI-MS, afin de contrôler le calibrage de l'intensité des signaux observés au cours des séances.

Composés d'arômes	***Concentration dans le yaourt (mg/kg)***	***Rapport m/z***
Acide butanoïque	2.21	89
Acide décanoïque	1.11	173
Acide hexanoïque	1.12	117
Diacétyle	4.34	87
Acétate d'éthyle	17.88	89
Butanoate d'éthyle	27.24	117
Hexanoate d'éthyle	22.44	145
Octanoate d'éthyle	1.14	173
Cinnamate de méthyle	2.2	163
Furaneol	18.47	129
g-décalactone	2.52	171
Z-3-hexenol	1.01	101/83
Hexanal	23.68	101/83
Limonène	2.23	137
Linalol	1.88	155/137
Maltol	32.53	127
Vanilline	15.72	153

Tableau 14 : Concentration des composés d'arôme dans le yaourt et le rapport m/z correspondant à leur ions moléculaires protonés.

Deux modes de calibrage ont été utilisés. D'une part, le signal obtenu pour l'ion moléculaire protoné (m/z=89) a permis le calibrage du système pour les ions dont les m/z sont compris entre m/z=59 et m/z=117. D'autre part, le signal obtenu pour l'ion moléculaire protoné (m/z=145) a permis le calibrage du système pour les ions dont les m/z sont compris entre m/z=129 et m/z=173.

La quantité de composés d'arôme expirés par les sujets est exprimée en hauteurs d'intensité de réponse du signal.

II.4.2.4 Traitement des résultats APCI-MS

Un logiciel développé au laboratoire (UMR GMPA) par H. Guillemin a été utilisé pour extraire les données des courbes APCI-MS pour les différents ions. Les données brutes du signal APCI-MS ont été découpées en différentes périodes de temps afin d'extraire des paramètres propres à chaque zone :

- Enregistrement de l'haleine du sujet,
- P1 : Période où le yaourt est en bouche (12 secondes),
- P2 : Période après ingestion du yaourt (jusqu'à 60 secondes).

La première phase correspond au moment où le yaourt est en bouche (P1), la seconde (P2) à la phase après l'ingestion du produit jusqu'à la persistance des sensations (60 secondes après l'introduction du yaourt en bouche) (Figure 29). Les intensités obtenues pendant la phase d'haleine ont été soustraites aux intensités des deux phases principales (P1 et P2).

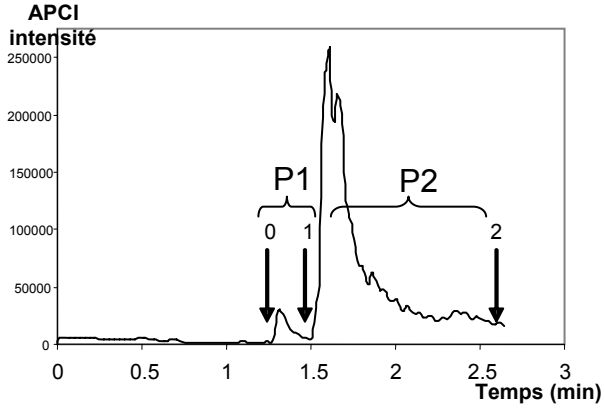


Figure 29 : Cinétique de libération de l'hexanoate d'éthyle mesurée par analyse APCI-MS pour le yaourt enrichi en caséinate, lorsque celui est dégusté par un sujet. 0: lors de l'introduction du yaourt en bouche, 1: à l'ingestion, 2: à la persistance, P1: Phase 1 lorsque le yaourt est dans la cavité buccale, P2: Phase 2: après ingestion du yaourt.

Les paramètres extraits à partir des données brutes des courbes pour chacune de ces 2 phases sont :

- Aire sous la courbe,
- Intensité maximale,
- Surface sous la courbe pour les 10 dernières secondes avant la mesure de la persistance.

II.4.2.5 Évaluation sensorielle temporelle au cours de la dégustation

Simultanément à l'analyse « nosespace », les sujets évaluaient l'intensité de l'arôme fraise à trois temps de la dégustation :

- À l'introduction du yaourt en bouche,
- À l'ingestion (12 secondes après avoir introduit le produit en bouche),
- À la persistance (60 secondes après l'introduction du yaourt en bouche).

Les sujets évaluaient l'intensité perçue des différents attributs sur une échelle linéaire non structurée s'échelonnant de « peu intense » à « très intense ». L'acquisition des données a été réalisée avec le logiciel FIZZ (Biosystèmes® 1999). Puis, les sujets ont évalué l'épaisseur en bouche des produits.

II.4.2.6 Analyses statistiques

Une analyse de variance à trois facteurs (composition, traitement mécanique et sujet) avec interactions a été réalisée sur les 4 variables sensorielles (intensité aromatique globale à l'introduction, à l'ingestion et à la persistance et épaisseur) sur les 5 variables APCI-MS (AUC1, AUC2, Imax1, Imax2 et $S_{50\text{-}60}$) pour chaque composé d'arôme. Pour chaque traitement mécanique, l'effet de la composition en protéines a été analysé par une analyse de variance à deux facteurs (composition, sujet) avec interactions sur les données sensorielles et les paramètres APCI-MS. Le facteur sujet a été traité comme facteur aléatoire pour ces deux analyses.

En cas de différences significatives à $p < 0.05$, les intensités moyennes des niveaux de chaque facteur étaient comparées par le test de comparaisons multiples de Student-Newman-Keuls (SNK).

II.5 Études préliminaires : mise au point des matrices et choix des facteurs

Avant de présenter les résultats, il nous est apparu important de présenter les résultats d'une étude préliminaire sur l'influence de la taille des gouttelettes lipidiques sur la libération des composés d'arôme et la perception, puis de présenter la démarche suivie pour la mise au point des facteurs finaux de l'étude.

II.5.1 Influence de la taille des gouttelettes lipidiques sur la libération de composés d'arôme et la perception

Une étude préliminaire a été réalisée dans le cadre de ce travail concernant l'effet de la taille des gouttelettes lipidiques sur la libération des composés d'arôme et sur la perception.
Pour évaluer l'effet de ce facteur, deux types de mesures ont été réalisées en parallèle : analyse physicochimique et évaluation sensorielle. D'une part, la quantité de composés d'arôme libérée dans l'espace de tête au dessus des yaourts a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse. D'autre part, un test de discrimination (test triangulaire) a été réalisé afin de détecter s'il existait ou non des différences sensorielles entre les produits.

Deux yaourts ont été fabriqués à partir d'émulsions constituées de deux tailles de gouttelettes lipidiques (diamètre de 400 et 1000 nm). Ces deux tailles de gouttelettes ont été obtenues par variation du barème d'homogénéisation : 60°C – 600 bars (400 nm) et 60°C – 50 bars (1000 nm).
Ces deux yaourts ont été ensuite aromatisés avec un des 3 composés d'arôme (Tableau 15), choisis selon leurs propriétés physicochimiques ou l'appartenance à des familles distinctes :

- Pentanoate d'éthyle : composé hydrophobe et non polaire,
- 3-méthyl butanal : composé hydrophile et polaire,
- Acétate d'éthyle : composé hydrophile et polaire.

	Concentrations (mg/kg)	***LogP***	***Seau (mg/L)***
Pentanoate d'éthyle	6	2.34	925.9
3-méthyl butanal	11	1.23	14000
Acétate d'éthyle	40	0.73	80000

Tableau 15 : Composés d'arôme et certaines de leurs propriétés physicochimiques utilisés dans l'étude de la taille des gouttelettes lipidiques.

6 yaourts différents ont ainsi été obtenus.

II.5.1.1 Détermination de la quantité de composés d'arôme libérée

La quantité de composés d'arôme libérée dans l'espace de tête au dessus des 6 yaourts a été déterminée à 4°C par chromatographie en phase gazeuse (Tableau 16). Les conditions d'analyse sont présentées en partie II.2.2.3. Trois répétitions ont été réalisées.

	Surfaces de pics	
	Yaourt 400nm	***Yaourt 1000nm***
Pentanoate d'éthyle	2714±77	2731±101
3-méthyl butanal	7046±224	6838±345
Acétate d'éthyle	4194±151	4390±121

Tableau 16 : Quantité (en surface de pics et leur écart-type) des composés d'arôme libérés dans l'espace de tête mesurée par chromatographie en phase gazeuse pour l'étude de l'influence de la taille des gouttelettes lipidiques sur la volatilité des composés d'arôme.

Une analyse de variance a montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les yaourts présentant des tailles de gouttelettes lipidiques différentes, quelque soit le composé d'arôme.

II.5.1.2 Analyse discriminative

Trois tests triangulaires ont été réalisés avec un panel de 26 personnes non entraînées.

Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les yaourts, quel que soit la note aromatique.

Ainsi cette étude a montré qu'il n'existait pas d'effet significatif de la taille des gouttelettes lipidiques sur la volatilité des composés d'arôme étudiés dans les yaourts, ni sur leur perception.

Le facteur taille des gouttelettes lipidiques n'a ainsi pas été retenu pour la suite de l'étude.

II.5.2 Choix des facteurs et mise au point des matrices

Suite aux résultats de cette étude préliminaire, le choix des facteurs de variation de la structure des yaourts s'est porté sur l'effet de la composition en protéines et du traitement mécanique.

Dans un premier temps, les matrices de composition variable en protéine ont été mises au point. Le schéma ci-dessous (Figure 30) illustre la mise au point de ces matrices.

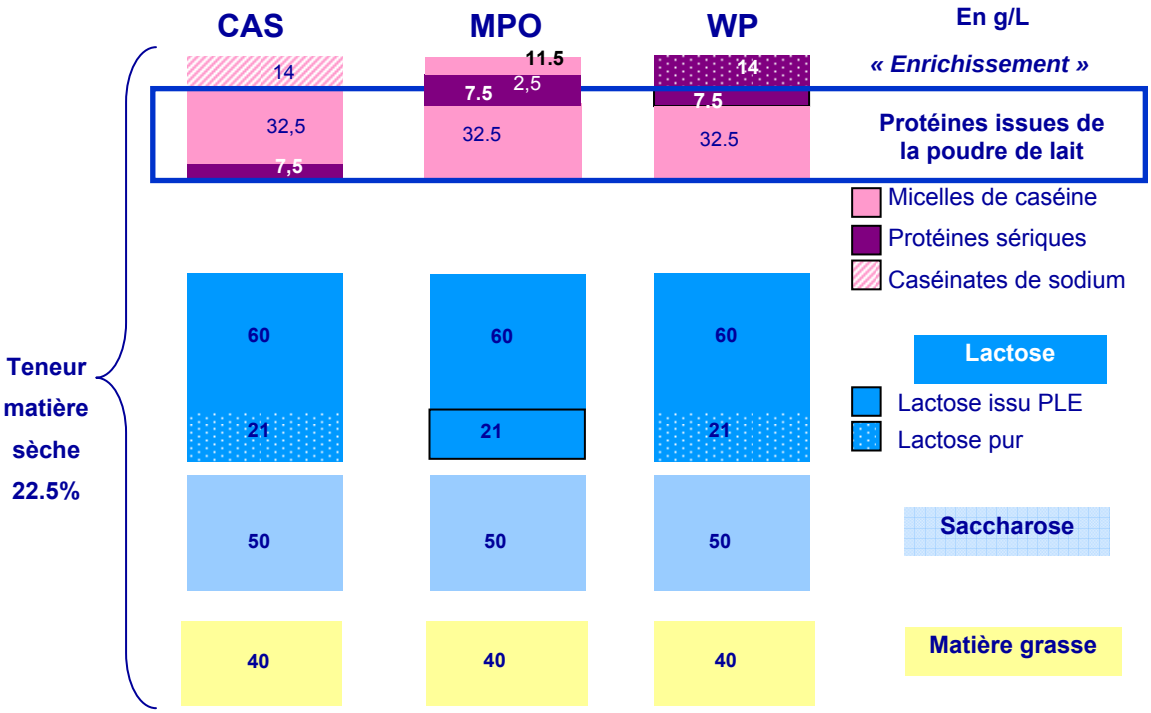


Figure 30 : Schéma illustrant la mise au point des yaourts de composition variable en protéine.

La matrice MPO a servi de référence. Une base de poudre de lait (contenant des micelles de caséines, des protéines sériques et du lactose) à 100 g/L d'eau a été enrichie afin d'arriver à une teneur en protéine constante (5.4%). Pour cela, 35 g/L de poudre de lait ont été ajoutées au mixe de base.

Pour la matrice enrichie en protéines sériques (yaourt WP), la même base a été utilisée (100 g/L de poudre de lait dans l'eau). Puis ce mixe a été enrichi avec des protéines sériques afin de parvenir à une teneur totale en protéines de 5.4%. Pour cela, 14 g/L de protéines sériques ont été ajoutées au mixe, puis complétées par 21 g/L de lactose pour atteindre une teneur constante en matière sèche.

Pour la matrice enrichie en caséinates de sodium, le même protocole d'enrichissement a été réalisé. 14 g/L de caséinates de sodium ont été ajoutées au mixe de poudre de lait et complétées par 21 g/L de lactose.

De plus, les trois matrices contiennent une teneur fixe de 4% de matière grasse. Un barème unique d'homogénéisation a été utilisé afin d'obtenir des tailles de gouttelettes lipidiques constantes entre les mixes et stables au cours du temps. La même teneur en sucre a été ajoutée dans les 3 mixes : 50 g/L.

Dans un second temps, les matrices de niveau de traitement mécanique variable ont été mises au point, comme décrit en partie 1.1.3.4.

III. Résultats et Discussion

III.1 Quelle est l'influence de la viscosité complexe modifiée par la composition en protéines et le traitement mécanique sur les propriétés sensorielles et les caractéristiques physicochimiques de yaourts brassés aromatisés ?

Introduction

Ce premier chapitre de la partie Résultats et Discussion est dédié à la présentation des travaux qui concernent le rôle de la viscosité complexe des yaourts brassés aromatisés modifiée par la composition en protéine et le traitement mécanique sur ses propriétés sensorielles et physicochimiques, volet majeur des travaux conduits pendant la thèse.

De nombreuses études se sont intéressées à comprendre le rôle de la structure des aliments sur la libération des composés d'arôme et leur perception. L'analyse des travaux antérieurs révèle que les caractéristiques physicochimiques peuvent être à l'origine des propriétés sensorielles des produits. Cependant, certaines études en conditions *in vivo* appuient l'hypothèse d'interactions sensorielles. C'est dans ce contexte que l'objectif principal de notre travail a été défini : « Quel est le rôle de la structure et des propriétés rhéologiques sur la libération des composés d'arôme et la perception olfactive ? ».

Afin de répondre à cette question, il est nécessaire de caractériser le plus finement possible les propriétés sensorielles et physicochimiques des matrices.
Deux facteurs de variation modifient la structure et les propriétés rhéologiques des matrices : la composition en protéines et le niveau de traitement mécanique appliqué (deux niveaux : faible et fort). Ces deux facteurs font l'objet des deux parties présentées dans ce premier chapitre.

La première partie de ce chapitre examine l'influence de la composition en protéines sur la structure et les propriétés rhéologiques des yaourts et sur la libération des composés d'arôme et les propriétés sensorielles. Cet effet a été étudié aux deux niveaux de traitement mécanique.
Dans un premier temps, l'influence de la composition en protéines sur les propriétés sensorielles de yaourts ayant subi un faible traitement mécanique a été étudiée par analyse descriptive quantitative. Cette étude a aussi permis de définir la procédure la plus efficace pour discriminer et quantifier les propriétés sensorielles des produits possédant des propriétés olfactives relativement proches. Trois modes de présentation des échantillons ont été comparés : présentation monadique, présentation comparative et présentation comparative par rapport à un produit de référence.

L'ensemble de ces résultats fait l'objet de la publication intitulée « *Influence of proteins on the perception of flavored stirred yogurts* » (publication n°1) dans la revue internationale à comité de lecture Journal of Dairy Science (89, 922-933).

Dans un second temps, l'influence de la composition en protéines a été étudiée sur les caractéristiques physicochimiques des yaourts ayant subi un faible traitement mécanique. Pour caractériser la structure des matrices, les yaourts ont été examinés au niveau macroscopique (propriétés rhéologiques) et au niveau microscopique (microstructure du réseau protéique). Puis la libération des composés d'arôme de la formule fraise de l'étude a été déterminée et quantifiée dans les trois yaourts en conditions statiques par deux méthodes : la méthode PRV (Phase Ratio Variation) et la méthode SPME (Solid Phase Microextraction). Cette caractérisation fait l'objet de la publication intitulée « *Complex viscosity induced by protein composition influences the aroma release of flavoured stirred yogurt* » (publication n°2) acceptée pour publication le 02/04/2006 dans la revue internationale à comité de lecture Journal of Agriculture and Food Chemistry.

Dans un troisième et dernier temps, nous nous sommes intéressés à l'effet de la composition en protéines sur les propriétés sensorielles et physicochimiques des yaourts après un fort traitement mécanique. Ce travail n'a pas fait l'objet de publication et les résultats sont présentés en français dans le manuscrit.

La deuxième partie de ce chapitre traite de l'influence du niveau de traitement mécanique sur les propriétés sensorielles et physicochimiques des yaourts de composition identique en protéines.

Pour caractériser les matrices, les propriétés rhéologiques et la libération des composés d'arôme dans les matrices en conditions statiques ont été déterminées. Les matrices ont ensuite été caractérisées selon leurs propriétés sensorielles. Ce travail n'a pas fait l'objet de publication. Les résultats sont présentés en français, puis discutés en regard de l'importance des facteurs choisis dans cette étude.

III.1.1 Influence de la composition en protéines sur les propriétés sensorielles et les caractéristiques physicochimiques de yaourts brassés aromatisés

III.1.1.1 Effet de la composition en protéines sur les propriétés sensorielles et les caractéristiques physicochimiques des yaourts à faible traitement mécanique

Cette partie concerne l'influence de la composition en protéines sur les propriétés sensorielles et physicochimiques des trois yaourts brassés aromatisés à faible traitement mécanique (yaourts MT-).

III.1.1.1.1 Influence des protéines sur la perception des yaourts brassés aromatisés.

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

INFLUENCE OF PROTEINS ON THE PERCEPTION OF FLAVORED STIRRED YOGURTS.

A. Saint-Eve, C. Lévy, N. Martin, and I. Souchon

Unité Mixte de Recherche de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, INA PG – INRA, 78850 Thiverval-Grignon, France.

For correspondence: I. SOUCHON

Phone number: +33 (0)1 30 81 54 86

Fax number: +33 (0)1 30 81 55 97

E-mail: souchon@grignon.inra.fr

ABSTRACT:

Among yogurt dairy components, protein type is known to modify the texture of the products and the volatility of odorous volatile organic compounds. The aim of this study was to investigate the impact of three protein ratios (caseinate to total protein) on the sensory properties of 4%-fat strawberry-flavored stirred yogurts. A sensory methodology study was therefore investigated in order to choose the most efficient method in terms of sensitivity, quantification and ease with which the panel could distinguish slight olfactory property differences between the yogurts. Three kinds of product presentation procedures were compared**:** a monadic presentation, a comparative presentation and a comparative presentation with a reference. The results showed that the three presentation methods emphasized some important texture differences between the yogurts in the same way. However, the comparative procedure with a reference was the only one to reveal clear olfactory property differences between the yogurts. The main effect of protein ratio variation in yogurt concerned the texture properties, which greatly differed between the three yogurts and was confirmed by complex viscosity measurements. Olfactory differences between the yogurts were more subtle. Overall, the flavor intensity and the fruity notes were less intense in the yogurts with the high caseinate ratio than in those with the low ratio. This result was in agreement with the physico-chemical measurements that showed a higher retention of a large majority of aroma compounds of the strawberry flavor in the yogurts with a high caseinate ratio.

Key words: Texture and olfactory properties, Milk proteins, Yogurt, Sensory descriptive analyses.

Abbreviation key: **CAS**: caseinate, **WP**: whey protein, **MPO**: milk powder.

INTRODUCTION

Flavor is defined as the combination of olfactory, gustatory and trigeminal sensations perceived during tasting. In our study, the term "odor" refers to the direct olfactory component of flavor (orthonasal perception) and the term "aroma" to the organoleptic properties perceptible by the olfactory organ via the back of the nose, *i.e*., retronasal olfactory perception when tasting (NF ISO 5492, 1995).

Yogurt and fermented milks are among the most common fresh dairy products eaten around the world. Their acceptability by the consumer is largely determined by their sensory properties. The composition and, in particular, the type of milk proteins, can have a great impact on the yogurt texture and on its flavor properties. Therefore, food product flavoring is a complex process because of multiple interactions that can occur between the dairy matrix and the aroma compounds, as well as between texture and flavor properties. Thus, a better understanding of the mechanisms that govern aroma and texture perception could be of great help for the optimization process in yogurt formulation.

As shown in previous studies (Tamime *et al.*, 1984, Kailasapathy and Supriadi, 1998, Sodini *et al.*, 2004), the variations of the type and concentration of milk proteins can modify the perceived texture of yogurts. Tamime *et al.* (1984) observed that yogurt enriched with caseinates had a coarse texture from a visual point of view, whereas other yogurts (with skim milk powder) were smooth. However, increasing the level of whey proteins (modification of the whey protein/casein ratio) in the milk base used for yogurt production led to a significant increase in granular texture perception (Kailasapathy and Supriadi, 1998).

The olfactory properties may also be influenced by protein changes in the matrices but in a different way, depending on the physico-chemical properties of the aroma compounds. However, most of the previous studies have been carried out on simple dairy food systems, but not on complex systems. For example, the addition of whey protein concentrate to a sucrose solution flavored with vanillin or benzaldehyde was reported to decrease its flavor perception, whereas no impact of caseinate on benzaldehyde-perceived intensity was observed (Hansen and Heinis, 1991, Hansen and Heinis, 1992). Reiners *et al.* (2000) showed that the addition of β-lactoglobulin had no effect on the odor perception of vanillin, but significantly decreased the odor intensity of eugenol.

In the present study, we investigated the influence of the protein ratio (caseinate to total protein) on the sensory properties of a complex dairy system: flavored stirred yogurts.

Therefore, a sensory methodology study was investigated in order to find the most efficient and sensitive sensory methodology for distinguishing and quantifying slight olfactory property differences between the yogurts. Descriptive analysis is the most widely used technique to assess product sensory properties. It involves the description and quantification of the sensory qualities of a product by trained panelists (Meilgaard *et al.*, 1991, Stone and Sidel, 1993). From a methodological point of view, the choice of the sample presentation mode (monadic or simultaneous) is a critical experimental factor, especially when quantifying the sensory property differences between relatively similar products.

The memory required to perform the sensory evaluation will differ, depending on the sample presentation mode (Thirion *et al.*, 1995). In the comparative (or simultaneous) mode, the judgment is quite independent of the long-term memory. It is formed when the subject tastes the products and can be modified as soon as the subject receives new information (Hastie and Park, 1986). In the monadic presentation, the judgment is based, to a much greater extent, on the memory of the references learned beforehand. In this case, the judgment is built on the recovery of information stored both in the short-term and in the long-term memory, requiring much more memory than in the comparative mode.

Some authors find the simultaneous presentation procedure more attractive (McBride, 1982). It is faster to implement than the monadic method because less time is required to train the panelists. The studies undertaken to compare the monadic and comparative modes of presentation (Larson-Powers and Pangborn, 1978; McBride, 1986; Thirion *et al.*, 1995, Mazzuchelli and Guinard, 1999) all showed a better discrimination ability of the panelists in the comparative procedure than in the monadic procedure. When different samples are presented side by side, the assessors are able to detect very small differences (McBride, 1982) and to make precise judgments about the relative differences. The monadic procedure may be more appropriate in some cases when the experimenter wants to minimize the influence of small visual differences between the products on the other sensory properties (Stone and Sidel, 1993). The monadic presentation is generally considered sufficiently sensitive, less tiring and faster than the comparative procedure (Mazzucchelli and Guinard, 1999), and is also more appropriate when a large number of products are studied.

The main objective of the present study was to investigate the impact of protein ratio on sensory properties. The products were flavored stirred yogurts which varied slightly in their protein composition. Therefore, the efficiency of three sample presentation procedures - monadic, comparative and comparative with a reference - was compared in view of determining the most sensitive descriptive procedure to investigate and to quantify subtle

olfactory differences. The results of the sensory analysis were also compared to physico-chemical characterizations (rheological measurements and aroma compound release) to support our observations and our conclusions.

MATERIALS AND METHODS

Products

Three flavored stirred yogurts were studied. They had the same dry matter (22.5%), fat (4%) and protein (5.4%) content. The composition of the yogurt is presented in Table 1. Only the protein ratio (caseinate to total protein) varied: a ratio of 86% (corresponding to the protein mixture fortified with sodium caseinates: CAS), a ratio of 81% (corresponding to the protein mixture fortified with milk powder: MPO) and a ratio of 60% (corresponding to the protein mixture fortified with whey protein: WP). The MPO yogurt was considered as the reference product.

Ingredients (suppliers)	CAS yogurt	MPO yogurt	WP yogurt
Water (Volvic, Danone)	1 L	1 L	1 L
Skim milk powder (Ingredia)	100 g	135 g	100 g
Lactose (Ingredia)	21 g	-	21 g
Sodium caseinate (Ingredia)	14 g	-	-
Whey protein (Ingredia)	-	-	14 g
Anhydrous milk fat (Lactalis)	40 g	40 g	40 g
Sugar (sucrose) (Daddy)	50 g	50 g	50 g
Protein total content	5.4%	5.4%	5.4%
Dry matter	22.50%	22.50%	22.50%

Table P1-1: Premix composition for yogurt preparation

Yogurt premix reconstitution and yogurt fermentation were performed in the laboratory. Each milk base was heated at 92°C for 5 minutes. The fermentation was carried out in a 7-L fermenter (SGI, France), thermostated at 44°C. The milks were inoculated with *Lactobacillus delbrueki* ss *bulgaricus* (LB18 incorporated in 0.005 % in milk), *Streptococcus thermophilus* (ST7 and ST143 in 0.01%) provided by Chr. Hansen (Arpajon, France). Fermentation was stopped when the pH reached 4.6 and the yogurts were immediately stored at 4°C.

The yogurts were flavored with 0.1% (w/w) strawberry flavoring containing 17 odorous compounds mixed with propylene glycol (Aldrich, France). The concentrations of the aroma compounds ranged from 1.01 to 32.53 mg/kg of yogurt (Table 2).

Aroma compounds	*Concentration in yogurt (mg/kg)*
Butanoic acid	2.21
Decanoic acid	1.11
Hexanoic acid	1.12
Diacetyle	4.34
Ethyl acetate	17.88
Ethyl butyrate	27.24
Ethyl hexanoate	22.44
Ethyl octanoate	1.14
Methyl cinnamate	2.2
Furaneol	18.47
γ-decalactone	2.52
Hexanal	1.01
Z-3-hexenol	23.68
Limonene	2.23
Linalol	1.88
Maltol	32.53
Vanillin	15.72

Table P1-2: Aroma compound composition of strawberry aroma mixed with propylene glycol and their concentrations (mg/kg) in yogurt.

Physico-chemical measurements

In order to control and characterize the three products, rheological properties (complex viscosity measured at the 0.1 and 100 Pa constraint with a frequency of 1 Hz) were determined (details given in Saint-Eve *et al.*, 2005).

The SPME (solid-phase microextraction) method was used to quantify all the aroma compounds of the strawberry aroma released in the vapor phase above the different yogurts. The analysis of the aroma compound release was carried out at 4°C by SPME using a gas chromatograph flame ionization detector. A two-hour extraction with a polydimethylsiloxane fiber (PDMS, 100 µm film thickness) was performed (all details and choice of conditions given in Saint-Eve *et al.*, 2005). The oven program was 37.5 min long: starting at 50°C, 4°C/min up to 70°C; 5°C/min up to 170°C; 8°C/min up to 220°C and 6 min at 220°C. Results obtained from SPME were expressed as area units. Each headspace analysis was done in triplicate.

Sensory evaluation

Panelists

The panel consisted of ten members of the laboratory staff (from 22 to 41 years-old, four women and six men), recruited according to their motivation and their availability to pursue a four-month study with two sessions per week. Six panelists had previous experience in sensory evaluation of dairy products but all ten panelists were trained in preliminary sessions for this specific study, as described in section 2.3.2.

Training and set-up of the sensory study

Nine training sessions were carried out. They involved: (1) the identification of the basic tastes in water and in yogurts and the ranking of several yogurts according to their sweetness and sourness; (2) the evaluation of the texture properties of several yogurts; (3) the identification and the recognition of the odor and aroma quality of each one of the 17 aroma compounds entering into the composition of the strawberry flavor as well as the complete flavouring either in water or in yogurts; (4) the panel was trained in the proper use of the unstructured linear scale to evaluate the intensity of the odor and aroma of flavored yogurts.
The generation of the attributes used for the sensory profile was carried out during a specific session where the three different flavored stirred yogurts of the study were presented. A list of 58 attributes was composed. In a subsequent session, the panelists agreed on a reduced list of 34 attributes (Table 3).

Odor attributes	*Aroma attributes*	*Taste attributes*	*Visual texture attributes*	*Texture-in-mouth attributes*
O-Overall intensity	A-Overall intensity	T-Sweet	V-Shiny	M-Granular
O-Lacteous	A-Lacteous	T-Sour	V-Granular	M-Thick
O-Fruity	A-Fruity		V-Thick	M-Unctuous
O-Solvent	A-Strawberry		V-Ropy	M-Mouth-coating
O-Green	A-Kiwi			M-Astringent
O-Butter	A-Pineapple			
O-Caramel	A-Apple			
O-Vanillin	A-Peach			
O-Animal	A-Solvent			
	A-Green			
	A-Caramel			
	A-Vanillin			
	A-Butter			
	A-Animal			

Table P1-3: List of the 34 attributes used for the descriptive analyses. O: odor (orthonasal perception), A: aroma (retronasal perception), T: Taste, V: visual texture (with a spoon), M: texture in mouth.

Sensory procedure

Products were presented in three-digit coded white plastic isothermal pots (40 g/pot) stored at 4°C. The samples were approximately at 10°C when they were tested. Panelists were provided with mineral water and plain crackers as palate cleansers between samples. The sessions were carried out in an air-conditioned room at 20°C under white lighting in individual booths. Data acquisition was assisted by FIZZ software (Biosystèmes®, 1999). For the descriptive analysis, the samples were arranged for each subject according to a Latin square. For a single subject, the order of presentation of the products was the same, regardless of the replication and the profiling procedure.

The three types of descriptive procedures were applied and each one was replicated over six sessions. The different profiles and their replications did not run in the same order for each subject. The reference product (MPO) was systematically replicated within a session, which means that four products were tested at each session.

The monadic profile: The products were presented one after the other for each subject. For each sample, the panelists scored the perceived intensity of each attribute on an unstructured scale anchored with the terms "very weak" and "very intense". The attributes were evaluated in the following order: visual texture with a spoon, odor, aroma, taste and texture-in-mouth.

The comparative profile: The products were simultaneously presented to each subject. The panelists scored the intensity of each attribute of the different yogurts on a single scale identical to the one used in the monadic profile. The panelists evaluated the attributes of visual texture with a spoon, odor and texture-in-mouth with a first series of pots. A second series was then delivered to the panelists to evaluate the intensities of aroma and taste attributes to limit product heating.

The comparative profile with a reference: The four products were simultaneously presented to the panelists. Among these, one product was identified as the reference and identified with an R (MPO yogurt). The three other products were coded with three random digits. For each sensory attribute, the panelists scored the intensity of all three samples by comparing it to the reference, whose intensity was located in the middle of the unstructured scale varying from "much less intense than R" to "much more intense than R". The order of the attributes for the evaluation was the same as in the standard comparative profile. As in the comparative profile, two sets of pots were delivered to the panelists.

Data analyses

All data analyses were performed using the SAS software package, version 9.1 (SAS® User's Guide: Statistics 1990). Two approaches were used to discriminate the products and to compare the efficiency of the three profiling methods: a univariate and a multivariate analysis. For each of the three procedures, a three-way analysis of variance (ANOVA) was carried out separately on each attribute according to the following model: attribute = product + repetition + subject + product x repetition + subject x product. When significant product differences were observed ($P<0.05$), product mean intensities were compared using the Newman-Keuls (SNK) multiple comparison test.

This statistical analysis is univariate and does not take the possible links between the sensory attributes into account. Consequently, a multivariate approach was also applied: the PROC STEPDISC procedure of SAS to perform stepwise discrimination analysis. This program was used to select the olfactory attributes that contribute the most to the discriminatory power of the model with $P = 0.15$. A linear discriminant analysis (PROC DISCRIM procedure of SAS) was also carried out to explore the performance of discriminant functions using preliminary attributes selected after stepwise discrimination analysis (SAS® User's Guide: Statistics 1990).

Panel performances were monitored. The inter-session repeatability of the panel and its homogeneity were evaluated on the basis of the repetition and product x repetition effects of the three-way ANOVA described above. Intra-session replicates were averaged for this analysis. The intra-session repeatability of the panel was then measured by a Student's test between the two replicated samples of the MPO product in each profile. The Student's test was considered significant for a probability lower than 5%. Finally, the consensus between the panelists was evaluated by loading at the product x subject interaction, resulting from the ANOVA presented in inter-session repeatability.

RESULTS

First of all, the results of the three sensory procedures were compared for the purpose of selecting the most sensitive sensory method to highlight texture and olfactory differences between the yogurts, taking panel performances into account.

Then, the results of the main objective, the influence of the protein ratio on the texture and olfactory properties, were presented, supported by the physico-chemical measurements.

Selection of the most sensitive sensory profile: comparison of the three types of procedures

Texture differences

The three profiles produced similar results in relation to texture attributes. According to ANOVA (Table 4), the three yogurts were significantly discriminated on all of the nine texture attributes, both in the monadic profile and in the comparative procedure with a reference profile, and for eight of them in the standard comparative profile. The three profiling methods led to different F-values for the same attributes. The mean-F product value of the significant texture attributes was higher for the monadic profile (42.6) than for the comparative profile (28.2) and for the comparative procedure with a reference product (17.2) (Figure 1a).

	Monadic profile		*Classical comparative profile*		*Comparative profile with a reference*	
	F value [2,32]	p value	F value [2,32]	p value	F value [2,32]	p value
V-shiny	9.08	0.001	1.11	ns	4.84	0.0159
V-granular	68.22	<0.0001	38.91	<0.0001	44.45	<0.0001
V-thick	36.35	<0.0001	19.01	<0.0001	14.92	<0.0001
V-ropy	20.67	<0.0001	28.68	<0.0001	14.65	<0.0001
M-granular	95.41	<0.0001	98.25	<0.0001	20.38	<0.0001
M-thick	52.5	<0.0001	8.7	0.0012	12.09	0.0002
M-unctuous	14.73	<0.0001	11.37	0.0006	8.44	0.0014
M-mouth-coating	12.21	0.0004	6.44	0.0052	4.83	0.0161
M-astringent	4.87	0.0157	11.49	0.0002	5.2	0.0165
O-overall intensity	5.5	0.0099	0.78	ns	4.87	0.0139
O-green	5.83	0.0079	0.01	ns	4.87	0.0156
A-fruity	0.53	ns	1.15	ns	4.07	0.0285
A-kiwi	0.22	ns	1.73	ns	4.6	0.0191
A-pineapple	2.4	ns	0.2	ns	4.74	0.0172

Ns: non-significant (P>0.05)

Table P1-4: Significant product effect of the ANOVA for the three types of sensory profiles - Fisher values and associated probabilities.

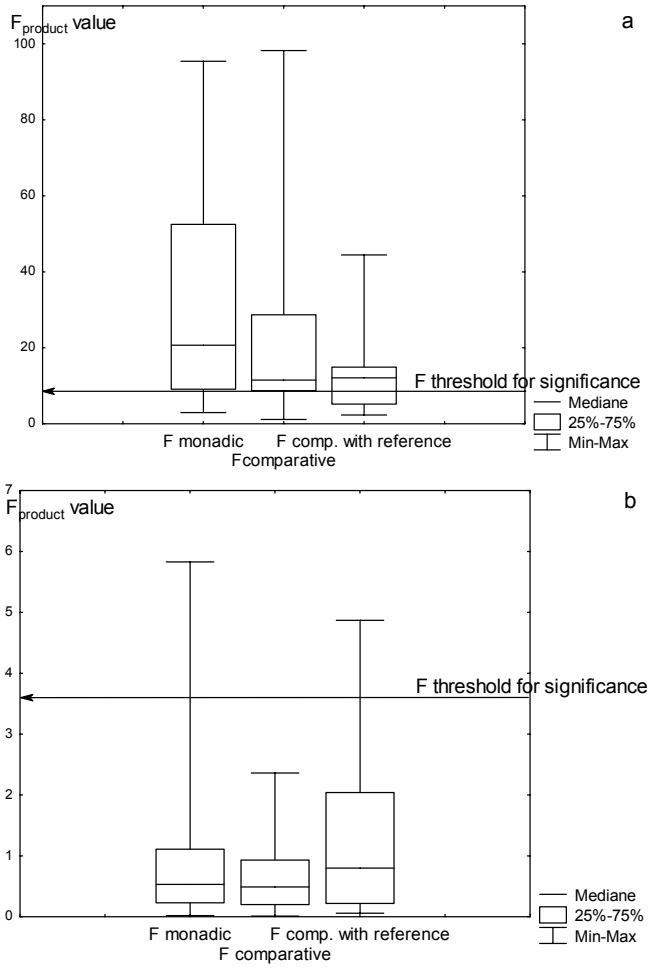


Figure P1-1: Box plots of the F-product values for texture (a) and olfactory (b) attributes for the different profiles. (F-limit is the threshold for significance).

Olfactory differences

The ANOVA on olfactory attributes showed different results as a function of the type of presentation modes (Table 4). The standard comparative profile seemed to be the least relevant for discriminating between the products according to their olfactory properties. No odor or aroma attribute showed significant differences between the products. In the monadic profile, the products only significantly differed on two olfactory attributes: the green odor and the overall odor intensity. In the comparative procedure with a reference, the products showed significant differences on five olfactory attributes: overall intensity of the odor, green odor, fruity aroma, kiwi aroma and pineapple aroma. Moreover, the mean-F value of the odor and aroma attributes obtained using the simultaneous presentation procedure with a reference was slightly higher (1.69) than the mean-F obtained with the monadic procedure (1.19) and the standard simultaneous procedure (0.64) (Figure 1b).

These results were confirmed by multivariate analyses (Table 5). As for the olfactory attributes, only one of them (overall odor intensity) could discriminate the three products (P<10%) in the monadic profile and none in the standard comparative profile. In the comparative profile with a reference, six of the aroma and odor attributes could together discriminate the three products (P<15%): pineapple aroma, green odor, fruity aroma, overall intensity of the aroma, peach aroma and vanillin aroma (listed in order of importance).

Monadic profile			*Comparative profile*	*Comparative profile with a reference*		
attributes	F	P	attributes	attributes	F	P
O-overall intensity	2.45	0.096	-	A-pineapple	4.42	0.016
				O-green	4.2	0.020
				A-fruity	2.01	0.143
				A-overall intensity	2.71	0.075
				A-peach	2.39	0.102
				A-vanillin	2	0.146

Table P1-5: List of the attributes selected by stepwise analyses for the three profile types from the olfactory attributes to discriminate the three yogurts.

Overall, and regardless of the type of sensory profile, the yogurts showed clear differences regarding the texture, but more subtle differences regarding the olfactory properties, which means that the protein ratio variation in the yogurts more strongly influenced the texture properties than the olfactory properties of the yogurts.

However, the three methods similarly highlighted the considerable texture differences between the yogurts and presented different aptitudes for distinguishing weak aroma and odor differences between the yogurts. The comparative profile with a reference appeared to be the most sensitive for discriminating the three flavored yogurts on the basis of their olfactory properties alone.

Panel performances

The results of the inter-session repeatability of the panel are presented in Table 6: the monadic profile and the comparative profile with a reference were the most repeatable profiles, and the standard comparative procedure the least. Concerning intra-session repeatability, the monadic profile was the least repeatable and the comparative procedure the most. The comparative profile with a reference was intermediate. The $F_{product*subject}$ value was used to evaluate the panel consensus. Panelists were globally homogeneous in their notation (Figure 2).

	Monadic profile	*Comparative profile*	*Comparative profile compared with a reference*
Number of significant attributes / 34	4	10	6
Inter-session repetition [1]	V-Granular O-Fruity M-Mouth-coating O-Lacteous	M-Unctuous O-Overall intensity O-Fruity O-Butter A-Lacteous A-Strawberry A-Kiwi A-Peach A-Solvant A-Butter	V-Granular V-Thick V-Ropy O-Overall intensity A-Animal M-Thick
Number of significant attributes / 34	8	1	4
Intra-session repetition [2]	V-Ropy O-Fruity O-Green N-Caramel A-Strawberry A-Green A-Animal T-Sweet	M-Unctuous	O-Overall intensity A-Strawberry A-Pineapple A-Mouth-coating

1: attributes for which the repetition factor and product*repetition interaction are significant (ANOVA, p<5%)
2: attributes for which there is a significant difference between the two intra-replicates of MPO t-test, p<5%).

Table P1-6: Sensory attributes for which there is not a good agreement between the panelists over the intra-session and inter-session repetitions.

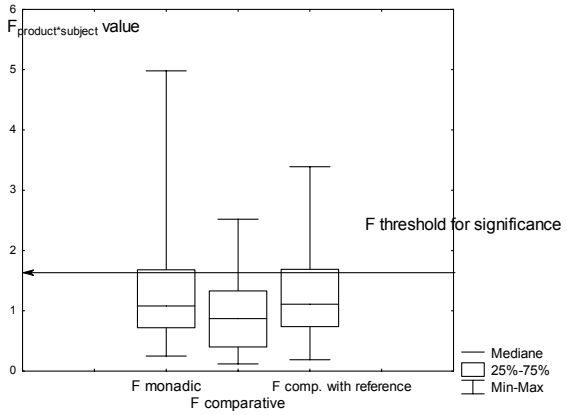


Figure P1-2: Consensus between panelists by representation of F-product*subject to box plot for the three profile types.

Influence of the protein ratio on the yogurt sensory properties

Since the comparative profile with a reference appeared to be the most sensitive procedure for distinguishing the subtle olfactory differences between the yogurts, this method was used to investigate the influence of the protein ratio on the texture and olfactory properties.

Influence of proteins on texture properties and complex viscosity of yogurts

The yogurts differing in their caseinate ratio presented clear differences in their texture properties. The yogurt with the highest caseinate ratio (CAS yogurt) was visually judged to be more granular, thicker and less shiny than the MPO yogurt. In the mouth, the CAS yogurt also appeared to be more granular, more astringent, less mouth-coating and less unctuous than MPO yogurt (Figure 3). The yogurt with the lowest caseinate ratio (WP yogurt) was visually perceived as being less thick and ropier, and less granular, less thick and less astringent in the mouth, than the MPO yogurt. The MPO yogurt visually appeared to be as shiny and granular as the WP yogurt, and somewhere in between in the case of the CAS and WP yogurts in relation to the thick and ropy properties. In the mouth, the MPO yogurt with the intermediate caseinate ratio was similar to the WP yogurt for the unctuous and mouth-coating properties, and almost similar to the CAS yogurt for the thickness.

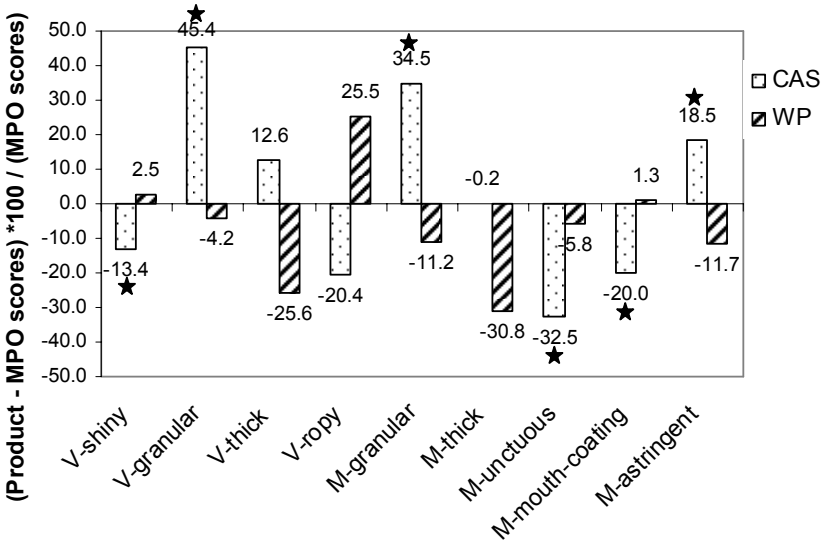


Figure P1-3: Percent of deviation between MPO yogurt and CAS yogurt or WP yogurt sensory intensities on the significant texture attributes by three-way ANOVA.
★: Significant differences between MPO and CAS or WP by Student's test ($P<0.05$).

Concerning the rheological measurements, the protein ratio had a strong effect on the complex viscosity of yogurt. At low shear stress, the yogurt with the highest caseinate ratio (CAS yogurt) had the highest complex viscosity (79.2 Pa.s (±9.7)). The WP yogurt was the least viscous (38.1 Pa.s (±4.4)) and the MPO yogurt was intermediate (52.7 Pa.s (±17.4)) (Figure 4).

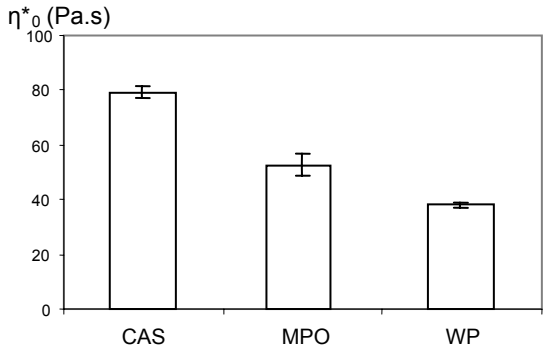


Figure P1-4: Complex viscosity and confidence intervals at low shear stress of 0.1Pa (η*0) shear stress of yogurts at 10°C.
Labels a, b, c indicate means that significantly differ at $p<0.05$ (SNK test)

Influence of proteins on olfactory properties and flavor release of yogurts

The results of the univariate analysis (Figure 5) showed how the olfactory properties of the strawberry flavoring of the yogurts are modified by the protein ratio in the dairy matrix. Concerning the olfactory properties (Figure 5), the overall odor intensity, green odor and fruity aroma were perceived as being more intense in WP yogurt than in MPO yogurt. On the contrary, the CAS yogurt was perceived as being less intense in fruity and kiwi aroma than the MPO yogurt. The MPO reference product was perceived as being more intense in pineapple aroma than WP yogurt and CAS yogurt.

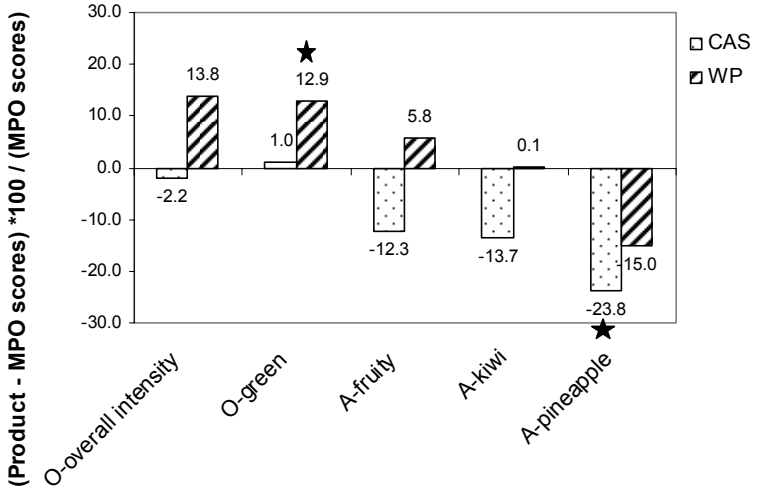


Figure P1-5: Percent of deviation between MPO yogurt and CAS yogurt or WP yogurt sensory intensities on the significant olfactory attributes by three-way ANOVA.
★: Significant differences between MPO yogurt and CAS or WP yogurts by Student test (<5%).

The multivariate analysis was performed on olfactory data for the comparative profile with a reference. Pineapple aroma, green odor, fruity aroma, overall intensity aroma, peach aroma and vanillin aroma together allowed a good discrimination of the three flavored yogurts (see Table 4). Three of these six attributes were the same as the one selected with the univariate approach. The three attributes that were not selected in the univariate analysis were the overall intensity aroma, the peach aroma and the vanillin aroma, which varied in the same way as the more global fruity aroma. The discriminant analysis carried out on these six attributes is illustrated in Figure 6 and gives a clearer picture of the olfactory characteristics that made it possible to distinguish the products in this olfactory perceptual space.

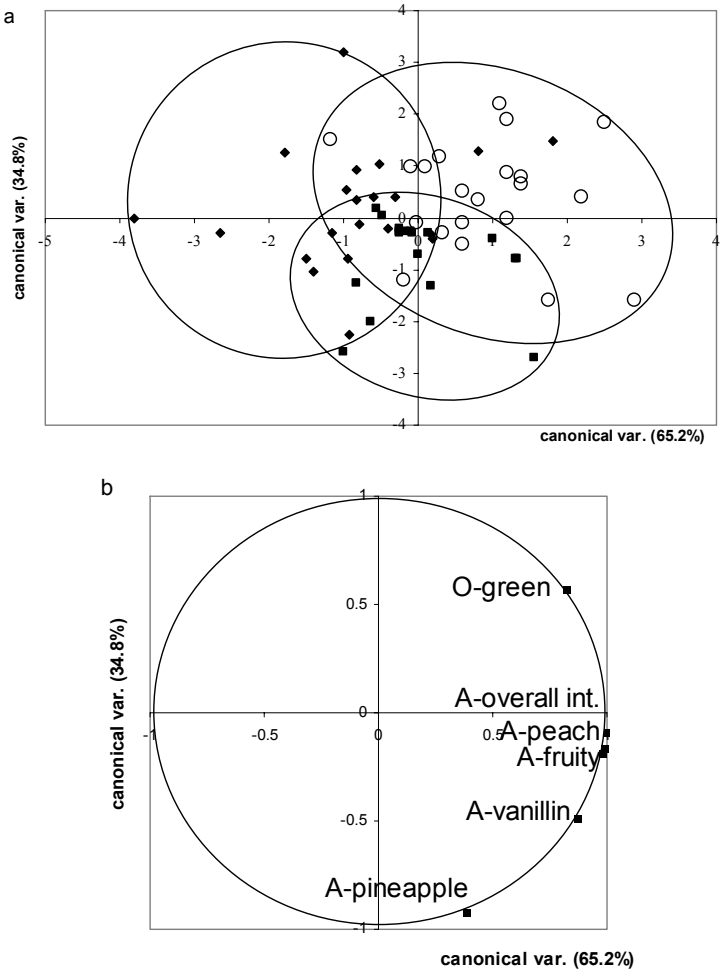


Figure P1-6: a-Product mapping of the factorial discriminant analysis with CAS yogurt (♦), MPO yogurt (■) and WP yogurt (o), b-Variables (six olfactory attributes) map, obtained with the comparative profile with a reference.

Concerning the aroma release measured by SPME, the release of only seven aroma compounds discriminated the three yogurts by one-way ANOVA ($p<0.05$), from among the 17 compounds of the strawberry aroma which were quantified: ethyl hexanoate, hexanal,

ethyl octanoate, methyl cinnamate, ethyl acetate, Z-3-hexenol and ethyl butyrate (Figure 7). As in sensory analysis, the results were compared to the reference product: MPO yogurt. CAS yogurt was characterized by a lower release of aroma compounds, except for Z-3-hexenol compared to the MPO yogurt. The WP yogurt presented the highest release, especially for ethyl octanoate. The release of ethyl butyrate and methyl cinnamate was higher in MPO yogurt than in CAS and WP yogurts. However, variations of aroma release were quite low between yogurts: about 10% to 30% of variations between CAS and MPO yogurts and less than 10% between WP and MPO yogurts.

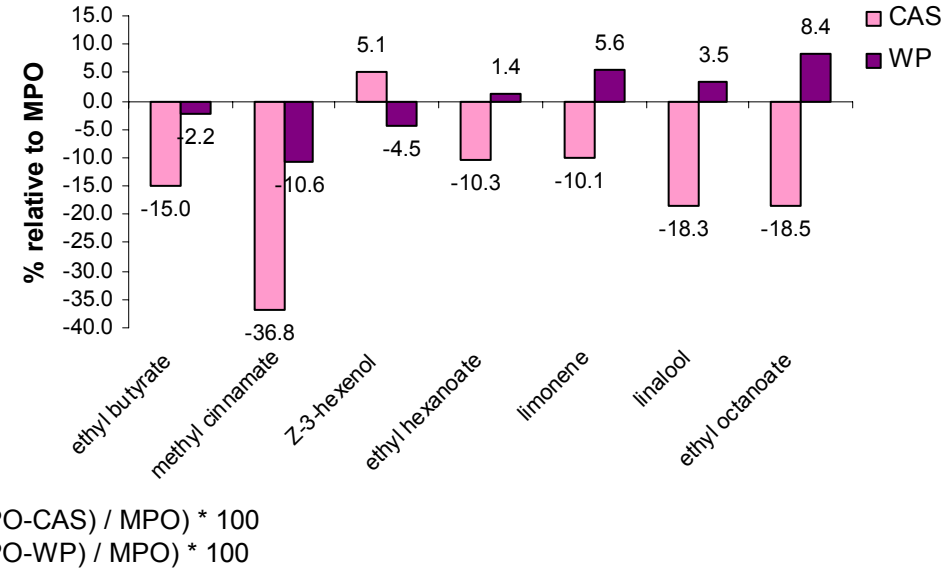


Figure P1-7: Percent of deviation of the significant aroma compounds by the SPME method (one-way ANOVA) between MPO yogurt and CAS or WP yogurts.

DISCUSSION

Yogurts differing in their protein ratio presented different texture characteristics: the increase of the caseinate ratio led to a thicker and more granular texture. This observation is in agreement with the rheological measurements carried out on studied yogurts and the observations reported by several authors in the literature: a lower viscosity was observed for a yogurt enriched with WP than for a yogurt enriched with MPO (Guzmán-González *et al.*, 1999, Guzmán-González *et al.*, 2000, Cho *et al.*, 1999). The fact that the yogurt with the highest caseinate ratio was the most granular corroborates the results of Tamime *et al.* (1984), who reported that yogurt enriched with sodium caseinate exhibits a coarse texture when visually assessed with a spoon, whereas yogurt enriched with milk powder is smoother. For

the authors, the difference is due to large casein particles and robust micellar chains observed in the microstructure of the yogurts fortified with sodium caseinate. This hypothesis about the heterogeneity of the microstructure could explain the granular properties of the CAS yogurt.

In our study, the type of protein also influenced the flavor properties of the yogurts. Yogurts enriched with caseinates were perceived as being less intense for a majority of olfactory notes, contrary to the yogurt with the lowest caseinate ratio. The SPME analysis showed a higher retention of the aroma compounds by the CAS yogurts than by the WP or the MPO yogurts. Physico-chemical bindings between the aroma compounds and the matrices could also explain these olfactory differences between the yogurts. The hypothesis of Hansen and Booker (1996) is in agreement with our results and could explain the higher olfactory intensity of WP yogurt. These authors observed that a protective effect occurs for citral in acid citric solutions when casein is present. They assumed that the sodium caseinate formed a more open micellar structure in solution with hydrophilic and hydrophobic patches, so there were fewer strong interactions within non-polar binding sites on β-lactoglobulin (Hansen and Booker, 1996). However, these results were not in agreement with those of Hansen and Heinis (1991, 1992), who found that the addition of whey protein to sucrose solutions (2.5%) flavored with vanillin, citral, benzaldehyde and d-limonene decreased the intensity of retronasal olfactory properties more than casein. The authors proposed different hypotheses to explain why solutions with a higher caseinate content were perceived as being more intense than the others. Structure and amino acid composition of the dairy proteins (caseinates and β-lactoglobulin) can explain the differences in flavor properties. Different types of physico-chemical interactions between milk proteins and aroma compounds could be at the reason. Vanillin, benzaldehyde and d-limonene may interact with the retinol-binding site or with other sites near the surface of the protein (β-lactoglobulin), resulting in decreased concentration of flavor compounds available for sensory properties by the panelist.

In the present study, the physico-chemical interactions between aroma compounds and proteins can explain the olfactory property differences observed between the yogurts in this study. Because the differences in flavor release were relatively low (a maximum of 30% variation of the aroma quantity between the yogurts), it would also be possible that the physico-chemical differences were not adequate to explain all the changes in the olfactory properties of the yogurts. Therefore, the role of sensory interactions must be taken into account. Indeed, interactions between texture and flavor perceptions could explain the differences between yogurts rather than the physico-chemical bindings (Paçi Kora *et al.*, 2004, Weel *et al.*, 2002). As reported by Paçi Kora *et al.* (2004), sensory analysis results (low

intensity in the green note of thickened yogurts) could not be explained by specific interactions between the thickening agent and hexanal (no effect on release under equilibrium and dynamic conditions). Thus, in the present study the sensory properties of yogurt flavor could also be influenced by a change in texture perception: the CAS yogurt was perceived as being thicker than the other yogurts and had a less intense odor and aroma. This could be the result of texture-aroma interactions linked to cognitive associations, as well as the result of different chewing behaviors adopted by the subjects when the texture of products is different.

The quantitative descriptive analysis of food products can be considered as one of the most complex sensory tasks (Stone and Sidel, 1993). Indeed, panelists have to analyze their perceptions when tasting the product, verbalize them and quantify them relative to the product sensory space under study (Lesschaeve and Issanchou, 1996). Yogurts were better discriminated by texture attributes than by olfactory attributes. This observation confirms the results of Lundgren *et al.* (1986), Pangborn *et al.* (1978), Wendin *et al.* (1997) and Paçi Kora *et al.* (2003). Texture differences between the products were probably more obvious and thus easier to evaluate. The limited capacity of the panelists to differentiate between products on the basis of olfactory attributes can first be explained by the difficulty of the task (Paçi Kora *et al.*, 2003). Indeed, the panelists were asked to evaluate each olfactory note separately, even if the aroma compound proportion and its concentration in the yogurts did not vary.
Concerning the type of procedure, the comparative procedure with a reference appeared to be the most sensitive for detecting slight olfactory differences between the products, and that is why it was selected. It could be assumed that panelists would be less tired with the comparative procedure with a reference than with a standard comparative profile, since the number of comparisons between the products is lower. In comparison to the monadic profile, the comparative profile is supposed to be an easier task, given that panelists can immediately apprehend the extent of the diversity of the product space in order to evaluate the intensity of each product. Moreover, in the monadic profile, the memory load required for the subjects is greater than in comparative profiles, because it includes the memory of the references and that of the products proposed during the training, at the same time. Moreover, the tasted product can be influenced by the evaluation of the previously tasted product. But, in our study, the panelists found that the two types of comparative profiles required more effort and were more difficult to perform than the monadic profile. We can explain this phenomenon by the double task required in standard comparative profiles: to evaluate the absolute intensity of each product and to compare it with the other products.

Moreover, in the comparative procedure, the panelists are more likely to get bored and tired if there are a large number of products and attributes to evaluate. In the present study, the order of presentation of the yogurts was arranged according to a Latin square, but not the attributes; consequently, for the attributes evaluated last in a sensory session, the panelists might be more tired and less sensitive. This is exactly what we observed regarding the inter-session repeatability of the attributes that were evaluated last (aromas) in our study. Moreover, the intra-session repeatability of the monadic profile was not as good as the one of the comparative profile. This might be because the evaluation of two identical products presented in the same time (MPO replicate) is easier than when they are evaluated one after the other. This result confirmed those of Mazzuchelli and Guinard (1998), who observed that the repeatability of the panel was better with the simultaneous presentation mode than with the monadic presentation mode.

In any case, the present study shows that the influence of the protein ratio on the olfactory properties is not easy to assess with complex products such as yogurts. Considering the methodological aspects of the sensory procedure, the comparative procedure with a reference appeared to be the most sensitive for the panelists to discriminate relatively similar products. This efficient and robust method could be useful for further sensory studies and particularly when there is a reference product.

Conclusions

This work demonstrates that the modifications of the protein ratio (caseinate to total protein) influenced the sensory properties of flavored stirred yogurts. To distinguish the olfactory property differences between the studied yogurts, the choice of a comparative procedure with a reference appeared to be the most efficient. Thus, the comparative profile with a reference appears to be a potentially useful procedure for discriminating relatively similar products.

Concerning the influence of proteins on sensory properties, the yogurts showed large differences of texture, whereas olfactory differences were smaller. There was a strong agreement between the rheological properties (complex viscosity) and texture attributes (thickness) of the yogurts. Moreover, the olfactory characteristics were in agreement with the release by the different yogurts of a majority of aroma compounds: the yogurt with a high caseinate ratio retained the majority of aroma compounds and was perceived as being less

intense than the two other yogurts. The reverse was observed for yogurt with a low caseinate ratio.

This study contributes to a better understanding of the impact of formulation on sensory properties. The variation of protein composition in dairy product formulation can generate a broad range of textures. However, the modification of flavor properties must be taken into account during flavoring. Further experiments are in progress to study the kinetics of release by matrices and to understand the mechanisms that govern sensory properties in flavored dairy complex matrices.

Acknowledgements:

This work was supported by the French government (CANAL-ARLE project). The authors gratefully acknowledge the scientific contribution of the participants. The authors are indebted to G. Wagman for revising the English version of the manuscript.

References:

Biosystèmes®. 1999. “Fizz: logiciel de gestion de l’analyse sensorielle et des tests consommateurs. Couternon, France.”.

Cho, Y.H., J.A. Lucey, and H. Singh. 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(8):537-545.

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

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

Hansen, H. and J.J. Heinis. 1991. Decrease of vanillin flavor perception in the presence of casein and whey proteins. J. Dairy Sci. 74:2936-2940.

Hansen, H. and J.J. Heinis. 1992. Benzaldehyde, citral and d-limonene flavor perception in the presence of casein and whey proteins. J. Dairy Sci. 75:1211-1215.

Hansen, A.P. and D.C. Booker. 1996. Flavour food interactions, ACS symposium series 633. Pages 75-89 in Flavor interactions with casein and whey protein. American Chemical Society, Washington, DC..

Hastie, R. and B. Park. 1986. The relationship between memory and judgment depends on whether the judgment task is memory based or on line. Psychological Rev. 93:258-268.

Kailasapathy, K. and D. Supriadi. 1998. Effect of partially replacing skim milk powder with whey protein concentrate on the sensory qualities of lactose hydrolysed acidophilus yoghurt. Milchwissenschaft 53:385-389.

Larson-Powers, N. and R.M. Pangborn. 1978. Paired comparison and time-intensity measurements of the sensory properties of beverages and gelatins containing sucrose or synthetic sweeteners. J. Food Sci. 43:41-46.

Lesschaeve, I. and S. Issanchou 1996. Could selection tests detect the future performance of descriptive panellists? Food Qual. Pref. 7(3-4): 177-183.

Lundgren, B., B. Lundgren, R.M. Pangborn, N. Daget, M. Yoshida, D.G. Laing, R.L. McBride, N. Griffiths, L. Hyvönen, F. Sauvageot, K. Paulu and N. Barylko-Pikielna. 1986.

An interlaboratory study of firmness, aroma, and taste of pectin gels. Lebensm. Wiss. Technol. 19:87-88.

Mazzucchelli, R. and J.X. Guinard. 1999. Comparison of monadic and simultaneous sample presentation modes in a descriptive analysis of milk chocolate. J. Sensory Stud. 14(2):235-248.

McBride, R.L. 1982. Range bias in sensory evaluation. J. Food Technol. 17:405-410.

McBride, R.L. 1986. Hedonic rating of food: single or side by side sample presentation? J. Sensory Stud. 21:355-363.

Meilgaard, M.C., G.V. Civille and B.T. Carr. 1991. Sensory evaluation techniques. Pages 188-199 in Descriptive analysis techniques. London, UK, CRC Press.

NF ISO 5492 (1995). Analyse sensorielle-Vocabulaire. In AFNOR (eds.), Contrôle de la qualité des produits alimentaires - Analyse sensorielle. Recueil de normes françaises, Paris. pp.27-51.

Paçi Kora, E., E. Latrille, I. Souchon and N. Martin. 2003. Texture-flavor interactions in low fat stirred yogurt : how mechanical treatment, thickener concentration and aroma concentration affect perceived texture and flavor. J. Sensory Stud. 18 (5):367-390.

Paçi Kora, E., I. Souchon, E. Latrille, N. Martin and M. Marin. 2004. Composition rather than viscosity modifies the aroma compound retention of flavored stirred yogurt. J. Agric. Food Chem. 52(10):3048-3056.

Pangborn, R.M., Z.M. Gibbs and C. Tassan. 1978. Effect of hydrocolloids on apparent viscosity and sensory properties of selected beverages. J. Texture Stud. 9:415-436.

Reiners, J., S. Nicklaus and E. Guichard. 2000. Interaction between b-lactoglobulin and flavour compounds of different chemical classes. Impact of the protein on the odour perception of vanillin and eugenol. Lait (80):347-360.

Saint-Eve, A., N. Martin and I. Souchon. 2005. How can protein ratio affect the physical properties and the aroma release of flavour stirred yogurt? J. Agric. Food Chem., submitted.

SAS®. User's Guide: Statistics. 1990. Version 9.1, Edition 2005. SAS Inst., Inc., Cary, NC.

Sodini, I., F. Remeuf, S. Haddad and G. Corrieu. 2004. The relative effect of milk base, starter, and process on yogurt texture: A review. Crit. Rev. Food Sci. Nutrition 44(2):113-137.

Stone, H. and J. Sidel. 1993. Sensory evaluation practices, second edition. Pages 202-242 in Descriptive analysis. Academic Press, Inc., London, United Kingdom.

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

Thirion, S., J.F. Martin, S. Rousset-Akri and C. Touraille. 1995. Comparaison de deux modes de présentation d'échantillons en analyse sensorielle. 4èmes journées agro-industrielles et méthodes statistiques, Dijon, 7-8 décembre 1995:127-134.

Weel, K., A. Boelrijk, A. Alting, P. Van Mil, J. Burger, H. Gruppen, A. Voragen and G. Smit. 2002. Flavor Release and Perception of Flavored Whey Protein Gels: Perception is Determined by Texture Rather than by Release. J. Agric. Food Chem. 50:5149-5155.

Wendin, K., R. Solheim, T. Allmere and L. Johanson. 1997. Flavour and texture in sourmilk affected by thickeners and fat content. Food Qual. Pref. 8(4): 281-291.

III.1.1.1.2 La viscosité complexe induite par des variations de la composition en protéines influence la libération des composés d'arôme de yaourts brassés aromatisés

Journal of Agricultural and Food Chemistry. "Complex viscosity induced by protein composition variations influences the aroma release of flavored stirred yogurt" A. Saint-Eve, A. Juteau, S. Atlan, N. Martin, and I. Souchon, 54: 3997-4004 (2006).

COMPLEX VISCOSITY INDUCED BY PROTEIN COMPOSITION VARIATION INFLUENCES THE AROMA RELEASE OF FLAVORED STIRRED YOGURT

Anne SAINT-EVE, Alexandre JUTEAU, Samuel ATLAN, Nathalie MARTIN and Isabelle SOUCHON*.

Unité Mixte de Recherche de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, Institut National Agronomique Paris-Grignon – Institut National de la Recherche Agronomique, 78850 Thiverval-Grignon, France.

* souchon@grignon.inra.fr

Phone number: +33 (0)1 30 81 54 86

Fax number: +33 (0)1 30 81 55 97

ABSTRACT.

Dairy protein composition is known to influence the structure and the texture characteristics of yogurts. The objective of the present work was therefore to investigate the impact of protein composition, at a constant protein level, on the physicochemical properties of 4%-fat flavored stirred yogurt, and more specifically, on the rheological properties, the microstructure and aroma release.

The results showed that caseinate-enriched yogurts generally presented changes in their microstructure network and had higher complex viscosity than whey protein-enriched yogurts. To a lesser extent, the release of the majority of aroma compounds was lower in caseinate-enriched yogurts. It was therefore possible to quantify physicochemical interactions between aroma compounds and proteins. The influence of gel structure on the flavor release was observed and was in agreement with sensory characteristics previously studied for these products (Saint-Eve, A.; Le´ vy, C.; Martin, N.; Souchon, I. Influence of proteins on the perception of flavored stirred yogurts. J. Dairy Sci. 2006, 89, 922-933.).

KEYWORDS.

Milk proteins, yogurt, microstructure, rheological properties, aroma release.

INTRODUCTION

Yogurt is a fermented milk product widely consumed around the world. Flavor and texture are essential aspects of the quality and the consumer acceptability of these products. One way to improve texture of yogurt consists to fortify the milk base. Addition of whey protein concentrate, sodium caseinate or milk powder is usually employed in yogurt manufacture. In a recent study, we showed that milk protein composition influences the sensory properties of 4%-fat flavored stirred yogurts (*1*). Indeed, the variation of yogurt protein composition generated large texture differences, and also some olfactory differences between the yogurts. In order to better understand and control the flavoring of yogurt and to adapt it to its structure and composition, it is necessary to identify and quantify the physicochemical properties responsible for the sensory stimuli. Improved knowledge of the influence of the structure and the composition on flavor release will provide a better understanding of the mechanisms that govern flavor release and perception. In the present study, we investigated the influence of protein composition on the microstructure, the rheological properties and the aroma release of stirred yogurts, in order to develop a better understanding of the determinants of texture and flavor perception variations in yogurts.

It is well known that type and content of milk proteins is of significant importance for the physical properties and the perceived texture of fermented products (*2, 3*). Microstructure studies of dairy products using Scanning Electron Microscopy (SEM) have revealed the structural modifications of the gel network when composition changes. Yogurts enriched with whey protein concentrate exhibit a structure with a very fine network, containing very small pores. In contrast, the addition of sodium caseinate to the milk base results in a rather coarse and loose structure (*4, 5, 6*). When considering the influence of the whey protein/casein concentration ratio on physical viscosity, data from the literature appear to be conflicting (*3*). Most of the authors observed that increasing the level of whey protein concentrate in yogurt results in greater gel strength (*5, 7*). On the contrary, other studies reported that at similar protein levels, the addition of caseinate instead of skim milk powder to the milk base strongly increases yogurt viscosity (*8, 9, 10, 11*). These observations can be explained by the nature of the interactions between denatured whey proteins and casein micelles achieved in the formation of the gel during acidification.

Moreover, variations of the structure and the composition of the food matrix (due to the nature of proteins) can be responsible for the modification of flavor retention. Proteins are

known to interact with the aroma compounds and often cause their volatility to decrease (*12*). Numerous studies have been conducted on the interaction between β-lactoglobulin and aroma compounds (*12, 13*). For example, β-lactoglobulin binds with esters, methyl ketones, alcohols and aldehydes, but not with methylpyrazine or shorts acids (*14, 15*). The most-probable binding site for these compounds is the hydrophobic pocket of β-lactoglobulin belonging to the family of the lipocalin protein (*12*). Contrary to β-lactoglobulin, the physicochemical interactions between aroma compounds and sodium caseinate were not as extensively studied.
Few studies have investigated the effect of yogurt structure on aroma release by adding a thickening agent. In low-fat flavored stirred yogurt, Paci Kora *et al.* (2004) and Nongonierma *et al.* (2006) showed a slight influence of composition (addition of a thickening agent) on aroma retention (*16, 17*). No study was previously made of the effect of protein composition on both structure and flavor release properties of a dairy complex matrix.
In this context, the aim of the present work was to investigate and to quantify the effect of protein composition on the physical properties and the aroma release of 4%-fat flavored stirred yogurts. In order to characterize its organization, the gel was examined at both the microscopic level (microstructure of the protein system) and the macroscopic level (rheological properties). The flavor release was quantified in yogurt by two methods. All results will be discussed in order to establish links between the structure of the gel and flavor release in order to develop a better understanding of yogurt perception (*1*).

MATERIAL AND METHODS

Yogurt manufacture

Three flavored stirred yogurts were studied. They had the same dry matter (22.5% w/w), fat (4% w/w) and protein (5.4% w/w) content (**Table 1**). Only a protein fraction used to fortify the premix varied: enrichment with sodium caseinate (CAS yogurt), enrichment with low heat skim milk powder (MPO yogurt) and enrichment with whey protein concentrate (WP yogurt). The MPO yogurt was considered as the reference product.

Ingredients (suppliers)	CAS yogurt	MPO yogurt	WP yogurt
Water (Volvic, Danone)	1 L	1 L	1 L
Skim milk powder (Ingredia)	100 g	135 g	100 g
Lactose (Ingredia)	21 g	-	21 g
Sodium caseinate (Ingredia)	14 g	-	-
Whey protein concentrate (80% w/w) (Ingredia)	-	-	14 g
Anhydrous milk fat (Lactalis)	40 g	40 g	40 g
Sugar (sucrose) (Daddy)	50 g	50 g	50 g
Protein total content	5.4%	5.4%	5.4%
Dry matter	22.50%	22.50%	22.50%

Table P2-1: Premix composition for preparation of the three yogurts.

The first stage of the manufacture of yogurts was the milk base reconstitution starting from the three different emulsions with a two-stage homogenizer (APV1000, APV, France). Each milk base was heated at 92°C for 5 minutes. The fermentation was carried out in a 7-L fermenter (SGi, France), thermostated at 44°C. The milk was inoculated with *Lactobacillus delbrueki* ss *bulgaricus* (LB18 incorporated in 0.005% vol/vol in milk), *Streptococcus thermophilus* (ST7 and ST143 in 0.01% vol/vol) provided by Chr Hansen (Arpajon, France). Fermentation was stopped when the pH reached 4.6 and the yogurts were pumped then stored at 4°C. After nine days of storage (corresponding to the age of yogurts for all the analyses), the yogurt pH was determined at 4°C with a pH meter (Mettler Toledo, France). This pH measurement is considered as one of the manufacturing checkpoints.

After one day of storage at 4°C, all the yogurts were flavored to 0.1% (w/w) with the strawberry flavor containing 17 aroma compounds mixed with propylene glycol (Aldrich, France). The flavoring step was performed with a food processor (Kenwood, USA) under controlled conditions (2 kg of yogurt per batch, 30 seconds, 2.5 power). Concentrations of aroma compounds ranged from 1.01 to 32.53 mg/kg of yogurt (**Table 2**). These concentrations corresponded to the ones used in the sensory study (*1*).

Aroma compounds	*Concentration in yogurt (mg/kg)*	*Log P 1 a*	*Henry's law constant*10^3 (dimensionless, 25°C)*
Butanoic acid	2.21	0,79	0.0394 a
Decanoic acid	1.11	4,09	1.7 a
Hexanoic acid	1.12	1,92	0.294 a
Z-3-hexenol	23.68	1,61	
Diacetyl	4.34	-1.34	0.547 b
Ethyl acetate	17.88	0,73	5.48 a
Ethyl butyrate	27.24	1,85	16.3 a
Ethyl hexanoate	22.44	2,83	29.5 c
Ethyl octanoate	1.14	3,81	65 a
4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	18.47	0,82	0.000349 a
g-decalactone	2.52	2,72	
Hexanal	1.01	1,78	8.61 d
Limonene	2.23	4,57	
Linalol	1.88	2,97	0.879 a
3-hydroxy-2-methyl-4H-Pyran-4-one	32.53	0,09	
Methyl cinnamate	2.2	2,62	1.05 a
Vanillin	15.72	1,21	0.000987 a

1: Log P = Log of the partition coefficient of the compound between water and octanol - calculated values.

a: EPI Estimation Programs Interface v3.10

b: (37)

c: (22)

d: (36)

Table P2-2: Aroma compound composition of strawberry aroma mixed with propylene glycol and their physicochemical properties.

Yogurt microstructure

Sample observations and photomicrography were performed with a Scanning Electron Microscope (SEM). After one week of storage at 4°C, three yogurt samples were taken with a 0.2 mL positive displacement microdispenser and prepared for scanning electron microscopy (SEM), according to the method adapted from Kalab (*18*). The yogurt samples were fixed for

at least 4 h in a glutaraldehyde solution (12.5% vol/vol). Samples were then rinsed five times for 15 min in ultra-filtered water. The samples were further dehydrated in a graded acetone series (500, 750 and 950 $mL.L^{-1}$) and then rinsed in anhydrous acetone. Dehydrated samples were dried by the critical point method under CO_2 with an Emscope CPD 750 apparatus (Ashford, Great Britain). The dehydrated cylinders of samples were stuck onto stubs with an epoxy resin (Araldites), and were then broken up with a scalpel in order to exhibit sample microstructure. A final 40-nm thick coating of gold–palladium was applied in a Polaron E 5100 coater (West Sussex, Great Britain). Sample observations and photomicrography were performed in a Hitachi S-3000N SEM (Tokyo, Japan) operating at a voltage of 4 kV. Six fields were observed for each sample.

Rheological properties

The rheological properties of yogurts were measured using a controlled-stress rheometer (model RS1, Haake, Germany), equipped with a cone and plate geometry (60 mm diameter, 2° angle and 117 µm gap). The measurement was controlled by RheoWin Pro software, version 2.84 (Haake, Germany). After gentle standardized mixing by three up and down movements of a spoon in the yogurt cup, the samples were deposited on the plate of the rheometer with a syringe (5 mL). Three replications were carried out with yogurt from the same cup. Measurements were made at 10°C. Three types of tests were conducted. The first one was a frequency sweep test. A constant stress (2 Pa) was imposed on the product at an increasing frequency (ω=0.1 to 100 rad/s) in order to describe the degree of organization of the yogurts. Measurements were verified to ensure that they were performed in the linear viscoelastic domain. The second test measured the complex viscosity by the stress sweep. A slope of constraints from 0.1 Pa to 100 Pa, with a frequency of 1 Hz, was exerted. For data treatment, only complex viscosity values at 0.1 and 50 Pa were used to discriminate the products. The correlation between constraints and perception was investigated. When evaluating texture with a spoon, a low shear rate is used. When evaluating texture in mouth, viscosity at higher constraints was used (*19, 20*). That is why 0.1Pa was choosen to be correlated to texture with a spoon and 50Pa to texture in mouth. The third test measured the flow curve of stirred yogurt by increasing the shear rate from 0 to 100 s-1 (upward curve), followed by decreasing the shear rate from 100 to 0 s-1 (downward curve). Three cycles were carried out with a time lag of 30 seconds between each loop. Before to perform the rheological measurements, the yogurt sample kept undisturbed in the gap during 3 minutes. The sample of yogurt changed for each type of test.

Release measurement using headspace analysis

All the release measurements were performed at 4°C, corresponding to the storage temperature of yogurt. No evolution of the yogurt matrix was observed at 4°C.

Determination of partition coefficients by Phase Ratio Variation method

Gas-to-matrix partition coefficients were determined at 4°C by Phase Ratio Variation (PRV) method (*21*). A partition coefficient is the ratio of the equilibrium concentrations between the aroma compounds in the gas phase and in the matrix. The Phase Ratio Variation method makes it possible to determine the partition coefficient without any external calibration. Comparison of the performances of different static headspace methods showed that the PRV method is the most suitable method to measure absolute volatilities in multicomponent systems (*22*).

The vials of 22.4 mL (Chromacol, France) were filled with different amounts of yogurt matrices: 0.05, 0.1, 0.5, 1 and 2 mL. The corresponding volume ratios (β) were 223.0, 111.0, 43.8, 21.4 and 10.2. All experiments were performed in triplicate to validate the repeatability of the measurements. When the equilibrium state was reached (after 12 h at 4°C), the vials were placed on a thermostated support at 4°C. A syringe was used to take 2 mL of headspace gas that was injected with an automatic headspace sampler CombiPal (CTC Analytics, Switzerland) into a gas chromatograph with a flame-ionization detector (GC-FID HP6890, Germany), heated at 250°C. Aroma compounds were transferred in a semi-capillary column of 30 m in length, with an internal diameter of 0.53 mm and a film thickness of 1 µm (BP20 Carbowax, Interchim, France). The carrier gas was helium at a flow rate of 8.6 mL/min. For the FID detector, H2 and air flow rates were 40 and 450 mL/min, respectively. The oven program was 37.5 min long: starting at 50°C, 4°C/min up to 70°C; 5°C/min up to 170°C; 8°C/min up to 220°C and 6 min at 220°C. A non-linear regression was applied in order to accurately determine the partition coefficients (*23*).

Determination of aroma compound release by Solid Phase Microextraction method

The analysis of the aroma compound release in the vapor phase above the yogurts was performed by SPME (solid-phase microextraction). The same gas chromatograph flame ionization detector used to determine partition coefficients was used. Headspace (HS) vials filled with 5 g/vial of product and previously stored overnight at 4°C were placed in the HS sample tray maintained at 4°C. The time to reach equilibrium between the SPME fiber (polydimethylsiloxane (PDMS) with a 100 µm film thickness) and the sampler headspace

ranged from one minute to four hours. During this equilibrium time, the vial was maintained under stirring at 4°C. After this time, aroma compounds were desorbed by inserting the fiber into the GC injector set at 250°C for 1 min. The operating conditions for GC-FID were similar to those of the PRV method. Results obtained from the SPME method were expressed as area units. Each headspace analysis was done in triplicate.

Data analyses

All data analyses were performed using the SAS software package, version 9.1 (*24*). The influence of protein composition on yogurt complex viscosity, partition coefficient and aroma compounds release was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) per product. When significant product differences were observed ($P<0.05$), product mean intensities were compared using the Student Newman Keuls (SNK) multiple comparison test.

RESULTS AND DISCUSSION

Protein composition influenced physical properties

Rheological properties

The viscoelastic properties of the yogurts were determined by frequency sweep tests. **Figure 1** shows the variations of the storage modulus G' and of the loss modulus G'' as a function of sweep frequency for the three yogurts. The G' value was higher than the G'' value over the frequency range and regardless of the yogurt. Moreover, the G' and G'' values increased slightly with the frequency. These results suggest that the products display the typical behavior of gelled structures (*25*). Moreover, CAS yogurt gave the highest G' values while WP yogurt had the lowest G' values. Varying the time scale of the applied deformation provides information about the nature of the bonds in the gel network (*26*). Regardless of the yogurt, the slopes of the curves were similar, suggesting that the overall nature of the bond in the gels did not vary greatly between the three yogurts.

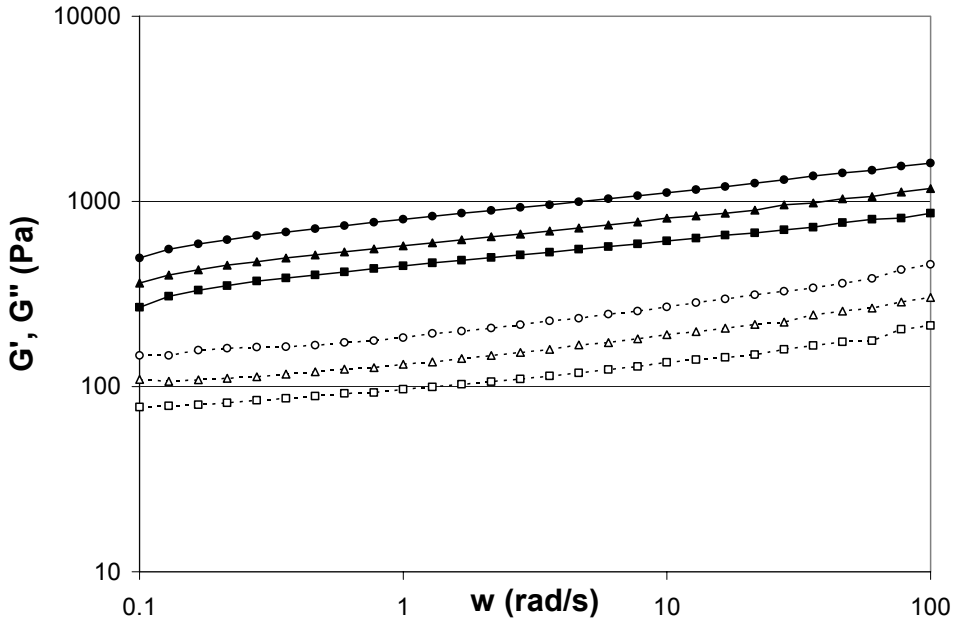


Figure P2-1: Storage modulus G' and loss modulus G'' of the three yogurts as a function of the angular speed.
● G' of CAS yogurt, ■ G'of MPO yogurt, ▲G' of WP yogurt
○ G'' of CAS yogurt, □ G''of MPO yogurt, Δ G'' of WP yogurt

Protein composition had a strong effect on the complex viscosity of yogurt. One-way ANOVA showed a significant influence of the protein composition on the complex viscosity at 0.1 Pa and 50 Pa. These results are presented in **Table 3**. At low shear stress (0.1 Pa), the yogurt fortified with caseinate (CAS yogurt) had the highest complex viscosity (η*=80 Pa.s). The WP yogurt was the least viscous (η*=40 Pa.s) and the MPO yogurt was intermediate (η*=60 Pa.s). These results at a shear stress of 0.1 Pa correspond to visual thickness of the yogurt with a spoon. At a value of 50 Pa, corresponding to yogurt under mastication conditions (*20*), the WP yogurt had a lower value for complex viscosity than MPO and CAS yogurts. However, these two products were not significantly discriminated.

	η^*_0 (Pa.s)		η^*_{50} (Pa.s)	
CAS yogurt	79.2 ± 9.7	a	2 ± 0.4	a
MPO yogurt	52.7 ± 17	b	1.6 ± 0.7	a
WP yogurt	38.1 ± 4.4	c	0.7 ± 0.4	b

Table P2-3: Complex viscosity (Pa.s) and confidence intervals at a low shear stress of 0.1Pa (η*0) and at 50Pa (η*50) shear stress of yogurts at 10°C.
The letters a, b and c indicate means that significantly differ at $p<0.05$ (SNK test)

These results were in agreement with numerous studies (*8, 9, 10, 5*). For Guzman-Gonzales *et al.* (*10*), an increase of the whey protein/casein ratio contributes to a decrease of yogurt

viscosity. Cho *et al.* (*9*) reported higher viscosities when enriching yogurts with skim milk powder rather than with whey protein. Moreover, at similar protein levels, the addition of caseinate instead of skim milk powder in the dairy mix strongly enhanced the yogurt viscosity. Modler and Kalab (*27*) supposed that yogurts enriched with caseinate exhibit a high degree of fusion of casein micelles, compared to yogurts stabilized with whey proteins. This micelle fusion effect could contribute to greater firmness.

However, Remeuf *et al.* (*6*) and Kailasapathy *et al.* (*7*) observed that yogurt enriched with whey protein had a higher viscosity than yogurt made with skim milk powder. This discrepancy between studies could be explained by variations in the whey protein preparation, which strongly influences the protein functionalities (*5*).

The flow curves of the different stirred yogurts are shown in **Figure 2**. For low shear rate values, the stirred yogurts enriched with caseinate had a higher shear stress (corresponding to the upward curve) than yogurts enriched with whey protein or milk powder. On the contrary, at high shear rate values, the shear stress of CAS yogurt was lower than the other two yogurts. Moreover, the area of the hysteresis loop of CAS yogurts between the up and down shear rate versus the shear rate curve was higher than those of MPO and WP yogurts. The area of the hysteresis loop represents the structural breakdown of stirred yogurt during shearing. The results can be interpreted as a greater increase in structure damage when yogurt was enriched with caseinates. Moreover, the WP yogurt was less resistant to low shear rate than the CAS yogurt, but was more stable when the shear rate increased.

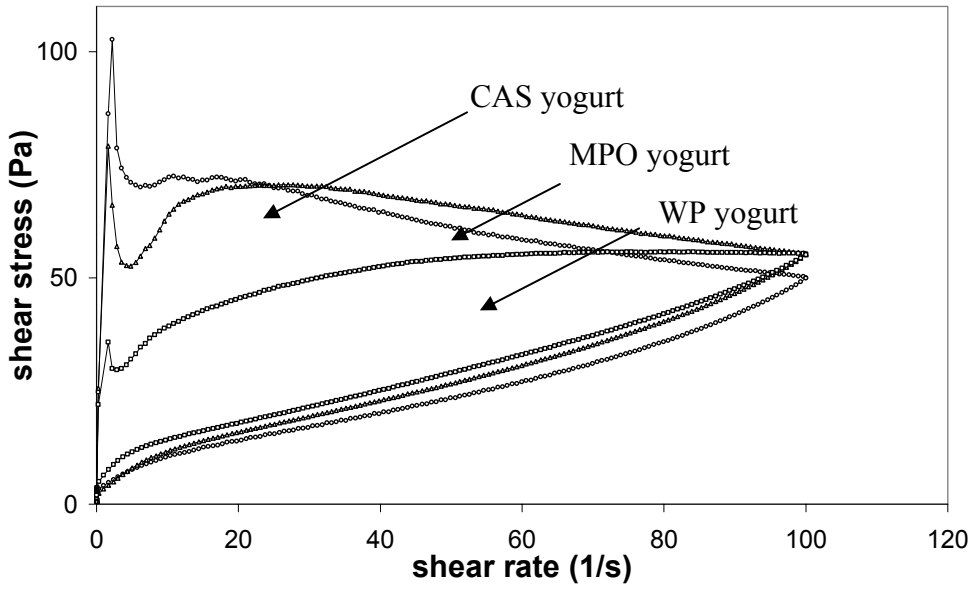


Figure P2-2: Shear stress as a function of increasing and decreasing shear rate for the three yogurts at 10°C: ○ CAS yogurt, □ MPO yogurt and Δ WP yogurt.

Microstructure

Scanning electron micrographs of the yogurts showed that protein composition led to differences in the organization of the gel network. As can be seen in **Figure 3**, a heterogeneous structure composed of large globular aggregates in a network forming large pores (sink zones) characterized the yogurt fortified with caseinates (CAS yogurt). When yogurts were enriched with whey protein, the protein network presented a more uniform distribution of the gel and smaller pores than CAS yogurt. Micrographs of MPO yogurt appeared to be in between those of the two others.

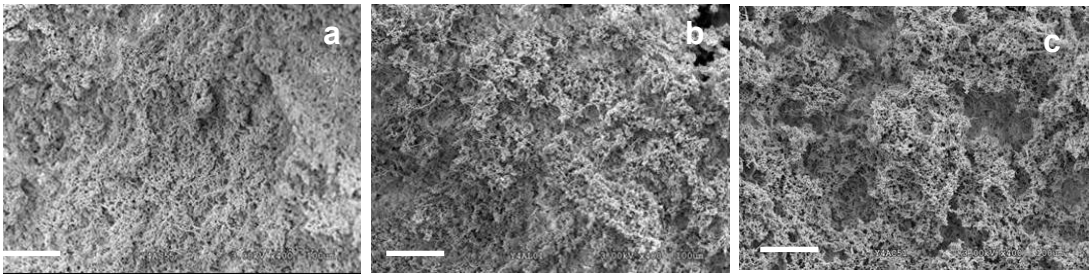


Figure P2-3: Microstructure of the three yogurts obtained from milk bases enriched with WP yogurt (a), MPO yogurt (b) and CAS yogurt (c) (white bar is 50µm).

These observations can be compared with those of several authors (*4, 27, 6, 5*). Remeuf *et al.* (*6*) observed irregular gel organization in yogurt fortified with MPO yogurt and CAS yogurt and a very fine network containing very small pores in WP yogurts. The protein network in the yogurt containing only skim milk powder induced a coarse texture with large globular aggregates. When yogurts were enriched with whey protein, the network became finer, the size of the aggregates became smaller, the network of cross-links denser and the pores smaller (*5*); these results corroborated those of the present study. Puvanenthiran *et al.* (*5*) reported that the addition of whey protein led to a structure where casein micelles appeared in the form of individual entities surrounded by finely flocculated protein and linked to very small whey protein aggregates. This structure might increase the number of bonds between particles and thus explain the dense and finely branched network in yogurt from whey protein-enriched milk base (*27*). We can suppose that when yogurts were enriched with caseinate, interactions between casein micelles were more likely. Yogurts fortified with casein preparations exhibited fusion of casein micelles. This would be indicative of a lower degree of interaction

between whey protein and casein micelles, possibly leading to the coarse network of the CAS yogurt, contrary to WP yogurt.

Some relationship between yogurt microstructure and complex viscosity can be deduced. As reported by Modler and Kalab (*27*) and Remeuf *et al.* (*6*), micelle fusion is influenced by the whey protein / casein ratio. Our results suggest that the homogeneous microstructure observed in WP yogurt was characterized by a low complex viscosity and a heterogeneous structure due to an enrichment in caseinate by a high viscosity. These results are in agreement with the texture perception (thickness and granuleous intensities) of the three yogurts (*1*). Yogurts differing in their protein composition presented different texture characteristics: the enrichment of yogurt with caseinate led to a thicker and more granular texture. This observation is in agreement with the rheological measurements carried out on studied yogurts and the heterogeneity of the microstructure could explain the granular properties of the CAS yogurt. Thus, scanning electron microscopy and rheological measurements can provide a better assessment of structure and texture of milk products.

Protein composition influenced aroma release

Air/yogurt partition coefficients of aroma compounds

In the present study, the PRV method made it possible to detect and quantify eight partition coefficients of aroma compounds among the 17 of the strawberry aroma at 4°C in the WP yogurt, and six in MPO yogurt and CAS yogurt (**Table 4**). Only a limited number of molecules could be studied by the PRV method given that aroma compounds were studied at low concentration (sensory concentration), low temperature (4°C) and low volatility for several of them (for example: vanillin or maltol). Thus, many aroma compounds could not be detected and quantified by this method. Nevertheless, the eight quantified aroma compounds presented a wide range of hydrophobicity (log P varying from -1.34 for diacetyl to 4.57 for limonene). They were mainly hydrophobic and were among the most volatile of the strawberry aroma (data in water at 25°C). Thus, the presence of fat in yogurts reduced their aroma volatility (*30*).

	$K_{i,\ gas/matrix}$ ($\times 10^3$)					
	CAS yogurt [ ]*		**MPO yogurt [ ]***		**WP yogurt [ ]***	
decanoic acid					**1.14**	[0.25-5.22]
diacetyle	**4.18**	[1.16-15.13]	**9.97**	[6.12-16.25]	**11.88**	[6.97-20.25]
ethyl acetate	**20.7**	[18.9-22.7]	**20.7**	[16.4-26.2]	**22.9**	[20.9-25.1]
ethyl butyrate	**20.7 (b)**	[19.3-22.2]	**21.8 (b)**	[19.5-24.3]	**25.7 (a)**	[24.1-27.4]
ethyl hexanoate	**4.29 (b)**	[3.26-5.65]	**5.42 (ab)**	[4.38-6.71]	**6.67 (a)**	[6.23-7.14]
hexanal	**4.28**	[1.97-9.28]	**9.28**	[5.06-17.04]	**8.79**	[6.86-11.26]
limonene					**4.85**	[2.86-8.21]
Z-3-hexenol	**1.82**	[1.09-3.02]	**1.51**	[0.58-3.95]	**1.02**	[0.37-2.81]

Table P2-4: Partition coefficients of aroma compounds for the three yogurts at 4°C.
The letters a and b indicate means that significantly differ at $p<0.05$ (SNK test)
* [ ]: confidence interval

Measured partition coefficients over yogurt at 4°C ranged from $1.02*10^{-4}$ for Z-3-hexenol to $2.57*10^{-3}$ for ethyl butyrate (**Table 4**) and were on the same order of magnitude for the three yogurts. The volatility of the aroma compounds in the dairy matrix is influenced by their physicochemical properties and by their interactions with product ingredients (fat, proteins, carbohydrates) (*12*). Hydrophilic compounds (diacetyl and ethyl acetate), which presented low log P values, were more volatile in yogurt at 4°C than in water at 25°C (**Tables 2 and 4**). Even if the temperature was lower in yogurt than in water, the highest partition coefficient was obtained in yogurt and could be explained by the low affinity of diacetyl and ethyl acetate for anhydrous milk fat, leading to an increase of volatility. Ethyl hexanoate, which is one of the most hydrophobic aroma compounds of the strawberry flavor, showed a reverse behaviour with a lower volatility in yogurt at 4°C than in water at 25°C due to the additional effect of fat and temperature (**Table 4**).

Two aroma compounds showed a significant product effect by one-way ANOVA, used to discriminate the three yogurts by their protein composition (**Table 4**): ethyl butyrate and ethyl hexanoate ($p<0.05$). These two aroma compounds were among the most volatile of the series studied. The retention of these two aroma compounds in WP yogurt was lower than in CAS and MPO yogurts. Moreover, whereas retention of these two esters was higher in CAS yogurt, the CAS and MPO yogurts were not significantly discriminated. The partition coefficients

were approximately 20 and 35% higher in WP yogurt than in MPO and CAS yogurts, respectively.

Concerning the other aroma compounds, a similar trend was observed but was not significant, probably due to the relative high variability of the measurements as a result of unfavorable experimental conditions (low temperature, complex matrices and low concentrations). Meanwhile, the release of diacetyl, ethyl acetate and hexanal was higher in WP yogurts than in CAS yogurts. The release over MPO yogurt was intermediate.

A reverse trend can be observed for Z-3-hexenol alcohol. Its partition coefficient was higher in CAS yogurt and lower in WP yogurt.

Except for Z-3-hexenol, partition coefficient results suggested that the majority of aroma compounds detected by the static headspace method had a greater affinity for sodium caseinate than for whey protein.

Little data are available concerning the comparison of aroma compound retention by mixed caseinate and whey protein. The large majority of studies concern the effect of the protein alone. Jouenne and Crouzet (*31*) have shown a strong interaction of limonene with β-lactoglobulin by apparent binding constants and interaction between β-lactoglobulin and aldehydes. Ketones are reversibly bound to whey protein through hydrophobic interactions and hydrogen binding (*32*). Esters (terpenyl acetate, ethyl hexanoate) also bind the hydrophobic core of β-lactoglobulin (*31, 33*). In the present study, no effect of protein composition was found for ethyl acetate. This result was already observed by Pelletier *et al.* (*14*), who found that most of the esters studied interact with β-lactoglobulin, except ethyl acetate. Moreover, concerning the binding of aroma compounds with caseinate, Landy *et al.* (*34*) showed that ethyl acetate does not interact with sodium caseinate in an aqueous medium, confirming our results. On the other hand, Farès *et al.* (*35*) reported the formation of a strong bond between diacetyl and sodium caseinate, contrary to ethyl acetate which interacts with the protein through weak (hydrogen) binding.

The PRV method did not make it possible to detect all the aroma compounds of the strawberry flavor under the experimental conditions of the present study. In order to investigate the impact of the protein composition on the release of all of the aroma compounds, it was necessary to use and develop another headspace methodology.

Quantification of aroma compound release in the headspace by the SPME method

The SPME method was used to detect and quantify all the aroma compounds of the strawberry aroma in the vapor phase above the yogurts. The extraction abilities of the SPME

fibers were much greater than the traditional static headspace method: the 17 aroma compounds were detected and quantified.

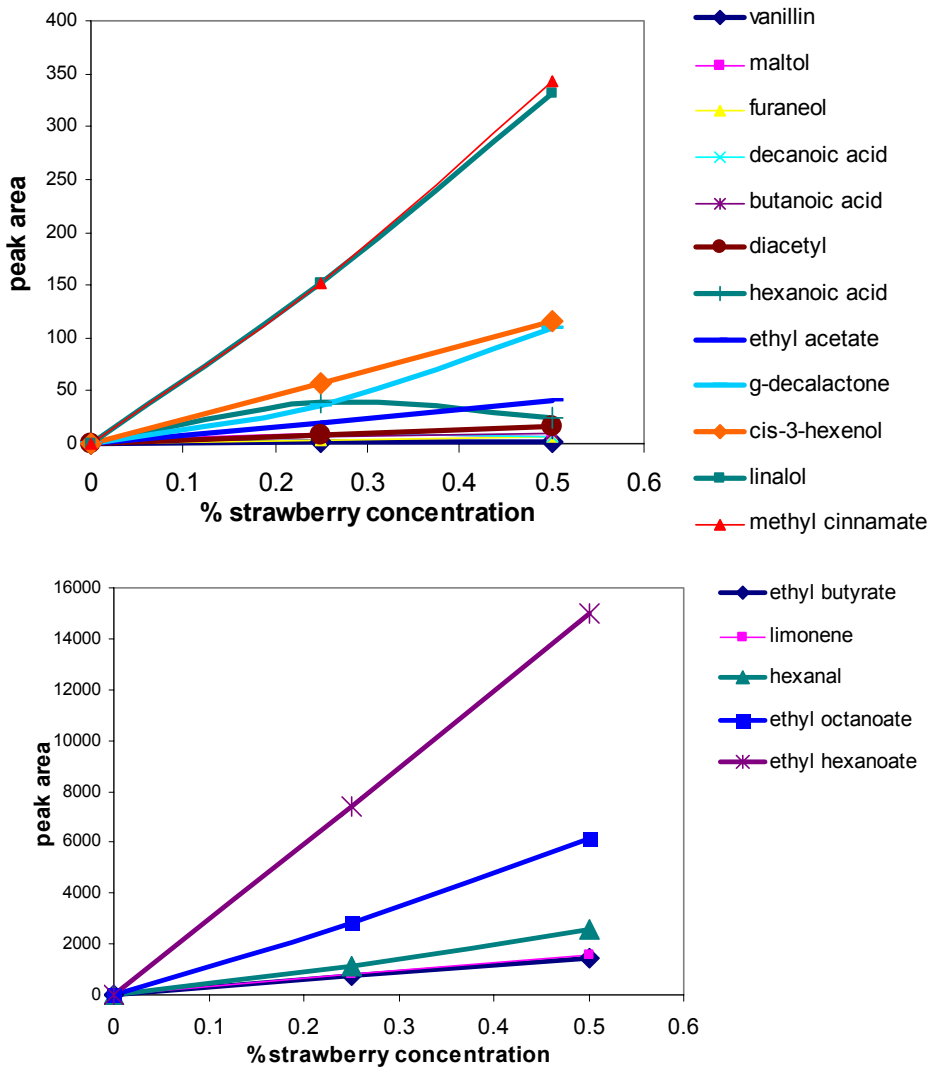


Figure P2-4: Proportionality between the aroma compound concentration and the FID response with a PDMS fiber.

Many precautions were taken before using SPME for the analysis of aroma release. Reproducibility between fibers was tested. The linear range of detection of the aroma compounds was controlled except for hexanoic acid (**Figure 4**). For a large majority of aroma compounds (16/17), no competition effect on the fiber was detected. Only the hexanoic acid release quantity was not linear when the concentration increased. Different equilibrium times (from 1 minute to 4 hours) were investigated (**Figure 5**) in order to quantify the release of aroma compounds but not the kinetic parameter of mass transfer. The time to reach the equilibrium was determined for each aroma compound: 10 minutes for ethyl octanoate and up

to 2 hours for hexanoic acid. Nevertheless, peak areas of a majority of the aroma compounds remain stable for 1 to 2 hours, except for some of the most hydrophilic aroma compounds of the flavor used in this study (ethyl acetate, butanoic acid). Only diacetyl decreased slightly over time, it could be due to an instability or a weak competition effect. Thus, 2 hours was the chosen equilibration time.

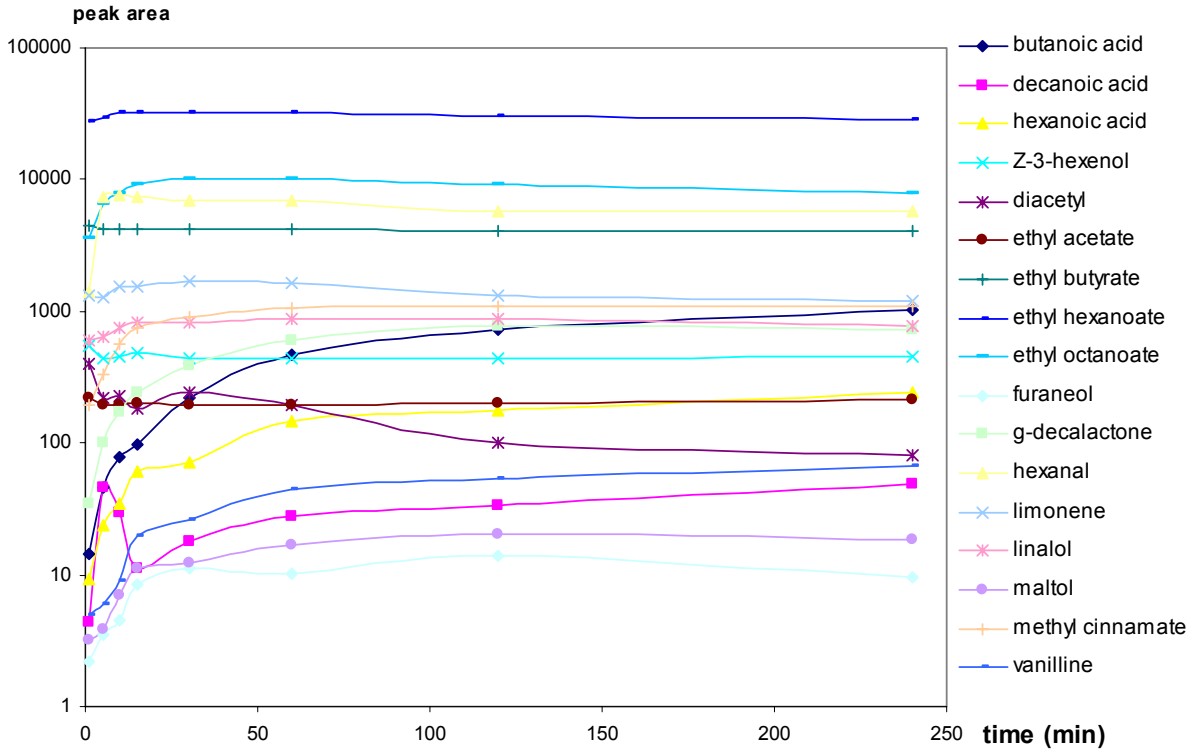


Figure P2-5: Stabilization time at 37°C of aroma compounds between the PDMS fiber and the headspace phase in yogurt MPO.

Seven aroma compounds could significantly discriminate the three products by one-way ANOVA ($p<0.05$): ethyl hexanoate, hexanal, ethyl octanoate, methyl cinnamate, ethyl acetate and Z-3-hexenol and ethyl butyrate (**Figure 6**). CAS yogurt was characterized by a low release of aroma compounds, except for Z-3-hexenol. The aroma compound release of WP and MPO yogurts was higher than for CAS yogurt. Differences between WP and MPO yogurts were observed: the release of ethyl octanoate was higher for WP yogurt than for MPO yogurt and the contrary was observed for methyl cinnamate. However, variations of aroma release were quite low between yogurts: about 10% to 30% of variations between CAS and MPO yogurts and less than 10% between WP and MPO yogurts.

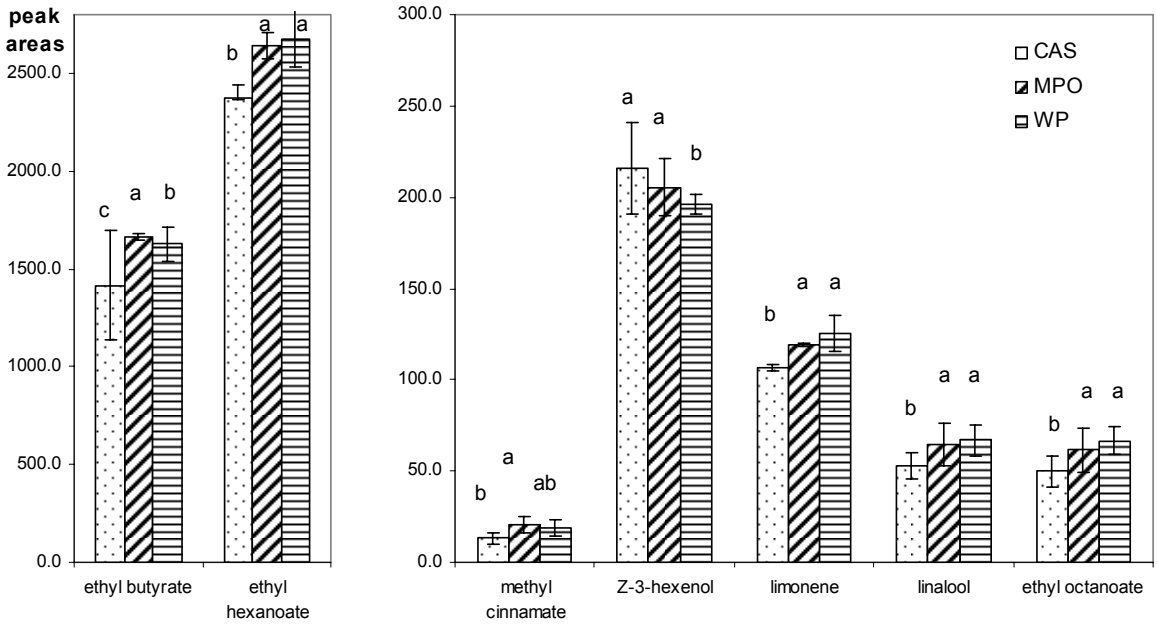


Figure P2-6: Flavor release (peak areas) from the three yogurts (CAS, MPO and WP yogurts) for the significant aroma compounds (seven on the 17 of the studied strawberry flavor) determined by the headspace SPME method.
The letters a, b and c indicate means that significantly differ at $p<0.05$ (SNK test)

Results similar to those obtained using the PRV method were observed, but the results were significantly confirmed on a greater number of aroma compounds. As was previously shown, only Z-3-hexenol presented a different behavior. The alcoholic function and the low hydrophobicity of this compound might explain a more specific interaction with whey protein than with caseinate.

Both methods (PRV and SPME) were complementary. The PRV method gave absolute values of partition coefficients but only two aroma compounds could significantly discriminate the products studied under our conditions. The SPME method only provided a comparison between the yogurts by relative variations, but the extraction by a fiber resulted in a greater degree of sensitivity than conventional static headspace analysis. Indeed, seven aroma compounds could significantly discriminate the yogurts by their protein composition variation.

Moreover, it was shown in a previous study, that the type of protein influenced the olfactory properties of the yogurts (*1*). Yogurts enriched with caseinates were perceived as being less intense for a majority of olfactory notes, contrary to yogurts enriched with whey protein. Thus, physicochemical bindings between the aroma compounds and the matrices were in agreement with the olfactory differences between the yogurts.

This work demonstrates that the protein composition influenced the physicochemical properties of flavored stirred yogurts. Slight differences in protein composition induced large differences of microstructure and rheological behavior (yogurt enriched with caseinate had a complex viscosity 100% higher than yogurt enriched with whey protein), and smaller differences in aroma release (yogurt enriched with caseinate had a aroma release in static conditions 30% lower than yogurt enriched with whey protein). Thus, the physicochemical characteristics (structural organization and flavor release) can contribute to explain the variation in yogurt texture and olfactory perception.

From a methodological point of view, the SPME method was a more sensitive method for a relative quantification of aroma compound release from a real food matrix, even at low concentrations.

This study contributes to a better understanding of the impact of formulation of a complex dairy product by focusing on the structure properties and the flavor release characteristics at the same time. Different hypotheses can explain the relationship between the microstructure of the product and the behavior of the aroma compounds. It was observed that the release of the aroma compound was lower in CAS yogurt than in WP yogurt. On one hand, the physicochemical interactions between aroma compounds and proteins can determine the flavor release in yogurt. On the other hand, the heterogeneous network with large pores of CAS yogurt might constitute a more effective barrier for the aroma compounds transfer in static conditions than the homogeneous network of WP yogurt.

These physicochemical results (aroma release and physical properties) are in agreement with the sensory properties (texture and flavor) shown in an earlier study (*1*). Further experiments are in progress to study the impact of protein composition and mechanical treatment on the dynamic aroma release parameters (diffusion coefficients in the yogurts) and to investigate the real time release of flavor and sensory perception during yogurt consumption.

ACKNOWLEDGMENT.

This work was supported by the French government (CANAL-ARLE project). The authors gratefully acknowledge the scientific contribution of the participants. We would also like to thank J.P. Tissier (LGPTA Lille) for microstructure analyses of the matrices. The authors are indebted to G. Wagman for revising the English version of the manuscript.

LITERATURE CITED.

(1) Saint-Eve, A., Lévy, C., Martin, N., Souchon, I. Influence of proteins on the perception of flavored stirred yogurts. *J Dairy Sci*. **2006,** 89:922-933.

(2) Tamime, A.Y., Muir D.D., Shenana M.E., Kalab M., Dawood A.H. Processed cheese analogues incorporating fat-substitutes - 2. Rheology, sensory perception of texture and microstructure. *Lebensmittel Wissenschaft & Technologie*. **1999,** 32,(1): p. 50-59.

(3) Sodini, I., Remeuf, F., Haddad, S., Corrieu, G. The relative effect of milk base, starter, and process on yogurt texture: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*. **2004,** 44,(2): p. 113-137.

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

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

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

(7) Kailasapathy, K., Supriadi, D. Effect of partially replacing skim milk powder with whey protein concentrate on the sensory qualities of lactose hydrolysed acidophilus yoghurt. *Milchwissenschaft*. **1998,** 53: p. 385-389.

(8) Guinee, T.P., Mullins, C.G., Reville, W.J., Cotter, M.P. Physical properties of stirred-curd unsweetened yoghurts stabilised with different dairy ingredients. *Milchwissenschaft*. **1995,** 50,(4): p. 196-200.

(9) Cho, Y.H., Lucey, J.A., Singh, H. 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.*. **1999,** 9,(8): p. 537-545.

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

(11) Patocka, G., Cervenkova, R., Jelen, P. Textural effects of soluble whey protein isolate in stirred yogurt. *Milchwissenschaft*. **2004,** 59,(1-2): p. 37-40.

(12) Guichard, E. Interactions between flavor compounds and food ingredients and their influence on flavor perception. *Food Rev. Int*. **2002,** 18,(1): p. 49-70.
(13) Hansen, A.P., Booker D.C. *Flavor interaction with casein and whey protein*, ed. F.-f.i.A.s.s. 633. 1996: Amer. Chemical Soc., 1155 Sixteenth ST NW Washington, DC 20036. 75-89.
(14) Pelletier, E., Sostman, K., Guichard, E. Measurement of interactions between β-lactoglobuline and flavor compounds (esters, acids and pyrazines) by Affinity and Exclusion Size Chromatography. *J. Agric.Food Chem.*. **1998,** 46: p. 1506-1509.
(15) Sostmann, K., Guichard, E. Immobilized β-lactoglobuline on a HPLC-column: a rapid way to determine protein-flavor interractions. *Food Chem.*. **1998,** 62,(4): p. 509-513.
(16) Paçi Kora, E., Souchon, I., Latrille, E., Martin, N., Marin, M. Composition rather than viscosity modifies the aroma compound retention of flavored stirred yogurt. *J. Agric.Food Chem*. **2004,** 52,(10): p. 3048-3056.
(17) Nongonierma, A., Springett, M., Le Quere, J.L., Cayot, P., Voilley, A. Flavour release at gas/matrix interfaces of stirred yoghurt models. *Int. Dairy J.*. **2006,** 16: p. 102-110.
(18) Kalab, M. Electron microscopy of milk products: a review of techniques. *Scanning Electron Microscopy*. **1981,** 3: p. 453-472.
(19) Shama, F., Sherman, P. Identification of stimuli controlling the sensory evaluation of viscosity. *J. Texture Stud*. **1973,** 4: p. 111-118.
(20) Skriver, A., Holstborg, J., Qvist, K. Relation between texture analysis and rheological properties of stirred yogurt. *J. Dairy Res.* **1999**, 66: 609-618.
(21) Ettre, L.S., Welter, C., Kolb, B. Determination of gas-liquid partition coefficients by automatic equilibrium headspace - gas chromatography utilizing the Phase Ratio Variation method. *Chromatographia*. **1993,** 35,(1/2): p. 73-84.
(22) Athès, V., Pena y Lillo, M., Bernard, C., Perez, R., Souchon, I. Comparison of experimental methods for measuring infinite dilution volatilities of aroma compounds in water / ethanol mixtures. *J. Agric.Food Chem.* **2004,** 52: p. 2021-2027.
(23) Atlan, S., Trelea, C., Saint-Eve, A., Souchon, I., Latrille, E. Processing gas chromatographic data and confidence interval calculation for partition coefficients determined by the Phase Ratio Variation (PRV) method. *J. Chromatography A.* **2006**, 1110:146-155.
(24) SAS® User's Guide: Statistics. 1990, SAS Inst., Inc., Cary, NC.
(25) Clark, A.H., Ross-Murphy S.B. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Advances in Polymer Science*. **1987,** 83: p. 57-192.

(26) Van Vliet, T., Van Dijk, H., Zoon, P. Walstra, P. Relation between syneresis and rheological properties of particle gels. *Colloid and Polymer Science*. **1991,** 269: p. 620-627.
(27) Modler, H.W., Kalab, M. Microstructure of yogurt stabilized with milk proteins. *J. Dairy Sc.*. **1983,** 66: p. 430-437.
(28) Teggatz, J.A., Morris, H.A. Changes in the rheology and microstructures of ropy yogurt during shearing. *Food Structure*. **1990,** 9: p. 133-138.
(29) Rohm, H., Kovac, A. Effect of starter cultures on linear viscoelastic and physical properties of yoghurt gels. *Journal of Texture Studies*. **1994,** 25: p. 311-329.
(30) De Roos, K.B. How lipids influence food flavor. *FOOD TECHNOLOGY*. **1997,** 51,(1): p. 60-62.
(31) Jouenne, E., Crouzet, J. Effect of pH on retention of aroma compounds by beta-lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2000,** 48,(4): p. 1273-1277.
(32) O'Neill, T.E., Kinsella, E. Binding of alkanone flavors to β-lactoglobulin: effects of conformational and chemical modification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1987,** 35: p. 770-774.
(33) Charles, M., Bernal, B., Guichard, E. *Interactions of β-lactoglobulin with flavor compounds*, in *Flavor science: Recent developpement*, A.J. Taylor and D.S. Mottram, Editors. 1996, The Royal Society of Chemistry: Cambridge. p. 433-436.
(34) Landy, P., Druaux, C., Voilley, A. Retention of aroma compounds by proteins in aqueous solutions. *Food Chemistry*. **1995,** 54,(4): p. 387-392.
(35) Farès, K., Landy, P., Guilard, R., Voilley, A. Physicochemical interactions between aroma compounds and milk proteins: effect of water and protein modification. *Jounal of Dairy Science*. **1998,** 81: p. 82-91.
(36) Buttery, R., Ling, L., Guadagni, D. Volatilities of aldehydes, ketones and esters in dilute water solutions. *J. Agric. Food Chem.* **1969**, 17: 385-389.
(37) Voutsas, E., Andreou, C., Theodorou, D., Tassios, D. Prediction of inficnite dilution volatilities of aroma compounds in water. *J. Food Sci*. **2001**, 66: 447-452.

III.1.1.1.3 Conclusion sur l'effet de la composition en protéines des yaourts MT-

Cette première partie de l'étude a permis de mettre en évidence le rôle de la structure et des propriétés rhéologiques sur la libération des composés d'arôme en conditions statiques et sur les propriétés sensorielles de yaourts MT- de composition en protéines variable.

La composition en protéine dans les yaourts à faible traitement mécanique influence principalement les propriétés sensorielles de texture. Les différences de texture entre les trois yaourts sont expliquées par les propriétés rhéologiques et les caractéristiques de microstructure du réseau protéique.

Cette étude a aussi montré que la composition en protéines influence les perceptions olfactives entre les yaourts de composition variable en protéines. L'intensité aromatique globale et les notes fruitées sont perçues plus intenses dans un yaourt enrichi en protéines sériques que dans un yaourt enrichi en caséinate. Ces résultats sont en accord avec les données de libération des composés d'arôme par les matrices en conditions statiques. En effet, une plus forte libération de la majorité des composés d'arôme de la formule fraise apparaît dans les yaourts enrichis en protéines sériques que dans les matrices enrichies en caséinate. La perception olfactive est donc, en partie, expliquée par les interactions physicochimiques entre les composés d'arôme et les protéines.

Cette partie montre ainsi l'effet de la composition en protéines pour un niveau de viscosité élevée. Afin de mieux comprendre l'effet de la composition lié à l'effet de la structure sur la perception et la libération des composés d'arôme, il est intéressant d'étudier l'effet de cette composition en protéines à un autre niveau de viscosité. Pour cela, un niveau élevé de traitement mécanique a été appliqué aux yaourts.

III.1.1.2 Effet de la composition en protéines sur les propriétés sensorielles et les caractéristiques physicochimiques des yaourts à fort traitement mécanique

III.1.1.2.1 Propriétés sensorielles

L'influence de la composition en protéines a été étudiée sur les propriétés sensorielles des yaourts à fort traitement mécanique (yaourts MT+).

La perception de texture et la perception olfactive ont été évaluées par un panel de 20 sujets. Une méthode d'analyse descriptive quantitative a été utilisée. Les échantillons ont été présentés selon le mode de présentation s'étant avéré le plus sensible (publication n°1) : procédure de comparaison par rapport à une référence. Les intensités des attributs « épais » et « intensité aromatique globale » des trois yaourts MT+ ont été évaluées par rapport à l'intensité du produit de référence (yaourt MT+ PLE). Pour réaliser cette étude, nous avons fait le choix de n'utiliser que deux attributs. En effet, le panel étant constitué de sujets naïfs, nous avons décidé de n'utiliser que des attributs dont le sens était relativement évident et faciles à utiliser pour des sujets non entraînés.

Les résultats ont montré que l'épaisseur diffère significativement entre les yaourts MT+ de composition variable en protéines. En effet, le yaourt enrichi en caséinate (yaourt CAS) a été perçu comme étant moins épais que les deux autres yaourts (yaourt WP et yaourt MPO), d'après l'analyse de variance à 2 facteurs ($p < 0.001$). Une variation de l'ordre de 25% de la perception de l'attribut épais a été observée entre le yaourt CAS et le yaourt MPO. Les yaourts WP et MPO n'ont pas été significativement discriminés (Figure 31).

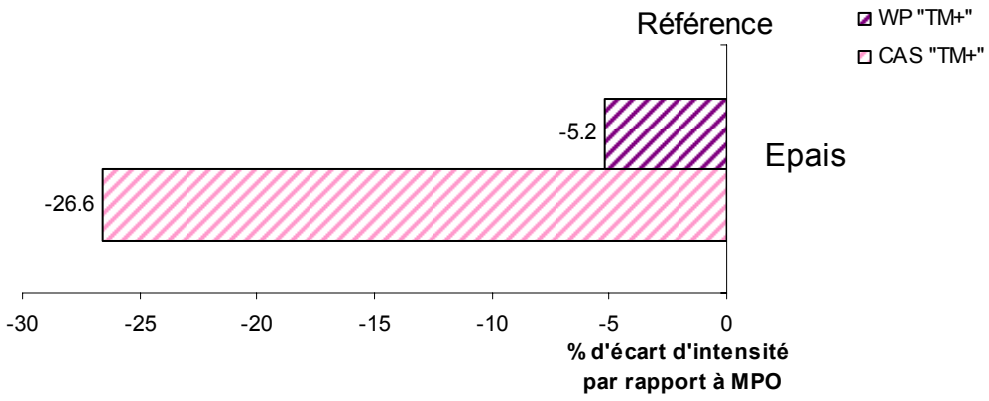


Figure 31 : Ecarts moyens d'intensité de l'attribut épais entre les yaourts CAS et WP calculés par rapport au produit de référence MPO (=(CAS ou WP - MPO / MPO)*100)), en pourcentage (attribut significatif selon l'analyse de variance à 2 facteurs (produit, sujet, traité comme facteur aléatoire) ($p < 0.05$)).

Par ailleurs, les résultats de l'analyse de variance ont montré qu'il n'existait pas de différence significative d'« intensité aromatique globale » entre les trois yaourts MT+.

Ainsi, la composition en protéine n'a pas d'effet sur les propriétés olfactives des yaourts ayant subi un traitement mécanique fort.

Le niveau fort de traitement mécanique appliqué aux yaourts a donc minimisé l'écart de perception olfactive dû à la composition en protéines mis en évidence précédemment entre les yaourts de traitement mécanique faible.

III.1.1.2.2 Propriétés rhéologiques

- Spectres mécaniques

Les spectres mécaniques des yaourts à fort traitement mécanique ont été déterminés par des balayages en fréquence. La Figure 32 montre les variations du module élastique G' et du module visqueux G'' en fonction de la fréquence pour les trois yaourts. La valeur du module élastique G' est supérieure à la valeur du module visqueux G'' pour l'ensemble des fréquences et quel que soit le type de yaourt. De plus, les valeurs de G' et G'' augmentent faiblement avec la fréquence. L'ensemble de ces résultats suggère que les produits ont un comportement typique d'une structure gélifiée (Clark et Ross-Murphy, 1987). Les pentes des droites décrites par G' en fonction de la fréquence sont relativement similaires entre les trois yaourts (comprises entre 0.15 et 0.17), montrant que la nature des liaisons du gel ne varie que très faiblement entre les trois yaourts MT+ (Van Vliet *et al.*, 1991). De plus, le yaourt MT+ enrichi en caséinates présente les valeurs de G' les plus faibles des trois yaourts.

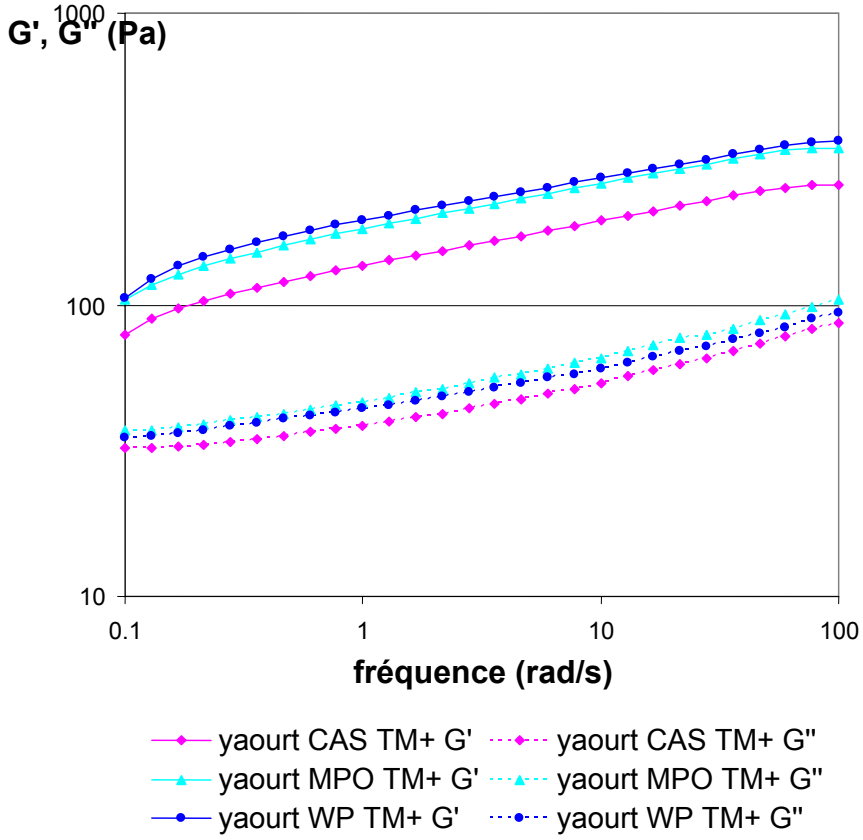


Figure 32 : Module élastique G' et module visqueux G'' pour les trois yaourts TM+ en fonction de la fréquence à 10°C.
G' du yaourt CAS, G' du yaourt MPO, G' du yaourt WP
G'' du yaourt CAS, G'' du yaourt MPO, G'' du yaourt WP

Les spectres mécaniques des yaourts MT- ont été présentés dans la publication n°2 et peuvent être comparés aux spectres mécaniques des yaourts MT+. Les valeurs du module élastique G' pour les yaourts à fort traitement mécanique sont systématiquement plus faibles que pour les yaourts à faible traitement mécanique. L'ordre des produits observés à partir des valeurs de G' et G'' des yaourts à fort traitement mécanique (MPO > WP > CAS) est modifié par rapport à celui des yaourts à faible niveau de traitement mécanique (CAS > MPO > WP). Ainsi, le yaourt CAS est celui qui a subi la plus grande déstructuration suite à l'application d'un traitement mécanique de niveau fort.

- Balayage en contraintes

Des balayages en contraintes ont été réalisés sur les yaourts à fort traitement mécanique (Figure 33). Une analyse de variance à un facteur (composition) a montré l'influence de la composition en protéines sur la viscosité complexe à 0.1 Pa. A faible contrainte (0.1 Pa), la viscosité complexe du yaourt CAS est significativement la plus faible (15 Pa.s) et celle du yaourt MPO la plus élevée (35 Pa.s).

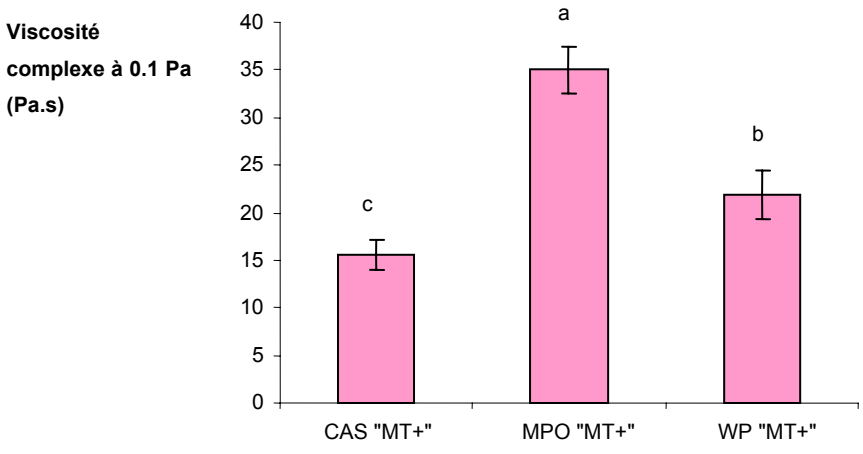


Figure 33 : Viscosités complexes (et écart-type) à contrainte nulle (0.1Pa) obtenues à 10°C pour les trois yaourts CAS, MPO et WP à fort traitement mécanique. Les différentes lettres traduisent des moyennes significativement différentes avec une valeur de $p < 0.05$, d'après le test SNK.

L'application d'un traitement mécanique additionnel aux yaourts MT- a conduit pour chacune des compositions protéiques à un abaissement de la viscosité complexe. La fragmentation du réseau protéique sous l'effet d'un traitement mécanique fort, perdant en partie sa cohésion, expliquerait cette diminution de la viscosité complexe (van Marle, 1998).

Arshad *et al.* (1993) ont observé sur des gels acides caséiques une viscosité complexe plus grande pour les gels natifs que pour les gels traités mécaniquement. Ils expliquent cette observation par une diminution du nombre de liaisons élastiques lors du traitement mécanique qui entraîne la déstructuration du réseau protéique.
Toutefois, les matrices MT+ ne sont pas totalement déstructurées : leur viscosité complexe diminue lorsque la contrainte augmente. Mais l'ordre des produits reste identique entre 0 et 100 Pa (CAS < WP < MPO).

- Boucles de thixotropie

Les boucles de thixotropie des yaourts à fort traitement mécanique sont présentées en Figure 34. Aux faibles vitesses de cisaillement, le yaourt CAS a les valeurs de contraintes les plus faibles des trois yaourts (correspondant à la montée de la première courbe de thixotropie). De plus, les yaourts CAS et MPO sont les produits qui présentent les surfaces les plus élevées pour la première boucle de thixotropie. Les surfaces de ces boucles peuvent être corrélées au taux de déstructuration des yaourts au cours du cisaillement. Cela signifie que les yaourts CAS et MPO présentent les plus fortes déstructurations lors de cette première boucle. Lors de la deuxième boucle, la résistance au cisaillement de la matrice est plus faible lorsque celle-ci est enrichie en caséinate. De plus, le yaourt WP est celui qui présente les surfaces de courbes les plus faibles et les contraintes, aux fortes vitesses de cisaillement, les plus élevées. Le yaourt WP est donc le plus stable et le plus résistant aux fortes déstructurations.
De plus, les boucles de thixotropie des yaourts MT+ décrivent des aires plus petites que les matrices MT- (résultats présentés dans la publication n°2). La déstructuration est donc moins importante pour un produit ayant déjà subi un traitement mécanique fort.

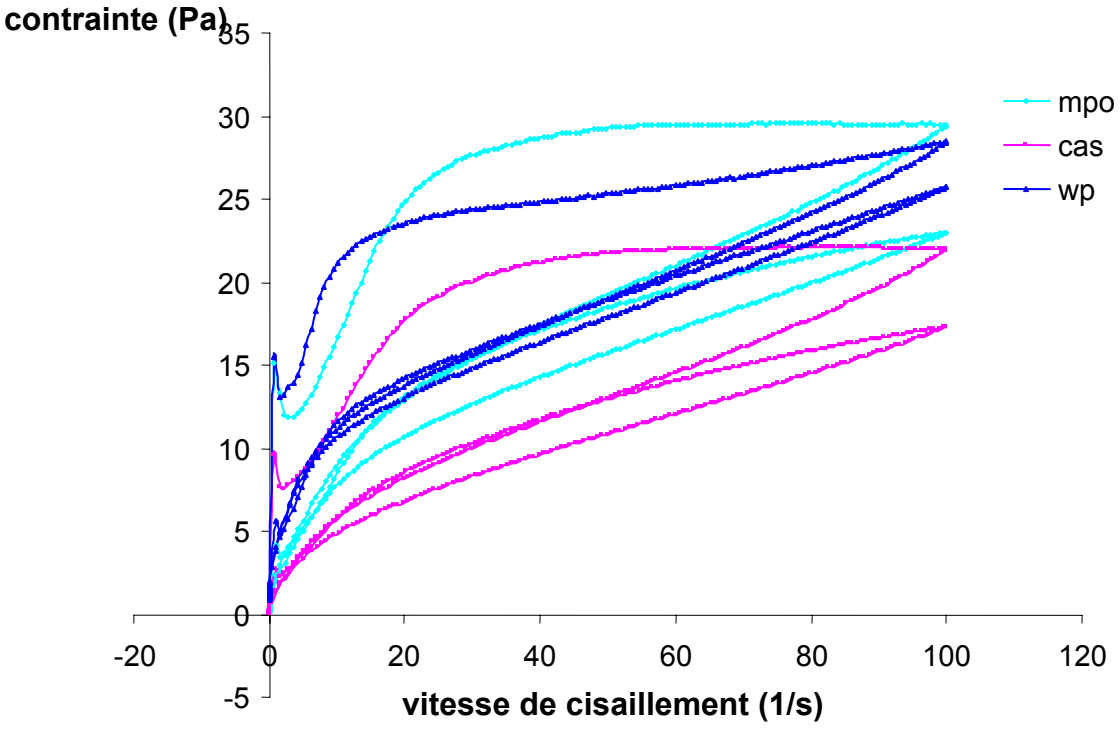


Figure 34 : Contrainte (Pa) en fonction de la vitesse de cisaillement (1/s) croissante, puis décroissante pour les trois yaourts "MT+" à 10°C : ● yaourt CAS, ■ yaourt MPO et ▲ yaourt WP.

III.1.1.2.3 Libération de composés d'arôme

Comme sur les yaourts MT-, la libération des composés d'arôme en condition statique a été mesurée sur les yaourts MT+ par deux méthodes :

i) la détermination des coefficients de partage qui quantifie la rétention des composés d'arôme à l'interface du transfert yaourt/air,

ii) la quantité de composés d'arôme libérés dans l'espace de tête par la méthode SPME.

- Coefficients de partage sur les yaourts à fort traitement mécanique

Les coefficients de partage air/yaourt des composés d'arôme de la formule fraise ont été déterminés par la méthode PRV à 4°C sur les yaourts MT+ (Ettre *et al.*, 1993, Atlan *et al.*, 2006). Ils sont présentés dans le tableau 17. Comme discuté dans la publication n°2, seul un nombre limité de composés d'arôme (7 composés d'arôme sur les 17 de la formule fraise) a pu être quantifié par la méthode PRV. En effet, les composés d'arôme sont étudiés à faible concentration dans les produits (correspondant aux concentrations utilisées pour l'analyse sensorielle), à basse température (4°C) et ils présentent des volatilités relativement faibles

pour quelques uns (vanilline, maltol). Ainsi, certains composés ne peuvent être ni détectés ni quantifiés par cette méthode.

		CAS "TM+"			MPO "TM+"			WP "TM+"		
Z-3-hexenol	(K_{gm} x 10^4)	**2.1**	[1.5-2.9]		**1.6**	[1.1-2.6]		**1.7**	[0.9-2.9]	
diacétyle	(K_{gm} x 10^4)	**2.2**	[0.6-7.8]		**0.7**	[0.1-4.2]				
acétate d'éthyle	(K_{gm} x 10^4)	**31.3**	[28-33.4]		**30.7**	[28-34]		**32.5**	[31-34]	
butyrate d'éthyle	(K_{gm} x 10^4)	**25.0**	[23-29]		**25.8**	[23-29]		**27.0**	[25-29]	
hexanoate d'éthyle	(K_{gm} x 10^4)	**5.8**	[4.8-6.9]		**6.0**	[5.1-7.0]		**5.4**	[4.2-6.8]	
hexanal	(K_{gm} x 10^4)	**8.0**	[6-11]	b	**6.8**	[5.2-9]	b	**14.0**	[11-19]	a
limonène	(K_{gm} x 10^4)	**4.2**	[2.2-8]		**1.8**	[3.1-1]		**1.3**	[0.3-4.9]	
linalol	(K_{gm} x 10^4)	**6.3**	[3.3-12]		**5.8**	[1.6-21]				

Tableau 17 : Coefficients de partage air/yaourt obtenus à 4°C par la méthode PRV pour les trois yaourts ayant subi un traitement mécanique fort. Les différentes lettres traduisent des moyennes significativement différentes avec une valeur de $p < 0.05$, d'après le test SNK.

Une analyse de variance à un facteur (composition) a montré que seule la volatilité de l'hexanal présente des différences significatives entre les trois yaourts MT+. La volatilité de l'hexanal dans le yaourt WP est environ deux fois plus élevée que dans les yaourts CAS et MPO. Pour les autres composés d'arôme, aucune différence significative due à la composition n'est observée pour les yaourts MT+.

- Libération des composés d'arôme mesurée par SPME

La méthode SPME présente l'avantage d'être plus sensible que l'analyse « headspace » simple, telle que réalisée pour la méthode PRV. Les 17 composés d'arôme sont en effet détectés et quantifiés par cette méthode. Elle permet de comparer la capacité de chaque yaourt à libérer les composés d'arôme.

A l'exception de l'hexanal, les résultats de l'analyse de variance à un facteur (composition) sur les quantités de composés d'arôme libérées par les yaourts MT+ et mesurées par la méthode SPME confirment les résultats obtenus avec les coefficients de partage.

Aucune différence significative ($p < 0.05$) de rétention des composés d'arôme n'est observée entre les trois yaourts MT+ en conditions d'équilibre à 4°C.

III.1.1.2.4 Conclusion sur l'effet de la composition protéique des yaourts MT+ sur les propriétés sensorielles et physicochimiques des yaourts

La composition en protéine influence les propriétés rhéologiques des trois yaourts à fort traitement mécanique. Le yaourt CAS présente la viscosité complexe à faible contrainte la plus faible des trois yaourts et est perçu comme étant le moins épais. Les yaourts MPO et WP n'ont pas pu être discriminés selon leur épaisseur en bouche. Les différences de viscosité complexe entre ces deux produits sont relativement faibles, certainement inférieures au seuil différentiel nécessaire à la détection d'une différence sensorielle.

En ce qui concerne l'arôme, aucune différence significative de libération des composés d'arôme dans les yaourts MT+ n'est observée en conditions statiques. Ce résultat va dans le même sens que les observations sensorielles puisqu'une absence de différence de perception olfactive entre les 3 yaourts de composition protéique différente mais ayant subi un fort traitement mécanique est observée.

Ainsi, les interactions physicochimiques protéines – composés d'arôme observées sur les yaourts à faible traitement mécanique (résultats présentés dans la publication n°2) n'ont pas été mises en évidence sur les yaourts à traitement mécanique fort.

Une hypothèse peut être formulée pour expliquer ces différences : les liaisons protéines – composés d'arôme ont pu être modifiées sous l'effet d'un fort traitement mécanique (cisaillement important).

Après avoir étudié l'effet de la composition en protéine aux deux niveaux de traitement mécanique, nous allons présenter les résultats concernant l'effet de la viscosité complexe due au niveau de traitement mécanique appliqué à des yaourts de composition constante. Cette étude nous permettra de comprendre le rôle de la viscosité des produits sur la libération et la perception olfactive.

III.1.2 Influence de la viscosité complexe modifiée par l'application d'un traitement mécanique fort sur les propriétés sensorielles et les caractéristiques physicochimiques de yaourts brassés aromatisés

III.1.2.1 Effet du traitement mécanique sur les propriétés sensorielles des yaourts

Les propriétés sensorielles des yaourts de composition identique en protéine et de niveau de traitement mécanique variable ont été évaluées par 20 sujets sur les attributs « épais » et « intensité aromatique globale ».

Un test de Student a permis de mettre en évidence des différences de perception de texture entre les yaourts MT- et les yaourts MT+. Les yaourts à faible traitement mécanique ont été perçus significativement plus épais que les yaourts à fort traitement mécanique ($p < 0.0001$). Le plus fort écart de perception de texture entre les deux niveaux de traitement mécanique est observé pour le yaourt enrichi en caséinate (74% de variation). Le plus faible écart de perception est observé pour le yaourt enrichi en protéines sériques (55% de variation) (Figure 35).

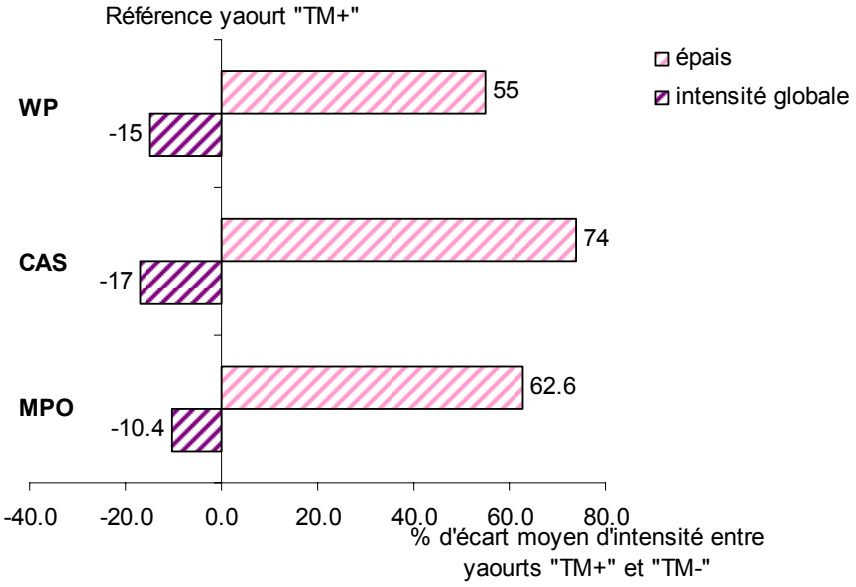


Figure 35 : Ecart moyen d'intensité perçue entre les yaourts « TM- » et « TM+ » en pourcentage (écart = (« TM- » - « TM+ » / « TM+ »)*100) pour les 3 compositions (yaourts CAS, MPO et WP) en pourcentage pour les attributs significatifs selon le test de Student ($p < 0.05$).

De plus, des différences de perception olfactive entre les yaourts MT+ et les yaourts MT- ont été mises en évidence par le test de Student. Les trois yaourts à fort traitement mécanique ont été perçus significativement plus intenses en arôme que ceux à faible traitement mécanique

($p < 0.05$). L'écart de perception olfactive entre les deux niveaux de traitement mécanique varie de 10 à 20%. L'écart le plus important est observé pour le yaourt CAS.

En conséquence, des yaourts perçus plus épais, mais de composition identique, sont perçus moins intenses en arôme. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats.

- Les différences de perception olfactive peuvent être dues à des modifications des propriétés physicochimiques de la matrice induites par l'application du traitement mécanique, et à des modifications des propriétés de partage à l'interface air/produit, des propriétés de transport des composés d'arôme dans la matrice (coefficient de diffusion) ou de transfert (coefficient de transfert de matière).
- Le produit peut également se comporter différemment dans la cavité buccale (modification du transfert de chaleur ou des écoulements) conduisant à des différences de libération des composés d'arôme et donc de perception olfactive.
- L'existence d'interactions sensorielles entre la perception de texture et la perception d'arôme n'est pas exclue pour expliquer ces différences de perception olfactive entre les yaourts d'épaisseurs différentes.

III.1.2.2 Effet du traitement mécanique sur les propriétés physicochimiques des yaourts

III.1.2.2.1 Viscosité complexe

L'effet de l'intensité du traitement mécanique appliqué aux yaourts sur les propriétés rhéologiques varie selon la composition protéique des yaourts :

- une diminution de 83% de la viscosité complexe initiale est observée pour le yaourt enrichi en caséinate entre les deux niveaux de traitement mécanique (faible et fort),
- une diminution de 49% pour le yaourt enrichi en poudre de lait,
- une diminution de 45% pour le yaourt enrichi en protéines sériques (Tableau 18).

	η* (Pa.s)				
	"MT-"		**"MT+"**		**% écart**
CAS	92.9 ± 6.9	a	15.3 ± 1.3	b	-83.5
MPO	67.2 ± 7.2	a	34.4 ± 3.2	b	-48.8
WP	42.9 ± 11	a	23.7 ± 3.0	b	-44.7

Tableau 18 : Viscosités complexes (Pa.s) des yaourts « MT+ » et « MT- » et pourcentage d'écart (=(MT+ - MT- / MT-)*100) à contrainte nulle (0.1 Pa) obtenues à 10°C pour les trois yaourts CAS, MPO et WP. Les différentes lettres traduisent des moyennes significativement différentes avec une valeur de $p < 0.05$, d'après le test SNK.

Ainsi, le yaourt enrichi en caséinate est le produit qui perd le plus de sa structure lorsqu'un traitement mécanique fort est appliqué. La présence de protéines sériques en plus grande proportions paraît stabilisée le gel par des liaisons entre protéines plus nombreuses (Lucey et Singh, 1998).

III.1.2.2.2 Coefficients de partage des composés d'arôme mesurés par PRV

L'effet du traitement mécanique sur les valeurs des coefficients de partage des composés d'arôme à 4°C a été testé par une analyse de variance à un facteur ($p < 0.05$) sur les yaourts de même composition en protéine. Les résultats montrent que l'intensité du traitement mécanique influence très faiblement la volatilité des composés d'arôme. En effet, seul le yaourt CAS présente un effet significatif pour un seul composé d'arôme sur les 7 qui sont quantifiés par cette méthode PRV. Les autres yaourts (WP et MPO) ne présentent pas de différence de libération des composés d'arôme entre leurs deux niveaux de traitement mécanique.

III.1.2.2.3 Libération des composés d'arôme mesurée par SPME

La quantité de composés d'arôme libérée par les yaourts en conditions statiques a été mesurée par la méthode SPME.

L'intensité du traitement mécanique appliqué influence la libération de certains composés d'arôme d'après les résultats de l'analyse de variance à un facteur ($p < 0.05$) :

- un effet significatif du traitement mécanique pour le yaourt CAS est observé pour trois composés d'arôme (hexanoate d'éthyle, hexanal et butyrate d'éthyle),
- deux composés d'arôme (hexanoate d'éthyle et hexanal) pour le yaourt MPO,
- un composé d'arôme (hexanal) pour le yaourt WP.

			Quantité libérée *(surface pics)*				
	Composés d'arôme	***Probabilité***	***TM+***		***TM-***		***% écart***
CAS	Hexanoate d'éthyle	0.0205	421150	**(a)**	349358	**(b)**	20.5%
	Hexanal	0.0023	435837	**(a)**	361055	**(b)**	20.7%
	Butyrate d'éthyle	0.036	3843874	**(a)**	3590232	**(b)**	7%
MPO	Hexanoate d'éthyle	0.0382	5739771	**(a)**	5460565	**(b)**	5.1%
	Hexanal	0.0091	430022	**(a)**	365730	**(b)**	17.6%
WP	Hexanal	0.0471	397592	**(a)**	359953	**(b)**	10.4%

Tableau 19 : Quantité libérée (en surface de pics) obtenue par la méthode SPME à 4°C pour les composés d'arôme présentant un effet significatif du traitement mécanique dans les trois yaourts et pourcentage d'écart (=(MT - MT- / MT-)*100). Les différentes lettres traduisent des moyennes significativement différentes avec une valeur de $p < 0.05$, d'après le test SNK.

Les quantités de ces composés d'arôme libérés sont plus importantes dans les yaourts à fort traitement mécanique que dans les yaourts à faible traitement mécanique (Tableau 19). Les matrices les plus visqueuses libèrent donc moins les composés d'arôme que les matrices les plus fluides. Cependant la variation est relativement faible entre les deux niveaux de traitement mécanique (5 à 20% de variation entre les yaourts MT+ et MT-).

A notre connaissance, très peu données de la littérature sont disponibles sur l'effet du traitement mécanique sur la libération des composés d'arôme. Seule l'étude de Paci Kora *et al.* (2004) sur des yaourts à 0% de matière grasse, montre un effet significatif du traitement mécanique sur le coefficient de partage d'un seul composé d'arôme sur les 5 étudiés (γ-octalactone). L'hypothèse pour expliquer ce résultat serait l'existence d'une interaction spécifique entre le composé d'arôme et un site de fixation du réseau caséique. Cette interaction aurait été modifiée par le traitement mécanique. Cette hypothèse peut être proposée pour expliquer les résultats de notre étude.

Le traitement mécanique présente un effet significatif sur la libération de l'hexanal, quelque soit le yaourt. Les différences de quantités d'hexanal libérées entre les yaourts MT+ et MT- sont plus importantes pour le yaourt CAS (environ 20.7%), que pour le yaourt MPO (17.5%) et que pour le yaourt WP (10.4%). De plus, l'écart de viscosité complexe entre les deux niveaux de traitement mécanique est également le plus important pour le yaourt CAS et le plus faible pour le yaourt WP (Tableau 18). Ainsi, les données de libération des composés d'arôme en conditions statiques peuvent être reliées aux données de viscosités complexes des différents yaourts. Ces résultats montrent que un effet modéré de la viscosité complexe sur la libération des composés d'arôme puisque seuls quelques composés d'arôme (3/17) montre un effet significatif.

III.1.2.3 Conclusion sur l'effet du traitement mécanique

Les données de libération des composés d'arôme obtenues en conditions statiques peuvent être reliées aux propriétés sensorielles des yaourts. En effet, les résultats physicochimiques ne peuvent expliquer qu'en partie les différences de perception entre les yaourts MT+ et les yaourts MT-. Les yaourts MT+ sont les moins visqueux et sont perçus comme étant les moins épais. Ils libèrent de plus grandes quantités de composés d'arôme en conditions statiques et sont perçus plus intenses en arôme que les yaourts MT-. En conclusion, les propriétés physicochimiques des composés d'arôme mesurées en conditions statiques vont dans le même sens que les variations de perception olfactive observées entre les yaourts de composition

constante. Cependant ces variations de libération sont relativement faibles et ne concernent qu'un nombre restreint de composés d'arôme. C'est pourquoi, seules, elles ne peuvent expliquer les différences de perception olfactive.

III.1.3 Conclusion sur l'effet de la viscosité complexe sur la libération des composés d'arôme en conditions statiques et sur la perception

Ce travail a montré l'influence de la composition en protéines sur les propriétés sensorielles des yaourts brassés aromatisés à faible traitement mécanique. Pour mettre en évidence les différences de propriétés olfactives entre les trois yaourts étudiés, le choix d'une procédure de comparaison par rapport à une référence est apparu comme la méthode la plus efficace pour discriminer des produits aux propriétés olfactives relativement proches.

En parallèle, nous avons étudié les caractéristiques physicochimiques des yaourts. Les propriétés rhéologiques et la libération des composés d'arôme en conditions statiques expliquent en partie les variations de perceptions entre les yaourts à faible traitement mécanique.

D'un point de vue méthodologique, la méthode SPME s'est avérée être la méthode la plus sensible pour quantifier la libération des composés d'arôme dans des produits complexes.

Ce travail a ainsi contribué à mieux comprendre l'impact de la composition en protéine sur les caractéristiques physicochimiques et sensorielles d'un produit laitier complexe par l'étude en parallèle i) des propriétés rhéologiques et de la perception de texture, ii) de la libération de composés d'arôme et de la perception olfactive.

La double caractérisation physicochimique et sensorielle de ces yaourts à faible traitement mécanique a fait l'objet d'une présentation dans le congrès 11th Weurman Flavour Research Symposium en 2005. L'article associé est présenté en annexe du manuscrit : « How can protein ratio affect physical properties, aroma release and perceptions in yoghurt? » A. Saint-Eve, N. Martin, C. Lévy and I. Souchon (2005). 11th Weurman Flavour Research Symposium, Eds. Bredie and Petersen, Elsevier. Rodskilde, Denmark.

La deuxième partie de cette étude (III.I.2) a montré que la composition en protéines des yaourts ayant subi un traitement mécanique fort avait peu d'influence sur les données sensorielles et physicochimiques.

Les différences sensorielles observées sur les yaourts MT- sont associées à des différences de viscosités complexes importantes entre les produits, rendant difficile les interprétations, ce qui n'est pas le cas pour les yaourts MT+. En effet, pour les yaourts MT-, la composition en protéine influence à la fois la viscosité complexe des yaourts et les interactions physicochimiques avec les composés d'arôme. Dans ce cas, une variation significative de la libération des composés d'arôme en conditions statiques et de la perception olfactive est

observée. Par contre pour les yaourts MT+, un plus faible impact de la composition en protéines sur la viscosité complexe est observé. Dans ce cas, une faible différence de libération des composés d'arôme en conditions statiques et de perception olfactive est observée entre les yaourts de composition protéique variable. Par conséquent, la viscosité complexe semble jouer un rôle plus important sur la libération des composés d'arôme en conditions statiques que les interactions physicochimiques entre les protéines et les composés d'arôme.
L'ensemble de ces résultats nous a également amenés à formuler l'hypothèse que le cisaillement dû à un traitement mécanique fort modifierait les liaisons entre les composés d'arôme et les composés non volatils de la matrice.

Le traitement mécanique influence considérablement les propriétés rhéologiques et la perception de texture des yaourts pour une même composition en protéines. Les yaourts liquides MT+ sont perçus plus intenses et libèrent une plus grande quantité de quelques composés d'arôme que les yaourts épais MT-. Ces résultats confirment que la viscosité complexe du produit semble jouer un rôle non négligeable dans la libération des composés d'arôme et la perception olfactive.

Ainsi, les produits présentant des viscosités complexes différentes entraînent, en bouche, des différences de comportement. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer les différences de libération des composés d'arôme dans ces matrices de viscosité complexe différente :

- Des modifications des propriétés thermodynamiques (partage à l'interface air/produit) et des propriétés cinétiques (propriétés de transport des composés d'arôme dans la matrice (coefficient de diffusion) ou de transfert (coefficient de transfert de matière)) modifieraient la libération des composés d'arôme dans ces matrices.
- Des différences de comportement du produit dans la cavité buccale (modification du transfert de chaleur ou des écoulements) conduiraient à des différences de libération des composés d'arôme et de perception olfactive. Les faibles viscosités contribueraient à créer une surface d'échange plus importante entre les produits et la cavité buccale. Ainsi, une plus grande quantité de composés d'arôme serait libérée par les matrices les moins visqueuses. Cette plus grande libération contribuerait à expliquer les différences de perception olfactive observées par les sujets.

- Nos résultats n'excluent pas le rôle des interactions cognitives. Dans cette étude, nous avons montré que les yaourts perçus plus épais étaient perçus moins intenses en arôme. Des interactions sensorielles pourraient alors exister entre les perceptions de texture et d'arôme des yaourts.

Ainsi, les résultats obtenus en conditions statiques montrent l'importance de la viscosité complexe du produit sur la libération de composés d'arôme et la perception. Par conséquent, une étude en conditions réelles de consommation parait nécessaire, en couplant le suivi de la libération des composés d'arôme et la perception olfactive temporelle.
De plus, pour affiner les hypothèses des mécanismes de perception olfactive, une étude de la libération des composés d'arôme en conditions dynamiques et contrôlées est nécessaire. Cette étude permettra de se rapprocher des conditions réelles de consommation et surtout de déstructuration en bouche.

Deuxième chapitre

III.2 Quelle est l'influence de la viscosité complexe modifiée par la composition et le traitement mécanique sur la libération de composés d'arôme en conditions dynamiques et la perception temporelle de yaourts brassés aromatisés ?

Introduction

Le chapitre précédent rapporte l'influence de la composition en protéines et du traitement mécanique sur les caractéristiques sensorielles et physicochimiques des yaourts mesurées en conditions d'équilibre. Nous avons montré que les variations des caractéristiques physicochimiques mesurées en conditions statiques expliquent en partie les variations des propriétés sensorielles de texture et d'arôme.

Cependant, la consommation d'un aliment n'est pas un phénomène statique. La perception olfactive qui en résulte est basée sur la perception initiale lors de la mise en bouche, sur la perception pendant la mastication et sur la perception après ingestion. Afin de prendre en compte le processus dynamique de la consommation et de comprendre son impact sur la libération des composés d'arôme et la perception, une étude en condition *in vivo* de mastication a été réalisée.

Cette étude a permis de suivre les quantités de composés d'arôme libérés par les matrices de viscosités complexes différentes. Ainsi il a été possible de confronter les quantités de composés d'arôme libérés, disponibles dans la cavité nasale et susceptibles d'atteindre les récepteurs avec la perception olfactive des yaourts déterminée au cours de la consommation.

Le suivi de la libération des composés d'arôme a été réalisé sur les yaourts de viscosité complexe variable. Pour modifier les propriétés rhéologiques de ces yaourts, deux facteurs de variation ont été utilisés : la composition en protéine et le traitement mécanique. En parallèle des analyses « nosespace », des sujets ont évalué et quantifié l'intensité aromatique globale des yaourts, aux principaux temps de la consommation.

Lors de la consommation d'un aliment, la disponibilité des composés d'arôme dans la cavité nasale est contrôlée par des paramètres physiques (hydrodynamique, température, thermodynamique…) et des paramètres physiologiques (salive, muqueuse…). Les effets de ces paramètres sur la libération des composés d'arôme et la perception olfactive ont été développés dans la partie Contexte Scientifique.

Afin de s'affranchir des paramètres physiologiques propres à chaque individu et de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la perception olfactive, une étude a été réalisée en conditions *in vitro*.

Pour cela, une cellule de cisaillement a été utilisée pour étudier la libération des composés d'arôme en conditions dynamiques en contrôlant les paramètres de température et d'agitation.

Par ailleurs, une étude précédente réalisée au laboratoire LGMPA (Paci Kora *et al.*, 2004) a montré qu'il n'y avait pas de différence de transfert de chaleur en bouche et en conditions *in*

vitro sur des yaourts à 0% de matière grasse de viscosité complexe différente mais de même composition. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier le rôle du cisaillement sur la libération des composés d'arôme dans les yaourts de viscosité complexe variable. Cette étude permet de prendre en compte l'effet de déstructuration de la matrice dans des conditions contrôlées, afin de se rapprocher le plus possible de la déstructuration en bouche.

Dans le cadre de cette étude, des mesures directes des composés volatils dans la phase gazeuse par APCI-MS (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation – Mass Spectrometry) ont été mises au point en conditions *in vitro* et *in vivo*. Les expériences ont été réalisées à l'UMR FLAVIC de l'Inra de Dijon.

L'impact de la structure des yaourts sur la libération des composés d'arôme et la perception olfactive en conditions *in vivo* est décrit dans la publication intitulée « Flavored stirred yogurts complex viscosity influences the real-time aroma release in mouth and the temporal sensory properties during eating » (publication n°3). Elle a été acceptée le 20 juillet 2006 dans la revue internationale à comité de lecture Journal of Agriculture and Food Chemistry.

L'étude en condition *in vitro* réalisée avec une cellule de cisaillement développée par l'UMR FLAVIC n'a pas fait l'objet de publication. Les résultats sont présentés en français dans une seconde partie.

III.2.1 La viscosité complexe des yaourts brassés aromatisés influence la libération des composés d'arôme en bouche et la perception temporelle lors de la consommation.

Journal of Agricultural and Food Chemistry. "Flavored stirred yogurts complex viscosity influences the real-time aroma release in mouth and the temporal sensory properties during eating." A. Saint-Eve, N. Martin, H. Guillemin, E. Semon, E. Guichard and I. Souchon, acceptée le 20 juillet 2006.

FLAVORED STIRRED YOGURTS COMPLEX VISCOSITY INFLUENCES REAL-TIME AROMA RELEASE IN THE MOUTH AND TEMPORAL SENSORY PROPERTIES DURING EATING.

Anne SAINT-EVE [a], Nathalie MARTIN [a], Hervé GUILLEMIN [a], Etienne SEMON [b], Elisabeth GUICHARD [b] and Isabelle SOUCHON [a].

[a] Unité Mixte de Recherche de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, Institut National Agronomique Paris-Grignon – Institut National de la Recherche Agronomique, 78850 Thiverval-Grignon, France.

[b] Unité Mixte de Recherche FLAVIC, Institut National de la Recherche Agronomique – ENESAD, 21065 Dijon, France

souchon@grignon.inra.fr

ABSTRACT.

The influence of flavored yogurt texture on aroma perception and in-nose aroma release measured by Atmospheric Pressure Chemical Ionization – Mass Spectrometry analysis was investigated. The study was carried out on six yogurts varied by protein composition and mechanical treatment. For the same matrix composition, the complex viscosity of yogurts influenced in-nose release and perception. After swallowing, aroma release and intensity of olfactory perception were higher in low viscous yogurts than in high viscous yogurts. Moreover, the protein composition influenced aroma release only when yogurts presented wide variations of complex viscosity and consequently texture. In mouth, aroma release and perception were more influenced by yogurt mechanical treatment than by protein composition. Based on mass transfer analysis, the main physical mechanism which could explain the difference in aroma release would be the surface exchange area developed in mouth and in throat.

KEYWORDS.

Dairy proteins, aroma release, texture, perception, APCI-MS.

Introduction

Aroma release during food consumption has been acknowledged in numerous studies as a key factor in flavor perception. Indeed, aroma compounds must reach the olfactory epithelium via the retronasal or the orthonasal pathway in order to be perceived by the consumer. The retronasal pathway delivers the aroma released from food products during chewing and swallowing. Several methods have been developed to measure aroma compound quantity in real-time in the nose-space of subjects during eating. The two most commonly used techniques for on-line analysis of air in the nasal cavity during eating are Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry (APCI-MS) and Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry (PTR-MS) (*1, 2*). *In vivo* aroma analysis has been used to show the effect of food formulation on aroma release during consumption: effect of fat (*3*), proteins (*4, 5*), thickening agents or sweeteners (*6, 7*). Moreover, *in vivo* aroma analysis has been used to study the impact of physiological factors such as mouth volume, saliva flow rate and air flow on the aroma compound profile that reaches the receptors (*8, 9*). These factors can lead to considerable interindividual differences. These differences have been investigated both by working with a great number of subjects and replicates, and by using a mouth model or a throat simulator in order to control oral physiological variations (*10, 11*).

Flavor release is one of the mechanisms that may explain differences in flavor perception of products with different structures, leading to differences in texture perception. Some studies have investigated the relationship between the behavior of aroma compound in food matrices (physicochemical interactions and release) and the perception. For that, these studies modified the rheological properties of matrices by composition variation (thickener, fat or protein). It was shown that non volatile constituents can specifically interact with aroma compounds. These physicochemical interactions partly explain the associated modulation of olfactory perception (*12, 13, 14*). But, sensory interactions between texture and aroma can also play a role (*15*). These cognitive interactions have been identified more specifically in studies investigating both on line aroma release and perception during consumption. Thus, although product thickening decreased perceived flavor intensity, it does not necessarily result in any change in the aroma compound concentrations measured in-nose (*15, 4*). The perceived texture rather than in-nose flavor concentrations determines the perceived aroma intensity (*4*). Sensory interaction can not be excluded when considering the results of the recent study of Boland (*7*). But these authors observed that increasing the physical strength of hydrocolloid

gel (gelatin and pectin) decreased flavor release during in-nose analysis. Consequently, the sensory changes can also be directly explained by aroma compound concentration available (*7*). The authors explained their different observations compared to those of Weel *et al.* (*4*) and of Hollowood *et al.* (*15*), by protocol difference with a free chewing procedure. Indeed, mastication could induce a breakdown of the food structure, an increase in the surface area and, therefore, an increase in the aroma release.

Thus, the influence of the physical properties of model food on flavor perception is not yet completely understood. To our knowledge, previous studies have primarily focused on texture differences due to composition variations and not on mechanical treatment variations, in order to maintain constant composition and to dissociate the effects.

In a previous study, we showed that the microstructure, the rheological properties and the aroma release under equilibrium conditions in yogurts vary by modifying the protein composition (*16*). Variations in these physicochemical characteristics partly explain variations in texture and olfactory perceptions of the flavored yogurts (*17*). However, food consumption is not a static experience. The resulting olfactory perception is based on initial impact, perception during chewing, and perception after swallowing, referred to as persistence. In order to take into account this dynamic process and understand its impact on aroma release and olfactory perception, we measured aroma release *in vivo* and perception during consumption.

In this context, the objective of the present study was to investigate the effect of the complex viscosity on the in-nose flavor release and on the temporal olfactory perception during consumption of a stirred yogurt flavored with a complex aroma. Complex viscosity was varied by using two factors. The first one was the protein composition of the yogurt, at a constant protein level. The second one was the mechanical treatment that enabled to modify the complex viscosity while keeping the composition constant.

MATERIALS AND METHODS

Flavoured yogurts preparation

Six flavored stirred yogurts were prepared. They had the same dry matter (22.5%), fat (4%) and protein (5.4%) content (**Table 1**). To modify the complex viscosity of the products, two variation factors were studied: milk protein composition and mechanical treatment. Three yogurts were obtained by varying only the protein fraction used to fortify the premix: enrichment with sodium caseinate (CAS yogurt), enrichment with milk powder (MPO yogurt)

and enrichment with whey protein (WP yogurt). To obtain the three other yogurts, an additional mechanical treatment was applied to the first three products in order to obtain less viscous yogurts. After the fermentation, all the 6 yogurts were pumped from the fermenter through a pipe (length=1.5m, diameter=6mm). This pumping corresponded to the lowest degree of mechanical treatment (MT- yogurts or yogurts with a low mechanical treatment). A second pumping was applied to 3 of yogurts through the same type of pipe but ending with a conical tip (diameter 0.8mm, angle 6°) at 4°C, one day after the fermentation. This second pumping lead to obtain the highest degree of mechanical treatment (MT+ yogurts or yogurts with a high mechanical treatment). Yogurt preparation and fermentation conditions were detailed in Saint-Eve *et al*. (*16*).

Ingredients (suppliers)	CAS yogurt[1]	MPO yogurt[2]	WP yogurt[3]
Water (Volvic, Danone)	1 L	1 L	1 L
Skim milk powder (Ingredia)	100 g	135 g	100 g
Lactose (Ingredia)	21 g	-	21 g
Sodium caseinate (Ingredia)	14 g	-	-
Whey protein (Ingredia)	-	-	14 g
Anhydrous milk fat (Lactalis)	40 g	40 g	40 g
Sugar (sucrose) (Daddy)	50 g	50 g	50 g
Protein total content	5.4%	5.4%	5.4%
Dry matter	22.50%	22.50%	22.50%

Table P3-1: Premix composition for yogurt preparation varying in the protein composition. [1]: CAS yogurt: caseinate enriched yogurt, [2]: MPO yogurt: milk powder enriched yogurt, [3]: WP yogurt: whey protein enriched yogurt.

Yogurts were flavored to 0.1% (m/m) with a strawberry flavor containing 17 aroma compounds mixed with propylene glycol (Aldrich, France). Concentrations of aroma compounds ranged from 1.01 to 32.53 mg/kg of yogurt (**Table 2**).

Aroma compounds	Concentration in yogurt (mg/kg)	m/z
Butanoic acid	2.21	89
Decanoic acid	1.11	173
Hexanoic acid	1.12	117
Diacetyl	4.34	87
Ethyl acetate	17.88	89
Ethyl butyrate	27.24	117
Ethyl hexanoate	22.44	145
Ethyl octanoate	1.14	173
Methyl cinnamate	2.2	163
4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	18.47	129
γ-decalactone	2.52	171
Hexanal	1.01	101/83
Z-3-hexenol	23.68	101/83
Limonene	2.23	137
Linalol	1.88	155/137
3-hydroxy-2-methyl-4H-Pyran-4-one	32.53	127
Vanillin	15.72	153

Table P3-2: Aroma compound concentration in yogurts and their m/z values corresponding to their protonated molecular ions.

pH measurements, rheological properties using a controlled-stress rheometer and aroma compound quantities by Solid Phase Microextraction analysis in yogurt were performed and considered as manufacturing checkpoints (details given in *16*). No significant variation of pH and aroma compound concentration between products was observed. The final pH of yogurts when consumed reached 4.30±0.02. The complex viscosity of the six products tested at a low shear stress (0.1 Pa) is presented in **Table 3**.

	CAS yogurt		MPO yogurt		WP yogurt	
Mechanical treatment	MT-	MT+	MT-	MT+	MT-	MT+
Complex viscosity (Pa.s)	158.9 a	18.9 e	109.3 b	41.5 d	60.3 c	25.2 ed
Thickness intensity	5.6 a	2.4 d	4.2 b	3.02 cd	3.7 bc	3.2 cd

Table P3-3: Complex viscosity determined at low shear stress (0.1Pa) and thickness perception evaluated by the 8 subjects for the six yogurts.
The letters a, b, c, d and e indicate means that significantly differ at $p<0.05$ (SNK test)
MT-: low mechanical treatment, MT+: high mechanical treatment.

Instrumental methods for *in vivo* aroma compounds release

Nose-space experiments using APCI-MS on-line analysis (Atmospheric Pressure Chemical Ionization – Mass Spectrometry) were performed on the six products with eight experienced subjects (four female and four male, aged from 22 to 52). They were able to recognize and classify various sensory properties according to their nature and their intensity. All subjects participated in one training session, performing at least three practice runs prior to analysis to familiarize them with the protocol.

Experiments were performed using APCI-MS with gaseous sample introduction. Aroma compound release measurements were carried out using an Esquire-LC mass spectrometer (Bruker Daltonique, Wissembourg, France) fitted with a APCI-MS source, in order to allow a gaseous sampling introduction due to the presence of a Venturi system. Air was sampled at a flow rate of 35mL/min through a deactivated fused silica tubing (i.d.=0.53mm) (Supelco, Saint Quentin Fallavier, France) heated to 150°C. A glass nosepiece in the form of a Y-junction was set-up between the entry of the APCI-MS capillary and the subject's nose.

The protonated molecular ion from each molecule was detected at its corresponding m/z value (**Table 2**). Some compounds with the same molecular weights of the strawberry aroma studied had the same m/z values. In this case, the signal measured corresponded to the sum of both compounds.

Prior to each session, the dynamic headspace (N_2 flow rate=35mL/min) of a solution of heptan-2-one (15 ppm), which provided a signal of the same order of magnitude as the signal observed during the nose-space sessions, was analyzed by APCI-MS. The purpose of this procedure was to control the potential derivation of the APCI-MS signal during experiments.

Two MS acquisition methods were used with regard to the molecular weight of volatile compounds. The first one used an optimization procedure of the signal on the protonated molecular ion (m/z=89) and allowed the calibration of the system to be performed for ions with m/z between 59 and 117. The other one used the protonated molecular ion (m/z=145) and allowed the calibration of the system to be performed and to detect ions with m/z from 129 to 173.

In-nose signals were expressed as peak heights and were proportional to aroma quantities and so to aroma concentration.

For each product, four replicates were performed, and for each replicate, two acquisition modes in APCI-MS signal (corresponding to the two calibrations) were carried out. Four sessions of 1h30 over two consecutive days were organized for each subject. During a session, the subjects ate 12 yogurt samples of 5g at 10°C according to a defined procedure. They had to swallow after having kept the yogurt in their mouth for 12 seconds. This time was choosen in regard to the literature (*18*) and to the yogurt structure after preliminary tests in order to limit temperature variability at the swallowing event between panelists. At the end of these 12 seconds, they were asked to eat as they normally did with usual swallowing, mouth closed, and to breathe into the nosepiece. The nose-space APCI – MS signal was measured for one minute after having introduced the yogurt into the mouth in order to have a complete information of aroma release by yogurt in oral cavity. Yogurt samples were presented in random order, and subjects were instructed to clean their palate with bread, apple and water between the samples. The subjects rested for a minimum of three minutes between samples. All the experiments were performed for nine days on the same products (from the same preparation). During this time, the evolution of products based on pH and complex viscosity measurements was controlled and products were considered to be stable.

A software developed in the laboratory was used to automatically draw the breath according to the breath curve for each ion and to extract the main parameters quantitatively representing the curve. The nose-space aroma release curves were divided into two phases. The first phase (P1) corresponded to the "oral" phase of consumption during chewing until swallowing, and the second phase (P2) corresponded to the phase after swallowing until end time (**Figure 1**). For the two phases of the release profile, parameters calculated involved the areas under the curves (AUC1 and AUC2) and the maximum intensities of the release profile (Imax1 and Imax2). At the end of the second phase, the area under the last ten seconds of the curve was calculated ($S_{50\text{-}60}$).

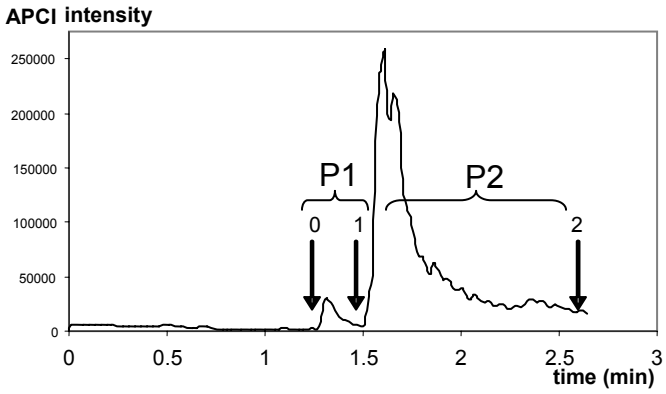


Figure P3-1: Release curves for ethyl hexanoate from CAS yogurt, when consumed by a subject using in-nose/APCI-MS analysis. 0: at introduction the yogurt in mouth, 1: at swallowing time, 2: at persistence time, P1: Phase 1 when the product was in mouth, P2: Phase 2: after having swallowing.

Sensory analysis

Difficulties in producing consistent data with Time-Intensity sensory evaluation have been reported many times (*19*). Therefore, in the present study, in order to reduce possible biases, subjects evaluated overall olfactory intensity of the products at the different key discreet times during consumption. At the same time as the nose-space aroma release measurement, the subjects scored perceived intensity at three times during the tasting: (i) upon introduction of the yogurt into the mouth, (ii) when swallowing (12 seconds after introduction of yogurt into the mouth), (iii) 60 seconds after introduction of yogurt into the mouth (persistence). The subjects scored the perceived overall aroma intensity of the attributes on an unstructured scale anchored with the terms "very weak" and "very intense". Each sample was evaluated 8 times by each subjects. Data acquisition was assisted by FIZZ© software (*20*). At the end of the evaluation, the subjects evaluated the thickness of the yogurts. The yogurts with different protein composition and low mechanical treatment presented clear differences in their perceived thickness and rheological properties (**Table 3**).

To validate tendencies observed on temporal sensory measurements, the effect of mechanical treatment on “thickness” and “overall aroma intensity” was investigated separately with 20 subjects and independently of any APCI-MS measurements.

The sessions were carried out in an air-conditioned room under white lighting in individual booths. Three tests (three protein compositions) were performed. For each test, three products of the same protein composition were simultaneously presented to the subjects: one reference sample (MT+ yogurt) and two test samples (MT+ yogurt (product identical to the reference) and MT- yogurt). For both sensory attributes, the subjects scored the intensity of the two

samples by comparing them to the reference. The samples were arranged for each subject according to a Latin square. Each test was replicated.

Data analysis

A three-way analysis of variance (ANOVA) (composition, mechanical treatment, random subject) with interactions was applied to the four sensory variables (overall aroma intensity at introduction, at swallowing and at persistence and thickness) and the five APCI-MS variables (AUC1, AUC2; Imax1, Imax2 and $S_{50\text{-}60}$) for each aroma compound. Within a mechanical treatment, effect of the protein composition was assessed by a two-way ANOVA (composition, random subject) with interactions on sensory data and APCI-MS parameters. When significant product differences were observed ($p < 0.05$), product mean intensities were compared using the Student Newman Keuls (SNK) multiple comparison test. Principal component analysis (PCA) was then performed to visualize the sample differences and the variable correlations. APCI-MS data were used for the construction of the PC'dimension. Sensory data (intensity at swallowing time and at persistence time) were used as supplementary variables. For sensory analysis results, independent of any APCI-MS measurements, the yogurts varying by mechanical treatment were assessed by a Student t-test. ANOVA and Student t-tests were performed using the SAS® software package, version 9.1 (*21*) and PCA analysis using Statistica® (*22*).

RESULTS

Sensory analysis

Temporal sensory properties

The overall aroma intensity was significantly higher at swallowing time than when introducing the food into the mouth (30% higher) and than after having swallowed (50% higher), regardless of the yogurt (**Figure 2**). Concerning the effect of the mechanical treatment on perception at introduction in mouth and swallowing, a trend for a slightly higher intensity for MT+ was observed (**Figure 3**), but the difference was not significant ($p=0.15$). However, at the persistence time, a significant effect of the mechanical treatment on overall strawberry aroma intensity was observed ($p < 0.05$). Yogurts with a low mechanical treatment were perceived as being more intense than yogurts with a high mechanical treatment at persistence (**Figure 3**).

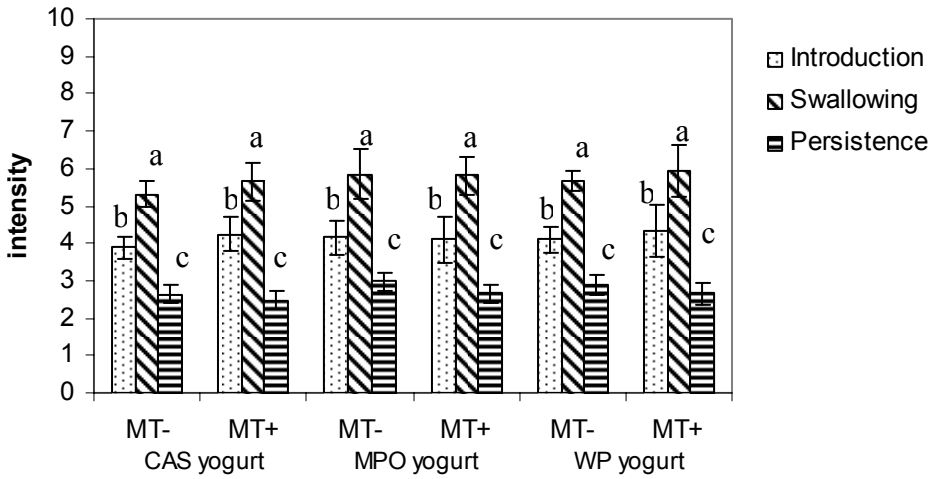


Figure P3-2: Overall intensity perceived for the six yogurts at the three times of the consumption: i) at introduction in mouth of the sample, ii) at swallowing, iii) at the persistence. (Means with standard deviation).
The letters a, b and c indicate means that significantly differ at $p<0.05$ (SNK test).
MT-: low mechanical treatment, MT+: high mechanical treatment.

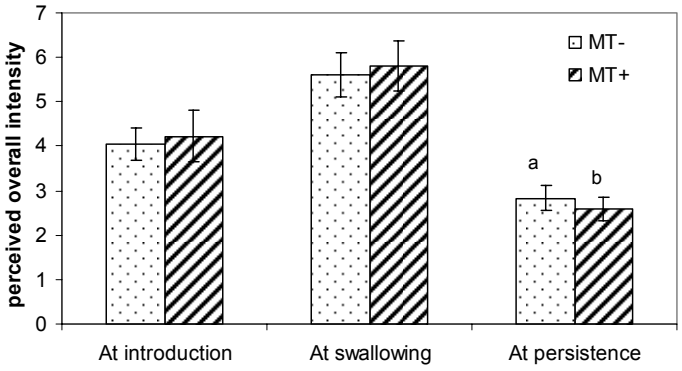


Figure P3-3: Overall aroma intensity perceived by the subjects for the yogurts varying by their mechanical treatment and averaged by protein composition. (Means with standard deviation).
The letters a and b indicate means that significantly differ at $p<0.05$ (SNK test).
MT-: low mechanical treatment, MT+: high mechanical treatment.

Protein composition had a varying influence on the olfactory perception of yogurts, depending on the level of mechanical treatment. The overall perception of the strawberry aroma of the MT- yogurts differed at swallowing time according to the protein composition ($p=0.06$), but no significant effect ($p > 0.4$) of the protein composition for MT+ yogurts was observed, regardless of the considered time during consumption. The overall aroma intensity was perceived as being less intense in MT- yogurt enriched with caseinate than in yogurt enriched with milk powder (**Figure 4**). No significant effect of protein composition in MT- yogurts was observed at persistence time. However, one trend could be observed ($p=0.13$): yogurts enriched with caseinate were slightly less intense than the two others.

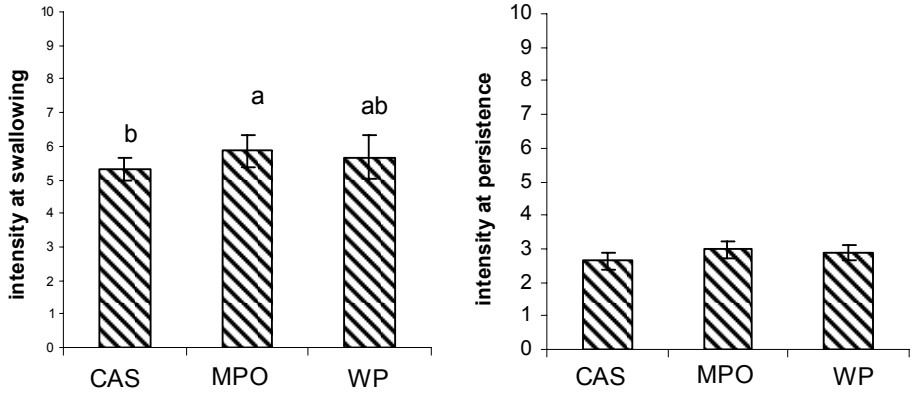


Figure P3-4: Overall intensity perceived for the six yogurts varying by the protein composition (CAS yogurt, MPO yogurt and WP yogurt) with low mechanical treatment (MT- yogurts) on the significant sensory attributes by ANOVA. (Means with standard deviation). The letters a, b, c and d indicate means that significantly differ at $p<0.05$ (SNK test).

Effect of mechanical treatment on perception

Mechanical treatment influenced sensory properties. The yogurts with a low mechanical treatment were perceived as being significantly thicker than yogurts with a high mechanical treatment ($p < 0.0001$). The greatest variation of thickness due to the additional mechanical treatment applied to the MT- product was 75% and was observed for yogurt enriched with caseinate with % variation defined as (MT- yogurt - MT+ yogurt) / MT+ yogurts)*100). The least impact of mechanical treatment on thickness was observed for yogurt enriched with whey proteins (55% variation).

Moreover, the Student t-test highlighted differences in olfactory perception between MT+ yogurts and MT- yogurts. For the three protein compositions (CAS, MPO and WP yogurts), the yogurt with a high mechanical treatment was perceived as being more intense in flavor than the one with a low mechanical treatment ($p < 0.05$). The variation of olfactory intensity between the two levels of mechanical treatment lies between 10 to 20%, the widest variation being observed for the CAS yogurt. Consequently, yogurts with identical composition, that were perceived as being thicker, were also perceived as being significantly less intense in flavor.

APCI-MS analysis

In-nose analysis was carried out by APCI-MS analysis. Among the 17 aroma compounds of the studied aroma, only seven ions (m/z= 87, 89, 101, 117, 137, 145, and 173) revealed a response above noise level. The low concentration of aroma compounds in yogurts (**Table 2**), the presence of fat in products leading to low volatility of the majority of hydrophobic flavor

compounds, and the "*in vivo*" measurement explained the relatively low level of performances of APCI-MS analysis obtained in this study. However, these performance levels were relatively higher than those of other studies already published (*6, 7*). The seven ions followed in the nasal cavity during yogurt consumption corresponded to ten aroma compounds of the strawberry flavor (**Table 2**). For the four couples of compounds detected at the same m/z, one of the compounds in each couple had a higher concentration and a higher volatility in the yogurt than the other one (*16*). We could therefore consider that the APCI-MS signal for each m/z detected was mainly due to one compound: ion m/z=89 (ethyl acetate), ion m/z=117 (ethyl butyrate), ion m/z=173 (ethyl octanoate), ion m/z=101/83 (Z-3-hexenol). Moreover, considering the odor threshold values (*23*), these four compounds had probably more sensory impact than the other ones in each couple (butanoic acid, decanoic acid, hexanoic acid and hexanal). For a large majority of subjects, as illustrated on **Figure 1**, we observed that the in-nose aroma release quantity was the highest after swallowing. Indeed, Imax2 values for the second phase (after swallowing) were higher than Imax1 values for the first phase (before swallowing) for the large majority of aroma compounds followed by APCI-MS analysis. The main influence on yogurt structure concerned the effect of mechanical treatment, which affected in-nose aroma release. The MT+ yogurts had significantly ($p < 0.05$) higher values for Imax2 and for AUC2 than the MT- yogurts for five ions (ions m/z= 87, 117, 137, 145 and 173) (**Figure 5**).

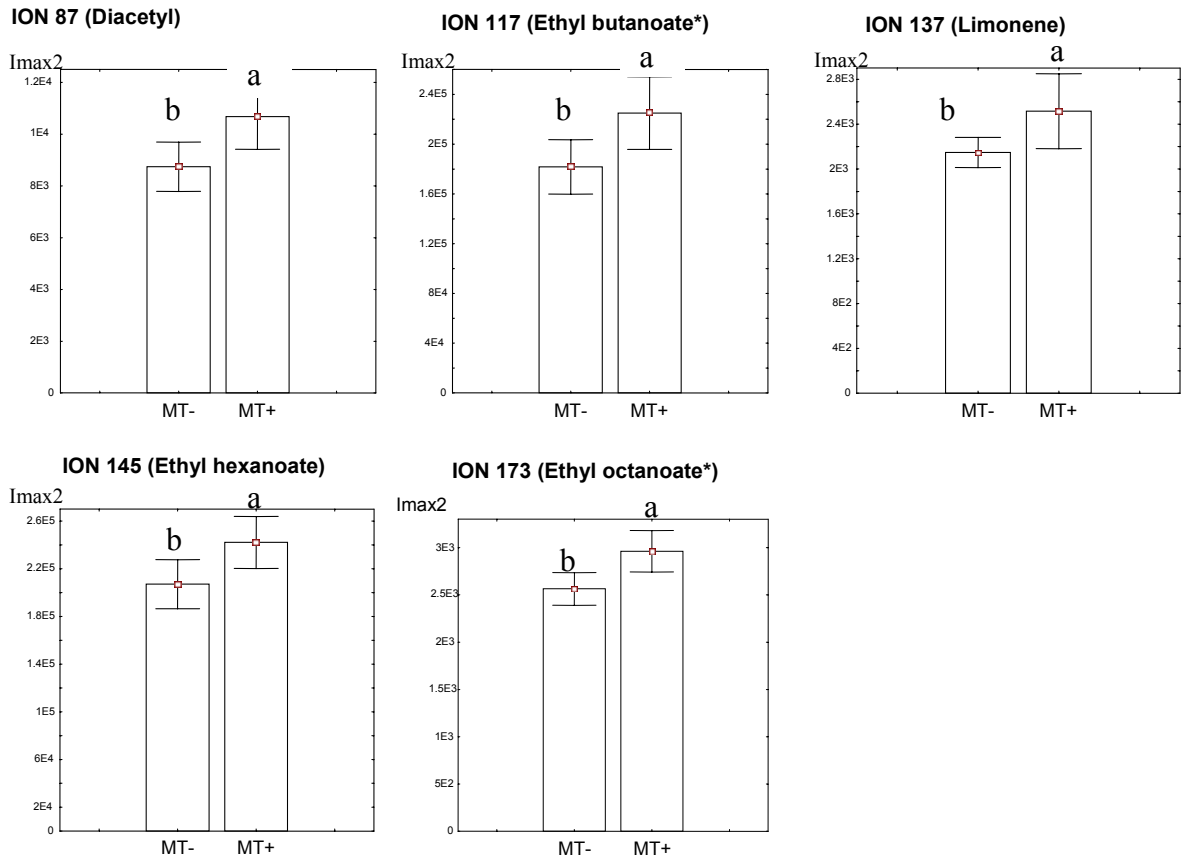


Figure P3-5: Mechanical treatment effect (MT- for low mechanical treatment and MT+ for high mechanical treatment) on the average values of the three yogurts and averaged across subjects for the maximum intensity of aroma release after swallowing for the significant aroma compounds by ANOVA. (Means with standard deviation).

*: main compound in the strawberry flavor responsible for the signal of this ion.
The letters a and b indicate means that significantly differ at $p<0.05$ (SNK test).

An increase of about 20 to 30% of the APCI-MS signal was observed for less viscous yogurts (MT+ yogurts) compared to MT- yogurts. For the three yogurts with a low mechanical treatment, the protein composition effect influenced the in-nose release during consumption of four ions ($p < 0.05$). Indeed, the maximal intensity after swallowing (Imax2) significantly differentiated the three yogurts for ion m/z=87 (diacetyl), ion m/z=89 (ethyl acetate), ion m/z=117 (ethyl butyrate) and ion m/z=101 (Z-3-hexenol) (**Table 4**). Smaller quantities of these four aroma compounds were released after swallowing yogurt enriched with whey protein (WP). Greater amounts of diacetyl, ethyl acetate and ethyl butyrate were released from the yogurt enriched with caseinate (CAS) and greater amounts of Z-3-hexenol from the yogurt enriched with MPO. A reverse trend was observed for the maximal release (Imax2) of more hydrophobic compounds such as ethyl octanoate (ion m/z=173) and for the area under the curve (AUC2) of ethyl hexanoate (ion m/z=145) (**Table 4**) ($p < 0.1$). For these two

compounds, the aroma release was lower in CAS yogurt than in WP yogurt. Finally, with regard to the different release parameters for consumption of the three MT+ yogurts, no difference between these yogurts was observed.

			MT- yogurt					
Parameters	Ions	Probability	**CAS yogurt**		**MPO yogurt**		**WP yogurt**	
Imax 1	173	5%	1243.7	b	1512.2	a	1368.6	ab
Imax 2	87	5%	9680	a	9217.3	a	7336.1	b
	89	5%	518316	a	500310	a	407022	b
	101	5%	2924.9	ab	3540.3	a	2185.7	b
	117	5%	203240	a	182404	ab	159697	b
	173	10%	2400	b	2541	ab	2748	a
AUC 2	87	5%	178511	a	164906	ab	142689	b
	89	5%	5458643	a	4548190	ab	4011386	b
	145	10%	2776091	b	3267825	a	3030554	ab

Table P3-4: Average parameter values for the release curves of yogurts varying by their protein composition with low mechanical treatment (MT- yogurts) with a significance of 5% or 10% by ANOVA.
The letters a and b indicate means that significantly differ at $p<0.05$ (SNK test).
Imax1: maximum intensity of Phase 1 of the release profile, Imax2: maximum intensity of Phase 2 of the release profile, AUC2: area under the curve of Phase 2 of the release profile.

The first factorial plot of PCA on APCI-MS and sensory parameters of yogurts showed that yogurts with different mechanical treatments formed three groups along the first principal component (PC1): MT+ yogurts (CAS yogurt, MPO yogurt, and WP yogurt), MT- yogurt enriched with caseinate, and MT- yogurt enriched with whey protein and milk powder (**Figure 6a**). MT+ yogurts can be described as (i) being more intense at swallowing time, (ii) having higher release for some ions (m/z= 137, 145 and 173) and (iii) leading to a lower release for ion m/z=89 (**Figure 6b**). Examination of the correlations between variables related to APCI-MS parameters and sensory data revealed that swallowing was correlated with the AUC1 parameters of ion m/z=173 (r=0.73), Imax2 of ion m/z=145 (r=0.74) and $S_{50\text{-}60}$ of ion m/z=89 (r=-0.85), and persistence with the AUC1 parameters of ion m/z=137 (r=0.79), AUC1 of ion m/z=173 (r=0.70) and AUC2 of ion m/z=173 (r=0.79) and $S_{50\text{-}60}$ of ion m/z=117 (r=-0.88) and ion m/z=89 (r=-0.85).

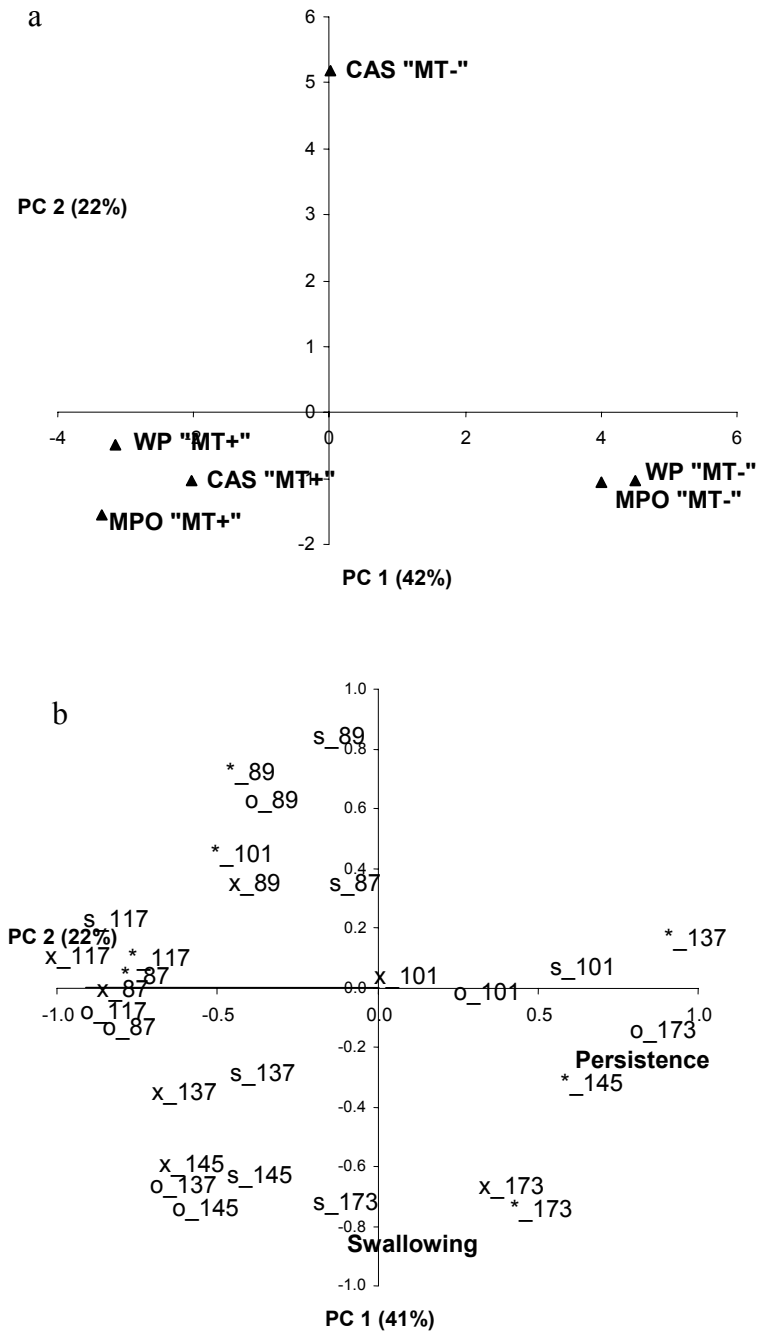


Figure P3-6: PCA plots (a: variables plot, b: individuals plot) on the sensory (at swallowing and at persistence) and APCI-MS (ions 87, 89, 101, 117, 137, 145 and 173) scores of the six yogurts. Shape of symbols differs with APCI-MS parameters (*: AUC 1, o: AUC 2, X: Imax2 and S: $S_{50\text{-}60}$). Imax2: maximum intensity of Phase 2 of the release profile, AUC1: area under the curve of Phase 1 of the release profile, AUC2: area under the curve of Phase 2 of the release profile, $S_{50\text{-}60}$: area under the 10 last seconds of the curve.

DISCUSSION

Maximum in-nose flavor release intensity and perception when swallowing

The release of aroma compounds into the nose did not occur until the sample was swallowed. This observation was in agreement with others (*7, 24, 26*). These results indicate that the mouth cavity can be considered to be more or less a closed system until swallowing occurs. The velum between the oral cavity and the pharynx produces a closure capable of more or less effectively blocking the transfer of aroma compounds to the nasal cavity via the retronasal route into the nasal cavity and olfactory epithelium (*27*). When swallowing occurs, the soft palate is displaced. This allows the consumed sample to pass into the esophagus and also opens the nasal cavity for the passage of aroma compounds into the nose (*24*). That is why the APCI-MS signal was the highest at swallowing time, regardless of the product and for all eight subjects.

As already observed by Buettner *et al.* (*24, 25*), information extracted from the in-nose release curve was in agreement with that collected on aroma perception: the higher the nose-space APCI-MS signal, the greater the perception. APCI-MS parameters after swallowing, as well as the olfactory perception at swallowing time, were significantly higher than the same parameters measured at other consumption times, regardless of the yogurt (**Figures 1 and 2**). Moreover, in-nose release parameters of the second phase of consumption (*i.e.*, after swallowing) led mainly to the discrimination of yogurts according to their protein composition or mechanical treatment.

Influence of the structure of yogurt on temporal perception and in-nose flavor release

Effect at swallowing

The additional mechanical treatment on MT- yogurt led to a more "liquid" product (MT+) with a lower complex viscosity. At swallowing time, a trend for a lower perceived intensity in MT- yogurts than in MT+ yogurts was observed (**Figure 3**). This trend was confirmed when separately scoring yogurt thickness and overall intensity independently of any APCI-MS measurements. Under classical conditions of sensory measurements, subjects evaluate products in more simple and comfortable conditions than during nose-space analysis. Under these classical conditions, aroma intensity of MT+ yogurts was significantly higher than MT- yogurts. Moreover, for the same composition, but with variable rheological properties, the

least viscous yogurts (MT+) significantly released a greater aroma quantity than the most viscous yogurts (MT-) after swallowing (**Figure 5**). This result associated with the sensory one showed that the released quantity in the nasal cavity at swallowing time could explain the perceived intensity evaluated by the subjects at the same time. A possible explanation for these differences between MT+ and MT- yogurts may be that during consumption, the low viscous yogurts MT+ can more cover extensively the mucous membranes of the mouth and the throat. MT+ yogurts could thus develop a greater exchange surface area available for the mass transfer of aroma compounds from the product to the air flow of breath. Since the quantity of flavor compound transferred from the product to the air phase is directly proportional to the exchange area, the higher the surface exchange, the higher the release after swallowing.

Structure variation could also have an additional effect on the kinetic aspects of flavor release by modifying flavor transport through the food product. This could be confirmed by diffusion coefficient determination of aroma compounds in these yogurts. However, Paçi Kora *et al.* (*18*) did not observe any significant effect of mechanical treatment on hexanal mass transfer in fat-free stirred yogurt. The variation of complex viscosity of a gel with similar composition seems not to modify significantly the aroma mass transfer of hexanal in the yogurt gel (*18*). The diffusion coefficient may also not be a key factor to explain olfactory perception.

The variation in aroma release quantity between MT+ and MT- yogurts seems to depend on the difference in complex viscosity between both products. A greater decrease of complex viscosity due to the additional mechanical treatment led to a greater increase in aroma release (**Table 3**). The greatest viscosity deviation induced by mechanical treatment was observed for CAS yogurt and this yogurt led to the highest aroma release variation in-nose. As an example, for ion m/z=145 (ethyl hexanoate) the difference between MT+ and MT- yogurts in aroma release quantities in the nasal cavity after swallowing (AUC2) was 27% for CAS yogurt and only 17% for WP yogurt and 15% for MPO yogurt. This result was in accordance with complex viscosity differences: These results were in agreement with numerous studies that reported a decrease of olfactory intensity of aroma compounds for an increase in viscosity. However, these studies generally used the addition of a thickening agent (*28, 29*). Boland *et al*. arrived at similar conclusions concerning the relationship between in-nose flavor release by PTR-MS and sensory properties of pectin gels with different structure and texture (*7*). Nevertheless, a clear link between the intensity of flavor perception and the quantity of aroma compounds released has not been systematically observed in the literature. It has been shown that an increase of gel viscosity led to an increase in gel thickness but did not significantly

change the *in vivo* aroma concentration in-nose, although there were significant changes in the perceived odor and taste (*5, 15, 4*). This result led the authors to suppose the presence of a sensory interaction between texture and flavor. In the present study, olfactory perception was explained by physicochemical results. But our results did not exclude the possible cognitive interactions between texture and aroma perceptions.

Effect after swallowing

Whereas the application of an additional mechanical treatment on yogurt tended to increase the intensity of flavor perception at swallowing time, the reverse effect was observed on perception at persistence time (**Figure 4**). We can hypothesize that the low viscosity of MT+ yogurts could facilitate the elimination of yogurt traces in the mouth and the throat by successive swallowing, thus leading to less persistence after 60 seconds in the mouth than in MT- yogurt. The MT- yogurt may interact or adhere more with oropharyneal mucosa than the less viscous MT+ yogurt. According to Buettner *et al.* (*25*), the durability and the thickness of the mucosa coating is highly dependent on the structure of the food material. MT- yogurts may lead to a thicker film coating the pharynx after swallowing compared to MT+ yogurts, leading to a longer release after swallowing. However, in the present study, the $S_{50\text{-}60}$ parameter from the APCI-MS signal representing the flavor release in the nose at persistence time did not differ between MT+ and MT- yogurts. This parameter makes it difficult to explain the olfactory differences from the aroma compound release at persistence time. No parameter from the flavor release curve could validate the hypothesis of a difference in the mucosa coating for either yogurt. Brauss *et al*. (*3*) also reported that aroma release after swallowing is not a key factor to discriminate yogurts with and without fat.

Another hypothesis can be proposed to explain the difference between physicochemical measurements and sensory data at persistence. The ions followed by APCI-MS analysis mainly included the aroma compounds responsible for fruity notes (*30*). However, no aroma compound with high molecular weight and low volatility such as maltol or vanillin was followed by this method, whereas they are responsible for sweet notes and contributed to the perceived overall intensity of strawberry flavor. It could be suggested that they participated in aroma persistence but could not be measured.

Protein composition influenced temporal sensory properties and in-nose flavor release

a) Yogurts with high complex viscosity (MT-)

Yogurt enriched with caseinate was perceived as being the least intense at swallowing time (**Figure 4**). The temporal olfactory perception was in agreement with previous sensory study (*17*), showing by quantitative descriptive analysis that MT- yogurts enriched with caseinate were perceived as being less intense for a majority of olfactory notes than WP yogurts. These results were in agreement with aroma analysis done in static condition, except for Z-3-hexenol (ion m/z=101). The release (determined by SPME analysis) of many aroma compounds (seven aroma compounds among the 17 compounds of the strawberry mixture) under static conditions was lower in caseinate-enriched yogurts than in whey protein-enriched yogurts at 4°C (*16*). But *in vivo* results were in agreement with *in vitro* static measurements for only one aroma compound: Z-3-hexenol. The in-nose release of ions m/z=87 (diacetyl), m/z=89 (ethyl acetate) and m/z=117 (ethyl butyrate) varied in the opposite direction of the sensory observations: higher release in CAS yogurt than in WP yogurt (**Table 4**). This disagreement between *in vivo* and *in vitro* results has already been observed and was in accordance with studies on custards and gels (*7*, *31*). Van Ruth *et al*. revealed that firmer custards demonstrated higher in-nose flavor concentrations than softer custards, whereas the latter had higher static headspace flavor concentrations (*31*). Boland *et al*. found similar results on pectin gels with the same disagreement between static and in-nose measurements (*7*). One hypothesis could be proposed to explain the difference between in-nose and static measurements and especially the higher in-nose release in CAS yogurt than in WP yogurt. The most viscous yogurt (CAS yogurt) may have been sheared more extensively and consequently released a higher quantity of aroma compounds than WP yogurt with the lowest complex viscosity of the three yogurts. This hypothesis was in agreement with Boland *et al*. (2006).

Another interesting result, observed on yogurt MT-, concerned two hydrophobic esters: ion m/z=145 (ethyl hexanoate) and ion m/z=173 (ethyl octanoate). For both compounds, the lowest in-nose release was observed for CAS yogurt ($p < 10\%$), corresponding to a reverse trend of the one described above, for the four ions (m/z=87, 89, 101 and 117). This result was in agreement with the release under static conditions above the three yogurts (*16*): CAS yogurt retained these esters to a greater degree than WP yogurt. In this case, physicochemical interactions between aroma compounds and proteins could partially explain the in-nose

release differences between the yogurts. Moreover, overall intensity perceived at swallowing time for CAS yogurt was the lowest and in agreement with hydrophobic ester in-nose release. The overall olfactory perception of strawberry aroma was due to a mixture of aroma compounds, but ethyl hexanoate was a key compound of the strawberry flavor (*32*). This could explain the agreement between sensory and release (in-nose and static) measurements. The wide variability of the APCI-MS measurements (low aroma concentrations and aroma mixture in yogurt) could explain that the ester variations among the three MT- yogurts were only significant with a probability of 10%. The differences in velum movements between the subjects may be considered as an additional variable to explain the variability in flavor release (*33*). Finally, we could hypothesize that the four aroma compounds presenting a significant release variation had a limited contribution to the perceived intensity, contrary to ethyl hexanoate. The positive and high correlations between ions m/z=145 and m/z=173 and the perception at swallowing time confirmed this hypothesis.

b) Yogurts with low complex viscosity (MT+)

In-nose aroma release, as well as the overall intensity perceived at swallowing time did not show any significant difference among the three MT+ yogurts. No effect of protein composition on temporal perception or in-nose aroma release quantities was observed. This result could be explained by similar exchange areas of yogurts developed in the mouth whatever the composition. The level of viscosity seems to play a major role. Indeed variations of complex viscosity among MT+ yogurts were quite low.

c) Comparison between MT+ yogurts and MT- yogurts

For MT- yogurts, protein composition influenced both complex viscosity and physicochemical interactions with aroma compounds. In this case, significant changes in aroma release and perception were observed. For MT+ yogurt, there was a weak impact of protein composition on complex viscosity. In this case, no difference in aroma release and perception was observed among yogurts with different protein composition. Consequently, complex viscosity variation seemed to prevail over physicochemical interaction in the in-nose aroma release and subsequent perception.

Conclusion

This study contributes to a better understanding of the impact of yogurt complex viscosity on in-nose aroma release and temporal sensory properties. Complex viscosity variations induced

by mechanical treatment seem to have a greater impact on *in vivo* aroma release and olfactory perception than protein composition alone. Even if inter-individual physiological differences led to different opening/closure of the velum and chewing/swallowing behaviors of subjects, the effect of product complex viscosity on perception in this study clearly explained the flavor release difference during the consumption.

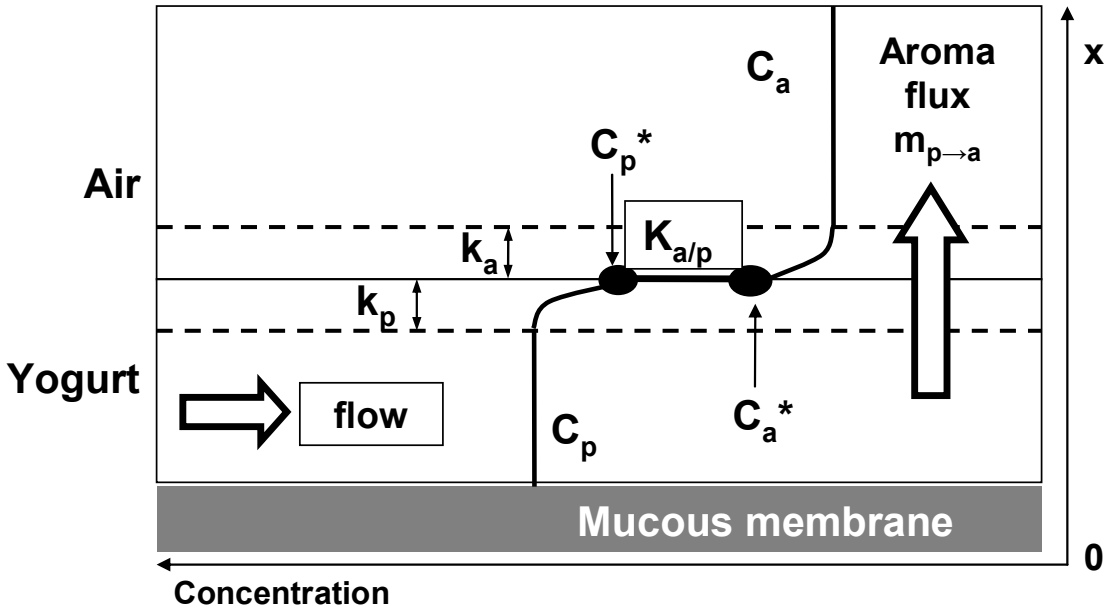


Figure P3-7 : Profile concentration of aroma compounds in the mouth or in the throat during yogurt consumption.
With k_p and k_a the local mass transfer coefficients (m.s^{-1}) of the product phase and air phase respectively, C_a and C_p are the concentrations (kg·m^{-3}) of the compound respectively in the air phase and in the product, $K_{a/p}$ the dimensionless (kg.m^{-3}/kg.m^{-3}) partition coefficient and C_p^* the concentration at the product/air interface at equilibrium (kg·m^{-3})

Physical mechanisms which could explain these differences between MT- and MT+ yogurts in aroma transfer were investigated. The mass transfer of flavour compound from the yogurt to the air phase, in convective and isothermal conditions, illustrated in **figure 7**, can be described by the following equation (*34*):

$$\dot{m}_{p\to a} = K_{ov} A \left(C_p - C_p^*\right) \qquad (1)$$

where $\dot{m}_{p\to a}$ is the mass transfer flux of a flavour compound (kg.s^{-1}), K_{ov} is the overall mass transfer coefficient of the compound (m.s^{-1}), A is the surface area of mass transfer (m²), C_p is the concentration of the compound in the product (kg·m^{-3}) and C_p^* is the concentration of the

compound at the product/air interface (kg·m^{-3}). C_p^* is an equilibrium concentration in the product phase and can be determined from the thermodynamical equilibrium at the product - gas interface through the partition coefficient ($K_{a/p}$), defined as:

$$K_{a/p} = \left[\frac{C_a}{C_p}\right]_{\text{at equilibrium}} \quad (2)$$

where C_a and C_p are the concentration (kg·m^{-3}) of the compound respectively in the air phase and in the product, $K_{a/p}$ is the dimensionless (kg.m^{-3}/kg.m^{-3}) partition coefficient..

Based on this mass transfer equation (equation 1), differences in flavour release can be explained by each term of the equation:

a difference in driving force of masse transfer $\left(C_p - C_p^*\right) = \left(C_p - \frac{C_a}{K_{a/p}}\right)$ (3)

a difference in overall mass transfer coefficient, K_{ov}

a difference in the surface area of mass transfer, A

The overall mass transfer resistance ($1/K_{ov}$) can be expressed as two local mass transfer resistances (product and air) as follows:

$$\frac{1}{K_{ov}} = \frac{1}{k_p} + \frac{1}{k_a K_{a/p}} \quad (4)$$

where k_p and k_a are the local mass transfer coefficients (m.s^{-1}) of the product phase and air phase respectively. Each local mass transfer coefficient depends on the hydrodynamic conditions of the respective phase, on the geometry of the system and on the diffusion coefficient of the compound.

Considering equations (1), (3) and (4) the main parameters that explain mass transfer are (i) the partition coefficient at the air product interface, (ii) the local mass transfer coefficient in the product and (iii) the surface area of mass transfer. We can reasonably consider that the local mass transfer in the gas phase is not dependent on the complex viscosity of the product. Step by step, these three hypotheses have been investigated.

First, the interactions between the aroma compounds and the matrices were investigated by headspace measurements in static conditions. No significant difference of aroma compound retention between MT+ and MT- yogurts has been observed for a very large majority of compounds (16 on the 17 of the strawberry flavour for MPO yogurt) (*35*). Secondly, the

diffusivities of some key aroma compounds of the strawberry flavour in yogurts were determined. Even if higher apparent diffusion coefficients were obtained in MT+ yogurt than in MT- yogurt, their variations between yogurts were quite low and could not explain the in-nose aroma release differences observed between the yogurts (*36*). These results were in agreement with the study of Gostan et al. (*37*) who investigated aroma compound self diffusion measurement by NMR on carrageenan gel with different structure.

The influence of the shear rate was studied on specific equipment simulating the shear rate in mouth conditions (*38*). This equipment permits to study the influence of shear rate on flavour release without any modification of the mass transfer surface area. Results showed that no difference in aroma release under shear rate was observed between the yogurts of different complex viscosities at 10°C as at 25°C (*35*). However, when consuming yogurt, the mass transfer is not really in isothermal condition during the first seconds. The heat transfer was studied on yogurts with different complex viscosity (induced by mechanical treatment and by addition of thickener) by Paci Kora *et al.* (*18*) on low fat yogurts. Results showed no difference in heat transfer between yogurts.

By eliminating the various assumptions successively, it seems that the difference in surface area could be the main mechanism which could explain the difference in flavour release.

During yogurt consumption, the low viscous yogurts (MT+) can cover more extensively the mucous membranes of the mouth and the throat. Consequently, these yogurts could develop a greater exchange surface area for the mass transfer of aroma compounds from the product to the air flow of breath. Since the quantity of flavor compound transferred from the product to the air phase is directly proportional to the exchange area (equation 1), the higher the surface exchange, the higher the release after swallowing.

The hypothesis of the role of the exchange area was also confirmed with the study of yogurts with different protein composition. Protein composition modifications induced less significant effects, whatever the mechanical treatment was, suggesting that complex viscosity variation seemed to prevail over physicochemical interaction in the in-nose aroma release and subsequent perception.

The *in vivo* measurement variability suggests that *in vitro* methods (artificial mouth) could be a useful experimental tool in order to identify the limiting step of mass transfer under controlled conditions. Further experiments are in progress to validate our hypothesis on the mechanisms involved in flavor release during yogurt consumption. For this, the equilibrium between adhesion and flow forces on mucous membrane will be investigated in order to better

understand the development of surface exchange area in mouth and in throat and thus to predict the aroma release.

ABBREVIATION USED

CAS yogurt: caseinate-enriched yogurt, MPO yogurt: milk powder-enriched yogurt, WP yogurt: whey protein-enriched yogurt, APCI-MS: Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry, MT-: low mechanical treatment, MT+: high mechanical treatment, Imax1: maximum intensity of Phase 1 of the release profile, Imax2: maximum intensity of Phase 2 of the release profile, AUC1: area under the curve of Phase 1 of the release profile, AUC2: area under the curve of Phase 2 of the release profile, S_{50-60}: area under the 10 last seconds of the curve, ANOVA: Analysis of Variance, SNK: Student Newman Keuls, PCA: Principal Component Analysis.

ACKNOWLEDGMENT.

This work was supported by the French government (CANAL-ARLE project). The authors gratefully acknowledge the scientific contribution of the participants. The authors are indebted to A.G. Valade for its technical support for APCI-MS measurement. We would also like to thank G. Wagman for revising the English version of the manuscript.

LITERATURE CITED

(1) Taylor, A.J., Linforth, R.S.T., Harvey, B.A., Blake, A. Atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry for in vivo analysis of volatile flavour release. Food Chem. 2000, 71,(3): p. 327-338.

(2) Lindinger, W., Hansel, A., Jordan, A. Proton-Transfer-Reaction Mass Spectrometry (PTR-MS): On-line monitoring of volatile organic compounds at pptv levels. Chem. Soc. Rev. 1998, 27: p. 347-354.

(3) Brauss, M.S., Linforth, R.S.T., Cayeux, I., Harvey, B., Taylor, A.J. Altering the fat content affects flavor release in a model yoghurt system. J. Agric. Food Chem. 1999, 47: p. 2055-2059.

(4) Weel, K., Boelrijk, A., Alting, A., Van Mil, P., Burger, J., Gruppen, H., Voragen, A., Smit, G. Flavor Release and Perception of Flavored Whey Protein Gels : Perception is Determined by Texture Rather than by Release. J. Agric. Food Chem. 2002, 50: p. 5149-5155.

(5) Mestres, M., Moran, N., Jordan, A., Buettner, A. Aroma release and retronasal perception during and after consumption of flavored whey protein gels with different textures. 1- in vivo release analysis. J. Agric. Food Chem. 2005, 53: p. 403-409.

(6) Mei, J., Reineccius, G.A., Knighton, W., Grimsrud, A. Influence of strawberry yogurt composition on aroma release. J. Agric. Food Chem. 2004, 52: p. 6267-6270.

(7) Boland, A.B., Delahunty, C.M., van Ruth, S.M. Influence of texture of gelatin gels and pectin gels on strawberry flavour release and perception. Food Chem.. 2006, 96: p. 452-460.

(8) Buffo, R.A., Rapp, J.A., Krick, T., Reineccius, G.A. Persistence of aroma compounds in human breath after consuming an aqueous model aroma mixture. Food Chem.. 2005, 89: p. 103-108.

(9) Harvey, B., Barra, J. Real time breath and headspace analysis of flavour volatiles. Europ. J. Pharmaceutics Biopharmaceutics. 2003, 55: p. 261-269.

(10) Weel, K., Boelrijk, A., Burger, J., Verschueren, M., Gruppen, H., Voragen, A., Smit, G. New device to simulate swallowing and in vivo aroma release in the throat from liquid and semiliquid food systems. J. Agric. Food Chem. 2004, 52: p. 6564-6571.

(11) van Ruth, S., Buhr, K. Influence of mastication rate on dynamic flavour release analysed by combined model mouth/proton transfer reaction - mass spectrometry. Int. J. Mass Spectrom. 2004, 239: p. 187-192.

(12) Pangborn, R.M., Szczesniak, A. Effect of hydrocolloids and viscosity on flavor and odor intensities of aromatic flavor compounds. J. Texture Studies. 1974, 4: p. 467-482.

(13) Wendin, K., Solheim, R., Allmere, T., Johanson, L. Flavour and texture in sourmilk affected by thickeners and fat content. Food Qual. Pref.. 1997, 8,(4): p. 281-291.
(14) Andriot, I., Harrison, M., Fournier, N., Guichard, E. Interactions between methyl ketones and b-lactoglobulin: Sensory analysis, headspace analysis, and mathematical modeling. J. Agric. Food Chem. 2000, 48,(9): p. 4246- 4251.
(15) Hollowood, T.A., Linforth, R.S.T., Taylor, A.J. The effect of viscosity on the perception of flavour. Chem. Senses. 2002, 27: p. 583-591.
(16) Saint-Eve, A., Juteau, A., Atlan, S., Martin, N., Souchon, I. Protein composition affects the physical properties and the aroma release of flavored stirred yogurt. J. Agric. Food Chem. 2006, 54: p. 3997-4004.
(17) Saint-Eve, A., Lévy, C., Martin, N., Souchon, I. Influence of proteins on the perception of flavored stirred yogurts. J. Dairy Sci. 2006, 89,(3): p. 922-933.
(18) Paçi Kora, E., Souchon, I., Latrille, E., Martin, N., Marin, M. Composition Rather Than Viscosity Modifies the Aroma Compound Retention of Flavored Stirred Yogurt. J. Agric. Food Chem. 2004, 52,(10): p. 3048-3056.
(19) Brown, W., Dauchel, C., Wakeling, I. Influence of chewing efficiency on texture and flavour perceptions of food. J. Texture Studies. 1996, 27: p. 433-450.
(20) Biosystèmes®, Fizz: logiciel de gestion de l'analyse sensorielle et des tests consommateurs. Couternon, France. 1999.
(21) SAS® User's Guide: Statistics. 1990, SAS Inst., Inc., Cary, NC.
(22) Statistica®. 2003, Statsoft Inst., Inc., France.
(23) Rychlik, M., Schieberle, P., Grosch, W. Compilation of odor thresholds, odor qualities and retention indices of key food odorants. 1998, Garching. Allemagne: TUM.
(24) Buettner, A., Beer, A., Hanning, C., Settles, M. Observation of the Swallowing Process by Application of Videofluoroscopy and Real-time Magnetic Resonance Imaging—Consequences for Retronasal Aroma Stimulation. Chem. Senses. 2001, 26: p. 1211-1219.
(25) Buettner, A., Beer, A., Hannig, C., Settles, M., Schieberle, P. Physiological and analytical studies on flavor perception dynamics as induced by the eating and swallowing process. Food Qual. Pref. 2002, 13: p. 497-504.
(26) Hansson, A., Giannouli, P., van Ruth, S. The influence of gel strength on aroma release from pectin gels in a model mouth and in-vivo, monitored with proton-transfer-reaction mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 2003, 51,(6): p. 4732-4740.
(27) Normand, V., Avison, S., Parker, A. Modeling the kinetics of flavour release during drinking. Chem. Senses. 2004, 29: p. 235-245.

(28) Baines, Z.V., Morris, E.R. Flavour/taste perception in thickened systems: the effect of guar gum above and below c*. Food hydrocolloids. 1987, 1 (3): p. 197-205.
(29) Wendin, K., Solheim, R., Allmere, T. Johanson, L. Flavour and texture in sourmilk affected by thickeners and fat content. Food Qual. Pref. 1997, 8,(4): p. 281-291.
(30) Wright, J. Creating and fomulating flavours" in Food Flavours Technology edited by A.J. Taylor 2002: p. 1-26.
(31) van Ruth, S., de Witte, L., Rey Uriarte, A. Volatile flavor analysis and sensory evaluation of custard desserts varying in type and concentration of carboxymethyl cellulose. J. Agric. Food Chem. 2004, 52: p. 8105-8110.
(32) Schreier, P. Quantitative composition of volatile constituents in cultivated strawberries, Fragaria ananassa cv. Senga Sengana, Senga Litessa and Senga Gourmella. J. Sci Food Agric. 1980, 31: p. 487-494.
(33) Rabe, S., Linforth, R.S.T., Krings, U., Taylor, A.J., Berger, R.G. Volatile release from liquids: a comparison of in vivo APCI-MS, in-mouth headspace trapping and in vitro mouth model data. Chem. Senses. 2004, 29: p. 163-173.
(34) Cussler, E. L. Diffusion. Mass Transfer in Fluid Systems. Cambridge, Edited by University Press, 1997.
(35) Saint-Eve, A. PhD thesis, Institut National Agronomique Paris-Grignon, Compréhension de la libération et de la perception d'arôme en conditions de consommation: Cas du yaourt brassé aromatisé. 2006, Paris, France.
(36) Déléris, I., Atlan, S., Tréléa, C., Lauverjat, C., Souchon I. Diffusivity measurements of aroma compounds from complex food gels: design of a new experimental device based on mass transfer modelling. IUFOST Congress, Nantes (France) 2006.
(37) Gostan, T., Moreau, C., Juteau, A., Guichard, E. and Delsuc, M. A. (2004). "Measurement of aroma compound self-diffusion in food models by DOSY." Magnetic Resonance in Chemistry 42, (6): p.496-499.
(38) Decourcelle N., Rondeau P., Lubbers S. Development and application of a "human mouth simulator" for liquid and semi-liquid foodstuffs, 2006 Submitted, J. Textures Studies.

III.2.2 Effet du cisaillement sur la libération des composés d'arôme en conditions in vitro

L'étude en condition *in vivo* de consommation a permis de mettre en évidence l'importance de la viscosité complexe des yaourts sur la libération des composés d'arôme et la perception olfactive. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer cet effet : i) importance de la déstructuration des matrices soumises au cisaillement en bouche en lien avec la mobilité des composés d'arôme, ii) importance de la surface d'échange développée en bouche qui est dépendante de la viscosité complexe des yaourts. Afin de répondre à cette première hypothèse, une étude en conditions dynamiques a été réalisée.

L'objectif de cette étude en conditions *in vitro* est de mettre en évidence l'importance du cisaillement et donc de la déstructuration de la matrice sur la libération des composés d'arôme dans des conditions d'agitation proches de celles de la bouche (Decourcelle *et al.*, 2006) et de températures contrôlées.

La cellule utilisée était couplée à l'APCI-MS afin de suivre en temps réel la libération des composés d'arôme au cours de la déstructuration de la matrice.

III.2.2.1 Les conditions de l'étude *in vitro*

La libération des composés d'arôme a été suivie par APCI-MS en conditions isothermes agitées et non agitées à 10°C.

Les courbes de réponse du signal APCI-MS correspondant à la libération des composés d'arôme de la formule fraise ont été obtenues dans trois yaourts :

- yaourt enrichi en protéines sériques à faible traitement mécanique (MT-),
- yaourt enrichi en protéines sériques à fort traitement mécanique (MT+),
- yaourt enrichi en poudre de lait à faible traitement mécanique (MT-).

Les courbes de libération des composés d'arôme ont été enregistrées sur deux phases, une première phase « statique » correspondant à la libération sans agitation et une phase « dynamique » où l'agitation était réalisée.

A partir des courbes de libération obtenues d'après le signal APCI-MS, certains paramètres ont été extraits en conditions agitées et non agitées, puis quantifiés et comparés pour les matrices de viscosité complexe variable.

Les résultats sont présentés en deux points : les conditions non agitées, puis les conditions agitées.

III.2.2.2 Effet du cisaillement sur la libération des composés d'arôme des yaourts de viscosité complexe variable

III.2.2.2.1 Conditions non agitées

En conditions non agitées, les seules quantités libérées de trois composés d'arôme (diacétyle, butyrate d'éthyle et hexanoate d'éthyle) permettent de discriminer significativement ($p < 0.1$) les trois yaourts à 10°C (Tableau 20).

	Ions	Composés d'arôme	Effet Produit	Effet Repetition	SNK « produit »		
$I_{non\ agitées}$	87	Diacétyle	p<0.1	NS	WP MT+ a	WP MT - a	MPO MT - a
$I_{non\ agitées}$	117	Butyrate d'éthyle	p<0.1	NS	WP MT + a	WP MT - b	MPO MT - b
$I_{non\ agitées}$	145	Hexanoate d'éthyle	p<0.1	NS	WP MT + a	MPO MT - b	WP MT - b
$I_{agitées}$	87	Diacétyle	p<0.05	p<0.05	WP MT + a	WP MT - b	MPO MT - c

Tableau 20 : Résultats de l'ANOVA à un facteur (produit) pour chaque composé d'arôme libéré dans les trois matrices (yaourt WP MT-, yaourt WP MT+, yaourt MPO MT-). Quantités mesurées en conditions dynamiques par APCI-MS.
Les différentes lettres traduisent des moyennes significativement différentes avec une valeur de $p < 0.05$, d'après le test SNK.
$I_{non\ agitées}$: intensité du signal APCI-MS avant cisaillement en conditions non agitées.
$I_{agitées}$: intensité maximale du signal APCI-MS après mise en route de l'agitation.

Les yaourts MPO et WP à faible traitement mécanique (MT-) ne sont pas discriminés (groupe identique selon le test SNK). Dans des conditions statiques, la cinétique de libération ne serait pas significativement différente entre les deux yaourts.

La comparaison des deux niveaux de traitement mécanique du yaourt WP montre une libération plus grande de butyrate d'éthyle et d'hexanoate d'éthyle pour le yaourt à fort traitement mécanique que celle à faible traitement mécanique. La même tendance est observée pour le diacétyle. Cependant pour ce composé d'arôme les deux produits enrichis en protéines sériques MT+ et MT- ne constituent pas de groupe différent selon le test SNK. Ces résultats montrent que, pour des matrices de composition identique, la cinétique de libération des composés d'arôme est plus rapide dans les matrices les moins visqueuses. Les variations des quantités libérées sont comprises entre 20 et 30% de variation entre les yaourts de traitement mécanique variable (où % = ((MT+ - MT-) / MT-) * 100).

Ces résultats en conditions non agitées complètent et confirment ceux obtenus sur la libération des composés d'arôme en conditions statiques, mis en évidence par les méthodes PRV et SPME et présentées dans le chapitre I.

III.2.2.2.2 Conditions agitées

En conditions agitées, un seul composé (diacétyle) permet de discriminer les trois yaourts, bien que l'effet répétition soit significatif. La diffusion de ce composé est la plus rapide dans le yaourt ayant la plus faible viscosité complexe (yaourt WP MT+), et la plus lente dans le yaourt ayant la plus forte viscosité complexe des trois yaourts testés (yaourt MPO MT-).
Cependant, il est difficile de discuter les résultats de la libération du diacétyle, puisque ce composé d'arôme présente un effet répétition significatif.
Ainsi, les résultats montrent que pour la très large majorité des composés d'arôme suivis par APCI-MS, la cinétique de libération des composés d'arôme en conditions dynamiques est similaire lorsque les yaourts étudiés sont soumis à une agitation constante et quelle que soit la viscosité complexe initiale du produit (Figure 36).

III.2.2.3 Conclusion sur l'effet du cisaillement sur la libération des composés d'arôme

Les résultats obtenus sur les paramètres de libération *in vitro* en conditions non agitées confirment ceux obtenus en conditions statiques. L'effet du traitement mécanique semble prédominant sur l'effet de la composition en protéine. Les résultats montrent que pour une composition identique en protéine, les composés d'arôme diffusent plus vite dans les yaourts les moins visqueux.
Les résultats obtenus en condition d'agitation montrent que lorsqu'une contrainte de cisaillement est appliquée aux yaourts de viscosité complexe variable, les quantités de composés d'arôme libérés par ces yaourts sont similaires. Ainsi des différences de libération observées sur des yaourts non agités ne sont plus observées lorsque ces derniers sont soumis à une agitation. Ces résultats permettent de conforter l'importance de la surface d'échange du produit développée en bouche sur la libération des composés d'arôme et par conséquent sur la perception olfactive.

Il aurait été intéressant d'étudier la libération des composés d'arôme en conditions agitées avec la cellule de cisaillement pour le yaourt enrichi en caséinate aux deux niveaux de traitement mécanique, puisque ces deux yaourts présentent les plus grandes variations de

viscosité complexe. Cependant pour des raisons de temps (ces expériences ayant été réalisées à l'UMR FLAVIC de Dijon), et d'échantillons disponibles, ces mesures n'ont pu être réalisés.

Cette étude a été menée en collaboration avec un autre travail de thèse du réseau CANAL ARLE (thèse Samuel Atlan). Une analyse mécanistique du système expérimental permettant le suivi de la libération des composés d'arôme est en cours d'élaboration dans le cadre de ce travail.

Un modèle physique de la libération des composés d'arôme comportant les phénomènes de diffusion (matrice) et de convection (gaz) a été développé. L'objectif est d'identifier des propriétés intrinsèques aux matrices et aux composés d'arôme (coefficients de partage et diffusion). Le modèle vise à s'approcher, au mieux, de la réalité en prenant en compte au cours du temps l'ensemble des conditions expérimentales (temps d'équilibre, géométrie, température, agitation, pertes, etc.) sur le système en conditions non agitées (transport par diffusion) puis en conditions agitées (transport par convection).

Ce travail étant en cours, les résultats concernant l'obtention des propriétés intrinsèques aux composés d'arôme et aux matrices ne sont pas rapportés dans ce chapitre et seront présentés dans la thèse de Samuel Atlan (prévue en décembre 2006).

III.2.3 Discussion et conclusion sur l'effet de la viscosité complexe sur la libération des composés d'arôme en conditions dynamiques

Cette étude en conditions *in vivo* a contribué à mieux comprendre l'impact de la viscosité complexe des yaourts sur la libération des composés d'arôme et la perception olfactive en conditions de consommation.

Des différences de perception olfactive ont été observées entre les yaourts de composition et de traitement mécanique variables et confortées par les quantités de composés d'arôme libérées en bouche.

A l'ingestion, pour des produits de même composition, la libération des composés d'arôme et l'intensité des propriétés olfactives des yaourts les moins visqueux sont plus élevées que celles des yaourts les plus visqueux. Ainsi les quantités de composés d'arôme libérées dans la cavité nasale sont corrélées avec les intensités perçues.

De plus, la composition en protéines influence la libération des composés d'arôme et la perception lorsque les yaourts présentent de larges variations de viscosité complexe et par conséquent de texture. Par contre, lorsque les yaourts ont subi un fort traitement mécanique conduisant à de faibles variations de viscosité complexe, la composition protéique n'a plus d'effet ni sur la libération des composés d'arôme, ni sur la perception temporelle.

Nous avons également montré que le traitement mécanique a un impact plus fort sur la viscosité complexe et donc sur la perception de texture que la composition en protéine.

Par conséquent, en bouche, les variations de viscosité complexe induites par le traitement mécanique ont un impact plus important sur la libération des composés d'arôme et la perception olfactive que lorsque ces variations sont dues à des modifications de la composition en protéine.

Ce travail a ainsi contribué à une meilleure compréhension de l'impact de la viscosité complexe sur la libération des composés d'arôme et sur la perception temporelle. Même si des différences physiologiques inter-individuelles conduisent à des différences d'ouverture/fermeture du voile du palais et des comportements différents de mastication/déglutition, comme présentées dans la partie de Contexte Bibliographique, les différences de viscosité complexe, dans cette étude, expliquent clairement les différences de libération des composés d'arôme lors de la consommation et également les différences de perception.

L'étude des **mécanismes physiques** peut expliquer les différences de transferts de composés d'arôme **entre les yaourts de niveaux de traitement mécanique variables (MT- et MT+).** Ces transferts ont été étudiés au cours de ce travail.

Les transferts de matière des composés d'arôme de la phase yaourt vers la phase gaz, en conditions convective et isotherme, peuvent être décrits selon l'équation suivante :

$$\dot{m}_{p\to a} = K_{ov} A \left(C_p - C_p^*\right) \qquad (1)$$

où $\dot{m}_{p\to a}$ est le flux de transfert de matière d'un composé d'arôme (kg.s^{-1}),

K_{ov} est le coefficient global de transfert de matière d'un composé (m.s^{-1}),

A est la surface (m²),

C_p est la concentration du composé dans le produit (kg·m^{-3}) et

C_p^* est la concentration du composé à l'interface produit/air (kg·m^{-3}). C_p^* est la concentration à l'équilibre dans la phase produit et peut être déterminé à partir de l'équilibre thermodynamique à l'interface produit-air par le coefficient de partage ($K_{a/p}$), défini ainsi :

$$K_{a/p} = \left[\frac{C_a}{C_p}\right]_{\text{at equilibrium}} \qquad (2)$$

où C_a et C_p sont les concentrations (kg·m^{-3}) des composés d'arôme respectivement dans la phase air et dans la phase produit.

Le coefficient de partage $K_{a/p}$ est sans dimension (kg.m^{-3}/kg.m^{-3}).

Basé sur l'équation de transfert de matière (équation 1), les différences de libération de composés d'arôme peuvent être expliquées par chacun des termes de l'équation :

- Différence de force motrice de transfert de matière $\left(C_p - C_p^*\right) = \left(C_p - \frac{C_a}{K_{a/p}}\right)$ (3)
- Différence du coefficient global de transfert, K_{ov}
- Différence de la surface disponible pour le transfert de matière, A.

La résistance globale du transfert de matière ($1/K_{ov}$) peut être exprimée comme deux résistances locales du transfert de matière (produit et air) présentées ci-dessous:

$$\frac{1}{K_{ov}} = \frac{1}{k_p} + \frac{1}{k_a K_{a/p}} \qquad (4)$$

où k_p et k_a sont des coefficients de transfert de matière local ($m.s^{-1}$) des phases produit et air. Chaque coefficient de transfert de matière est dépendant des conditions hydrodynamiques des phases respectives, de la géométrie du système et des coefficients de diffusion des composés d'arôme au sein des matrices yaourts.

En considérant les équations (1), (3) et (4), les principaux paramètres qui expliquent le transfert de matière sont :

(i) le coefficient de partage de l'interface air-produit,

(ii) le coefficient de transfert local dans le produit,

(iii) la surface d'échange du transfert de matière.

Il semble raisonnable de considérer que le transfert de matière local dans la phase air n'est pas dépendant de la viscosité complexe du produit.

Etape par étape, ces trois hypothèses ont été étudiées au cours de ce travail.

Tout d'abord, **les interactions entre les composés d'arôme et les matrices** ont été analysées par des mesures « headspace » en conditions statiques, comme présenté dans le complément en français qui fait suite à la publication n°2.

Aucune différence significative de rétention des composés d'arôme n'a été observée entre les yaourts MT- et MT+, et ceci pour une très large majorité de composés d'arôme (16 sur les 17 composés suivis par la méthode SPME pour le yaourt MPO).

Puis, les **coefficients de diffusion des principaux composés d'arôme** de la formule fraise ont été déterminés **dans les yaourts** (résultats obtenus au laboratoire LGMPA, Deleris, 2006). Même si des coefficients de diffusion apparents plus élevés ont été obtenus dans les yaourts MT+ que dans les yaourts MT-, **les variations entre les yaourts sont relativement faibles et ne peuvent pas expliquer les différences observées entre les yaourts**. Ces résultats sont confirmés par les données obtenues avec la cellule de cisaillement en conditions non agitées. De plus, ces résultats sont en accord avec ceux de Gostand *et al.* (2004), qui ont étudié l'auto-diffusion des composés d'arôme par RMN (résonance magnétique nucléaire) dans des gels de carraghénane de différentes structures.

L'influence du cisaillement sur la libération des composés d'arôme a été étudiée avec la cellule de cisaillement, dans des conditions d'agitation proches de celles en bouche. Cet équipement a permis d'étudier l'influence de l'agitation sur la libération des composés d'arôme sans aucune modification de la surface d'échange. Les résultats montrent **qu'aucune différence de libération des composés d'arôme** n'a été observée entre les yaourts de viscosités complexes différentes à 10°C, **soumis à une agitation constante**.

Lors des premières secondes de la consommation de yaourt, le transfert de matière n'est pas totalement en conditions isothermes. Le transfert de chaleur a été étudié par Paci Kora *et al.* (2004) sur des yaourts de différentes viscosités complexes (induites par des intensités variables de traitement mécanique et par ajout d'épaississant) sur des yaourts brassés à 0% de matière grasse. Les résultats ont montré qu'il n'y avait **pas de différence significative du transfert de chaleur entre des yaourts de viscosité complexe variable**.

Ainsi, suite à **l'examen des différents paramètres**, il semble que **les variations de surface d'échange seraient l'étape limitante du transfert de matière** qui pourrait expliquer les différences de libération de composés d'arôme selon la viscosité complexe des yaourts.
Lors de la consommation de yaourt, les yaourts les moins visqueux (MT+) peuvent recouvrir une plus grande surface de muqueuses de la bouche et de la gorge (étalement en bouche plus important). Par conséquent, ces yaourts peuvent développer une plus grande surface d'échange pour le transfert de matière des composés d'arôme du produit vers le flux d'air de respiration. Puisque la quantité de composés d'arôme transférée du produit vers la phase air est directement proportionnelle à la surface d'échange (équation 1), plus la surface d'échange est grande, plus la libération des composés d'arôme après déglutition va être élevée.
L'hypothèse du rôle de la surface d'échange est confirmée par l'étude des yaourts de composition en protéine variable. Les modifications de la composition en protéines induisent des effets significatifs moindres de libération des composés d'arôme en bouche, quelque soit le niveau de traitement mécanique. Ces résultats suggèrent que la viscosité complexe semble prédominer sur les interactions physicochimiques dans la libération des composés d'arôme dans la cavité nasale et par conséquent sur la perception.

Les résultats obtenus en conditions *in vitro* et *in vivo* suggèrent donc l'importance de la surface d'échange entre le produit et la cavité buccale pour expliquer la perception, et de ce fait l'importance de la structure et des propriétés rhéologiques du produit.
En conséquence, une plus grande surface d'échange entre le yaourt et la cavité buccale conduirait à des quantités plus importantes de composés d'arôme libérées par l'aliment au niveau de la cavité nasale et à l'origine d'une perception plus intense.

La viscosité complexe des produits est donc le paramètre clé qui influencerait l'étalement et la surface d'échange en bouche, conduisant à des différences de perception olfactive.

III.3 Quelle est l'influence de l'emballage sur la libération des composés d'arôme et la perception de yaourts à 0% et 4% de matière grasse au cours de leur conservation ?

Introduction

Afin d'aboutir à une formulation raisonnée d'un produit alimentaire aromatisé, il paraît nécessaire d'intégrer, dès sa conception, les propriétés des composés d'arôme et leurs évolutions au cours de la conservation et de la consommation de ce produit.

L'emballage protège le produit alimentaire et préserve ses qualités organoleptiques tout au long de sa conservation. Dans le cas du yaourt, l'emballage doit être résistant aux attaques acides, prévenir la perte de composés d'arôme et être imperméable à l'oxygène.

L'adsorption de composés d'arôme par les matériaux d'emballage peut influencer la perception olfactive du produit. L'adsorption doit donc être quantifiée et réduite au minimum. Elle peut être influencée par les propriétés des polymères, des molécules d'arôme, et également par les conditions externes au produit (durée de stockage, température de stockage...). L'étude de la littérature montre que l'influence du type d'emballage sur les produits laitiers frais a été peu étudiée et est basée sur les caractéristiques physicochimiques de systèmes modèles. Une plus grande attention est portée aux produits de longue conservation, tels que le jus d'orange.

Nous nous sommes intéressés à l'impact de l'emballage sur la perception aromatique des yaourts par une démarche couplant analyses physicochimiques et sensorielles.

Pour étudier l'influence du type de polymère (polypropylène ou polystyrène) sur les caractéristiques sensorielles et physicochimiques, nous avons étudié des yaourts brassés aromatisés au cours des 28 jours de stockage à 4°C. Les yaourts étudiés, à 0 et 4% de matière grasse, ont été aromatisés avec une formule fraise de 17 composés d'arôme.

Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'UMR SCALE de l'INRA de Massy, dans le cadre du projet CANAL-ARLE.

Cette étude a fait l'objet d'une publication intitulée « Sensory properties of flavoured stirred yogurt as affected by packaging material and storage time » (publication n°4) qui sera soumise en avril 2006 dans la revue internationale à comité de lecture International Dairy Journal.

Cette étude a également fait l'objet d'un poster dans le cadre d'un congrès : 11th Weurman Flavour Research Symposium. L'article associé est intitulé : « The integration of the packaging material in the formulation of flavoured yogurts: how to choose the kind of polymer in accordance with the yogurt composition? ». Il est présenté en annexe 2.

SENSORY PROPERTIES OF FLAVOURED STIRRED YOGURT AS AFFECTED BY PACKAGING MATERIAL AND STORAGE TIME.

A. Saint-Eve[1], C. Lévy[1], M. Le Moigne[1], V. Ducruet[2], I. Souchon[1]

[1] Unité Mixte de Recherche de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, Institut National Agronomique Paris-Grignon – Institut National de la Recherche Agronomique, 78850 Thiverval-Grignon, France.

[2] Unité Mixte de Recherche SCALE – Institut National de la Recherche Agronomique.

ABSTRACT:

The influence of the packaging polymer (polypropylene or polystyrene) on the sensory and physicochemical characteristics of flavoured stirred yogurts with either 0% or 4% of fat content was investigated during 28 days of storage at 4°C. Whatever the packaging type, the complex viscosity and the thickness perception increased during the storage due to exopolysaccharide production, whereas the pH of yogurts decreased. On both sensory and physicochemical characteristics, higher impact of packaging type was observed on 0% fat yogurts than on 4% fat yogurts. For 0% fat yogurt, yogurt conditioned in glass presented the lowest aroma quantity decrease during the storage of the three packaging, in accordance with the olfactory properties. But between the two polymer types, polystyrene packaging seems to be preferable in order to limit aroma compounds losses and subsequent fruity notes intensities and to avoid the development of odour and aroma defects for 0% and 4% fat yogurts. In general, the sensory properties were in agreement with the physicochemical measurements.

Key words: yogurt, polymer packaging, sensory profile, aroma release.

INTRODUCTION

Yogurt is a very popular fermented milk, widely consumed all over the world. To preserve its physicochemical and sensory characteristics during the storage, different packaging are used. However, the influence of the polymer properties on fresh dairy products evolution was few investigated.

Packaging is essential to protect the food product and to preserve its inherent quality during the storage. But, the sorption of aroma compounds by polymeric packaging (or "flavour scalping") may alter the organoleptic quality of the product, and results in a decrease of the olfactory intensity or a modification of the olfactory profile (Nielsen & Jagerstad, 1994; Van Willige, Schoolmeester, van Ooij, Linssen & Voragen, 2002).

Different factors can influence the sorption of aroma compounds by packaging: the type of packaging material, the nature of aroma compounds, the composition of the food matrices and the external environment (temperature, time of storage, humidity…) (Ducruet, Fournier, Saillard, Feigenbaum & Guichard, 2001; Van Willige *et al.*, 2002). For example, polycarbonate or polyethylene terephthalate packaging, which can be considered as polar polymers, can absorb smaller quantities of apolar terpenes (limonene and myrcene) than a non-polar polymer material like linear low-density polyethylene or oriented polypropylene (Van Willige *et al.*, 2002). Moreover, by increasing the length of the carbon chain of aldehydes, the polarity decreased and consequently, absorption in non-polar packaging increased: hexanal with C6 carbon chain was less absorbed than the decanal (C10) (Van Willige *et al.*, 2002). The same phenomenon was observed for the sorption of esters, ketones and aldehydes on a polypropylene polymer (Nielsen & Jagerstad, 1994). The structure of a packaging polymer has also an influence on the sorption of aroma compound, because this last is only possible in the amorphous area of polymer. Thus, sorption of aroma by a polymer decreased with the increase of crystalline regions (Van Willige *et al*., 2002).

The temperature during storage is another parameter which influences flavour scalping. The aroma compound sorption by packaging polymers (linear low-density polyethylene and oriented polypropylene) increased with the storage temperature (from 4 to 40°C). This phenomenon can be explained by an increased mobility of the molecules which can be associated to a reduction in the crystalline areas due to the temperature increase (Van Willige *et al.*, 2002).

The influence of the packaging type on fresh dairy products was few studied and was often based on model systems (Van Willige, Linssen & Voragen, 2000). The products with a long time conservation as the orange juice caused more attention in literature. Linssen *et al.* have studied the sorption of aroma compounds from flavoured drink yogurts into packaging material (polyethylene) (Linssen, Verheul, Roozen & Posthumus, 1992). Even at low temperature (4°C), these authors observed a decrease of aroma compounds, but the impact on sensory properties was not investigated. Only few studies investigated the influence of packaging on the sensory properties (Pieper, Borgudd, Ackermann & Fellers, 1992; van Aardt, Duncan, Marcy, Long & Hackney, 2001). Among these studies, it was shown that an orange juice stored in glass bottle at 4°C for 24 weeks was not differentiated of a juice conditioned in a low-density polyethylene packaging, even though a reduction of d-limonene of up to 50% by absorption into the packaging was observed (Pieper *et al.*, 1992).

Therefore, the first objective of the present study was to investigate the impact of packaging type on sensory and physicochemical characteristics of flavoured fresh dairy products.

During the storage, some changes of these quality characteristics of yogurt may appear whatever the packaging. Indeed, the storage time can cause a decrease of the pH and a fall of the sourness of fresh dairy products (Abu-Jdayil & Mohameed, 2002; Lubbers, Decourcelle, Vallet & Guichard, 2004). In parallel, many authors showed that the yogurt viscosity increased during the storage period, (Martin, Skokanova, Latrille, Beal & Corrieu, 1999; Salvador & Fiszman 2004) explained by the postacidification which occurs during the storage.

Another modification during yogurt storage concerned the aroma compounds composition. For example, it was shown that aldehydes, terpenes and esters decreased strongly during the first three days of the storage in the headspace of flavoured dairy bases, then more slightly (Harasawa, Tateba, Ishizuta, Wakayama, Kishino & Ono, 1998). These results were in agreement with those of Lubbers *et al.*, who showed that the aroma quantities in the headspace above the flavoured stirred yogurts were significantly twice weaker at the 28^{th} day of storage at 10°C than at the 7^{th} day (Lubbers *et al.*, 2004). The authors explained it by an increase of the yogurt viscosity during the storage and thus by the stronger interactions between the aroma compounds and the matrices network. But no sensory study was performed.

The influence of fat on the physicochemical and sensory characteristics of yogurt has been extensively investigated (Brauss, Linforth, Cayeux, Harvey & Taylor, 1999; Tuorila, Sommardahl, Hyvönen, Leporanta & Merimaa, 1995; Sodini, Remeuf, Haddad & Corrieu,

2004). The increase of the fat content caused an increase of the yogurt viscosity as well as thick and compact attributes (Brauss *et al.*, 1999), and a decrease of the flavour perception explained by a decrease of the aroma compounds release (due to hydrophobic interactions between aroma compounds and fat) (De Roos, 1997; Guichard, 2002; Rabe, Krings & Berger, 2003).

If yogurt perception has been quite investigated in literature, the influence of the packaging type on flavoured fresh dairy products has been, to our knowledge, few studied. In this context, the aim of the present study was to investigate the influence of the kind of packaging polymers, the first one, a semi-crystalline polymer (polypropylene, PP) and the second one, a totally amorphous and vitrous polymer (polystyrene, PS) on both sensory and physicochemical characteristics of flavoured stirred yogurts during the storage. For that, yogurts flavoured with the same strawberry aroma with either 0% or 4% of fat content were investigated. The aroma release, the rheological properties and the olfactory and texture perceptions of yogurts were followed during 28 days of storage at 4°C.

MATERIALS AND METHODS

Yogurt manufacture

Two flavoured stirred yogurts were studied with either 0% or 4% fat content. The premix compositions for the two yogurts were detailed in Table 1.

Ingredients (suppliers)	*mix composition for 4% fat yogurt*	*mix composition for 0% fat yogurt*
Water (Volvic, France)	1 L	1 L
Low heat Skim milk powder (Ingredia, France)	135 g	135 g
Anhydrous Milk Fat (Lactalis, France)	0 g	40 g
Sugar (sucrose) (Daddy, France)	50 g	50 g
Dry matter	18.50%	22.50%

Table P4-1: Premix composition for yogurt preparation

For the 4% fat yogurt, the first stage of the manufacture of yogurts was the milk base reconstitution starting from an emulsion with a two-stage homogenizer (APV1000, APV, France). For the 0% fat yogurt, skim milk powder was mixed in water to reconstitute the milk.

Then the 2 milk bases were heated at 92°C for 5 minutes. The fermentation was carried out in a 7-L fermenter (SGI, France), thermostated at 44°C. The milks were inoculated with *Lactobacillus delbrueki* ss *bulgaricus* (LB18 incorporated in 0.005 % vol/vol in milk) and *Streptococcus thermophilus* (ST7 and ST143 in 0.01 % vol/vol) provided by Chr Hansen (Arpajon, France). Fermentation was stopped when the yogurt pH reached 4.6 and then stored at 4°C.

Yogurts were flavoured 24h after the fermentation with 0.1% (w/w) strawberry aroma containing 17 aroma compounds mixed with propylene glycol (Aldrich, France). Concentrations of aroma compounds ranged from 1.01 to 32.53 mg/kg in the yogurt (Table 2). The flavoring step was performed with a food processor (Kenwood, USA) under controlled conditions (2 kg of yogurt per batch, 30 seconds, 2.5 power). More details on fermentation and flavouring are given in Saint-Eve *et al.* (2006).

Aroma compounds (Aldrich, France)	*Concentration in yogurt (mg/kg)*
Butanoic acid	2.21
Decanoic acid	1.11
Hexanoic acid	1.12
Diacetyl	4.34
Ethyl acetate	17.88
Ethyl butyrate	27.24
Ethyl hexanoate	22.44
Ethyl octanoate	1.14
Methyl cinnamate	2.2
4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	18.47
g-decalactone	2.52
Hexanal	1.01
Z-3-hexenol	23.68
Limonene	2.23
Linalol	1.88
3-hydroxy-2-methyl-4H-Pyran-4-one	32.53
Vanillin	15.72

Table P4-2: Aroma compound composition of strawberry aroma mixed with propylene glycol and their concentrations (mg/kg) in yogurts.

After flavouring, the yogurts were immediately conditioned after flavouring starting from the same batch, in three different kinds of packaging: glass used as reference (G), polystyrene (PS, consisting of High Impact PS and Crystal PS at a 50/50 ratio) and polypropylene (PP).

Each kind of yogurt pot was capped with an adapted lid: aluminium and polyethylene for glass and PP; polyethylene and polypropylene for PS. The conditioning effect could be compared to a packaging effect since the mass-transferring surface of the covers is relatively weak. The thermo sealing of the covers was achieved with a domestic iron. Each pot contained 125g of yogurt. The yogurts were then stored at 4°C.

Sensory analysis

Subjects

The subjects were 15 members of the laboratory staff (from 22 to 41 years old, 6 women and 9 men) recruited according to their motivation and availability to pursue a 4-months study with two sessions per week. Six subjects had previous experience in sensory evaluation of dairy products but all 15 subjects were trained in preliminary sessions for this specific study. The panel was separated in two groups: panel 1 (8 subjects) who evaluated 0 % fat yogurts; panel 2 (7 subjects) who evaluated 4 % fat yogurts. At the second day of storage, the two panels evaluated the yogurts at the two levels of fat content (0% and 4%).
Nine sessions of training were carried out and were described in Saint-Eve *et al.* (Saint-Eve, Lévy, Martin & Souchon, 2006

Training of the subjects

The generation of the attributes used for the sensory profile was carried out during a specific session where the 0% and 4% fat flavoured stirred yogurts of the study were presented. A list of 58 attributes was composed. In a subsequent session, the subjects agreed on a reduced list of 30 attributes (Table 3) related to texture in mouth (M), odour (O), aroma (A) and taste (T). Flavour is defined as the combination of olfactory, gustatory and trigeminal sensations perceived during tasting (NF ISO 5492, 1995). In our study, the term odour refers to the direct olfactory component of flavour (orthonasal perception) and the term aroma to the organoleptic attribute perceptible by the olfactory organ via the back of the nose, *i.e*. retronasal olfactory perception when tasting (NF ISO 5492, 1995).

Odour attributes	*Aroma attributes*	*Taste attributes*	*Texture-in-mouth attributes*
O-Overall intensity	A-Overall intensity	T-Sweet	M-Thick
O-Lacteous	A-Lacteous	T-Sour	M-Unctuous
O-Fruity	A-Fruity		M-Astringent
O-Solvent	A-Strawberry		
O-Butter	A-Kiwi		
O-Caramel	A-Pineapple		
O-Vanillin	A-Apple		
O-Animal	A-Peach		
O-Defect	A-Solvent		
O-Green	A-Green		
	A-Caramel		
	A-Vanillin		
	A-Butter		
	A-Animal		
	A-Defect		

Table P4-3: List of the 30 attributes used for the descriptive analyses. O: odor (orthonasal perception), A: aroma (retronasal perception), T: Taste, M: texture in mouth.

Sensory procedure

Before each sensory evaluation, yogurt samples were served in white isothermal pots (40g/pot) and stored one night at 4°C. The yogurts were presented in 3-digit coded. The samples were approximately at 10°C when they were tested. Subjects had mineral water and plain crackers as palate cleansers between samples. Sessions were carried out in an air-conditioned room under white lighting in individual booths. Data acquisition was assisted by FIZZ software (Biosystèmes® 1999).

The samples were presented in a monadic way and tasted according to a Latin square experimental design for each subject for the descriptive analysis at the 2^{nd}, 14^{th} and 28^{th} days of storage. The reference product conditioned in glass was replicated within the session at the 14^{th} and 28^{th} day of storage, which means that four products were tested at these sessions. The subjects evaluated the perceived intensity for each attribute on an unstructured scale anchored with the terms "very weak" and "very intense". The attributes were evaluated in the following order: odour, aroma, taste and texture in mouth. For a single subject, the order of presentation of the products was the same whatever the replication. The yogurt pots were distributed one

by one to the subjects in order to limit product heating. A replication was performed for the session at the 14th day of storage.

Physico-chemical analysis

pH measurement

The yogurt pH was measured at 4°C with a pH-metric probe (Mettler Toledo, France). Each measurement was carried out at the same date as the sensory analysis sessions.

Rheological properties

The complex viscosity of yogurts was measured using a controlled-stress rheometer (model RS1, Haake, Germany), equipped with a cone and plane geometry (60 mm diameter, 2° angle and 117 µm gap). Rheological measurements were taken during a sweeping in constraint in harmonic mode. A slope of constraints ranging between 0.1 Pa and 100 Pa, with a frequency of 1 Hz was exerted. Measurements were carried out at 10°C. Details were given in Saint-Eve *et al.* (Saint-Eve, Juteau, Atlan, Martin & Souchon, 2006).

Aroma compounds release

Aroma release measurements were performed at 4°C, corresponding to the storage temperature of yogurts. The Solid-Phase Microextraction (SPME) method was used to quantify the aroma compounds of the strawberry aroma release in the vapor phase above the different yogurts.

A gas chromatograph flame ionization detector (GC-FID HP6890, Germany) combined with an automatic headspace sampler CombiPal (CTC Analytics, Switzerland) was used. A 2h-extraction with a polydimethylsiloxane fiber (PDMS, 100 µm film thickness) was performed. The oven temperature was programmed from 50°C to 70°C at 4°C/min, and from 70°C to 170°C at 5°C/min and from 170°C to 220°C (maintained for 6 min) at 8°C/min. Results obtained from SPME were expressed as area units. Each headspace analysis was done in triplicate (details given in Saint-Eve *et al.*, 2006).

Product codes

The products were coded as follow: f-p-tx. “f” was the level of fat content (0% or4%), “p” was the packaging type (g for glass, PP for polypropylene and PS for polystyrene) and “tx”

was the time of storage (t2 for the second day of storage, t14 for the 14th day of storage and t28 for the 28th day of storage).

Data analysis

All data analysis were performed using SAS software package, version 9.1 (SAS® User's Guide: Statistics 1990).

The fat content effect was only investigated at the 2nd day by a one-way analysis of variance (ANOVA) (product) on the physicochemical data and by a three-way ANOVA (product, group, subject (group)) on the sensory data.

The influence of packaging and storage time was assessed on the sensory data by a three-way analysis of variance (ANOVA) (time, packaging, and subject) with interactions, where subject was treated as a random effect. The influence of packaging effect and storage time on physicochemical data set (pH, aroma release and complex viscosity) was analyzed by a two-way ANOVA (packaging, time) with interaction. When significant differences were revealed ($p < 0.05$), mean partition coefficients were compared using the Student-Newman-Keuls (SNK) multiple comparison test.

Principal component analysis (PCA) was performed to visualize the yogurt sample differences and the variable correlations from the discriminant sensory and instrumental data resulting from ANOVA.

RESULTS and DISCUSSION

First of all, the effect of fat content on the sensory properties and flavour release of yogurt at the second day of storage was introduced. Then, the effect of storage and packaging on low fat stirred yogurts was presented, following by the results for the 4% fat yogurts.

Influence of the fat content on the perception and flavour release of yogurt at the second day of storage

The fat content had a great influence on the yogurt sensory and instrumental characteristics as showed by the one-way ANOVA (Table 4). A significant effect of fat content was evidenced on 9 sensory attributes and on 7 aroma compounds release in yogurts conditioned in glass material at the second day of storage.

Factor	*Fat*	*Intensity means*			
Sensory variables	*p-value*	*0% fat*		*4% fat*	
O-Lacteous	0.032	1.96		3.48	
O-Green	0.041	3.37		1.38	
A-Overall intensity	0.043	6.59		5.73	
A-Fruity	0.038	6.52		4.7	
A-Kiwi	0.001	5.76		3.11	
A-Solvent	0.031	3.43		1.93	
A-Butter	0.062	0.83		1.75	
M-Thick	0.055	1.09		0.39	
M-Unctuous	0.0403	2.66		1.75	
Aroma compounds release		*Area peak means*			
Ethyl acetate	0.048	159	a	126.4	b
Ethyl butanoate	0.003	192.4	a	1459.1	b
Ethyl hexanoate	0.029	10334.5	a	3416.7	b
Ethyl octanoate	0.006	938.4	a	103.5	b
Hexanal	0.003	4562.6	a	292.2	b
Limonene	0.031	523.2	a	161.5	b
Linalol	0.041	221.7	a	95.4	b

Table P4-4: Significant effect of fat content (0% and 4%) on the sensory attributes (3-way ANOVA (Product, group, subject(group)) and aroma compounds release variables (2-way ANOVA (product, repetition)) at the 2nd day of storage conditioned in glass packaging. Probability levels associated with means and SNK comparison test.

The low fat yogurts were perceived less intense in lacteous and butter aroma than the 4% fat yogurts. On the contrary, the low fat yogurts were perceived more intense in green odour, overall intensity aroma, fruity aroma and solvent aroma than the 4% fat yogurts. The variation of fruity notes intensities between yogurts with and without fat were about 15 to 60%, with % variation defined as follow: ((0% fat yogurt intensity – 4% fat yogurt intensity) / 0% fat yogurt intensity)*100. These results were in agreement with the aroma compounds release above the yogurts: 7 aroma compounds were significantly less released in presence of fat in yogurt (Table 4). However, differences in release variation were revealed between the aroma compounds. Significant hydrophilic aroma compound (ethyl acetate) presented low variation of aroma release between the two levels of fat in yogurt (20% variation) and no significant effect of fat content was observed for diacetyl. On the contrary, the most hydrophobic aroma compounds presented great variations: an aroma quantity decrease of more than 60% variation was observed in 4% fat yogurts in comparison to 0% fat yogurts for ethyl butyrate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, hexanal, limonene and linalool.

These results were in agreement with several authors (De Roos, 1997; Brauss *et al.*, 1999; Folkenberg & Martens, 2003; Nongonierma, Springett, Le Quere, Cayot & Voilley, 2006). One interpretation is that fat acts as a solvent, reducing the aroma compound volatility and therefore causes a decrease in the amounts released. However, these effects depend on the physicochemical characteristics of the aroma compounds.

Low fat yogurts: storage and packaging effects

Effect of the storage on sensory and physicochemical properties of low fat stirred yogurts whatever the packaging

The rheological properties of yogurts were modified during the time of storage. A 71% increase of the complex viscosity was observed for the low fat yogurts between the 2nd and the 28th day of storage. In parallel, the low fat yogurts were perceived thicker during the storage (129% increase between the 2nd and the 28th day of storage). The increase of complex viscosity during the storage can thus explain the increase in thickness perception of yogurts.
The complex viscosity increase can be explained by the postacidification which occurs during the yogurt storage. This phenomenon reinforced the strength of the protein network by the exopolysaccharides production (residual activity of the micro-organisms), and by the acidification of the product due to the increase in lactic acid. Moreover, as other authors (Barrantes, Tamime, Muir & Sword, 1994; Martin *et al.*, 1999) we observed that major texture changes occurred during the first week of storage. The postacidification consequences on rheological properties and texture observed in this study confirmed the results of several authors who investigated the variation trends of texture sensory characteristics during the storage for fermented dairy products on viscosity (Barrantes *et al.*, 1994; Barrantes, Tamime, Sword, Muir & Kalab, 1996) and thickness (Biliaderis, Khan & Blank, 1992).

During the storage, the yogurt pH decreased from 4.30 to 4.11, which can be explained by the acidifying activity of the bacteria. This result was coherent with those of literature (Martin *et al.*, 1999; Abu-Jdayil & Mohameed, 2002). However, in this study, the yogurts were not discriminated by the sour characteristics. At the sensory level, the pH decrease did not result directly in perceived sourness but rather seemed to be expressed by sweet/sour balance: the difference between sour and sweet tastes increased with the time of storage (of 25 % between 2nd and the 28th day of storage for low fat yogurts).

Aroma release and olfactory perception of low fat stirred yogurts changed during the storage at 4°C, as illustrated in the principal component analysis (PCA) (Figure 1). The first factorial plot of PCA showed that the fruity notes perception and the aroma compounds quantity decreased from the 2nd to 14th day of storage. Indeed, the perceived olfactory intensities declined significantly during the first 14 days of storage like kiwi aroma, apple aroma and solvent aroma (Figure 2). In parallel, several aroma compounds had a significant and similar evolution during the storage: ethyl acetate, 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone and limonene significantly decreased during the 28 days of ageing. For example, 53.2% loss was observed for the limonene from the 2nd to the 28th day of storage with % variation defined as ((peak area at 28th day – peak area at 2nd day) / peak area at 28th day)*100 (Figure 3). Other aroma compounds such as ethyl butyrate, ethyl octanoate, ethyl hexanoate and γ-decalactone presented also a significant decrease during the storage, but this decrease was also depending on the packaging effect. Thus, the aroma release variations during the 14 first days of storage can explain the olfactory perception differences.

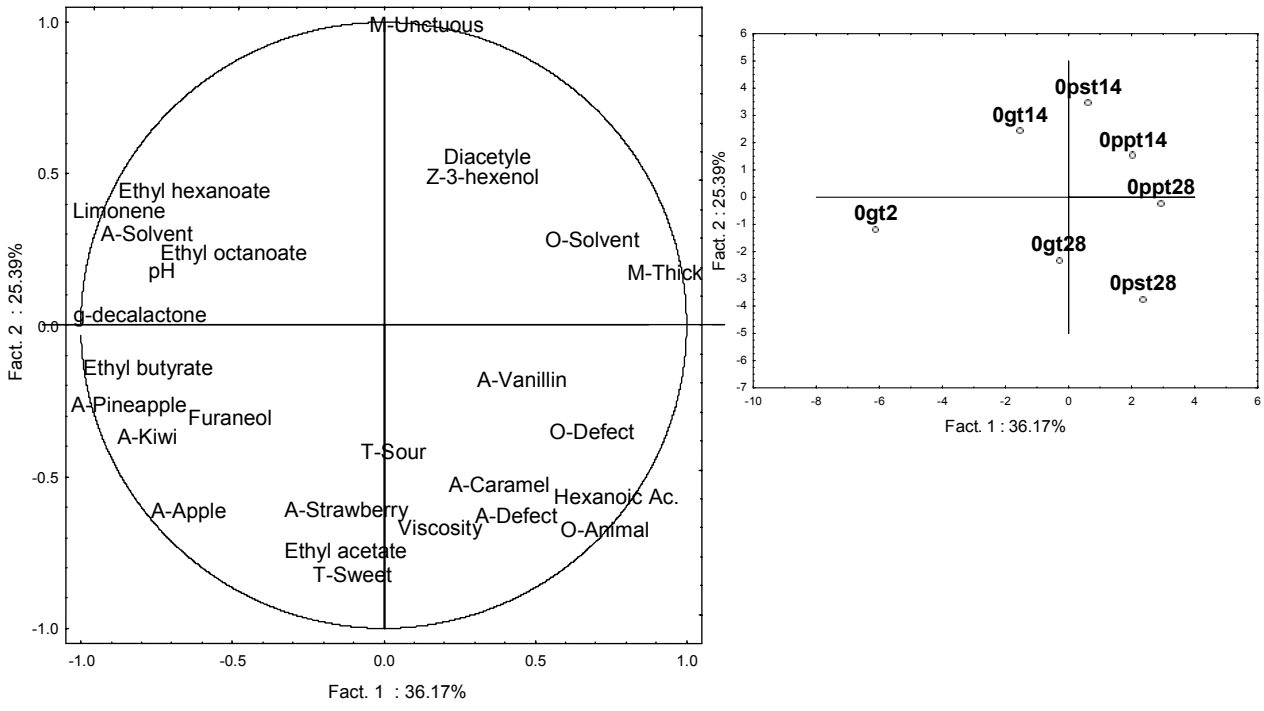


Figure P4-1: PCA biplot on the descriptive quantitative analysis scores of the 0% fat yogurts. a-variable map (sensory and physicochemical variables), b-product map.

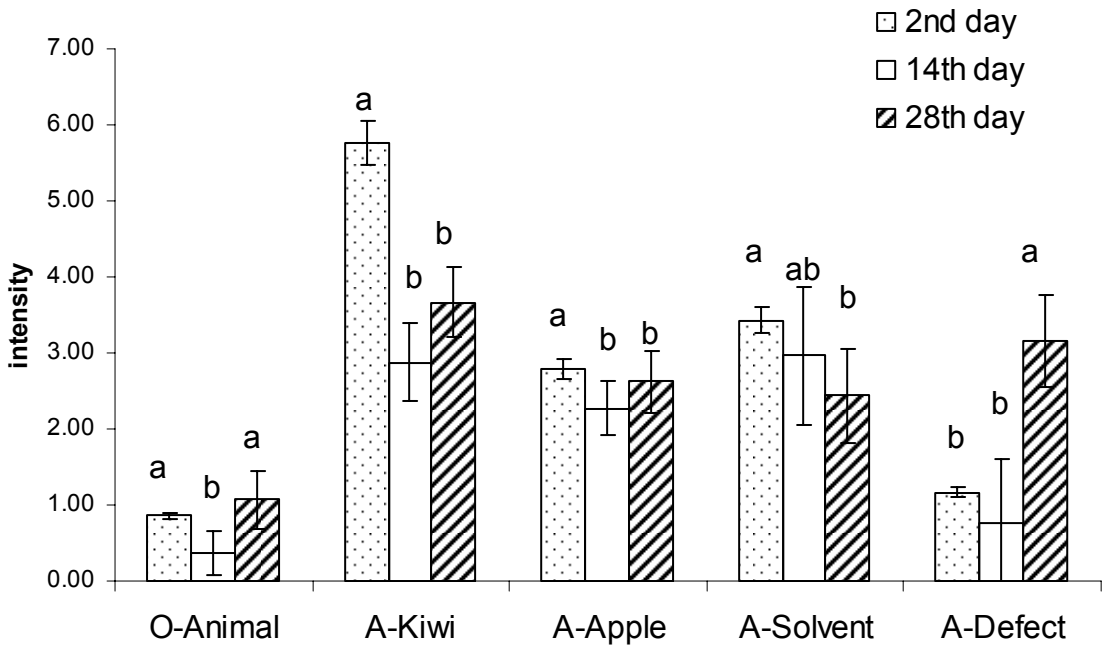


Figure P4-2: Influence of time of storage (2nd, 14th and 28th day of storage) on significant olfactory attributes averaged by packaging and subjects intensities for low fat stirred yogurt.

These results corroborated findings of Lubbers *et al.*, who observed a decrease of some aroma compounds (esters) in the headspace during the ageing of flavoured yogurts (Lubbers *et al.*, 2004). According to these authors, the changes in rheological properties observed during ageing could partly explain the results in aroma release. In addition, the hypotheses of bacterial digestion of some aroma compounds (aldehydes reduced to alcohols) in yogurt was proposed by Harasawa et al. (1998) and could explain the aroma decrease during the storage.

The 2nd axis of PCA illustrated mainly the evolution of yogurt between the 14th and the 28th day of storage. Hexanoic acid quantity increased strongly (+133% variation) and significantly ($p<0.02$) between the 14th and 28th day (Figure 3). This increase could be related to the increase of animal odour and defect aroma perception, especially between the 14th and the 28th day of storage (Figure 2).

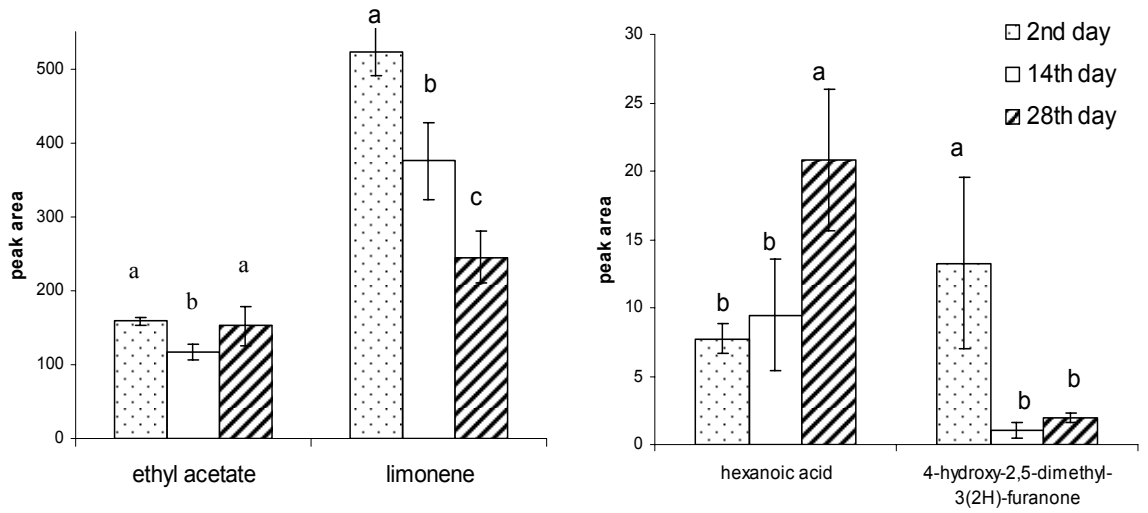


Figure P4-3: Influence of time of storage (2nd, 14th and 28th day of storage) on significant aroma compounds released (in peak area) measured by SPME method at 4°C for low fat stirred yogurt.
The letters a, b and c indicate means that significantly differ at $p<0.05$ (SNK test)

These results were in agreement with those of Harasawa *et al.*, who observed during the yogurt storage a decrease of aldehydes, esters and terpenes release and an increase of acids release (hexanoic, octanoic and decanoic acids) (Harasawa *et al.*, 1998). Moreover, Yazici & Akgun observed that the storage time had a negative impact on the flavour scores in yogurts. The most noted defects was acidity and rancid flavour for all samples at the end of the storage period (Yazici & Akgun, 2004).

The examination of the correlations between the sensory attributes showed negative texture-aroma correlations: thickness-kiwi aroma (r^2=-0.8), thickness-pineapple aroma (r^2=-0.78), thickness-apple aroma (r^2=-0.76). These results could be explained by physicochemical interactions between the aroma compounds and the exopolysaccharides, which increased during the storage. In opposite, the solvent odour was positively correlated with the thickness character (r^2=0.83). It could be explained by the increase of complex viscosity and hexanoic acid released quantity in the course of time and subsequent thickness and perceived solvent odour increase. In addition, taste-aroma correlations were observed: sweet-strawberry aroma (r^2=0.71), sweet-apple aroma (r^2=0.71) and sour-animal odour (r^2=0.78). A negative correlation was also observed between sweetness and unctuous characters (r^2=-0.81). These results corroborated the impact of aroma and taste on texture perception already observed, and sensory interactions between aroma and taste (Frank & Byram, 1988; Saint-Eve, Paci Kora & Martin, 2004).

Effect of the type of packaging on sensory and physicochemical properties of low fat stirred yogurts during the storage

The aroma compounds quantities above the low fat yogurts decreased during the storage whatever the packaging. However, yogurts conditioned in glass presented the lowest decrease of the three packaging types (Figure 1). The highest aroma quantities released above the yogurts was observed for yogurts conditioned in glass, especially for ethyl butyrate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate and γ-decalactone, as illustrated at the 14th day of storage in Figure 4. This result confirmed that glass is almost perfect barrier and inert, and do not interact with the packaged food to any considerable extent (Nielsen & Jagerstad, 1994).

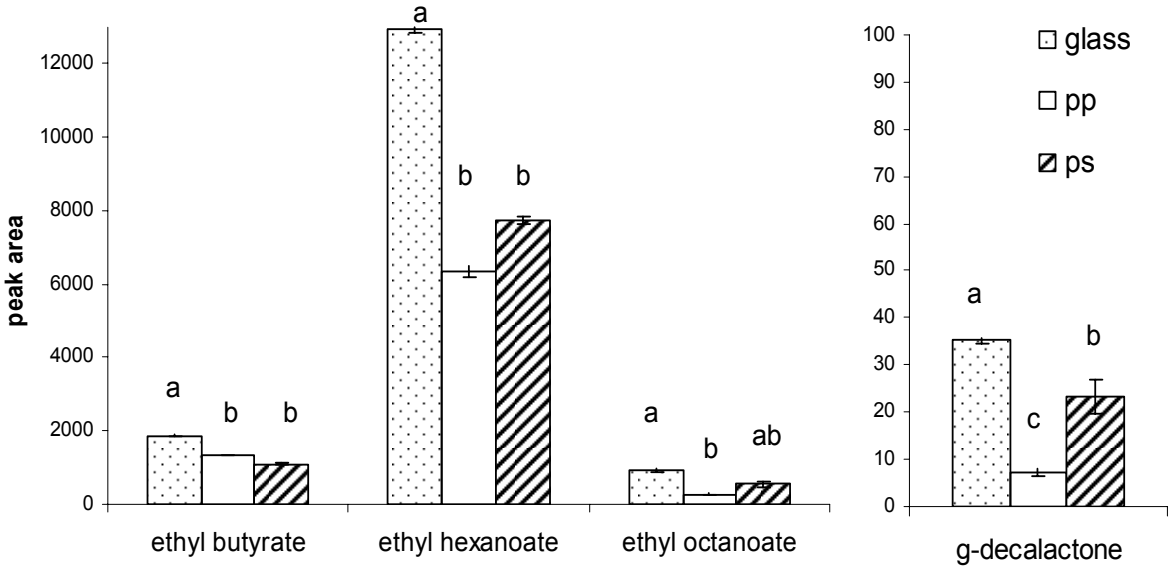


Figure P4-4: Influence of packaging type (glass, PS and PP) on significant aroma compounds released (in peak area) measured by SPME method at 4°C at the 14th day of storage for low fat stirred yogurt.
The letters a, b and c indicate means that significantly differ at $p<0.05$ (SNK test)

Concerning the polymer packaging, the significant effects were dependent on time effect. Between the 2nd and the 14th day of storage, the loss of some aroma compounds (ethyl butyrate, ethyl octanoate, ethyl hexanoate and γ-decalactone) was greater in yogurts conditioned in polypropylene packaging than in yogurts conditioned in polystyrene packaging (Figure 1). Then, a greater stabilization of aroma compounds release was observed for yogurts conditioned in polypropylene between the 14th and the 28th day of storage than for yogurts conditioned in polystyrene. Indeed, between the 14th and the 28th day of storage, the aroma compounds quantities, particularly for diacetyl and Z-3-hexenol decreased in yogurt

conditioned in PS and to a less extend in yogurt conditioned in PP (Figure 1). The properties of the polymers can explain the differences in the evolution of the yogurts in the course of time. At 4°C, polystyrene is totally amorphous in vitrous state, while polypropylene is a semi-liquid crystalline polymer in rubbery state. Thus, these differences in the structure can explain why the kinetics of sorption of aroma compounds were slower in polystyrene packaging than those in polypropylene packaging.

Concerning the influence of packaging on sensory properties, beyond 14 days, a stabilization of the olfactory properties of the flavoured yogurt was only observed when the latter was packed in a polypropylene pot. These sensory results were in agreement with the low change after the 14^{th} day of storage of the aroma release above the yogurts conditioned in polypropylene packaging.

In addition, hexanoic acid quantity increased after the 14^{th} day of storage, especially in yogurt conditioned in PS. Thus, yogurts conditioned in polypropylene presented a higher loss of aroma compounds responsible for fruity notes, but lower quantity of aroma compounds such as acids than yogurts conditioned in polystyrene packaging at the end of the storage. Moreover, yogurts conditioned in PS and glass materials developed similar odour and aroma defects during the storage time. Defect notes appeared at the end of the storage time, mainly for yogurts conditioned with polystyrene (Figure 1). Defect notes in yogurt conditioned in polystyrene yogurt can thus be explained by the great hexanoic quantity measured at the 28^{th} day of storage.

4% fat stirred yogurts: effect of the storage and packaging on sensory and physicochemical properties

Less significant effects of the storage and packaging were observed for yogurts with 4% fat content than for 0% fat yogurts. Indeed, only 10 sensory attributes differed significantly for 4% fat yogurts, whereas 17 ones differed for low fat yogurts. A stabilisation due to the physicochemical interactions between aroma compounds and fat and due to the slow diffusion of aroma compounds in fat could explain this result and was in agreement with those of other authors (Brauss *et al.*, 1999) on fresh dairy products.

Because of the lipophilic character of many aroma compounds, the yogurt with 4% fat content could lose less aroma compounds by absorption into packaging than the 0% fat yogurt. These results were in agreement with Van Willige *et al.*, who observed that very small amounts of oil added to an aqueous system can significantly decrease the absorption of the aroma compounds by the linear low-density polyethylene packaging (Van Willige *et al.*, 2000).

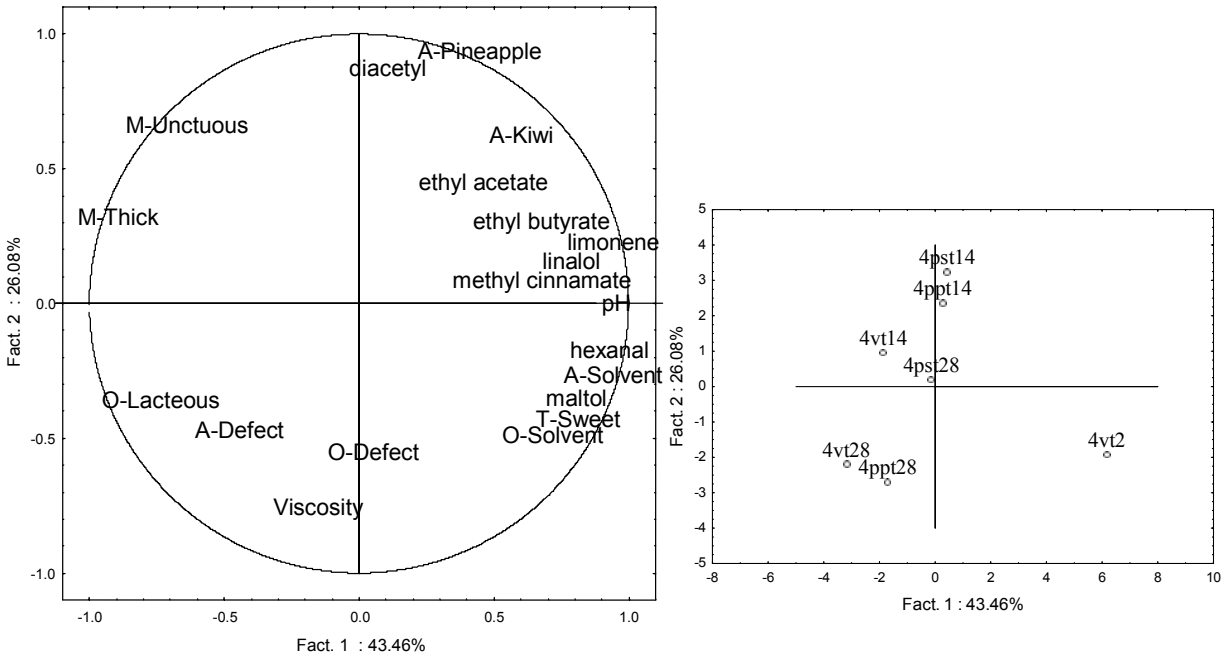


Figure P4-5: PCA biplot on the descriptive quantitative analysis scores of the 4% fat yogurts. a-variable map (sensory and physicochemical variables), b-product map.

The PCA (Figure 5) was performed on the set of significantly discriminant attributes and physicochemical variables. The first two principal components accounted for 69.5% of the data variance. Yogurts were discriminated along the first axis according to their aroma compounds release and their texture perception. Some aroma compounds responsible for fruity notes (limonene, linalool and hexanal), the solvent odour and the sweet taste were opposed to the thickness perception and the lacteous odour. The first factorial axis exhibited a ranking of the samples conditioned in glass according to the time of storage. The majority of the aroma compound presented the highest quantities in yogurt at the 2nd day of storage. Then, a decrease of aroma compounds quantities during ageing was observed, whereas the yogurt thickness and the lacteous odour increased.

The second factorial axis showed that between the 14th and the 28th day of storage, the pineapple aroma intensity and the diacetyl quantity decreased, whereas the yogurt complex viscosity increased (67% variation). These results confirmed those already observed in low fat yogurts. Moreover, the yogurts conditioned in polymers at the 14th and the 28th day of storage were differentiated. At the 28th day, the yogurt conditioned in polystyrene had a diacetyl quantity and pineapple aroma intensity higher than the two others yogurts and was perceived less intense in odour and aroma defects than the two others. Thus, a polystyrene packaging

seems to be preferable to avoid loss of fruity notes and a great development of odour and aroma defects in flavoured yogurts used in the present study.
The decrease of fruity notes for the 4% fat yogurt was rather observed between the 14th and the 28th day of storage, instead of between the 2nd day and the 14th day of storage for the 0% fat yogurt. Fat plays thus a protective role in the fruity quality of the yogurt.

CONCLUSION

This work shows the influence of the type of packaging during the storage on physicochemical and sensory properties of flavoured stirred yogurts.
The analyses of the yogurts in the course of time at 4°C, highlighted, for all kinds of packaging, a fast evolution of the low fat yogurts during the first 14 days at the physicochemical and sensory levels. For the 4% fat yogurts, a fruity notes decrease was observed between the 14th and the 28th day of storage. However, less significant effects were observed for yogurts with 4% fat content than for low fat yogurts.
Concerning the packaging effects, a polystyrene packaging seems to be preferable to avoid a loss of fruity notes for 0% and 4% fat yogurts and a limited development of odour and aroma defects, particularly for 4% fat yogurts.
The physicochemical results (complex viscosity, pH values and aroma release above the yogurts) are in agreement with the sensory properties of the yogurts.
This study contributes to a better understanding of the impact of packaging on the physicochemical and sensory properties. It shows the need of integrating the packaging type in the flavoured dairy product formulation, even if yogurt has a short conservation time and is stored at low temperature. Further experiments are in progress to study the quantity of aroma compounds sorbed by packaging material.

Acknowledgements
This work was supported by the French government (CANAL-ARLE project). The authors gratefully acknowledge the scientific contribution of the participants. We would also like to thank G. Wagman for revising the English version of the manuscript.

Appendix

G: glass, PP: polypropylene, PS: polystyrene, SPME: Solid Phase MicroExtraction, PDMS: Polydimethylsiloxane, M: mouth, O: Odour, A: Aroma, T: Taste, ANOVA: analysis of variance, PCA: principal component analysis, SNK: Student Newman Keuls.

LITERATURE CITED

Abu-Jdayil, B. & Mohameed H. (2002). Experimental and modelling studies of the flow properties of concentrated yogurt as affected by the storage time. *Journal of Food Engineering,* 52: 359-365.

Barrantes, E., Tamime, A.Y., Muir, D.D. & Sword, A.M. (1994). The effect of substitution of fat by microparticulate whey protein on the quality of set-type, natural yogurt. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 47(2): 61-68.

Barrantes, E., Tamime, A.Y., Sword, A.M., Muir, D.D. & Kalab, M. (1996). The manufacture of set-type natural yoghurt containing different oils .1. Compositional quality, microbiological evaluation and sensory properties .2. Rheological properties and microstructure. *International Dairy Journal,* 6: 827-837.

Biliaderis, C.G., Khan, M.M. & Blank, G. (1992). Rheological and sensory properties of yogurt from skim milk and ultrafiltered retentates. *International Dairy Journal,* 2: 311-323.

Biosystèmes® (1999). "Fizz: logiciel de gestion de l'analyse sensorielle et des tests consommateurs. Couternon, France.".

Brauss, M.S., Linforth, R.S.T., Cayeux, I., Harvey, B. & Taylor, A.J. (1999). Altering the fat content affects flavor release in a model yoghurt system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 47: 2055-2059.

De Roos, K.B. (1997). How lipids influence food flavor. *Food Technology* 51(1): 60-62.

Ducruet, V., Fournier, N., Saillard, P., Feigenbaum, A. & Guichard, E. (2001). Influence of Packaging on the Aroma Stability of Strawberry Syrup during Shelf Life. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 49(5): 2290-2297.

Folkenberg, D.M. & Martens M. (2003). Sensory properties of low fat yoghurts. Part A: Effect of fat content, fermentation culture and addition of non-fat dry milk on the sensory properties of plain yoghurt. *Milchwissenschaft,* 58: 154-157.

Frank, R.A. & Byram J. (1988). Taste-smell interactions are tastant and odorant dependent. *Chemical Senses,* 13(3): 445-455.

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

Harasawa, N., Tateba, H., Ishizuta, N., Wakayama, T., Kishino, K. & Ono, M. (1998). Flavor deterioration in yogurt. *Process-Induced Chemical Changes in Food.* (pp.285-296) Shahidi. New York, Plenum Press.

Linssen, J.P.H., Verheul, A., Roozen, J.P. & Posthumus, M.A. (1992). Absorption of flavour compounds by packaging material: Drink yoghurts in polyethylene bottles. *International Dairy Journal***,** 2(1): 33-40.

Lubbers, S., Decourcelle, N., Vallet, N. & Guichard, E. (2004). Flavor release and rheology behavior of strawberry fatfree stirred yogurt during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10): 3077-3082.

Martin, N.C., Skokanova, J., Latrille, E., Beal, C & Corrieu, G. (1999). Influence of fermentation and storage conditions on the sensory properties of plain low fat stirred yogurts. *Journal of Sensory Studies,* 14: 139-160.

Nongonierma, A., Springett, M., Le Quere, J.L., Cayot, P. & Voilley, A. (2006). Flavor release at gaz-matrix interfaces of stirred yoghurt models. *International Dairy Journal,* 16: 102-110.

Nielsen, T. & Jagerstad M. (1994). Flavour scalping by food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 5: 353-356.

Pieper, G., Borgudd, L., Ackermann, P. & Fellers, P. (1992). Absorption of aroma volatiles of orange juice into laminated carton packages did not affect sensory quality. *Journal of Food Science,* 57(6): 1408-1411.

Rabe, S., Krings, U. & Berger, R.G. (2003). Influence of oil-in-water emulsion characteristics on initial dynamic flavour release. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83: 1124–1133.

Saint-Eve, A., Juteau, A., Atlan, S., Martin, N. & Souchon, I. (2006). Complex viscosity induced by protein composition variations influences the aroma release of flavored stirred yogurt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* in press.

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

Saint-Eve, A., Paci Kora, E. & Martin, N. (2004). Impact of the olfactory quality and chemical complexity of the flavouring agent on the texture of low fat stirred yogurts assessed by three different sensory methodologies. *Food Quality and Preference,* 15(7-8): 655-668.

Salvador, D. & Fiszman S.M. (2004). Textural and sensory characteristics of whole and skimmed flavored set-type yogurt during long storage. *Journal of Dairy Science* 87: 4033-4041

SAS® User's Guide: Statistics (1990). SAS Inst., Inc., Cary, NC.

Sodini, I., Remeuf, F., Haddad, S. & Corrieu, G. (2004). "The relative effect of milk base, starter, and process on yogurt texture: A review." *Critical reviews in food science and nutrition,* 44(2): 113-137.

Tuorila, H., Sommardahl, C., Hyvönen, L., Leporanta, K. & Merimaa, P. (1995). Does fat affect the timing of flavour perception ? A case study with yoghurt. *Food Quality and Preference,* 6: 55-58.

Van Aardt, M., Duncan, S.E., Marcy, J.E., Long, T.E. & Hackney, C.R. (2001) Effectiveness of poly(ethylene terephthalate) and high-density polyethylene in protection of milk flavor. *Journal of Food Science*, 84: 1341-1347.

Van Willige, R., Linssen, J., Legger-Huysman, A., & Voragen, A. (2003). Influence of flavour absorption by food-packaging materials (low-density polyethylene, polycarbonate terephthalate) on taste perception of a model solution and orange juice. *Food Additives and Contaminants,* 20(1): 84-91.

Van Willige, R., Linssen, J., & Voragen, A. (2000). Influence of food matrix on absorption of flavour compounds by linear low-density polyethylene: oil and real food products. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* 80: 1790-1797.

Van Willige, R., Schoolmeester, D., van Ooij, D.N., Linssen, J.P.H. & Voragen, A.G. (2002). Influence of storage time and temperature on absorption of flavor compounds from solutions by plastic packaging materials. *Journal of Food Science,* 67(6): 2023-2031.

Yazici, F. & Akgun A. (2004). Effect of some protein based fat replacers on physical, chemical, textural, and sensory properties of stained yoghurt. *Journal of Food_Engineering,* 62: 245-254.

Conclusion :

Afin d'aider à la conception de produits alimentaires de qualités organoleptiques souhaitées, il est nécessaire de maîtriser les mécanismes de perceptions des produits lors de leur conservation. Dans ce contexte, nous avons montré que la nature de l'emballage (polypropylène ou polystyrène) jouait un rôle sur la perception aromatique d'un yaourt brassé aromatisé, et de manière variable, selon la teneur en matière grasse.

Les analyses des différents produits à 0% de matière grasse, lors du stockage à 4°C, ont mis en évidence, quel que soit l'emballage (polystyrène et polypropylène), une évolution rapide des produits au cours des 14 premiers jours, tant au niveau physicochimique (diminution de la libération des esters et du pH, augmentation de la viscosité) qu'au niveau sensoriel (perte des notes fruitées). Au-delà de 14 jours, une stabilisation de la composition en composés d'arôme et de la perception de l'arôme du produit emballé est observée dans un pot en polypropylène, contrairement à celles observées dans les emballages en polystyrène qui continue d'évoluer. En effet, les cinétiques de sorption des composés d'arôme dans un emballage en polystyrène sont plus lentes que dans un emballage en polypropylène. Les propriétés des polymères (densité, état vitreux) peuvent expliquer ces différences de cinétiques de sorption. De plus, dans un yaourt à 0% de matière grasse, les composés d'arôme, et en particulier les esters, présentent une affinité plus grande pour le polypropylène que pour le polystyrène.

Ainsi, un emballage en polystyrène est donc préférable pour éviter la perte des notes fruitées du yaourt aromatisé. Des interactions spécifiques de certaines molécules avec le polystyrène ont également été mises en évidence et pourraient entraîner des déséquilibres aromatiques.

Pour les yaourts à 4% de matière grasse, des effets moins importants, tant au niveau physicochimique que sensoriel, ont été observés. Un effet stabilisant de la matière grasse sur l'arôme pourrait expliquer ce résultat.

Cette étude a permis de montrer la nécessité d'intégrer l'influence de l'emballage dans la formulation de la composition aromatique du yaourt, produit à durée de vie courte et stocké à basse température.

L'ensemble de ces données expérimentales permettra de valider les modèles de transferts de matière établis (groupe modélisation emballage réseau CANAL-ARLE), afin de délivrer des outils de prédiction des effets dynamiques (libération, transferts et réactions) du comportement des composés d'arôme dans des matrices alimentaires complexes.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail de thèse était de comprendre **le rôle de la viscosité complexe et de la structure d'un aliment sur sa perception**. Pour répondre à cet objectif, une stratégie d'étude, fondée sur les complémentarités qu'apportent les approches sensorielle et physicochimique, a été mise en oeuvre. Le choix d'un modèle d'étude s'est porté sur un produit complexe offrant une large gamme de propriétés rhéologiques et de texture : le yaourt brassé aromatisé. Afin de modifier la viscosité complexe de ce produit alimentaire, deux facteurs de variations ont été choisis : la composition en protéines et le traitement mécanique appliqué au yaourt. Un arôme fraise simplifié (17 composés d'arôme) a été utilisé pour aromatiser les produits.
L'analyse bibliographique, sur l'impact des propriétés rhéologiques sur la libération des composés d'arôme et sur les propriétés sensorielles olfactives, met en évidence de nombreux facteurs de nature physicochimique liés aux caractéristiques de la matrice et de l'arôme, ainsi que des facteurs physiologiques (salive, température, mastication etc.). L'ensemble de ces facteurs est à l'origine des variations de perception olfactive des produits alimentaires. Après analyse de la littérature, pour répondre à l'objectif de ce travail de thèse, nous avons choisi de suivre une démarche intégrant i) une caractérisation physique des matrices (propriétés rhéologiques et microstructure), ii) la libération des composés d'arôme en conditions statiques, puis en condition de consommation et iii) les propriétés sensorielles des matrices.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les yaourts de viscosités complexes variables. Trois niveaux de composition en protéines et deux niveaux de traitement mécanique ont été choisis pour obtenir des produits ayant une viscosité complexe comprise entre 15 et 120 Pa.s. L'approche physicochimique visait à identifier et à quantifier les facteurs susceptibles de modifier les quantités de composés d'arôme libérés par les matrices et donc à l'origine de la perception olfactive. La libération des composés d'arôme dans les yaourts brassés aromatisés a été étudiée en conditions statiques, c'est-à-dire dans des conditions où le produit n'était pas déstructuré et où les quantités d'arôme libérées étaient mesurées à l'état d'équilibre. Les propriétés rhéologiques et la microstructure des produits ont été déterminées. En parallèle, l'approche sensorielle a consisté à caractériser la perception de texture et la perception olfactive des mêmes produits par analyse descriptive quantitative.

Ce travail a montré que, sur les yaourts ayant subi un faible traitement mécanique, de petites variations de la composition protéique ont un effet important sur les propriétés rhéologiques et la microstructure des produits. Les différences de texture perçues entre les yaourts sont expliquées par leurs caractéristiques physiques. L'épaisseur perçue est en effet fortement corrélée à la viscosité complexe des produits. Par ailleurs, la composition en protéines influence la libération des composés d'arôme en conditions statiques dans les yaourts : **les yaourts les plus visqueux libèrent de moins grandes quantités de composés d'arôme que les yaourts les moins visqueux**. Ces variations de libération entre les yaourts sont relativement faibles (de l'ordre de 20%), mais sont en accord avec les propriétés olfactives évaluées par un panel de sujets. Ces résultats suggèrent que **les interactions physicochimiques entre les composés d'arôme et la matrice expliquent en partie la perception olfactive**.

Lorsque les yaourts subissent un fort traitement mécanique, l'effet de la composition en protéine sur les propriétés physicochimiques et sensorielles est minimisé. Il n'existe plus de différence de libération des composés d'arôme entre les différentes matrices de viscosité complexe relativement basse (15 à 40 Pa.s), ni de différence de perception olfactive. Ces résultats suggèrent que les liaisons physicochimiques entre les composés d'arôme et les protéines sont modifiées par le cisaillement dû à l'application d'un traitement mécanique intense.

Les propriétés rhéologiques sont influencées par l'intensité du traitement mécanique appliqué aux yaourts de même composition en protéines. De fortes différences sont observées et varient selon la composition en protéines des yaourts. Le yaourt enrichi en protéines sériques présente une plus grande résistance à la déstructuration que le yaourt enrichi en caséinates. Par ailleurs, **l'intensité du traitement mécanique influence significativement la perception olfactive.** Les matrices les plus visqueuses sont perçues moins intenses en arôme que les matrices les moins visqueuses. Cependant, l'intensité du traitement mécanique n'influence que faiblement la libération des composés d'arôme dans les matrices de même composition, en conditions d'équilibre. Lorsque les yaourts sont moins visqueux, après avoir subi un traitement mécanique fort, seuls quelques composés d'arôme sont davantage libérés en conditions statiques. Ces variations de libération sont relativement faibles (10 à 20% de variation) et ne concernent qu'un nombre restreint de composés d'arôme (1 à 3 sur les 17 composés d'arôme de la formule fraise en fonction de la composition en protéine). Ces résultats confirment que les seules différences de volatilité des composés d'arôme entre les matrices ne peuvent pas expliquer les différences de perception olfactive.

Ainsi, la viscosité complexe des yaourts joue un rôle non négligeable dans la libération des composés d'arôme par les matrices en conditions d'équilibre et dans la perception olfactive.
Globalement, les matrices les plus visqueuses libèrent de moins grandes quantités de composés d'arôme et sont perçues les moins intenses en arôme, quel que soit le facteur de variation de la viscosité complexe (composition protéique ou traitement mécanique).
Cette étude en conditions statiques a permis de conforter l'hypothèse des interactions physicochimiques pour expliquer les différences de comportement des composés d'arôme dans les matrices présentant de fortes différences de viscosité complexe.
Cependant, la consommation d'un produit n'est pas un phénomène statique. En bouche, le produit est mis en mouvement et subit une déstructuration. La cinétique de libération des composés d'arôme en bouche dépend alors de cette mise en mouvement du produit dans la cavité buccale. Il est ainsi nécessaire d'étudier la libération des composés d'arôme et la perception en conditions dynamiques de consommation.

Dans un second temps, **des mesures *in vivo* de libération des composés d'arômes** dans la cavité nasale ont été effectuées par la méthode APCI-MS. En parallèle, **la perception olfactive** a été évaluée aux principaux temps de la consommation (mise en bouche, ingestion et persistance) par un panel de sujets.
Les quantités de molécules dans la cavité nasale passent par un maximum lors de la déglutition, correspondant à la perception la plus intense au moment de l'ingestion.
Les quantités de composés d'arôme disponibles dans la cavité nasale permettent de différencier des matrices aux propriétés rhéologiques distinctes. **Lors de l'ingestion, les différences de quantités de composés d'arôme libérés entre yaourts de traitement mécanique variable peuvent expliquer les différences de perception olfactive observées.**
Plus les yaourts sont visqueux, moins ils libèrent de composés d'arôme et moins ils sont perçus intenses en arôme.
Les résultats obtenus en conditions *in vivo* ont permis de hiérarchiser les effets des deux facteurs retenus dans notre étude : composition en protéine et traitement mécanique. En conditions de consommation, l'effet du traitement mécanique prédomine sur l'effet de la composition en protéines pour les données physicochimiques comme sensorielles, suggérant l'importance de la viscosité complexe sur la libération des composés d'arôme.
Par ailleurs, nous avons montré que la persistance aromatique en bouche des produits les plus visqueux est perçue significativement plus intenses que celle des produits les moins visqueux.

Les paramètres de libération des composés d'arôme retenus dans cette étude n'ont pas permis d'expliquer ce résultat. L'hypothèse formulée serait que les yaourts les moins visqueux seraient plus facilement et donc plus rapidement éliminés dans les muqueuses buccales et celles du pharynx par les déglutitions successives, que les yaourts les plus visqueux. Les composés d'arôme issus des yaourts les plus visqueux seraient alors libérés pendant un temps plus long.

Afin d'affiner les hypothèses pouvant expliquer les mécanismes en bouche expliquant les différences de libération des composés d'arôme dans les yaourts, l'impact de la déstructuration des matrices en bouche sur la libération des composés d'arôme a été étudié en conditions *in vitro.* L'objectif de ces mesures était de prendre en compte le rôle du cisaillement du produit sur la libération des composés d'arôme et donc de se rapprocher des conditions réelles en bouche.

L'ensemble des résultats en conditions *in vitro* a été obtenu à l'aide d'une cellule de cisaillement, où les paramètres de température et d'agitation étaient contrôlés. Ces résultats ont montré que **lorsque des yaourts de viscosité complexe différente subissent un cisaillement constant, la libération des composés d'arôme entre ces yaourts est similaire**.

Ces résultats confirmeraient l'hypothèse d'une surface d'échange différente en bouche selon la viscosité complexe des produits, et qui modifierait la libération des composés d'arôme en bouche. Celle-ci va en effet conditionner la disponibilité des composés d'arôme dans la cavité nasale, les quantités susceptibles d'atteindre les récepteurs olfactifs, et par conséquent la perception olfactive.

Différentes hypothèses ont alors été formulées quant à la compréhension des mécanismes physiques à l'origine des différences de libération des composés d'arôme en bouche. Par élimination des différentes hypothèses (transfert de matière, transfert de chaleur, déstructuration des matrices par cisaillement, interactions physicochimiques), nous avons montré **l'importance de la surface d'échange** entre le produit et les cavités buccale et pharyngée. Ces différences de surface d'échange sont **induites par les différences de viscosité complexe** entre les produits et sont à l'origine des différences de libération des composés d'arôme en bouche, et par conséquent à l'origine de la perception olfactive.

La présence d'interactions sensorielles entre la texture et l'arôme des produits ne peut être exclue, mais n'a pas été étudiée dans le cadre de ce travail.

L'utilisation de mesures instrumentales de libération des composés d'arôme, en conditions *in vivo*, nous a permis d'acquérir des données essentielles à la compréhension des mécanismes de la perception olfactive. Les analyses de suivi des composés d'arôme en ligne par APCI-MS sont cependant limitées aux composés d'arôme de poids moléculaires distincts. Elle reste, néanmoins, une des méthodes de référence actuelle pour obtenir des résultats quantitatifs précis. Toutefois, les analyses de libération en conditions statiques ont permis de suivre la libération d'un plus grand nombre de composés d'arôme que les analyses par APCI-MS. En effet, les mesures obtenues par les méthodes « headspace » statique ont permis de comparer les quantités libérées des 17 composés d'arôme de la formule fraise, alors que la technique APCI-MS n'a permis de suivre la libération de 7 composés d'arôme seulement. Les techniques « headspace » classiques et les techniques d'APCI-MS apportent donc des informations complémentaires lors de l'étude d'un produit réel aromatisé avec une formule complexe.

Dans un troisième et dernier temps, nous avons étudié l'influence de l'emballage (polypropylène ou polystyrène) sur les caractéristiques sensorielles et physicochimiques de deux yaourts brassés aromatisés (0% et 4% de matière grasse) au cours du stockage (28 jours à 4°C).
Les propriétés physicochimiques et sensorielles des yaourts à 0% de matière grasse sont davantage influencées par la nature de l'emballage que celles des yaourts à 4% de matière grasse. Ce résultat s'explique par l'affinité de la matière grasse pour une large majorité de composés d'arôme qui a un rôle important de rétention et stabilise ainsi l'arôme en limitant le transfert. Dans un yaourt à 0% de matière grasse, les composés d'arôme, en particulier les esters, présentent une affinité plus grande pour le polypropylène que pour le polystyrène. Un emballage en polystyrène semble préférable pour éviter la perte des notes fruitées du yaourt aromatisé.
Ainsi, même si le yaourt est un produit à durée de vie courte et stocké à basse température, ces résultats montrent **la nécessité d'intégrer la nature de l'emballage dans la formulation de la composition aromatique du yaourt**.

Les travaux effectués au cours de cette thèse ouvrent différentes perspectives.
Au cours de cette étude *in vivo*, nous nous sommes intéressés uniquement à la perception aromatique globale évaluée aux différents temps de la consommation. Or l'arôme utilisé contient de nombreuses notes sensorielles, mises en évidence lors des analyses descriptives

quantitatives. Ces notes olfactives n'ont probablement pas le même « profil » temporel. Il serait donc intéressant de travailler sur des produits aromatisés avec un composé d'arôme responsable d'une seule note olfactive, tel que l'hexanoate d'éthyle pour la note fruitée ou la vanilline pour une note chaude. Cette expérience permettrait de comprendre plus précisément l'impact de la viscosité complexe des yaourts sur la perception olfactive d'un produit aromatisé avec une formule complexe et ceci en fonction des propriétés des molécules d'arôme.
L'étude pourrait être élargie à la libération des composés sapides en bouche pour intégrer et comprendre les mécanismes responsables de la perception de la saveur.

Il a été montré que la libération des composés d'arôme, dont les variations permettent de discriminer les yaourts en conditions statiques, varie d'environ 30% entre les matrices de viscosité complexe variable. Afin de montrer l'apport et de quantifier l'importance de ces variations sur la perception olfactive, il pourrait être intéressant d'étudier les seuils différentiels de perception de ces composés d'arôme en mélange dans les yaourts.

Afin de s'affranchir des différences interindividuelles et comprendre le rôle de la mastication et de la déglutition, des expériences complémentaires pourraient être réalisées à l'aide de simulateurs buccaux. L'utilisation de bouches artificielles ou de gorges artificielles permettrait d'étudier, *in vitro*, l'influence des paramètres d'origine physiologique mise en évidence lors de l'étude bibliographique sur la libération des composés d'arôme. Ainsi, l'influence des paramètres masticatoires et salivaires, par exemple, pourrait être pris en compte. Par ailleurs, il serait intéressant de quantifier l'équilibre entre forces d'adhésion et force d'écoulement entre le produit et les muqueuses buccales et celles du pharynx, afin de mieux comprendre la génération des surfaces d'échanges qui seront disponibles pour les transferts en bouche.

Ce travail a permis néanmoins d'obtenir de nombreuses données expérimentales : données physicochimiques (propriétés rhéologiques, libération des composés d'arôme…) et données sensorielles (perception temporelle). Modéliser ces données expérimentales en y associant l'état actuel des connaissances en physiologie de la mastication et de la déglutition permettrait de mieux comprendre les mécanismes générateurs des stimuli à l'origine de la perception olfactive.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abu-Jdayil, B. and Mohameed, H. “Experimental and modelling studies of the flow properties of concentrated yogurt as affected by the storage time.” *Journal of food engineering*, **2002**, 52:359-365.

Afonso, I.M. and Maia, J.M. “Rheological monitoring of structure evolution and development in stirred yoghurt.” *Journal of food engineering,* **1999**, 42(4): 183-190.

Andriot, I., Harrison, M., Fournier, N. and Guichard, E. “Interactions between methyl ketones and β-lactoglobulin: Sensory analysis, headspace analysis, and mathematical modeling.” *Journal of agricultural and food chemistry*, **2000,** 48(9):4246- 4251.

Athès, V., Pena y Lillo, M., Bernard, C., Perez, R. and Souchon, I. “Comparison of experimental methods for measuring infinite dilution volatilities of aroma compounds in water / ethanol mixtures.” *Journal of agricultural and food chemistry,* **2004,** 52:2021-2027.

ATLAN, S., TRELEA, C., SAINT-EVE, A., SOUCHON, I. AND LATRILLE, E. “CONFIDENCE INTERVAL CALCULATION OF PARTITION COEFFICIENTS DETERMINED USING THE PRV (PHASE RATIO VARIATION) METHOD.” *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A*, 2006**, 1110:146-155.**

Arshad, M., Paulsson, M. and Dejmek, P. “Rheology of build-up, breakdown, and rebodying of casein gels.” *Journal of dairy science*, **1993**, 76: 3310-3316.

B

Baines, Z.V. and Morris, E.R. “Flavour/taste perception in thickened systems: the effect of guar gum above and below c*.” *Food hydrocolloids*. **1987,** 1(3):197-205.

Barrantes, E., Tamime, A.Y., Sword, A.M., Muir, D.D. and Kalab, M. “The manufacture of set-type natural yoghurt containing different oils .1. Compositional quality, microbiological evaluation and sensory properties - .2. Rheological properties and microstructure.” *International dairy journal*, **1996**, 6:827-837.

Barrantes, E., Tamime, A.Y., Muir, D.D. and. Swordal. A.M. “The effect of substitution of fat by microparticulate whey protein on the quality of set-type, natural yogurt.” *Journal of the society of dairy technology*, **1994**, 47(2):61-68.

Barthelemy, J. "Evaluation d'un grandeur sensorielle complexe : description quantifiée." *Evaluation sensorielle. Manuel méthodologique.* Tec&Doc. Paris, Lavoisier, **2003.**

Biliaderis, C.G., Khan, M.M. and Blank, G. “Rheological and sensory properties of yogurt from skim milk and ultrafiltered retentates.” *International dairy journal*, **1992**, 2:311-323.

Biosystèmes®. “Fizz: logiciel de gestion de l’analyse sensorielle et des tests consommateurs. Couternon, France.” **1999**.

Bleeckx, D. "Dysphagie. Évaluation et rééducation des troubles de la déglutition." De Boeck Université, **2002**.

Boland, A.B., Buhr, K., Giannouli, P. and van Ruth, S. “Influence of gelatin, starch, pectin and artificial saliva on the release of 11 flavour compounds from model gel systems.” *Food Chemistry,* **2004**, 86(3):401-411.

Boland, A.B., Delahunty, C.M. and Van Ruth, S.M. “Influence of texture of gelatin gels and pectin gels on strawberry flavour release and perception.” *Food chemistry,* **2006,** 96:452-460.

Bonnans, S. and Noble, A.C. “Interaction of salivary flow with temporal perception of sweetness, sourness, and fruitiness.” *Physiology and behavior*, **1995**, 57(3):569-574.

Boscaini, E., van Ruth, S., Biasoli, F., Gasperi, F. and Mark, T. “Gas Chromatography-Olfactometry (GC-O) and Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry (PTR-MS) Analysis of the Flavor Profile of Grana Padano, Parmigiano Reggiano, and Grana Trentino Cheeses.” *Jounal of agricultural and food chemistry,* **2003**, 51:1782-1790.

Brauss, M.S., Linforth, R.S.T., Cayeux, I., Harvey, B. and Taylor, A.J. “Altering the fat content affects flavor release in a model yoghurt system.” *Journal of agricultural and food chemistry,* **1999,** 47:2055-2059.

Brown, W.E., Shearn, M. and McFie, H. “Method to investigate differences in chewing behaviour in humans : II.- Use of electromyography during chewing to assess chewing behaviour.” *Journal of texture studies,* **1994**, 25:17-31.

Brown, W., Dauchel, C. and Wakeling, I. “Influence of chewing efficiency on texture and flavour perceptions of food.” *Journal of texture studies,* **1996,** 27:433-450.

Buettner, A. and Schieberle P. “Influence of mastication on the concentrations of aroma volatiles - some aspects of flavour release and flavour perception.” *Food chemistry,* **2000**, 71:347-354.

Buettner, A., Beer, A., Hanning, C. and Settles, M. “Observation of the Swallowing Process by Application of Videofluoroscopy and Real-time Magnetic Resonance Imaging—Consequences for Retronasal Aroma Stimulation.” *Chemical senses,* **2001,** 26:1211-1219.

Buettner, A., Beer, A., Hannig, C., Settles, M. and Schieberle, P. “Physiological and analytical studies on flavor perception dynamics as induced by the eating and swallowing process.” *Food quality and preference,* **2002,** 13:497-504.

Buettner, A. and Mestres M. “Investigation of the retronasal perception of strawberry aroma aftersmell depending on matrix composition.” *Jounal of agricultural and food chemistry,* **2005**, 53:1661-1669.

Buffo, R.A., Rapp, J.A., Krick, T. and Reineccius, G.A. “Persistence of aroma compounds in human breath after consuming an aqueous model aroma mixture.” *Food chemistry,* **2005,** 89:103-108.

Buhr, K., van Ruth, S. and Delahunty, C. “Analysis of volatile flavour compounds by Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry: fragmentation patterns and discrimination between isobaric and isomeric compounds.” *International journal of mass spectrometry*, **2002**, 221:1-7.

Buttery, R., Ling, L. and Guadagni, D. “Volatilities of aldehydes, ketones and esters in dilute water solutions.” *Journal of agricultural and food chemistry*, **1969**, 17:385-389.

C

Cayot, P. and Lorient D. *Traitements mécaniques. Structures et technofonctions des protéines du lait*. P. Cayot and D. Lorient. Paris, Technique et Documentation, Lavoisier, **1998,** p.149-157.

Charles, M., Bernal, B. and Guichard, E. *Interactions of β-lactoglobulin with flavor compounds*, in *Flavor science: Recent developpement*, A.J. Taylor and D.S. Mottram, Editors. 1996, The Royal Society of Chemistry: Cambridge. p. 433-436.

Cho, Y.H., Lucey, J.A. and Singh, H. “Rheological properties of acid milk gels as affected by the nature of the fat globule surface material and heat treatment of milk.” *International dairy journal*, **1999**, 9(8):537-545.

Clark, A.H. and Ross-Murphy, S.B. “Structural and mechanical properties of biopolymer gels.” *Advances in polymer science*, **1987**, 83: 57-192.

D

Decourcelles, N., Rondeau, P. and Lubbers, S. “Development and application of a "human mouth simulator" for liquid and semi-liquid foodstuffs.” *Journal of texture studies*, 2006, submitted.

De Roos, K.B. “How lipids influence food flavor.” *Food technology,* **1997,** 51(1):60-62.

Ducruet, V., Fournier, N., Saillard, P., Feigenbaum, A. and Guichard, E. “Influence of Packaging on the Aroma Stability of Strawberry Syrup during Shelf Life.” *Journal of agricultural and food chemistry*, **2001**, 49(5):2290-2297.

E

Engelen, L., de Wijk, R.A., Prinz, J, Janssen, A., Weenen, H. and Bosman, F. “The effect of oral and product temperature on the perception of flavor and texture attributes of semi-solids.” *Appetite,* **2003**, 41(3):273-281.

Engelen, L., de Wijk, R.A., Prinz, J., van der Bilt, A. and Bosman, F. “The relation between saliva flow after different stimulations and the perception of flavor and texture attributes in custard desserts.” *Physiology & behavior*, **2003**, 78(1):165-169.

Engelen, L., Fontijn-Tekamp, A. and van der Bilt, A. “The influence of product and oral characteristics on swallowing.” *Archives of Oral Biology,* **2005**, 50:739-746.

Ettre, L.S., Welter, C. and Kolb, B. “Determination of gas-liquid partition coefficients by automatic equilibrium headspace - gas chromatography utilizing the Phase Ratio Variation method.” *Chromatographia,* **1993,** 35(1/2):73-84.

F

Farès, K., Landy, P., Guilard, R. and Voilley, A. “Physicochemical interactions between aroma compounds and milk proteins: effect of water and protein modification.” *Jounal of dairy science,* **1998,** 81:82-91.

Fischer, N. and Widder, S. “How proteins influence food flavor.” *Food Technology,* **1997**, 51(1):68-70.

Folkenberg, D.M. and Martens, M. “Sensory properties of low fat yoghurts. Part A: Effect of fat content, fermentation culture and addition of non-fat dry milk on the sensory properties of plain yoghurt.” *Milchwissenschaft milk science international*, **2003**, 58:154-157.

Frank, R.A. and Byram, J. “Taste-smell interactions are tastant and odorant dependent.” *Chemical senses*, **1998**, 13(3):445-455.

G

Giboreau, A. "La méthode du temps-intensité." *Traité d'évaluation sensorielle. Aspects cognitifs et métrologiques des perceptions*. Dunod. Paris, **2001**.61-73.

Gierczynski, I., Labouré, H., Valade, A.-G., Sémon, E. and Guichard, E. “Breath-by-breath mass spectrometry measurements and inter-individual differences: a detailed analysis of raw data.” *Journal of agricultural and food chemistry,* **2006**, submitted.

Grote, C. and Pawliszyn J. “Solid-Phase Microextraction for the analysis of human breath.” *Analytical chemistry,* **1997**, 69:587-596.

Guichard, E. “Interactions between flavor compounds and food ingredients and their influence on flavor perception.” *Food review international,* **2002,** 18(1):49-70.

Guinard, J.X., ZoumasMorse, C., Walchak, C. and Simpson, H. “Relation between saliva flow and flavor release from chewing gum.” *Physiology and behavior,* **1997**, 61(4):591-596.

Guinee, T.P., Mullins, C.G., Reville, W.J. and Cotter, M.P. “Physical properties of stirred-curd unsweetened yoghurts stabilised with different dairy ingredients.” *Milchwissenschaft milk science international*, **1995,** 50(4):196-200.

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

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

H

Haahr, A.M., Bardow, A., Thompsen, C., Jensen, S., Nauntofle, B., Bakke, M., Adler-Nissen, J. and Bredie, W. “Release of peppermint flavour compounds from chewing gum: effect of oral functions.” *Physiology & behavior,* **2004**, 82:531-540.

Hansen, A.P. and Booker, D.C. “Flavour food interactions, ACS symposium series 633. in Flavor interactions with casein and whey protein.” *American Chemical Society, Washington, D.C.*, **1996**, Pages 75-89.

Hansen, H. and Heinis, J.J. “Benzaldehyde, citral and d-limonene flavor perception in the presence of casein and whey proteins.” *Journal of dairy science*, **1992**, 75:1211-1215.

Hansen, H. and Heinis, J.J. “Decrease of vanillin flavor perception in the presence of casein and whey proteins.” *Journal of dairy science*, **1991**, 74:2936-2940.

Hansson, A., Giannouli, P. and Van Ruth, S. “The influence of gel strength on aroma release from pectin gels in a model mouth and in-vivo, monitored with proton-transfer-reaction mass spectrometry.” *Journal of agricultural and food chemistry,* **2003,** 51(6):4732-4740.

Harasawa, N., Tateba, H., Ishizuka, N., Wakayama, T., Kishino, K. and Ono, M. “Flavor deterioration in yogurt.” *Process-induced chemical changes in food*, Shahidi. New York, Plenum Press, **1998**, 285-296.

Harvey, B. and Barra, J. “Real time breath and headspace analysis of flavour volatiles.” *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics,* **2003,** 55:261-269.

Hastie, R. and Park, B. “The relationship between memory and judgment depends on whether the judgment task is memory based or on line.” *Psychological review*, **1986**, 93:258-268.

Hess, J., Roberts, R.F. and Ziegler, G. “Rheological Properties of Nonfat Yogurt Stabilized Using Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus Producing Exopolysaccharide or Using Commercial Stabilizer Systems.” *Journal of dairy science*, **1997**, 80(2): 252-263.

Hodgson, M.D., Langridge, J.P., Linforth, R. and Taylor, A.J. “Aroma release and delivery following the consumption of beverages.” *Jounal of agricultural and food chemistry,* **2005**, 53:1700-1706.

Holley, A. “Les récepteurs des odeurs et autres attraits du modèle olfactif.” *médecine/sciences,* **1994**, 10:1077-1080.

Holley, A. and Sicard G. “Les récepteurs olfactifs et le codage neuronal de l'odeur.” *médecine/sciences,* **1994**, 10:1091-1098.

Hollowood, T.A., Linforth, R.S.T. and Taylor, A.J. “The effect of viscosity on the perception of flavour.” *Chemical senses,* **2002,** 27:583-591.

Hotchkiss, H. “Food-packaging interactions influencing quality and safety.” *Food additives and contaminants*, **1997**, 14:601-607.

I

Ingham, K.E., Linforth, R.S.T. and Taylor, A.J. “The effect of eating on aroma release from strawberries.” *Food chemistry* **1995**, 54(3):283-288.

J

Jouenne, E. and Crouzet, J. “Effect of pH on retention of aroma compounds by beta-lactoglobulin.” *Journal of agricultural and food chemistry,* **2000,** 48(4):1273-1277.

K

Kailasapathy, K. and Supriadi, D. “Effect of partially replacing skim milk powder with whey protein concentrate on the sensory qualities of lactose hydrolysed acidophilus yoghurt.” *Milchwissenschaft milk science international*, **1998**, 53:385-389.

Kalab, M. “Electron microscopy of milk products: a review of techniques.” *Scanning Electron Microscopy,* **1981,** 3:453-472.

L

Laing, D.G. and Francis, G.W. “The capacity of Humans to identify odors in mixtures.” *Physiology & Behavior,* **1989**, 46:809-814.

Laing, D.G. “Perceptual odour interactions and objective mixture analysis.” *Food Quality and Preference,* **1994**, 5:75-80.

Land, D.G. Perspectives on the effects of interactions on flavour perception: an overview. *Flavour-food interactions.* McGorrin, R.J. and Leland, J.V. Washington, DC, ACS Symposium Series. American Chemical Society**. 1996**, 2-11.

Landy, P., Druaux, C. and Voilley, A. “Retention of aroma compounds by proteins in aqueous solutions.” *Food chemistry*, **1995,** 54(4):387-392.

Larson-Powers, N. and Pangborn, R.M. “Paired comparison and time-intensity measurements of the sensory properties of beverages and gelatins containing sucrose or synthetic sweeteners.” *Journal of food science*, **1978**, 43:41-46.

Lee, W.E. and Pangborn, R.M. “Time-intensity : the temporal aspects of sensory perception.” *Food Technology,* **1986,** 40(11):71-82.

Lesschaeve, I. and Issanchou, S. “Could selection tests detect the future performance of descriptive panellists?” *Food quality and preference*, **1996**, 7(3-4):177-183.

Lethuaut, L., Weel, K., Boelrik, A. and Brossard, C. " Flavor perception and aroma release from model dairy desserts." *Journal of agricultural and food chemistry,* **2004, 52(11):** 3478-3485.

Lindinger, W., Hansel, A. and Jordan, A. “Proton-Transfer-Reaction Mass Spectrometry (PTR-MS): On-line monitoring of volatile organic compounds at pptv levels.” *Chemical Society reviews,* **1998,** 27:347-354.

Lindinger, W., Hansel, A. and Jordan, A. “On-line monitoring of volatile organic compounds at pptv levels by means of Proton-Transfer-Reaction Mass Spectometry (PTR-MS) Medical applications, food control and environmental research.” *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes and ion Processes,* **1998,** 13:191-241.

Linforth, R.S.T., Savary, I., Pattenden, B. and Taylor, A.J. “Volatile compounds found in expired air during eating of fresh tomatoes and in the headspace above tomatoes.” *Journal of the science of food and agriculture,* **1994,** 65:241-247.

Linssen, J.P.H., Verheul, A., Roozen, J.P. and Posthumus, M.A. “Absorption of flavour compounds by packaging material: Drink yoghurts in polyethylene bottles.” *International dairy journal*, **1992**, 2(1):33-40.

Lubbers, S., Decourcelles, N., Vallet, N. and Guichard, E. “Flavor release and rheology behavior of strawberry fatfree stirred yogurt during storage.” *Journal of agricultural and food chemistry*, **200**4, 52(10):3077-3082.

Lucey, J.A. and Singh, H. “Formation and physical properties of acid milk gels : a review.” *Food research international,* **1998**, 30:529-542.

Lundgren, B., Pangborn, R.M., Daget, N., Yoshida, M., Laing, D.G., McBride, R.L., Griffiths, N. , Hyvönen, L., Sauvageot, F., Paulu, K. and Barylko-Pikielna, N. “An interlaboratory study of firmness, aroma, and taste of pectin gels.” *Lebensmittel wissenschaft und technologie*, **1986**, 19:87-88.

M

MacLeod, P. and Sauvageot, F. *Bases neurophysiologiques de l'évaluation sensorielle des produits alimentaires.* Paris, Tec et Doc, Lavoisier, **1986**.

Martin, N.C., Skokanova, J., Latrille, E., Beal, C. and Corrieu, G. “Influence of fermentation and storage conditions on the sensory properties of plain low fat stirred yogurts.” *Journal of sensory studies*, **1999**, 14:139-160.

Mayr, D., Märk, T., Lindinger, W., Brevard, H. and Yeretzian, C. “Breath-by-breath analysis of banana aroma by proton transfer reaction mass spectrometry.” *International journal of mass spectrometry,* **2003,** 223-224:743-756.

Mazzucchelli, R. and Guinard, J.X. “Comparison of monadic and simultaneous sample presentation modes in a descriptive analysis of milk chocolate.” *Journal of sensory studies*, **1999**, 14(2):235-248.

McBride, R.L. “Hedonic rating of food: single or side by side sample presentation?” *Journal of sensory studies*, **1986**, 21:355-363.

McBride, R.L. “Range bias in sensory evaluation.” *Journal of food technology*, **1982**, 17:405-410.

Mei, J., Reineccius, G.A., Knighton, W. and Grimsrud, A. “Influence of strawberry yogurt composition on aroma release.” *Journal of agricultural and food chemistry,* **2004,** 52:6267-6270.

Meilgaard, M.C., Civille, G.V. and Carr, B.T. “Sensory evaluation techniques. in Descriptive analysis techniques.” London, UK, *CRC Press,* **1991,** Pages 188-199**.**

Mestres, M., Moran, N., Jordan, A. and Buettner, A. “Aroma release and retronasal perception during and after consumption of flavored whey protein gels with different textures. 1- in vivo release analysis.” *Journal of agricultural and food chemistry,* **2005,** 53:403-409.

Meynier, A., Rampon, V., Dalgalarrondo, M. and Genot, C. " Hexanal and t-2-hexenal form covalent bonds with whey proteins and sodium caseinate in aqueous solution." *International Dairy Journal*, **2004**, 14(8):681-690.

Miettinen, S.M., Tuorila, H., Piironen, V., Vehkalahti, K. and Hyvonen, L. “Effect of Emulsion Characteristics on the Release of Aroma As Detected by Sensory Evaluation, Static Headspace Gas Chromatography, and Electronic Nose.” *Journal of agricultural and food chemistry*, **2002**, 50:4232-4239.

Modler, H.W. and Kalab, M. “Microstructure of yogurt stabilized with milk proteins.” *Journal of dairy science,* **1983,** 66:430-437.

N

Nassl, K., Kropf, F. and Klostermeyer, H. “A method to mimic and to study the release of flavour compounds from chewed food.” *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung and Forschung,* **1995,** 201:62-68.

Netter, F. "Atlas d'anatomie humaine", eds Masson.

NF ISO 5492 “Analyse sensorielle-Vocabulaire. In AFNOR (eds.), Contrôle de la qualité des produits alimentaires - Analyse sensorielle.” *Recueil de normes françaises*, Paris. **1995**, pp.27-51.

Nielsen, T. and Jagerstad M. “Flavour scalping by food packaging.” *Trends in Food Science and Technology*, **1994**, 5:353-356.

Nongonierma, A., Springett, M., Le Quere, J.L., Cayot, P. and Voilley, A. “Flavour release at gas/matrix interfaces of stirred yoghurt models.” *International dairy journal*, **2006,** 16:102-110.

Normand, V., Avison, S. and Parker, A. “Modeling the kinetics of flavour release during drinking.” *Chemical senses,* **2004,** 29:235-245.

O

Odake, S., Roozen, J.P. and Burger, J. “Effect of saliva dilution on the release of diacetyl and 2-heptanone from cream style dressings.” *Nahrung,* **1998**, 42(6): 385-391.

O'Neill, T.E. and Kinsella, E. “Binding of alkanone flavors to β-lactoglobulin: effects of conformational and chemical modification.” *Journal of agricultural and food chemistry,* **1987,** 35:770-774.

Overbosch, P., Ageterof, W.G.M. and Haring, P. “Flavor release in the mouth.” *Food Reviews International,* **1991**, 7(2):137-184.

P

Palsgard, E. and Dijksterhuis, G. “The sensory perception of flavor release as a function of texture and time: a time intensity study using flavored gels.” *Journal of Sensory Studies,* **2000,** 15:347-359.

Paçi Kora, E. "Approche pluridisciplinaire des interactions texture-flaveur dans un produit laitier frais de type yaourt brassé." Thèse de docotrat, Institut National Agronomique Paris Grignon, **2004**.

Paçi Kora, E., Souchon, I., Latrille, E., Martin, N. and Marin, M. “Composition rather than viscosity modifies the aroma compound retention of flavored stirred yogurt.” *Journal of agricultural and food chemistry*, **2004**, 52(10):3048-3056.

Paçi Kora, E., Latrille, E., Souchon, I. and Martin, N. “Texture-flavor interactions in low fat stirred yogurt : how mechanical treatment, thickener concentration and aroma concentration affect perceived texture and flavor.” *Journal of sensory studies*, **2003**, 18(5):367-390.

Pangborn, R.M. and Szczesniak, A. “Effect of hydrocolloids and viscosity on flavor and odor intensities of aromatic flavor compounds.” *Journal of texture studies,* **1974,** 4:467-482.

Pangborn, R.M. and Lundgren, B. “Salivary secretion in response to mastication of crisp bread.” *Journal of texture studies,* **1977**, 8:463-472.

Pangborn, R.M., Gibbs, Z.M. and Tassan, C. “Effect of hydrocolloids on apparent viscosity and sensory properties of selected beverages.” *Journal of texture studies*, **1978**, 9:415-436.

Patocka, G., Cervenkova, R. and Jelen, P. “Textural effects of soluble whey protein isolate in stirred yogurt.” *Milchwissenschaft milk science international,* **2004,** 59(1-2):37-40.

Pelletier, E., Sostman, K. and Guichard, E. “Measurement of interactions between β-lactoglobuline and flavor compounds (esters, acids and pyrazines) by Affinity and Exclusion Size Chromatography.” *Journal of agricultural and food chemistry,* **1998,** 46:1506-1509.

Piggott, J.R. and Schaschke, C.J. “Release cells, breath analysis and in-mouth analysis in flavour research.” *Biomolecular Engineering,* **2001**, 17:129-136.

Pieper, G., Borgudd, L., Ackermann, P. and Fellers, P. “Absorption of aroma volatiles of orange juice into laminated carton packages did not affect sensory quality.” *Journal of food science*, **1992**, 57:1408-1411.

Pionnier, E. "Libération et perception des composés de la flaveur au cours de la mastication d'une base fromagère." thèse de doctorat Dijon, Université de Bourgogne, **2003**.

Pionnier, E., Chabanet, C., Mioche, L, Le Quere, J.L. and Salles, C. “1-In vivo aroma release during eating of a model cheese: relationships with oral parameters.” *Jounal of agricultural and food chemistry,* **2004,** 52(3):557-564.

Pionnier, E., Nicklaus, S., Chabanet, C., Mioche, L, Taylor, A.J., Le Quere, J.L. and Salles, C. “Flavor perception of a model cheese: relationships with oral and physico-chemical parameters.” *Food quality and preference,* **2004**, 15:843-852.

Pionnier, E., Semon, E., Chabanet, C. and Salles, C. “Evaluation of the solid phase microextraction (SPME) technique for the analysis of human breath during eating.” *Sciences des aliments,* **2005**, 25(3):193-206.

Prescott, J. “Flavour as a psychological construct: implications for perceiving and measuring the sensory qualities of foods.” *Food quality and preference*, **1999**, 10:349-356.

Prinz, J.F. and Lucas, P.W. “Swallow thresholds in human mastication.” *Archives in oral biology,* **1995**, 40(5):401-403.

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

R

Rabe, S., Krings, U. and Berger, R. “In vitro Study of the Influence of Physiological Parameters on Dynamic In-mouth Flavour Release from Liquids.” *Chemical senses,* **2004**, 29(2):153-162.

Rabe, S., Linforth, R.S.T., Krings, U., Taylor, A.J. and Berger, R.G. “Volatile release from liquids: a comparison of *in vivo* APCI-MS, in-mouth headspace trapping and *in vitro* mouth model data.” *Chemical senses,* **2004,** 29:163-173.

Reid, R.C., Prausnitz, J. and Poling, B.E."*The properties of gases and liquids, 4eme édition."* R.C. Reid, J. Prausnitz and B.E. Poling. New York, Etats Unis, McGraw-Hill Inc, **1987**.

Reiners, J., Nicklaus, S. and Guichard, E. “Interaction between b-lactoglobulin and flavour compounds of different chemical classes. Impact of the protein on the odour perception of vanillin and eugenol.” *Lait*, **2000**, 80:347-360.

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

Richard, H. "Connaissance de la nature des arômes." Paris, Tec&Doc, **1992**.

Le petit Robert. "Dictionnaire de la langue française", **2006**.

Roberts, D.D. and Acree, T.E. “Simulation of retronasal aroma using a modified headspace technique : investigating the effects of saliva, temperature, shearing and oil on flavor release.” *Journal of agricultural and food chemistry,* **1995**, 43:2179-2186.

Rohm, H. and Kovac, A. “Effect of starter cultures on linear viscoelastic and physical properties of yoghurt gels.” *Journal of texture studies,* **1994,** 25:311-329.

Rönnegard, E. and Dejmek, P. “Development and breakdown of structure in yoghurt studied by oscillatory rheological measurements.” *Lait,* **1993,** 73(4):371.

Rychlik, M., Schieberle, P. and Grosch, W. “Compilation of odor thresholds, odor qualities and retention indices of key food odorants.” Garching. Allemagne: TUM, **1998**.

S

Saint-Eve, A., Lévy, C., Martin, N. and Souchon, I. “Influence of proteins on the perception of flavored stirred yogurts.” *Journal of dairy science,* **2006,** 89(3):922-933.

Saint-Eve, A., Juteau, A., Atlan, S., Martin, N. and Souchon, I. “Complex viscosity induced by protein composition influences the aroma release of flavored stirred yogurt.” *Journal of agricultural and food chemistry,* **2006,** in press.

Saint-Eve, A., Paci Kora, E. and Martin, N. “Impact of the olfactory quality and chemical complexity of the flavouring agent on the texture of low fat stirred yogurts assessed by three different sensory methodologies.” *Food quality and preference*, **2004**, 15(7-8):655-668.

Salvador, D. and Fiszman, S.M. “Textural and sensory characteristics of whole and skimmed flavored set-type yogurt during long storage.” *Journal of dairy science*, **2004**, 87:4033-4041.

SAS®. “User’s Guide: Statistics.” (1990). Version 9.1, Edition 2005. SAS Inst., Inc., Cary, NC.

Schreier, P. “Quantitative composition of volatile constituents in cultivated strawberries, Fragaria ananassa cv. Senga Sengana, Senga Litessa and Senga Gourmella.” *Journal of agricultural and food chemistry,* **1980,** 31:487-494.

Schlich, P. and Cordelle, S. "Dominance sensorielle des sensations (DTS) et préférences." *Rencontres Dijonnaises entre les sciences et les industries du goût,* Dijon, 24-25/11/**2005**.

Shama, F. and Sherman, P. “Identification of stimuli controlling the sensory evaluation of viscosity.” *Journal of texture studies,* **1973,** 4:111-118.

Skriver, A., Holstborg, J. and Kvist, K. “Relation between sensory texture analysis and rheological properties of stirred yogurt.” *Journal of dairy research*, **1999**, 66:609-618.

Sodini, I., Remeuf, F., Haddad, S. and Corrieu, G. “The relative effect of milk base, starter, and process on yogurt texture: A review.” *Critical reviews in food science and nutrition*. **2004,** 44(2):113-137.

Sostmann, K. and Guichard, E. “Immobilized β-lactoglobuline on a HPLC-column: a rapid way to determine protein-flavor interactions.” *Food chemistry,* **1998,** 62(4):509-513.

Statistica®. **2003,** Statsoft Inst., Inc., France.

Stone, H. and Sidel, J. “Sensory evaluation practices, second edition. in Descriptive analysis.” *Academic Press*, Inc., London, United Kingdom, **1993**, Pages 202-242.

T

Tamime, A.Y. and Robinson, R.K. *Yoghurt. Science and technology.* UK, Pergamon Press, 1999.

Tamime, A.Y., Muir, D.D., Shenana, M.E., Kalab, M. and Dawood, A.H. “Processed cheese analogues incorporating fat-substitutes - 2. Rheology, sensory perception of texture and microstructure.” *Lebensmittel wissenschaft & technologie*, **1999**, 32(1):50-59.

Tamime, A.Y., Kalab, M. and Davies, G. “Microstructure of set-style yoghurt manufactured from cow's milk fortified by various methods.” *Food microstructure*, **1984**, 3:83-92.

Taylor, A.J. and Linforth, R.S.T. “Flavor release in the mouth.” *Trends in Food Science and Technology,* **1996**, 7: 444-448.

Taylor, A.J. and Linforth, R.S.T. "Techniques for measuring flavor release in vivo during eating." *Abstracts of papers of the american chemical society*. **1999**, 518.

Taylor, A.J., Linforth, R.S.T., Harvey, B.A. and Blake, A. “Atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry for in vivo analysis of volatile flavour release.” *Food chemistry,* **2000,** 71(3):327-338.

Teggatz, J.A. and Morris, H.A. “Changes in the rheology and microstructures of ropy yogurt during shearing.” *Food structure,* **1990,** 9:133-138.

Thirion, S., Martin, J.F., Rousset-Akri, S. and Touraille, C. “Comparaison de deux modes de présentation d'échantillons en analyse sensorielle.” *4èmes journées agro-industrielles et méthodes statistiques*, Dijon, 7-8 décembre **1995**:127-134.

V

van Marle, M.E. “Structure and rheological properties of yoghurt gels and stirred yoghurts.” thèse de doctorat University of Twente, **1998**.

van Ruth, S., Roozen, J.P., and Cozijnsen, J.L. “Volatile compounds of rehydrated french beans, bell peppers and leeks. Part 1. Flavour release in the mouth and in three mouth model systems.” *Food Chemistry,* **1995**, 53:15-22.

van Ruth, S., Grossmann, I., Geary, M. and Delahunty, C. “Interactions between artificial saliva and 20 aroma compounds in water and oil model systems.” *Jounal of agricultural and food chemistry,* **2001**, 49:2409-2413.

van Ruth, S., King, C. and Giannouli, C. “Influence of Lipid Fraction, Emulsifier Fraction, and Mean Particle Diameter of Oil-in-Water Emulsions on the Release of 20 Aroma Compounds.” *Journal of agricultural and food chemistry*, **2002**, 50:2365-2371.

van Ruth, S. “Influence of saliva on temporal volatile flavour release from red bell peppers determined by proton transfer reaction-mass spectrometry.” *European Food Research Technologies,* **2003**, 216:220-223.

van Ruth, S.M., Dings, L., Burh, K. and Posthumus, M. “In vitro and in vivo volatile flavour analysis of red kidney beans by proton transfer reaction-mass spectrometry.” *Food research international*, **2004,** 37:785-791.

van Ruth, S. and Buhr, K. “Influence of mastication rate on dynamic flavour release analysed by combined model mouth/proton transfer reaction - mass spectrometry.” *International journal of mass spectrometry,* **2004,** 239:187-192.

van Ruth, S., De Witte, L. and Rey Uriarte, A. “Volatile flavor analysis and sensory evaluation of custard desserts varying in type and concentration of carboxymethyl cellulose.” *Journal of agricultural and food chemistry,* **2004,** 52:8105-8110.

van Vliet, T., Van Dijk, H., Zoon, P. and Walstra, P. “Relation between syneresis and rheological properties of particle gels.” *Colloid and Polymer Science*, **1991**, 269:620-627.

van Willige, R., Linssen, J., Legger-Huysman, A. and Voragen, A. “Influence of flavour absorption by food-packaging materials (low-density polyethylene, polycarbonate terephthalate) on taste perception of a model solution and orange juice.” *Food additives and contaminants*, **2003**, 20(1):84-91.

van Willige, R. and Schoolmeester, D. “Influence of storage time and temperature on absorption of flavor compounds from solutions by plastic packaging materials.” *Food and chemical toxicology*, **2001**, 67(6):2023-2031.

van Willige, R., Linssen, J. and Voragen, A. “Influence of food matrix on absorption of flavour compounds by linear low-density polyethylene: oil and real food products.” *Journal of the science of food and agriculture*, **2000**, 80:1790-1797.

Voutsas, E., Andreou, C., Theodorou, D. and Tassios, D. “Prediction of infinite dilution volatilities of aroma compounds in water.” *Journal of food science,* **2001**, 66:447-452.

W

Weel, K., Boelrijk, A., Burger, J., Verschueren, M., Gruppen, H., Voragen, A. and Smit, G. “New device to simulate swallowing and in vivo aroma release in the throat from liquid and semiliquid food systems.” *Journal of agricultural and food chemistry,* **2004,** 52:6564-6571.

Weel, K., Boelrijk, A., Alting, A., Van Mil, P., Burger, J., Gruppen, H., Voragen, A. and Smit, G. “Flavor Release and Perception of Flavored Whey Protein Gels : Perception is Determined by Texture Rather than by Release.” *Journal of agricultural and food chemistry*, **2002,** 50:5149-5155.

Wendin, K., Ellekjær, M.R. and Solheim, R. “Fat Content and Homogenization Effects on Flavour and Texture of Mayonnaise with Added Aroma.” *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, **1999,** 32(6):377-383.

Wendin, K., Solheim, R., Allmere, T. and Johanson, L. “Flavour and texture in sourmilk affected by thickeners and fat content.” *Food quality and preference*, **1997**, 8(4):281-291.

Y

Yazici, F. and Akgun, A. “Effect of some protein based fat replacers on physical, chemical, textural, and sensory properties of stained yoghurt.” *Journal of food engineering*, **2004**, 62:245-254.

Annexe

Proceeding du Congrès 11th Weurman Flavour Research Symposium (2005).

How can protein ratio affect aroma release, physical properties and perceptions of yogurt?

Anne Saint-Eve,[a] Nathalie Martin,[a] Cécile Levy,[a] Isabelle Souchon[a]

[a]*UMR GMPA, INAPG –INRA, France*

ABSTRACT

Among yogurt dairy components, the type of proteins is known to influence the behaviour of odorous volatile organic compounds (VOC). The aim of this study is to focus on the impact of the proteins on the physicochemical (rheological properties, microstructure, VOC release) and sensory (texture and flavour) properties of 4% fat flavoured stirred yogurts. Yogurts varied according to the ratio of milk proteins used. Large differences were highlighted concerning the structures of the different yogurts observed by scanning electron microscopy. Yogurts differed largely in viscosity and in texture perception. Different effects on retention of VOC and the intensity of most olfactory attributes of the strawberry flavour was observed in yogurts.

INTRODUCTION

Several factors affect yogurt quality including dairy ingredients (proteins, fat…), strains and technological parameters (thermal treatment, homogenisation…). Especially, the type and content of milk proteins is of significant importance for the physical properties and the perceived texture of the fermented product, as it has been effectively highlighted by numerous researchers [1-2]. Variations in the structure and the composition of the food matrix (due to the nature of proteins) can also be responsible for the modification of the release of VOC and the related flavour properties [3-4]. Many studies on interactions between VOC and other non-volatile constituents of food are carried out with model systems [5]. However, yogurt is a complex and multiphasic system and to our knowledge no study has looked at the role of protein ratio on physicochemical and sensory properties of flavoured yogurts.

The aim of the present study is to investigate and to quantify the impact of the ratio of proteins on the physicochemical (rheological properties, microstructure, VOC release) and

sensory (texture and flavour) properties of 4% fat flavoured stirred yogurts made with different milk protein ratio (caseinates on total of proteins).

MATERIALS AND METHODS

Product preparation

Three flavoured stirred yogurts with equal contents of dry matter (22.5%), fat (4%) and proteins (5.4%) were used. Only the protein ratio (caseinates on total proteins) varied: ratio 86% (caseinates: CAS), ratio 81% (milk powder: MPO) and ratio 60% (whey protein: WP). MPO was the reference product. Yogurts were flavoured with a strawberry flavour containing 17 VOC.

Physico-chemical measurements

The complex viscosity of the three yogurt matrices was measured at 10°C in harmonic regime with a rheometer (details given in [6]). Sample observations and photomicrography were performed with a Scanning Electron Microscopy (SEM) (details in [7]). The VOC release in the vapor phase at 4°C was measured by solid-phase microextraction using a gas chromatograph with an automatic headspace sampler CombiPal. Physico-chemical measurements are expressed relatively to MPO reference.

Sensory profile

A descriptive sensory analysis of the 3 yogurts was performed by 10 trained subjects. 34 descriptors were used including visual texture with a spoon, texture in mouth, odour (orthonasal olfactory perception) and aroma (retronasal olfactory perception) and taste by a comparative descriptive analysis. The subjects evaluated the intensity of the samples (MPO, CAS, WP) compared to the reference MPO, which was anchored in the middle of the unstructured intensity scale varying from "less intense" to "more intense" than reference. Data acquisition was assisted by Fizz software (Biosystèmes®, 1999).

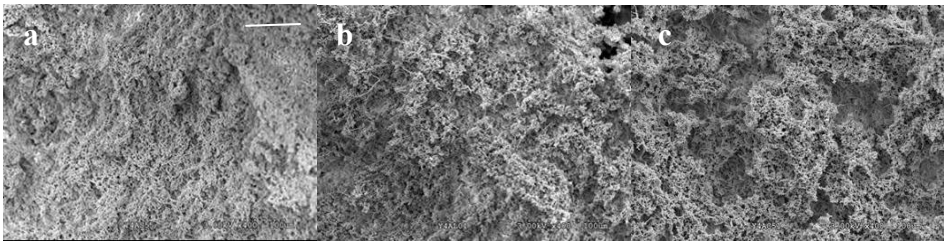
Data analysis

Data analyses were carried out using SAS software package, version 9.1 (SAS® Statistics, 1990). Factorial discriminant analyses (procedures discrim and stepdisc of SAS) were used to reveal the sensory and release differences between yogurts.

RESULTS AND DISCUSSION

Physical properties and texture perception influenced by the ratio of proteins

Yogurts differed significantly in complex viscosity. The CAS yogurt had the highest complex viscosity: η*=80 Pa s. On the other hand, the yogurt WP was the least viscous (η*=40 Pa s) and the yogurt MPO was intermediate (η*=60 Pa s). These results are in agreement with [8-9], who reported that, at similar protein levels, the addition of caseinate instead of MPO in the dairy mix enhanced strongly the yogurt viscosity. Structures observed by SEM differed between the yogurts. Protein network of WP was compact and presented a more uniform distribution of the gel. On the contrary, a heterogeneous structure with numerous pores appeared for CAS (Figure 1). These results correspond to those of [7], who observed irregular gel organisation in yogurt from MPO and CAS and a fine network containing very small pores in WP yogurts.



1. Figure 1. Microstructure of yogurts obtained from milk bases enriched with WP (a), MPO (b) and CAS (c) with ratio caseinates/total proteins: WP (60%), MPO (81%), CAS (86%). Bar-50µm.

The sensory descriptive analyses revealed quite large differences in texture perception between the 2 products and the reference. The flavoured yogurt CAS was visually more granular (+45%) and less ropy (-20.4%) than MPO. In mouth, CAS appeared more granular (+34%) and less mouth coating (-20%) than MPO. WP was perceived ropier (+25%) and less thick (-30%) than MPO. Visually, WP appeared as granular as MPO. In mouth, WP was judged mouth-coating as MPO. Thickness scores were correlated to the complex viscosity measurements. CAS was the most viscous and the thicker and WP the least. Moreover, the visual observations of gel microstructure can be related to the macroscopic evaluation of yogurt appearance through the attribute granular. Our results corroborated those of [1].

VOC release and olfactory perception influenced by the ratio of proteins

Stepwise discriminant analysis led to the selection of a subset of 7 VOCs ($p<0.05$): ethyl hexanoate, hexanal, ethyl octanoate, methyl cinnamate, ethyl acetate, Z-3-hexenol and ethyl butyrate quoted by decreasing order of discriminating power between yogurts (Figure 2). CAS was characterized by a low release of VOC, except for Z-3-hexenol.

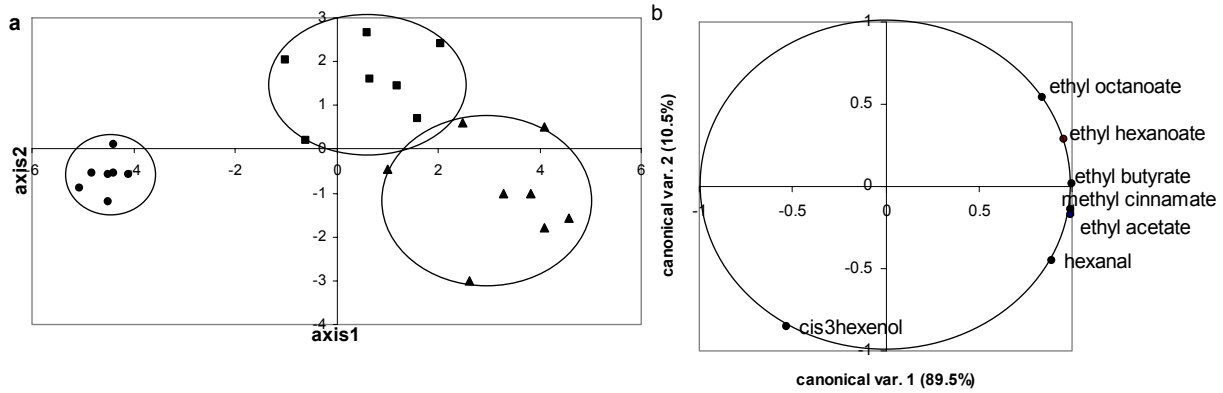


Figure 2. a-Product mapping of the factorial discriminant analysis with CAS (●), MPO (▲) and WP (■); (ratio: WP (21.5/54), MPO (10.1/54), CAS (7.5/54)) b-Variables (VOC) map.

The VOC release of WP and MPO was higher than for CAS. But differences between WP and MPO were revealed: the release of ethyl octanoate was higher for WP than for MPO and the contrary was observed for methyl cinnamate.

However, variations of VOC release were quite low between yogurts: about 10% to 30% of variation between CAS and MPO and less than 10% between WP and MPO.

From the profiling, stepwise factorial discriminant analysis selected 6 orthonasal and retronasal attributes from the whole set of olfactory descriptors: pineapple in mouth, green in nose, fruity, overall intensity, peach and vanillin in mouth. CAS was not very intense in flavour, compared to WP (more intense in flavour, especially in green note). The product MPO was characterized as pineapple.

To conclude, the protein ratio modifies the behaviour of VOC and their release. Consequently, it affects the olfactory perception. In the present study, CAS retained the majority of VOC and was perceived less intense than the 2 other yogurt types. The reverse was observed for WP. For ethyl butyrate and methyl cinnamate the release was highest in MPO, but no sensory effect was observed. Consequently, the sensory results could not fully be explained by physico-chemical interactions between the proteins and the VOC. This observation tends to support the hypothesis that the VOC headspace concentration can not alone predict flavour intensity. Previous studies have shown that a decrease in aroma intensity

cannot systematically be explained by a variation of the concentration of VOC released in the breath when viscosity increases [3]. Sensory interactions between texture and flavour also play a role on the perception [10].

CONCLUSION

Proteins had principal effects on the physical properties and texture perception of flavoured yogurt, and secondly on VOC release and olfactory attributes. There were strong relationships between rheological properties and texture attributes and also between release of VOC and olfactory attributes.

References

1. A.Y. Tamime and R.K. Robinson, Yoghurt, Paris, France (1985) 431.
2. I. Sodini, F. Remeuf, S. Haddad and G. Corrieu, Crit. rev. Food Sci. Nutr., 44 (2) (2004) 113.
3. K. Weel, A. Boelrijk, A. Alting, P. Van Mil, J. Burger, H. Gruppen, A. Voragen and G. Smit, J. Agric. Food Chem., 50 (2002) 5149.
4. N. Decourcelle, S. Lubbers, N. Vallet, P. Rondeau and E. Guichard, Int. Dairy J., 14 (9) (2004) 783.
5. A.M. Seuvre, M.A. Espinosa Diaz and A. Voilley, J. Agric. Food Chem., 48 (9) (2000) 4296.
6. E. PaçiKora, I. Souchon, E. Latrille, N. Martin and M. Marin, J. Agric. Food Chem., 52 (10) (2004) 3048.
7. F. Remeuf, S. Mohammed, I. Sodini and J.P. Tissier, Int. Dairy J., 13 (9) (2003) 773.
8. Y.H. Cho, J.A. Lucey and H. Singh, Int. Dairy J., 9 (8) (1999) 537.
9. T.P. Guinee, C.G. Mullins, W.J. Reville and M.P. Cotter, Milchwiss., 50 (4) (1995) 196.
10. A. Saint-Eve, E. PaciKora and N. Martin, Food Quality Pref., 15 (7-8) (2004) 655.

Proceeding du Congrès 11th Weurman Flavour Research Symposium (2005).

The integration of the packaging material in the formulation of flavoured yogurts: how to choose the kind of polymer in accordance with the yogurt composition?

Anne Saint-Eve,[a] Cécile Levy,[a] Marine Le Moigne,[a] Solenn Coic,[b] Violette Ducruet,[b] Isabelle Souchon[a]

[a]UMR GMPA, INRA ; [b]UMR SCALE, INRA, France

Keywords: Yogurt, packaging, storage period, fat content, sensory analysis, sorption

ABSTRACT

The influence of the packaging polymer (polypropylene or polystyrene) on the sensory and physicochemical characteristics of flavoured stirred yogurts was investigated during 28 days of storage at 4°C. The yogurts with either 0% or 4% of fat content were flavoured with a strawberry aroma. Higher impact of packaging on fat free yogurts than on 4% fat yogurts was observed on both sensory and physicochemical characteristics. A fast loss of the fruity notes during the first 14 days was obtained in accordance with the decrease of the aroma compound content. Then a relative stabilization of the flavour in the case of polypropylene was observed. However, polystyrene packaging seemed to be preferable for fat free yogurts in order to limit flavour losses.

INTRODUCTION

Packaging materials are essential to protect the food product and to preserve its inherent quality during the storage. The interactions between food constituents and packaging materials may alter the organoleptic quality of the product, and has to be minimized [1]. The interactions occurring during storage are mainly i) sorption phenomena from food to packaging materials and ii) migration phenomena from packaging to food. The sorption of flavour compounds is influenced by the properties of the polymers and the flavour molecules, and by the external conditions of storage (time, temperature…) [2].

Knowledge of the behaviour of yogurt during storage is important because changes of quality characteristics may appear. Indeed, the time of storage can cause a fall in the acidity of fresh dairy products and an increase in yogurt viscosity [3-4].

To our knowledge, the influence of the packaging type on fresh dairy products has been little studied. The rare studies are based on model systems. In this context, the influence of the kind of packaging polymer (polypropylene (PP) or polystyrene (PS)) on the sensory characteristics

of flavoured stirred yogurts was investigated during 28 days of storage at 4°C. The yogurts with either 0% or 4% of fat content were flavoured with a strawberry aroma.

MATERIALS AND METHODS

Product preparation

Fermented milk products were either 0% or 4% fat stirred flavoured yogurts [5]. Yogurts were flavoured with a strawberry aroma containing 17 volatile compounds. Their concentrations ranged from 1.01 to 32.53 mg/kg in the final product.

The products (Table 1) were conditioned in three different kinds of packaging: glass used as reference (G), polystyrene (PS) and polypropylene (PP).

Table 1: Products studied and abbreviations used.

Product abbreviation	Fat content (%)	Packaging	Days of storage	Product abbreviation	Fat content (%)	Packaging	Days of storage
0gt2	0	Glass	2	4gt2	4	Glass	2
0pst2	0	PS	2	4pst2	4	PS	2
0ppt2	0	PP	2	4ppt2	4	PP	2
0gt14	0	Glass	14	4gt14	4	Glass	14
0pst14	0	PS	14	4pst14	4	PS	14
0ppt14	0	PP	14	4ppt14	4	PP	14
0gt28	0	Glass	28	4gt28	4	Glass	28
0pst28	0	PS	28	4pst28	4	PS	28
0ppt28	0	PP	28	4ppt28	4	PP	28

Physicochemical measurements

The complex viscosity of the three yogurt matrices was measured at 10°C, in harmonic regime with a rheometer [5]. The pH of the products was measured at 4°C. The release of volatile compounds at 4°C was measured by solid-phase microextraction using a gas chromatograph combined with an automatic headspace sampler CombiPal.

Sensory profile

A descriptive sensory analysis of the yogurts was assessed by 15 trained subjects. Descriptive quantitative analyses after 2, 14 and 28 days of storage were based on 30 descriptors related to visual texture with a spoon (V), texture in mouth (M), odour (N) (orthonasal olfactory perception), aroma (M) (retronasal olfactory perception) and taste. The subjects evaluated the

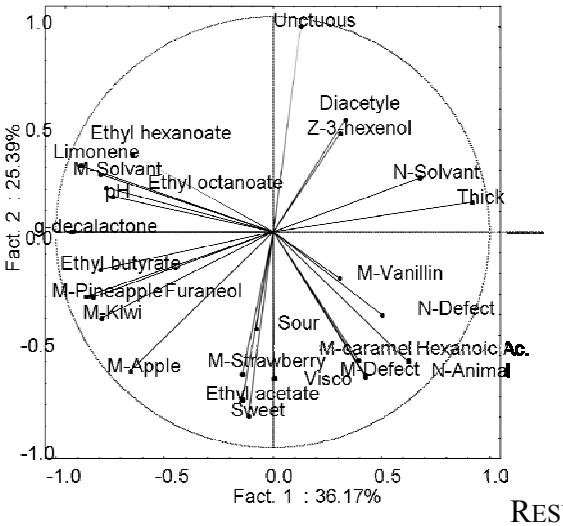
intensity perceived for each descriptor on an unstructured scale anchored with the terms ’very weak‘ and ’very intense‘. A replication was performed for each product.

RESULTS AND DISCUSSION

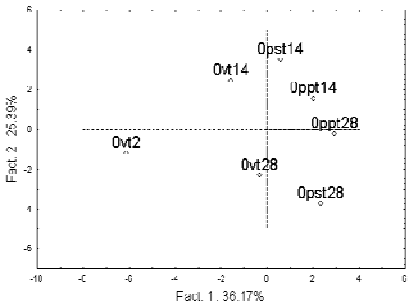
Evolution during the storage of low fat stirred yogurts

A principal component analysis (PCA) based on the correlation matrix was performed on the yogurt samples, using sensory and physicochemical variables, which significantly varied according to the product. A 3-factor analysis of variance (time, packaging, subject) with interaction on the sensory data set, and 2-factor ANOVA (time, packaging) with interaction on the physicochemical data set was performed. 17 sensory descriptors and 12 physicochemical parameters varied significantly according to the time of storage, the packaging or the interaction time of storage*packaging ($p<0.05$). The first factorial plot of PCA showed that fruity notes perception and aroma compounds quantity decreased from the 2nd to 14th day of storage, contrary to the thick perception, which increased during the storage. Indeed, perceived intensities of the olfactory notes kiwi, apple and solvent declined. In parallel, several aroma compounds had a significant and similar evolution during the storage: ethyl acetate, furaneol and limonene, which decreased during ageing (53.2% for the limonene from the 2nd to the 28th day of storage). It also corroborated findings of [4], who had observed a decrease of some flavour compounds during the ageing of flavoured yogurts.

a



b



RESUME

2. Figure 1: PCA biplot on the descriptive quantitative analysis scores of the 0% fat yogurts. a-variable map, b-product map

In opposition, hexanoic acid quantity increased strongly and significantly ($p<0.02$) between the 14th and 28th day (+133%). This increase could be related to the increase of animal odour and defect of flavour perception, especially between the 14th and the 28th day of storage. Moreover, the pH decreased during ageing from 4.30 to 4.10.

The 2nd axis of PCA illustrates mainly the evolution of yogurt between the 14th and 28th day of storage. Concerning the texture attributes, yogurts were perceived thicker from the 14th day. Rheological measurements confirmed this observation: an increase of the complex viscosity of the low fat yogurts of 71% was observed. Higher viscosities were attributed to exopolysaccharide production due to bacterial activity, confirmed by the decrease of pH during the storage [4-6]. According to [4], the changes in rheological properties observed during ageing could partly explain the results in flavour release.

Effect of the type of packaging of low fat stirred yogurts during the storage

In general, the time effect dominated the packaging effect, but differences between the 3 packaging materials appeared. Yogurts conditioned in PS and glass materials had a similar evolution. Defect notes appeared at the end of the storage time, mainly for yogurts conditioned with polystyrene, and probably due to the migration of small molecules from the packaging to the food. Beyond 14 days, a stabilization of the composition and the perception of the product flavour was observed only when the latter was packed in a polypropylene pot. Moreover, the quantity of yogurt aroma compounds in the 3 packagings decreased during the storage, but yogurt conditioned in glass presented the lowest decrease. The properties of the packaging polymers (higher density of polystyrene) could explain the evolution of the products by kinetics of sorption, i.e. the sorption being slower on polystyrene than on polypropylene.

However, in a fat free yogurt, the flavour compounds, and in particular the esters, exhibited a greater affinity for polypropylene than for polystyrene.

CONCLUSION

The analyses of the products stored at 4°C highlighted for all kinds of packaging a fast evolution of the low fat yogurts during the first 14 days, at the physicochemical and sensory levels. A polystyrene packaging seems to be preferable to avoid loss of fruity notes in flavoured yogurts used in this study. Less significant effects were observed for yogurts with 4% fat content than with fat free yogurts.

References

1. R. Van Willige, D. Schoolmeester, A. van Ooij, J. Linssen and A. Voragen, J. Food Sci., 67 (6) (2001) 2023.
2. V. Ducruet, N. Fournier, P. Saillard, A. Feigenbaum and E. Guichard, J. Agr. Food Chem. 49 (5) (2001) 2290.
3. N. Martin, J. Skokanova, E. Latrille, C. Beal and G. Corrieu, J. Sens.Stud., 14 (1999) 139.
4. S. Lubbers, N. Decourcelle, N. Vallet and E. Guichard,, J. Agr. Food Chem., 52 (10) (2004) 3077.
5. E. Paçi Kora, E. Latrille, I. Souchon and N. Martin, J. Sens. Stud., 18 (5) (2003) 367.
6. Z.B. Guzel-Seydim, E. Sezgin and A. Seydim, Food Control 16 (3) (2005) 205.
7. M.S. Brauss, S.T. Linforth, I. Cayeux, B. Harvey and A.J. Taylor, J. Agr. Food Chem. 47 (1999) 2055.

Résumé :

Une approche couplant analyses physicochimique et sensorielle a été mise en oeuvre pour comprendre le rôle de la viscosité complexe, modifiée par la composition en protéines et l'intensité du traitement mécanique appliqué, sur la perception olfactive au cours de la consommation de yaourts brassés aromatisés.
La viscosité complexe des yaourts influence les propriétés sensorielles des matrices et la libération des composés d'arôme en conditions statiques, c'est-à-dire en conditions non agitées et à l'équilibre entre phases aire et matrice. Globalement, les yaourts les plus visqueux libèrent de plus faibles quantités de composés d'arôme et sont perçus les moins intenses en arôme, quel que soit le facteur de variation de la viscosité complexe, composition protéique ou traitement mécanique.
Or, la consommation est un processus dynamique. C'est pourquoi des mesures *in vivo* de libération des composés d'arôme dans la cavité nasale ont été effectuées en parallèle de l'évaluation de la perception olfactive au cours de la consommation. Lors de l'ingestion, les variations de quantités de composé d'arôme libérés dans la cavité nasale, dépendantes des différences de viscosité complexe des matrices, contribuent à expliquer les différences de perception de l'intensité aromatique.
Par ailleurs, la composition protéique influence la libération des composés d'arôme uniquement lorsque les yaourts présentent de larges variations de viscosité complexe et par conséquent de texture. Lorsque les yaourts subissent un fort traitement mécanique, aucun effet de la composition protéique sur la libération et la perception des composés d'arôme n'est observé. Ainsi, en bouche, la libération des composés d'arôme et leur perception sont plus influencées par les différences de viscosité complexe que par les interactions protéine-composés d'arôme.
Afin d'affiner les hypothèses des mécanismes de libération des composés d'arôme en bouche, l'impact de la déstructuration des matrices a été étudié en conditions *in vitro*. Mais, la libération des composés ne dépend pas de cette déstructuration. Ainsi, la viscosité complexe, qui pourrait expliquer des différences de surface d'échange entre le produit et la cavité buccale, constituerait le facteur clé à l'origine de la perception aromatique.
Par ailleurs, l'influence de l'emballage sur les caractéristiques physicochimiques et sensorielles de yaourts brassés aromatisés a également été étudiée au cours du stockage. Les propriétés physicochimiques et sensorielles des yaourts à 0% de matière grasse sont davantage influencées par la nature de l'emballage que celles des yaourts à 4% de matière grasse. Un emballage en polystyrène semble préférable pour éviter la perte des notes fruitées du yaourt. Ces résultats montrent la nécessité d'intégrer la nature de l'emballage dans la formulation de la composition aromatique du yaourt.

Mots-clé : yaourt, protéines laitières, traitement mécanique, libération, arôme, perception, texture, rhéologie, analyse « nosespace ».

Abstract :

The influence of complex viscosity, induced by protein composition and mechanical treatment, on olfactory perception of flavoured stirred yogurts during eating has been studied through physicochemical and sensory approaches.
The complex viscosity of yogurts influenced the sensory properties and the aroma release in static conditions that means in non mixing and in equilibrium conditions. Generally, the most viscous yogurts released less quantity of aroma compounds and were perceived less intense in aroma, whatever the factors of variation of the complex viscosity (mechanical treatment or protein composition).
As consumption is a dynamic process, *in vivo* measurements of aroma release in nasal cavity were performed in parallel to the evaluation of olfactory perception during eating. At swallowing, the aroma quantity released in the nasal cavity, which is dependent on complex viscosity differences can explained the perceived intensity.
Moreover, protein composition influences the aroma release only when the yogurts present wide variations of complex viscosity, and subsequent texture. But no effect of protein composition on aroma release and perception is observed when the yogurts were subjected to a high mechanical treatment. Thus, in mouth, the aroma release and the olfactory perception are more influenced by complex viscosity variations than by interactions between aroma compounds and proteins.
In order to specify the hypotheses of the mechanisms of aroma release in mouth, the impact of shearing on yogurts was investigated in *in vitro* conditions. But, the aroma release is not influenced by this shearing. Thus complex viscosity, which could explained the exchange area generated between product and mouth cavity, would be the key factor at the origin of the olfactory perception.
Moreover, the influence of packaging on physicochemical and sensory characteristics of flavoured stirred yogurts was studied during the storage. The physicochemical and sensory properties of low fat stirred yogurts are more influenced by the type of packaging than those of 4% fat stirred yogurts. To avoid the loss of the fruity notes of the yogurts, a polystyrene packaging seems better. These results showed the necessity of integrating the nature of packaging into the formulation of the aroma composition of yogurts.

Key-words: yogurt, milk protein, mechanical treatment, release, aroma, perception, texture, rheology, nosespace.